Forschungszentrum Jülich

Institut für Biotechnologie

Prozeßentwicklung zur simultanen Produktabtrennung von L-Phenylalanin

Dietrich Maaß

Jül-3888

Prozeßentwicklung zur simultanen Produktabtrennung von L-Phenylalanin

Dietrich Maaß

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3888
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-3888
D83 (Diss., Berlin, T.U., 2001)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Inhaltsverzeichnis

NOMENKLATUR IV

KURZFASSUNG DER ARBEIT VII

1 EINLEITUNG 1

2 STAND DES WISSENS 2

2.1 MOTIVATION FÜR DEN INTEGRIERTEN ANSATZ 2
2.1.1 BIOLOGISCHE GRÜNDE 2
2.1.2 TECHNISCHE GRÜNDE 3
2.1.3 GEGENÜBERSTELLUNG DER PROZEßVARIANTEN 4
2.1.4 BEWERTUNG UND VERGLEICH DER PROZEßVARIANTEN 8
2.2 VERFAHRENSTECHNISCHE GRUNDLAGEN 9
2.2.1 FLÜSSIGMEMBRANVERFAHREN 9
2.2.2 STOFFTRANSPORTMECHANISMEN 11
2.2.3 FLÜSSIGMEMBRANTECHNIK 14
2.3 EINSATZMÖGLICHKEITEN VON HOHLFASERMODULEN 16
2.3.1 EINFACHE HOHLFASERPERMEATION 16
2.3.2 HOHLFASER-EMULSIONS-PERTRAKTION 16
2.3.3 PERTRAKTION MIT ZWEI HOHLFASERMODULEN 17
2.4 HOHLFASERMODULE ZUR DISPERSIONSFREIEN EXTRAKTION 18
2.5 FLUIDDYNAMIK IN HOHLFASERMODULEN 20
2.5.1 STRÖMUNG IN DEN HOHLFASERN 20
2.5.2 STRÖMUNG IM MANTELRAUM 21
2.6 REAKTIVEXTRAKTION IN DER BIOTECHNOLOGIE 23
2.7 PRÄZIPITATION 24
2.8 CHEMISCHE GRUNDLAGEN 25
2.8.1 L-PHENYLALANIN 25
2.8.2 GLEICHGEWICHT 26
2.8.3 KINETIK 27
2.8.4 EXTRAKTIONSMITTELKLASSEN 27
2.9 REAKTIONSORT / EXTRAKTIONSMECHANISMEN 28
2.10 BESCHREIBUNG DES STOFFTRANSPORTS 29
2.10.1 EXTRAKTION 29
2.10.2 RÜCKEXTRAKTION 30
2.10.3 MODELLIERUNG DES STOFFTRANSPORTS 31

3 PROBLEMSTELLUNG 33

4 MATERIAL UND METHODEN 34

4.1 ON-LINE ANALYTIK 34
4.1.1 CO_2 UND O_2 IM ABGAS 34
4.1.2 PH-WERT 34
4.1.3 SAUERSTOFFPARTIALDRUCK 34
4.1.4 DRUCK 34
4.1.5 PROZEßDATENERFASSUNG 34
4.2 OFF-LINE ANALYTIK 35
4.2.1 GLUCOSEKONZENTRATION IM FERMENTATIONSMEDIUM 35
4.2.2 OPTISCHE DICHTE UND BIOTROCKENMASSE 35
4.2.3 AMINOSÄUREN IN WÄßRIGER LÖSUNG 35

4.2.4	ORGANISCHE SÄUREN IN WÄßRIGER LÖSUNG	36
4.2.5	ELEMENTARANALYSE DER WÄßRIGEN PHASEN	36
4.2.6	PROTEINE IM ÜBERSTAND	36
4.2.7	MESSUNG DER ZELLINTERNEN METABOLITE	37
4.3	**AUSWAHL DER EINGESETZTEN STOFFSYSTEME**	**37**
4.4	**SATZWEISE EXTRAKTIONEN IN RÜHRZELLEN**	**41**
4.4.1	VARIATION DER EINGESETZTEN GEGENIONEN	42
4.4.2	EINFLUß DES D_2EHPA GEHALTS	42
4.4.3	EINFLUß DER L-PHENYLALANINKONZENTRATION	42
4.4.4	REVERSIBILITÄT DER EXTRAKTION	42
4.5	**KINETISCHE MESSUNGEN IN DER RÜHRZELLE NACH NITSCH**	**42**
4.6	**REAKTIVEXTRAKTIONEN IM HOHLFASERMODUL**	**44**
4.6.1	DIE VERWENDETEN MODULE	44
4.6.2	REINIGUNG VON HOHLFASERMODULEN	46
4.6.3	AUFBAU DER EXTRAKTIONSANLAGEN	48
4.6.4	KREISLAUFEXPERIMENTE	51
4.6.5	DURCHLAUFEXPERIMENTE	52
4.7	**AUFKONZENTRIERUNG**	**53**
4.8	**WEITERE PRODUKTREINIGUNG**	**53**
4.8.1	PRÄZIPITATION IM THERMOSTATISIERTEN BECHERGLAS	53
4.8.2	KONTINUIERLICHE FÄLLUNG IM SEDIMENTER	54
4.9	**DAS BIOLOGISCHE SYSTEM**	**54**
4.9.1	STAMMHALTUNG UND SCHÜTTELKOLBENKULTIVIERUNG	55
4.10	**AUFBAU UND DURCHFÜHRUNG DER FERMENTATIONEN**	**55**
4.10.1	FERMENTATION IM ZULAUFVERFAHREN IM 7,5 L- FERMENTER	56
4.10.2	FERMENTATION IM ZULAUFVERFAHREN MIT FILTRATIONSUMLAUF	57
4.10.3	FERMENTATION IM ZULAUFVERFAHREN IN SCHÜTTELKOLBEN	59
4.11	**DEMONSTRATIONSEXPERIMENT IM PILOTMAßSTAB**	**60**
5	**ERGEBNISSE**	**62**
5.1	**SATZWEISE EXPERIMENTE ZUR AUSWAHL GEEIGNETER STOFFSYSTEME**	**62**
5.1.2	SATZWEISE EXTRAKTIONEN MIT VERSCHIEDENEN EXTRAKTIONSMITTELN	63
5.1.3	AUSWAHL GEEIGNETER GEGENIONEN	65
5.1.4	EINFLUß DES D_2EHPA ANTEILS	67
5.1.5	EINFLUß DER KONZENTRATION AN L-PHENYLALANIN	69
5.1.6	REVERSIBILITÄT DER EXTRAKTION	69
5.1.7	BERECHNUNG DES GLEICHGEWICHTS	70
5.2	**EINSATZ DER CARRIER ZUR HOHLFASERGESTÜTZTEN EXTRAKTION**	**71**
5.2.1	HOHLFASERPERTRAKTION IM LABORMAßSTAB	71
5.2.2	PERTRAKTION IM TECHNISCHEN MAßSTAB	72
5.2.3	VARIATION DER CARRIER KONZENTRATION	75
5.2.4	VARIATION DER PROTONENKONZENTRATION	76
5.2.5	BERECHNUNG DER STOFFÜBERGANGSKOEFFIZIENTEN	77
5.2.6	VARIATION DER VOLUMENSTRÖME	78
5.2.7	ANMERKUNGEN ZUM BETRIEB IM PILOTMAßSTAB	81
5.2.8	AUFKONZENTRIERUNG	84
5.2.9	SELEKTIVITÄT DER EXTRAKTION	86
5.2.10	PRÄZIPITATION	87
5.3	**UNTERSUCHUNGEN ZUR STOFFTRANSPORTLIMITIERUNG**	**87**
5.3.1	BERECHNUNG DER STOFFÜBERGANGSKOEFFIZIENTEN	88
5.3.2	KINETISCHE MESSUNGEN IN DER RÜHRZELLE	88
5.3.3	KINETIK DER HOHLFASEREXTRAKTION	88

5.4 BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN 92
5.4.1 FED-BATCH FERMENTATIONEN IN PH GEREGELTEN SCHÜTTELKOLBEN 92
5.4.2 ÜBERTRAGUNG IN DEN LABORMAßSTAB 95
5.4.3 WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN D_2EHPA UND *E.COLI* 99
5.5 DEMONSTRATIONSEXPERIMENT IM PILOTMAßSTAB 101

6 FEHLERBETRACHTUNG 104

7 DISKUSSION 105

7.1 EXTRAKTIONSMITTELAUSWAHL 105
7.1.1 TERTIÄRE AMMONIUMVERBINDUNGEN 105
7.1.2 QUARTERNÄRE AMMONIUMVERBINDUNGEN 106
7.1.3 SCHWEFELSÄUREESTER 107
7.1.4 PHOSPHORSÄUREESTER 107
7.1.5 EINFLUß DER L-PHENYLALANINKONZENTRATION 109
7.1.6 REVERSIBILITÄT DER EXTRAKTION 109
7.1.7 EINSATZ VON EXTRAKTIONSMITTELN UNTERSCHIEDLICHER REINHEIT 109
7.1.8 EXTRAKTIONSAUSBEUTE BEI VERSCHIEDENEN CARRIERKONZENTRATIONEN 111
7.2 EINFLUß DES PH-WERTES 112
7.3 AUSWAHL DER GEGENIONEN 116
7.3.1 $(NH_4)_2SO_4$ 116
7.3.2 KCL 116
7.3.3 KOH 116
7.3.4 NAOH 117
7.3.5 H_2SO_4 117
7.4 EINFLUß DER HYDRODYNAMIK 118
7.5 BESCHREIBUNG DES STOFFÜBERGANGS 118
7.5.1 MESSUNG DER STOFFÜBERGANGSKINETIK 118
7.6 MODELLBILDUNG 120
7.7 AUFKONZENTRIERUNG UND WEITERE VERFAHRENSSCHRITTE 120
7.8 AUSBEUTE DES INTEGRIERTEN VERFAHRENS 121
7.9 BIOLOGISCHE EFFEKTE DES PHOSPHORSÄUREESTERS 122
7.10 DEMONSTRATIONSEXPERIMENT ZUR INTEGRIERTEN PRODUKTABTRENNUNG 124

8 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK 126

9 ANHANG 128

9.1 ERGEBNISSE DER DURCHLAUFEXPERIMENTE 128
9.2 BELADUNGSDIAGRAMME FÜR VERSCHIEDENE D_2EHPA-ANTEILE 129
9.3 MEDIEN UND LÖSUNGEN 131

10 BIOLOGISCHE GRUNDLAGEN 134

10.1 GLUCOSEVERWERTUNG BEI *ESCHERICHIA COLI* 134
10.2 SYNTHESE AROMATISCHER AMINOSÄUREN BEI *ESCHERICHIA COLI* 136
10.3 PROZEßFÜHRUNG IN BIOREAKTOREN 138
10.4 PROZEßKINETISCHE GRÖßEN 140
10.4.1 WACHSTUM 140
10.4.2 BILANZIERUNG VON O_2 UND CO_2 141

11 LITERATURVERZEICHNIS 150

Nomenklatur

Lateinische Symbole und Formelzeichen

A	Fläche	[m^2]
a	Aktivität	[-]
Bo	Bodensteinzahl	[-]
c	Konzentration	[mol l^{-1}]
C	Carrier	
CTR	Kohlendioxidtransportrate	[mmol $l^{-1}h^{-1}$]
d	Durchmesser	[m]
D	Diffusionskoeffizient	[cm^2 min^{-1}]
D	Verteilungskoeffizient	[-]
E	Extraktionsgrad	[%]
F	Phenylalanin	
H	Protonen	
j	Stoffstrom	[mol s^{-1}]
K	Gleichgewichtskonstante	[-]
K	Verteilungskoeffizient	[m s^{-1}]
l	Länge der Hohlfaser	[m]
N	Anzahl der Hohlfasern	[-]
OTR	Sauerstofftransportrate	[mmol $l^{-1}h^{-1}$]
p	Druck	[bar]
P	Produkt	
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (potentia hydrogenii)	[-]
pK	negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante	[-]
PV	Phasenverhältnis	[-]
Q	Volumenstrom	[m^3 s^{-1}]
R	Reaktionsrate	[mol s^{-1}]
Re	Reynoldszahl	[-]
S	Substrat	
Sc	Schmidtzahl	[-]
V	Volumen	[m^3]
w	Strömungsgeschwindigkeit	[m s^{-1}]
Y	Selektivität / Ausbeute	[mol mol^{-1}]

Griechische Symbole und Formelzeichen

β	Stoffübergangskoeffizient	[cm s^{-1}]
ε	geometrischer freier Volumenteil	[-]
η	dynamische Viskosität	[Pa s]
μ	Wachstumsrate	[g $g^{-1}h^{-1}$]
ν	kinematische Viskosität	[m^2 s]
π	Produktbildungsrate	[g $g^{-1}h^{-1}$]
ρ	Dichte	[kg l^{-1}]
σ	Substratverbrauchsrate	[g $g^{-1}h^{-1}$]

Indizes

*	im Gleichgewicht
0i	zum Zeitpunkt 0
a	außen
aq	in der wäßrigen Phase
AV	über die Gesamtanlage
B	Base
E	Extraktion
eff	effektiv
Ex	im Extrakt
F	Fermentation
ges	gesamt
h	hydraulisch
HF	Hohlfaser
hin	Hinreaktion
i	zum Zeitpunkt i
i	im Inneren der Hohlfaser
in	am Einlauf des Fermenters
m	Modul in der Membran
n	stöchiometrischer Koeffizient
org	in der organischen Phase
out	am Austritt des Fermenters
Phe	für L-Phenylalanin
Raff	im Raffinat
rück	Rückreaktion
S	Säure
tot	gesamt

Abkürzungen

AES	Atomemissionsspektroskopie
D_2EHPA	Di-2-ethylhexylphophorsäure
DNNSA	Dinonylnapthalinschwefelsäure
HFE	Hohlfaser-Emulsion
HFM	Hohlfasermodul
HX	unbeladener Carrier
L-PheX	beladener Carrier
O/W	Emulsion von Öl- in Wasserphase
W/O	Emulsion von Wasser- in Ölphase

Kurzfassung der Arbeit

Die Akkumulation von L-Phenylalanin in Fermentationsprozessen mit *E. coli*-Überproduzenten macht einen Prozess zur integrierten Produktabtrennung sowohl aus wirtschaftlicher als auch aus biologischer Sicht interessant.

Die membrangestützte Reaktivextraktion in Hohlfasermodulen kann als integrierte Produktabtrennung im Pilotmaßstab etabliert werden. Dabei sind maximale Trennleistungen von 11 g/m²h über die Hohlfasermembran erreichbar. Der Extraktionsprozess ist über eine Beziehung von Sherwood Zahl (Sh) in Abhängigkeit von Reynolds- und Schmidt-Zahl (Re, Sc) mathematisch zu beschreiben. Anhand dieses Modells können Einflüsse der Hydrodynamik für Auslegungsprozesse abgeschätzt werden. Die berechneten Stoffübergangskoeffizienten stimmen mit den experimentell ermittelten Werten weitgehend überein.

Ein biokompatibles Stoffsystem, bestehend aus Extraktions- und Lösungsmittel (Di-2-ethylhexyl-Phosphossäure,D_2EHPA und Kerosin), mit ausreichenden Extraktionsleistungen für L-Phe steht zur Verfügung. Die Toxizitätsschwelle des Extraktionsmittels liegt dabei oberhalb 20 %v/v. Unterhalb dieses Grenzwertes hat der Eintrag des Carriers in die Fermentation einen positiven Effekt auf die Produktbildung. Eine reversible Extraktion mit vollständiger Carrierregeneration wird durch den Einsatz von Schwefelsäurelösung als Extraktphase erreicht.

Mit der membrangestützten Reaktivextraktion kann L-Phenylalanin aus Fermentationspermeat im Pilotmaßstab abgetrennt und aufkonzentriert werden. Die Selektivität der Reaktivextraktion erreicht in Bezug auf den vorgelegten Fermentationsüberstand einen Wert von 97 %. Die Präzipitation des aufkonzentrierten Phenylalanins aus dem Extrakt liefert eine weißliche Trockensubstanz mit einer Reinheit von über 99 %.

Mit der entwickelten Technologie kann im Pilotmaßstab aus laufenden Fermentationsprozessen L-Phenylalanin im Kilogramm Maßstab abgetrennt und präzipitiert werden. Der Aufarbeitungsprozess besteht damit aus nur drei Einzelschritten. Durch die integrierte Produktabtrennung wird die Produktivität der Fermentation um Faktor 3,75 erhöht.

Mit der vorliegenden Arbeit kann die simultane Produktabtrennung aus Fermentationsprozessen mit direkter Raffinatrückführung erstmalig im Pilotmaßstab gezeigt werden.

1 Einleitung

Die Biotechnologie ist definitionsgemäß die integrierte Anwendung von Naturwissenschaften und Ingenieurwissenschaften mit dem Ziel, Organismen, Zellen, Teile daraus und molekulare Analoge technisch zu nutzen[1].

Die mikrobielle Herstellung von Aminosäuren wird derzeit in einem Maßstab von etwa einer Million Tonnen pro Jahr weltweit durchgeführt. Der Bedarf für Aminosäuren als Geschmacksverstärker, Futtermitteladditive, Antioxidantien oder Bestandteil von Nahrungsmitteln ist weiterhin ansteigend. Die Aminosäure L-Phenylalanin wird zum überwiegenden Teil in der Produktion des künstlichen Süßstoffs Aspartam eingesetzt. Mit jährlich 9000 Tonnen ist sie eine Aminosäure mit einem der größten Marktvolumina. Aufgrund des wachsenden Marktes für Aspartam ist auch ein steigender Bedarf an L-Phenylalanin zu erwarten.

Ältere Produktionsverfahren zur Herstellung von L-Phenylalanin verwenden enzymatische Methoden oder Ganzzell-Biotransformationen. Aufgrund der Kosten zur Herstellung der jeweiligen Precursor sind heute direkte Fermentationsverfahren mit Überproduzenten, ausgehend von Glucose und Ammoniak, ökonomisch sinnvoller[2].

Mit einem Weltmarktanteil von 70 % ist Monsanto heute der größte Produzent von Aspartam. Das eingesetzte L-Phenylalanin wird dazu fermentativ hergestellt. Der zweitgrößte Aspartam-Produzent ist die Holland Sweetener Company, eine Tochter des niederländischen DSM-Konzerns. In deren Produktionsverfahren wird eine enzymatische Kopplung zur Synthese des Aspartam verwendet[3]. Aufgrund der Spezifität des verwendeten Enzyms ist dabei der Einsatz von D/L-Phenylalanin möglich. Zur Verwertung muß jedoch das verbleibende D-Phenylalanin racemisiert werden, so daß die Verwendung von fermentativ hergestelltem L-Phenylalanin für den Gesamtprozeß ökonomisch sinnvoller wäre.

Zur Gewinnung des L-Phenylalanins aus Fermentationslösungen werden zunächst die Zellen über Zentrifugen und/oder Filtrationseinheiten abgetrennt. Dabei muß häufig bereits auskristallisiertes Phenylalanin durch pH-Verschiebung wieder in Lösung gebracht werden. Die weitere Produktaufarbeitung läuft über mehrere Verfahrensschritte (z.B. Adsorption, Entfärbung, Kristallisation) bis zum festen Endprodukt.

Verschiedene Autoren vermuten eine Produktinhibierung durch L-Phenylalanin im fermentativen Produktionsprozeß[4]. Arbeiten zur Analyse dieser Inhibierungen sind jedoch bisher nicht publiziert worden. Bei der fermentativen Herstellung von L-Tryptophan konnte jedoch eine Produktinhibierung beobachtet werden. Eine integrierte Abtrennung des L-Phenylalanins könnte demzufolge eine derartige Produktinhibierung vermeiden und des weiteren die angesprochene pH-Verschiebung der gesamten Fermentationslösung vor der Zellabtrennung umgehen.

Mit Hilfe des Organismus *Escherichia coli* sollte daher ein Fermentationsverfahren mit einer integrierten Abtrennung des Produktes entwickelt werden. Dieses Verfahren soll bis in den Industriemaßstab (>1000 t L-Phe/a) scale-up fähig sein. Da im Prozeßverlauf das gebildete Produkt im Reaktor akkumuliert, werden in der vorliegenden Arbeit Techniken zur simultanen Produktabtrennung entwickelt, um Produktinhibierungen zu vermeiden.

Die Komplexität der Fermentationslösung erfordert Aufarbeitungsverfahren mit hoher Selektivität für das Zielprodukt. Es werden daher verschiedene Aufarbeitungsvarianten überprüft. Dabei gilt es zum einen, die prinzipielle Eignung zur integrierten Produktabtrennung zu zeigen. Des weiteren sind die Selektivität, die Trennleistung und eine einfache Prozeßführung von Bedeutung.

2 Stand des Wissens

2.1 Motivation für den integrierten Ansatz

Die fermentative Herstellung von niedermolekularen Metaboliten kann besonders bei chiralen Verbindungen (wie z. B. L-Phenylalanin) eine Alternative zu chemischen Synthesen darstellen. Im Verlauf der Fermentation akkumuliert jedoch das gebildete Produkt im Reaktor und kann zu Inhibierungen führen. Um dies zu vermeiden, lassen sich Techniken zur simultanen Produktabtrennung einsetzen. Dazu werden Aufarbeitungstechniken in den Fermentationsprozeß integriert. Unter einem integrierten Ansatz wird in der vorliegenden Arbeit die zur Fermentation simultan ablaufende, kontinuierliche und integrierte Abtrennung des Produkts verstanden. Dabei wird in einem Bypass Produkt entnommen und das Produkt hieraus abgereichert. Durch den integrierten Ansatz wird eine Verbesserung der Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses erwartet. Die Gründe für diese Verbesserung lassen sich in biologische und technische Aspekte unterteilen.

2.1.1 Biologische Gründe

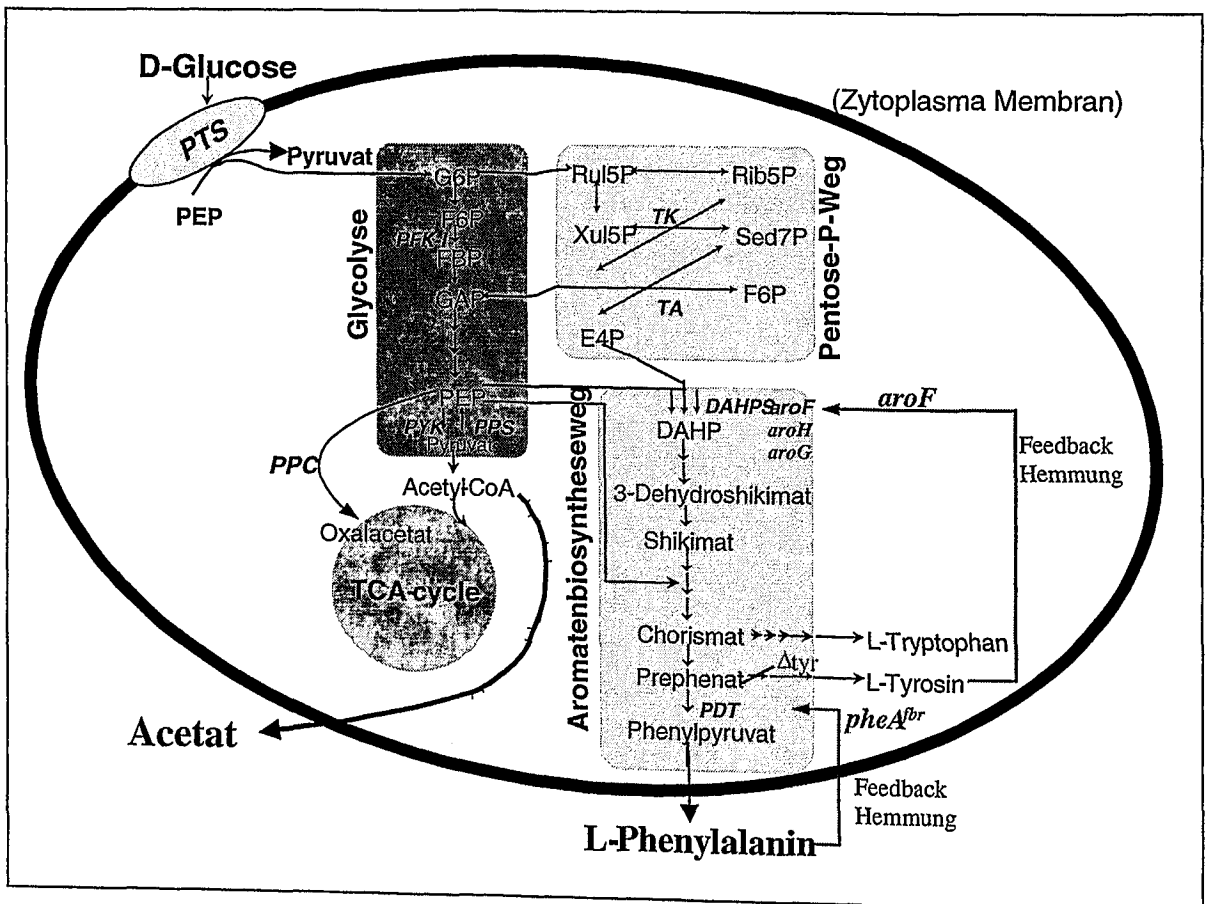


Abb. 2-1: Zentralstoffwechsel und Aromatenbiosynthese am Beispiel eines *E. coli*-Produktionsstammes mit genetischen Veränderungen in der Aromatenbiosynthese

Die biologisch motivierten Gründe für einen integrierten Prozeß sind im Aromatenbiosyntheseweg begründet. Wegen des hohen energetischen Aufwands der Aromatenbiosynthese ist dieser Weg auf mehreren Ebenen reguliert[5]. Neben der genetischen Regulation ist die allosterische Hemmung von Enzymen der wichtigste

Mechanismus[6]. So kann es im fortschreitenden Fermentationsverlauf durch Akkumulation der Aminosäure im Reaktor zur Verschlechterung der erzielbaren Ausbeuten kommen[7].

Der Grund hierfür liegt im folgenden Regulationsmechanismus: Die über das PTS-System aufgenommene Glucose wird innerhalb der Glykolyse zu Phosphoenolpyruvat (PEP) umgesetzt. Gleichzeitig wird Glucose-6-Phosphat im Pentose-Phosphat-Weg zu Erythrose-4-Phosphat (E4P) umgesetzt. Ausgangspunkt der Aromatenbiosynthese ist die Kondensation von je einem PEP und E4P zu Desoxyarabinoheptulosonat-7-phosphat (DAHP). Diese Reaktion wird durch die DAHP-Synthase katalysiert. Diese irreversible Eingangsreaktion in den Biosyntheseweg ist eine wichtige Regulationsstelle[8]. Die DAHP-Synthase liegt in Form von drei Isoenzymen vor, die durch die Endprodukte der Enzymkaskade Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan bei Akkumulation dieser spezifisch inhibiert werden. Die durch das Gen *aroG* codierte DAHP-Synthase wird durch Phenylalanin Feedback inhibiert. Das Gen *aroF* codiert wiederum die tyrosinspezifische DAHP-Synthase[9]. Bei unphysiologischen Konzentrationen an L-Phenylalanin, wie sie in einem Produktionsprozeß vorkommen, führt jedoch auch L-Phenylalanin zu einer Inhibierung dieses Enzyms. *In vitro* Untersuchungen zeigten, daß die DAHP-Synthase-Aktivität bei einer Konzentration von 10 g/l L-Phenylalanin bereits um 50% reduziert wird[10]. Bisher konnten molekularbiologische Arbeiten zur Vermeidung dieser Inhibierung nicht den gewünschten Erfolg bringen.

Trennt man das produzierte L-Phenylalanin durch entsprechende Techniken bereits während der Fermentation ab, lässt sich dieser negative Effekt vermutlich vermeiden, wie schon für andere Produkte gezeigt werden konnte[11]. Damit wäre eine Erhöhung des Produkttiters und der Raum-Zeitausbeute zu erwarten.[12]

2.1.2 Technische Gründe

Neben der biologischen Motivation für eine integrierte Produktabtrennung gibt es jedoch auch einige technische Aspekte, die einen integrierten Ansatz interessant erscheinen lassen[13]. Verschiedene Autoren[14/15] nennen relevante ökonomische Vorteile durch eine integrierte Abtrennung des Wertstoffes aus der laufenden Fermentation. Ein wichtiger Aspekt ist die theoretische Ausbeute von 100 % in der ersten Trennoperation. In vollständig integrierten Ansätzen kann diese Ausbeute erreicht werden, weil die Fermentationslösung im Kreislauf gefahren und vollständig rezykliert wird. Des weiteren können vorgelegte Nährsalze und Precursor bei selektiver Abtrennung des Produkts im Fermentationsprozeß weiter genutzt werden.

Eine bessere Ausnutzung der Reaktorvolumina durch die Integration führt ebenfalls zur Kostenersparnis[16]. Aufgrund der kontinuierlich betriebenen Aufarbeitung und der im Vergleich zu satzweisen Aufarbeitungsschritten kleinen Volumenströme sollten Investitionskosten eingespart werden können[17/18].

2.1.3 Gegenüberstellung der Prozeßvarianten

Ein Verfahren zur integrierten Produktabtrennung sollte folgende Merkmale aufweisen:

- selektive Abtrennung des Produkts
- möglichst geringe Verluste an vorgelegten Medienbestandteilen (Glucose, Salze, etc.)
- keine toxischen Effekte auf den Fermentationsprozeß
- geringe oder keine Veränderung der Ionenstärke des Fermentationsüberstands
- keine Beeinflussung der Mikroorganismen durch eine Gradientenbildung im Bypass (O_2, pH)
- Aufkonzentrierung des Produkts

Im folgenden werden einige Aufarbeitungsverfahren beschrieben, die für eine Prozeßintegration geeignet sein könnten. Aufgrund der Vor- und Nachteile der einzelnen Varianten wird dann das in dieser Arbeit eingesetzte Verfahren bestimmt.

2.1.3.1 Fließbettadsorption

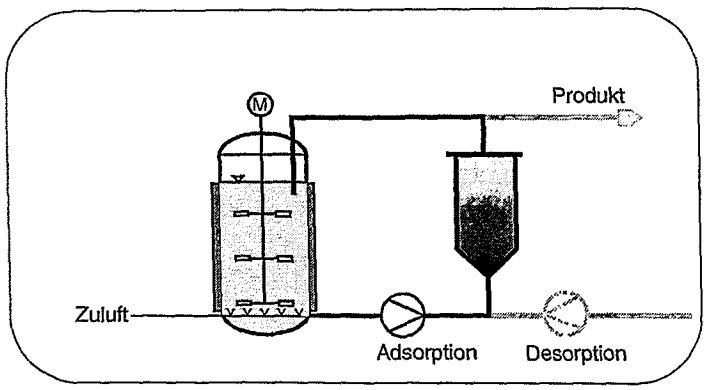


Abb. 2-2: Integration der Fließbettadsorption in den Fermentationsprozeß

Adsorptionsverfahren können in Form der Fließbettadsorption über einen Bypass direkt in den Prozeß integriert werden[19]. Abb. 2-2 zeigt das Prinzip dieses Verfahrens. Durch den Einsatz von Adsorbermaterialien großer Dichte kann ein Austragen der Partikel durch den Fluidisierungsstrom vermieden werden. Verwendet man ein Adsorbermaterial unterschiedlicher Dichte und Korngrößen, läßt sich das Fließbett als klassierende Wirbelschicht fahren. Dabei findet aufgrund der unterschiedlichen Dichte und Größe eine Schichtung der Adsorberpartikel statt. Durch diese Fluidisierung kann die Säule direkt mit biomassehaltiger Zulauflösung gefahren werden, da es nicht zu einer Verstopfung mit Mikroorganismen kommen kann[20]. Ist jedoch die Verweilzeit der Mikroorganismen in dem Bypass zu lang, können Gradienten auftreten (z.B. O_2, pH), wodurch es zu Limitierungen kommen kann. Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens für die Aufarbeitung von Primärmetaboliten ist der Mangel an selektiven Harzen für Aminosäuren, insbesondere L-Phenylalanin[21]. Bei der Verwendung nicht selektiver Ionentauscherharze würden jedoch auch Nährsalze aus der Fermentationslösung adsorbiert und müßten ersetzt werden[22/23].

2.1.3.2 Elektrodialyse

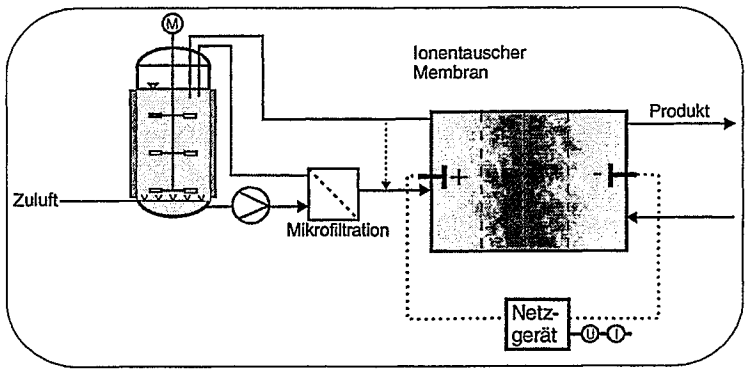


Abb. 2-3: Integration der Elektrodialyse in den Fermentationsprozeß

Bei der Abtrennung ionischer Komponenten aus verdünnten wäßrigen Lösungen liegt die Elektrodialyse nahe. Wie v. Eysmondt zeigen konnte, lassen sich mit dieser Methode Fermentationslösungen aufreinigen[24]. Die treibende Kraft des Trennprozesses und damit die Trenn- und Konzentrierungsleistung lassen sich über den angelegten Strom frei wählen[25]. Über ein Mikrofiltrationsmodul wird die Biomasse zurückgehalten und ein Permeatstrom dem Reaktor entnommen (Abb. 2-3). Um das L-Phenylalanin der Elektrodialyse zugänglich zu machen, muß vor dem eigentlichen Trennschritt ein pH-Shift erfolgen. Durch die Titration werden die im physiologischen Bereich zwitterionischen L-Phe Moleküle geladen. In einem Membranstapel werden dann die geladenen Aminosäuremoleküle durch den angelegten Strom aus dem Fermentationspermeat getrennt. Die Abtrennung fermentativ hergestellter Säuren konnte aus Modelllösungen für Zitronensäure[26] und Essigsäure[27] gezeigt werden. Die Probleme beim integrierten Einsatz der Elektrodialyse ergeben sich zum einen aus dem nötigen pH-Shift vor der Abtrennung. Dadurch werden erhebliche Salzfrachten in den Fermentationsprozeß eingetragen, die die Fermentation stören können. Ein weiteres Problem ist die geringe Selektivität. Aufgrund der starken Unterschiede in den Diffusionkoeffizienten werden beim Einsatz der Elektrodialyse in Aminosäureprozessen zunächst nur die anorganischen Ionen abgetrennt und dann erst die Aminosäuren[28]. Umgehen ließe sich dieses Problem durch den Einsatz geladener ionenselektiver Membranen[29], dann wäre jedoch ein zweifacher pH-Shift nötig, um das L-Phe zuerst als Kation und anschließend als Anion zu dialysieren und so die Salze abzutrennen.

2.1.3.3 Donnan Dialyse

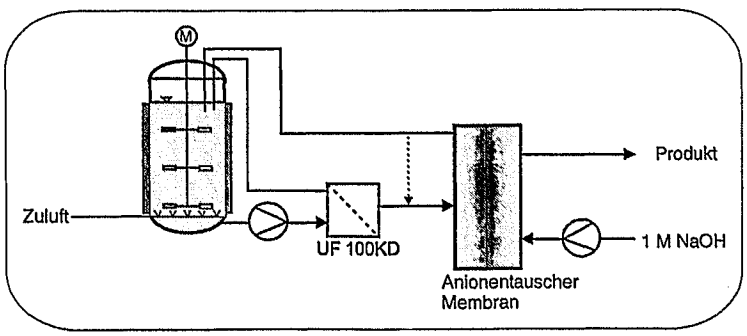


Abb. 2-4: Integration der Donnan Dialyse in den Fermentationsprozeß

Die Etablierung der Donnan Dialyse mit Ionentauschermembranen als integriertem Prozeßschritt scheint sehr vielversprechend. Im Gegensatz zur Elektrodialyse ist hier keine elektrische Spannung notwendig , um den Ionenübergang zu erzwingen[30]. Der treibende Gradient ist allein die vorgelegte Konzentration an Gegenionen[31]. In Abb. 2-4 ist die Implementation dieses Verfahrens in den Produktionsprozeß schematisch dargestellt. Nach Abtrennung der Biomasse und der Proteine in einer geeigneten Ultrafiltrationseinheit, wird

das Permeat in ein Modul mit Ionentauschermembran geführt. Jenseits der Membran werden hohe Konzentrationen an Gegenionen vorgelegt (z.B. Na^+ aus NaOH). Diese Ionen diffundieren durch die geladene Membran. Zur Wahrung der Elektroneutralität diffundieren im Gegenzug dazu andere Kationen auf die Akzeptorseite[32/33]. Mit diesem Verfahren sollte eine Aufkonzentrierung um den Faktor hundert oder höher möglich sein[34]. Bei der Donnan Dialyse können die Phasenverhältnisse frei gewählt werden, was eine Aufkonzentrierung ebenfalls erleichtert[35]. Zur Abtrennung organischer Säuren aus Fermentationsmedien liegt bereits eine Patentanmeldung vor[36], jedoch liegen die beschriebenen Trennleistungen und Selektivitäten in sehr niedrigen Bereichen. Bei der Donnan Dialyse werden alle Kationen aus der Fermentationslösung abgetrennt. Da jedoch die anorganischen Ionen aufgrund Ihrer geringen Größe wesentlich schneller diffundieren als das L-Phe, ist für komplexe Fermentationslösungen keine Selektivität für L-Phe vorhanden.

2.1.3.4 Integrierte Kristallisation

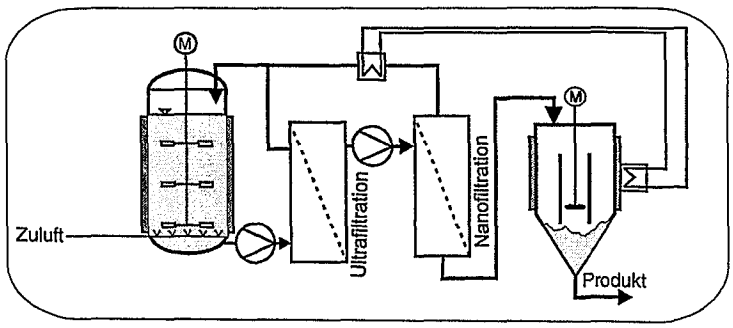


Abb. 2-5: Integration der Kristallisation in den Fermentationsprozeß

Die Integration eines Kristallisationsverfahrens in den Fermentations-Bypass bietet sich bei sehr hohen Produktkonzentrationen an. Die Löslichkeit von L-Phenylalanin in der Fermentationslösung liegt unter physiologischen Bedingungen (T = 25°C bis 37°C; pH = 6 bis 7) bei ca. 30 g/l. Oberhalb dieses Wertes läßt sich das Produkt kristallisieren. Abb. 2-5 zeigt schematisch das Integrationsprinzip einer Kristallisation. Über eine Ultrafiltration (UF) werden die Biomasse und die Proteine im Reaktor zurückgehalten. Durch Zwischenschaltung einer Nanofiltration wird das Permeat der UF weiter aufkonzentriert. Durch Absenken der Temperatur im Retentat wird die Kristallisation eingeleitet. Zur Energieersparnis kann eine Wärmepumpe eingesetzt werden. Die Vorteile dieses Verfahrens sind die gute Charakterisierung dieser Technologie und die Verfügbarkeit kompletter Anlagen auf dem Markt. Jedoch wird das preiswerte Verfahren der Kristallisation durch den Einsatz von teuren Membranfiltrationen ökonomisch sehr unattraktiv. Ohne diese Membranschritte wäre jedoch die Abreicherungsrate zu gering. Ein wesentlicher Nachteil ergibt sich zudem aus der Patentsituation. Tanabe und Ohmori von der Firma Ajinomoto haben das Verfahren 1995 zum Patent angemeldet[37].

2.1.3.5 Reaktivextraktion / Flüssigmembranverfahren

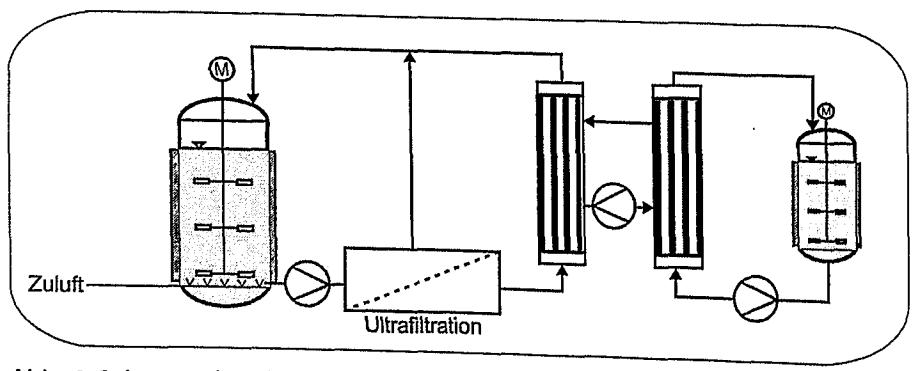


Abb. 2-6: Integration der Reaktivextraktion in den Fermentationsprozeß

Bei der Reaktivextraktion (Abb. 2-6) handelt es sich um ein Flüssigmembranverfahren. Dabei wird die filtrierte Fermentationslösung in einem geeigneten Kontaktor mit einer organischen Phase in Kontakt gebracht. Aufgrund des ionischen Charakters des L-Phe kann es ohne eine Maskierung der Ladungen nicht in die unpolare organische Phase übergehen. In der organischen Phase ist ein Carrier gelöst, der als Flüssigionentauscher fungiert und die Ladung des L-Phe maskiert, so daß es sich in der unpolaren Phase lösen kann. In einem zweiten Kontaktor kann das L-Phe durch Gegenionen vom Carrier verdrängt werden und in eine wäßrige Phase rückextrahiert werden. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Selektivität, welche durch die Affinität des aromatischen Rings am L-Phe zu einer organischen Phase und der Ladung des Carriers erzeugt wird. Durch diese Affinität werden mit einer hohen Selektivität Ionen mit einem aromatischen Rest extrahiert. Der einstellbare Gradient in Form der Gegenionen ermöglicht eine Extraktion entgegen des L-Phe-Gradienten, so daß auch aufkonzentriert werden kann. Der wesentliche Nachteil dieses Verfahrens liegt jedoch in der nötigen Titration des L-Phe. Um eine definierte Nettoladung am Molekül zu erzeugen, müßte das Raffinat vor der Extraktion in den stark sauren oder den stark basischen Bereich titriert werden. Nach der Extraktion muß dann zurück auf den Fermentations pH-Wert titriert werden. Dadurch werden erhebliche Mengen an Salzen in die Fermentation verschleppt. Ein weiterer Nachteil ist die mögliche Toxizität der Carrier auf die Organismen in der Fermentation.

2.1.3.6 Ionentauscher

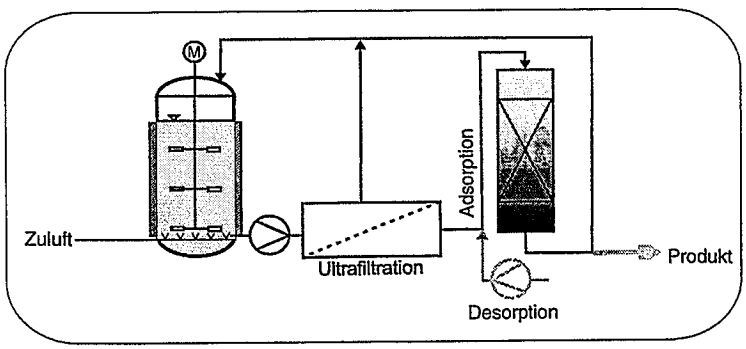


Abb. 2-7: Integration einer Ionentauschersäule in den Fermentationsprozeß

Die Integration einer Ionentauschersäule in den Fermentationsprozeß ist technisch wie in Abb. 2-7 dargestellt leicht möglich. Über eine Ultrafiltration werden die Biomasse und die größeren Proteine zurückgehalten. Mit dem Permeat wird eine Ionentauschersäule beladen. Nach der Adsorption des Produkts wird die abgereicherte Matrix zurück in den Fermenter geführt. Im satzweisen Betrieb kann dann das L-Phenylalanin von der Säule desorbiert werden. Nach dieser Regeneration des Ionentauscherharzes wird die Säule dann erneut beladen. Der Einsatz fester Harze für die integrierte Produktabtrennung aus Fermentationsprozessen wurde bereits beschrieben[38]. Auch die Beladung mit biomassehaltigen Suspensionen ist bei entsprechenden technischen Lösungen möglich[39], so daß eine Filtration vor der Adsorption nicht nötig ist. Allerdings ist diese Technologie nur für die Abtrennung ungeladener Substanzen (wie z.B. Catechole) problemlos einsetzbar[40]. Für den Einsatz von Ionentauschern zur Adsorption geladener Moleküle gilt dies nicht. Die Selektivität für die Extraktion von Aminosäuren mit den dafür geeigneten Harzen ist sehr niedrig[41]. Des weiteren werden die Bestandteile dissoziierter Salze ebenfalls adsorbiert, dadurch wird eine selektive Abtrennung der Aminosäuren unmöglich.

2.1.3.7 Verfahren ohne Rückführung

Neben den oben dargestellten Prozeßvarianten gibt es noch die Möglichkeit, den entnommenen Fermentationsüberstand zu prozessieren und anschließend zu verwerfen und damit eine Integration der Aufarbeitung ohne Rückführung durchzuführen. Der Nachteil

dieser Verfahren ist jedoch, daß vorgelegte Precurser, Nährsalze und Glucose nicht weiter genutzt werden können.

2.1.4 Bewertung und Vergleich der Prozeßvarianten

Die Bedingungen, die ein integriertes Verfahren erfüllen sollte, lassen sich im wesentlichen auf einige wenige Punkte beschränken. Zunächst sollte die Abtrennung des L-Phenylalanins selektiv erfolgen und möglichst wenige andere Moleküle aus dem Fermentationsprozeß mitreißen. Weiterhin sollte die Fermentationslösung neben der Abtrennung des Produkts in ihren Eigenschaften (pH, T, Ionenstärke) möglichst wenig verändert werden. Der Abreicherungsgrad des gewählten Trennverfahrens sollte zufriedenstellend und nicht von den Prozeßbedingungen der Fermentation abhängig sein. Eine Schädigung des biologischen Systems durch die integrierte Aufarbeitung muß ausgeschlossen werden können.

In Tabelle 1 sind einige Merkmale der Prozeßvarianten und ihre Bewertung dargestellt. Die Fließbettadsorption, die Elektro- und die Donnan Dialyse, die Ionentauscher und die Verfahren ohne Rückführung haben eine geringe Selktivität gemeinsam. Da jedoch bei einem integrierten Ansatz eine hohe Selektivität zu Beginn der Aufarbeitung ein ganz wesentliches Merkmal ist, können die genannten Verfahren nicht eingesetzt werden. Die positive Bewertung der integrierten Kristallisation wird durch die im Text genannten Nachteile (geringe Abreicherungsraten, hohe Betriebs- und Anlagenkosten durch druckgetriebene Membranverfahren) relativiert. Somit scheidet die integrierte Krsiatllisation als Verfahren zur Integration aus.

	Fließbett-adsorption	Elektro-dialyse	Donnan Dialyse	Kristal-lisation	Reaktiv-extraktion	Ionen-tauscher	ohne Rück-führung
Selektivität	☹	☹	☹	😐	☺	☹	☹
Medien-verluste	☹	☹	☹	😐	☺	😐	☹☹
Toxizität	☺	☺	☺	☺	😐	☺	☺
Ionenstärke	☺	☹	☹	☺	😐	☺	☹
Gradienten-bildung	☹	☺	☺	☺	☺	☺	😐
Aufkonzen-trierung	😐	☺	😐	☺	☺	😐	😐

Tabelle 1: Bewertung der einzelnen Prozeßvarianten

Betrachtet man die vorgestellten Prozeßvarianten unter den oben genannten Gesichtspunkten, so hat jedes Verfahren Vor- und Nachteile für den beabsichtigten Einsatz. Greift man jedoch die Reaktivextraktion heraus, zeigt sich, daß hier die Vorteile eher überwiegen. Da ein Einsatz als integriertes Verfahren noch nicht überprüft wurde, sollten die genannten Nachteile (Titration/Salzfracht, Toxizität)[42] auf ihre Relevanz im Bezug auf die Einsetzbarkeit dieses Verfahrens überprüft werden und im Idealfall durch geeignete technische Lösungen kompensiert werden. Aufgrund der vorliegenden Informationen wird die Reaktivextraktion als das geeignetste Verfahren für den integrierten Einsatz zur Aminosäureabtrennung in dieser Arbeit genauer untersucht.

2.2 Verfahrenstechnische Grundlagen

Bei der Reaktivextraktion handelt es sich um ein Flüssigmembranverfahren. Im folgenden sollen die Grundlagen zur Flüssigmembrantechnik behandelt und die verschiedenen Verfahrensvarianten aufgezeigt werden.

2.2.1 Flüssigmembranverfahren

Durch den Einsatz von Membranen soll die gezielte Abtrennung einer oder mehrerer Übergangskomponenten ermöglicht werden. Die Membran soll als selektive Barriere zwischen der abgebenden und aufnehmenden Phase wirken. Bei klassischen Membranverfahren, wie der Umkehrosmose oder der Mikrofiltration, besteht die Membran aus einer festen Phase. Bei den Flüssigmembranverfahren trennt eine flüssige Membranphase die Abgeber- und Aufnehmerphasen, welche ineinander mischbar sind. In der Regel handelt es sich bei der Abgeber- und Aufnehmerphase um wäßrige Fluide. Es sind jedoch auch organische Flüssigkeiten oder Gase denkbar. Generell wird für den Stofftransport durch Membranen der Begriff Permeation verwendet. Die Flüssigmembrantechnik wird aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur Flüssig-Flüssig-Extraktion auch als Pertraktion bezeichnet.

2.2.1.1 Verfahrensgrundlagen

In dieser Arbeit sind die Abgeber- und Aufnehmerphasen wäßrige Lösungen. Die Membranphase besteht aus einer organischen Lösung. Die miteinander in Kontakt stehenden Flüssigkeiten sollten nicht ineinander löslich sein.

Zur technischen Realisierung einer solchen Membran gibt es verschiedene Möglichkeiten. Entweder kann mit dispergierten Emulsionstropfen gearbeitet werden, oder man verwendet eine trägergestützte Flüssigmembran. Dazu wird die Membranphase in ein poröses Trägermaterial eingebracht. Es ist aber auch möglich, die jeweiligen Phasentrennungen über zwei poröse Membranen zu erreichen und die Flüssigmembran zwischen diesen zu zirkulieren. Hier findet der Phasenkontakt dann in den Poren statt.

Der Stofftransport bei Flüssigmembranverfahren läßt sich allgemein beschreiben. In der wäßrigen Phase diffundiert die abzutrennende Komponente an die Phasengrenzfläche zwischen Abgeber- oder Raffinatphase und Membranphase und tritt in die organische Membranphase ein. Die Übergangskomponente muß dazu entweder selbst physikalisch oder durch den Einsatz von Lösungsvermittlern (sog. Carriern) in der Membranphase löslich sein. Die Carrier bilden mit der Übergangskomponente eine membranlösliche Verbindung. Die übergegangene Verbindung diffundiert dann zur Grenzfläche zwischen Membran und Aufnehmer- oder auch Extraktphase. Dort löst sich die Übergangskomponente in der wäßrigen Aufnehmerphase. Die treibenden Kräfte für den Stoffübergang werden in Kapitel 2.2.2 beschrieben.

Es handelt sich demnach um einen simultan ablaufenden Extraktions- Reextraktions-Prozeß. Bei der klassischen Flüssig-Flüssig-Extraktion verlaufen Extraktion und Reextraktion in zwei räumlich getrennten Apparaten. Bei Flüssigmembranverfahren können beide Prozeßschritte grundsätzlich in einem Apparat durchgeführt werden.

Die als Membranphase eingesetzten Extraktionsmittel können rein physikalisch wirkende oder chemisch wirkende Lösungsmittel sein[43].

Mit physikalisch wirkenden Lösungsmitteln werden in der Regel Nichtelektrolyte aus wäßrigen Lösungen entfernt. Sie lösen die Übergangskomponente durch physikalische Wechselwirkungen. Diese Wechselwirkungen können Dispersions-, Induktions-, Dipol-Dipol-

Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen sein. Es handelt sich hierbei immer um nicht stöchiometrische Wechselwirkungen.

Im Gegensatz dazu gehen die chemisch wirkenden Extraktionsmittel mit dem zu extrahierenden Stoff eine stöchiometrische Verbindung ein. Sie werden immer dann eingesetzt, wenn es sich bei der Übergangskomponente um einen Elektrolyten, wie z.B. eine Carbonsäure oder ein Metallsalz, handelt. Solche Stoffe lassen sich aufgrund ihres ionischen Charakters nicht physikalisch in unpolaren Lösungsmitteln lösen. Bei chemisch wirksamen Extraktionsmitteln wird ein Lösungsvermittler (Carrier) in einem organischen Verdünnungsmittel gelöst. Aufgrund der stattfindenden Reaktion zwischen dem Lösungsvermittler und der Übergangskomponente spricht man hier von Reaktivextraktion.

Die Stofftrennung bei der Flüssigmembrantechnik beruht –wie auch bei der Extraktion- auf den unterschiedlichen Löslichkeiten der abzutrennenden Komponenten in den Phasen. Die Verteilung einer Komponente in den Phasen kann durch den Verteilungskoeffizienten (Gl. 2-1) gemäß des Nernst'schen Verteilungsgesetzes beschrieben werden. Der auf die molaren Konzentrationen bezogene Verteilungskoeffizient der Komponente i lautet:

Gl. 2-1
$$K_{ci} = \frac{c_{i,org}}{c_{i,aq}} \cdot \frac{V_{org}}{V_{aq}}$$

Der Volumenquotient berücksichtigt hierbei unterschiedlich große Phasen.

Neben dem Verteilungskoeffizienten wird in der Praxis häufig die Extraktionsleistung oder auch der Extraktionsgrad E verwendet.

Gl. 2-2
$$E = 100 \cdot \left(\frac{c_{i,org}}{c_{0i,aq}} \cdot \frac{V_{org}}{V_{aq}} \right)$$

Wobei $c_{0i,aq}$ die Startkonzentration an Übergangskomponente ist. Setzt man die experimentell bestimmbaren Werte ein, erhält man für E:

Gl. 2-3
$$E = 100 \cdot \left(\frac{(c_{0i,aq} - c_{i,aq})}{c_{0i,aq}} \cdot \frac{V_{org}}{V_{aq}} \right)$$

Da das Lösungsmittel in der Reaktivextraktion im Gegensatz zur Flüssig-Flüssig-Extraktion nicht als Zwischenspeicher, sondern nur als selektive Barriere dient, können auch Lösungsmittel mit niedrigen Extraktionsgraden für die Übergangskomponente eingesetzt werden. Durch die großen realisierbaren Austauschflächen läßt sich der daraus resultierende niedrige Konzentrationsgradient über die Membran kompensieren.

Des weiteren werden bei der Reaktivextraktion in Flüssigmembranen sehr geringe Lösungsmittelmengen benötigt. Beim Einsatz von Hohlfasermodulen sind als weitere wesentliche Vorteile die unabhängige Phasenführung und die geringen Lösungsmittel- und Carrierverluste zu nennen. Durch die in weiten Grenzen frei wählbaren Volumenstromverhältnisse sind zudem hohe Aufkonzentrierungen erreichbar.

Da die Diffusionskoeffizienten in Flüssigkeiten wesentlich höher sind als in Polymeren, können in Flüssigmembranen wesentlich höhere Stofftransportraten als in herkömmlichen Feststoffmembranen erzielt werden.

Anwendung findet die Flüssigmembrantechnik bereits in der Hydrometallurgie, der Abwasserreinigung, der Nuklearchemie und auch in der Biotechnologie (Zitronensäure). Die Hauptaufgaben bestehen in der Abtrennung von Metallen (Zn, Cu, Cr, Pb, Ni, Ur), schwachen Basen und Säuren (H_2S)[44].

2.2.2 Stofftransportmechanismen

Die auftretenden Transportmechanismen hängen von der Art der Extraktion ab, d.h. ob es sich um eine physikalische oder chemische Extraktion handelt. Der Mechanismus wird außerdem darüber charakterisiert, ob eine Reaktion in der Raffinat- oder der Extraktphase auftritt.

2.2.2.1 Einfache Permeation

Der membranlösliche Stoff A liegt zu Beginn des Prozesses in der Raffinatphase vor. Zwischen den beiden Seiten der Membran herrscht ein Konzentrationsunterschied. Das unterschiedliche chemische Potential der beiden Phasen bildet die treibende Kraft. A tritt aus der Abgeberphase in die Membranphase über, diffundiert über die Membran und löst sich schließlich in der Extraktphase. Durch die steigende Konzentration von A in der Extraktphase sinkt der treibende Gradient ab. Hat sich zwischen Abgeber- und Aufnehmerphase ein Gleichgewicht an A eingestellt, endet der Prozeß. Eine Aufkonzentrierung ist somit durch dieses Verfahren nicht möglich.

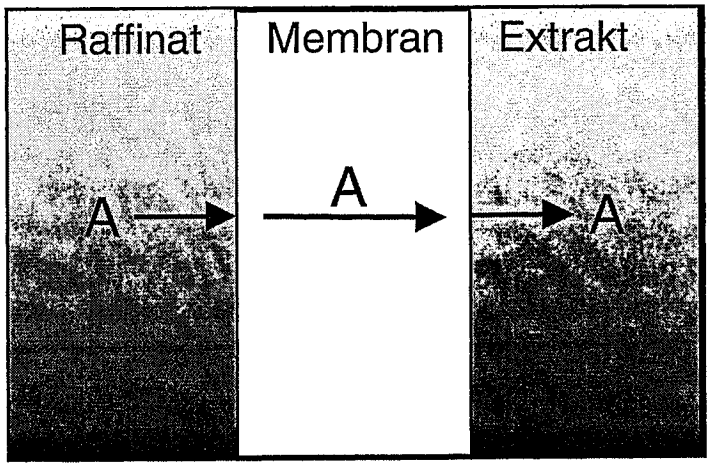


Abb. 2-8: einfache Permeation (schematisch)

2.2.2.2 Einfache Permeation mit chemischer Reaktion

Die einfache Permeation kann durch ein Reaktion auf Extraktseite wesentlich effizienter gestaltet werden. Wird die Übergangskomponente A auf der Aufnehmerseite der Membran in eine membranunlösliche Komponente AB umgewandelt, bleibt der treibende Gradient erhalten. Die Phenolabtrennung aus Abwässern ist ein wichtiges Beispiel dieser Technologie[45/46].

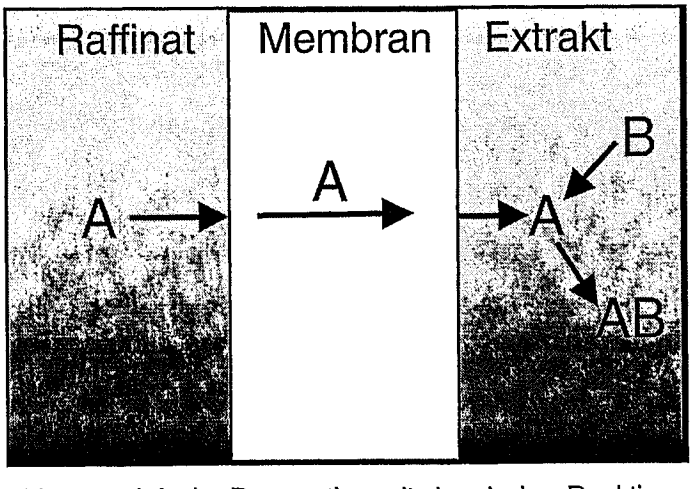


Abb. 2-9: einfache Permeation mit chemischer Reaktion

Durch den hohen pH-Wert der Aufnehmerphase (pH ≥ 13) dissoziiert das Phenol nach dem Eintritt in die Extraktphase nahezu vollständig. Die dabei entstehenden Phenolationen sind aufgrund ihres ionischen Charakters in der organischen Membranphase nicht löslich, da diese unpolar ist. Auf diese Weise kann stets das maximale Konzentrationsgefälle in Richtung Aufnehmerphase aufrecht erhalten werden[47].

2.2.2.3 Einfacher Carriertransport

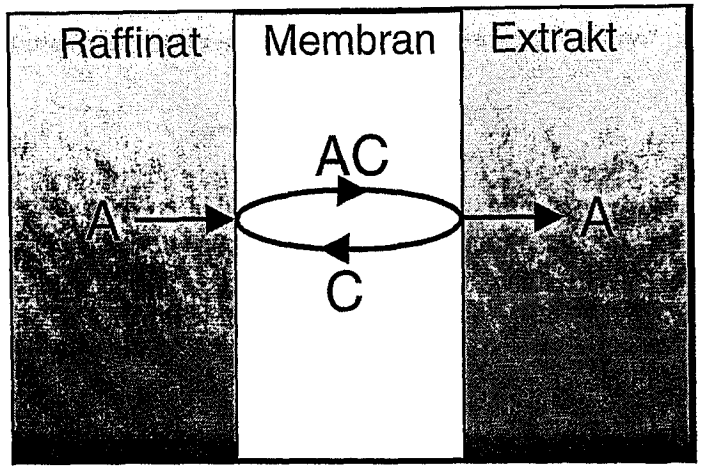


Abb. 2-10: einfacher Carriertransport

Durch den Einsatz chemisch wirkender Extraktionsmittel lassen sich auch schwer oder gar nicht lösliche Komponenten über die organische Membran abtrennen. Diese Carrier werden in der organischen Membranphase gelöst. Der unbeladene Carrier bildet an der Grenzfläche zwischen Membran und Raffinat mit der Übergangskomponente A eine membranlösliche Verbindung AC. Nach Diffusion durch die organische Membran wird A an der Phasengrenze Membran / Extrakt wieder freigesetzt. Der unbeladene Carrier kann nach dieser Regenerierung zurück an der Abgeberphase erneut beladen werden. Bei diesem Transportmechanismus wird die Transportgeschwindigkeit nicht mehr allein durch die Diffusion bestimmt, sondern außerdem durch die Extraktions- und Reextraktionsgeschwindigkeiten. Der Transport endet auch bei diesem Verfahren mit Erreichen des Konzentrationsgleichgewichts in den wäßrigen Phasen. Eine Aufkonzentrierung ist demnach auch mit diesem Verfahren nicht möglich.

2.2.2.4 Einfacher Carriertransport mit chemischer Reaktion in der Aufnehmerphase

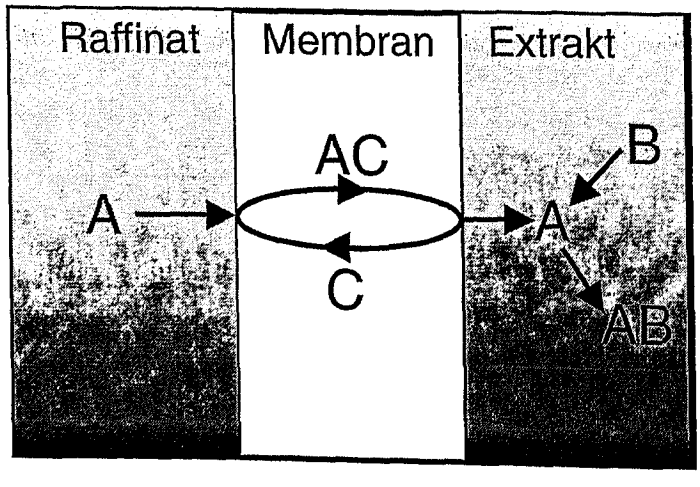


Abb. 2-11: Carriertransport mit Reaktion

Eine Aufkonzentrierung ist beim Carriertransprt möglich, wenn, wie bei der einfachen Permeation, eine Reaktion in der Aufnehmerphase die Übergangskomponente bindet. Dabei muß auch hier das Reaktionsprodukt AB in der Membranphase unlöslich sein.

2.2.2.5 Coupled-Co-Transport

Wenn am Transport der Übergangskomponente A außer dem Carrier C noch eine dritte Komponente D beteiligt ist, spricht man von gekoppeltem Stofftransport (coupled transport).

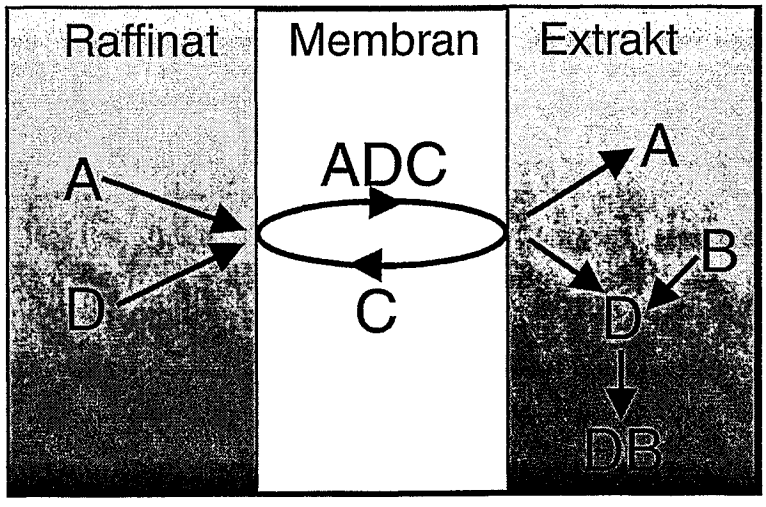


Abb. 2-12: Coupled-Co-Transport

Erfolgt der Transport von A und D in die gleiche Richtung, so spricht man vom coupled-co-transport. Die beiden Komponenten A und D reagieren an der Phasengrenze mit dem Carrier C zu dem membranlöslichen Komplex ADC. Dieser diffundiert über die Membran zur Aufnehmerphase. Die Komponenten A und D gehen in diese Phase über. Durch einen großen Überschuß von D kann der Transport selbst dann noch aufrecht erhalten werden, wenn die Gleichgewichtseinstellung für A bereits erreicht ist. Mit diesem Verfahren ist also eine Aufkonzentrierung von A im Extrakt möglich, wenn eine der Komponenten (D) auf der Extraktseite durch eine Hilfsreaktion zur unlöslichen Verbindung reagiert. Dieses Phänomen wird bei der Abtrennung von Chromoxid mit Tridodecylamin genutzt.

2.2.2.6 Coupled-Counter-Transport

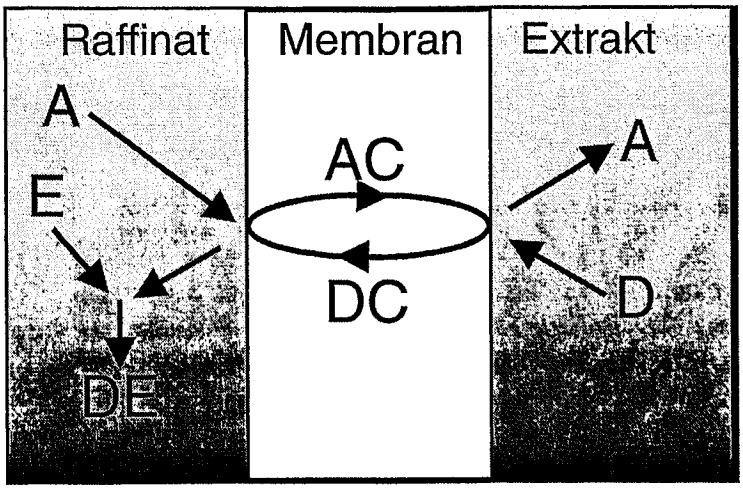


Abb. 2-13: Coupled-Counter-Transport

Den gekoppelten Transport von A und D in entgegengesetzte Richtungen nennt man coupled-counter-transport. Bei der Komponente D spricht man auch von Gegenionen zu A. Zunächst reagiert A mit DC zur membranlöslichen Komponente AC. Das freiwerdende D geht in das Raffinat über. Im Raffinat reagiert Komponente D mit E zu DE. Dadurch steht D nicht mehr zur Rückdiffusion zur Verfügung und die Reaktion wird in Richtung Raffinat gezogen. Nach Diffusion über die organische Phase, geht an der Phasengrenze zum Extrakt A in die wäßrige Phase über und D bildet den Komplex DC. Nach Rückdiffusion dieses Carrierkomplex schließt sich der Kreislauf. Der coupled-counter-transport gehört zu den wichtigsten Transportmechanismen in der Flüssigmembrantechnik. Der treibende Gradient kann hier durch die Konzentration an Gegenionen D beinahe frei gewählt werden. Eine Aufkonzentrierung ist also nicht mehr vom Gleichgewicht der Komponente A in den wäßrigen Phasen, sondern von den Gegenionen D abhängig und somit leicht möglich.

2.2.3 Flüssigmembrantechnik

Bei der technischen Umsetzung der Flüssigmembrantechnik gibt es eine Reihe von Verfahrensvarianten, die kurz vorgestellt werden sollen. Neben den dispergierten Emulsionstropfen gibt es noch die Möglichkeit der trägergestützten Flüssigmembranen. Hinzu kommen noch einige Verfahrensvarianten zum Einsatz der Flüssigmembrantechnik in Hohlfasermodulen.

2.2.3.1 Dispergierte Emulsionstropfen

Beim Einsatz dispergierter Emulsionstropfen, kurz ELM (Emulsion Liquid Membrane), liegt die Extraktphase innerhalb fein dispergierter Mikrotropfen in der organischen Membranphase vor. Um den Extrakt zu stabilisieren, müssen Emulgatoren eingesetzt werden.

Durch die Emulsionsbildung lassen sich sehr große volumenspezifische Austauschflächen herstellen. Zwischen Abgeber- und Membranphase lassen sich Austauschflächen von 3000...4000 m^2/m^3 erreichen. Zwischen der Membran- und Abgeberphase liegen diese im Bereich 10^6 m^2/m^3[48].

Das Verfahren gliedert sich in folgende Prozeßschritte:

- Emulgierung: Zur Herstellung einer stabilen Emulsion aus Membran- und Aufnehmerphase werden diese unter Zugabe von Emulgatoren (Tenside) intensiv durchmischt.
- Stoffaustausch: Die emulgierte W/O-Emulsion (Wasser in organischer Phase) wird mit der wäßrigen Abgeberphase kontaktiert. Die W/O-Emulsion wird in der kohärenten Abgeberphase dispergiert. Der Stofftransport erfolgt durch Molekulardiffusion und Konvektion, abhängig von der Tropfengröße und der Viskosität. Die spezifisch leichteren Emulsionstropfen steigen nach oben, während die gereinigte Abgeberphase sich am Boden sammelt.
- Emulsionsspaltung: Aufgrund der Stabilisierung der Tropfen mit Hilfe eines Emulgators, muß die Emulsion aufgebrochen werden. Dies erfolgt in elektrostatischen Wechselfeldern (5-20 kWh/m^3), wobei ein kontinuierlicher Betrieb aufrecht gehalten werden kann.

Im Vergleich zu den trägergestützten Flüssigmembranen können mit diesem Verfahren größere Stoffaustauschflächen realisiert werden. Der Einsatz von Emulgatoren ist jedoch als ein wesentlicher Nachteil anzusehen, da die Spaltung der Emulsion einen großen Kostenfaktor darstellt. Des weiteren kann es bei der Emulsionsspaltung zu erheblichen Rückvermischungen zwischen den Phasen kommen. Für einen integrierten Ansatz, wie er in dieser Arbeit angestrebt wird, sind dispergierte Emulsionstropfen deshalb nicht geeignet.

2.2.3.2 Trägergestützte Flüssigmembranen

Bei den trägergestützten Membranen, kurz SLM (Supported Liquid Membrane), wird die Membranphase in einem porösen Trägermaterial immobilisiert (Abb. 2-14). Die Stützmatrix muß eine hydrophobe Oberfläche besitzen, um einerseits ein Eindringen von Wasser in die Poren zu verhindern und andererseits die organische Phase aufnehmen zu können. Trägermaterialien sind verschiedene Polymere wie z.B. Polypropylen mit einer Stärke von 20...500 µm. Die mit der organischen Phase getränkten Poren haben einen Durchmesser von 0,01...10 µm. Die Porosität liegt in der Regel bei 30%...40%.

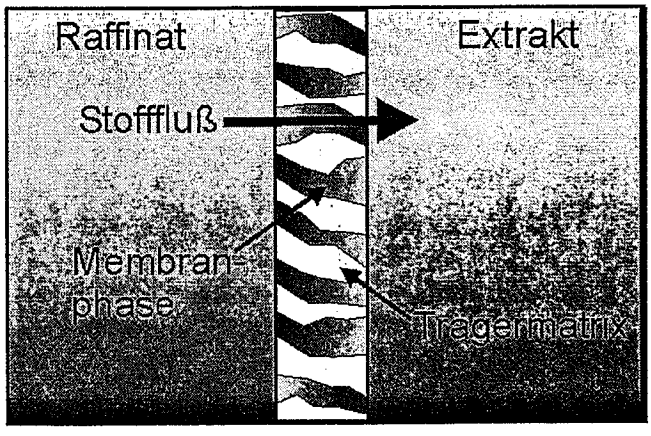


Abb. 2-14: Schema der trägergestützten Flüssigmembran

In den Poren bilden sich je nach Betriebsbedingungen stabile Grenzflächen aus. Befindet sich das Lösungsmittel auf der Extraktseite, so muß nur eine der Grenzflächen stabilisiert werden. Das ist bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion und der Emulsions-Pertraktion der Fall.

Die Bauform der Polymermembranen als Hohlfasermodul bietet den Vorteil sehr großer volumenspezifischer Austauschflächen. Hierbei werden mehrere tausend poröse Hohlfasern zu einem Modul gebündelt. Eine Phase strömt dann im Mantelraum, während die andere in den Hohlfasern strömt.

Gegenüber den ELM bieten die SLM einige wesentliche Vorteile:

- es sind keine Emulgatoren erforderlich,
- die Volumenströme von Raffinat und Extrakt sind unabhängig voneinander wählbar,
- es ist eine kompakte Bauweise möglich,
- es tritt keine Rückvermischung auf,
- das Volumen an organischer Phase ist sehr gering und
- aufgrund der getrennten Phasenführung können Phasen nahezu gleicher Dichte eingesetzt werden.

Der Einsatz trägergestützter Flüssigmembranen hat jedoch auch einige Nachteile:

- die Grenzschicht der organischen Phase läßt sich nicht an beiden Seiten des Trägermaterials stabil halten. Es kann also leicht zu einem Auswaschen der Membranphase aus den Trägerporen kommen. Das Auswaschen kann aus der physikalischen Löslichkeit des Membranmaterials in den wäßrigen Phasen oder aber aus dem Abreißen von Tropfen aus dem Porenfilm resultieren,
- beim Einsatz von Hohlfasern mit sehr kleinen Faserinnendurchmessern treten sehr hohe Druckverluste auf,
- die Grenzflächenspannung muß ausreichend hoch sein, um die Phasengrenzen zu stabilisieren,

- bei stark voneinander abweichenden osmotischen Drücken der wäßrigen Phasen kann es zum osmotischen Wasserfluß kommen. Während zu Beginn nur ein molekularer Wassertransport stattfindet, kann es im weiteren Verlauf zu einer Benetzung der Membranporen mit Wasser kommen, so daß die Phasengrenzen zusammenbrechen[49].

Um ein Abscheren organischer Tropfen aus den Poren auf der Abgeberseite zu verhindern, wird ein erhöhter statischer Druck angelegt. Dadurch wird die raffinatseitige Phasengrenzfläche weiter in die Poren hinein und damit aus der Strömung heraus verlagert. Die Kapillarkräfte in den Poren verhindern ein Herausdrücken der organischen Phase. Erst bei Überschreiten eines Grenzdrucks (Breaktrough Pressure) kommt es zum Phasenbruch. Unterhalb dieses Durchbruchdrucks kommt es jedoch zum Auswaschen der Membran. Dieser Effekt kann durch die Emulsionspertraktion kompensiert werden. Dabei kommt auf der Aufnehmerseite eine Emulsion aus Aufnehmer- und Membranphase zum Einsatz. Die organische Phase kann dispers oder kohärent vorliegen. Liegt sie dispers vor, wird die herausgewaschene Phase ständig erneuert. Liegt sie kohärent vor, kann ein Auswaschen ausgeschlossen werden, da die Membranporen unmittelbar mit dem Lösungsmittel in Kontakt stehen. Da in dieser Arbeit die abgetrennte Übergangskomponente jedoch aus der Extraktphase möglichst rein gewonnen werden soll, würden die Lösungsmittelmengen stark stören. Diese Verfahrensvariante verbietet sich daher.

2.3 Einsatzmöglichkeiten von Hohlfasermodulen

Der Einsatz von Hohlfaserkontaktoren zur membrangestützten Reaktivextraktion von Kationen erscheint sehr vielversprechend. Es wird ein Bündel von bis zu mehreren Tausend Hohlfasern zusammengefaßt und in ein zylindrisches Kunststoff- oder Edelstahlgehäuse eingebracht. Die gängigsten Membranen sind hydrophobe und poröse Polymere wie z.B. Polypropylen. An beiden Seiten des Gehäuses werden die Fasern durch ein Vergußmaterial so abgedichtet, daß die offenen Hohlfasern frei bleiben. Durch ein Umlenkwehr in der Mitte des Gehäuses wird eine gehäuseseitige Kreuzströmung um die Fasern erzwungen (s. Abb. 2-18).

2.3.1 Einfache Hohlfaserpermeation

Vor Beginn des Trennprozesses müssen die Hohlfasern mit dem organischen Lösungsmittel imprägniert werden. Die wäßrigen Abgeber- und Aufnehmerphasen werden dann getrennt durch Hohlfasern und Mantelraum geführt, so daß in den Poren die selektive Membran immobilisiert wird.

Teramoto und Tanimoto[50] haben die ersten Untersuchungen zur Abtrennung von Kupfer aus Wasser mit Hohlfasermodulen durchgeführt. Der bereits beschriebene Counter-Carrier-Transport wurde mit dem Chelatbildner 2-Hydroxy-5-nonylacetophenoxim (SME529; Shell Chemical Co. Ltd.) als Carrier durchgeführt. Die Aufnehmerlösung wurde durch die Hohlfasern und die Abgeberphase im Gegenstrom durch den Mantelraum geführt. Durch Gliederung des Stoffübergangs in Einzelschritte stellten die Autoren ein Modell des Stofftransports auf. Die erreichten Standzeiten lagen durch das Auswaschen von Carrier nur bei etwa 30 Stunden. Danach mußte die Membran regeneriert werden. Längere Standzeiten können durch die Optimierung der Membranzusammensetzung erreicht werden[51].

Im Gegensatz dazu betrieben Loicano et al.[52] ein Hohlfasermodul mit der Aufnehmerlösung im Mantelraum und der Abgeberlösung in den Hohlfasern. Sie beschrieben die selektive Abtrennung von Kupfer Ionen aus einer Kupfer/Zink Lösung.

2.3.2 Hohlfaser-Emulsions-Pertraktion

Das Ausbluten der Membranphase läßt sich bei der Hohlfaser-Emulsions-Pertraktion (HFE) verhindern, indem auf der Aufnehmerseite eine Emulsion aus wäßriger Extraktphase und organischer Phase vorgelegt wird. In der Literatur werden dafür zwei Möglichkeiten

beschrieben[53/54]. Zum einen kann eine Emulsion der Membranphase in der Wasserphase benutzt werden. Man spricht dann von einer O/W-Emulsion. Eine W/O-Emulsion bezeichnet ein Verfahren, in dem man die Aufnehmerphase in der organischen Phase emulgiert.

O/W-Emulsion

Teramoto und Tanimoto[50] benutzten dieses Verfahren, indem sie eine kleine Menge organischer Phase in die Aufnehmerphase gaben. So wurde die aus den Poren ausgewaschene Phase ständig erneuert. Um eine Kontamination der zu reinigenden Abgeberphase zu verhindern, kann problemlos mit Überdruck auf der Abgeberseite gefahren werden.

W/O-Emulsion

Die zweite Variante der Emulsions-Pertraktion arbeitet mit einer kohärenten organischen Membranphase mit dispergierter Aufnehmerphase. Die Extraktion läuft in der Stützmembran ab, während die Reextraktion erst in der Kernströmung der Aufnehmeremulsion stattfindet. Neben der herkömmlichen Hohlfaser-Pertraktion wurde dieses Verfahren bereits mehrfach erfolgreich zur Abtrennung von Metallen und Schwermetallen eingesetzt[55]. Vom TNO Institut wurde die Entfernung von Zink-Ionen aus Abwasser mit Di-2-ethylhexylphosphorsäureester (D_2EHPA) als Carrier untersucht[56]. Die Abgeberphase wurde faserseitig im Gegenstrom zur Aufnehmeremulsion (mantelseitig) gefahren. Durch das TNO Patent von 1991 ist dieses Verfahren rechtlich geschützt. Der große Vorteil der HFE Pertraktion liegt in der Einsatzbarkeit unstabilisierter Emulsionen. So kann auf den Einsatz von Emulgatoren verzichtet werden.

2.3.3 Pertraktion mit zwei Hohlfasermodulen

Eine alternative Prozeßführung in Hohlfasermodulen läßt sich durch den Einsatz zweier getrennter Hohlfaserbündel realisieren. Diese Fahrweise teilt die bei der gewöhnlichen Pertraktion in einem Hohlfasermodul ablaufende Extraktion und Rückextraktion auf zwei Module auf. Zur Verdeutlichung ist in Abb. 2-15 der Stoffübergang durch die beiden Membranen schematisch dargestellt. In diesem Beispiel wird das L-Phe als Kation extrahiert und im Gegenzug werden Protonen in das Raffinat transportiert.

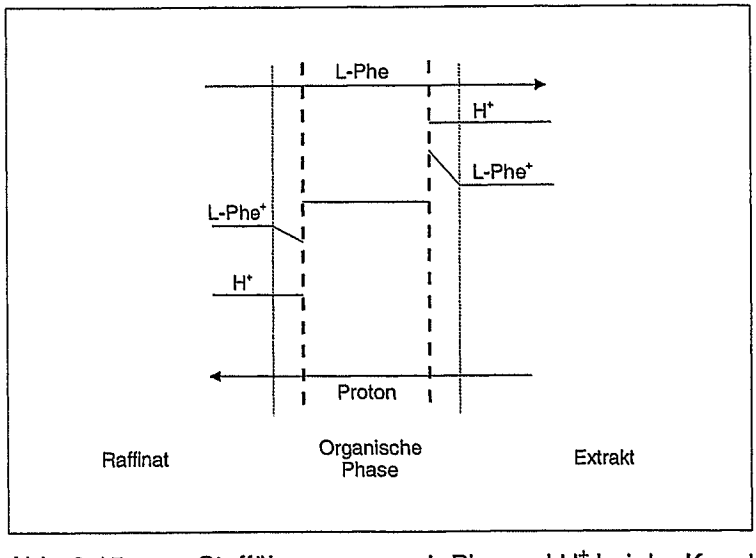


Abb. 2-15: Stoffübergang von L-Phe und H^+ bei der Kopplung von Extraktion und Rückextraktion in zwei Hohlfasermodulen

Die technische Umsetzung dieses Verfahrens zeigt die Abb. 2-16. Die organische Phase wird zwischen zwei Modulen im Kreislauf gefahren und entspricht dabei der Membranphase. Die Abgeber- und Aufnehmerphasen strömen jeweils im inneren der Faser eines Bündels während die organische Phase den Mantelraum durchspült. Der Vorteil der Pertraktion in

zwei Hohlfasermodulen liegt darin, daß nur noch eine Phasengrenze pro Hohlfaser stabilisiert werden muß. Das ausgewaschene Lösungsmittel wird durch den organischen Kreislauf ständig ersetzt. Im Vergleich zur Hohlfaser-Emulsions-Pertraktion entfällt die Emulsionstrennung. Andererseits ist eine größere Lösungsmittelmenge erforderlich. Durch die extremen Verhältnisse in den Volumenströmen, die in dieser Fahrweise möglich sind, ist dieser Nachteil jedoch vernachlässigbar. Wesentlicher ist jedoch der zusätzliche Widerstand gegenüber dem Stoffübergang, der aus der zusätzlichen Membran und den Diffusionswegen resultiert.

Sengupta et al. benutzten dieses Verfahren zur Abtrennung von Phenol und Essigsäure aus Wasser[57]. Basu und Sirkar haben mit diesem Verfahren Zitronensäure aus *Aspergillus niger* Fermentationen abgetrennt. Als Carrier setzten sie Tri-N-Octylamin ein[58]. Aufgrund der stabilen Grenzflächen in den Modulen, dem Verzicht auf Emulgatoren und dem betriebsbedingt geringen Anteil an organischen Komponenten in den wäßrigen Phasen scheint diese Verfahrensvariante der Reaktivextraktion in Hohlfasermodulen am besten für den Einsatz in Bioprozessen geeignet.

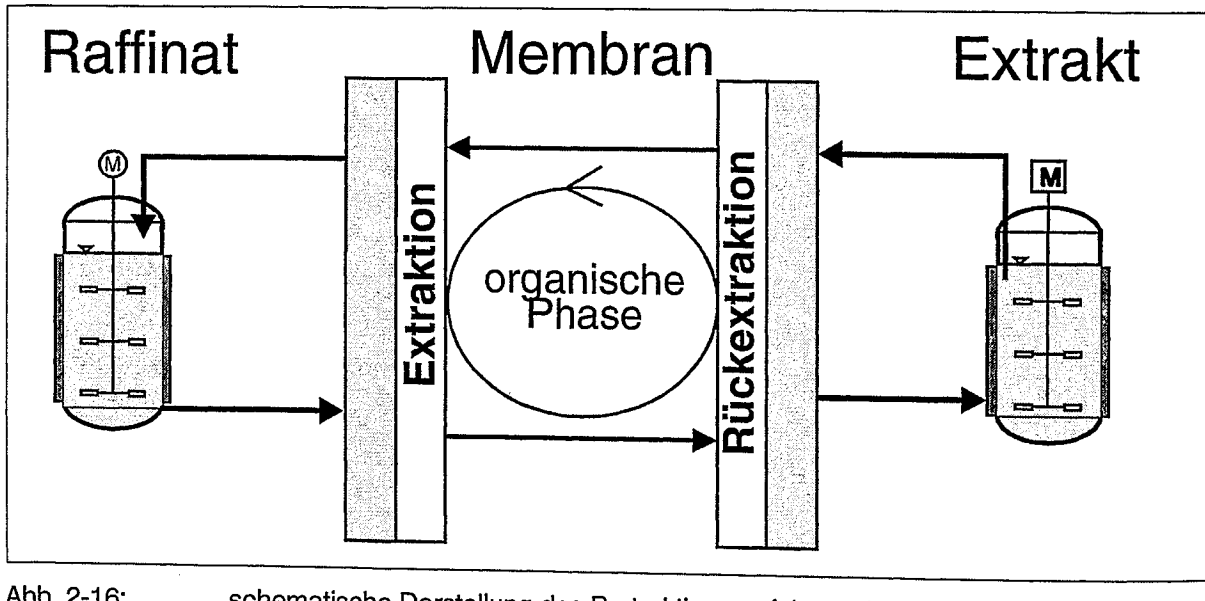


Abb. 2-16: schematische Darstellung des Pertraktionsverfahrens in zwei Hohlfasermodulen

2.4 Hohlfasermodule zur dispersionsfreien Extraktion

Ein häufig eingesetzter Membrantyp für mikroporöse Membranen in der nichtdispersiven Extraktion sind Hohlfasern. Die Art der Strömungsführung und die Art der Betriebsweise können in beliebiger Weise variiert und an das jeweilige Trennproblem angepaßt werden. Gegenüber Flachmembranen bieten Hohlfasermodule (HFM) einige Vorteile bei der Extraktion. Die Gründe für die hohe Leistungsfähigkeit sind vielseitig. Zum einen bieten HFM sehr große spezifische Oberflächen. Wie Tabelle 2 zeigt, können die spezifischen Oberflächen um mindestens eine Größenordnung über denen von Extraktionskolonnen liegen.

Extraktortyp	spezifische Oberfläche [m²/m³]
Extraktionskolonne	
ohne Energieeintrag	30 bis 300
mit Energieeintrag	150 bis 450
Hohlfasermodul	1500 bis 6000

Tabelle 2: spezifische Oberflächen unterschiedlicher Extraktoren nach Reed[59]

Es lassen sich also bei gleichem Apparatevolumen entsprechend größere Stoffübergangsraten oder mit kleinerem Apparatevolumen die gleichen Stoffübergangsraten erzielen.

Weitere Vorteile der HFM sind:
- kurze Diffusionswege
- keine Flutung möglich
- keine Dichteunterschiede der Phasen notwendig
- Einfluß der Viskosität untergeordnet
- keine Rückvermischung
- kontinuierliches Gegenstromverhalten

Die großen spezifischen Stoffaustauschflächen gehen einher mit kurzen Diffusionswegen. Bei kleinen Durchmessern der Hohlfasern (d_i = 240µm, d_a = 300µm) und hohen Packungsdichten (≥ 50%) ergeben sich zu beiden Seiten der Membran kurze Diffusionswege bis an die Phasengrenze (ca. 10^{-4}m). Diese Diffusionswege sind direkt mit der Dicke von Nernst-Filmen vergleichbar[60]. Wendet man die vereinfachende Sichtweise des Filmmodells an[61], bedeutet dies, daß im HFM das gesamte Phasenvolumen vom Konzentrationsgradienten erfaßt wird.

Ein weiterer Vorteil ist die freie Wählbarkeit des Phasenverhältnisses, welche aus der makroskopischen Trennung der beiden Volumenströme resultiert. Nach Gl. 2-4 ist das Phasenverhältnis definiert als der Quotient aus dem Durchsatz der wäßrigen Phase und dem Durchsatz der organischen Phase.

Gl. 2-4
$$PV = \frac{Q_{aq}}{Q_{org}}$$

Dichteunterschiede der Phasen bestimmen in herkömmlichen Extraktoren die Flutungsgrenze und ermöglichen dort erst die Phasentrennung nach der Extraktion. Da im HFM in beiden Phasen erzwungene Strömung herrscht und diese durch die Membran voneinander getrennt werden, sind hier keine Dichteunterschiede notwendig.

Da in den Hohlfasern laminare Strömung herrscht, ist axiale Rückvermischung auszuschließen[62]. Im Mantelraum sind makroskopische Rückströmungen bei Veränderungen des lokalen freien Querschnitts möglich.

Neben den genannten Vorzügen des Einsatzes von HFM gibt es allerdings auch einige Nachteile. Für HFM ergeben sich bei der Extraktion Durchsatzgrenzen, da dispersionsfreier Betrieb nur bei bestimmten transmembranen Druckdifferenzen möglich ist. Aufgrund der Strömung muß in beiden Phasen mit entsprechenden Druckverlusten gerechnet werden. Sowohl im Gegenstrom- als auch im Gleichstrombetrieb kann es daher vorkommen, daß durch den Druckverlust über die Modullänge der Grenzwert der minimalen transmembranen Druckdifferenz unterschritten wird, und es zum Phasendurchbruch kommt. Das bedeutet, daß für eine gegebene Modullänge die Volumenströme der beiden Phasen nicht beliebig erhöht werden können. Die Längenabhängigkeit des Phasendurchbruchs ist ausschließlich eine Funktion der minimalen und maximalen transmembranen Drücke und des Druckverlustes.

Während herkömmliche Extraktionsapparate aus einer großen Anzahl verschiedener Werkstoffe mit hoher chemischer und thermischer Stabilität gefertigt werden, kommen nur wenige Materialien zur Verarbeitung als Hohlfaser in Frage. Am häufigsten wird dabei Polypropylen, wie in den Hohlfasern der Hoechst Celanese, verwendet. Das Polyolefin Polypropylen zeichnet sich durch eine relativ hohe Chemikalienbeständigkeit aus. Durch die hohen transmembranen Drücke kann die Hohlfaserstruktur jedoch bei Temperaturen oberhalb 80°C zerstört werden. Neben Polypropylen wird auch Celluloseacetat (Enka) als Hohlfaser verarbeitet, welches allerdings aufgrund der geringen Chemikalienbeständigkeit nicht für den Einsatz in Extraktionsprozessen geeignet ist.

Die in Fermentationslösungen auftretenden Feststoffe in Form von Biomasse, Zelltrümmer, o.ä. müssen vor der Extraktion entfernt werden. Es kommt in der Regel zwar nicht zu Oberflächenfouling an der Membran[63], jedoch können sich Hohlfasereingänge verstopfen (Tiefenfiltration), da es keine Radialströmung gibt. Es muß daher vor der Extraktion eine Filtration durchgeführt werden.

Aufgrund des Modulcharakters ergibt sich ein einfaches scale-up. Durch die Parallelschaltung von n Modulen ist eine Kapazitätserhöhung um den Faktor n möglich. Wegen der Größe der Module im Industriemaßstab (A_{effekt}= ca. 100m²) und der höheren Effektivität dieser Module im Vergleich zu Labor- oder Technikumsmodulen[64] sind die Kosten für größere Kapazitäten trotz modularer Bauweise geringer als linear ansteigend. Kostenschätzungen zur Phenolabtrennung mittels Hohlfaserextraktion zeigen mit Reinigunskosten von 1,5 DM/m³ Abwasser bereits das wirtschaftliche Potential dieser Technik[65].

2.5 Fluiddynamik in Hohlfasermodulen

Für den stabilen und vor allem dispersionsfreien Betrieb sind die lokalen Drücke in den beiden Modulkompartimenten von entscheidender Bedeutung. Die Abhängigkeit des Druckverlustes von der Strömung soll daher im folgenden näher betrachtet werden. Aufgrund der physikalischen Trennung der beiden Phasen, muß zwischen der Strömung in der Hohlfaser und im Mantelraum unterschieden werden.

2.5.1 Strömung in den Hohlfasern

Bei der Strömung durch die Hohlfaser handelt es sich um eine Rohrströmung. Für ein Newtonsches Fluid charakterisiert die kritische Reynoldszahl (Re_{krit} = 2300) den Übergang von laminarer zu turbulenter Strömung[66]. Dabei wird die Reynoldszahl entsprechend Gl. 2-5 mit dem Innendurchmesser der Hohlfaser und der mittleren Geschwindigkeit in den Hohlfasern berechnet.

Gl. 2-5
$$Re_{HF} = \frac{w_{HF} \cdot d_i}{\nu}$$

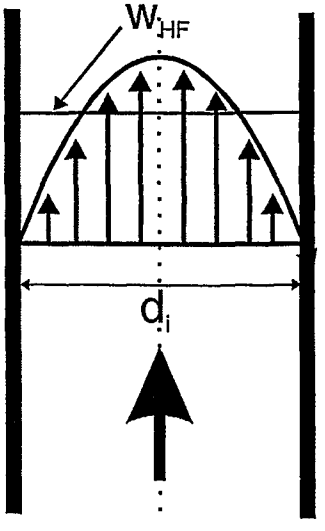


Abb. 2-17: laminare Rohrströmung

Aufgrund der sehr kleinen Innendurchmesser der Hohlfasern liegt selbst bei hohen Strömungsgeschwindigkeiten laminare Strömung vor.

Bei laminarer Rohrströmung kann das Auftreten von axialer Rückvermischung durch die Bodensteinzahl beschrieben werden.

Gl. 2-6
$$Bo = Re \cdot Sc = \frac{w_{HF} \cdot d_i}{D}$$

Bei einem Verhältnis von Hohlfaserlänge zu –durchmesser von >3000 (wie es in HFM der Fall ist) tritt ab Bo >10^4 keine axiale Rückvermischung auf[67].

Nach Hagen-Poisseuille berechnet sich der Druckverlust einer einzelnen Hohlfaser bei laminarer Strömung aus der Strömungsgeschwindigkeit nach Gl. 2-7.

Gl. 2-7
$$\Delta p = \frac{64}{Re} \cdot \frac{l}{d_i} \cdot \rho \cdot \frac{w_{HF}^2}{2} = 32 \cdot \frac{\eta \cdot l \cdot w_{HF}}{d_i}$$ (für Re ≤ 2300 und ρ=1kg/l)

Bei Verwendung eines Hohlfasermoduls mit mehreren tausend Hohlfasern muß mit einer mittleren Strömungsgeschwindigkeit und einer mittleren Reynoldszahl für das gesamte Modul gerechnet werden.

Gl. 2-8
$$\overline{w_{HF}} = \frac{Q_{HF,tot}}{A_{HF,tot}} = \frac{Q_{HF,tot}}{N \cdot \left(d_i^2 \cdot \pi/4\right)}$$

Mit der nach Gl. 2-8 berechneten mittleren Strömungsgeschwindigkeit läßt sich für das gesamte Hohlfasermodul der Druckverlust berechnen.
Durch verschiedene Einflußfaktoren kann es zu Abweichungen von diesem berechneten Wert kommen. Die Quellung der Hohlfasern durch die Benetzung mit Lösungsmittel, die Durchmesserverteilung der einzelnen Fasern im Bündel und die ungleichmäßige Anströmung der Hohlfasern können die Strömungsgeschwindigkeit bei gleichbleibendem Druckverlust verringern.
Die genannten Faktoren sind jedoch meßtechnisch nicht leicht zugänglich und daher in ihrer Komplexität schwer zu erfassen. Neben den genannten Faktoren wirken noch weitere auf die reale Strömungsgeschwindigkeit, so daß hier keine eindeutigen Vorhersagen möglich sind. Falls die experimentellen Ergebnisse und die nach Hagen-Poisseuille für laminare Strömung berechneten Druckverluste gute Übereinstimmung zeigen, sind die Effekte der genannten Einflußfaktoren gering. Der Druckverlust über der Strömungsgeschwindigkeit ließe sich dann also mit den gezeigten Zusammenhängen hinreichend gut beschreiben.

2.5.2 Strömung im Mantelraum

Die auf dem Markt erhältlichen Kreuzstrom-Hohlfasermodule der Celanese AG[68] haben zur Vermeidung von Totwasserzonen strömungsbrechende Einbauten. Wie in Abb. 2-18 zu sehen ist, wird die Phase, welche die Hohlfasern umströmt, durch ein zentrales Rohr in den Modul geführt. Die Poren dieses Zentralrohres verteilen die Phase in den Mantelraum, wo sie die Hohlfasern umspült. Ein Strömungsbrecher in der Mitte des Moduls erzwingt eine Umströmung aller Hohlfasern durch die äußere Phase. In der zweiten Hälfte des Moduls wird die Phase wiederum im Zentralrohr gesammelt und aus dem Modul herausgeführt.

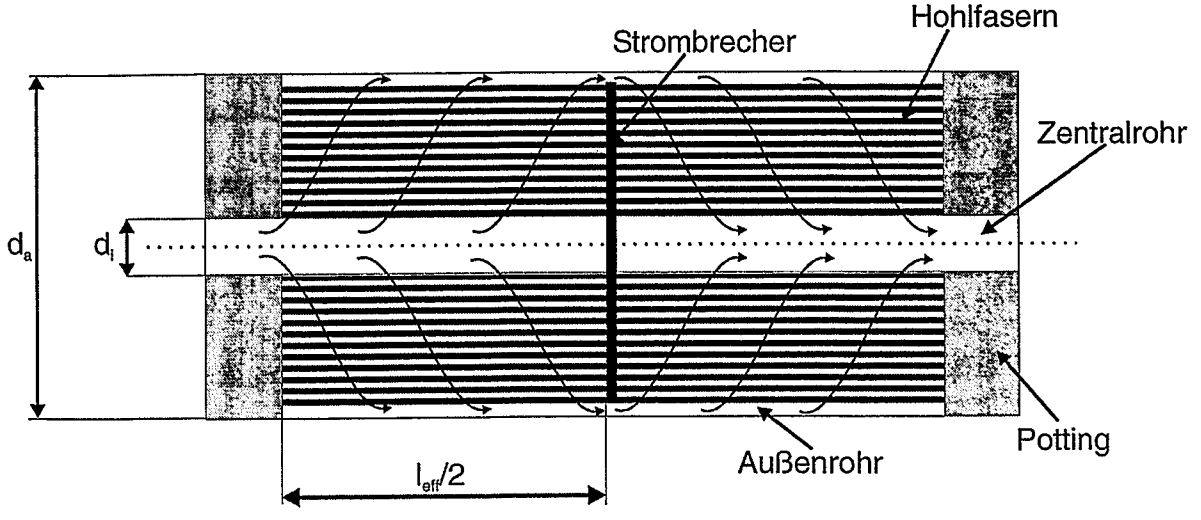


Abb. 2-18: Strömungsführung im Mantelraum eines Kreuzstrom-Hohlfasermoduls (idealisiert)

Ein mathematischer Ansatz zur Beschreibung der Hydrodynamik wird vom Hersteller der Membranen und der Module nicht explizit angeboten[69]. Allerdings finden sich in der Literatur einfache Modelle für den Einsatz der Hohlfasermodule als Gas-Flüssig Kontaktoren[70]. In der älteren Literatur gibt es zwei Ansätze zur Beschreibung der Hydrodynamik in derartigen geometrischen Strukturen[71].

Einerseits kann man die Strömung betrachten, als würde sie ein Bett durchfließen. Das würde bedeuten, daß die Reynoldszahl vom hydraulischen Durchmesser dieses Bettes abhängt. Andererseits ist die Beschreibung als eine Überströmung einzelner Zylinder möglich. Dann wäre Re vom Durchmesser des Rohres abhängig.

Aufgrund der dichten Packung der Hohlfasern in dem Modul ist es jedoch nur schwer vorstellbar, daß die typische geradlinige Strömung, wie sie an einer einzelnen Faser auftreten würde, hier zu Grunde gelegt werden kann. Vielmehr wird davon ausgegangen, daß die Strömung im Mantelraum des Hohlfasermoduls als Strömung in einem dicht gepackten Bett betrachtet werden muß[72].

Der hydraulische Durchmesser d_h ergibt sich aus dem freien durchspülten Raum im Modul $4*V_m$ und der benetzten Fläche A des Bettes[73/74].

Gl. 2-9
$$d_h = \frac{4V_m}{A} = \frac{d_a^2 - d_i^2 - N d_{HF}^2}{N d_{HF}}$$

Dabei ist N die Anzahl der Hohlfasern, d_{HF} der Hohlfaserdurchmesser und d_a bzw. d_i der Durchmesser des Moduls bzw. des Zentralrohrs.

Der geometrische freie Volumenteil ε_{th} ist wie folgt definiert:

Gl. 2-10
$$\varepsilon_{th} = \frac{V_m - V_{HF}}{V_m} = \frac{\frac{(\pi(d_a^2 - d_i^2))}{4}\, l_{eff} - N\frac{\pi d_{HF}^2}{4} \cdot l_{eff}}{\frac{\pi(d_a^2 - d_i^2)}{4} \cdot l_{eff}} = 1 - \frac{N \cdot d_{HF}^2}{d_a^2 - d_i^2}$$

Vm ist das Modulvolumen und V_{HF} das Volumen der darin befindlichen Hohlfasern.

Die effektive Strömungsgeschwindigkeit in der Hohlfaserpackung ist daher:

Gl. 2-11
$$w_{eff}(d) = \frac{w(d)}{\varepsilon_{th}}$$

Die Durchmesser-abhängige lokale Oberflächengeschwindigkeit w(d) ist definiert als:

Gl. 2-12
$$w(d) = \frac{2Q}{\pi d\, l_{eff}}$$

Aus der Integration folgt die mittlere Oberflächengeschwindigkeit.

Gl. 2-13
$$\overline{w} = \frac{2Q}{\pi l_{eff}} \frac{\ln(d_a/d_i)}{d_a - d_i}$$

Setzt man die mittlere Oberflächengeschwindigkeit und den hydraulischen Durchmesser ein, so erhält man die Reynoldszahl.

Gl. 2-14
$$Re = \frac{\overline{w}\, d_h \rho}{\eta} = \frac{2Q \cdot \rho}{\pi \cdot \eta} \cdot \frac{(d_a + d_i) \cdot \ln(d_a/d_i)}{l_{eff} \cdot N \cdot d_{HF}}$$

Aus der Reynoldszahl läßt sich nun gemäß Gl. 2-7 der Druckverlust im Mantelraum berechnen. Es gilt jedoch zu beachten, daß analog zur Druckverlustrechnung für Rohrbündelwärmeübertrager[75] hier statt dem Innendurchmesser der Hohlfaser der hydraulische Durchmesser des Modulmantels eingesetzt wird.

2.6 Reaktivextraktion in der Biotechnologie

In den letzten Jahren sind eine Vielzahl biotechnologischer Verfahren zur Produktion von organischen End- oder Zwischenprodukten wie Carbonsäuren, Aminosäuren oder Antibiotika weiterentwickelt worden. Die Nährlösungen bestehen dabei aus komplexen Gemischen von Kohlenstoff-, Stickstoff-, und Phosphatverbindungen, Mineralsalzen und Precursorn. Die bei der Fermentation entstehenden Primär- und Sekundärmetabolite müssen am Ende des Prozesses so aufbereitet werden, daß ein hinreichend sauberes Produkt vorliegt.

Die Gewinnung und Reinigung der biotechnologisch hergestellten Produkte stellt spezifische Anforderungen an das Aufarbeitungsverfahren. Die Komponenten liegen in stark, verdünnten wäßrigen Lösungen vor und sind oftmals Temperatur- und pH-sensitiv. Die bei Fermentationen enstehenden Gemische bestehen meist aus Stoffen mit sehr ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften. Zur Trennung dieser Komponenten stellt die Reaktivextraktion ein interessantes Werkzeug dar.

Die Reaktivextraktion bietet gegenüber anderen Trennverfahren für den Einsatz in der Biotechnologie einige Vorteile.

- Die Extraktionsausbeute kann wegen der höheren Verteilungskoeffizienten gegenüber der Extraktion erheblich gesteigert werden.[76/77/78]
- Die selektive Abtrennung stark polarer Carbonsäuren wie Milchsäure oder Aminosäuren ist nur durch Reaktivextraktion möglich.[79/80/77/78]
- Die reaktive Aufspaltung eines Gemisches von Aminosäuren ist wegen der hohen Selektivität der Extraktionsmittel möglich.[81]
- Die Extraktion von Penicillin kann durch den Einsatz von Reaktivkomponenten vom stark sauren in den neutralen pH Bereich verschoben werden, dadurch wird die Stabilität des Penicillins erheblich gesteigert.[80/77]

Die Abtrennung von Zitronensäure aus Fermentationslösungen mittels Reaktivextraktion wurde bereits mehrfach beschrieben.[82/83] Es war bisher jedoch nicht möglich, das Raffinat direkt in den Fermenter zurückzufahren. Statt dessen sind aufwendige Reinigungs- und Regenerationsschritte beschrieben, bevor eine Rückführung möglich ist.

Auch die nicht integrierte Reaktivextraktion von Phenylalanin mit der ELM Technologie ist bereits in der Literatur beschrieben worden[84]. Dabei wurden sowohl klassische Verfahren, wie eine pulsierte Siebbodenkolonne[85], als auch membrangestützte Techniken[86] eingesetzt. Jedoch waren die Trennleistungen und die erreichte Selektivität sehr gering. Die hohe Toxizität der in den oben genannten Arbeiten eingesetzten Carrier auf das Mikroorganismen-Wachstum verbietet allerdings den Einsatz dieser Techniken in Pilotprozessen.

2.7 Präzipitation

Die Präzipitation ist vermutlich eines der ältesten Aufarbeitungsverfahren und eine effektive Methode zur Reduzierung des Volumens einer Produktlösung. Neben der sehr frühen Verwendung in einer Aufarbeitungskette beim Einsatz zur Proteinfällung kommt sie andererseits sehr häufig am Ende des Prozesses zum Einsatz. Dabei geht es darum, das gewünschte Produkt so schnell und billig wie möglich in einer festen Form zu gewinnen.

Die Präzipitation ist ein vergleichsweise einfaches Verfahren, das in der Industrie sehr häufig eingesetzt wird. Auch für hochwertige Produkte wie in der Blutplasma-Fraktionierung[87] kommt die Präzipitation zum Einsatz.

Die großen Vorteile der Präzipitation ist die Anwendbarkeit in einfachen Anlagen, wie Rührkesseln, Mixer-Settler oder Wirbelschichtreaktoren. Nach einer Aufkonzentrierung wird das Produkt aus dem Extrakt präzipitiert. Dabei kommt eine pH-Verschiebung zum Einsatz. Verschiebt man den pH einer hochkonzentrierten Lösung durch Titration in Richtung des isoelektrischen Punktes, beginnt die Aminosäure auszufallen und reißt Nachbarmoleküle, die Aufgrund der Löslichkeit nicht fallen würden, mit.

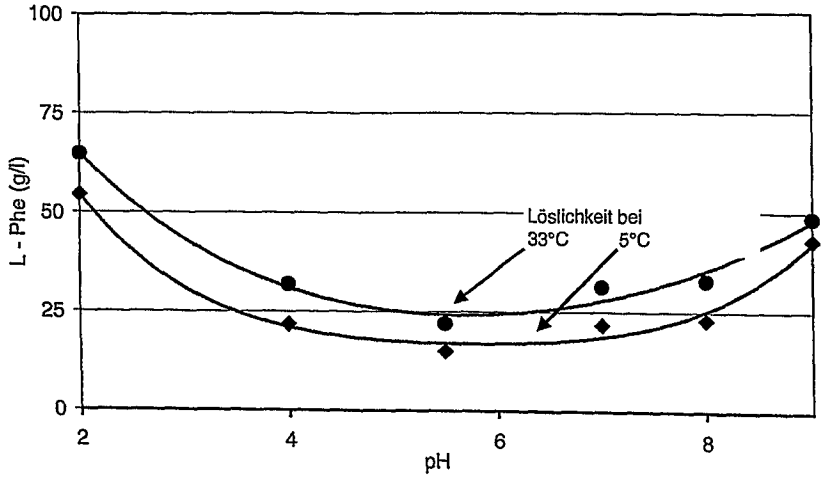


Abb. 2-19: Löslichkeit von L-Phe in Wasser[88]

Die Löslichkeit von L-Phenylalanin ist stark Temperatur- und pH-Wert abhängig. Wie in Abb. 2-19 zu sehen ist, hat die Aminosäure am isoelektrischen Punkt (pH = 5,5) die niedrigste Löslichkeit. Das hängt mit dem zwitterionischen Charakter des Moleküls zusammen, der bei diesem pH am stärksten ausgeprägt ist (vergl. Kap. 2.8.1). Neben der Temperatur und dem pH hat aber auch die Ionenstärke der Lösung einen erheblichen Einfluß auf die Löslichkeit. So können in schwefelsaurer Lösung bis zu 100 g/l L-Phe gelöst werden. Im Gegensatz dazu ist es aber auch möglich, durch Präzipitation das L-Phe bis auf einen Gelöstanteil in der Mutterlauge von 5 g/l auszufällen[89].

2.8 Chemische Grundlagen

2.8.1 L-Phenylalanin

Phenylalanin ist ein Vertreter der proteinogenen Aminosäuren. Es entsteht formal aus der Substitution eines H-Atoms der Methylgruppe des Alanins durch einen Benzolring. Dieser Benzolring kann im menschlichen Organsimus nicht synthetisiert werden. Daher können alle aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan) als essentiell angesehen werden.

Nach der IUPAC-IUB-Nomenklatur kann L-Phenylalanin mit Phe oder F abgekürzt werden. Die allgemeine Formel lautet C_6H_5-CH_2-$CH(NH_2)$-COOH. Aufgrund des asymmetrischen C-Atoms an Position 2 ist Phe optisch aktiv und kann als D oder L-Form vorliegen, wobei nur die L-Form biosynthetisch zugänglich ist. Daher wird in dieser Arbeit in der Regel die Bezeichnung L-Phe verwendet.

Die wichtigsten Stoffdaten sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Summenformel	$C_9H_{11}NO_2$
molare Masse	165,19 g/mol
Löslichkeit in Wasser (25°C)	29,6 g/l
Löslichkeit in Wasser (100°C)	99,0 g/l
Säurenkonstante pK_1 (25°C)	1,83
Basenkonstante pK_2 (25°C)	9,13
Diffusionskoeffizient D	$3{,}58*10^{-4}$ cm²/min

Tabelle 3: Stoffdaten von Phenylalanin[88]

Aufgrund der beiden funktionellen Gruppen des Phenylalanins hat es einen zwitterionischen Charakter. Je nach pH-Wert kann die Aminosäure als diprotoniertes Kation, deprotoniertes Anion oder nach außen neutral vorliegen. Die prozentualen Anteile der jeweiligen Ionenspezies berechnen sich aus dem pH und der Säure- bzw. Basenkonstante der Aminosäure. In Abb. 2-20 sind diese Anteile in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgetragen.

Um eine Aminosäure mit Hilfe eines flüssigen Ionentauschers, wie es bei der Reaktivextraktion der Fall ist, abzutrennen, muß diese in einer geladenen Form vorliegen. In der Literatur finden sich daher häufig Hinweise darauf, daß sich Aminosäuren nur oberhalb pH 10 oder unterhalb pH 3 in zufriedenstellendem Maße extrahieren lassen[90].

Der Dissoziationsgrad und damit die Ionisierung des L-Phe in Abhängigkeit des pH-Wertes wird durch die folgenden Gleichungen beschrieben[91].

Gl. 2-15
$$100 \cdot \frac{c[F^+]}{c[F_{ges}]} = 100 \cdot \left(1 - \frac{1}{1+10^{pH-pK_S}}\right)$$

Gl. 2-16
$$100 \cdot \frac{c[F^{+/-}]}{c[F_{ges}]} = 100 \cdot \left(1 - \frac{1}{1+10^{pH-pK_S}} - \frac{1}{1+10^{pK_B-pH}}\right)$$

Gl. 2-17
$$100 \cdot \frac{c[F^-]}{c[F_{ges}]} = 100 \cdot \left(1 - \frac{1}{1+10^{pK_B-pH}}\right)$$

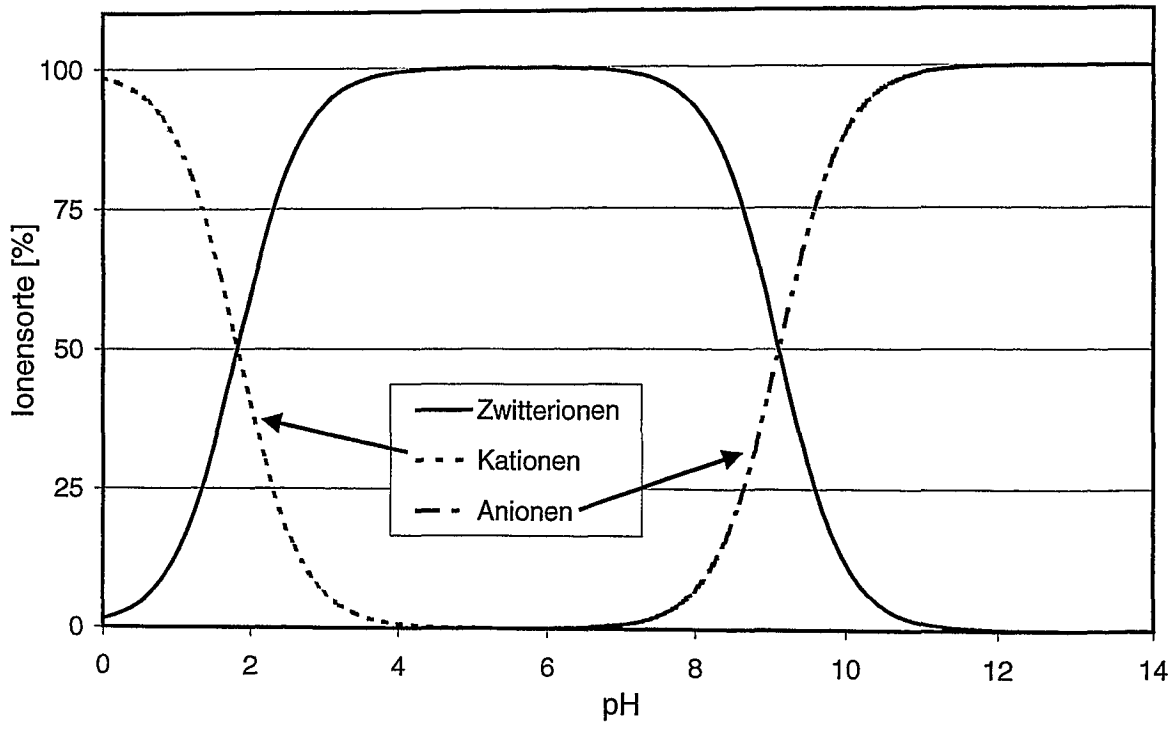


Abb. 2-20: Ladung des L-Phe in Abhängigkeit des pH-Wertes[92]

2.8.2 Gleichgewicht

Bei einer reversiblen chemischen Reaktion, wie sie für die Reaktivextraktion wünschenswert ist, laufen mit wachsender Konzentration der Produkte Rückreaktionen ab, so daß sich ein Gleichgewichtszustand einstellt, bei dem die Edukte noch nicht vollständig umgesetzt sind. Mit Hilfe des Massenwirkungsgesetz läßt sich dieser Gleichgewichtszustand allgemein beschreiben.

Gl. 2-18
$$K = \prod_i \left[\frac{a_i}{a^0}\right]^{\nu_i}$$

Eine chemische Reaktion wird im allgemeinen wie folgt dargestellt:

Gl. 2-19
$$|\nu_A|A + |\nu_B|B \Leftrightarrow \nu_C C + \nu_D D$$

damit gilt für die chemische Gleichgewichtskonstante K für obige Reaktion:

Gl. 2-20
$$K = \frac{\left[a_C/a^0\right]^{\nu_C} \cdot \left[a_D/a^0\right]^{\nu_D}}{\left[a_A/a^0\right]^{|\nu_A|} \cdot \left[a_B/a^0\right]^{|\nu_B|}}$$

A und B sind die Edukte. C und D sind die Produkte. Die Anzahl, mit der das jeweilige Molekül an der Reaktion teilnimmt, wird durch die stöchiometrischen Koeffizienten ν_i angegeben. Um den wirksamen Gehalt einer Komponente zu berücksichtigen, gehen in das Massenwirkungsgesetz die Aktivitäten a_i bezogen auf die Standardaktivität a^0 = 1 mol/l ein. Aufgrund von Wechselwirkungen zwischen einzelnen Ionen kann diese wirksame Konzentration kleiner als die tatsächliche sein.

Für verdünnte wäßrige Lösungen kann jedoch mit einer Aktivität von 1 gerechnet werden. Da in dieser Arbeit nur mit verdünnten Lösungen gearbeitet wird, kann das Massenwirkungsgestz vereinfacht werden. Dazu werden nur die Konzentrationen berücksichtigt.

Gl. 2-21
$$K_c = \frac{cC^{\nu_C} \cdot cD^{\nu_D}}{cA^{|\nu_A|} \cdot cB^{|\nu_B|}}$$

2.8.3 Kinetik

Die Reaktionsgeschwindigkeit einer Gleichgewichtsreaktion entspricht der Differenz der Hin- und Rückreaktionsgeschwindigkeit. Für das oben genannte Beispiel gilt:

Gl. 2-22
$$R_{hin} = R_1 = k_1(T) \cdot c_A^{|\nu_A|} \cdot c_B^{|\nu_B|}$$

Gl. 2-23
$$R_{rück} = R_2 = k_2(T) \cdot c_C^{|\nu_C|} \cdot c_D^{|\nu_D|}$$

Für die Gesamtreaktion gilt:

Gl. 2-24
$$R_{ges} = R_1 - R_2$$

Da im Gleichgewicht die Hin- und Rückreaktion gleich schnell ablaufen, wird die resultierende Geschwindigkeit gleich null, und es gilt das vereinfachte Massenwirkungsgesetz.

Gl. 2-25
$$K_c = \frac{R_1}{R_2} = \frac{cC^{\nu_C} \cdot cD^{\nu_D}}{cA^{|\nu_A|} \cdot cB^{|\nu_B|}}$$

2.8.4 Extraktionsmittelklassen

Zur Abtrennung von Aminosäuren aus wäßrigen Medien bieten sich chemisch wirkende Extraktionsmittel an. Die Extraktionsmittel maskieren die Ladung der Aminosäure, so daß diese sich in eine organische Phase extrahieren läßt. Aufgrund der hohen Viskosität dieser Extraktionsmittel werden sie mit geeigneten Lösungsmitteln verdünnt. Die zur Verfügung stehenden Extraktionsmittel lassen sich in verschiedene Klassen einteilen[93].

2.8.4.1 Anionentauscher

Der Extraktionsmechanismus entspricht dem der festen Ionentauscher. Flüssige Anionentauscher sind in der Regel aliphatische Amine. Das Amin reagiert mit dem L-Phe-Anion und setzt dabei ein anderes Anion oder Hydroxylion frei. Bei der Reextraktion wird dann die Aminosäure durch die hohe Gegenionenkonzentration der Extraktphase oder Striplösung von dem Carrier und damit aus der organischen Phase verdrängt. Beispiele für Anionentauscher sind die ternären Ammoniumsalze Alamin 308 und Alamin 304 und das quarternäre Aliquat 336 (Trioctylmethylammoniumchlorid).

2.8.4.2 Kationentauscher

Bei der Extraktion mit flüssigen Kationentauschern werden L-Phe-Kationen von der organischen Phase durch Komplexbildung aufgenommen und andere Kationen oder Protonen an die wäßrige Lösung abgegeben. Wie bei den Anionentauschern erfolgt die Reextraktion durch eine Verdrängung des L-Phe vom Carrier durch Gegenionen. Als flüssige Kationentauscher wurden in dieser Arbeit Phosphorsäure- und Sulfonsäureester eingesetzt.

2.8.4.3 Solvatisierende Extraktionsmittel

Diese Extraktionsmittel extrahieren neutrale Verbindungen wie z.B. Metallkomplexe. Ein Beispiel für ein solches Extraktionsmittel ist MIBK (Methylisobutylketon).

2.8.4.4 Chelat-Bildner

Chelat-Bildner vereinigen die Eigenschaften der solvatisierenden Extraktionsmittel und der Kationentauscher. Es bilden sich ringförmige Strukturen aus, da die Liganden mehrere Koordinationsstellen um das zentrale Ion einnehmen.

Um ionische Aminosäuren zu extrahieren, kommen sowohl Anionen- als auch Kationentauscher in Frage. Der Vorteil dieser Extraktionsmittel liegt in dem - über die Gegenionenkonzentration einstellbaren - treibenden Gradienten.

2.9 Reaktionsort / Extraktionsmechanismen

Abhängig von der Wasserlöslichkeit der Reaktionspartner kann die Extraktion mit flüssigen Ionentauschern an verschiedenen Orten im Stoffsystem stattfinden.

2.9.1.1 Homogene Reaktion in der organischen Phase

Für diesen Reaktionsort muß die abzutrennende Komponente sich zunächst in der organischen Phase physikalisch lösen. Die physikalische Löslichkeit von L-Phe kann jedoch aufgrund der großen Hydrathülle und des polaren Charakter des Moleküls ausgeschlossen werden. Dieser Reaktionsmechansimus ist daher für das vorliegenden Trennproblem nicht gültig.

2.9.1.2 Homogene Reaktion in der wäßrigen Phase

Falls das Extraktionsmittel sowohl unbeladen als auch beladen eine ausreichende Löslichkeit in der wäßrigen Phase besitzt, kann diese Art der Reaktion angenommen werden. Die Löslichkeit der eingesetzten Carrier ist jedoch mit wenigen zehn bis hundert ppm vernachlässigbar klein, so daß auch dieser Mechanismus für die Beschreibung der Abtrennung nicht in Frage kommt.

2.9.1.3 Hetereogene Reaktion an der Phasengrenze

Da das Extraktionsmittel kaum in Wasser und das L-Phe nicht in der organischen Phase löslich ist, kann dieser Mechanismus angenommen werden. Zur Vereinfachung wird die Gesamtmenge an L-Phe zur Beschreibung des Gleichgewichts eingesetzt. Das Gleichgewicht läßt sich folgendermaßen beschreiben:

Gl. 2-26

$$[F_{aq}] \cdot + n\,[CH_{org}] \;\Leftrightarrow\; [C_n F_{org}] + n\,[H^+_{aq}]$$

Die Gleichgewichtskonstante K_{ges} ergibt sich aus Meßwerten der satzweisen Extraktionen nach Einstellung der Gleichgewichte. Daher wird in Gl. 2-27 die gemessene Konzentration an L-Phe ohne Berücksichtigung der pH-abhängigen Konzentration der jeweiligen Ionenspezies verwendet:

Gl. 2-27

$$K_{ges} = \frac{c[C_n F_{org}] \cdot c\,[H^+_{aq}]^n}{c[F_{aq}] \cdot c\,[CH_{org}]^n}$$

Die Konzentration des L-Phe in der wäßrigen Phase ist dabei über HPLC-Messungen zugänglich. Die Konzentrationen an beladenem und unbeladenem Carrier in der organischen Phase lassen sich über den L-Phe Gehalt in der wäßrigen Phase vor und nach der

Extraktion und dem Gesamt-Carrieranteil bilanzieren. Die Protonenkonzentration erhält man aus dem pH-Wert.

Der Verteilungskoeffizient bezogen auf die molaren Konzentrationen kann aus der Gleichgewichtskonstanten direkt abgeleitet werden.

Gl. 2-28
$$D = \frac{c[C_n F_{org}]}{c[F_{aq}]^n} = K_{ges} \cdot \frac{c[CH_{org}]^n}{c[H^+_{aq}]}$$

Nach logarithmieren folgt daraus:

Gl. 2-29
$$\log(D) = \log(K_{ges}) - \log(c[H^+_{aq}]) + n \cdot \log(c[CH_{org}])$$

Mit:

$$-\log(c[H^+_{aq}]) = +pH$$

Anhand der logarithmierten Gleichung wird bereits der starke Einfluß des pH-Werts deutlich. Dieser Einfluß ist phänomenologisch durch die vollständige Protonierung des Carriers im tiefen pH-Bereich zu erklären.

Aufgrund der einfachen positiven Gesamtladung am L-Phe kann für die Komplexierungsreaktion eine Stöchiometrie gleich eins angenommen werden. Die Koeffizienten n sind also immer gleich eins zu setzen. Die L-Phe-Konzentrationen zu Beginn (0) und am Ende (1) der Extraktion werden mittels HPLC bestimmt. Die Konzentration an Carrier-gebundenem L-Phe in der organischen Phase $c[CF_{org}]$ erhält man aus der Massenbilanz, die um einen Volumenquotienten erweitert wird.

Gl. 2-30
$$c[CF_{org}] = \left(c[F^+]^0_{aq} - c[F^+]^1_{aq}\right) \cdot \frac{V_{aq}}{V_{org}}$$

Nach Einsetzen von Gl. 2-30 in Gl. 2-27 erhält man die Gleichgewichtskonstante K als Funktion der vorgelegten L-Phe-Konzentration. Anhand von Gl. 2-28 läßt sich daraus der Verteilungskoeffizient D bestimmen. Sind D und K bekannt, lassen sich für verschiedene Carrierkonzentrationen in der organischen Phase und für verschiedene pH-Werte des Extrakts die Gleichgewichtskonzentrationen in den wäßrigen Phasen berechnen.

2.10 Beschreibung des Stofftransports

Zur Beschreibung des Stofftransports sollen zunächst die Extraktion und die Rückextraktion getrennt behandelt werden.

2.10.1 Extraktion

Bei einem einzelnen Durchlauf durch den Modul ist die Konzentrationsänderung an L-Phe sehr gering. Aufgrund dieser geringen Konzentrationsänderung kann der treibende Gradient über den Modul als konstant angenommen werden (s. Kap. 9.1). Der Stoffübergang läßt sich demnach für das vorliegende System mit Gl. 2-31 beschreiben.

Gl. 2-31
$$Q_{aq}\left(c[F]^0_{aq} - c[F]^L_{aq}\right) = \beta_{aq} A_i \left(c[F]_{aq} - c[F]^{eq}_{aq}\right)$$

Für eine ideale Durchmischung des Raffinats im Vorlagegefäß gilt, daß die Konzentration im Vorlagegefäß gleich der am Moduleingang ist. Mit einer instationären Massenbilanz über das Vorlagegefäß läßt sich die Änderung der L-Phe Konzentration über der Zeit bestimmen.

Gl. 2-32
$$V_{aq}\frac{dc[F]_{aq}}{dt} = Q_{aq}\left(c[F]_{aq}^{0} - c[F]_{aq}^{L}\right)$$

Wird die Gleichgewichtskonzentration $c[F]_{aq}^{eq}$ durch die tatsächliche Konzentration zum Zeitpunkt $t=t_i$ $c[F]_{aq}^{i}$ ersetzt, läßt sich aus der Kombination der Gleichungen Gl. 2-31 und Gl. 2-32 der Stoffübergangskoeffizient aus der Konzentrationsänderung im Vorlagegefäß berechnen.

Gl. 2-33
$$V_{aq}\frac{dc[F]_{aq}}{dt} = \beta_{aq} A_i \left(c[F]_{aq}^{0} - c[F]_{aq}^{i}\right)$$

Nach Integration von Gl. 2-33 zwischen $t = 0$ und $t = t_i$ läßt sich der Stoffübergangskoeffizient K direkt aus der Änderung der Vorlagekonzentration über der Zeit bestimmen.

2.10.2 Rückextraktion

Für den Rückextraktionsprozeß läßt sich der Stoffübergangskoeffizient analog Gl. 2-33 berechnen. In diesem Fall wird die Konzentrationszunahme an L-Phe in der Extrakt-Vorlage über der Zeit gemessen.

Für einen gekoppelten Prozeß von Extraktion und Rückextraktion, wie er in dieser Arbeit etabliert werden soll, ist der Gesamtstoffübergang der Anlage aus Gl. 2-33 zugänglich. Dafür müssen jedoch einige Bedingungen eingehalten werden. Zum einen müssen die Volumina der Phasen gleich sein. Die wäßrigen Phasen müssen im Inneren der Hohlfasern geführt werden, da sich im Mantelraum die Strömungsverhältnisse ändern. Um aus der Konzentrationsänderung einer Phase den mittleren Stoffübergangskoeffizienten der gesamten Anlage zu berechnen, muß die Beladung des Carrier vollständig reversibel sein. Es darf also keine Stoffsenke für das L-Phe in der organischen Phase vorliegen. Unter diesen Bedingungen gilt:

Gl. 2-34
$$\beta_{AV} = \frac{V_{aq}}{A_i} \Big/ t \cdot \left(\ln c[F]_{aq}^{0} - \ln c[F]_{aq}^{i}\right)$$

für $t = 0 \rightarrow \ln c[F]_{aq}^{0}$

für $t = i \rightarrow \ln c[F]_{aq}^{i}$

Die Änderung der L-Phe Konzentration in einer der wäßrigen Phasen (V_{aq}) über der Zeit, liefert in Abhängigkeit der Membranfläche (A_i) den Stoffübergangskoeffizienten β.

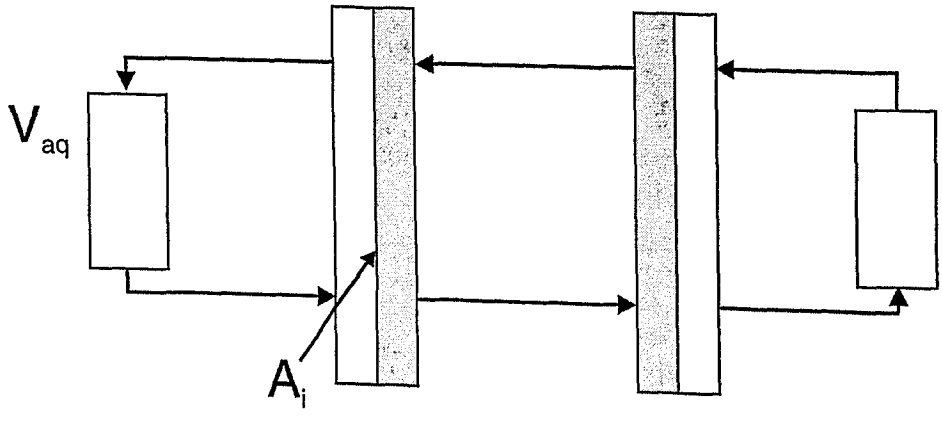


Abb. 2-21: Bilanzraum zur Berechnung des Stoffübergangskoeffizienten

2.10.3 Modellierung des Stofftransports

Für die Modellierung des Stofftransports kann Gleichgewicht an den Phasengrenzen angenommen werden. Der Stoffübergang des Phenylalanins von der Raffinat-Phase über die organische Phase bis in die Extrakt-Phase setzt sich aus mehreren Schritten zusammen. Für jeden einzelnen Schritt kann der Stoffffluß j beschrieben werden.

Diffusion der L-Phe-Ionen in der Phasengrenze des Raffinats:

Gl. 2-35
$$j_{Phe,Raff} = \beta_{Phe,Raff} A_i \left(c\,[F^+]_{aq} - c\,[F^+]^*_{aq}\right)$$

Diffusion der Protonen in der Phasengrenze des Raffinats:

Gl. 2-36
$$j_{H,Raff} = \beta_{H,Raff} A_i \left(c\,[H^+]^*_{aq} - c\,[H^+]_{aq}\right)$$

Diffusion des L-Phe-Carrier-Komplex durch die organische Phasengrenze:

Gl. 2-37
$$j_{C-Phe,M} = \frac{D_{C-Phe} A_m}{\delta} A_i \left(c\,[CF]^*_{org} - c\,[CF]_{org}\right)$$

Dieser Stoffstrom tritt sowohl bei der Extraktion in die organische Phase als auch bei der Rückextraktion in den Extrakt jeweils mit verändertem Vorzeichen auf.

Diffusion des Carriers durch die organische Phasengrenze:

Gl. 2-38
$$j_{CH,M} = \frac{D_{CH} A_m}{\delta} A_i \left(c\,[CH]_{org} - c\,[CH]^*_{org}\right)$$

Auch dieser Stoffstrom tritt sowohl bei der Extraktion als auch bei der Rückextraktion jeweils mit verändertem Vorzeichen auf.

Diffusion des L-Phe-Carrier-Komplex im Inneren der organischen Phase:

Gl. 2-39
$$j_{C-Phe,org} = \beta_{C-Phe,org} A_a \left(c\,[CF]^*_{org} - c\,[CF]_{org}\right)$$

Diffusion des Carriers im Inneren der organischen Phase:

Gl. 2-40
$$j_{CH,org} = \beta_{CH,org} A_a \left(c\,[CH]_{org} - c\,[CH]^*_{org}\right)$$

Diffusion der L-Phe Ionen in der Phasengrenze des Extrakts:

Gl. 2-41
$$j_{Phe,Ex} = \beta_{Phe,Ex} A_i \left(c\,[F^+]^*_{aq} - c\,[F^+]_{aq}\right)$$

Diffusion der Protonen in der Phasengrenze des Extrakts:

Gl. 2-42
$$j_{H,Ex} = \beta_{H,Ex} A_i \left(c\,[H^+]_{aq} - c\,[H^+]^*_{aq}\right)$$

Die verschiedenen Flächen A_i, A_a und A_m beziehen sich auf die Innenseite und die Außenseite der Hohlfasern und die Phasengrenzfläche im Inneren der Hohlfaserwand.

Aus stöchiometrischen Gründen gilt im stationären Zustand:

Gl. 2-43
$$j_{Phe,Raff} = j_{H,Raff} = j_{C-Phe,M} = j_{CH,M} = j_{C-Phe,org} = j_{CH,org} = j_{Phe,Ex} = j_{H,Ex}$$

Die Gleichungen für die Einzelstoffflüsse können numerisch gelöst werden. In iterativen Rechenoperationen können so die Konzentrationsprofile im Hohlfasermodul schrittweise berechnet werden. Für jeden Zeitschritt wird in jedem Volumenelement die Massenbilanz ausgeglichen. Die Prozedur wird so lange wiederholt, bis stationäre Bedingungen vorliegen. Die Lösung liefert die Beziehung für die Sherwoodzahl (Sh) in Abhängigkeit der Hydrodynamik (Re) und der Stoffeigenschaften (Sc) im Hohlfaserinneren über die gesamte Anlage. Für laminare Strömung im Hohlfaserinneren haben verschiedene Autoren für die Extraktion in Hohlfasermodulen mit verschiedenen Stoffsystemen eine theoretische Abhängigkeit in Analogie zum Wärmetransport gefunden. Zur Beschreibung des Stoffübergangs dient ein Potenzansatz mit dimensionslosen Kennzahlen.

Gl. 2-44 $$Sh = c\ Re^{a}\ Sc^{b}$$ gefunden.

Die dimensionslosen Kennzahlen berechnen sich nach Gl. 2-45 bis Gl. 2-47. Damit ist der Stoffübergang vom Impulstransport (molekular und gesamt) und von Viskositäts- und Diffusionseffekten abhängig.

In Tabelle 4 sind die aus der Literatur bekannten Stofftransportgleichungen für verschiedene zu extrahierende Komponenten zusammengefaßt.

Autor	**Stoffübergang**	**Stoffsystem**	**extrahierte Komponente**	**Lit.-Nr.**
Cardoso et al., 1999	$Sh = 0{,}03\ Re^{0,6}\ Sc^{0,33}$	Trioctylmethyl-ammoniumchlorid in Hexanol	L-Phe	94
Schöner, et al., 1998	$Sh = 1{,}76\ Re^{0,82}\ Sc^{0,33}$	D_2EHPA in Isodekan	Zn	95
Daiminger, et al., 1996	$Sh = 0{,}36\ Re^{0,53}\ Sc^{0,33}$	D_2EHPA in Isodekan	Cd, Ni, Zn	96
Feron, et al., 1993	$Sh = 0{,}90\ Re^{0,50}\ Sc^{0,33}$	D_2EHPA in Isodekan	Zn	97

Tabelle 4: Stoffübergang in Hohlfasermodulen, Vergleich von Literaturzitaten

Abhängig von der zu extrahierenden Komponente und dem gewählten Extraktionsmittel weichen die Stoffübergangskorrelationen voneinander ab.

Ist die Abhängigkeit der Sherwoodzahl für ein Stoffsystem bekannt, läßt sich der Stofftransportkoeffizient β daraus berechnen und mit experimentell bestimmten Werten vergleichen.

Die drei dimensionslosen Kennzahlen lassen sich aus experimentellen Parametern bzw. Konstanten berechnen.

Gl. 2-45 $$Sh = \frac{\beta_{AV}\, d_h}{D} = \frac{\text{gesamter Stofftransport}}{\text{molekularer Stofftransport}}$$

Gl. 2-46 $$Re = \frac{\overline{w}\, d_h\, \rho}{\eta} = \frac{\text{gesamt Impulstransport}}{\text{molekularer Impulstransport}}$$

Gl. 2-47 $$Sc = \frac{\eta}{\rho D} = \frac{\text{Viskositäts Effekte}}{\text{Diffusions Effekte}}$$

3 Problemstellung

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist die Prozeßentwicklung zur integrierten Produktabtrennung von L-Phenylalanin simultan aus laufenden Fermentationsprozessen. Dadurch sollen Produktinhibierungen in der Aromatenbiosynthese der *E. coli*-Zellen vermieden werden, um die Produktivität des Gesamtprozesses zu erhöhen.

Wie im vorhergehenden Kapitel gezeigt werden konnte, gibt es eine Reihe verschiedener Lösungsansätze. Für jeden einzelnen existieren Sachverhalte, die den integrierten Ansatz erschweren oder gar unmöglich erscheinen lassen.

Ein Abwägen der Vor- und Nachteile der Prozeßvarianten hat auf die Reaktivextraktion als ein mögliches Verfahren zur Integration hingewiesen. Zur Etablierung dieser Technologie ergibt sich aus den im Kapitel 2.1.3 genannten Verfahrensnachteilen zunächst die folgende Gliederung der Arbeiten:

- Entwicklung eines oder mehrerer Stoffsysteme zur Reaktivextraktion - bestehend aus Extraktions- und Verdünnungsmittel – mit ausreichend hohen Extraktionsleistungen für L-Phenylalanin,
- Überprüfung der Biokompatibilität dieser Systeme anhand von Parallelansätzen im Miniaturmaßstab,
- Untersuchung des pH-Einflusses sowie der Notwendigkeit einer Titration des Raffinats.

Nach Bearbeitung oben genannter Punkte sind im folgenden die Voraussetzungen zum technischen Einsatz der Reaktivextraktion zu schaffen. Dazu gehören im wesentlichen:

- Aufbau und Inbetriebnahme einer Anlage zur hohlfasergestützen Reaktivextraktion, zunächst im Labormaßstab und danach im Pilotmaßstab,
- Einsatz verschiedener Stoffsysteme zur Extraktion von L-Phe in diesen Anlagen,
- Bestimmung der Art und Konzentration der im Raffinat vorgelegten Gegenionen in Bezug auf Rückextraktionsgrad, Regeneration des Carriers und Stabilität der Phasengrenzen, insbesondere im Pilotmaßstab,
- Verifizierung der Untersuchungen zur Biokompatibilität im Laborreaktor,
- Aufkonzentrierung von L-Phe aus Fermentationsüberständen im „off-line"-Betrieb und Untersuchung der Selektivität der Extraktion,
- Untersuchung der Möglichkeiten zur weiteren Aufarbeitung bis zum Feststoff und Bestimmung des Reinheitsgrades.

Der erfolgreiche Abschluß der oben genannten Arbeiten bietet die Voraussetzungen für eine integrierte Produktaufarbeitung. Zum Abschluß der Arbeiten werden daher die Ergebnisse dieser Arbeit mit einem weiteren Projekt zur Fermentationsentwicklung zusammengeführt. Es soll im Pilotmaßstab integriert aufgearbeitet werden. Dieses Experiment hat im Bezug auf diese Arbeit folgende Zielsetzungen:

- Demonstration der integrierten Aufarbeitung im „on-line"-Betrieb,
- Aufkonzentrierung und Produktion von trockenem Produkt im Kilogramm-Maßstab,
- Untersuchung der Effekte auf die Produktivität der *E. coli*-Zellen.

4 Material und Methoden

4.1 on-line Analytik

4.1.1 CO_2 und O_2 im Abgas

Die Konzentration dieser Gase wird mittels einer Abgasanalytik über NIR-Infrarot-Adsorption bestimmt. In das Gerät ist eine Pumpe integriert, die den Gasvolumenstrom auf 1l/min konstant hält.

Die Kalibrierung erfolgt mit reinem Stickstoff, mit Raumluft (20,80% O_2) und mit Eichgas (15% O_2, 10% CO_2).

4.1.2 pH-Wert

Der pH-Wert wird über einen Meßverstärker an die Prozeßdatenerfassung übertragen und vom Prozeßrechner aufgezeichnet. Während der Fermentationen wird über den PID-Regler eine Schlauchpumpe angesteuert, die bei Absinken des pH-Wertes 25%ige Ammoniaklösung in den Fermenter dosiert.

4.1.3 Sauerstoffpartialdruck

Der Sauerstoffpartialdruck wird im Fermenter und im Filtrationsumlauf gemessen. Die Eichung der Elektrode im Fermenter erfolgt bei 37°C, 500 rpm, 0,3 bar Überdruck und einer Begasungsrate von 1 vvm. Für die Einstellung des Nullpunkts und der maximalen Sauerstoffsättigung wird reiner Stickstoff bzw. Druckluft (Raumluft) verwendet.

Die Übereinstimmung der Elektroden wird nach jeder Fermentation in Wasser überprüft, die Werte der Sauerstoffpartialdrücke im Filtrationsumlauf werden gegebenenfalls korrigiert.

4.1.4 Druck

Hinter dem Abluftfilter wird ein an eine Regeleinheit angeschlossenes Ventil montiert, so daß der Druck über den Abluftvolumenstrom reguliert werden kann.

4.1.5 Prozeßdatenerfassung

Die Prozeßdatenerfassung erfolgt über ein SMP-Interface (Siemens), das die Prozeßdaten als A/D- Wandler an den Prozeßrechner überträgt.

Dabei werden während der Fermentationen folgende Parameter erfaßt:

- c_{O2} im Abgas
- Rührerdrehzahl
- c_{CO2} im Abgas
- Temperatur
- pO_2 im Fermenter
- Gasvolumenstrom
- pO_2 im Filtrationsumlauf

- pH-Wert
- Gravimetrische Daten der Dosierstrecken: Glucose-Feed, Lauge, Permeat

Während der Extraktionsexperimente werden folgende Parameter erfaßt:

- pH-Wert der Donor- und Akzeptorphase
- Volumenströme des Raffinats, des Extrakts und der organischen Membranphase

Zur Meßdatenerfassung im Labormaßstab wird das im IBT2 entwickelte Programm MEDUSA verwendet. Vor einer Prozeßdurchführung können hier die Variablen und Dosierstrecken konfiguriert werden.

Während des Prozesses können die Meßwerte in tabellarischer und graphischer Form dargestellt werden, der Zeittakt der Darstellung ist dabei einstellbar. Außerdem können den Dosierstrecken während des Prozesses von MEDUSA Sollwerte für die Substratzugabe gesetzt werden, die durch eine Ansteuerung von Schlauchpumpen erfüllt werden. Diese Kommunikation erfolgt über serielle Schnittstellen.

Da die gravimetrischen Daten des Permeatflusses bei hoher Filtrationsleistung stark oszillieren, wird ein Zeittakt von 15 s eingestellt.

Die tabellarisch aufgeführten Meßdaten können von MEDUSA in ein für Microsoft- Excel™ erkennbares Format exportiert werden.

Zur Meßdatenerfassung der Extraktionsexperimente im Technikumsmaßstab wird das im IBT2 entwickelte Programm DROBS eingesetzt.

4.2 off-line Analytik

4.2.1 Glucosekonzentration im Fermentationsmedium

Die Bestimmung der Glucosekonzentration erfolgt mit einem accutrend sensor® (Roche). Die auf einen Teststreifen aufgetragene Glucoselösung wird durch die dort immobilisierte Glucoseoxidase in Gluconolacton umgewandelt. Der dabei äquimolar freiwerdende Sauerstoff wird amperometrisch gemessen.

Die Fermentationsproben werden mit bidestilliertem Wasser 1:10 verdünnt. Von dieser Verdünnung werden ca. 10 µl auf einen Teststreifen aufgetragen, die Glucosekonzentration kann nach ca. 1 Minute vom Display des Gerätes abgelesen werden.

4.2.2 Optische Dichte und Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD)wird die Probe nach geeigneter Verdünnung mit bidestilliertem Wasser bei λ=620 nm in einem Shimadzu UV-160 Zweistrahl-Spektralphotometer gegen Wasser gemessen. Aus der Extinktion lässt sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die optische Dichte berechnen.

Die Messung der Biotrockenmasse erfolgt durch Filtration von 2,5-10 ml der Probe in einem Celluloseacetatfilter (Porengröße 0,2 µm). Die Filter werden im Trockenschrank mindestens 24 Stunden getrocknet. Nach dem eintägigen Abkühlen im Exsiccator werden die Filter gewogen und daraus die Biotrockenmasse bestimmt.

4.2.3 Aminosäuren in wäßriger Lösung

Die Konzentrationen der Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin werden mittels Reversed-Phase-HPLC gemessen. Dabei wird für die Analytik des Raffinats und des Extrakts sowie für den Fermentationsüberstand dieselbe Meßmethode eingesetzt. Zur

Vermeidung von Kristallbildung werden die Proben bei Raumtemperatur entsprechend verdünnt.

Um die Haltbarkeit der Säule zu verlängern, werden die Proteine vor der Messung aus den Proben gefällt. Dazu werden 500µl Probe mit 100µl Trichloressigsäure (36%) versetzt, und 10 Minuten intensiv durchmischt und bei 14000 rpm abzentrifugiert. 300µl des Überstandes werden zum Neutralisieren mit 15µl NaOH (45%) versetzt und gründlich durchmischt. Die Proben können dann geeignet verdünnt werden.

Für die Messung werden die Proben in der HPLC mit ortho-Phtaldialdehyd und Mercaptoethanol derivatisiert und mit einem Gradienten der Puffer A und B eluiert. Die über die RP18-Säule getrennten Analyte werden an einem Fluoreszenzdetektor gemessen (HPLC- Geräteparameter im Anhang).

4.2.4 Organische Säuren in wäßriger Lösung

Die organischen Säuren Acetat, Citrat, Lactat, Fumarat, Oxoglutarat werden mittels Ionenausschluß-HPLC aufgetrennt und bei λ=215 nm durch einen UV-Detektor photometrisch bestimmt. Die Proben werden vorher nur geeignet verdünnt.

4.2.5 Elementaranalyse der wäßrigen Phasen

Die wäßrigen Phasen der Extraktion (Extrakt und Raffinat), das Fermentationspermeat aus dem Filtrationsmodul und die trockenen Kristalle aus der Präzipitation werden einer Elemantaranlyse unterzogen. Dabei werden GC-MS Scans durchgeführt, um alle Anionen und Kationen oberhalb der Nachweisgrenze zu messen. Als relevant erwiesen sich die Kationen der Elemente Na, Mg, Al, Si, K, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn und Mo. Diese werden dann im ICP-MS (Inductive Coupled Plasma – Mass Spectrometer) quantifiziert. Als einziges relevantes Anion wird SO_4^{2-} im Raffinat nachgewiesen und ebenfalls über ICP-MS quantifiziert. Die Analysen werden in einem externen Labor gemäß DIN EN 45 001 durchgeführt.

4.2.6 Proteine im Überstand

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Fermentationsüberstand erfolgte durch den Bradford-Test. Beim Bradford-Test binden die Aminogruppen der Proteine ionisch an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue. Die dadurch bewirkte Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs kann photometrisch bei λ= 570 nm gemessen werden. Sie korreliert mit dem Proteingehalt der Probe.

Für die Erstellung der Eichreihe wird Rinderserumalbumin, Fraktion V, in Konzentrationen zwischen 5-50 mg/l verwendet. Die photometrische Messung der Proben wird in einem Shimadzu UV-160 Zweistrahl-Spektralphotometer gegen Wasser durchgeführt.

Außerdem wird in einer SDS- PAGE (Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese) eine Größenabschätzung der Proteine durchgeführt. Dazu wird ein gebrauchsfertiges Bis-Tris- Gel (12 % Vernetzungsgrad, 1 mm Dicke) eingesetzt. Als Laufpuffer dient MES-SDS-Laufpuffer. Als Proteinstandard dient der ebenfalls gebrauchsfertige Mark12™. Die Durchführung erfolgt nach den Anweisungen der Packungsbeilage.

Die Spannung beträgt 150 mV. Die Auftrennung endet, wenn die Markerfront das untere Ende des Gels erreicht hat.

Die Proben werden ebenfalls entsprechend der Packungsbeilage vorbereitet.

Folgende Proben werden in 1:2, 1:5 oder 1:10- Verdünnung auf das Gel aufgetragen:

	Ferm.beginn	vor Induktion	nach Induktion	Ferm.ende
Basisfermentation	×	×	×	
Fermentation mit Filtration		×	×	×

Zunächst wird das gesamte Gel mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Da die Banden der Proben einer Fermentation sehr schwach sind, wird die entsprechende Hälfte des Gels mit einem empfindlicheren Silberfärbekit gefärbt.

4.2.7 Messung der zellinternen Metabolite

In den Versuchen in der Schüttelkolbenanlage wird von jedem Ansatz ein Zellaufschluß durchgeführt. Um das zur Messung der Metabolite zur Verfügung stehende Volumen zu vergrößern, wird der Zellaufschluß im Dreifachansatz durchgeführt. Die drei Ansätze werden nach dem letzten Zentrifugieren vereinigt und eingefroren.

Vor der Probenahme werden 0,4 ml- Eppendorfreaktionsgefäße mit 30 µl der Perchlorsäurelösung und 65 µl des Silikonöls gefüllt und abzentrifugiert.

Von jeder Probe werden jeweils 200 µl in ein so vorbereitetes Reaktionsgefäß pipettiert und für 45 Sekunden in einer Beckmann- Microfuge E abzentrifugiert. Alle extrazellulären Substanzen verbleiben aufgrund ihrer Dichte im Silikonöl, das die obere Phase bildet. Die Zellen gelangen durch das Silikonöl hindurch in die Perchlorsäurephase und lysieren dort.

Die Reaktionsgefäße werden mit einem Skalpell in der Ölphase durchgeschnitten, die Spitzen zum Überführen der Perchlorsäurephase kopfüber jeweils in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gesteckt und für 3 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert (Beckmann-Zentrifuge GS-15 R). Anschließend werden die Spitzen mit einer Pinzette entfernt, die Ansätze intensiv durchmischt und für 10 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Zum Neutralisieren der Perchlorsäurelösung wird dann 25 µl der Neutralisationslösung in jedes Reaktionsgefäß pipettiert, die Ansätze werden anschließend für 10 Minuten auf Eis gekühlt und dann bei 4°C und 14000 rpm 10 Minuten lang zentrifugiert. In der unteren Phase, die nun verworfen werden kann, sammeln sich dabei gefälltes Kaliumperchlorat, Zelltrümmer und Silikonöl. Die oberen Phasen, die die zellinternen Metabolite enthalten, werden nochmals zentrifugiert und dann in der HPLC gemessen.

Zur Qualitätsabschätzung des Zellaufschlusses wird der Versuch zusätzlich mit vorbereiteten L-Phenylalaninlösungen (5 und 10 g/l) sowie mit $H_2O_{bidest.}$ durchgeführt.

4.3 Auswahl der eingesetzten Stoffsysteme

Zur Auswahl der Stoffsysteme, welche in einer hohlfasergestützten Reaktivextraktion zum Einsatz kommen, werden zunächst satzweise Experimente durchgeführt. In diesen Experimenten verläuft der Stoffübergang bis zur Einstellung des Gleichgewichts.

4.3.1.1 Auswahl der Carrier

Nach Kertes und King[98] können die Extraktionsmittel zur Extraktion von organischen Säuren in drei Gruppen unterteilt werden:

- sauerstofftragende Kohlenwasserstoffe
- Phosphor-Sauerstoffverbindungen und Schwefel-Sauerstoffverbindungen
- hochmolekulare, aliphatische Amine.

Die Bindungen zwischen sauerstofftragenden Kohlenwasserstoffen wie Alkohole, Ketone, Acetate und Ether sind nicht besonders stark und unspezifisch. Die Extraktion von

Substanzen aus verdünnten Lösungen ist mit diesen Extraktionsmitteln nur unzureichend möglich. Für die Reaktivextraktion von Aminosäuren aus Fermentationslösungen sind sie nicht geeignet und werden daher nicht näher untersucht.

Organische Schwefel- und Phosphorverbindungen sind starke Lewisbasen und bilden stärkere Bindungen mit der Übergangskomponente als die Kohlenwasserstoffe. Die Aminosäure wird dabei als Kation gebunden. Die Extraktionsleistung steigt mit der Anzahl der direkten Kohlenstoff-Phosphor-Bindungen. Ein weiterer Vorteil ist die geringe Löslichkeit in Wasser. Das Extraktionsmittel koextrahiert kaum Wasser und geht fast nicht in die wäßrige Phase über, wie es bei Kohlenwasserstoffen der Fall ist.

Aliphatische Amine bilden mit dem zu extrahierenden Stoff durch den Übergang von dissoziierten Säuren stabile neutrale Ionenpaarbindungen aus. Wegen des mitextrahierten Säure-Protons wird die wäßrige Lösung neutralisiert. Bei den quarternären Ammoniumverbindungen wie Aliquat 336, wird nur das Säure-Anion in einem Ionenaustausch extrahiert. Wegen des höheren Verteilungskoeffizienten im Vergleich zu Kohlenwasserstoffen sind die Amine und Ammoniumverbindugnen sehr effektiv bei der Extraktion von Metaboliten. Die Amine sind ebenfalls in Wasser nahezu unlöslich.

Ein Vertreter der organischen Phosphorverbindungen ist der flüssige Kationentauscher Di-2-ethylhexylphsophorsäure (D_2EHPA), eine mittelviskose, stark saure Flüssigkeit. D_2EHPA eignet sich laut Literatur zur Extraktion von Aminosäuren bei einem pH-Wert von 2 bis 3[99]. Das Säure-Anion D_2EHP^- extrahiert das L-Phe Kation Phe^+ aus der wäßrigen in die organische Phase[100/101]. Einige wichtige Stoffdaten des D_2EHPA sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Di-2-ethylhexylphosphorsäure	D_2EHPA
Summenformel	$((C_2H_5)C_6H_{12}O)_2POOH$
Handelsname (Hersteller)	Baysolvex D_2EHPA (Bayer) Hostarex PA 216 (Hoechst)
molare Masse [g/mol]	322,43
Dichte [kg/l]	0,97
Flammpunkt [°C]	198
Löslichkeit in H_2O bei 20 °C [g/l]	< 1
Affinität	Kationen selektiv

Tabelle 5: Datenblatt D_2EHPA

Ein weiterer Kationentauscher ist Dinonylnaphtalinschwefelsäure (DNNSA), die sich zur Reaktivextraktion von Aminosäuren und von Diaminosäuren eignet[81]. Für pH 1-4 werden hohe Extraktionsleistungen (> 90 %) beschrieben. Der Kationenaustausch erfolgt analog zum D_2EHPA.

Das Produkt Nacure 1051 von King Industries, Norwalk (USA), besteht aus DNNSA und dem Lösungsmittel Ethylenglycolmonobutylether[102]. Als Synex wird die Säure ohne Lösungsmittel bezeichnet. Neben der sehr hohen Extraktionsleistung sollte jedoch auch der tiefe Flammpunkt hervorgehoben werden.

Dinonylnaphtalinschwefelsäure	DNNSA
Summenformel	$(C_9H_{19}O)_2(C_{10}H_8O)SOOH$
Handelsname (Hersteller)	Nacure 1051 (King Industries) Synex (King Industries)
molare Masse [g/mol]	495,8
Dichte [kg/l]	0,87
Flammpunkt [°C]	-1,1
Löslichkeit in H_2O bei 20 °C [g/l]	< 1
Affinität	Kationen selektiv

Tabelle 6: Datenblatt DNNSA

Weitaus häufiger als für Kationentauscher finden sich in der Literatur Hinweise auf die Reaktivextraktion von Aminosäuren mit Anionentauschern. Das am häufigsten eingesetzte Extraktionsmittel ist das quarternäre Ammoniumsalz Trioctylmethylammonium-chlorid[103/104/105/106/107/108]. Es eignet sich zur Extraktion von L-Phe, anderen Aminosäuren und Enzymen[109]. In Tabelle 7 sind die wesentlichen Daten dieses Extraktionsmittels zusammengestellt. Trioctylmethylammoniumchlorid wird unter verschiedenen Handelsnamen angeboten. Dabei können sich auch die genauen Zusammensetzungen des Moleküls unterscheiden. So sind bei Aliquat 336 und Adogen 464 einige der Octylseitenketten durch Nonyl- oder Decylketten ersetzt. Da der Umfang dieser Substitution sehr gering ist, spricht man dennoch von Trioctylmethylammoniumchlorid. Da die Aminosäure für die Extraktion als Anion vorliegen muß, wird ein hoher pH-Wert zwischen 10 und 12 benötigt. Um die Koextraktion von OH^--Ionen zu verhindern, sollte der pH jedoch nicht zu hoch gewählt werden.

Trioctylmethylammoniumchlorid	
Summenformel	$(C_8H_{17})_2CH_3NCl$
Handelsname (Hersteller)	TOMAC (Serva) Aliquat 336 (Henkel) Adogen 464 (Sherex)
molare Masse [g/mol]	404,17
Dichte [kg/l]	0,88
Flammpunkt [°C]	>110
Löslichkeit in H_2O bei 20 °C [g/l]	< 1
Affinität	Anionen selektiv

Tabelle 7: Datenblatt Trioctylmethylammoniumchlorid

Für den technischen Einsatz spricht der hohe Flammpunkt von über 110 °C. Jedoch finden sich in der Literatur Hinweise auf ein hohes toxisches Potential dieses Carriers[16], was bei einem integrierten Einsatz den Fermentationsprozeß beenden würde.

Primäre, sekundäre und tertiäre Amine werden neben der Metallextraktion auch zur Extraktion organischer Säuren und Antibiotika eingesetzt. Sie binden die Übergangskomponente durch Bildung von Ionenpaaren. In Tabelle 8 und Tabelle 9 sind die Stoffdaten zweier tertiärer Amine, die in dieser Arbeit zu Einsatz kommen, zusammengestellt.

Trilaurylamin	
Summenformel	$(C_{12}H_{25})_3N$
Handelsname (Hersteller)	Alamin 304 (Henkel)
molare Masse [g/mol]	522,00
Dichte [kg/l]	0,82
Flammpunkt [°C]	190
Löslichkeit in H_2O bei 20 °C [g/l]	< 1
Affinität	Ionenpaarbildung

Tabelle 8: Datenblatt Alamin 304

Tri-isooctylamin	
Summenformel	$(C_8H_{17})_3N$
Handelsname (Hersteller)	Alamin 308 (Henkel)
molare Masse [g/mol]	353,67
Dichte [kg/l]	0,80
Flammpunkt [°C]	190
Löslichkeit in H_2O bei 20 °C [g/l]	< 1
Affinität	Ionenpaarbildung

Tabelle 9: Datenblatt Alamin 308

4.3.1.2 Auswahl der Lösungsmittel

Bei der Reaktivextraktion eingesetzte Extraktionsmittel (Carrier) sind häufig hochviskose oder kristalline Substanzen. Daher muß der Carrier durch ein sekundäres Lösungsmittel verdünnt werden. Als Lösungsmittel wird üblicherweise eine chemisch inerte Substanz verwendet, die in erster Linie das Fließverhalten der organischen Phase verbessern soll[110]. Die betreffenden Eigenschaften sind die Viskosität der organischen Phase, die Emulsionsneigung und das Absetzverhalten.

Das gewählte Lösungsmittel kann jedoch auch direkten Einfluß auf das Extraktionsergebnis haben. Die nicht reaktive Extraktion von Aminosäuren ist nach Abbasian et al.[111] unmöglich. Das Verdünnungsmittel kann den Verteilungskoeffizienten erhöhen und so die Extraktionsleistung steigern. Je polarer das Verdünnungsmittel ist, desto höher ist der Verteilungskoeffizient der zu extrahierenden Aminosäure[112]. Bei alkoholischen Verdünnern besteht die Gefahr der Veresterung mit den übergehenden Säuren[113]. Folgende Ansprüche werden an ein Lösungsmittel für die Reaktivextraktion gestellt[114]:

- geringe Wasserlöslichkeit, geringe Aufnahme der wäßrigen Phase,
- gute Aufnahmekapazität für das Extraktionsmittel,
- geringe Verdunstungsverluste,
- keine Neigung zur Emulsionsbildung,
- Beständigkeit gegen Zersetzung,

- gute Bioverträglichkeit,
- günstiger Preis sowie hohe Verfügbarkeit.

Als Verdünnungsmittel zur Aufnahme der Reaktivkomponenten kommen in dieser Arbeit Kerosin, Butylstearat, Decan, Dodecan, Pentadecan, Decanol, Oktanol und Xylen zum Einsatz.

4.4 Satzweise Extraktionen in Rührzellen

Die oben genannten Stoffsysteme werden zunächst in satzweisen Experimenten zur L-Phe-Extraktion eingesetzt. Dabei soll die Extraktionsleistung und das am besten geeignete Verdünnungsmittel ermittelt werden. Dazu wird eine temperierte Rührzelle eingesetzt. Eine skizzierte Darstellung des Versuchsaufbaus zeigt Abb. 4-1. Die Rührzelle hat ein Volumen von 200 ml und wird über einen Doppelmantel auf 35 °C thermostatisiert. Zur intensiven Durchmischung der wäßrigen Phase (unten) mit der organischen Phase wird an der Phasengrenze eine Rührplatte eingesetzt. Die Drehzahl wird mit 200 min^{-1} so gewählt, daß beide Phasen intensiv durchmischt werden, sich jedoch noch keine Trombe ausbildet. Die Auflistung der verwendeten Geräte befindet sich im Anhang.

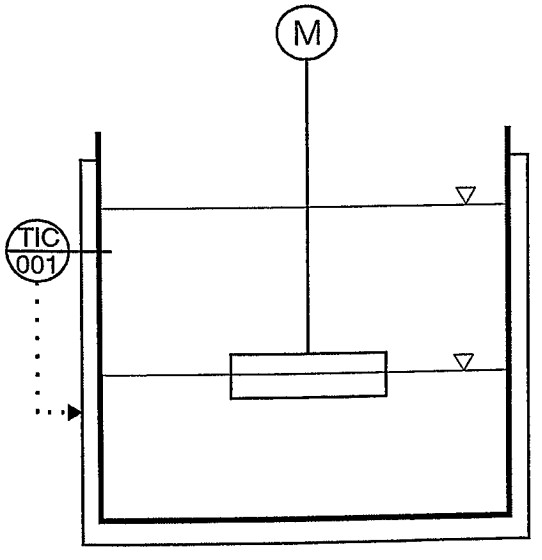


Abb. 4-1: Schema der Rührzelle

Die organische Phase besteht aus einem Carrier und einem Lösungsmittel. Der Carrieranteil beträgt, falls nicht anders erwähnt, 10 %vol. Die wäßrige Phase besteht aus destilliertem Wasser, in dem die jeweilige Menge L-Phenylalanin (i.d.R. 10 g/l) gelöst wird. Zur pH Einstellung wird H_2SO_4 bzw. NaOH benutzt. Die folgenden Experimente werden –falls nicht explizit erwähnt- unter den genannten Bedingungen in der Rührzelle durchgeführt. Die Volumina beider Phasen betragen 75 ml, so daß sich ein Phasenverhältnis von eins ergibt.

Zur Untersuchung der Extraktionsdauer auf den Extraktionsgrad wird nach 1, 3, 5, 10, 15 und 30 Minuten eine Probe aus dem intensiv durchmischten Rührgefäß gezogen und über der Zeit aufgetragen. Im weiteren Verlauf werden nach jeweils drei Minuten Proben gezogen.

Es werden nacheinander die verschiedenen Extraktionsmittel mit verschiedenen Lösungsmitteln zur Extraktion von L-Phe eingesetzt. Anhand der extrahierten L-Phe-Menge werden die einzelnen Systeme miteinander verglichen. Die Messung der extrahierten L-Phe-Menge erfolgt über HPLC im Raffinat.

4.4.1 Variation der eingesetzten Gegenionen

Die Rückextraktion des Phenylalanins aus der organischen Phase wird mit verschiedenen Gegenionen im Extrakt untersucht. Es werden 1 und 2 molare Lösungen von $(NH_4)_2SO_4$, NaOH, KOH, H_2SO_4 und KCl als Extraktphase vorgelegt. Die organische Phase besteht aus 10% D_2EHPA in Kerosin und ist durch eine Extraktion mit Phenylalanin vorbeladen. Zum Vergleich der Systeme wird der Extraktionsgrad bezogen, auf die vorgelegte Menge an Aminosäure im Raffinat, herangezogen.

4.4.2 Einfluß des D_2EHPA Gehalts

Der Einfluß des Carrieranteils wird mit dem Stoffsystem D_2EHPA in Kerosin untersucht. Es kommen organische Phasen mit einem Gehalt an D_2EHPA von 2, 5, 10 und 15 %vol zum Einsatz. Des weiteren wird der pH im Raffinat von 2-12 variiert.

4.4.3 Einfluß der L-Phenylalaninkonzentration

Im Raffinat werden L-Phe Konzentrationen von 0,1 g/l, 0,5 g/l, 1 g/l, 2 g/l, 5 g/l, 10 g/l und 20 g/l vorgelegt und die verschiedenen Extraktionsgrade miteinander vergleichen.

4.4.4 Reversibilität der Extraktion

Die mehrfache Verwendung der organischen Phase soll zeigen, ob sich die Extraktionsleistung ändert. So sind Rückschlüsse auf die Reversibilität der Extraktion möglich. Die Rückextraktion des L-Phe erfolgt mit 1 M H_2SO_4. Nach der Regeneration der organischen Phase wird diese erneut zur Extraktion eingesetzt. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt.

4.5 Kinetische Messungen in der Rührzelle nach Nitsch

Die Stoffaustauschlimitierung zwischen den wäßrigen Phasen und der organischen Phase wird in einer speziellen Rührzelle untersucht. Aufgrund ihrer Geometrie wird diese Rührzelle von der Arbeitsgruppe Nitsch an der TU München für die Messung von Stoffübergängen in zweiphasigen Systemen empfohlen[115/116]. Über Messungen von Wärmeübertragung und physikalischem Stoffaustausch ist die Geometrie dieser Zelle kalibriert worden. Daher kann für transportlimitierende Prozesse einen linearen Zusammenhang zwischen Stoffstrom und Drehzahl[117/118] in diesem System experimentell überprüft werden. Chemische Limitierungen dagegen können an der Unabhängigkeit des Stoffübergangs von der Strömung erkannt werden. In Abb. 4-2 ist die Drehzahlabhängigkeit des Stoffstroms bei reaktions- und transportlimiertem Stoffübergang in der verwendeten Rührzelle gezeigt.

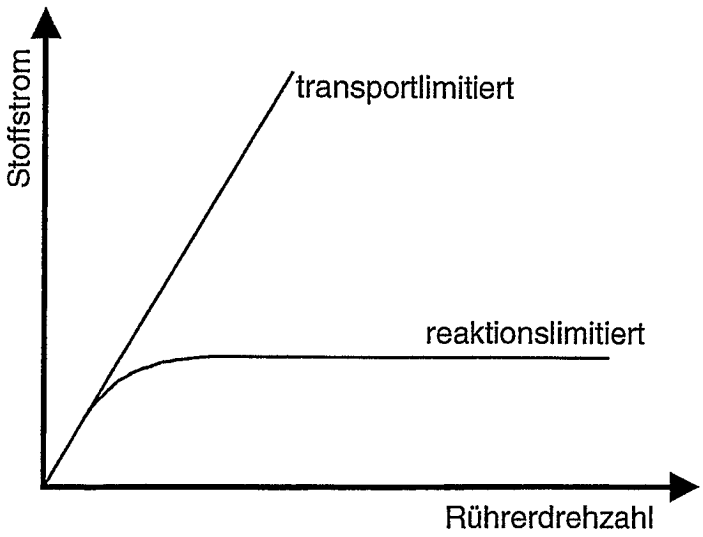


Abb. 4-2: Drehzahlabhängigkeit des Stoffstroms (nach [115])

Bei der verwendeten Rührzelle handelt es sich um einen Schlaufenreaktor. Im Gegensatz zu der in Kapitel 4.4 beschriebenen Rührzelle hat dieser zwei Rührer, die an konzentrisch eingebauten Wellen aufgehängt sind. In einem lotrecht stehenden Glaszylinder werden die wäßrige (Extrakt oder Raffinat) und organische Phase einander überschichtet, so daß jede Phase von einem Rührer durchmischt wird.

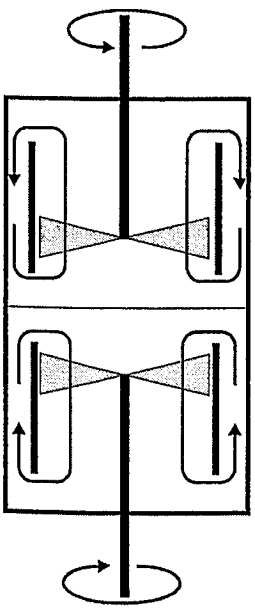


Abb. 4-3: Strömungsführung in der Rührzelle nach Nitsch ([115])

In Abb. 4-3 ist die Strömungsführung in der Rührzelle nach Nitsch schematisch dargestellt. Durch die beiden Propellerrührer wird eine Strömung durch das innere Leitrohr von der Phasengrenze weg erzwungen. Am Deckel und Boden wird die Strömung jeweils umgelenkt, um durch den Ringspalt wieder zur Phasengrenze zu strömen. Die eingebauten Strömungsbleche heben die Radialkomponente der Strömung auf und stellen so die Schlaufenströmung sicher.

Das Volumen jeder Phase beträgt 390 cm^3 ($V = 3{,}9 \cdot 10^{-4}$ m^3). Die Austauschfläche zwischen den Phasen ist 44,2 cm^2 ($A_{PG} = 4{,}42 \cdot 10^{-3}$ m^2) groß.

Um eine vollständige Durchmischung der beiden Phasen zu erreichen, beträgt die minimale Drehzahl der Rührer 50 min^{-1}. Die maximale Drehzahl hängt stark von der Grenzflächenspannung des Systems ab. Im Gegensatz zu den Experimenten in Kapitel 4.4

soll laminare Strömung herschen und es dürfen sich nicht einmal Tröpfchen ablösen. Die Phasengrenze muss also zu jedem Zeitpunkt des Versuchs stabil sein.

Es werden für die Extraktion und die Rückextraktion jeweils drei Experimente bei verschiedenen Drehzahlen durchgeführt. Die Parameter der Experimente sind in Tabelle 10 zusammengefaßt. Die Rührzelle ist in allen Experimenten auf 25 °C thermostatisiert und der Start pH der wäßrigen Phasen liegt bei 5,8. Das Phasenverhältnis ist immer gleich eins.

	Extraktion			Rückextraktion		
Parameter	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
D_2EHPA [%vol]	10	10	10	10	10	10
L-Phe [mmol/l]	60	60	60	60	60	60
V [ml]	390	390	390	390	390	390
n_{wss} [min^{-1}]	100	150	200	90	135	180
n_{org} [min^{-1}]	100	150	200	90	135	180

Tabelle 10: Versuchsparameter der Experimente in der Rührzelle nach Nitsch

Nach Befüllen der Rührzelle mit 390 ml der jeweiligen Phase, wird die entsprechende Drehzahl eingestellt und der zeitliche Verlauf der L-Phe-Konzentration in der wäßrigen Phase gemessen. Für die Rückextraktion wird eine vorbeladene organische Phase eingesetzt und ebenso verfahren. Der Stofftransportkoeffizient β läßt sich für jedes Experiment in der Rührzelle analog Gl. 2-34 mit Gl. 4-1 berechnen[119].

Gl. 4-1
$$\beta = \frac{V_{aq}}{A_{PG}} \Big/ t \cdot \left(\ln c[F]^{0}_{aq} - \ln c\,[F]^{i}_{aq} \right)$$

Dabei ist V_{aq} das Volumen der wäßrigen Phase und A_{PG} die Phsengrenzfläche welche sich zwischen den beiden Phasen in der Zelle ausvildet. Aus der Konzentrationsänderung des L-Phe über der Zeit läßt sich β bestimmen.

4.6 Reaktivextraktionen im Hohlfasermodul

Nachdem die Auswahl der Stoffsysteme abgeschlossen ist, sollen diese im technischen Betrieb zur membrangestützten Extraktion in Hohlfasermodulen eingesetzt werden. Dazu wird zunächst eine Laboranlage und später eine Pilotanlage aufgebaut.

4.6.1 Die verwendeten Module

Bei den verwendeten Modulen handelt es sich um Liqui-Cel® Extra-Flow Hohlfaserkontaktoren der Celanese AG. Das hydrophobe Membranmaterial Polypropylen ermöglicht bis zu einem Druck von etwa 4 bar einen Phasenkontakt zwischen wäßriger und organischer Phase, ohne daß Wasser durch die Membran tritt. Bei Überdruck auf wäßriger Seite ist so ein dispersionsfreier Betrieb möglich. Die Investitionskosten dieser Membranen liegen im industriellen Bereich bei ca. 60 US$/$m^2$ effektiver Kontaktfläche[120].

Für die Experimente im Labormaßstab werden ältere Module mit der Typenbezeichnung 5PCM-106 X10 240 ID verwendet. Mit diesen Modulen soll die Reaktivextraktion grundsätzlich untersucht werden, um dann einen möglichst schnellen scale-up in den

Technikumsmaßstab durchzuführen. Für die Experimente im Technikumsmaßstab werden Module der Modelreihe 4X28 X30 240 ID verwendet.

Modul- und Membranparameter 5PCM-106 X10 240ID:

Modul

Länge	20 cm
Durchmesser	2,5 cm
Betriebstemperatur	1°C...60°C
effektive Fläche	0,23 m^2
spezifische Fläche	ca. 4000 m^2/m^3
max. Transmembrandruck	4,14 bar
max. Betriebsdruck	5 bar
Anzahl der Hohlfasern, N_f	2100
Faserlänge, L	16 cm

Membran

Porosität	30%
Porengröße	0,05 µm
Faser-Innendurchmesser	240 µm
Faser-Außendurchmesser	300 µm
Membranstärke	30 µm

Hohlfasermaterial	Polypropylen
Vergußmaterial (Potting)	Epoxidharz

Neben der wesentlich höheren Membranfläche liegt bei den 4X28 Modulen die Porosität der Membran um 10 % höher als bei den kleineren und älteren 5PCM 106X10 Modulen. Die tatsächliche Phasenkontaktfläche beträgt damit 7,4 m^2.

Modulparameter 4X28 X30 240 ID:

Modul

Länge	100 cm
Durchmesser	10 cm
Betriebstemperatur	1°C...60°C
effektive Fläche	18,6 m^2
spezifische Fläche	3641 m^2/m^3
max. Transmembrandruck	4,14 bar
max. Betriebsdruck	5 bar
Anzahl der Hohlfasern, N_f	31800
Faserlänge, L	71 cm

Membran

Porosität	40%
Porengröße	0,03 µm
Faser-Innendurchmesser	244 µm
Faser-Außendurchmesser	300 µm
Membranstärke	28 µm

Hohlfasermaterial	Polypropylen
Vergußmaterial (Potting)	Polyethylen

4.6.2 Reinigung von Hohlfasermodulen

Die vom Hersteller vorgeschriebene Reinigungsprozedur[121] sollte nur als Startpunkt angesehen werden, um ein Reinigungsprotokoll zu erstellen, welches den eigenen Anforderungen am besten genügt. Zur Entfernung von Verunreinigungen bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion gibt der Hersteller folgende Vorschrift an:

- Lösungsmittelspülung (Rezirkulation 15-30 min) mit einer 1/1 Mischung aus Wasser und Isopropylalkohol
- Wasserspülung (einmaliger Durchfluß 10-15 min)
- Trocknen des Kontaktors (mit Luft oder Stickstoff)

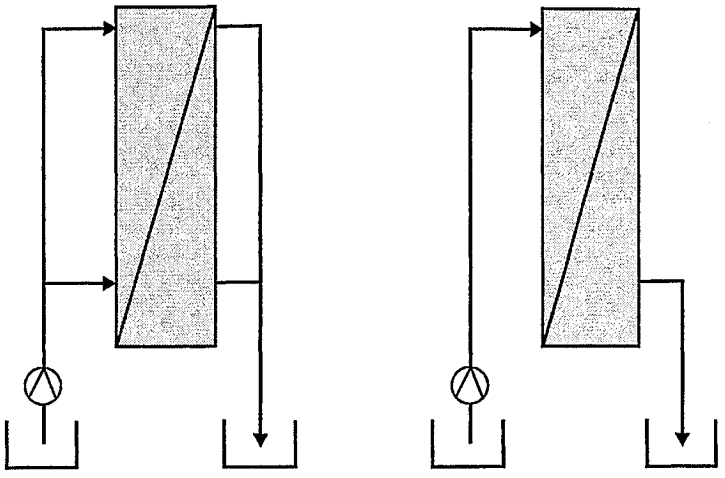


Abb. 4-4: Verrohrungsschema zur Hohlfaserreinigung

Das vom Hersteller vorgeschlagene Verrohrungsschema ist in Abb. 4-4 dargestellt. Um sicher zu stellen, daß die Lösungsmittelreste vollständig aus den Poren entfernt werden, sollte Wasser in beide hohlfaserseitigen Anschlüsse eingeleitet und aus den gehäuseseitigen Anschlüssen abgeführt werden.

Für diese vorgeschlagene Verrohrung ergeben sich jedoch Totwassergebiete in dem Modul. Daher wird eine kreuzweise Strömungsführung gewählt, bei der der Zulauf mantelraumseitig und der Ablauf hohlfaserseitig geführt wird. Die anderen Anschlüsse werden verschlossen.

Durch die Verwendung von reinem Isopropylalkohol kann ebenfalls eine Verbesserung der Reinigungsleistung erzielt werden. Je nach Verschmutzungsgrad der Hohlfasern verlängern sich die Reinigungszeiten.

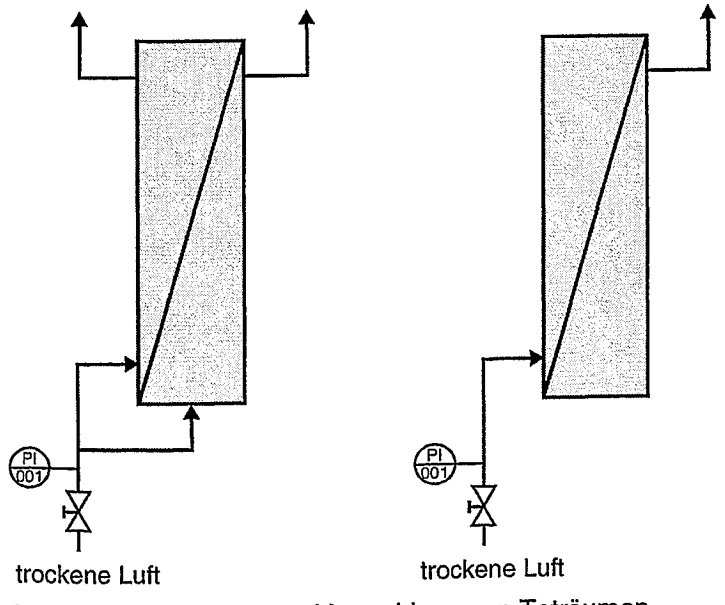


Abb. 4-5: Verrohrung zur Vermeidung von Toträumen

Zur Wiederherstellung des hydrophoben Charakters der Membran muß die Reinigungslösung vollständig aus den Hohlfaserporen entfernt werden. Ansonsten würde das Wasser bereits bei sehr niedrigen transmembranen Drücken durch die Poren dringen. Es ist daher notwendig, den Hohlfasermodul nach dem Verrohrungsschema in Abb. 4-5 gründlich zu trocknen, bevor er wieder verwendet wird. So gereinigte und getrocknete Module werden einem Integritätstest unterzogen. Dazu wird der Mantelraum unter steigenden Druck mit Wasser beaufschlagt. Der Durchbruchdruck, bei dem Wasser aus den

Hohlfasern auf der Stirnseite austritt, sollte nicht unter dem angegebenen maximalen Transmembrandruck liegen.

4.6.3 Aufbau der Extraktionsanlagen

Bei der technischen Durchführung der Reaktivextraktion in Hohlfasermodulen werden zwei Module hintereinander geschaltet. So ist es möglich, die organische Phase kontinuierlich zu regenerieren.

Zur Durchführung von Vorversuchen im Labormaßstab wird mit den Modulen des Typs 5PCM 106 zunächst eine Extraktionsanlage im Labormaßstab aufgebaut. In dieser Anlage werden die prinzipiellen Möglichkeiten der Reaktivextraktion von L-Phenylalanin in Hohlfasermodulen untersucht. Aufgrund der Zielsetzung, ein technisch einsetzbares Verfahren zu entwickeln, wird aufbauend auf die im Labormaßstab gewonnenen Erkenntnisse sehr frühzeitig ein scale-up in den technischen Maßstab durchgeführt. So können die Probleme der Maßstabsvergrößerung (Membraninstabilitäten durch zu hohe hydrostatische Drücke, Eintrag von Carrier, etc.) bereits frühzeitig erkannt und bearbeitet werden.

4.6.3.1 Aufbau der Laboranlage

Abb. 4-6 zeigt ein Fließbild der Laborextraktionsanlage. Die beiden Module werden im Gegenstrombetrieb von den beiden wäßrigen Phasen und der organischen Phase durchspült. Dabei wird die organische Phase durch den Mantelraum beider Module geführt, da hier die besseren Extraktionsleistungen erwartet werden können[122]. Das Raffinat bzw. der Extrakt durchströmen das Hohlfaserinnere jeweils eines Moduls. Die gezeigten Mischgefäße sind aus Glas und nicht temperierbar. Bei den Pumpen 1 – 3 handelt es sich um Zahnradpumpen (Verder Liquiflo Serie V051.12) mit einem Förderbereich von 50 ml/h bis 2000 ml/h.

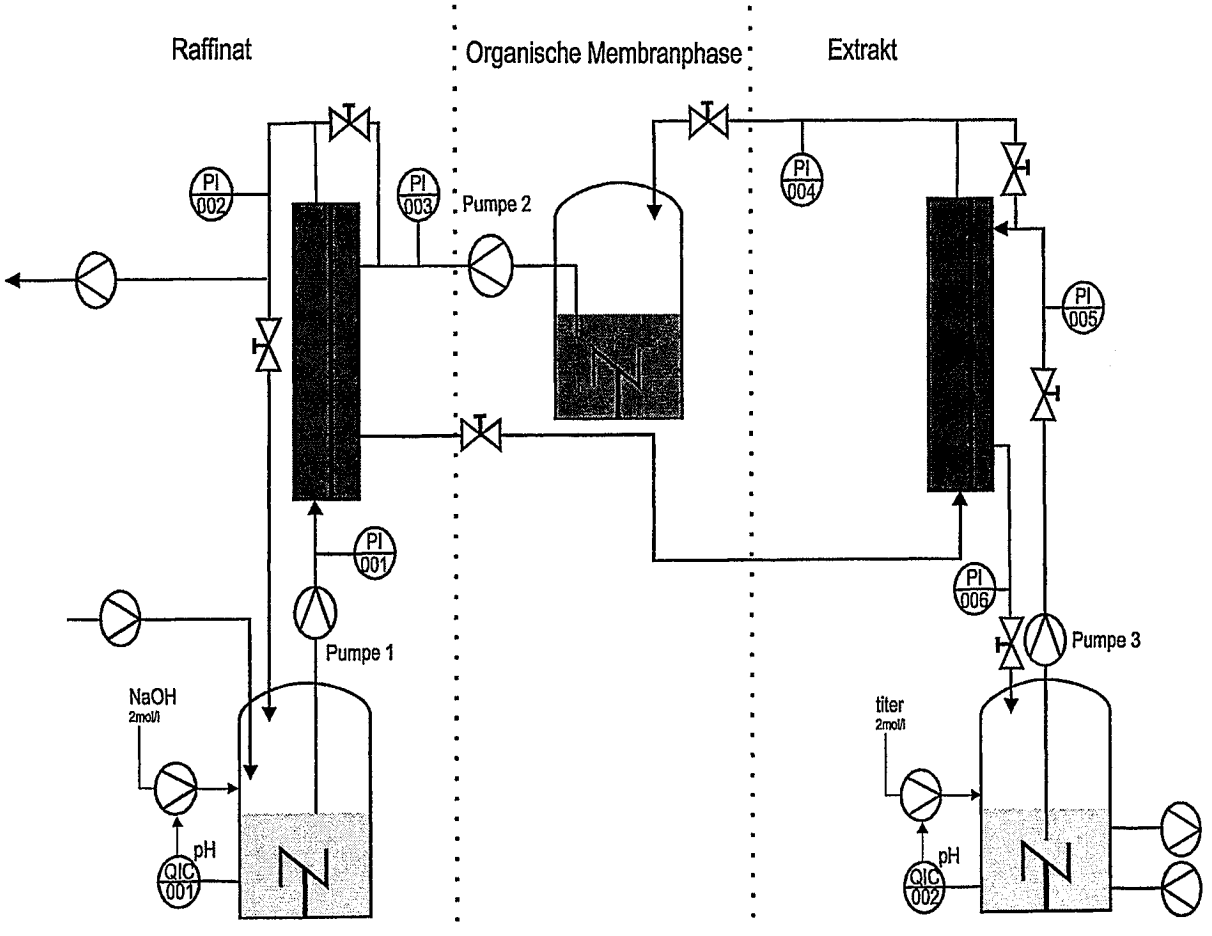


Abb. 4-6: Fließbild der Laborextraktionsanlage

Die Experimente in der Laboranlage haben das Ziel, die Möglichkeit der Reaktivextraktion von L-Phe in Hohlfasern zu untersuchen. Dabei werden vor allem Erfahrungen während des Betriebs gesammelt und die Möglichkeit der Aufkonzentrierung untersucht. Aufgrund der instabilen Phasengrenzen in ionischen Systemen wird allerdings ein sehr schneller scale-up angestrebt, um den Betrieb im Pilotmaßstab zu zeigen.

4.6.3.2 Aufbau der Technikumsanlage

Die Basis der Technikumsanlage sind die Hohlfaserkontaktoren vom Typ 4X28. Abb. 4-7 zeigt ein Foto des experimentellen Aufbaus. Die vertikal aufgehängten weißen Tuben I und II sind die beiden verwendeten Hohlfasermodule.

Neben den Modulen sind die gläsernen Ausgleichgefäße zu erkennen. Abb. 4-8 gibt einen Gesamtüberblick der Anlage. Aufgrund der größeren Volumenströme und dem damit einhergehenden komplexeren Handling der Phasen wird die Anlage so aufgebaut, daß ein Befüllen, Entleeren und Reinigen der Anlage halbautomatisch durchgeführt werden kann.

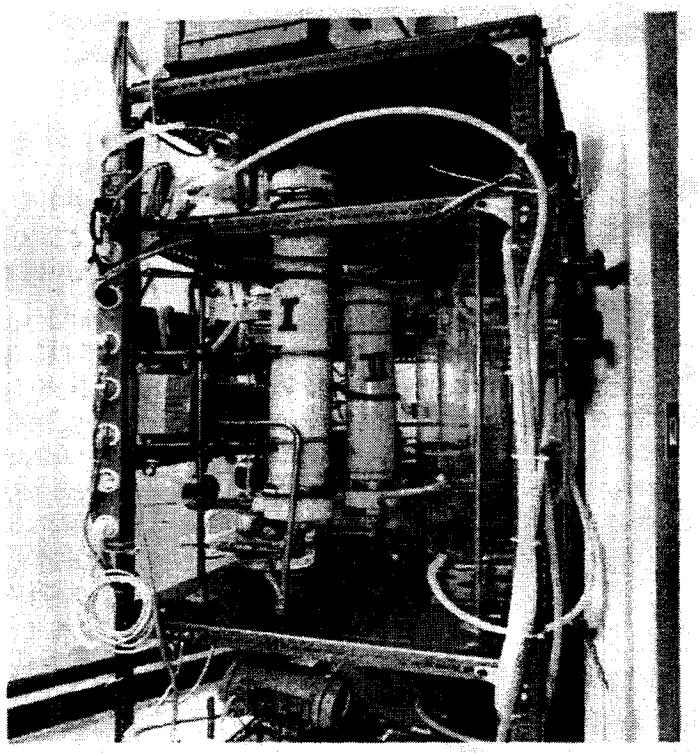


Abb. 4-7: Technikumsanlage zur hohlfasergestützten Pertraktion

Der Aufbau läßt die drei getrennten Stoffkreisläufe Donor, Akzeptor- und organische Phase erkennen. In den Hohlfasern des Modul I fließt die L-Phe haltige Donorphase und in den Hohlfasern des Modul II die ebenfalls wäßrige Akzeptorphase. Aufgrund der chemischen Beständigkeit der Module sollte bei Verwendung von Schwefelsäure eine Konzentration von 2 mol/l nicht überschritten werden[123/124]. Die organische Phase strömt in einem geschlossenen Kreislauf in den Mantelräumen beider Module. Über diese Zirkulation der organischen Phase werden Extraktion und Reextraktion direkt miteinander gekoppelt, so daß eine kontinuierliche Regenaration der beladenen Carrier erreicht wird. Nach dem Befüllen der Anlage wird die Luft in den Poren durch die nach oben strömenden Phasen verdrängt. Wenn die Phasen am oberen Ende der Module blasenfrei austreten, läßt sich über die Vier-Wege-Kreuzschalthähne in allen drei Phasen die Strömungsführung frei wählen. So kann die Fahrweise bei laufenden Pumpen von Gleich- auf Gegenstrom geändert werden.

Im Kreislauf der organischen Phase befindet sich ein Abscheider. Das beim Anfahren durch Feinsttropfeneintrag in die organische Phase geschleppte Wasser kann hier gesammelt und während des Betriebs in die Akzeptorphase zurückgeführt oder verworfen werden. Die genaue Bezeichnung der Pumpen und Armaturen findet sich im Anhang.

Die Module sind über Schnellkupplungen in die Kreisläufe integriert. Das ermöglicht zum einen die frei Wahl der Strömungsführung durch Mantel- oder Hohlfaserraum. Zum anderen lassen sich die Module schnell aus der Anlage ausbauen, um sie zu reinigen, zu trocknen oder einem Integritätstest zu unterziehen.

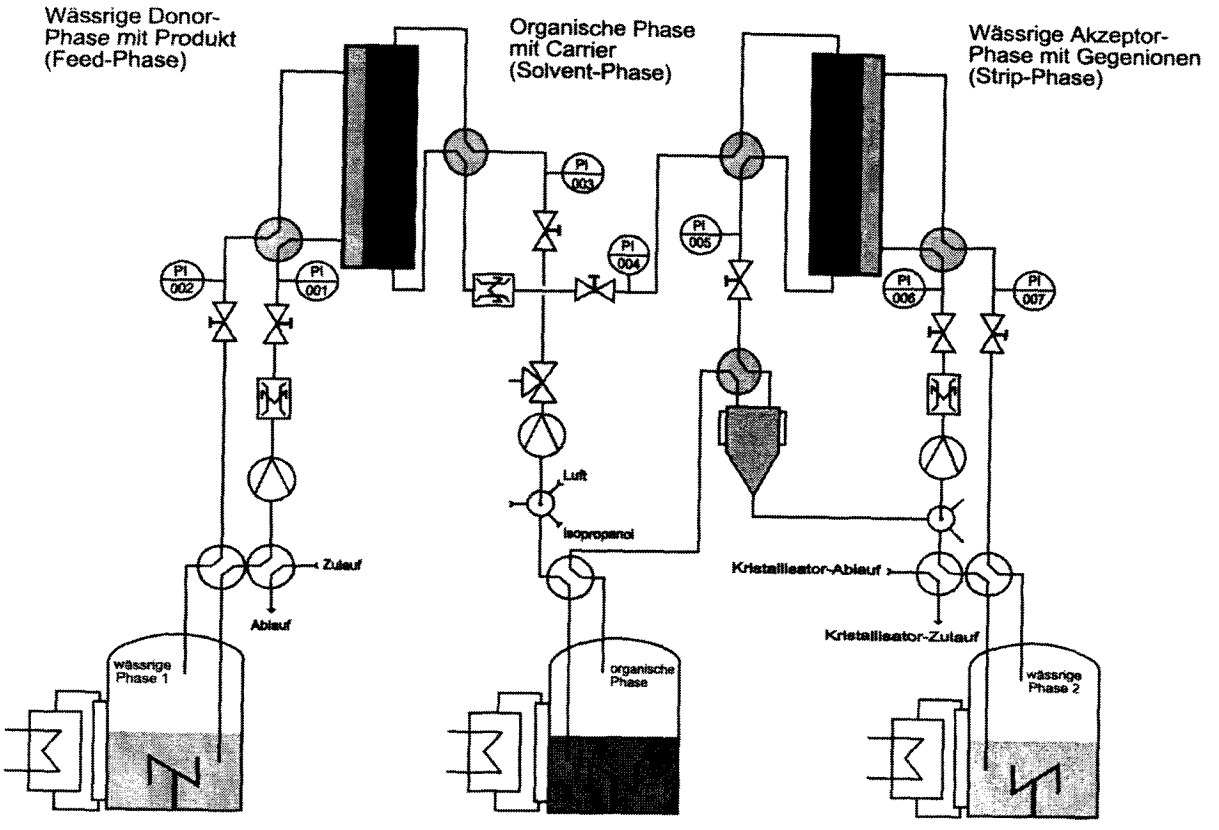


Abb. 4-8: Fließbild der Technikumsanlage

Die bereits erwähnten Kreuzschalthähne (4-Wege, Swagelok-Whitey, Serie 40) ermöglichen neben einem erleichterten Befüllen und Entleeren der Anlage und der Umschaltbarkeit von Gleich- auf Gegenstrom auch die Durchführbarkeit von Kreislauf- und Durchlaufexperimenten. Als Ausgleichsgefäße dienen thermostatisierbare Glaszylinder (Höhe: 68 cm, Durchmesser: 10 cm) mit einem maximalen Füllvolumen von 5 l. An den Wänden der Ausgleichsgefäße sind Strombrecher angebracht, die als statische Mischer arbeiten.

Über Federmanometer mit Reguliernadelventil (Swagelok) kann an allen Modulaus- und -eingängen der Druck gemessen und daraus die transmembrane Druckdifferenz zwischen den Phasen berechnet werden. Die Volumenströme der wäßrigen Phasen werden mit induktiven Rotametern (Altometer Sliedrecht Holland K 380/6) gemessen. Die regelbaren Zahnradpumpen (Verder Liquiflo Serie 37 RX) sind pulsationsfrei und bedingt säurebeständig. Der maximale Förderbereich liegt bei 2100 l/h. Aufgrund der Zusammensetzung der organischen Phase wird hier eine Schlauchpumpe (Watson Marlow 506) mit entsprechend beständigen Doppelschlauchelementen[125] (Marprene) eingesetzt. Im Havariefall kann dieses Doppelschlauchelement innerhalb weniger Minuten ersetzt werden.

Aufgrund der korrosiven Eigenschaften der verwendeten Lösungen werden alle Armaturen und Fittings aus Edelstahl (Swagelok) ausgeführt. Die Verrohrung der Anlage besteht aus Teflonschläuchen (Swagelok) mit einem Innendurchmesser von 12 mm.

4.6.4 Kreislaufexperimente

In den Kreislaufexperimenten werden die drei Phasen Raffinat, organische, und Extraktphase vorgelegt und im Kreis durch die Module gepumpt (s. Abb. 4-9). Dabei wird die zeitliche Änderung der L-Phe-Konzentration im Raffinat und Extrakt gemessen. Es wird das Extraktionsmittel Aliquat336 und D_2EHPA mit verschiedenen Gegenionen eingesetzt.

Über die entsprechenden Zulaufleitungen werden die Ausgleichsgefäße der drei Phasen befüllt. Falls es erforderlich sein sollte (z.B. in Aufkonzentrierungsexperimenten) ein großes Volumen an Donor bereit zu stellen, kann ein externes Vorlagegefäß (bis 100l)

angeschlossen werden. Über zwei Schlauchpumpen (Watson Marlow) mit Niveauregulierung kann dann eine Austauschrate (0 l/h...100 l/h) mit dem Ausgleichsgefäß eingestellt werden. Über die Pumpenanordnung kann ebenfalls die Ultrafiltrationseinheit des 300l-Kessels direkt an die Reaktivextraktionsanlage angeschlossen werden.

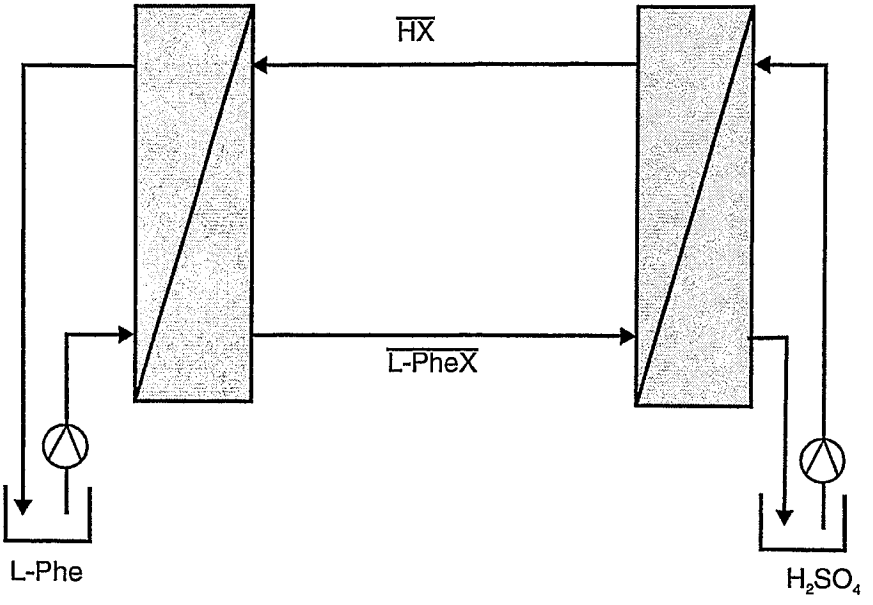


Abb. 4-9: Schema der Kreislaufexperimente (HX = unbeladener Carrier, L-PheX = beladener Carrier

Nach Befüllen der Gefäße werden nacheinander die Pumpen für die wäßrigen Phase und die der organischen Phase gestartet. Die Ventilschaltung wird so gewählt das die Anlage im Gleichstrom Betrieb arbeitet. Es ist darauf zu achten, daß die Drücke in den wäßrigen Phasen immer über denen in der organischen Phase liegen. Nach Verdrängen der Luft aus den Poren, kann im Bedarfsfall die Strömungsrichtung geändert werden. Läuft die Anlage stabil, d.h. ohne Feinsttropfenübergang von einer in die andere Phase, kann der Volumenstrom in den Phasen auf den entsprechenden Wert erhöht werden. Die Probennahme erfolgt über Nadelventile.

4.6.5 Durchlaufexperimente

Mit den Durchlaufexperimenten wird die Konzentrationsänderung beim einmaligen Durchlauf durch den Modul gemessen. Dazu werden am Ein- und Auslauf Proben gezogen und mittels HPLC analysiert.

Abb. 4-10 zeigt schematisch den Aufbau des Experiments. Beide wäßrigen Phasen durchfließen jeweils ein Modul im Gegenstrom zur organischen Phase.

Zum Anfahren der Anlage wird ebenso vorgegangen, wie es für Kreislaufexperimente beschrieben wurde. Nach Erreichen eines stabilen Betriebspunktes werden die Donor- und Akzeptorphase über 4-Wege Ventile an die jeweiligen 300 l Vorratsbehälter angeschlossen, die ebenfalls thermostatisierbar sind.

Zur Quantifizierung der Carrierverluste werden stündlich Proben der organischen Phase gezogen. In diesen wird mittels Atomemissionsspektroskopie (AES) der Phosphorgehalt bestimmt und daraus der D_2EHPA-Gehalt errechnet.

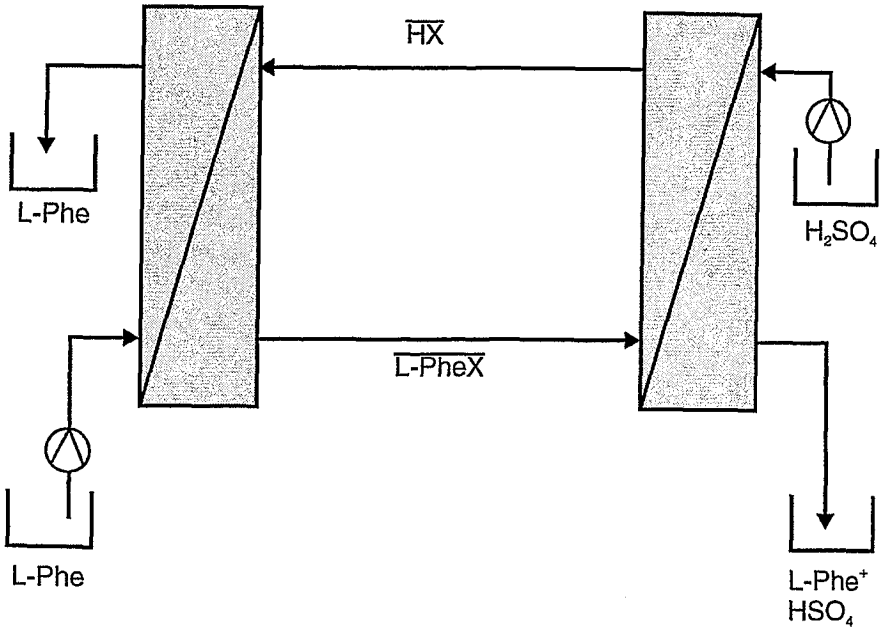


Abb. 4-10: Schema der Durchlaufexperimente

4.7 Aufkonzentrierung

Um die Möglichkeiten der Aufkonzentrierung zu überprüfen, werden Ansätze mit sehr viel größerem Volumen im Raffinat als im Extrakt gefahren. Dabei kommt wäßrige L-Phe Lösung und Fermentationspermeat aus *E. coli* Fermentationen zum Einsatz. Aus den Extraktionen mit realer Fermentationslösung kann dann die Selektivität der Extraktion ermittelt werden.

4.8 Weitere Produktreinigung

Nach Beendigung der Extraktion wird das im Extrakt konzentrierte Phenylalanin durch pH-Änderung ausgefällt. Dabei kommt Extrakt zum Einsatz, das bei der Extraktion von Fermentationspermeat gewonnen wird. Durch die pH-Absenkung werden äquivalent zum gewonnenen L-Phe molare Mengen Salz produziert.

4.8.1 Präzipitation im thermostatisierten Becherglas

Zunächst wird eine Präzipitation im Becherglas durchgeführt. Dabei werden 300 ml Probe aus dem Extrakt der Pilotanlage bei 10 °C in einem thermostatisierten Becherglas gerührt. Dann wird die Probe unter Rühren langsam auf pH 3,5 titriert. Über eine Probennahme im Abstand von fünf Minuten kann der L-Phe Gehalt chromatographisch gemessen werden. Der ausgefallenen Kristallbrei wird getrocknet und analysiert.

4.8.2 Kontinuierliche Fällung im Sedimenter

Nach der erfolgreichen Präzipitation im Becherglas wird ein 1,5 l Sedimenter zur kontinuierlichen Präzipitation umgerüstet.

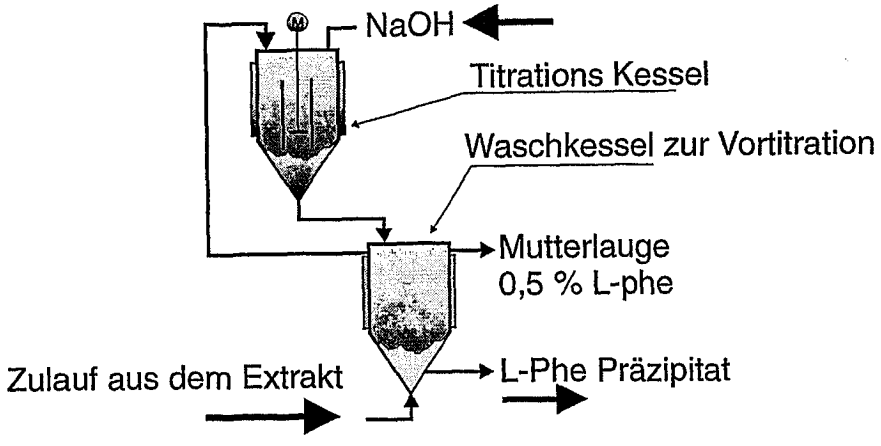


Abb. 4-11: Schema der kontinuierlichen Präzipitation

Der prinzipielle Aufbau ist in Abb. 4-11 dargestellt. Der Zulauf aus dem Extrakt wird zunächst von unten durch einen Gegenstromwäscher geleitet. Hier werden Verunreinigungen aus dem Präzipitat gespült und der Zulaufstrom mit Kristallbrei aus dem Titrationskessel vortitriert, um Titrationsmittel zu sparen. Von dort wird die Lösung in den Titrationskessel geführt. Dabei handelt es sich um einen Mammutschlaufenreaktor mit Zwangsumströmung. Hier wird der pH-Wert auf 3,5 geregelt. Das ausgefallenen Präzipitat wird im Waschkessel nachbehandelt und anschließend filtriert und lyophilisiert.

4.9 Das biologische System

Für die vorliegenden Arbeiten wird ein im Institut für Biotechnologie 1 entwickelter L-Phe Produktionsstamm verwendet. In diesem *Escherichia coli*-Stamm ist sowohl das Gen für die durch Tyrosin regulierte DAHP-Synthase (*aroF*), als auch die regulierte, phenylalaninspezifische Chorismatmutase- Prephenatdehydratase (*pheA*) deletiert. Zusätzlich wurde die Chorismatmutase- Prephenatdehydrogenase (tyrA) deletiert, um so einen für Tyrosin auxotrophen Stamm zu erhalten. Um einen deregulierten Biosyntheseweg für Phenylalanin zu erhalten, wurde ein geeignetes Plasmid in *E. coli* transformiert. Das Plasmid basiert auf dem Vektor pJF119EH, welcher einen glucoseresistenten, IPTG-induzierbaren *tac*-Promotor enthält. Dieser wurde durch molekularbiologische Methoden aus dem Promotor des *lac*-Operons hergestellt. Als Selektionsmarker befindet sich auf dem Vektor das Gen für die β-Lactamase, welches eine Ampicillin-Resistenz ausprägt.

In das Plasmid sind zwei Gene kloniert. Durch die genetischen Veränderungen soll der Stamm folgende Eigenschaften erhalten:

- einfache Kultivierbarkeit und Erhöhung der Plasmidstabilität durch Antibiotikaresistenz,
- Kontrollierbarkeit des Wachstums und Erhöhung der phenylalaninspezifischen Substratausbeute durch Tyrosinauxotrophie sowie
- teilweise Aufhebung zellinterner Regulationsmechanismen mit dem Ziel der Überproduktion der Zielsubstanz.

4.9.1 Stammhaltung und Schüttelkolbenkultivierung

Für die Erstellung der Kryokulturen werden 100 ml LB-Medium angesetzt, die mit 0,5 Vol.-% angeimpft werden. Die Kultivierung erfolgte auf einem Schüttel-Inkubator bei 37°C mit 200 rpm und wird bei einer optischen Dichte von ca. 3,5 beendet. Die Kultur wird in 100 ml steriles Glycerin gegeben, gut vermischt, und in Portionen zu ca. 1,8 ml in Nalgene Kryoröhrchen pipettiert. Diese werden bei –80°C eingefroren.

Die Anzucht der Vorkulturen erfolgte mit Vorkulturmedium (s. Anhang) in Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Sie werden ebenfalls mit 0,5 Vol.-% angeimpft, und über Nacht mit 170 rpm bei 37°C geschüttelt. Die Anzucht bis zu einer optischen Dichte von ca. 3,0 dauerte 15 h.

Die Einhaltung der maximalen optischen Dichte der Kryo- und der Vorkulturen war wichtig, weil die Zellen sonst aufgrund der Nährstofflimitation die stationäre Wachstumsphase erreichen. Dies kann in einer Fermentation zu einer Beeinträchtigung von Wachstum und Produktbildung führen.

4.10 Aufbau und Durchführung der Fermentationen

Um den Aufbau des Fermenters mit seiner Peripherie und die Durchführung der Fermentation zu verdeutlichen, ist der theoretisch zu erwartende Verlauf einer Fermentation in Abb. 4-12 dargestellt. Das im Medium vorgelegte L-Tyrosin sowie die Glucose werden von den Zellen zum Wachstum verwendet. Sobald die Konzentration der Substanzen einen kritischen Wert unterschritten hat, wird ihr Zulauf gestartet. Ihre Konzentration bleibt dann auf konstantem Niveau, das Zellwachstum ist aufgrund der direkten Abhängigkeit von der L-Tyrosinverfügbarkeit linear. Die Produktion von L-Phenylalanin wird durch die Zugabe von IPTG induziert. Die Zellen sollen nur bis zu einer bestimmten optischen Dichte wachsen, danach sollen die verfügbaren Substanzen nur noch für die Synthese von L-Phenylalanin verwendet werden. Um das Wachstum zu unterbinden, wird die L-Tyrosinzufuhr beendet. Die Zellkonzentration erreicht ihren Endwert.

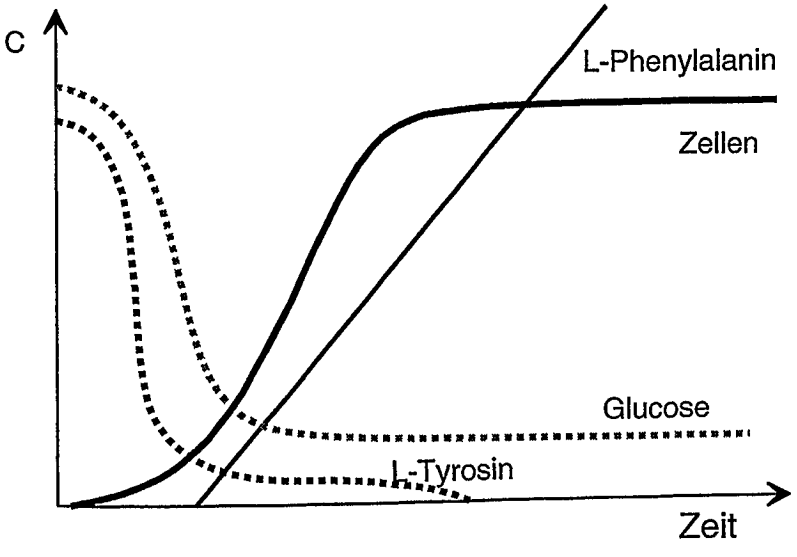


Abb. 4-12: Theoretischer Verlauf einer Fermentation. Biomasse-, L-Phe-, Glucose und Tyrosinkonzentration

Der in Abb. 4-12 dargestellte theoretische Fermentationsverlauf ist stark idealisiert. Die Glucosekonzentration wird nicht geregelt, sondern gesteuert. Eine Etablierung geeigneter Regelstrategien ist jedoch bereits in Bearbeitung[126]. Dadurch ist ein unregelmäßiger Kurvenverlauf zu erwarten. Gleiches gilt für den Verlauf der L-Tyrosinkonzentration, die von ihr abhängige Zellkonzentration und die L-Phenylalaninsynthese. Tyrosin wird im Verlauf des Prozesses dosiert. Jedoch ist die Menge so gering, daß die Konzentration im Fermenter unterhalb der meßbaren Konzentration liegt.

4.10.1 Fermentation im Zulaufverfahren im 7,5 l- Fermenter

Die Zusammensetzung der verwendeten Medien findet sich im Anhang. Der Fermenter wird nach dem unten abgebildeten Schema (Abb. 4-13) aufgebaut. Zu dem Fermenter gehört eine Meß- und Regeleinheit, über die Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Drehzahl und Zuluft gemessen bzw. geregelt werden können. Eine Regeleinheit für den Fermenterinnendruck wird nachträglich installiert. Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt der Abluft können über eine Abgasanalytik bestimmt werden.

Vor dem Autoklavieren wird die pH- Sonde kalibriert. Das Autoklavieren des Fermenters erfolgt mit eingebauten Sonden und einem Inhalt von ca. 2 l entionisiertem Wasser bei 121°C für 20 min. Das Wasser konnte anschließend über das Probenahmeventil abgelassen werden.

Dann werden 3,6 l Medium über einen Sterilfilter in den Reaktor gepumpt, im Medium werden pO_2-Sonde und Abgasanalytik geeicht.

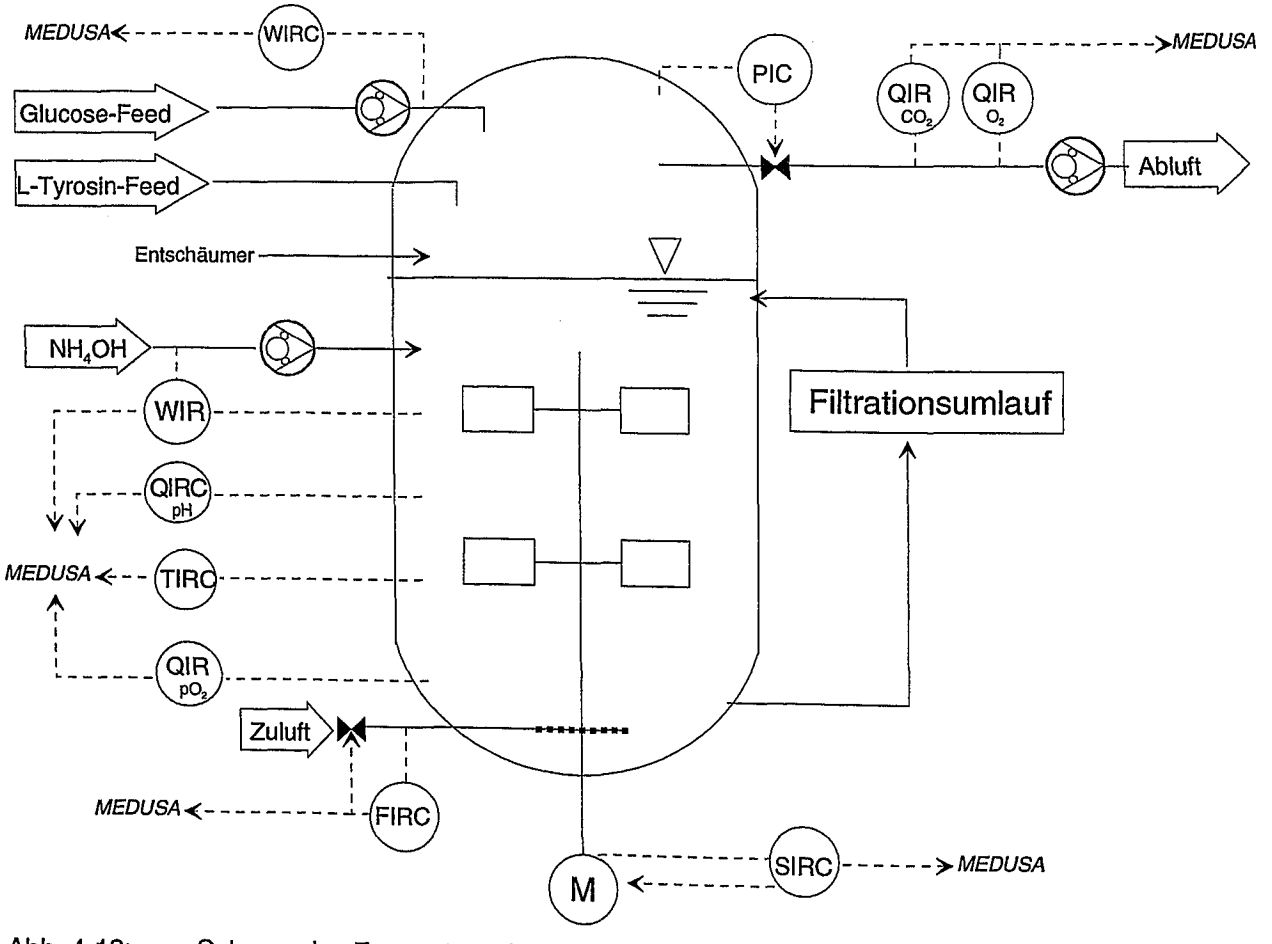


Abb. 4-13: Schema des Fermenteraufbaus. Der Filtrationsumlaufs ist in Kapitel 4.10.2 im Detail abgebildet und beschrieben.

Zu Beginn der Fermentation wird der Reaktor mit 400 ml Vorkultur inokuliert. Drehzahl und Zuluft werden zunächst auf 250 rpm bzw. 1 vvm eingestellt. Um ein Absinken des pO_2 auf unter 30 % zu verhindern, werden die Parameter manuell erhöht.

Sobald die Glucosekonzentration im Fermenter 10 gl^{-1} unterschreitet, wird der Zulauf von Glucose- und Tyrosinlösung gestartet. Die Zulaufgeschwindigkeit für die Glucoselösung wird über die Dosierstrecke manuell gesteuert. Die Zugabe der Tyrosinlösung wird mit konstanter Pumpleistung komplett in den Fermenter geleitet.

Um die im Laufe einer Fermentation zugegebenen Mengen von Glucose- und Ammoniaklösung nachvollziehen zu können, werden die zugehörigen Flaschen auf Waagen

gestellt, die mit Dosierstrecken verbunden sind. Diese können die aktuellen Anzeige der Waage als analoges Signale zur Prozeßdatenerfassung übertragen.

Das Antischaummittel wird manuell mit einer sterilen Kanüle durch ein Septum zugegeben, weil ein Zudosieren von kleinen Volumina durch die automatische Füllstandsregelung nicht möglich ist. Alle anderen Medien und Lösungen werden über sterile Animpfnadeln in den Fermenter geleitet.

Die Fermentation wird nach 50 Stunden beendet, denn Erfahrungen mit diesem Prozeß im 20-l- Maßstab zeigten, daß nach dieser Zeit keine Produktbildung mehr stattfindet.

Abb. 4-14 zeigt ein Foto des Fermenters. Erkennbar ist der Schrank mit Steuereinheit (rechts), auf ihm der pH-Meßverstärker und das Druckventil. Links vom Fermenter stehen die Pumpen (unten), Dosierstrecken und Waagen (Mitte) sowie die Abgasanalytik und der Dosimat (oben). Am Fermenter ist der Filtrationsumlauf montiert.

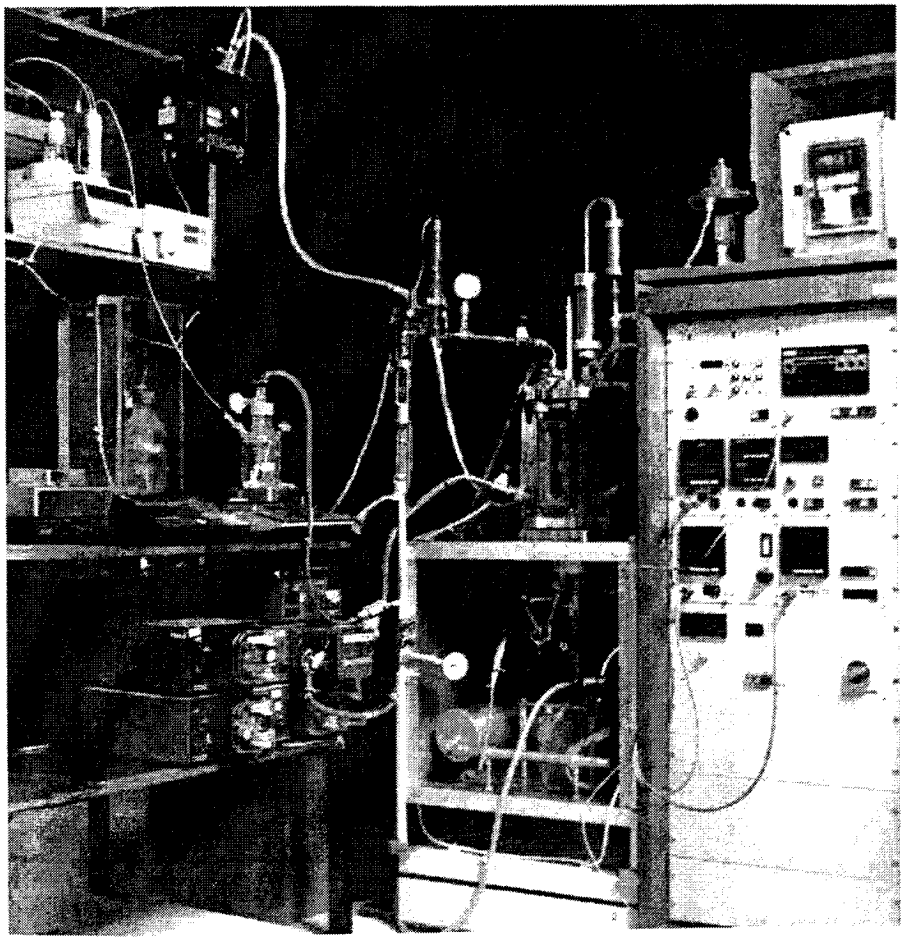


Abb. 4-14: Foto des Fermenters

4.10.2 Fermentation im Zulaufverfahren mit Filtrationsumlauf

Der 7,5-l-Reaktor wird den Versuchen ohne Filtrationsumlauf und der Filtrationsumlauf dem Schema in Abb. 4-15 entsprechend aufgebaut und in den Aufbau des Reaktors integriert.

Die Fermentationslösung wird aus einem Seitenstutzen des Reaktors durch das Filtrationsmodul gepumpt, das Retentat gelangt durch ein Septum im Fermenterdeckel wieder zurück. Vor und hinter dem Filtrationsmodul sind Manometer in den Umlauf eingebaut, um den Druckabfall im Modul bestimmen zu können. Außerdem wird der Sauerstoffpartialdruck am Ende des Umlaufs durch eine pO_2-Sonde gemessen, die Werte werden an die Prozeßdatenerfassung übertragen. Der Volumenstrom hinter dem Modul kann von einem Strömungsmeßgerät abgelesen werden.

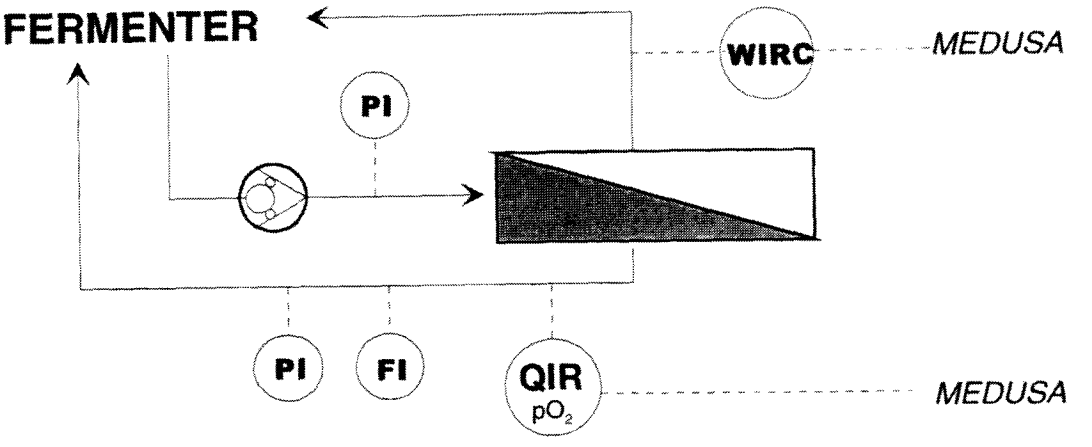


Abb. 4-15 Schema des Filtrationsumlaufs

Abb. 4-16 zeigt ein Foto des Filtrationsumlaufs. Die Fermentationslösung wird aus dem Fermenter von unten durch das Modul gepumpt. Hinter dem Modul sind Durchflußanzeiger, pO_2- Elektrode und Manometer montiert. Am Fermenterein- und -ausgang sind die Ventile erkennbar, mit denen der Druck im Umlauf eingestellt werden kann. Das Permeat wird in einer Flasche gesammelt, die auf einer Waage steht.

Der Permeatvolumenstrom wird mit Hilfe einer Dosierstrecke durch die kontinuierliche Messung der Zeit ermittelt, die bis zur Abtrennung von 250 g Permeat verging. Das Permeat wird dann durch eine von der Dosierstrecke gesteuerte Schlauchpumpe in den Fermenter gepumpt.

Mit der Biomasserückhaltung wird etwa 2 Stunden nach der Induktion der L-Phenylalaninsynthese mit IPTG begonnen. Auf diese Weise kann ein Einfluß der Filtration auf die Produktbildung ebenso erkannt werden, wie ein Einfluß auf das Wachstum der Zellen.

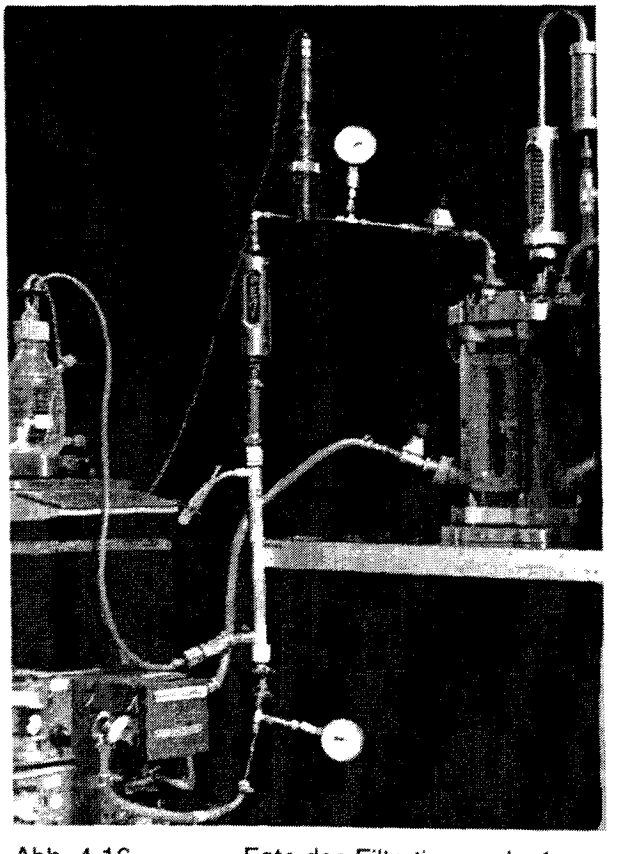


Abb. 4-16 Foto des Filtrationsumlaufs

Die Dauer der Fermentationen wird auf 30 Stunden gekürzt. In den im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Fermentationen zeigte sich, daß im 7,5 l- Reaktor schon nach dieser Zeit keine Produktbildung mehr stattfindet.

Zur Untersuchung der Einflüsse der Aufarbeitung wird die D_2EHPA / Kerosin- Mischung mit einem Dosimaten kontinuierlich in den Permeatvolumenstrom gegeben. Die Zugabe des reinen D_2EHPA muß manuell erfolgen, weil der Dosimat den Carrier aufgrund seiner Viskosität nicht dosieren kann. Zu Beginn der Filtration, d.h. bei hohen Permeatvolumenströmen, werden alle 10 min. 27 µl zugegeben, weil das Permeat bis zu einer Masse von 250 g gesammelt und dann zurückgeführt wird. Der Zugabeintervall kann mit sinkendem Permeatvolumenstrom vergrößert werden.

4.10.3 Fermentation im Zulaufverfahren in Schüttelkolben

Diese Versuche werden in einer Anlage durchgeführt, in der 12 Schüttelkolben mit Temperatur- und pH-Regelung sowie mit Substratdosierung parallel untersucht werden können. Die Lösungen werden jeweils aus einer Flasche durch gleich lange Schläuche in die Kolben dosiert. Jeder Schlauch ist mit einem eigenen Schlauchquetschventil versehen, welches vom Prozeßrechner einzeln angesteuert werden kann. Die Prozeßdatenerfassung erfolgt mit dem Programm Fed-batch Pro.

Es werden 1 l-Kolben verwendet, die mit 90 ml Medium und 10 ml Inokulum befüllt werden.

Die Proben werden mit einer Kanüle und einer sterilen Spitze durch das Septum im Seitenstutzen der Kolben entnommen. Die Analytik wird wie bei den Proben der anderen Fermentationen durchgeführt.

Die Induktion erfolgt bei einer optischen Dichte von ~5.

Zur Untersuchung der Biokompatibilität werden folgende Ansätze gefahren.

Die Zugabe von D_2EHPA- bzw. KH_2PO_4-Lösung erfolgt bei einer OD_{620} von ~7. Diese Werte ergeben sich aus dem Verhältnis der maximalen optischen Dichte sowie der OD bei Induktion und bei D_2EHPA- Zugabe von Schüttelkolben zu 7,5-l- Fermenter, das jeweils etwa 1:5 beträgt.

Folgende Ansätze werden untersucht:

Ansatz	Referenz	D_2EHPA	D_2EHPA	KH_2PO_4
Modifikation	-	80 µl (in 1 Puls)	80 µl (in 4 Pulsen)	35,79 mg (in 1 Puls)

Tabelle 11: Modifikation der Parallelansätze in der Schüttelkolbenanlage

Die Zugabe von D_2EHPA und KH_2PO_4 erfolgt äquimolar.

Insgesamt dauert diese Fermentation wie die Experimente im 7,5-l- Bioreaktor 30 h.

4.11 Demonstrationsexperiment im Pilotmaßstab

Die Demonstration der simultanen Produktabtrennung von L-Phe aus einer laufenden Fermentation wird im Pilotmaßstab durchgeführt. In Abb. 4-17 ist der Aufbau der Anlage schematisch gezeigt. Das Arbeitsvolumen der Fermentation liegt bei 200 l. Zur Biomasserückhaltung und Permeatbereitstellung wird eine Ultrafiltrationseinheit (500kD, 4,4 m^2) eingesetzt. Das so gewonnene Permeat wird mit einer Austauschrate von 15 l/h in die Extraktionsanlage geführt. Dort wird ein Raffinatvolumen von ca. 5 l durch die Hohlfasern des ersten Modul im Kreis gefahren. Die organische Membranphase wird im Mantelraum beider Module zirkuliert. Das Extraktvolumen beträgt 50 l und wird im Inneren der Hohlfasern des zweiten Moduls zirkuliert. Bezogen auf das vorgelegte Raffinat nämlich das Arbeitsvolumen des Fermenters liegt demnach ein Phasenverhältnis PV von 4 vor. Nach Beendigung des Experiments wird der Extrakt in einer Präzipitationseinheit gefällt.

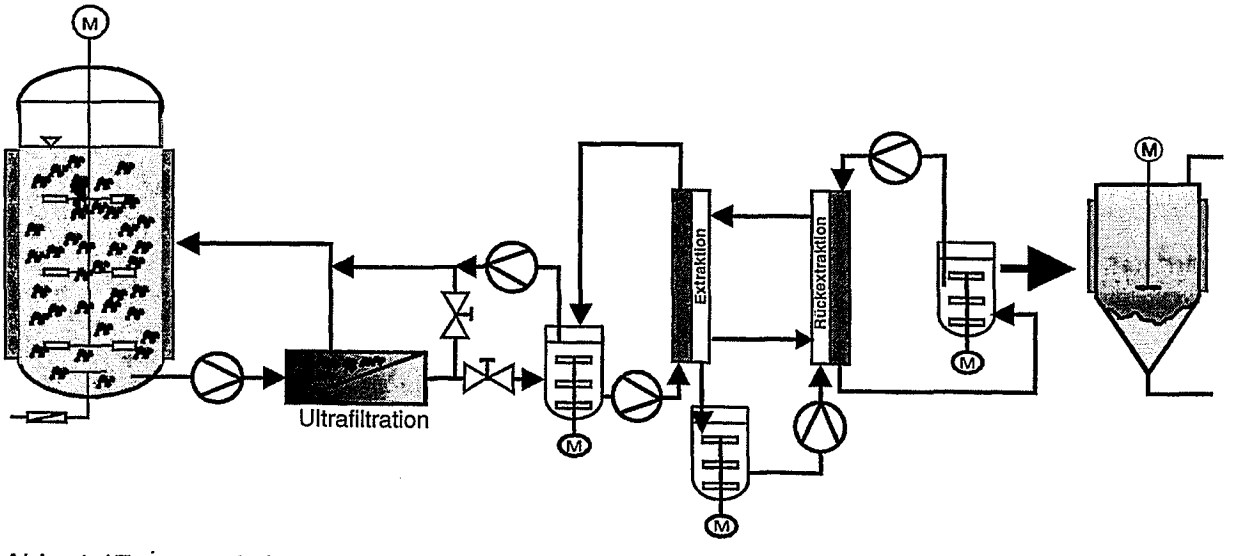


Abb. 4-17: Schema des integrierten Prozesses im Pilotmaßstab

Der gesamte Anlagenaufbau ist auf der folgenden Seite in Abb. 4-18 im Detail gezeigt. Die Beschreibung des Fermentationsprozesses mit Regelstrategie und genauen Daten zur Prozeßführung findet sich bei Gerigk.[127]

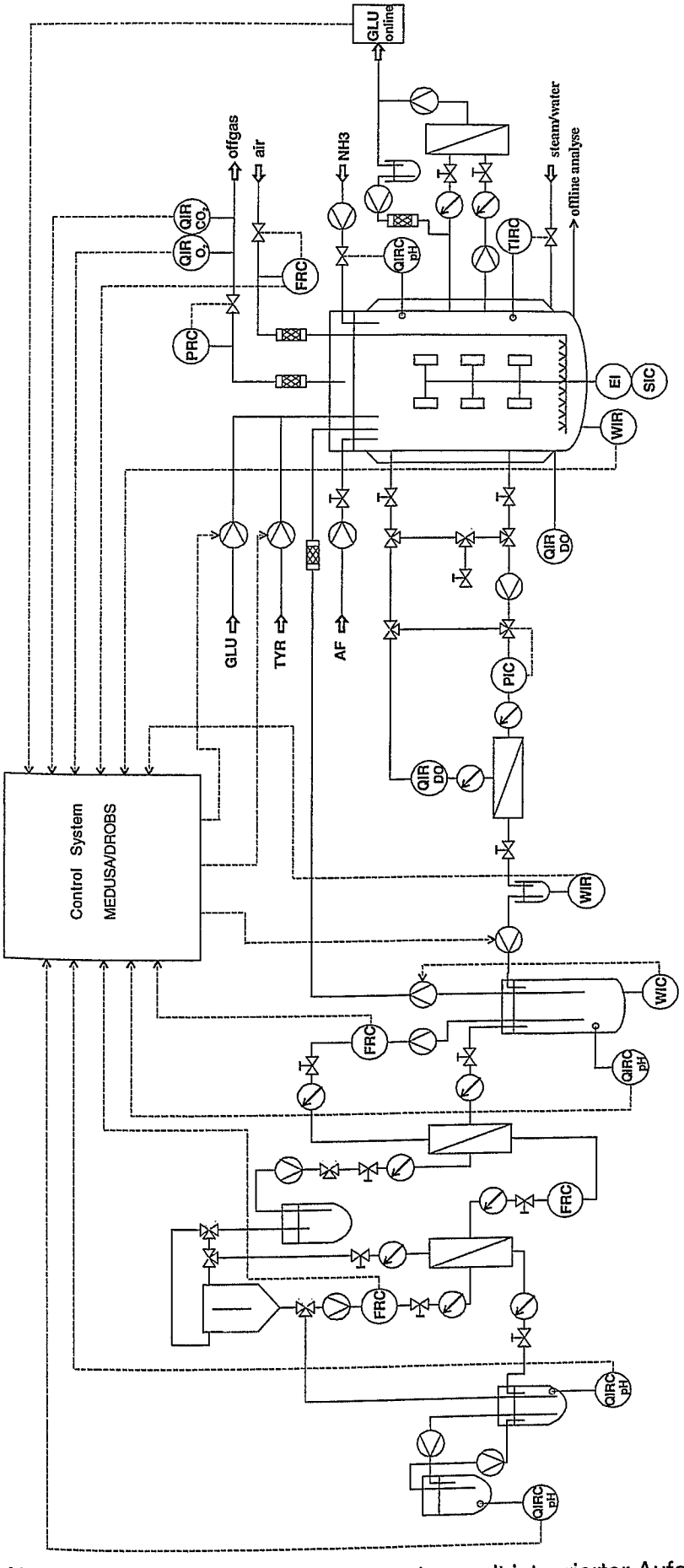


Abb. 4-18: Fließbild der Pilotanlage mit integrierter Aufarbeitung

5 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die experimentellen Ergebnisse der Arbeit zusammengefaßt. Die Abfolge der Darstellung gliedert sich in fünf Bereiche. Zunächst werden anhand von satzweisen Extraktionen die Extraktions- und Verdünnungsmittel auf ihre Einsetzbarkeit untersucht. Auf dieselbe Weise sollen geeignete Gegenionen gefunden und die Einflüsse der Carrier- und L-Phe-Konzentration untersucht werden. Abschließend wird die Reversibilität der Extraktion untersucht.

Im zweiten Abschnitt wird der technische Einsatz der Reaktivextraktion in Hohlfasermodulen gezeigt. Dabei wird zunächst eine Laboranlage und später im Pilotmaßstab eine Technikumsanlage aufgebaut und in Betrieb genommen. Im Pilotmaßstab werden die Einflüsse der Hydrodynamik und der Carrier- und Gegenionenkonzentration auf den Stoffübergang untersucht. Die Möglichkeiten der Aufkonzentrierung und der weiteren Produktreinigung werden aufgezeigt.

Im dritten Abschnitt wird eine modellmäßige Beschreibung der Extraktion mit dem gewählten Stoffsystem gezeigt und mit experimentell ermittelten Werten verglichen.

Im vierten Abschnitt werden die biologischen Untersuchungen zur Biokompatibilität gezeigt. Es werden die Wechselwirkungen der Extraktionsmittel auf Produktivität und Wachstum der Mikroorganismen im Miniatur- und Labormaßstab untersucht.

Im fünften Abschnitt wird die Pilotanlage zur kontinuierlichen Produktabtrennung direkt an einen 300 l *E. coli* Fermentationsprozeß angeschlossen. Es wird die Einsetzbarkeit dieses Verfahrens und die Möglichkeit der Verbesserung des Gesamtprozesses untersucht.

5.1 Satzweise Experimente zur Auswahl geeigneter Stoffsysteme

Zur Auswahl geeigneter Extraktions- und Verdünnungsmittel werden ansatzweise Extraktionen von wäßriger L-Phe Lösung unternommen. Diese Untersuchungen werden in Rührzellen, wie in Kapitel 4.4 beschrieben, durchgeführt. Dabei wird der L-Phe Übergang zwischen Raffinat- und organischer Phase bis zur Gleichgewichtseinstellung untersucht. Es werden 6 Reaktivkomponenten und 8 Verdünnungsmittel ausgewählt (siehe Kapitel 2.8 und 4.3), die im folgenden untersucht werden.

Vor der Untersuchung der Reaktivkomponenten werden die Lösungsmittel ohne Zusatz zur Extraktion eingesetzt. In diesen Experimenten findet keine Extraktion von L-Phenylalanin statt. Die Reaktivkomponenten sind D_2EHPA, DNNSA, Aliquat 336, Alamin 304 und Alamin 308. Die Verdünnungsmittel zur Aufnahme der Reaktivkomponenten sind Kerosin, Butylstearat, Decan, Dodecan, Pentadecan, Decanol, Oktanol und Xylen.

5.1.1.1 Einfluß der Extraktionsdauer auf die Gleichgewichtseinstellung

Das erste untersuchte Extraktionsmittel ist D_2EHPA. Da D_2EHPA als Kationentauscher reagiert, wird das Raffinat mit H_2SO_4 auf einen pH-Wert unter 3,1 eingestellt. So wird sichergestellt, daß ausreichend L-Phe-Kationen für die Extraktion zur Verfügung stehen. D_2EHPA wird in Kerosin gelöst. Obwohl in der Rührzelle durch die hohe Drehzahl turbulente Strömung sichergestellt ist, soll die zeitliche Abhängigkeit der Extraktion kurz untersucht werden. Um das kinetische Verhalten der Extraktion bewerten zu können, werden über einen Zeitraum von 30 min Proben aus dem intensiv durchmischten Reaktionsgefäß genommen. Als Raffinat wird eine ein prozentige L-Phe-Lösung in Wasser vorgelegt.

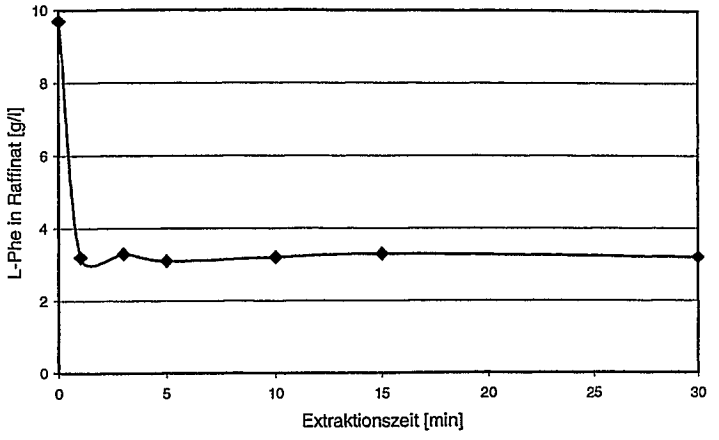


Abb. 5-1: L-Phe Konzentration über der Zeit (10% D_2EHPA in Kerosin)

In Abb. 5-1 ist der Verlauf der L-Phe Konzentration über der Zeit dargestellt. Bereits nach einer Minute sind 6,5 g/l des vorgelegten L-Phe aus dem Raffinat in die organische Phase übergegangen. Eine längere Kontaktzeit bringt keinen weiteren Phasenübergang. Aufgrund dieser Ergebnisse wird in den folgenden Experimenten nur noch eine Probe nach drei Minuten genommen. Die Berechnung eines Stoffübergangskoeffizienten β nach Gl. 2-34 ist aufgrund der turbulenten Strömung und der nicht zugänglichen Größe der Phasengrenzfläche in diesen Experimenten nicht möglich.

Zur Bewertung der Extraktionsversuche wird der Extraktionsgrad E eingeführt. Er beschreibt das Verhältnis von extrahierten L-Phe, zum ursprünglich im Raffinat vorgelegten L-Phe. Die mit HPLC gemessenen Konzentrationen der wäßrigen Proben lassen sich ohne Messung der organischen Phase direkt in den Extraktionsgrad umrechnen. Der Extraktionsgrad berechnet sich analog Gl. 2-3 nach:

Gl. 5-1
$$E = \frac{c_{Phe,org}(t) \cdot V_{org}}{c_{Phe,w}(t_0) \cdot V_w} \cdot 100 = \frac{(c_{Phe,w}(t_0) - c_{Phe,w}(t)) \cdot V_{org}}{c_{Phe,w}(t_0) \cdot V_w} \cdot 100$$

5.1.2 Satzweise Extraktionen mit verschiedenen Extraktionsmitteln

5.1.2.1 Di-2-ethylhexylphosphorsäure (D_2EHPA)

In Abb. 5-2 sind D_2EHPA Extraktionen mit fünf verschiedenen Verdünnungsmitteln einander gegenübergestellt. In dieser und den folgenden Versuchsreihen liegt die Vorlagekonzentration an L-Phe im Raffinat bei 5 g/l. Alle anderen Versuchsbedingungen werden beibehalten.

Mit dem Extraktionssystem D_2EHPA/Kerosin wird eine Extraktionsausbeute von 76 % erreicht. Dabei reduziert sich der pH-Wert im Raffinat von 3,0 auf 1,9.

Das Extraktionssystem D_2EHPA /Decan extrahiert 74 % des gelösten L-Phe. Hier fällt der pH von 3,0 auf 1,9.

Mit dem Verdünner Dodecan können 71 % des Phe extrahiert werden. Der pH fällt von 2,8 auf 1,9. Mit Pentadecan werden nur 69 % extrahiert, wobei der pH von 3,0 auf 1,9 fällt.

Bei Verwendung von Butylstearat fällt die Extraktionsleistung deutlich geringer mit 58 % aus. Der pH fällt hier von 3,0 auf 2,1.

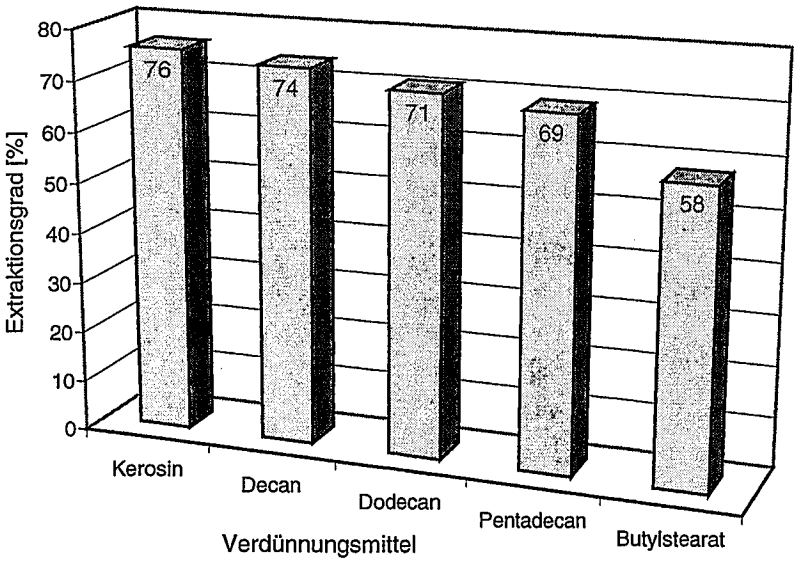


Abb. 5-2: Extraktionsausbeute mit D_2EHPA in verschiedenen Lösungsmitteln

Vergleicht man die Alkane Verdünnungsmittel untereinander, so fällt auf, daß mit steigender C-Zahl die Extraktionsleistung geringer wird. Insgesamt fällt bei den Ergebnissen auf, daß bei dem eingestellten Ausgangs pH die Menge an L-Phe-Kationen unter 10 % liegt. Trotzdem werden Extraktionsleistungen von teilweise über 70 % erzielt.

5.1.2.2 Dinonylnaphtalinschwefelsäure (DNNSA)

Dinonylnaphtalinschwefelsäure (DNNSA) wirkt wie D_2EHPA als Kationentauscher. Das Raffinat wird daher mit H_2SO_4 auf $pH < 3,1$ eingestellt. Aufgrund der hohen Grenzflächenaktivität der Säure gestalten die Experimente sich als schwer reproduzierbar. Das Absetzverhalten der beiden Phasen voneinander dauert verschieden lang und es kommt teilweise zu einer Mulmbildung an der Phasengrenze. Bei den Extraktionsversuchen mit DNNSA/Kerosin liegt die Extraktionsleistung zwischen 66 % und 99 %. Der pH-Wert sinkt dabei von 3,1 auf 2,4.

5.1.2.3 Trioctylmethylammoniumchlorid ALIQUAT 336

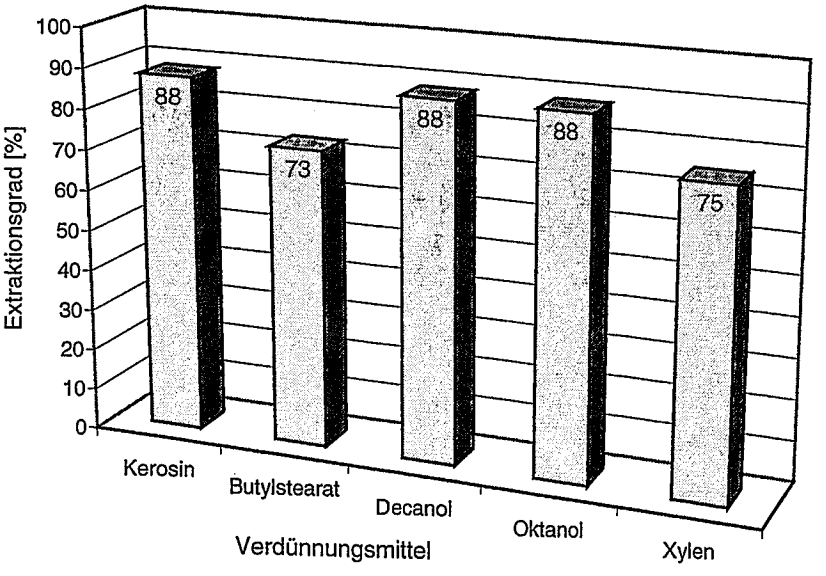


Abb. 5-3: Extraktionsausbeute mit Aliquat 336 in verschiedenen Lösungsmitteln

Beim Einsatz von Butylstearat als Verdünnungsmittel wird ein Extraktionsgrad von 61 % erreicht. Der pH-Wert fällt dabei von 3,1 auf 2,2. Aufgrund der schlechten Phasentrennung und der hohen Oberflächenaktivität des Extraktionsmittels werden die weiteren Alkane Decan, Dodecan und Pentadecan nicht in Kombination mit DNNSA eingesetzt.

Neben des schlechten Absetzverhaltens sei an dieser Stelle auch auf den niedrigen Flammpunkt von −1,1 °C hingewiesen (s. Kapitel 4.3.1.2), der einen technischen Einsatz dieses Systems bedenklich erscheinen läßt.

Die quartenäre Ammoniumverbindung Trioctylmethylammoniumchlorid ist Hauptkomponente des Extraktionsmittels Aliquat 336. Ein Teil der C_8-Ketten ist allerdings durch C_9- und C_{10}-Homologe ersetzt. Aliquat 336 ist ein flüssiger Anionentauscher. Der pH wird daher mit NaOH auf einen Wert >9 eingestellt. So liegen genügend L-Phe Anionen für die Extraktion vor. Aufgrund der guten Ergebnisse mit dem Alkangemisch Kerosin als Verdünnungsmittel, wird im folgenden auf den Einsatz der reinen Alkane verzichtet.

Beim Ansetzen der organischen Phase aus Aliquat 336 und Kerosin wird bereits bei einem Extraktionsmittelanteil von 10 % die Löslichkeitsgrenze des Aliquat 336 überschritten und es bildet sich ein zweiphasiges System. Daher wird hier der Carrieranteil auf 5 % abgesenkt. Mit diesem System werden 88 % des L-Phe aus dem Raffinat extrahiert. Neben Butylstearat, werden weitere Verdünnungsmittel mit einer höheren Löslichkeit für Aliquat 336 eingesetzt. Die Alkohole Decanol und Oktanol extrahieren wie Kerosin 88 % der Aminosäure. Nach dem Dispergieren der Phasen findet beim Einsatz von Oktanol als Verdünner eine sehr schnelle Phasentrennung statt. Im Gegensatz dazu kommt es bei den Decanol Ansätzen zu Mulmbildung und verzögerter Phasentrennung. Butylstearat und Xylen extrahieren nur 73 bzw. 75 %. Die pH-Werte bleiben bei allen Ansätzen nahezu konstant.

5.1.2.4 Tertiäre Ammoniumsalzen

Die beiden tertiären Amine Alamin 304 und Alamin 308 werden zur Extraktion mit Kerosin verdünnt. Der pH wird auch hier mit Natronlauge auf 10,4 eingestellt, da es sich um Anionentauscher handelt. Bei beiden Extraktionsmitteln liegt der Extraktionsgrad bei ca. 6 %. Wegen dieser geringen Extraktionsleistung werden die anderen Verdünnungsmittel nicht mehr untersucht.

5.1.2.5 Bewertung der Extraktionsmittel

Eine detaillierte Bewertung und Diskussion der einzelnen Carriersysteme erfolgt in Kapitel 7.1. Zur weiteren Untersuchung der Einflußfaktoren auf die Extraktion (Gegenionen, Carrieranteil, L-Phe-Konzentration, etc.) wird jedoch nur das Extraktionsmittel D_2EHPA verwendet. Aufgrund der gezeigten Ergebnisse im Bezug auf Extraktionsleistung und Stabilität der Phasengrenze erscheint der weitere Einsatz von D_2EHPA sinnvoll.

5.1.3 Auswahl geeigneter Gegenionen

Der Einfluß der vorgelegten Gegenionen auf die Rückextraktion wird mit dem Stoffsystem D_2EHPA in Kerosin untersucht. Es werden 1 und 2 molare Lösungen von $(NH_4)_2SO_4$, NaOH, KOH, H_2SO_4 und KCL als Extraktphase vorgelegt. Die organische Phase besteht aus 10% D_2EHPA in Kerosin und ist durch eine Extraktion mit Phenylalanin vorbeladen.

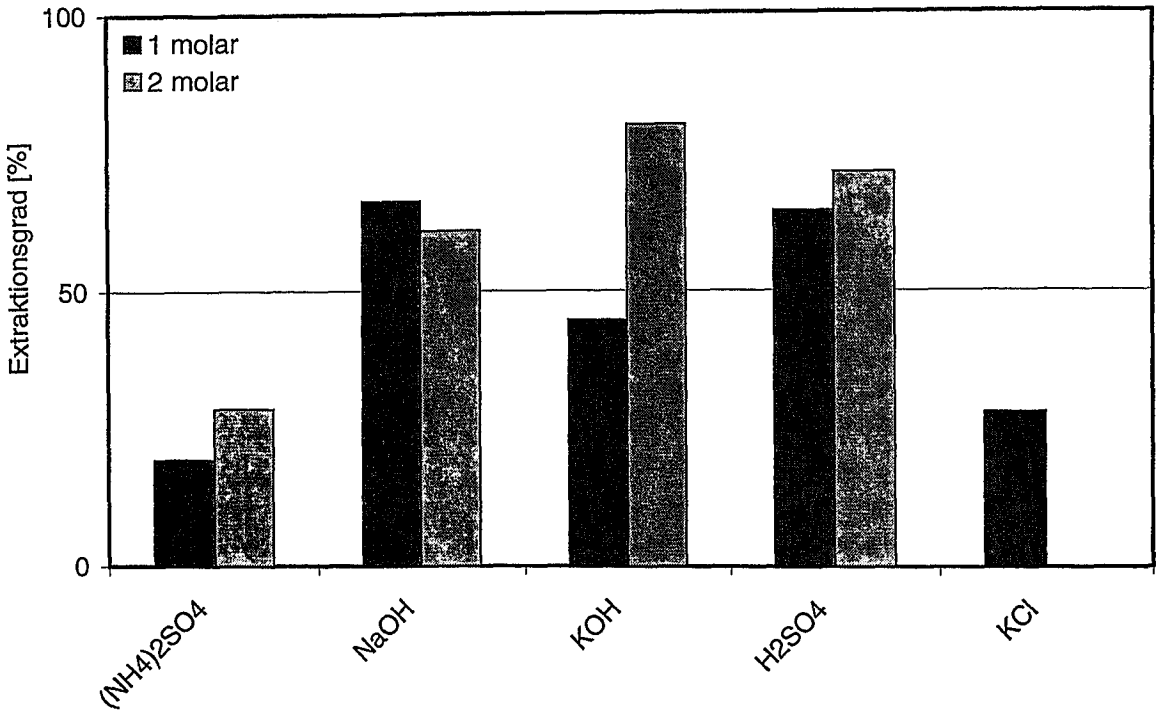


Abb. 5-4: Ausbeuten bei D_2EHPA-Extraktionen mit verschiedenen Gegenionen

In Abb. 5-4 sind die Extraktionsgrade beim Einsatz verschiedener Extraktphasen und Konzentrationen aufgetragen. Dabei wird der Extraktionsgrad auf die im Raffinat vorgelegte L-Phe Konzentration von 80 mmol/l bezogen. Bei Rückextraktionen aus organischen D_2EHPA Phasen dienen jeweils die Kationen der vorgelegten Salze als Gegenionen. Bei den basischen Systemen NaOH und KOH wird eine Eintrübung der Extraktphase durch die Ausbildung von Mikroemulsionen beobachtet. Mit Ausnahme von KOH gilt für alle Systeme, daß die Erhöhung der Gegenionenkonzentration keine signifikante Steigerung der Extraktionsleistung zur Folge hat. Die Extraktionen mit NaOH und H_2SO_4 haben bei der Konzentration 1 mol/l einen Extraktionsgrad von ca. 65 %. Der höchste Extraktionsgrad wird mit 2 molarer KOH erreicht. Beim Einsatz von 1 molarer KCl-Lösung kommt es bei einem Extraktionsgrad von 28 % zu keiner Eintrübung der Phasen.

5.1.4 Einfluß des D_2EHPA Anteils

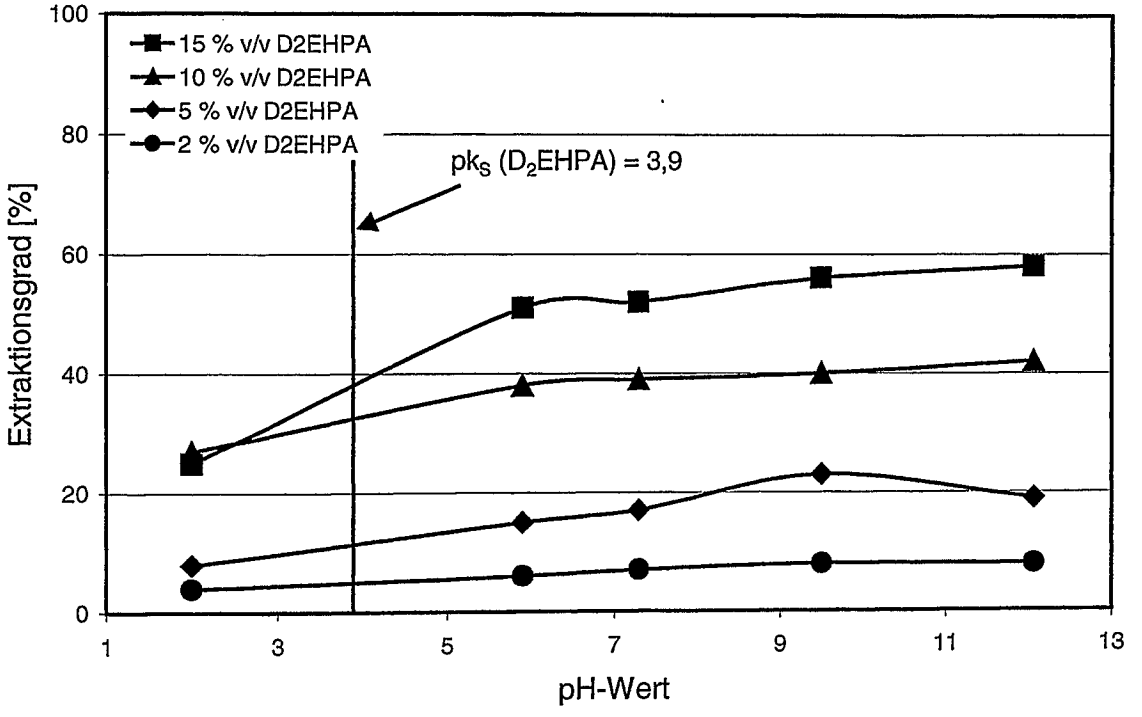


Abb. 5-5 Extraktionsausbeute mit verschiedenen D_2EHPA-Anteilen in der organischen Phase als Funktion des pH (10 g/l L-Phe vorgelegt)

Der Gehalt an D_2EHPA in der organischen Phase, der pH-Wert des Raffinats und der Gehalt an gelösten L-Phenylalanin wird variiert, um den Einfluß dieser Betriebsparameter auf die Extraktionsleistung im Gleichgewicht zu untersuchen.

Abb. 5-5 zeigt die Extraktionsausbeute in Prozent über dem pH-Wert. Dabei werden die D_2EHPA Anteile in der organischen Phase von 2 % v/v bis 15 % v/v variiert. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Erhöhung des D_2EHPA Anteils einen erheblichen Einfluß auf die Extraktionsleistung des Stoffsystems hat. Der Extraktionsgrad kann bei pH 12 von 8 % bei 2 % Carrieranteil auf 58 % mit einem 15-prozentigen Carrieranteil gesteigert werden. Dagegen hat die Variation des pH-Werts nur einen geringen Einfluß auf die Extraktionsleistung. Lediglich zwischen pH 2 und 6 erhöht sich die Extraktionsleistung mit steigendem pH-Wert. Oberhalb von pH 6 bleibt der Extraktionsgrad mit steigendem pH-Wert konstant.

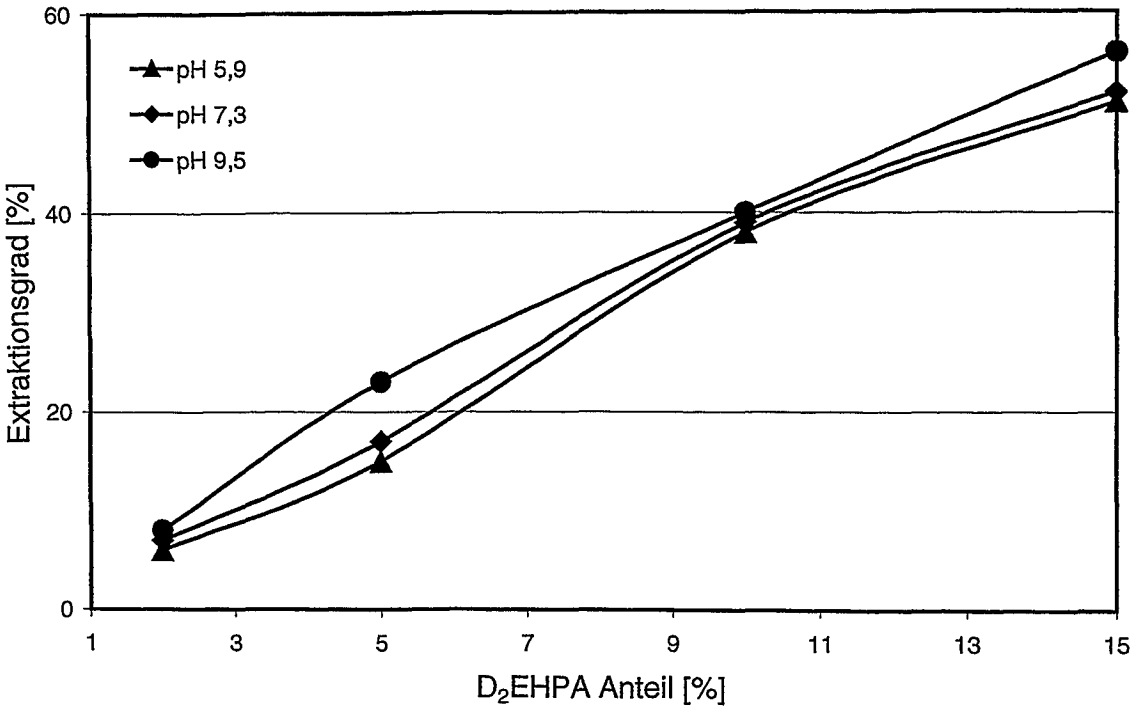


Abb. 5-6 Extraktionsausbeute als Funktion des pH (10 g/l L-Phe vorgelegt)

In Abb. 5-6 ist der Extraktionsgrad über dem Carrier-Anteil aufgetragen. Es ist zu erkennen, daß im untersuchten Bereich eine lineare Abhängigkeit zwischen D_2EHPA-Anteil und Extraktionsgrad besteht.

5.1.5 Einfluß der Konzentration an L-Phenylalanin

Der Einfluß der Konzentration an vorgelegtem L-Phe auf die Extraktion wird bis zur Gleichgewichtseinstellung untersucht. Der Gehalt an D_2EHPA in der organischen Phase beträgt 10 % v/v. Die Konzentration des L-Phe in der Vorlage wird von 0,1 g/l bis 20 g/l variiert. Der Extraktionsgrad als Funktion der Ausgangskonzentration ist in Abb. 5-7 dargestellt. Im Kurvenverlauf ist eine Sättigungskinetik zu erkennen. Das vorgelegte L-Phe wird über weite Konzentrationsbereiche zu ca. 50 % extrahiert. Unter einem Schwellenwert von 5 g/l geht die Extraktionsleistung jedoch stark zurück. Unterhalb 1 g/l Phenylalanin findet keine Extraktion mehr statt.

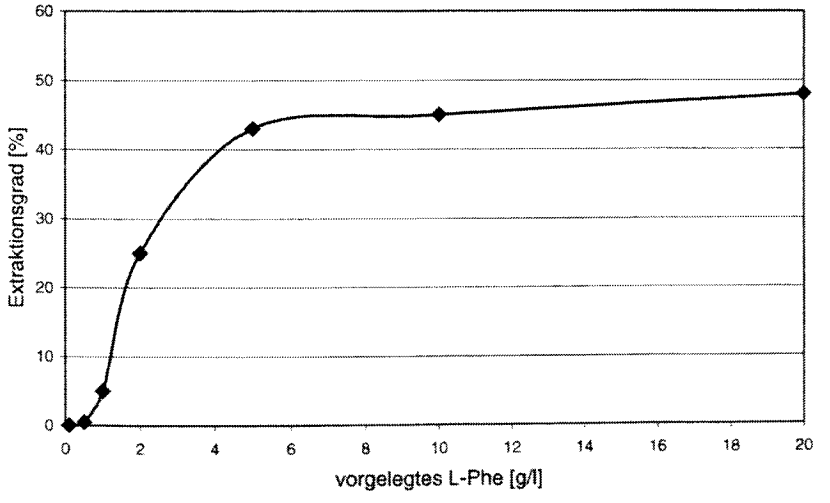


Abb. 5-7: Extraktionsausbeute mit verschiedenen L-Phe Konzentrationen im Raffinat (10 % v/v D_2EHPA in Kerosin, pH 5,8)

5.1.6 Reversibilität der Extraktion

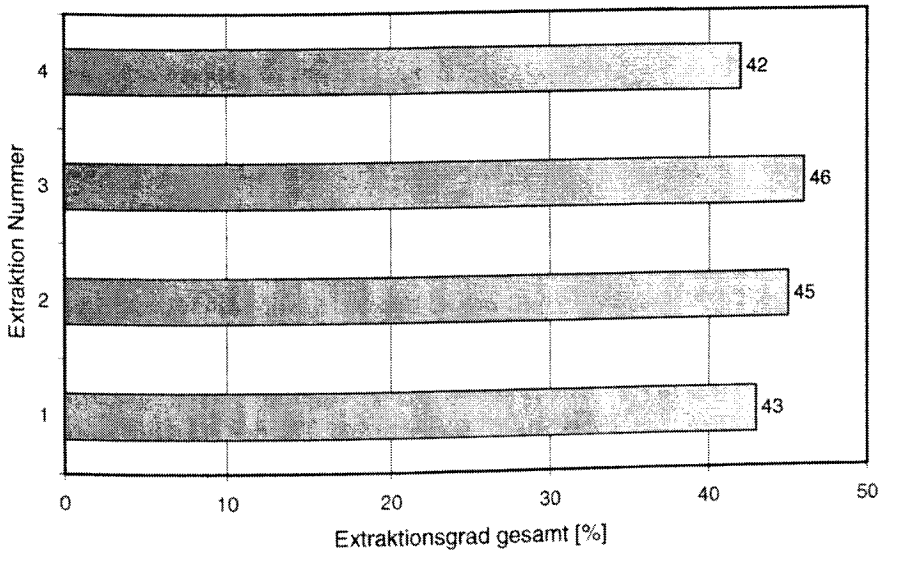


Abb. 5-8: mehrfache Verwendung der organischen Phase

Zur Überprüfung der Reversibilität der Extraktion werden satzweise Experimente mit mehrmaliger Verwendung der organischen Phase durchgeführt. Als Raffinat dient eine

60 mM wäßrige L-Phe Lösung. Die Akzeptorphase besteht aus ein molarer H_2SO_4-Lösung. Nach der Rückextraktion wird die gebrauchte organische Phase erneut mit frischem Raffinat in Kontakt gebracht. Die Extraktionsausbeuten der einzelnen Versuche sind in Abb. 5-8 dargestellt. Der Extraktionsgrad liegt in allen Ansätzen bei ca. 45 % bei einem Fehler von 6 % (s. Kap. 6)und ist keine Tendenz zur Verschlechterung der Extraktionsleistung mit steigender Versuchsnummer zu erkennen.

5.1.7 Berechnung des Gleichgewichts

Mit Gl. 2-27 läßt sich für die satzweisen Experimente die Gleichgewichtskonstante K berechnen. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tabelle 12 wiedergegeben. Für Extraktionen mit einer Vorlagekonzentration von 10 g/l L-Phe ergibt sich aus der Standardabweichung ein Fehler von 15 %. Eine Beispielrechnung befindet sich im Anhang (9.2).

pH	2	5,9	7,3	9,5	12
K	$11*10^{-2}$	$4,4*10^{-3}$	$1,1*10^{-3}$	$1,5*10^{-4}$	$1,2*10^{-5}$

Tabelle 12: Gleichgewichtskonstante K in Abhängigkeit des pH-Werts

Bei bekanntem K läßt sich mit Gleichung Gl. 2-28 der Verteilungskoeffizient D ermitteln. Aus dem Verteilungskoeffizienten lassen sich direkt die Gleichgewichtskonzentrationen in den Phasen berechnen. Abb. 5-9 zeigt das Beladungsdiagramm bei Extraktionen mit einem D_2EHPA Anteil von 10 %. Es sind für fünf verschiedene pH-Werte die berechneten Gleichgewichtsisothermen aufgetragen. Aus den oben gezeigten Experimenten sind zum Vergleich einige Meßwerte im Beladungsdiagramm dargestellt. Für andere Gehalte an D_2EHPA sind die Beladungsdiagramme im Anhang zu finden.

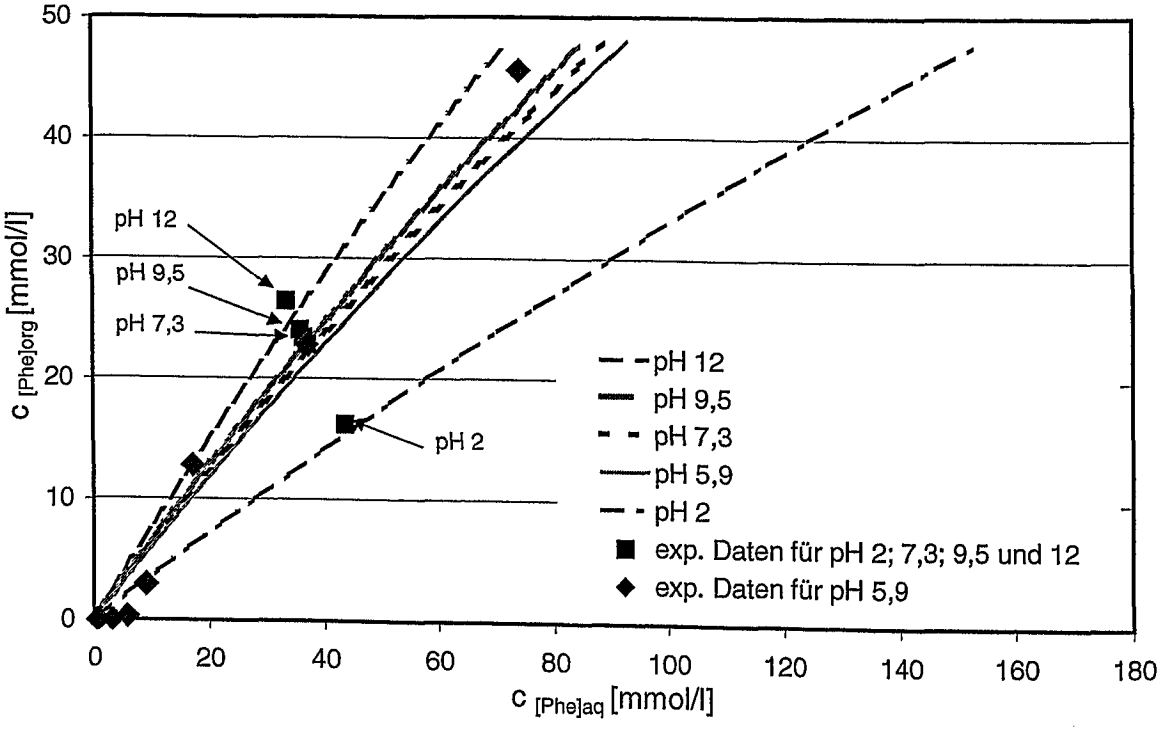


Abb. 5-9: Beladungsdiagramm für einen D_2EHPA Anteil von 10 % bei pH 12; 9,5; 7,3; 5,9 und 2

Die Übereinstimmung der Meßwerte mit den berechneten Isothermen wird deutlich. Die Vergleichswerte für pH 5,9 zeigen auch bei der Extrapolation über 10 g/l hinaus eine gute Übereinstimmung. Der Einfluß des pH-Werts auf den Extraktionsgrad ist bei den einzelnen Kurven gut zu erkennen. Obwohl im basischen das L-Phe vollständig deprotoniert ist und ausschließlich als Anion vorliegt, ist hier die Extraktion am effizientesten.

5.2 Einsatz der Carrier zur hohlfasergestützten Extraktion

5.2.1 Hohlfaserpertraktion im Labormaßstab

Mit dem Stoffsystem Aliquat 336 in Oktanol werden Extraktionen im Labormaßstab durchgeführt. Dabei kommt eine Laborextraktionsanlage mit 5PCM 106X4 Kontaktoren zum Einsatz. Die wäßrigen Phasen werden mit ca. einem bar Gegendruck durch die Hohlfasern jeweils eines Moduls gefahren. Die organische Phase wird durch den Mantelraum beider Module geleitet. Als Modelllösung für das Raffinat dient eine wäßrige L-Phe Lösung (ca. 10 g/l) bei pH 12. Die Extraktphase wird mit HCl auf pH 2 titriert. Als Gegenionen dienten Chloridionen, die in Form von Salzsäure vorgelegt werden. Das Raffinat (1000 ml) und der Extrakt (200 ml) haben ein volumetrisches Phasenverhältnis von 5.

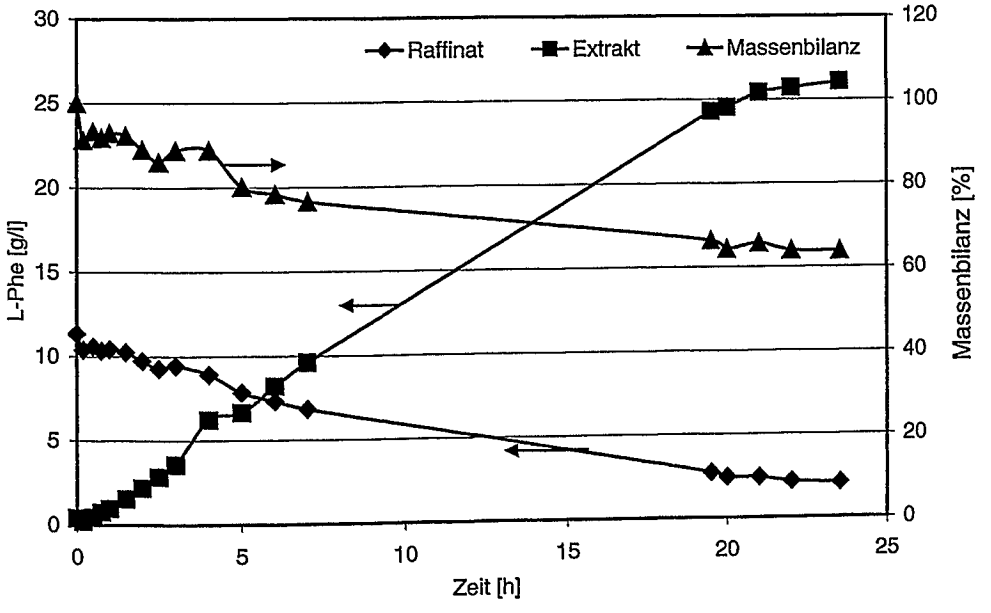


Abb. 5-10: Hohlfaserpertraktion im Labormaßstab mit Aliquat 336

In Abb. 5-10 ist der Verlauf der L-Phe Konzentrationen in Raffinat und Extrakt über der Zeit dargestellt. Auf der rechten Ordinate ist die Massenbilanz an L-Phe berechnet aus den Aminosäuregehalten der beiden wäßrigen Phasen aufgetragen.

Aus dem Raffinat werden im Verlauf des Experiments ca. 9 g/l L-Phe abgetrennt. Aus dem Phasenverhältnis ergibt sich eine mögliche Aufkonzentrierung von 5. Tatsächlich wird das L-Phe im Extrakt auf etwa 23,5 g/l aufkonzentriert. Das Volumen des Extrakt beträgt nur 200 ml, so daß von den extrahierten 9 g/l L-Phe absolut nur 4,7 g/l rückextrahiert werden. Anhand der Massenbilanz wird deutlich, daß die Rückextraktion unvollständig ist. Bis zum Ende des Experiments fällt die Massenbilanz stetig bis zu einer Bilanzlücke von über 35 %.

Zum Ende des Experiments wird in beiden wäßrigen Phasen ein öliger Film auf der Flüssigkeitsoberfläche beobachtet. Ein starker Geruch nach organischen Verunreinigungen in den wäßrigen Phasen ging mit dieser Beobachtung einher. Möglich wäre es, daß ein Teil

des L-Phe in den öligen Schichten bzw. in der organischen Phase irreversibel komplexiert worden ist und die hohe Bilanzlücke daraus resultiert.

5.2.2 Pertraktion im technischen Maßstab

Im technischen Maßstab wird 4X28 Module mit einer Membranfläche von 18,6 m^2 eingesetzt. Der Aufbau der Anlage ist im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Es werden im folgenden nur die Ergebnisse der Kreislaufexperimente gezeigt. Die Durchlaufexperimente dienen nur zur Bestimmung der Konzentrationsänderung bei einmaligem Durchgang und damit zur Ermittlung des Konzentrationsgradienten über die Modullänge. Die Ergebnisse finden sich im Anhang (s. Kap. 9.1).

5.2.2.1 Einsatz von Aliquat 336 im technischen Maßstab

Nachdem im Labormaßstab gezeigt werden konnte, daß das Aliquat 336 gelöst in Oktanol als Stoffsystem zur Hohlfaserextraktion einsetzbar ist, wird es auch im technischen Maßstab untersucht. Ein Einsatz von Aliquat 336 zur hohlfasergestützten Pertraktion in diesem Maßstab wurde allerdings bisher nicht in der Literatur beschrieben. Die Volumina der Phasen betragen jeweils 5 l. Der Volumenstrom im Raffinat wird auf 160 l/h, in der organischen Phase auf 60 l/h und im Extrakt auf 360 l/h eingestellt. Zunächst werden die beiden wäßrigen Phasen in die Anlage gefahren. Nachdem ein stabiler Betrieb mit konstanten Volumenströmen erreicht ist, werden die Module auf Lumenseite mit der organischen Phase geflutet. Es kommt jedoch bereits beim Eintritt der organischen Phase in Modul 1 zu einem Phasendurchbruch. Dabei trat das Raffinat mit hoher Geschwindigkeit in die organische Phase über und der Versuch mußte abgebrochen werden. Durch diesen Vorfall ist eine umfassende Reinigung der Anlage und der Module notwendig.

5.2.2.2 Einsatz von D_2EHPA im technischen Maßstab

Aufgrund der Phaseninstabilität beim Einsatz von Aliquat 336 wird im folgenden das Stoffsystem D_2EHPA in Kerosin eingesetzt. Die Volumina der Phasen betragen wiederum jeweils 5 l.

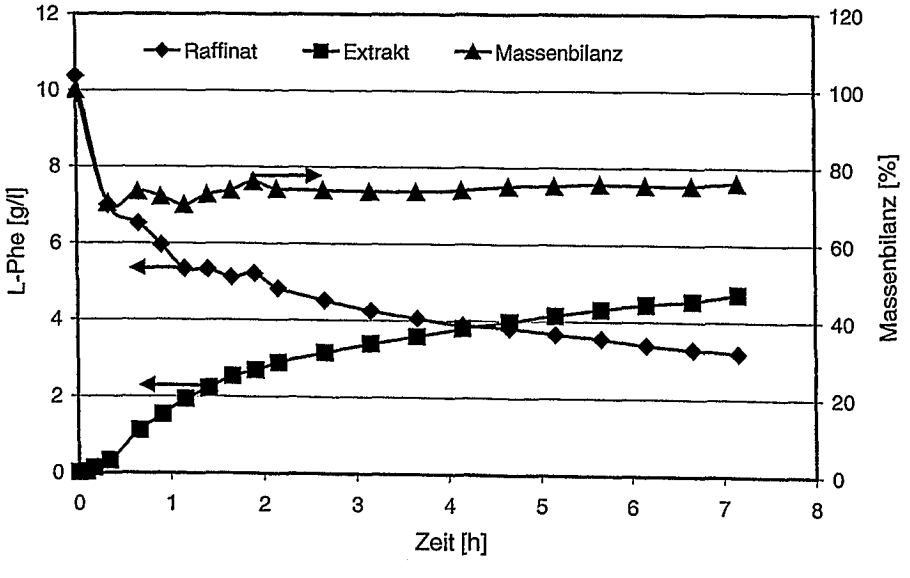


Abb. 5-11: Hohlfaserpertraktion im technischen Maßstab / 10 % D_2EHPA in Kerosin / 1n KCl im Extrakt vorgelegt

Als Extraktphase wird 1 molare KCl-Lösung vorgelegt. Die Volumenströme werden wie im vorhergehenden Experiment gewählt. Bei dieser Extraktion kommt es zu keinem Phasendurchbruch und auch zu keiner Eintrübung. Nach 7 Stunden stabilem Betrieb wird das Experiment abgebrochen. Wie Abbildung Abb. 5-11 dargestellt ist, kann das vorgelegte Phenylalanin auf etwa 3,5 g/l abgereichert werden. Aufgrund des Volumenverhältnisses von 1 kommt es zu keiner Aufkonzentrierung und die erreichte L-Phe Konzentration im Extrakt liegt zum Ende des Experiments bei ca. 4,7 g/l. Die Massenbilanz weist jedoch eine Bilanzlücke von über 20 % auf, die bereits zu Beginn des Experiments auftritt und nicht mehr geschlossen wird. Mit einem Meßfehler von 6 % (s. Kap. 6) kann diese Bilanzlücke nicht erklärt werden. Die organische Phase stellt sich in diesen Experimenten als Stoffsenke für das übergehende L-Phe heraus. Eine unvollständige Regeneration des Carriers durch die vorgelegten Gegenionen und damit eine irreversible Bindung der Aminosäure an das Carriersystem könnten die Gründe dafür sein.

Aufgrund der unvollständigen Rückextraktion des Phenylalanins beim Einsatz von KCl als Extraktphase wird im folgenden Ansatz 2 M KOH-Lösung verwendet. Das Phasenverhältnis beträgt wiederum eins. Um das Experiment zu starten, wird zunächst nur in den beiden wäßrigen Phasen zirkuliert. Dann wird organische Phase zugegeben. Nachdem die Anlage störungsfrei arbeitet, wird die Akzeptorphase gegen das Wasser in den Hohlfasern vertauscht. Bei Kontakt der KOH-Lösung mit der organischen Phase, bildet sich ein milchig weißer Niederschlag in der organischen Phase. Über den integrierten Zyklon wird die wäßrige Phase wieder abgetrennt und der Versuch wird weitergeführt. Die L-Phe-Lösung wird ebenfalls in die Anlage gefahren. Im weiteren Versuchsverlauf bildete sich aus dem Niederschlag ein hochviskoses Gel. Durch einen Temperaturshift von 30°C auf 50°C läßt sich dieses Gel teilweise wieder in Lösung bringen.

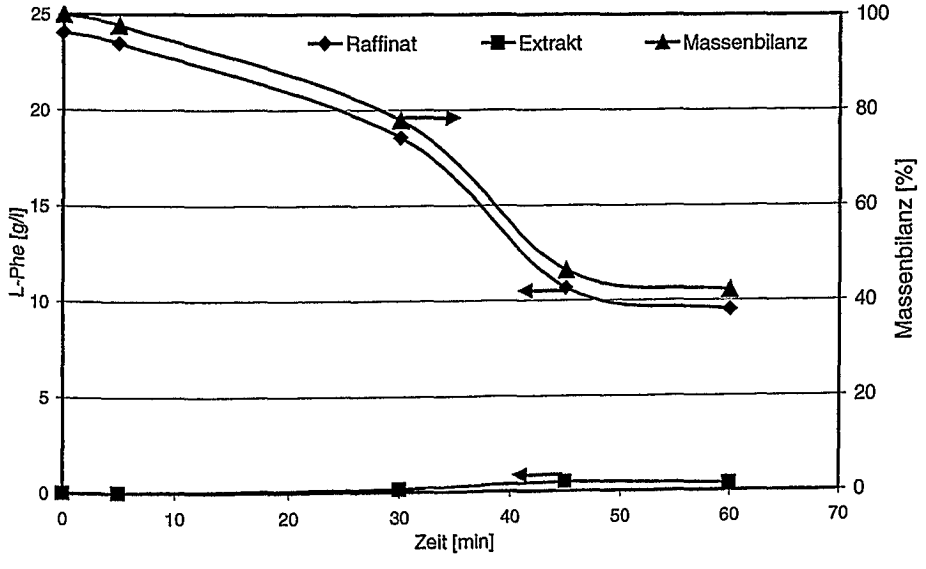


Abb. 5-12: Hohlfaserpertraktion im technischen Maßstab / 10 % D_2EHPA in Kerosin / 2n KOH im Extrakt vorgelegt

Abb. 5-12 zeigt den Verlauf der L-Phenylalanin-Konzentration im Extrakt und Raffinat. In den ersten 40 Minuten wird das L-Phe aus dem Extrakt um 50% extrahiert. Es findet nahezu keine Rückextraktion aus der gelierten organischen Phase statt und die Konzentration an L-Phe in der Akzeptorphase bleibt nahe null. Das Experiment wird nach einer Stunde abgebrochen. Die Bilanzlücke liegt zum Zeitpunkt des Abbruchs bei beinahe 60 %.

Zur Vermeidung der Gelbildung wird die Salzkonzentration reduziert. Der Extrakt besteht in der folgenden Extraktion aus 0,3 molarer NaOH. Alle anderen Versuchsbedingungen werden beibehalten. Der Verlauf der Phenylalaninkonzentrationen und die Masssenbilanz sind in Abb. 5-13 dargestellt. Die Versuchsdauer beträgt vier Stunden. Bis zum Ende der ersten Stunde verläuft das Experiment zufriedenstellend. Aus dem Extrakt werden in der ersten Stunde circa 20 g/l extrahiert. Im Raffinat finden sich jedoch nur 6 g/l wieder, so daß die

Bilanzlücke bereits über 60 % beträgt. Im weiteren Verlauf des Experiments kommt es zu einer starken Eintrübung der organischen Phase. Aufgrund der starken Streuung der Meßwerte wird ab diesem Zeitpunkt auf eine Kurve zur Verknüpfung der Datenpunkte verzichtet.

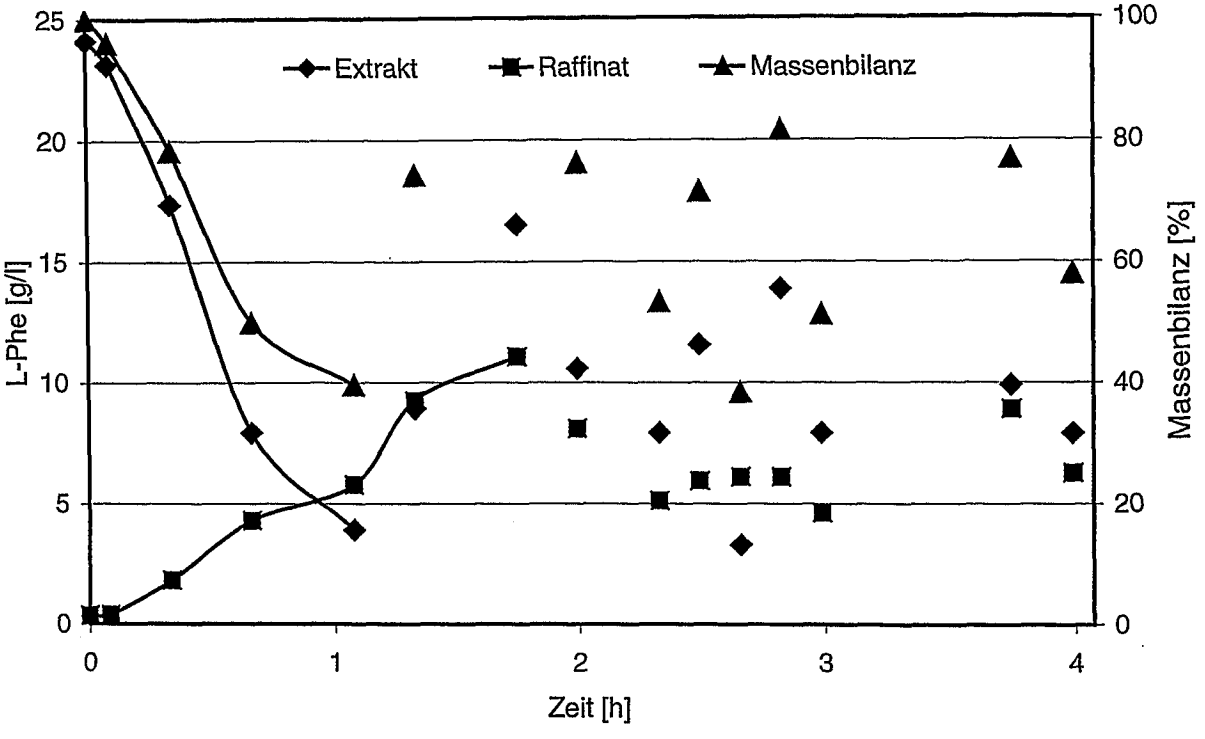


Abb. 5-13: Hohlfaserpertraktion im technischen Maßstab / 10 % D_2EHPA in Kerosin / 0,3n NaOH im Extrakt vorgelegt

Das Experiment wird nach vier Stunden abgebrochen. Die immer wieder auftretenden Eintrübungen und Emulsionsbildungen beim Einsatz basischer Extraktphasen werden im weiteren Verlauf der Arbeit diskutiert. In den folgenden Experimenten werden nur noch saure Extraktphasen zur Rückextraktion eingesetzt, da mit basischen Systemen kein stabiler Betrieb der Anlage möglich ist.

Im folgenden Experiment betragen die Volumenströme der wäßrigen Phasen jeweils 250 l/h und der der organischen Phase 60 l/h. Mit einer organischen Phase aus 10 % D_2EHPA in Kerosin und ein molarer H_2SO_4 im Raffinat wird die Anlage über vier Stunden stabil betrieben. Die Abnahme des Phenylalanin im Raffinat ist in Abb. 5-14 dargestellt. Das Phasenverhältnis zwischen Extrakt und Raffinat beträgt 0,92. Bereits nach zwei Stunden ist der Großteil des vorgelegten L-Phe aus dem Raffinat in den Extrakt übergegangen. Nach einer Beladung der organischen Phase, die mit einer Bilanzlücke von 30 % einhergeht, kann das gesamte L-Phe zum Ende des Experiments rückextrahiert und die Bilanz geschlossen werden. Die im Vergleich zur Startkonzentration im Raffinat geringere Konzentration im Extrakt am Ende des Experiments läßt sich mit dem Phasenverhältniß von 0,92 und der Restkonzentration im Raffinat von 0,8 g/l erklären. Aus dem Anstieg der Konzentration im Extrakt über der Zeit läßt sich nach Integration von Gl. 2-33 der Stoffübergangskoeffizient über die gesamte Anlage berechnen.

Gl. 5-2
$$\beta_{AV} = \frac{V_{aq}}{A_{eff}} \Big/ t \cdot \left(\ln[c_{Phe\,0}] - \ln[c_{Phe\,t}]\right)$$

Für das gezeigte Experiment beträgt β_{AV} 71,1*10^{-7} cm/s. Das entspricht einer Permeabilität von 7,7 g/[m^{2}h].

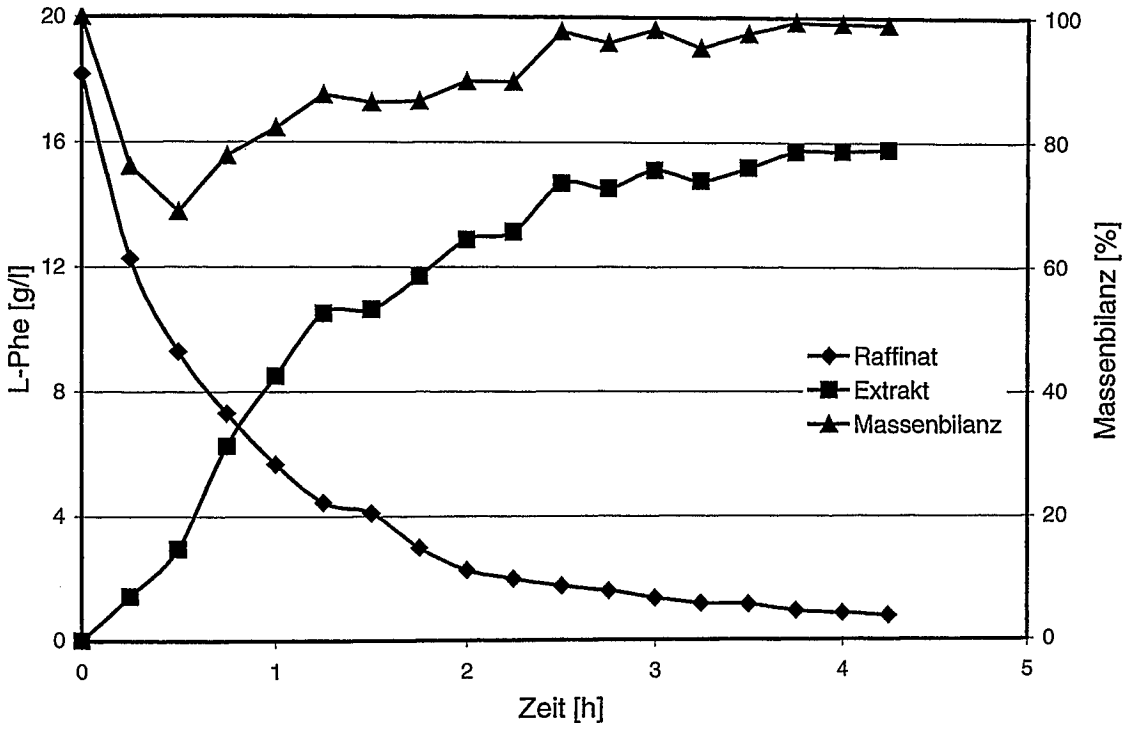


Abb. 5-14: Hohlfaserpertraktion im technischen Maßstab / 10 % D_2EHPA in Kerosin / 1 M H_2SO_4 im Extrakt vorgelegt

In den folgenden Experimenten werden die Konzentrationen an Carrier und Gegenionen und die Volumenströme variiert, mit dem Ziel, die Extraktionsanlage zu charakterisieren. Es wird ein fünf dimensionales Parameterfeld, bestehend aus den drei Volumenströmen der Phasen, der Konzentration an H_2SO_4 im Raffinat und der Menge an eingesetztem D_2EHPA in der organischen Phase untersucht.

5.2.3 Variation der Carrier Konzentration

Der Einfluß des in Kerosin gelösten D_2EHPA-Anteils in der organischen Phase wird mit 10, 20 und 30 %v/v untersucht. Im Extrakt wird 2 M H_2SO_4 vorgelegt. In Abb. 5-15 sind die drei Experimente einander gegenübergestellt. Der besseren Übersicht wegen sind nur jeweils die Akzeptorphasen aufgetragen. Um die einzelnen Verläufe vergleichbar zu machen, wird die normierte Konzentration bezogen auf die vorgelegte Menge an L-Phenylalanin als Parameter gewählt. Die Volumenströme betragen in den wäßrigen Phasen jeweils 250 l/h und in der organischen Phase 156 l/h.

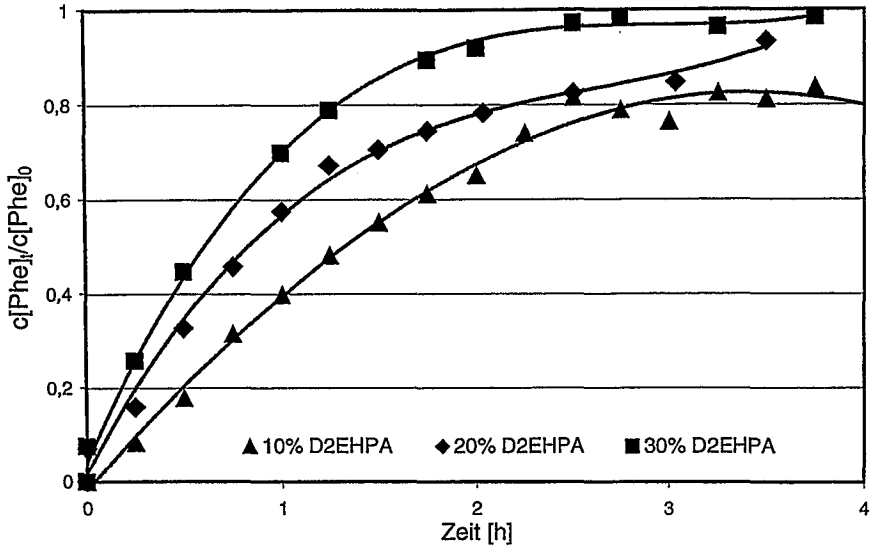


Abb. 5-15: Einfluß der eingesetzten D_2EHPA Menge auf den Stoffübergang (Q_{Ex} = 250 l/h, Re_{Ex} = 11,6; Q_{Raf} = 250 l/h, Re_{Raf} = 11,6; c(H_2SO_4) = 2M

Bei einem Gehalt an D_2EHPA in der organischen Phase von 30 %v/v sind bereits nach einer Stunde Betriebszeit 70 % des vorgelegten L-Phe in das Raffinat übergegangen. Nach der selben Zeit sind mit einem D_2EHPA Anteil von 20 %v/v circa 60 % und mit 10 %v/v D_2EHPA nur etwa 40 % der vorgelegten Aminosäure übergegangen.

5.2.4 Variation der Protonenkonzentration

Die Konzentration an vorgelegtem H_2SO_4 und der zur Verfügung stehenden Gegenionen in Form von Protonen wird mit 1 und 2 molarer Schwefelsäure untersucht.

Bei geringerer Konzentration an H_2SO_4 und Variation der Gehalte an D_2EHPA ergibt sich ein ähnliches Bild wie in Abb. 5-15. In Abb. 5-16 sind die Konzentrationsverläufe für eine Versuchsreihe mit 1M H_2SO_4 im Raffinat gezeigt. Auch in dieser Versuchsreihe ist der Effekt der Carrier Konzentration zu erkennen. Insgesamt sind die Verläufe der Kurven jedoch flacher und die Spreizung der Kurvenschar mit steigenden D_2EHPA Anteil ist nicht so stark. Im Gegensatz zu den Extraktionen mit 2 molarer H_2SO_4 werden 80 % Stoffübergang mit dem höchsten Carrieranteil erst nach zwei Stunden erreicht.

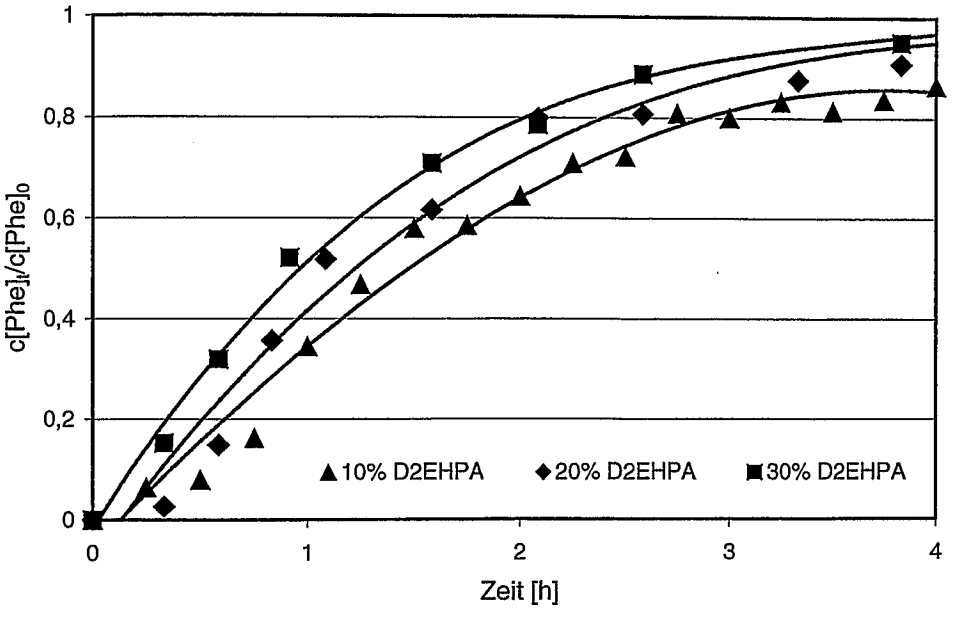


Abb. 5-16: Einfluß der eingesetzten D_2EHPA Menge auf den Stoffübergang (Q_{Ex} = 250 l/h, Re_{Ex} = 11,6; Q_{Raf} = 250 l/h, Re_{Raf} = 11,6; $c(H_2SO_4)$ = 1M

5.2.5 Berechnung der Stoffübergangskoeffizienten

Zum direkten Vergleich der Einflüsse von Carrier- und Protonenkonzentration sind in Abb. 5-17 die Stoffübergangskoeffizienten (Gl. 5-2) β_{AV} über dem D_2EHPA Anteil für die Versuchsreihen mit ein und zwei molarer Schwefelsäure aufgetragen. Der Stoffübergang wird durch die Erhöhung der Schwefelsäurekonzentration um ca. 10 % verbessert. Der Einfluß der Carrierkonzentration liegt allerdings im untersuchten Bereich wesentlich höher als der der Protonenkonzentration. Durch eine Erhöhung des D_2EHPA Anteils von 10 auf 30 %v/v wird der Stoffübergang um etwa 40 % verbessert.

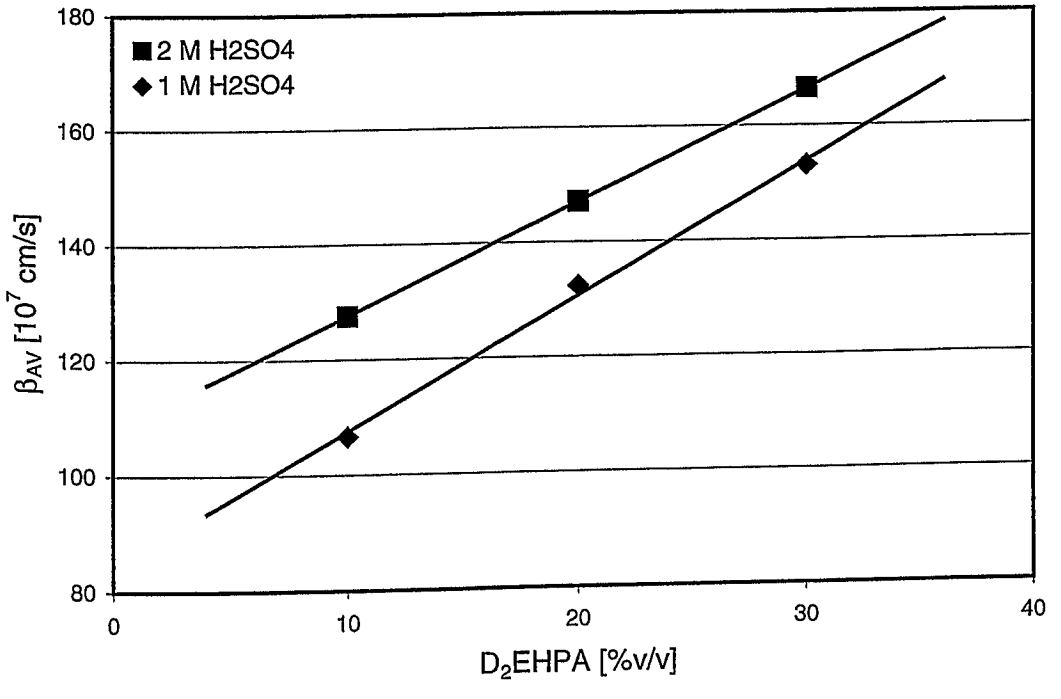


Abb. 5-17: β_{AV} über dem D_2EHPA-Gehalt

5.2.6 Variation der Volumenströme

Neben den verschiedenen Konzentrationen an Protonen und Carrier werden die Effekte der Hydrodynamik auf den Stofftransport in der Hohlfaserextraktionsanlage untersucht. Es werden in getrennten Versuchsreihen die Volumenströme der beiden wäßrigen Phasen und der organischen Phase variiert. Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsreihen wird immer die Änderung der normierten L-Phe-Konzentration im Extrakt als Parameter für den Stoffübergang herangezogen.

5.2.6.1 Raffinat

In Abb. 5-18 ist die Konzentrationsänderung im Extrakt über der Zeit für die drei verschiedenen Volumenströme im Raffinat dargestellt. Alle anderen Parameter sind in den drei Experimenten konstant. Das Raffinat wird mit 500, 250 und 160 l/h durch die Hohlfasern des Extraktionsmoduls gefahren. Die Reynoldszahlen bei diesen Volumenströmen betrugen 7,4 (160 l/h), 11,6 (250 l/h) und 23,2 (500 l/h).

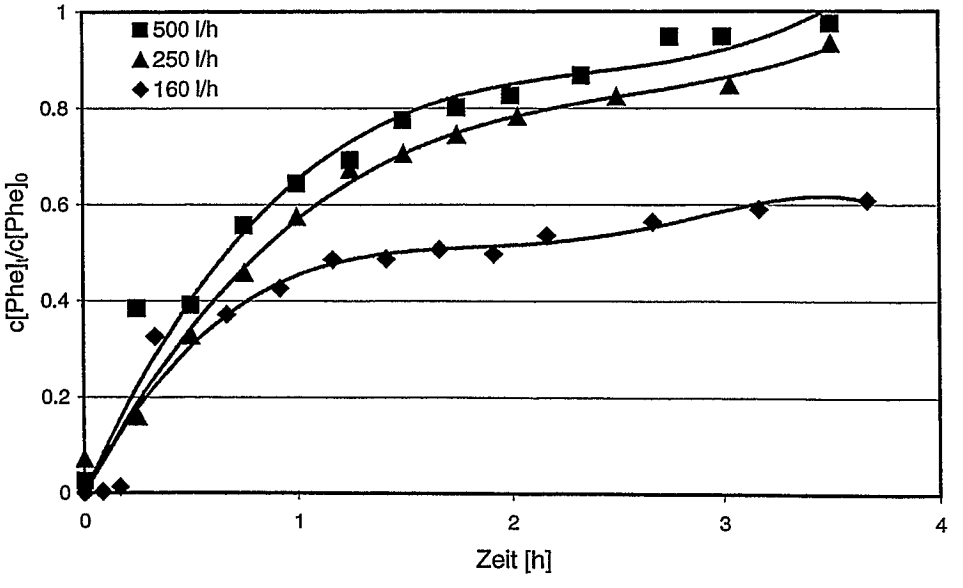


Abb. 5-18: Stoffübergang bei Variation des Volumenstroms der Raffinatphase (Q_{org} = 156 l/h, Re_{org} = 5,7; Q_{Ex} = 250 l/h, Re_{Ex} = 11,6; c(H_2SO_4) = 2 M, 20 %v/v D_2EHPA)

In allen Experimenten liegt immer laminare Strömung vor. Bei einer Reynoldszahl von 7,4 ist nach etwa 2 h Prozeßzeit 50 % des vorgelegten L-Phe in die Akzeptorphase übergegangen. Bei höheren Reynoldszahlen ist der Stoffübergang wesentlich schneller. Bei Re=11,6 sind nach 2 h bereits 80 % der vorgelegten Aminosäure übergegangen. Ein weitere Erhöhung der Reynoldszahl auf 23,3 hat jedoch keinen wesentlichen positiven Effekt auf den Stoffübergang.

5.2.6.2 Membranphase

In der nächsten Versuchsreihe wird der Volumenstrom in der organischen Phase variiert. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften des Membranmaterials ist diese Variation jedoch nur in sehr engen Grenzen möglich. Bei zu hohen Volumenströmen in der Membranphase würde der höhere Druck einen Phasendurchbruch hervorrufen. Für die Volumenströme 60 l/h und 156 l/h in der Membranphase sind in Abb. 5-19 die Konzentrationsverläufe auf Extraktseite dargestellt. Die anderen Versuchsparameter bleiben jeweils konstant. Bei einem Volumenstrom von 60 l/h beträgt die Reynoldszahl 2,2. Bei 156 l/h liegt sie bei 5,7.

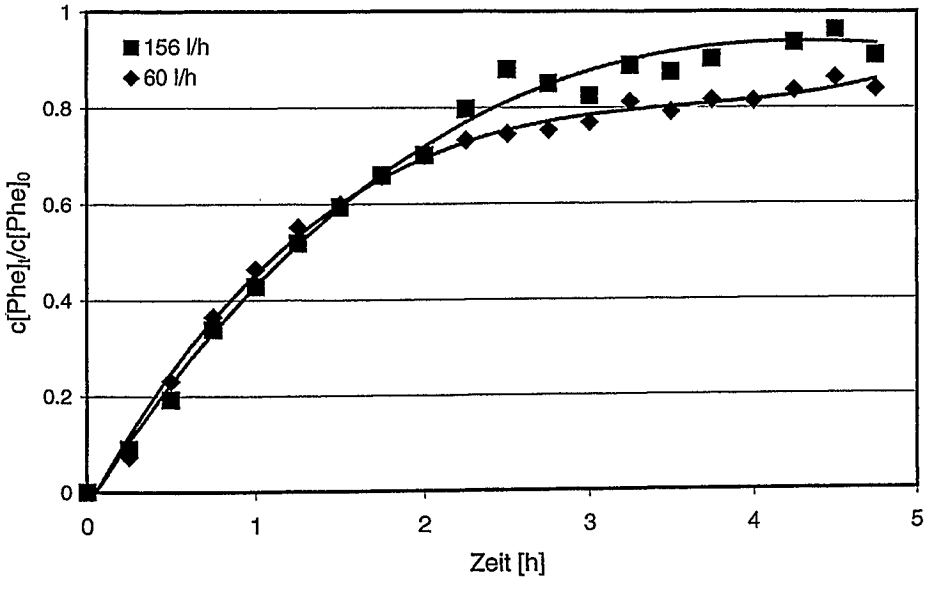


Abb. 5-19: Stoffübergang bei Variation des Volumenstroms der Membranphase (Q_{Ex} = 250 l/h, Re_{Ex} = 11,6; Q_{Raf} = 500 l/h, Re_{Raf} = 23,3; c(H_2SO_4) = 1 M, 10 %v/v D_2EHPA)

Bis zu einer Prozeßzeit von 2 h ist der Stoffübergang für beide Reynoldszahlen gleich. Erst gegen Ende des Experiments weichen die Verlaufskurven der L-Phe-Konzentration leicht voneinander ab. Und für Reynolds = 2,2 ist der Stoffübergang etwas geringer. In der letzten Versuchsreihe zum Einfluß der Volumenströme auf die Extraktionsleistung werden die hydrodynamischen Verhältnisse im Extrakt variiert.

5.2.6.3 Extrakt

In Abb. 5-20 sind die Konzentrationsverläufe für Q = 250 l/h (Re = 11,6); 500 l/h (Re = 23,3) und 680 l/h (Re = 31,5) gezeigt. Für die drei untersuchten Werte der Reynoldszahl ergibt sich kein wesentlicher Unterschied in der Änderung der Konzentration über der Zeit. In allen drei Experimenten sind nach etwa drei Stunden 80 % des vorgelegten L-Phenylalanins übergegangen.

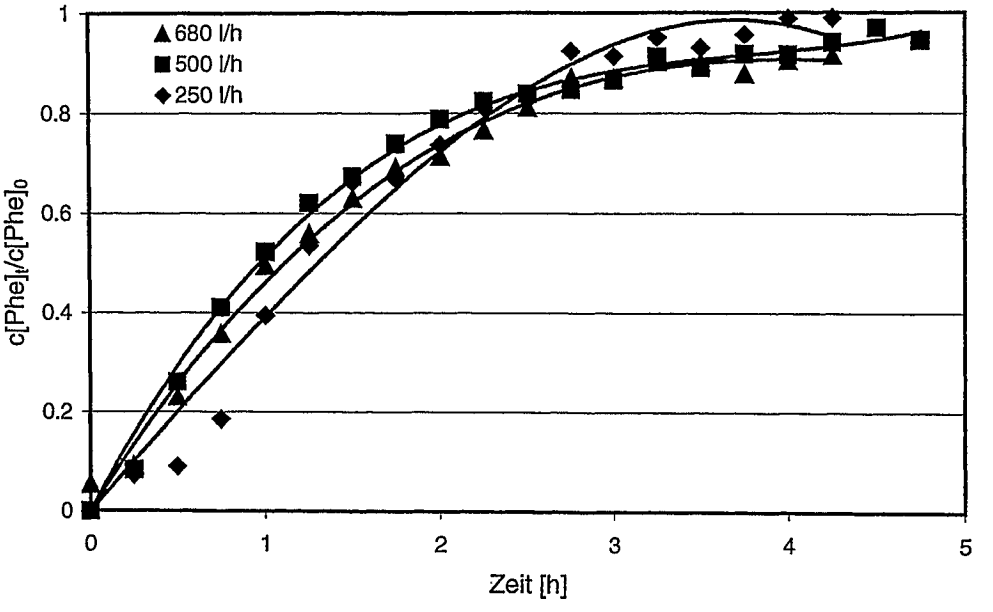


Abb. 5-20: Stoffübergang bei Variation des Volumenstroms der Extraktphase (Q_{Raf} = 250 l/h, Re_{Raf} = 11,6; Q_{org} = 60 l/h, Re_{org} = 2,2; $c(H_2SO_4)$ = 1 M, 10 %v/v D_2EHPA)

Die Ergebnisse zum Einfluß der Volumenströme auf den Stofftransport in den einzelnen Phasen zeigen deutlich, daß der Geschwindigkeit bestimmende Schritt der Stoffübergang vom Raffinat in die organische Phase ist.

5.2.7 Anmerkungen zum Betrieb im Pilotmaßstab

Während des Betriebs der Pilotanlage sind einige Besonderheiten aufgefallen, die kurz in einem eigenen Kapitel aufgegriffen werden sollen.

5.2.7.1 Änderung der Protonenkonzentration durch die Extraktion

Das eingesetzte Extraktionsmittel D_2EHPA arbeitet in der Reaktivextraktion wie ein flüssiger Kationentauscher. Im Raffinat wird H_2SO_4 vorgelegt, so daß als Gegenionen zum L-Phe Protonen über die organische Membran in den Extrakt transportiert werden. Die Veränderung der Protonenkonzentration läßt sich über den pH-Wert leicht messen. In einem Ionentauscherprozeß mit einer Stöchiometrie von eins sollte die Abnahme an L-Phe im Extrakt der Zunahme an Protonen entsprechen. Diese Annahme gilt jedoch nur in nicht gepufferten Systemen und trifft im gezeigten pH Bereich nur sehr bedingt zu. In Abb. 5-21 sind die Konzentrationsverläufe der beiden Reaktionsteilnehmer im Raffinat einer Extraktion in der Pilotanlage gegeneinander aufgetragen. Es ist zu beachten, daß die Ordinate um Faktor hundert gegenüber der Abszisse überhöht ist.

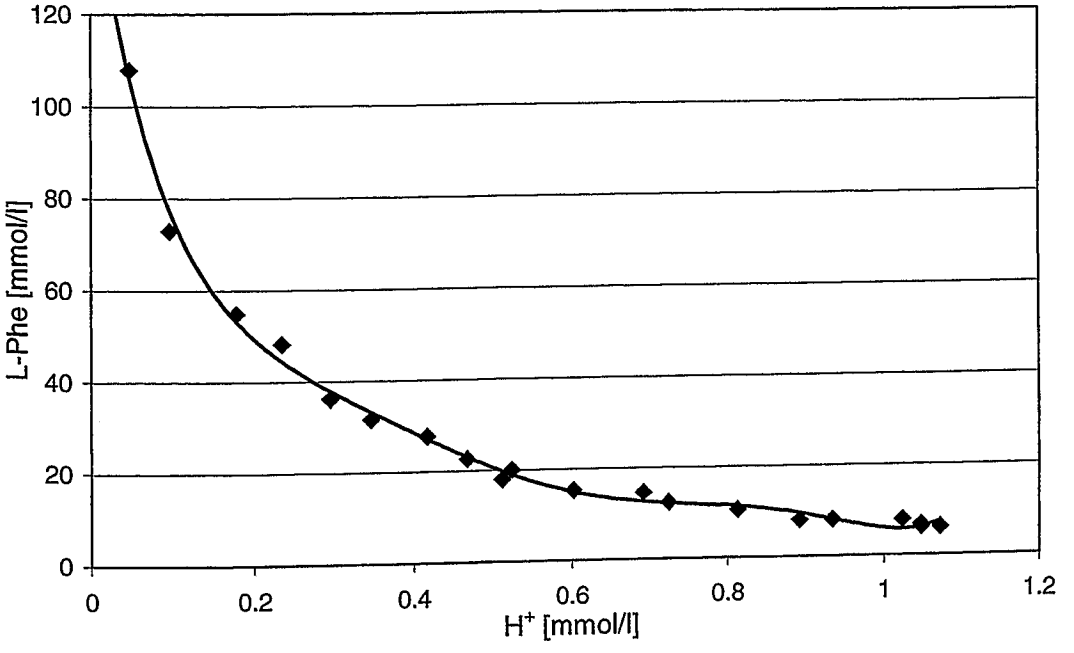


Abb. 5-21: Verlauf der L-Phe und Protonenkonzentration im Raffinat, die Änderung der Protonenkonzentration entspricht einer pH-Wert-Änderung von 4,3 auf 3

Der Konzentrationsverlauf bietet ein sehr unerwartetes Bild. Falls das L-Phe als Kation extrahiert würde, sollte die Abhängigkeit zwischen extrahierter Aminosäure und übergegangenem H^+ linear und in derselben Größenordnung sein. Abb. 5-21 zeigt jedoch, daß die Konzentrationen der beiden Reaktionsteilnehmer keine lineare Abhängigkeit aufweisen und gänzlich voneinander unabhängig verlaufen.

5.2.7.2 Carrierverluste im technischen Betrieb

Während Extraktionen im technischen Betrieb werden Proben aus der organischen Phase gezogen und mit ^{31}P-NMR der Phosphatgehalt gemessen. Über die Molmasse wird dann der D_2EHPA Verlust aus der organischen Phase berechnet. Diese Ergebnisse werden mit den Volumina der wäßrigen Phasen korreliert, um so den Verlust an D_2EHPA, bezogen auf

Raffinat- und Extraktvolumina, zu berechnen. In Abb. 5-22 ist der D_2EHPA Verlust für einen Carrieranteil von 10 %v/v (entspr. 0,3 mol/l) in Kerosin über die Prozeßzeit aufgetragen. Während des fünfstündigen Experiments lag der Verlust an D_2EHPA aus der organischen Phase bei durchschnittlich 17 mg/l Wasserphase. Ein Vergleich mit Literaturdaten ist in Abb. 5-23 gezeigt.

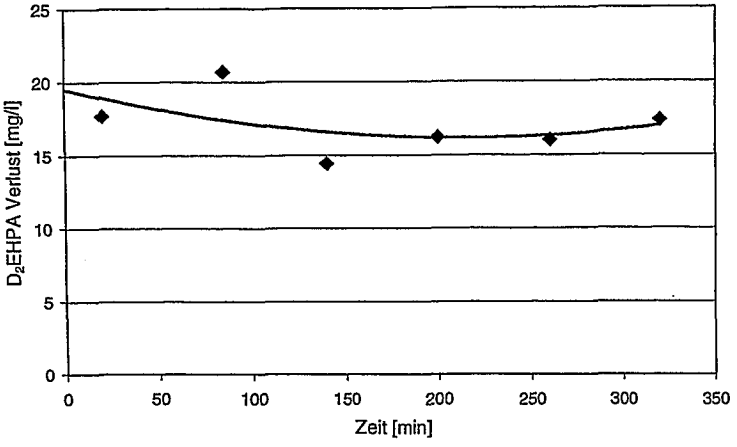


Abb. 5-22: Verlust von D_2EHPA in mg/l bezogen auf die wäßrigen Phasen

Die Löslichkeiten von D_2EHPA in Wasser in Abhängigkeit des pH-Werts und des vorgelegten Gehalts an D_2EHPA in der organischen Phase sind in Abb. 5-23 aufgetragen. Die Daten für pH 8,4 sind nicht alle dargestellt, da diese den Maßstab unnötig verzerren würden. Aufgrund der Dissoziation des D_2EHPA ist im basischen pH Bereich die Löslichkeit des Carriers wesentlich größer als im neutralen pH Bereich. Zum Vergleich ist der Mittelwert aus den untersuchten Extraktionen bei pH 6,8 mit aufgetragen.

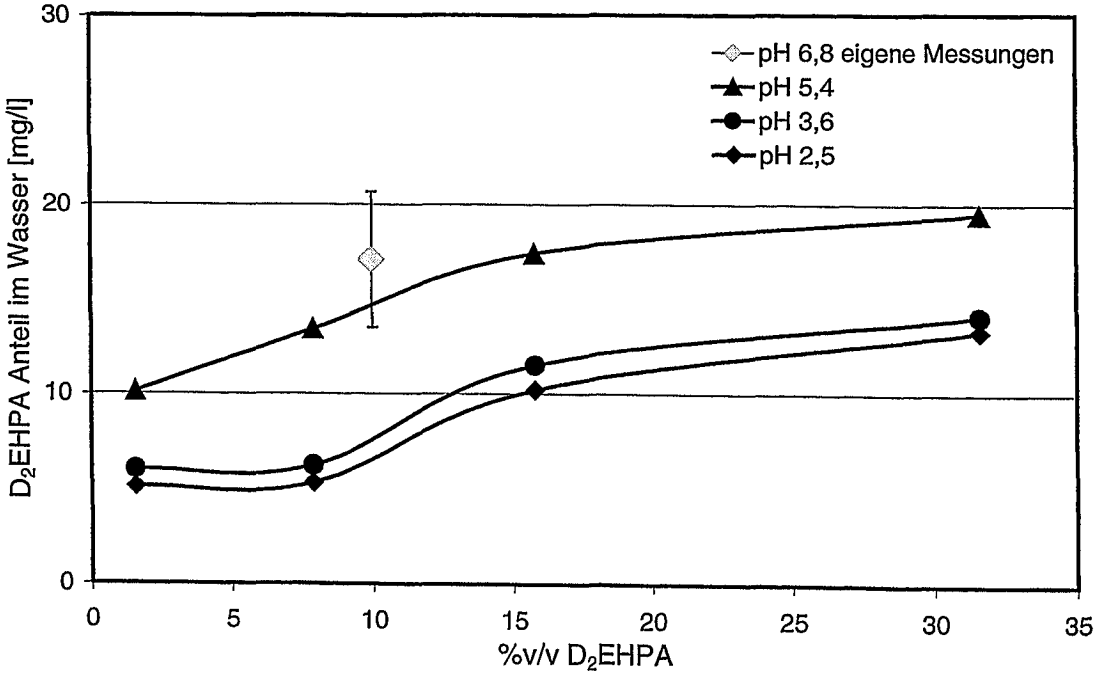


Abb. 5-23: wäßrige Löslichkeit von D_2EHPA nach Bulowsky et al., 1992[128]

Mit einer Erhöhung des D_2EHPA Anteils von 2 auf 30 %v/v geht eine erhebliche Steigerung des D_2EHPA Übergangs in die wäßrige Phase einher. Jedoch liegt auch der höchste Wert von 20 mg/l in einem sehr niedrigen Bereich. Im Gegensatz dazu steht die Löslichkeit von

reinem D_2EHPA bei Kontakt mit Wasser von 1,2 g/l. Dieser hohe Wert ist allerdings nicht von technischer Relevanz, da die Extraktionsmittel immer verdünnt eingesetzt werden. Für eine Vorauswahl von Extraktionsmitteln im Bezug auf die Biokompatibilität (s. Kap. 5.4.1) sollte jedoch mit dieser Konzentration gearbeitet werden, um eine höchstmögliche Prozeßsicherheit zu gewährleisten.

5.2.7.3 Druckverlust im Hohlfasermodul

Der Druckverlust während der Extraktion in den Hohlfasern ist in Abb. 5-24 über der Reynoldszahl aufgetragen. Nach Hagen-Poisseuille läßt sich aus der Reynoldszahl der Druckverlust für laminare Rohrströmung abschätzen (vergl. Gl. 2-7). Die so berechneten Werte sind ebenfalls aufgetragen.

Die gemessenen Werte weichen im Bereich höherer Reynoldszahlen stark von den berechneten Werten ab. Des weiteren verläuft der Anstieg des Druckverlustes bei den experimentell bestimmten Werten exponentiell, während er nach Hagen-Poisseuille linear verläuft.

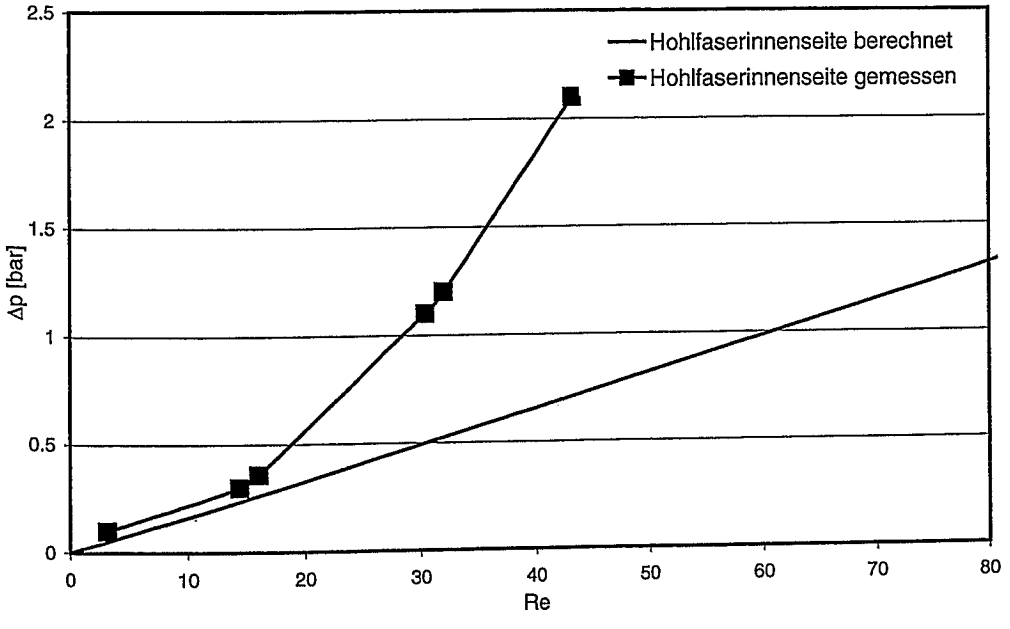


Abb. 5-24: berechneter und gemessener Druckverlust in den Hohlfasern

5.2.8 Aufkonzentrierung

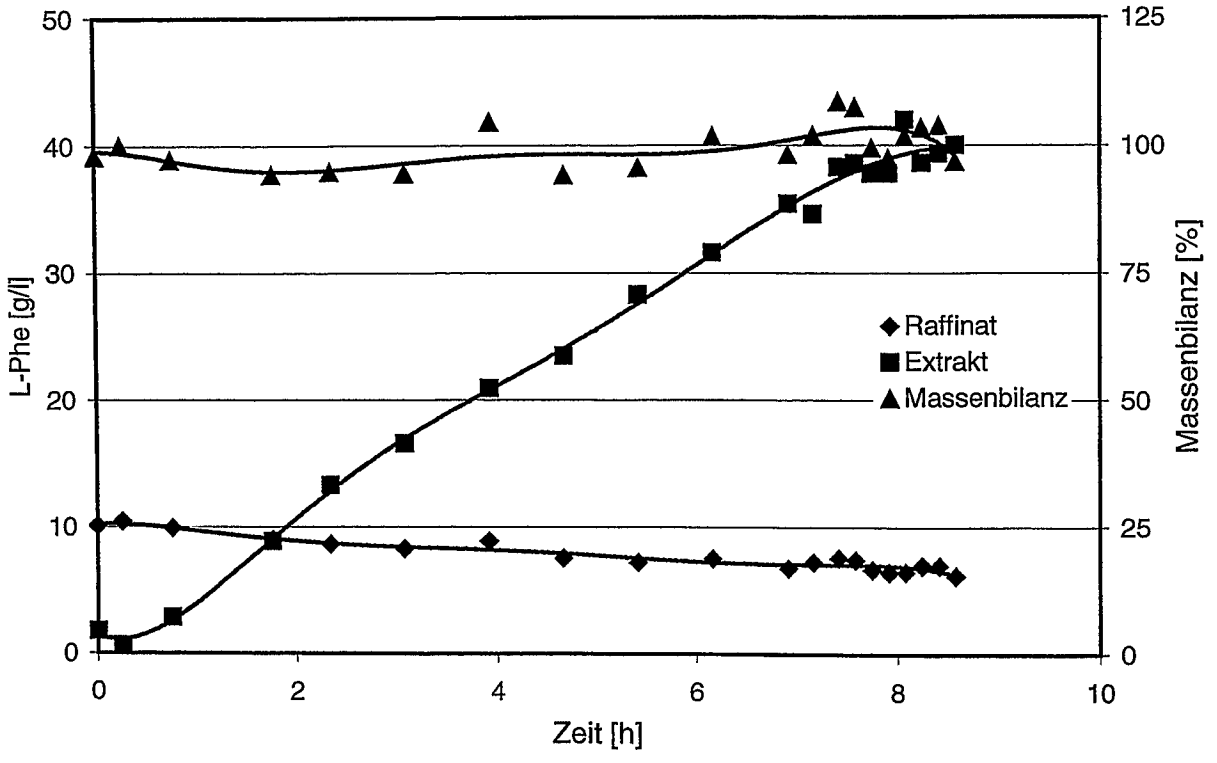


Abb. 5-25: Aufkonzentrierung von wäßriger L-Phe Lösung, $V_{R/E}$ = 10 (Raffinat V = 80 l, Q = 250 l/h / Membran V = 5 l, Q = 156 l/h / Extrakt V =8 l, Q = 500 l/h)

Ein wesentlicher Vorteil der Reaktivextraktion ist die Aufkonzentrierung des Produkts simultan zur Abtrennung. Ob mit dem gewählten Stoffsystem D_2EHPA und H_2SO_4 eine Aufkonzentrierung möglich ist, sollte anhand einer Versuchsreihe mit Phasenverhältnissen zwischen Raffinat und Extrakt von ungleich eins untersucht werden.

In 80 l wäßriger Modelllösung werden 10 g/l L-Phe vorgelegt. Nach etwa 8 Stunden sind aus diesem Raffinat 4 g/l, also insgesamt 360 g L-Phe abgetrennt worden. Im Extrakt mit einem Volumen von 8 Litern können die abgetrennten 4 g/l auf einen Wert von 40 g/l um Faktor 10 aufkonzentriert werden. Die Massenbilanz ist geschlossen.

5.2.8.1 Extraktion von Fermentationspermeat

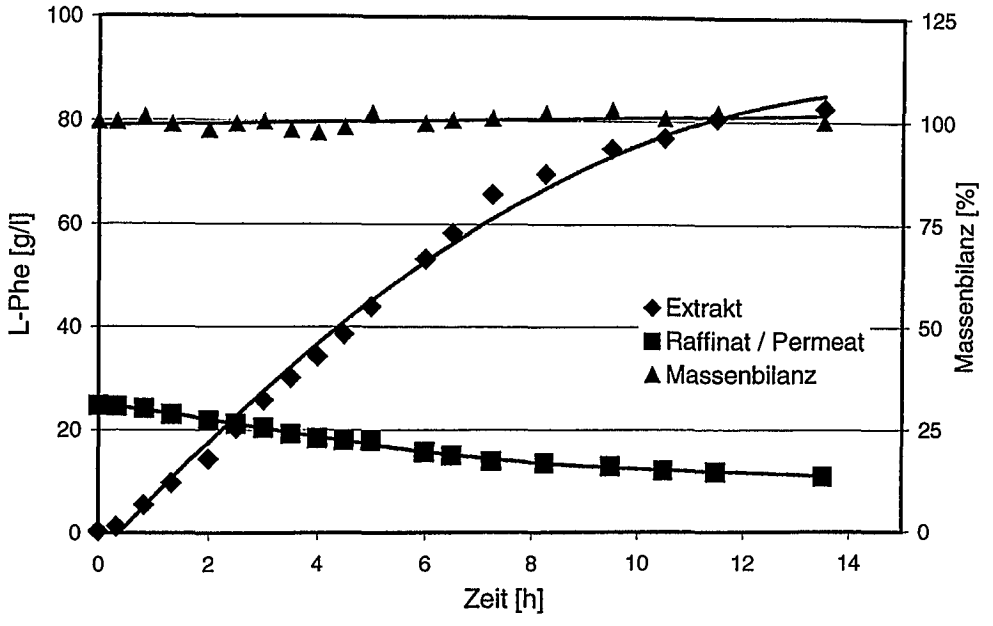


Abb. 5-26: Aufkonzentrierung von Fermentationspermeat, PV = 6 (Raffinat V = 42 l, Q = 250 l/h / Membran V = 5 l, Q = 156 l/h / Extrakt V = 7 l, Q =500 l/h)

Die Extraktion von Fermentationspermeat aus *E.coli* Fermentationen als Raffinatphase wird mit einem Phasenverhältnis PV von 6 durchgeführt. Der Verlauf der Konzentrationen in den wäßrigen Phasen und die Massenbilanz ist in Abb. 5-26 gezeigt.

Die Startkonzentration im Permeat liegt bei etwa 25 g/l L-Phe. Nach ca. 13,5 h sind 14 g/l aus dem Permeat in den Extrakt übergegangen. Bei einem Volumen von 42 l entspricht das einer Gesamtmenge von 588 g L-Phenylalanin. Die extrahierte Aminosäure kann im Extrakt auf 84 g/l aufkonzentriert werden. Die in diesem Experiment erreichte Permeabilität liegt bei etwa 10 g/m²h.

5.2.9 Selektivität der Extraktion

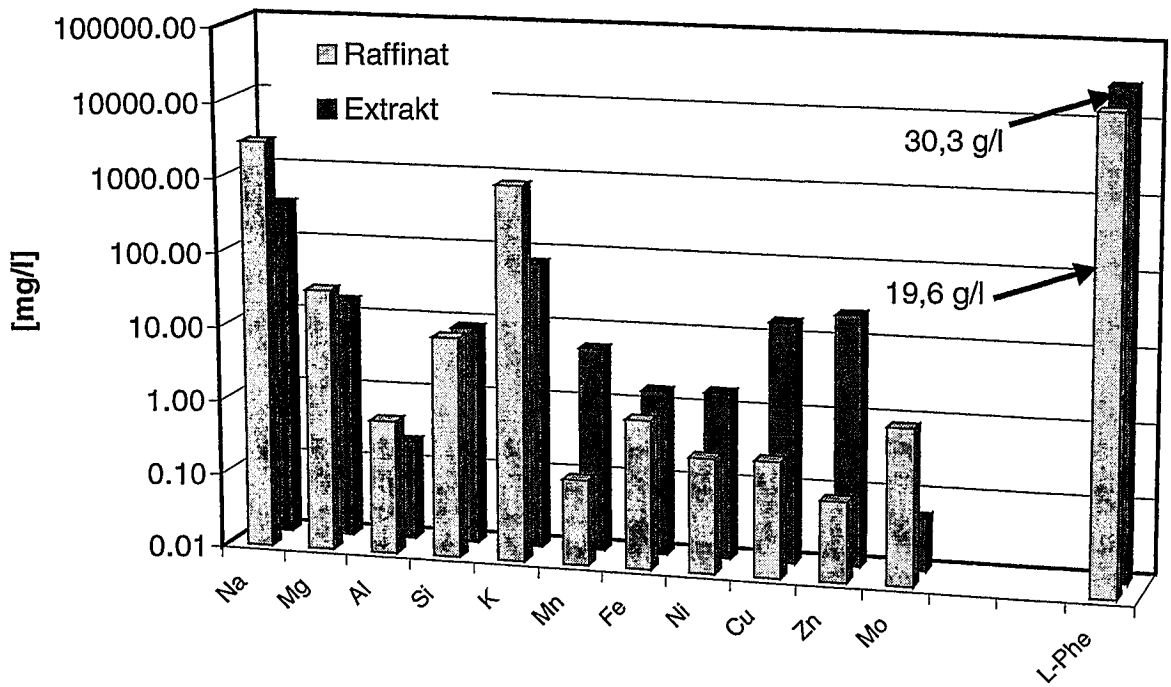


Abb. 5-27: Konzentration der gemessenen Ionen im Raffinat vor der Extraktion und im Extrakt nach der Extraktion (aufgrund der erheblichen Konzentrationsunterschiede wurde eine logarithmische Skalierung gewählt)

Die Selektivität der Extraktion wird durch Elementaranalysen der Kationen im Raffinat am Ende der Extraktion von Fermentationspermeat bestimmt. In der Akzeptorphase finden sich die in Abb. 5-27 gezeigten Anteile an Kationen. Während das vorgelegte L-Phe auf 150 % aufkonzentriert werden kann, liegt die Konzentration der untersuchten anorganischen Kationen unter denen im Raffinat. Bezogen auf die Summe aller gemessenen Kationen im vorgelegten Raffinat, beträgt der L-Phe-Anteil im Extrakt 97 % der extrahierten Kationen. Die Selektivität der Extraktion hängt jedoch erheblich von der Zusammensetzung des verwendeten Raffinats ab.

5.2.10 Präzipitation

Die Präzipitation des L-Phe im Becherglas durch pH-Verschiebung führt zu drastischem Ausfallen der Aminosäure. Dabei wird soviel Produkt mitgerissen, daß eine Abreicherung bis weit unter die Löslichkeitsgrenze möglich ist. Nach Präzipitation bleibt ein Restgehalt an Phenylalanin von 5 g/l in der Mutterlauge zurück.

Aus dem Extrakt wird nach Ende der Extraktion das L-Phenylalanin in der in Abb. 4-11 beschriebenen Anlage präzipitiert. Mit NaOH wird der pH-Wert der Lösung in Richtung des isoelektrischen Punktes der Aminosäure verschoben. Der so erhaltene Kristallbrei wird dann abfiltriert. Das Restwasser wird in einer Gefriertrocknungsanlage abgezogen. Die Analyse des Feststoffs ergibt einen Gehalt von 98 g L-Phe/100g und einen Kristallwasseranteil von 1,5 %.

Nach Elementaranalysen auf Anionen und Kationen und HPLC Messungen für organische Säuren und Aminosäuren kann die Reinheit der vorliegenden Kristalle angegeben werden. Der vorliegende Feststoff besteht zu 98 % aus L-Phenylalanin-hydrogensulfat. Der Feststoff hat einen Kristallwasseranteil von 1,5 %.

Zur Bestimmung der organischen Verunreinigungen wird eine GC-MS Übersichtsanlayse durchgeführt. Dabei konnten folgende Verbindungen gemessen werden:

2,3-Butandiol	2 – 20 mg/l
Benzaldehyd	0,1 – 1 mg/l
Phenylethanol	0,1 – 1 mg/l
Phenylacetaldehyd	0,1 – 1 mg/l
Dimethylpyrazin	0,1 – 1 mg/l
Trimethylpyrazin	0,5 – 5 mg/l
Tetramethylpyrazin	1 – 10 mg/l
Trimethylpropylpyrazin	0,1 – 1 mg/l
2-Benzyl-3,5,6-trimethylpyrazin	0,1 – 1 mg/l
weitere Stickstoffhaltige Verbindungen	0,1 – 1 mg/l
Dioctylphtalat	0,5 – 5 mg/l

Aus der Summe der gemessenen Analyte ergibt sich eine Verunreinigung des Produkts durch organische Substanzen von 4,7 mg/kg bis 47 mg/kg. Die Verunreinigungen stammen vermutlich zum einen aus dem verwendeten Kerosin, zum anderen könnte es sich bei einigen jedoch auch um Fermentationsprodukte handeln[129].

Es kann demnach mit einer einfachen Präzipitation des Extrakts eine Produktreinheit von > 99 % erreicht werden.

5.3 Untersuchungen zur Stofftransportlimitierung

Zur Untersuchung der Stofftransportlimitierung werden sowohl Experimente im Labormaßstab als auch in der Pilotanlage herangezogen. Die Untersuchungen im Labormaßstab erfolgen in einer Rührzelle nach Nitsch, die sich erheblich von den in Kapitel (5.1 bis 5.1.6) verwendeten Rührzellen unterscheidet (s. Kap.4.5).

5.3.1 Berechnung der Stoffübergangskoeffizienten

Für die Extraktionen in Rührzellen und die hohlfasergestützten Extraktionen werden die Stoffübergangskoeffizienten ermittelt, um Zusammenhänge zwischen der Hydrodynamik und dem Stoffübergang feststellen zu können. Die Berechnung des Stoffübergangskoeffizienten β erfolgt nach Gl. 2-34.

5.3.2 Kinetische Messungen in der Rührzelle

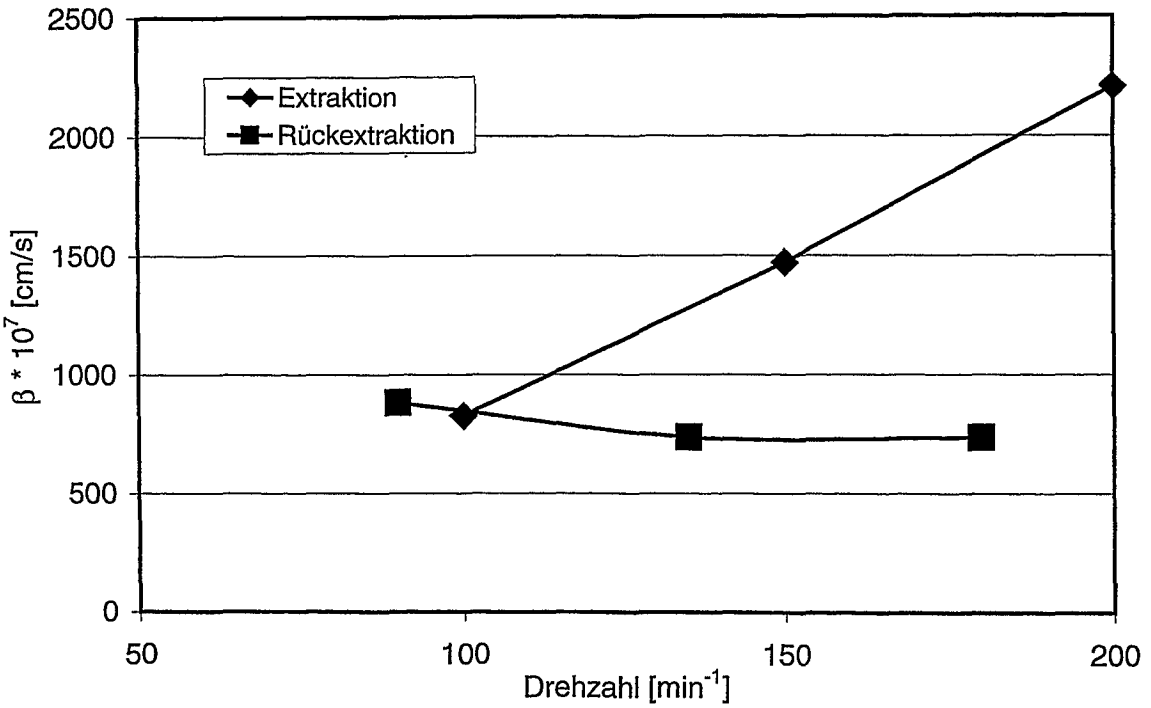


Abb. 5-28: Drehzahlabhängigkeit der Extraktionen in der Rührzelle

Die kinetischen Messungen in der Rührzelle nach Nitsch (Kap. 4.5) ergeben für den Stoffübergangskoeffizienten in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl die in Abb. 5-28 gezeigten Ergebnisse. Die Versuchbedingungen sind in Tabelle 10 zusammengefaßt. Bei diesen Experimenten herrscht in beiden Phasen immer laminare Strömung, so daß es zu keiner Zeit zum Ablösen von Tröpfchen an der Phasengrenzfläche kommt.

Für die Extraktion ist in einem Drehzahlbereich von 100 min^{-1} bis 200 min^{-1} eine deutliche Abhängigkeit von der Hydrodynamik zu erkennen. Hier liegt eindeutig eine Transportlimitierung vor. Bei der Rückextraktion hat die Variation der Rührerdrehzahl keinen Einfluß auf den Stoffübergang. Im gewählten Konzentrationsbereich liegt demzufolge Reaktionslimitierung vor.

5.3.3 Kinetik der Hohlfaserextraktion

Für die Extraktionen im Hohlfasermodul läßt sich ebenfalls der Stoffübergangskoeffizient berechnen. Aus der Konzentrationsänderung im Vorlagegefäß über der Zeit läßt sich β_{av} gemäß Gl. 2-34 berechnen. Bei der Berechnung muß die tatsächliche Kontaktfläche berücksichtigt werden, die sich aus der Porosität der Membran und der gesamt Fläche zu

7,4 m² ergibt. Der Einfluß der Hydrodynamik in den einzelnen Phasen auf den Stoffübergang wird deutlich, wenn man β_{av} über der Reynoldszahl aufträgt.

In Abb. 5-29 sind die Stoffübergangskoeffizienten in Abhängigkeit der Reynoldszahl in jeweils einer Phase aufgetragen. Dabei wurden die Bedingungen in den jeweiligen beiden anderen Phasen konstant gehalten, so daß nur die Hydrodynamik in der betrachteten Phase Einfluß auf den Stoffübergang hat. Die Reynoldszahlen der anderen Phasen sind jeweils an den Graphen eingetragen. Abb. 5-29 zeigt deutlich, daß der Stoffübergang bei Reynoldszahlen unter 10 vom Strömungsverhalten in der Raffinatphase abhängt. Ab Reynoldszahlen größer 10 scheint die Hydrodynamik im Raffinat keinen Einfluß mehr auf β_{av} zu haben. In der Membranphase und der Extraktphase hat die Hydrodynamik im untersuchten Bereich keinen Einfluß auf den Stoffübergang, da hier für die untersuchten Reynoldszahlen nahezu konstante Werte für β_{av} vorliegen. Auffällig ist jedoch der um eine Größenordnung niedrigere Stoffübergangskoeffizient im Vergleich zu den Extraktionen in der Rührzelle.

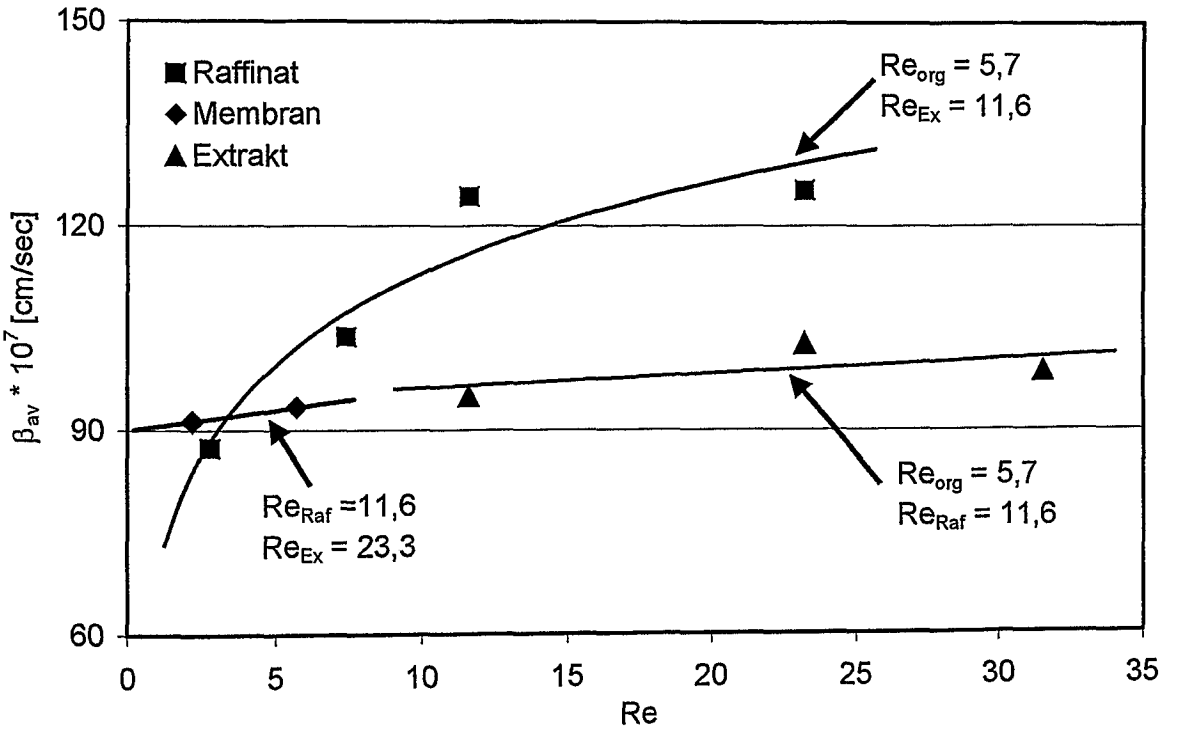


Abb. 5-29: Einfluß der Hydrodynamik in den Phasen auf den Gesamtstoffübergang

Aufbauend auf Gl. 2-44 und den Daten in Tabelle 4 läßt sich der Stoffübergang mathematisch mit dimensionslosen Kennzahlen beschreiben. Eine Gleichung der Art: $Sh = a\,Re^b \cdot Sc^c$; sollte nach Cardoso et al.[94] für die Reaktivextraktion in Hohlfasermodulen gelten. Die Ergebnisse aus Abb. 5-28 und Abb. 5-29 zeigen jedoch, daß diese Abhängigkeit nur im Raffinat gilt und somit hier der limitierende Schritt für den Stoffübergang liegt. Für die Sherwoodzahl kann bei einem Carrieranteil von 10 % in der organischen Phase und 1 M H_2SO_4 im Extrakt die Beziehung

$$Sh = 0{,}027\,Re^{0{,}15} \cdot Sc^{0{,}33}$$

gefunden werden. In Abb. 5-30 ist der Verlauf von Sh über Re für zwei verschiedene Carrier- und Protonenkonzentrationen gezeigt. Bei einem Carrieranteil von 20 % in der organischen Phase und 2 M H_2SO_4 im Extrakt gilt:

$$Sh = 0{,}035\,Re^{0{,}15} \cdot Sc^{0{,}33}.$$

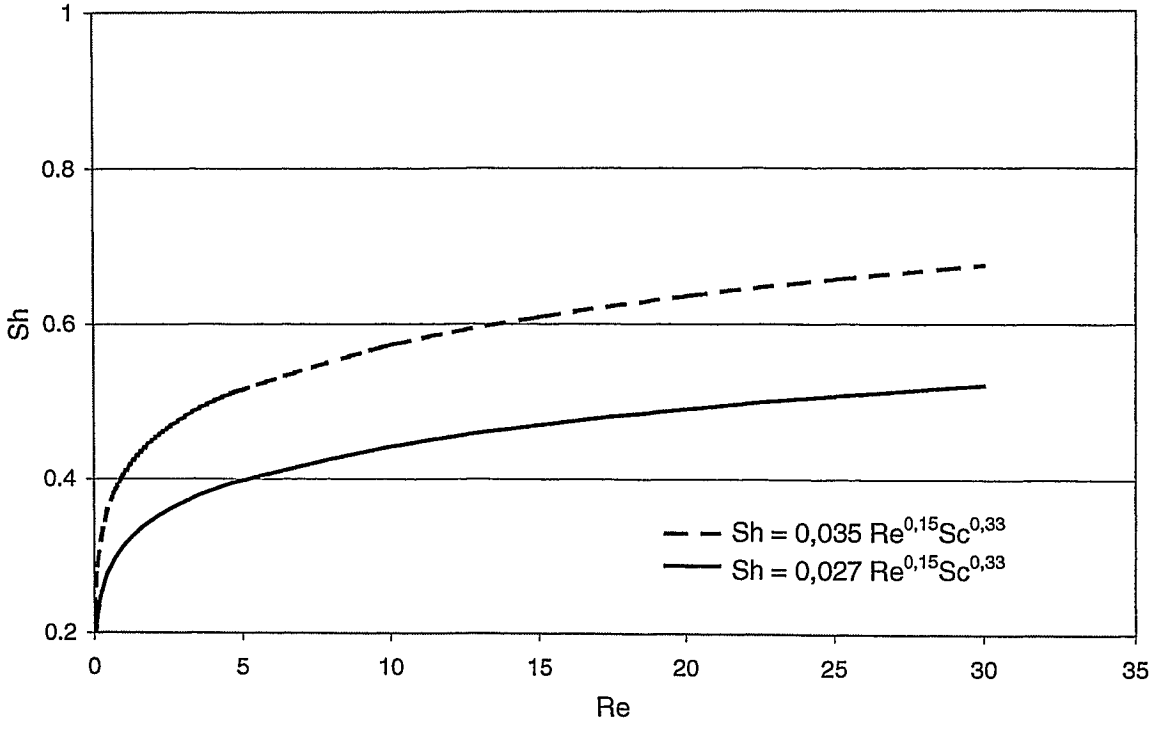


Abb. 5-30: Sh als Funktion von Re und Sc (Sc = const. = 1675)

Da die Sherwoodzahl direkt vom Stoffübergangskoeffizienten β_{av} abhängt, ist ein Vergleich mit den experimentellen Ergebnissen leicht möglich.

$$Sh = \frac{\beta_{av} \cdot d_i}{D}$$

Dabei ist d_i der Durchmesser der Hohlfaser (240 µm) und D der Diffusionskoeffizient des L-Phe in Wasser ($3{,}58 * 10^{-4}$ cm²/min).[130] In Abb. 5-31 sind die Stoffübergangskoeffizienten über der Reynoldszahl aufgetragen. Es sind Daten für verschiedene Konzentrationen an Carrier und an Gegenionen dargestellt. Die Linien bezeichnen die aus der Simulation der Sherwoodzahl berechneten Stoffübergangskoeffizienten, während die Symbole Meßwerte darstellen.

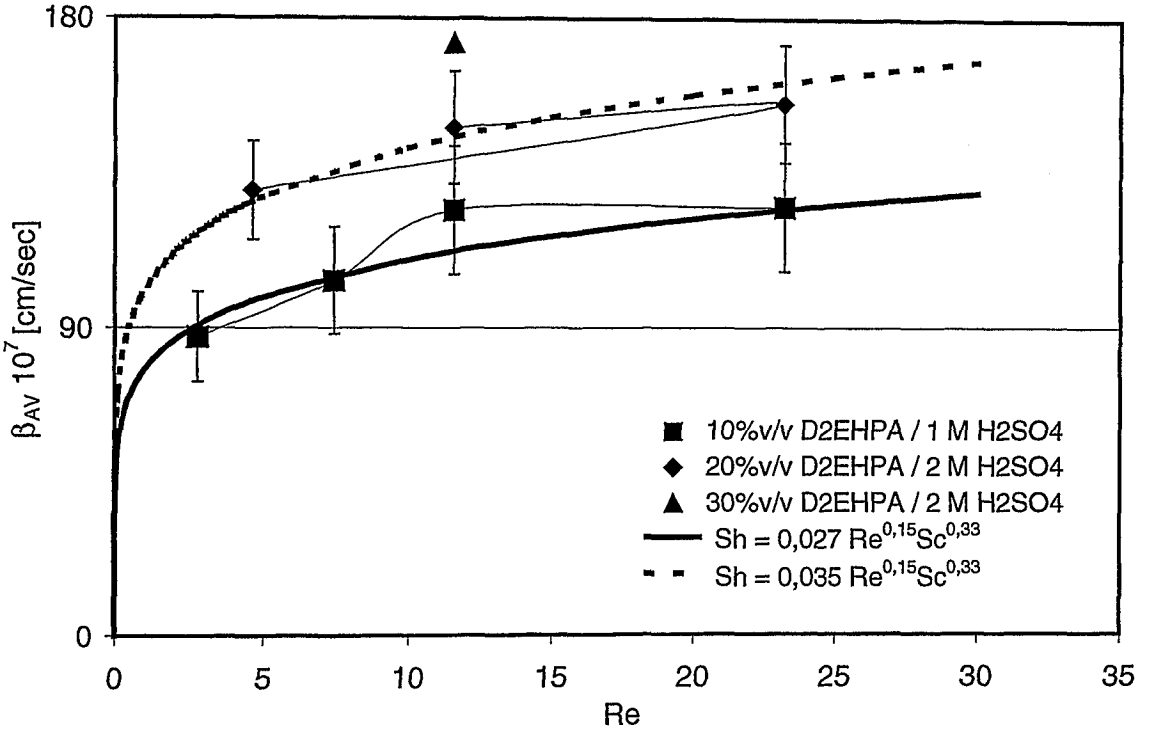


Abb. 5-31: Vergleich gemessener und berechneter Stoffübergangskoeffizienten im Hohlfaserinneren der Raffinatseite

Der Vergleich von Meßwerten und simulierten Daten zeigt eine gute Übereinstimmung. Die deutliche Abhängigkeit des Stoffübergangs von der Reynoldszahl im unteren Bereich ist in Abb. 5-31 zu erkennen. Mit steigender Reynoldszahl wird diese Abhängigkeit jedoch immer geringer. Anhand der Daten für höherer Gegenionen- und Carrierkonzentrationen zeigt sich die Konzentrationsabhängigkeit des Stoffübergangs.

5.4 Biologische Untersuchungen

Bei Einsatz einer integrierten Produktabtrennung kommt es durch die Rückführung des Raffinats in den Fermenter zu Wechselwirkungen zwischen dem Aufarbeitungs- und dem Fermentationsprozeß. Diese Wechselwirkungen bestehen im wesentlichen im Eintrag potentiell toxischer Substanzen in Form der Extraktionsmittel aus der organischen Phase. Um toxische Effekte von Seiten des Verdünnungsmittels auszuschließen werden Vorversuche mit Kerosin durchgeführt. Die Zugabe von Kerosin in laufende Fermentationen zeigte zu keiner Zeit negative Effekte auf Wachstum oder Produktivtität.

Die Toxine können den Prozeß maßgeblich stören oder sogar zum Erliegen bringen. Im folgenden wird daher die Biokompatibilität der eingesetzten Carriersysteme untersucht.

5.4.1 Fed-Batch Fermentationen in pH geregelten Schüttelkolben

Die Experimente zur Untersuchung der Biokompatibilität werden in pH geregelten Schüttelkolben durchgeführt. Es werden die Carrier D_2EHPA, DNNSA, Aliquat 336 und Alamin 308 auf ihre Toxizität gegenüber *E. coli* getestet. Nach 5 Stunden Fermentationsdauer werden jeweils 1,2 g/l Carrier in fed batch Prozessen dazugegeben. Diese Menge entspricht in etwa der Löslichkeit der reinen Carrier (100 %) in Wasser. In Abb. 5-32 ist der Verlauf der optischen Dichte über der Zeit dargestellt.

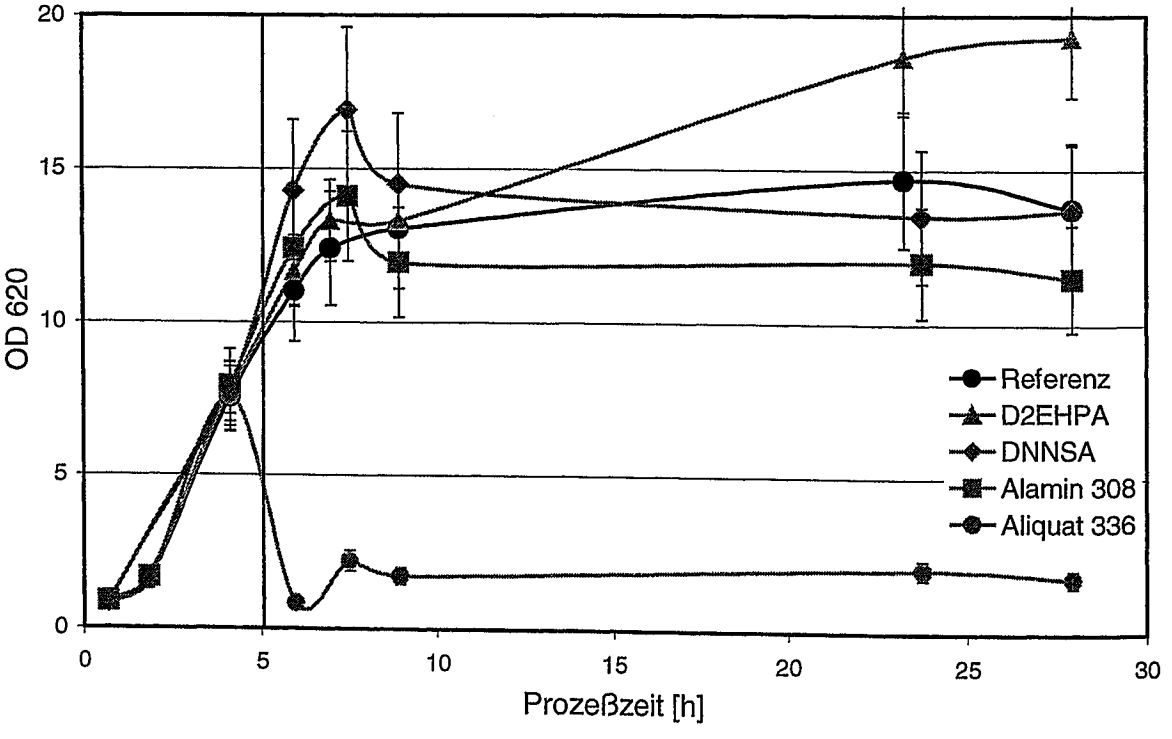


Abb. 5-32: Verlauf der optischen Dichte (Lösungsmittelpulse bei t = 5h)

Wie in Abb. 5-32 zu sehen ist, erreicht die Referenzkurve eine optische Dichte von 15. Die toxische Wirkung auf das Wachstum zeigt sich nur bei der Zugabe von Aliquat 336 deutlich. Hier wird das Wachstum nach dem Puls sofort eingestellt. Die Pulse D_2EHPA verbessern das Wachstum um ca. 25%. Durch die Zugabe von DNNSA und Alamin 308 wird das Wachstum geringfügig reduziert.

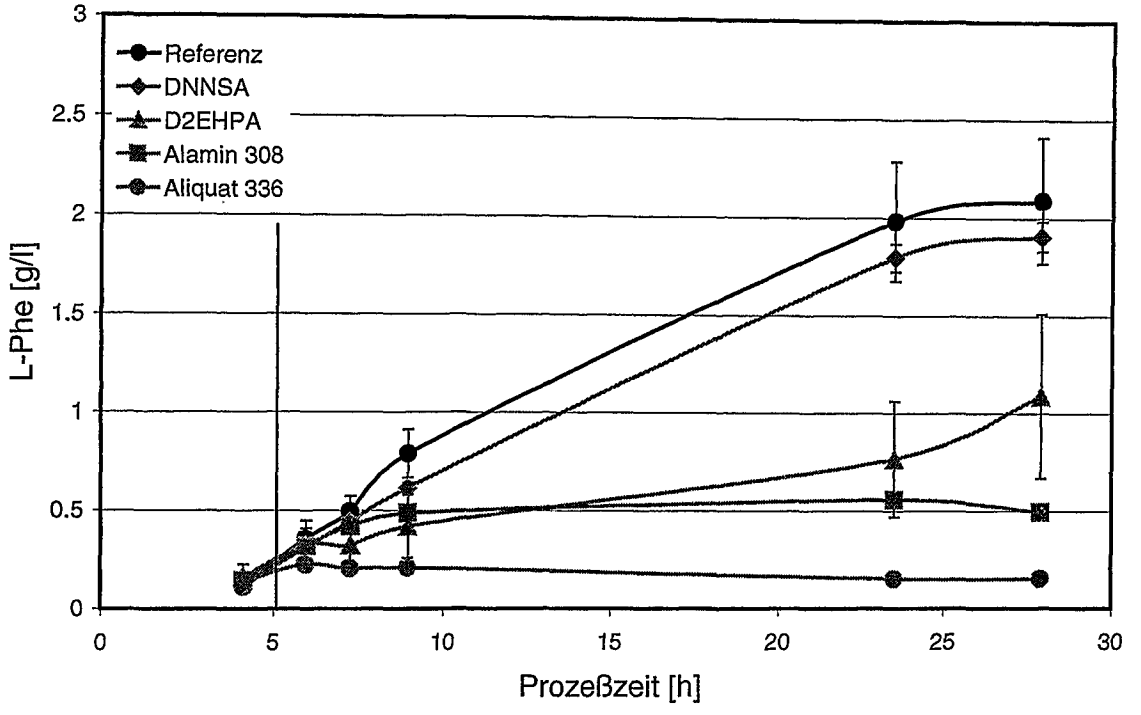


Abb. 5-33: Verlauf der L-Phe Konzentration (Lösungsmittelpulse bei t = 5h)

In Abb. 5-33 ist der Verlauf der L-Phenylalaninkonzentration über der Zeit nach den Pulsen aufgetragen. Der Referenzwert für den Produkttiter ist 2,1g/l L-Phe. Die integrale Produktivität π_{Phe} der Refrenzfermentation beträgt 0,006 $g/g_{BTM}h$. Der Fehler liegt bei 10 %.

Im Gegensatz zur optischen Dichte hat neben Aliquat 336 auch Alamin 308 einen deutlichen negativen Effekt auf die Produktbildung. Während die Zugabe von D_2EHPA die Produktivität (π_{Phe} = 0,004 $g/g_{BTM}h$) um ca. 40% reduziert, hat DNNSA keinen negativen Effekt auf die Bildung von L-Phe (π_{Phe} = 0,006 $g/g_{BTM}h$).

Mit den Carriern D_2EHPA und DNNSA werden weitere Meßreihen durchgeführt, um die toxischen Effekte auf die Produktivität in Abhängigkeit der Carrierkonzentration zu untersuchen. In einem integrierten Extraktionsverfahren werden die Carrier in wesentlich geringeren Konzentrationen eingesetzt als in den oben gezeigten Vorversuchen. In den oben gezeigten Experimenten entsprechen die Dosismengen der physikalischen Löslichkeit bei Kontakt des reinen Carriers mit Wasser (100%). Die Dosismengen in den folgenden Experimenten entsprechen den Löslichkeiten der Carrier bei 10% (12 mg/l) und 20% (20 mg/l) Carrieranteil im Lösungsmittel Kerosin. Des weiteren wird ein Puls entsprechend der doppelten Löslichkeit bei Kontakt mit reinem Carrier (2,4 g/l) gegeben (200%). Das bedeutet, daß in diesem Ansatz der Carrier als zweite Phase in der Fermentationslösung vorliegt. In den Durchlaufexperimenten in der Pilotanlage kann bei einem D_2EHPA Anteil von 10 %v/v eine Konzentration von ca. 17 mg D_2EHPA/l in den wäßrigen Phasen gemessen werden (s. Abb. 5-22).

Die Abb. 5-34 und Abb. 5-35 zeigen die Ergebnisse dieser Experimente. Die Zugabe von DNNSA (Abb. 5-34) hat eine leichte Verringerung des Produkttiters zur Folge. Bei einer Dosis entsprechend der doppelten Löslichkeit (200%) wird die Produktion von L-Phenylalanin am stärksten - um ca. 50% - reduziert.

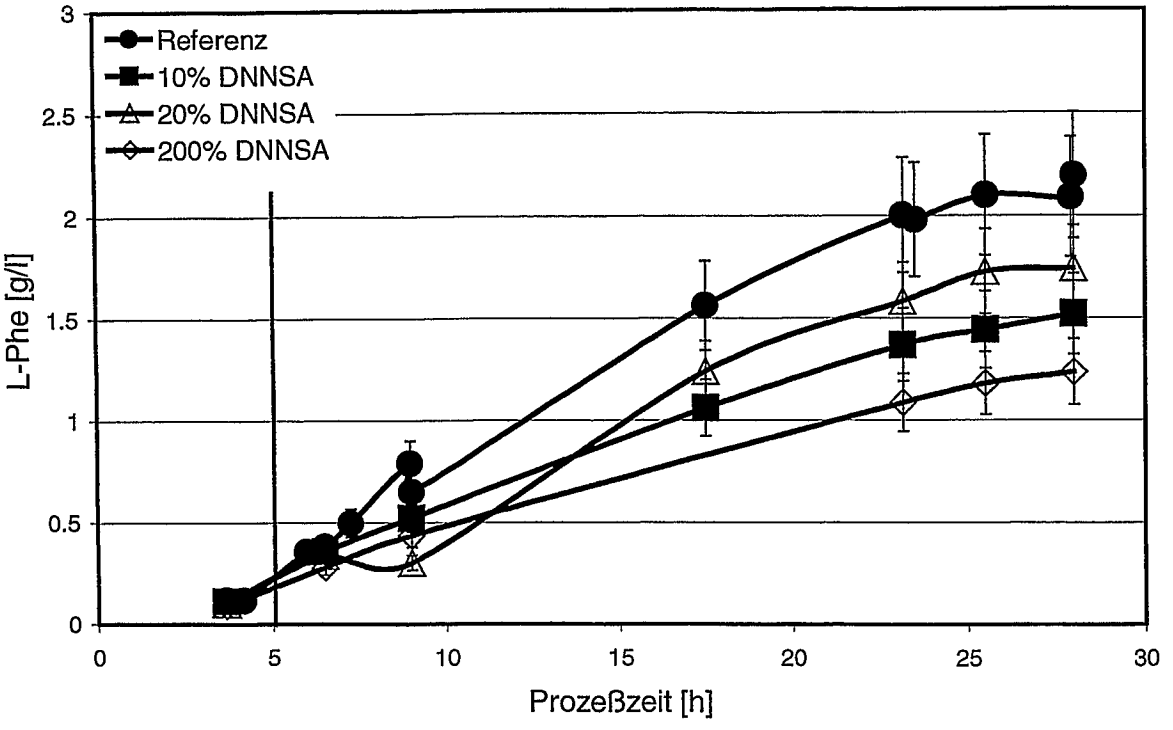


Abb. 5-34: L-Phe Verlauf nach DNNSA Zugabe

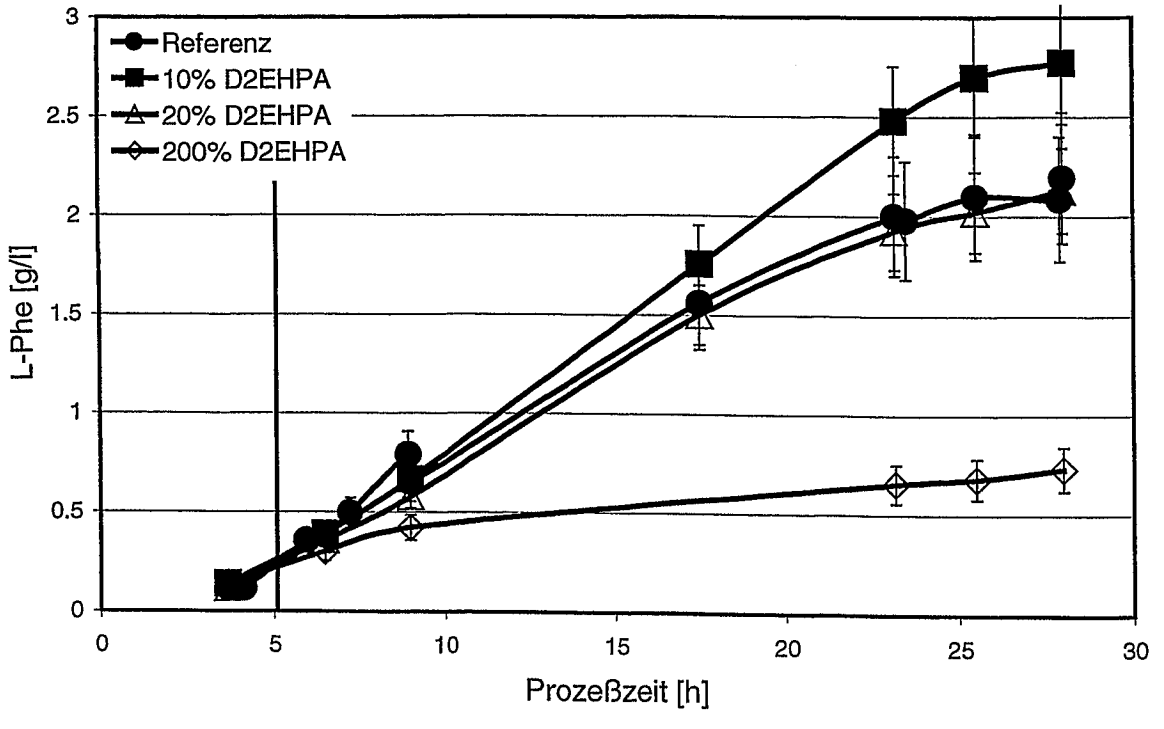


Abb. 5-35: L-Phe Verlauf nach D_2EHPA Zugabe

Bei der Versuchsreihe mit D_2EHPA-Pulsen sieht der Verlauf der Konzentrationen anders aus. Der stärkste Puls (200%) verringert die Produktbildung im Verhältnis zur Referenz um 75% auf 0,6 g/l L-Phe. Bei einem 20% Puls liegt der Konzentrationsverlauf auf dem der Referenz. Es wird ein Endtiter von 2,1 g/l L-Phe erreicht. Die Produktivität (π_{Phe} = 0,008 $g/g_{BTM}h$) liegt hier über der der Referenzfermentation. Durch die Zugabe des

10% Puls an D_2EHPA kann die Produktivität noch weiter auf $\pi_{Phe} = 0{,}01$ g/g_{BTM}h gesteigert werden. In diesen Fermentationen wird ein Produkttiter erreicht, der mit 2,8 g/l um 30% über dem Referenzwert von 2,1 g/l liegt.

5.4.2 Übertragung in den Labormaßstab

Nach den Untersuchungen zur Biokompatibilität der Carrier in pH geregelten Schüttelkolben werden die Effekte im Labormaßstab überprüft. Aufgrund der oben genannten Ergebnisse wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit nur noch mit dem Extraktionssystem D_2EHPA/Kerosin gearbeitet. Daher werden auch die Experimente zur Maßstabübertragung in den 7,5 l Fermenter nur mit D_2EHPA durchgeführt.

5.4.2.1 Fermentation im Zulaufverfahren

Bei den Untersuchungen im Laborreaktor wird zunächst eine Referenzfermentation im Zulaufverfahren durchgeführt. In diesem Prozeß werden die Referenzwerte für die Biomasse- und die Produktkonzentration ermittelt. Zur Überprüfung des D_2EHPA Effekts auf den Fermentationsprozeß wird über ein Hohlfaser-Ultrafiltrationsmodul (500 kD) Permeat aus dem Reaktor entnommen. Pro Liter Permeat werden 25 mg D_2EHPA zugegeben. Das carrierhaltige Permeat wird anschließend in den Fermenter zurückgeführt. Mit diesem Experiment kann sowohl der Einfluß des Carriers auf den Fermentationsprozeß als auch mögliche Effekte durch eine Filtration der Fermentationslösung (Scherstress, O_2-Limitierung, o.ä.) untersucht werden.

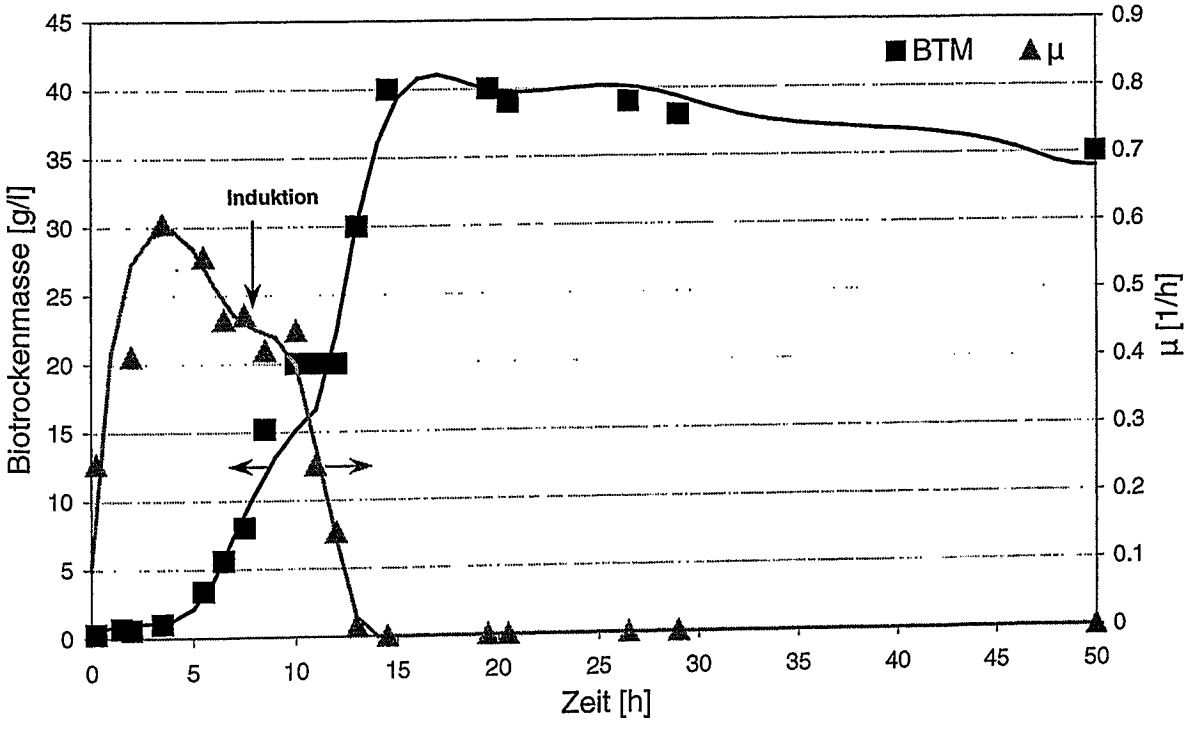


Abb. 5-36: Fermentation im Zulaufverfahren (BTM und Wachstumsrate)

Der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration sowie der Wachstumsrate µ während einer Fermentation ohne Biomasserückhaltung sind in Abb. 5-36 dargestellt. Nach 4 h ist das Wachstum der Tyr-auxotrophen Bakterien von der L-Tyrosin-Dosierung abhängig, da die im Medium vorgelegte Menge dieser Aminosäure verbraucht ist. Das Wachstum stagniert, sobald die Tyrosin-Zufuhr beendet wird und für die Zellen kein Tyrosin im Medium mehr verfügbar ist. Der L-Tyrosinbedarf für den Zellerhalt wird vernachlässigt. Pro g L-Tyrosin

werden über die gesamte Fermentationsdauer 6,7 g Biotrockenmasse gebildet, das entspricht einer Zunahme der optischen Dichte um 16,8 Einheiten.

Nach etwa 25 h ist die Konzentration der Biomasse rückläufig. Die Abwesenheit von L-Tyrosin ist nicht für das Sinken der Biomassekonzentration verantwortlich. Die Biomassekonzentration sinkt, in der in Abb. 5-36 dargestellten Fermentation, nach dem Erreichen des Maximums von ca. 40 gl^{-1} ab, da durch die Zufuhr von Glucoselösung die Fermentationslösung verdünnt wird, und das Wachstum stagniert.

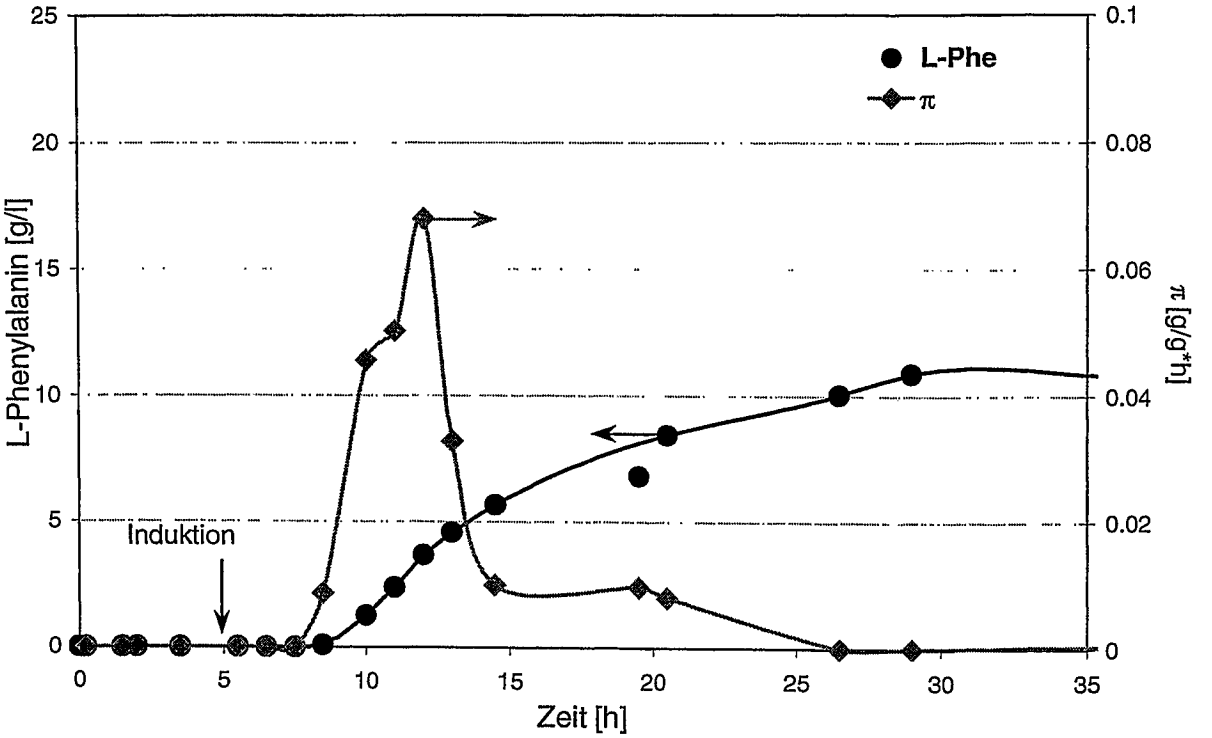


Abb. 5-37: Produktbildung der Fermentation im Zulaufverfahren

Abb. 5-37 zeigt die L-Phenylalaninkonzentration und die differentielle biomassespezifische Produktbildungsrate π während der Fermentation. Nach der Induktion mit IPTG steigt π bis auf einen Wert von 0,07 g pro g Biomasse und Stunde. Dieser Wert wird nur in einer Probe gemessen, konnte aber reproduziert werden (0,066 $gg^{-1}h^{-1}$). Danach sinkt die Produktbildungsrate rasch wieder ab. Insgesamt wird eine L-Phenylalaninkonzentration von ca. 11 gl^{-1} erreicht. Eine hohe Produktbildungsrate kann also nur für einen sehr kurzen Zeitraum erreicht werden. Für den Produktionsprozeß ist eine hohe Produktivität über einen langen Zeitraum erforderlich.

In den ersten 30 Stunden werden Biomasse und L-Phenylalanin produziert, daher werden die Selektivitäten für diesen Zeitraum bestimmt. Die Dauer der folgenden Fermentationen wird auf 30 Stunden gekürzt, daher sind die Werte direkt mit den dort gezeigten Selektivitäten vergleichbar.

5.4.2.2 Fermentation mit D_2EHPA-Zugabe

Für den Versuch mit D_2EHPA Zugabe wird eine Ultrafiltration der Fermentationslösung durchgeführt. Eine Sauerstofflimitierung der Zellen kann aufgrund der zusätzlichen pO_2 – Messung im Filtrationsumlauf ausgeschlossen werden. Der Zulaufvolumenstrom in den eingesetzten Filtrationsmodul beträgt 180 l/h. Das entspricht einer Reynoldszahl von 916 an der Membran (w = 1,3 m/s). Bei einem Transmembrandruck von 0,7 bar wird bei einer Membranfläche von 0,024 m² ca. 360 ml Permeat pro Stunde bereitgestellt.

Ein Vergleich von Abb. 5-36 mit Abb. 5-38 zeigt, daß sich Wachstumkurven der beiden Fermentationen ähneln. Allerdings liegt die maximale Biotrockenmassekonzentration ca. 5 g unter dem Referenzwert.

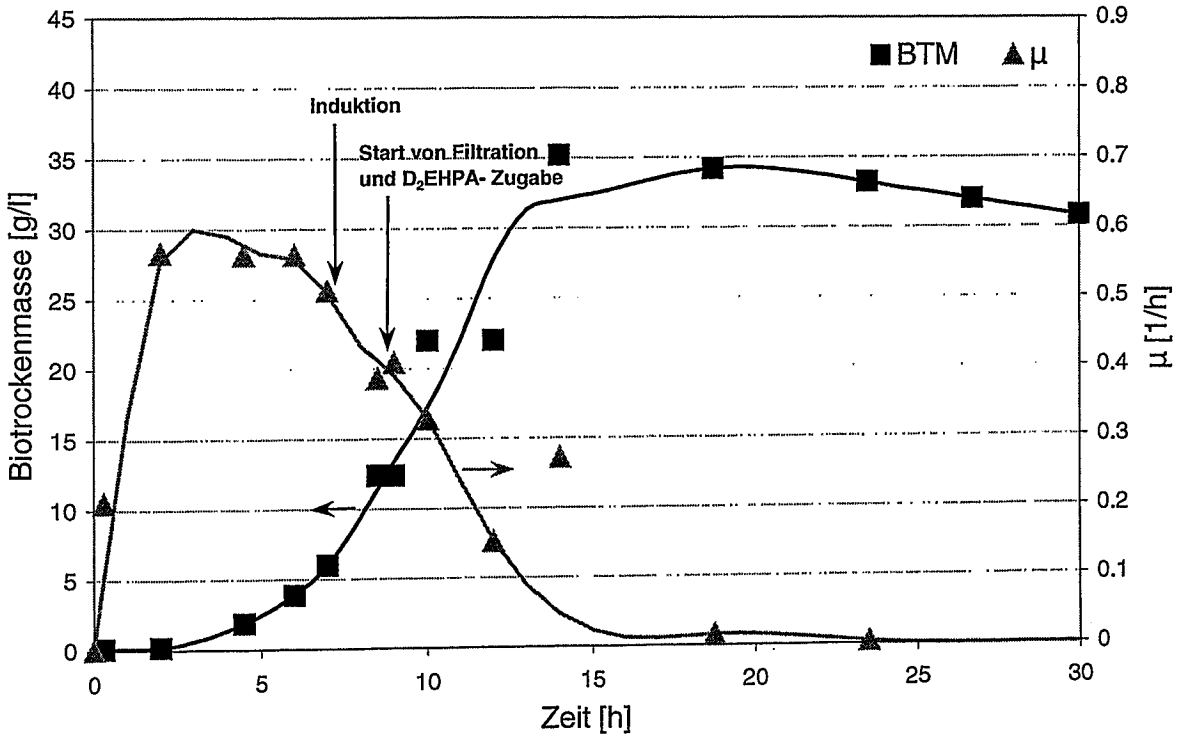


Abb. 5-38: Fermentation mit D_2EHPA-Zugabe (BTM u. Wachstumsrate)

Die Zugabe des D_2EHPA bewirkt eine deutliche Steigerung des Produkttiters bei einer Reduktion des Glucoseverbrauchs um 29 % im Vergleich zur der Referenzfermentation.

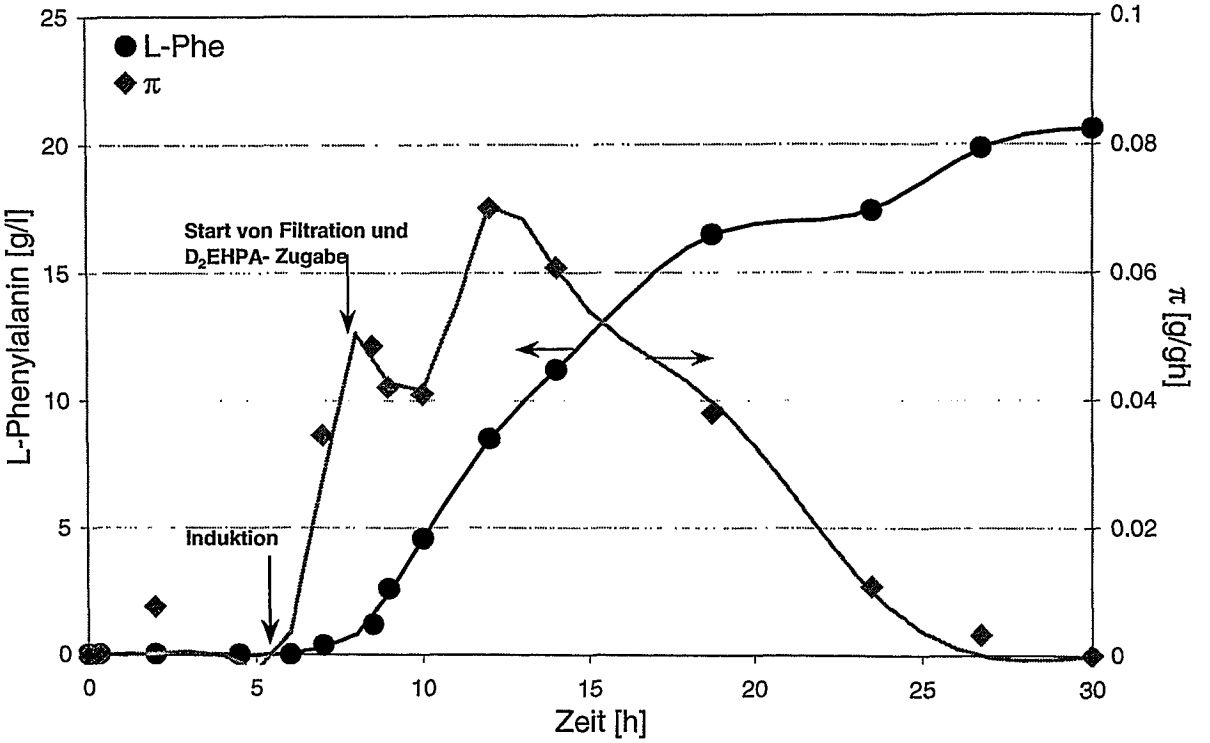


Abb. 5-39: Produktbildung der Fermentation mit D_2EHPA-Zugabe

Nach dem Start der D_2EHPA-Zugabe sinkt die Produktbildungsrate zunächst ab. Allerdings sinkt sie nicht bis auf Null. Nach einer kleinen Senke wird der Verlauf abgefangen, um danach wieder deutlich anzusteigen.

Die Phase der hohen Produktbildungsrate wird in dieser Fermentation erheblich länger aufrechterhalten als in der Referenzfermentation. Die lange Produktbildungsphase resultiert in einem hohen Produkttiter. Zum Ende der Fermentation liegt die L-Phe Konzentration über 20 g/l.

5.4.3 Wechselwirkungen zwischen D_2EHPA und *E.coli*

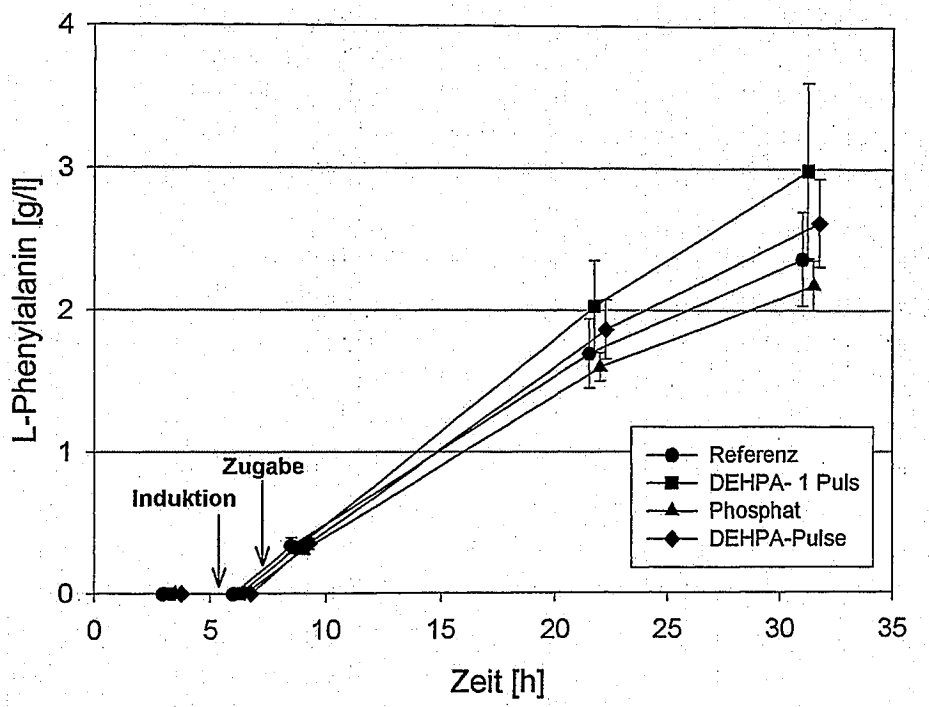


Abb. 5-40: Produktbildung im Schüttelkolben mit Zugabe von D_2EHPA und Phosphat als einzelnem Puls und sukzessiver Erhöhung des D_2EHPA Anteils durch mehrere Pulse

Zum besseren Verständnis der Effekte, welche der Carrier D_2EHPA auf das Wachstum und die Produktbildung von *E.coli* hat, wird eine weitere Meßreihe in pH geregelten Schüttelkolben durchgeführt. Neben den Referenzfermentationen wird das D_2EHPA-Volumen einmal als Puls und einmal sukzessive während der Fermentation zudosiert. Zur Überprüfung einer möglichen Phosphatlimitierung wird KH_2PO_4 als Puls dosiert. Die Zugaben beginnen jeweils kurz nach der Induktion zur siebten Stunde und enthalten immer die gleichen molaren Anteile an Phosphat. In Abb. 5-40 ist die L-Phe-Konzentration über der Zeit aufgetragen; aus gleichen Ansätzen wird jeweils der Mittelwert bestimmt. Im Rahmen der Standardabweichung liefern die Ergebnisse in Abb. 5-40 keine signifikanten Aussagen. Es wird jedoch tendenziell das Ergebnis früheren Untersuchungen bestätigt.

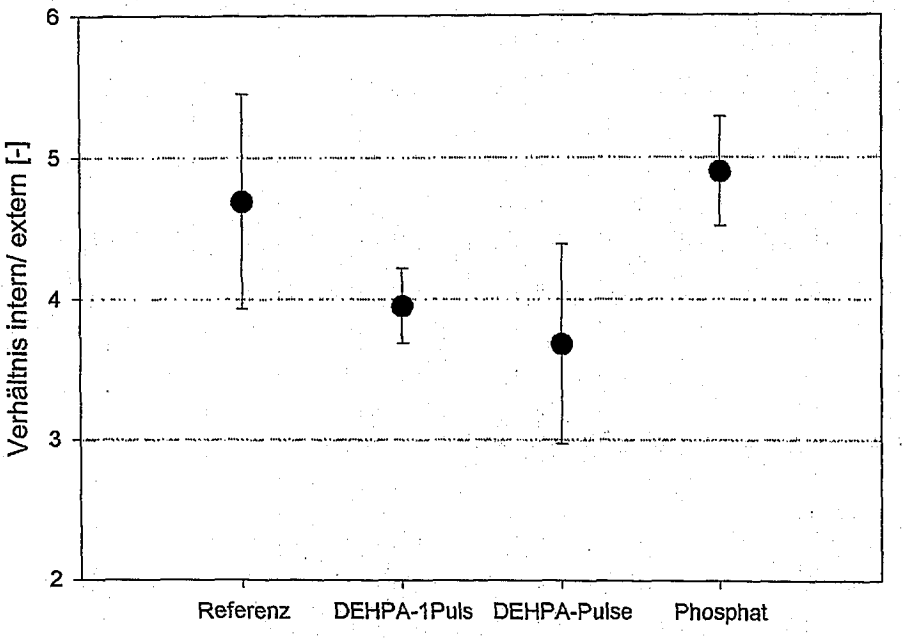


Abb. 5-41: Massenverhältnis intern/extern der Schüttelkolbenexperimente

Mit Proben dieser Versuchsreihe wird ein Zellaufschluß durchgeführt. In Abb. 5-41 ist das Verhältnis von interner zu externer L-Phe-Konzentration der *E. coli*-Zellen für die verschiedenen Ansätze aufgetragen.

Auch aus diesen Ergebnissen lassen sich nur Tendenzen ablesen. In den Referenz-Fermentationen und den Ansätzen mit KH_2PO_4-Zugabe sind keine wesentlichen Unterschiede im intern/extern Verhältnis zu erkennen. Dagegen liegen die Werte der D_2EHPA Ansätze ca. 15 % unter diesen Werten.

5.5 Demonstrationsexperiment im Pilotmaßstab

Zur Demonstration der integrierten Aufarbeitung werden Fermentationen mit kontinuierlicher Aufarbeitung im Pilotmaßstab durchgeführt. Das Arbeitsvolumen der Fermentation liegt bei 200 l. Zur Biomasserückhaltung und Permeatbereitstellung wird eine Ultrafiltrationsmembran mit einer nominalen Trenngrenze von 500 kD eingesetzt. Die Fläche dieser Membran beträgt 4,4 m² und stellt über die gesamte Fermentationsdauer einen Mindestpermeatstrom von 15 l/h zur Verfügung (Gerigk[127]).

Eine Referenzfermentation zum Vergleich mit dem integrierten Prozeß wird mit Biomasserückhaltung jedoch ohne Produktabtrennung durchgeführt. In diesem Referenzexperiment wird das Permeat aus dem Filtrationsmodul direkt in den Fermenter zurückgeführt, so daß keine Volumen- oder Konzentrationsveränderung im Fermenter auftritt.

In dieser Referenzfermentation wird eine integrale Glucoseselektivität $y_{P/S}$ von 0,04 erreicht. Der Produkttiter zu Ende der Fermentation liegt bei 7,8 g/l L-Phenylalanin. (Daten bei Gerigk[127])

In einem zweiten Experiment wird das Permeat aus der Biomasserückhaltung in die Reaktivextraktionsanlage geführt. Dort wird das Produkt abgetrennt und die abgereicherte Phase anschließend direkt in den Fermentationsprozeß zurückgegeben. Nach Passieren der organischen Phase wird das Phenylalanin dann in der Akzeptorphase (Extrakt) aufgenommen. Aufgrund des Volumens des Extrakts von 50 l wird das L-Phe aufkonzentriert.

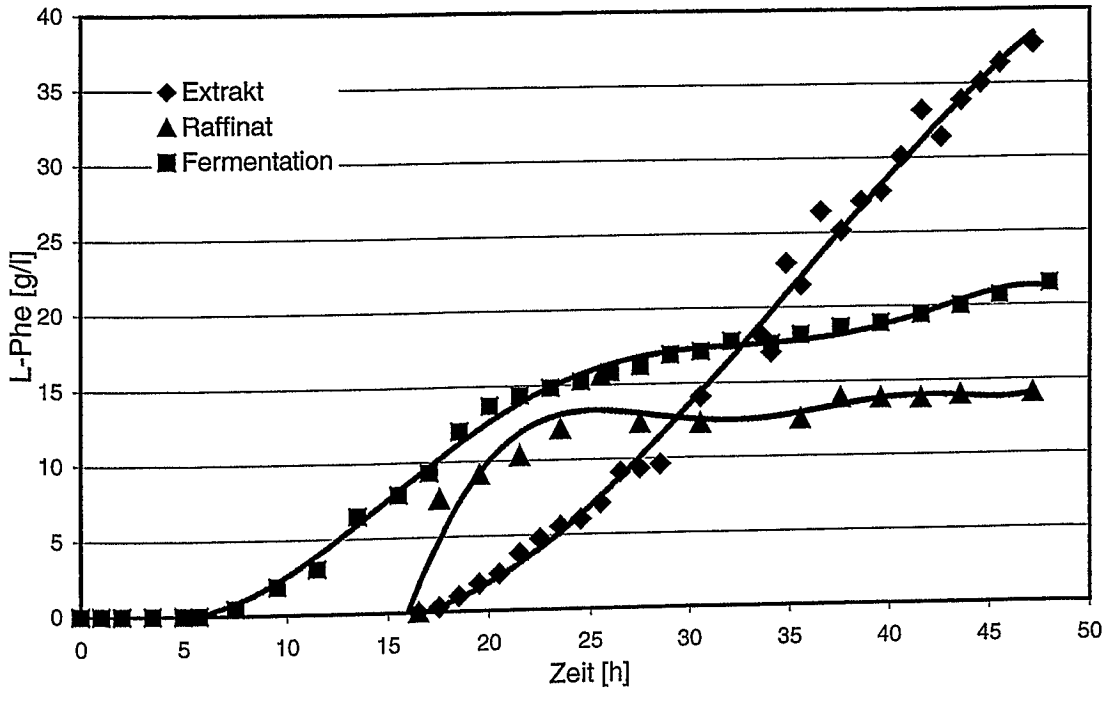


Abb. 5-42: Konzentrationsverläufe in der Fermentation, im Permeat (Raffinat) und im Extrakt bei der integrierten Produktabtrennung aus einem Fermentationsprozeß (Fermentationsdaten von Gerigk[126])

In Abb. 5-42 sind die Konzentrationsverläufe im Fermenter und in den wäßrigen Phasen der Reaktivextraktion über der Zeit dargestellt. Da die Raffinatphase über ein Zwischengefäß in den Extraktionsmodul geführt (s.Abb. 4-17), und hier durch die kontinuierliche Extraktion des

L-Phe verdünnt wird, ist die Konzentration im Vergleich zum Fermenter geringer. Die Produktabtrennung wird bei 16,5 h zugeschaltet. Die Daten zur Fermentation finden sich bei Gerigk[131].

Ab 16,5 h flacht die Kurve für den Konzentrationsverlauf im Fermenter etwas ab und erreicht zum Prozeßende einen Wert von etwa 22 g/l. Nach einer Anfahrphase von 7 h kann im Mischgefäß der Extraktphase eine Konzentration von ca. 13 g/l gehalten werden. Im Raffinat steigt die Konzentration vom Zeitpunkt des Einschaltens der Aufarbeitung bis zum Prozeßende kontinuierlich an und erreicht nach 47 h eine Konzentration von 37 g/l. Bezogen auf die Fermentation werden inklusive dem aufkonzentrierten Produkt 30,7 g/l L-Phenylalanin produziert. Die integrale Glucoseselektivität $y_{P/S}$ liegt bei diesem Experiment bei 0,20[132].

Durch dieses Experiment kann die prinzipielle Funktion der integrierten Aufarbeitung gezeigt werden. Im Vergleich zur L-Phe Konzentration in der Fermentation kann um Faktor 2 aufkonzentriert werden. Insbesondere die direkte Rückführung der abgereicherten Fermentationslösung in den Fermenter ist hier von großer Bedeutung. Durch die integrierte Abtrennung des L-Phenylalanins aus dem Fermentationsprozeß kann der Produkttiter von 8 g/l auf 30 g/l um Faktor 3,75 gesteigert werden. Die integrale Glucoseselektivität steigt von 0,04 auf 0,20 um Faktor 5. Die Permeabilität des L-Phe in der Reaktivextraktion liegt bei ca. 11 g/m²h.

Um die Trennleistung der Extraktionsanlage mit der Produktivität der Fermentation vergleichen zu können, wird eine spezifische Extraktionsausbeute $Y_{E/F}$ eingeführt. Die spezifische Extraktionsausbeute berechnet sich aus dem Verhältnis des extrahierten Produkts zur gebildeten Menge. Da die Fermentation 16,5 Stunden vor der Extraktion gestartet wird, muß der jeweilige Wert auf die Prozeßzeit der entsprechenden Operation bezogen werden.

Gl. 5-3

$$Y_{E/F} = \frac{c_E \cdot V_E / t_E}{c_F \cdot V_F / t_F}$$

Dabei sind c, V und t die Konzentration des L-Phe, das Volumen der jeweiligen Phase und t die Prozeßzeit der jeweiligen Operation. Die Indizes E und F stehen für Extrakt und Fermentation. Da die Fermentation mit Zufütterung gefahren wird, muß hier das jeweils aktuelle Arbeitsvolumen des Fermenters eingesetzt werden, während das Volumen des Extrakts mit 50 l konstant bleibt.

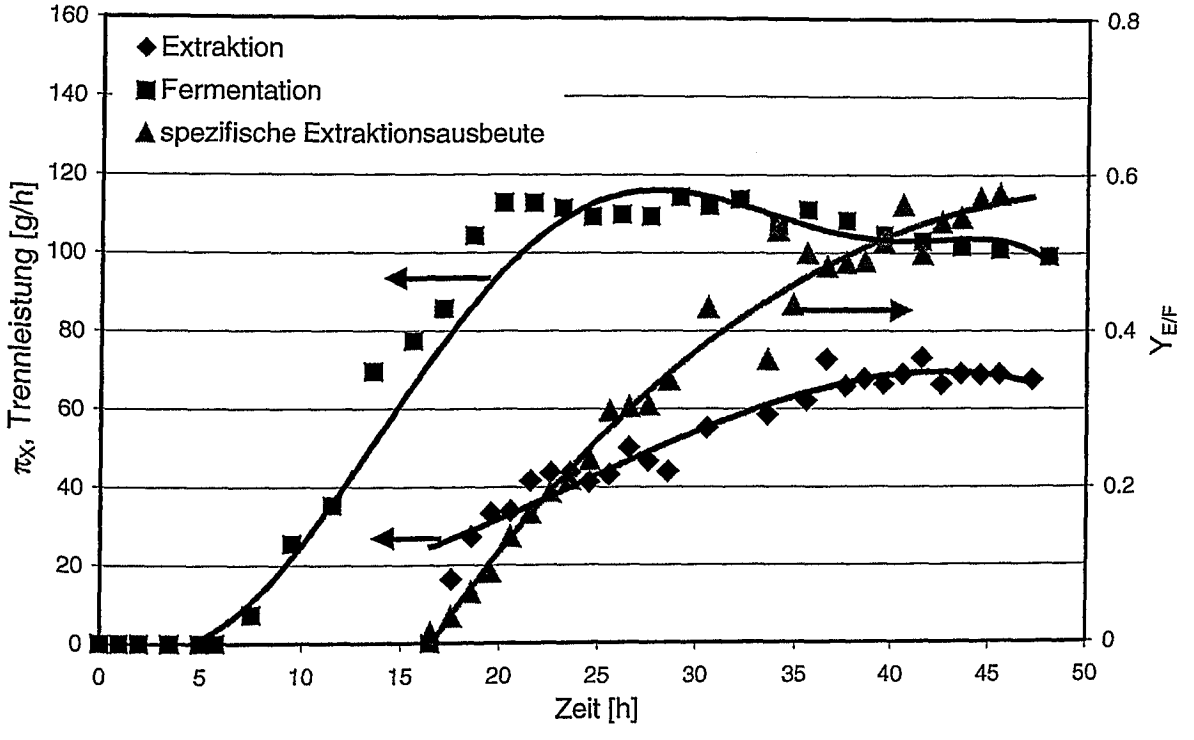


Abb. 5-43: Vergleich der Produktbildung im Fermenter mit der Trennleistung der Reaktivextraktion

In Abb. 5-43 sind die Produktbildungsrate der Fermentation und die Trennleistung der Extraktionsanlage einander gegenübergestellt. Die große Erhöhung des Produkttiters in der Fermentation führt dazu, daß die Trennleistung der Reaktivextraktions–Anlage nicht mehr ausreicht um alles gebildete Produkt abzutrennen. Die spezifische Extraktionsausbeute erreicht daher auch nur einen maximalen Wert von nahe 0,6. Die Trennleistung liegt damit um ca. 40 % unter der –durch die integrierte Abtrennung erhöhte- Produktbildungsrate der Fermentation.

6 Fehlerbetrachtung

Die Untersuchungen in dieser Arbeit werden im wesentlichen mit HPLC-Analytik an RP18 Säulen durchgeführt. Dabei werden die Aminosäuren vor der Säule mit o-Phtalsäuredialdehyd derivatisiert. Aufgrund des sauren Charakters der Extraktphase wird besonderes Augenmerk auf die pH Sensitivität der Analyse gelegt. Michael et al.[133] berichten von einer erheblichen Änderung der Signalintensität durch eine Änderung des pH-Werts. Diese Veränderungen werden allerdings nur bei einer Verschiebung des pH in den basischen Bereich und nicht im sauren beobachtet. Die Genauigkeit der HPLC wird regelmäßig (etwa alle 15 Analysen) durch Referenzsubstanzen überprüft. Durch eine pH-Verschiebung kann in dem eingesetzten Analysator jedoch keine Änderung der Signalintensität beobachtet werden.

Durch geeignete Verdünnung werden die Proben auf einen Meßbereich von 10 µmol/l bis 200 µmol/l eingestellt. In diesem Meßbereich liegt der Fehler immer unter 4 %. Bei der Verdünnung der Proben wird ein Fehler von maximal 3 % gemessen. Der Gesamtfehler der HPLC-Analytik addiert sich somit auf 6 %.

Für die pH Messungen ergibt sich ein Fehler von 2 %.

Beim Einsatz der pH geregelten Schüttelkolben kommt es bei Parallelansätzen zu weniger Abweichungen vom Mittelwert. Durch Verdunstung treten Flüssigkeitsverluste von bis zu 0,07 g/h auf. Das entspricht bei einer 30 stündigen Fermentation einem Volumenfehler von bis zu 2,1 %. Die Dosiergenauigkeit der Glucose- und Laugestrecken ist mit einem Fehler von max. 4 % (Glucose), bzw. 7 % (Lauge) behaftet[134]. Da diese Abweichungen nicht reproduzierbar sind, wird kein allgemeiner Fehler angenommen. Satt dessen sind in den betreffenden Darstellungen die Standardabweichungen aus den Versuchsreihen an den jeweiligen Meßwerten aufgetragen.

Bei den Untersuchungen zur Abhängigkeit des Stoffübergangs von der Hydrodynamik werden zur Volumenstrommessung Rotameter eingesetzt. Die in der Pilotanlage verwendeten Rotameter (Altometer Sliedrecht, Holland) haben einen Gerätefehler der mit 5 % angenommen wird.

7 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hat die Entwicklung eines integrierten Aufarbeitungsverfahrens für L-Phenylalanin zum Ziel. Dabei gilt es, die Aminosäure simultan zum laufenden Fermentationsprozeß aus dem Bioreaktor abzutrennen und wenn möglich, zu konzentrieren. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß dieses Ziel erreicht werden konnte.

Die membrangestützte Reaktivextraktion in Hohlfasermodulen kann für eine integrierte Produktabtrennung etabliert werden. Es wird ein biokompatibles Stoffsystem, bestehend aus Extraktions- (D_2EHPA) und Lösungsmittel (Kerosin), mit ausreichenden Extraktionsleistungen für L-Phe gefunden. Eine reversible Extraktion mit vollständiger Carrierregeneration wird durch den Einsatz von Schwefelsäurelösung als Extraktphase erreicht. Das abgetrennte Produkt kann um Faktor zehn aufkonzentriert werden. Durch anschließende Präzipitation des Extrakts wird ein Feststoff mit einer Reinheit von über 99 % gewonnen. Die Einflüsse der Hydrodynamik und der Konzentration der Reaktionsteilnehmer auf den Stoffübergang sind experimentell untersucht und können modellmäßig beschrieben werden. Die simultane Produktabtrennung aus einem Fermentationsprozeß kann im Pilotmaßstab gezeigt werden und wirkt sich positiv auf den Gesamtprozeß aus.

Im folgenden werden die einzelnen Aspekte der Prozeßentwicklung diskutiert und mit Literaturdaten verglichen.

7.1 Extraktionsmittelauswahl

Die Auswahl des Extraktionsmittels für den Einsatz zur integrierten Reaktivextraktion stützt sich auf mehrere Punkte.

Zum einen muß der Carrier eine ausreichend große Affinität für das L-Phe haben. Da die Raffinatphase jedoch im Kreis durch den Hohlfasermodul gefahren wird muß E nicht im Bereich von nahe hundert Prozent liegen. Außerdem ist ein zu hoher Extraktionsgrad ungünstig, weil durch die zu hohe Affinität zwischen Aminosäure und Extraktionsmittel die Rückextraktion erschwert wird. Ein Extraktionsgrad ab 35 % ist daher bereits ausreichend.

Im technischen Betrieb dürfen beim Einsatz des Extraktionsmittels keine Störungen auftreten. Dazu gehören die Flutung einer Phase durch das Zusammenbrechen der Phasengrenzfläche. Dies kann bei ionischen Tensiden durch die stark herabgesetzte Oberflächenspannung leicht passieren. Insbesondere im Pilotmaßstab ist diese Gefahr sehr groß, da hier die transmembranen Drücke aufgrund der größeren Modullänge erheblich höher sind als im Labormaßstab. Eine Eintrübung der wäßrigen Phasen ist unerwünscht, da dies den Eintrag von Mikroemulsionen aus organischen Lösungs- und Extraktionsmitteln in den Fermentationsprozeß bedeuten würde.

Das eingesetzte Extraktionsmittel sollte in weiten Konzentrationsbereichen biokompatibel sein. Obwohl durch die hohlfasergestützte Extraktion ein dispersionsfreier Betrieb gewährleistet werden kann[135], kommt es im Rahmen der Löslichkeit des jeweiligen Agens zu einem Übergang in die wäßrige Phase. Ein nicht biokompatibler Stoff würde bei der Rückführung des Raffinats sofort durch seine toxische Wirkung auf die Bakterien den Prozeß zum Erliegen bringen.

7.1.1 Tertiäre Ammoniumverbindungen

Bei den untersuchten tertiären Ammoniumverbindungen handelt es sich um die Stoffe Alamin 304 (Henkel) und Alamin 308 (Henkel). Alamine arbeiten wie flüssige Anionentauscher. Siebold et al.[136] konnten bei der Reaktivextration von Milchsäure aus Fermentationsüberständen einen Extraktionsgrad von über 70 % zeigen. Im Gegensatz dazu zeigen die eigenen Ergebnisse, daß bei der Extraktion von L-Phenylalanin mit tertiären Ammoniumverbindungen nahezu keine Extraktion stattfindet. Bei dem gewählten pH-Wert

von 10,4 liegt 90 % des vorgelegten L-Phe als Anion vor (s. Abb. 2-20). Der Extraktionsgrad liegt jedoch bei beiden Extraktionsmitteln lediglich bei 6 %.

7.1.2 Quarternäre Ammoniumverbindungen

Die in dieser Arbeit eingesetzte quarternäre Ammoniumverbindung ist Trioctylmethylammoniumchlorid. Sie wird unter dem Handelsnamen Aliquat 336 von der Firma Henkel angeboten. Aliquat 336 zeigte bei allen eingesetzten Lösungsmitteln hohe Extraktionsgrade von 73 % bis 88 %. Ein Problem ist jedoch die geringe Löslichkeit in den eingesetzten Lösungsmitteln, so daß nur fünf prozentige Lösungen bei der Extraktion eingesetzt werden konnten. Um so erfreulicher sind die hohen Extraktionsgrade. Bei den satzweisen Extraktionen kommt es trotz des hohen Stoffübergangs nicht zu einer pH-Wert-Änderung. Der Grund dafür liegt im Extraktionsmittel selbst. Im Austausch für das L-Phe geht vom Aliquat 336 ein Chlorid ins Raffinat über. Dieser Effekt ist von großem Vorteil bei einem integrierten Einsatz, da eine pH-Wert Änderung der Fermentationslösung unerwünscht ist. Aufgrund der Extraktionsleistung ist Aliquat 336 also ein interessantes Agenz für die L-Phe Abtrennung.

Beim Einsatz von längerkettigen Alkoholen als Verdünnungsmittel kommt es zur Mulmbildung an der Phasengrenze. Diese Mulmbildung ist für eine membrangestützte Extraktion ausgesprochen ungünstig. Dadurch werden Scaling-Prozesse begünstigt, wodurch die nutzbare Membranfläche reduziert wird[137].

Beim Einsatz des Stoffsystems Aliquat 336/Oktanol zur hohlfasergestützten Extraktion in der Laboranlage zeigt sich allerdings, daß diese Mulmbildung den Prozeß nicht behindert. Es ist mit diesem System sogar möglich, das L-Phe auf 23,5 g/l zu konzentrieren. Im Prozeßverlauf zeigt sich allerdings eine Bilanzlücke. Diese beträgt zum Prozeßende beinahe 40 % und weist auf eine Stoffsenke in der organischen Phase hin. Vermutlich wird ein Teil der extrahierten Aminosäure irreversibel an den Carrier gebunden und kann nicht rückextrahiert werden. Ein weiteres Problem zeigt sich durch einen Einbruch von organischen Substanzen in die wäßrigen Phasen, welcher durch starken Geruch und einen öligen Film auf der Flüssigkeitsoberfläche beobachtet werden kann. Im Pilotmaßstab zeigt sich, daß Aliquat 336 nicht eingesetzt werden kann. Ein dramatischer Phasendurchbruch mit sofortiger Flutung der organischen Phase brachte das Experiment bereits in der Anfahrphase zum Stillstand.

Neben den technischen Problemen ist Aliquat 336 selbst im Promillebereich toxisch für *E. coli*. Die Toxizitätstests in pH-geregelten Schüttelkolben (Abb. 5-32 und Abb. 5-33) zeigen, daß nach einem Lösungsmittelpuls von 1,2 g pro Liter Fermentationslösung sowohl das Wachstum der Bakterien als auch die Produktion des L-Phe mit sofortiger Wirkung beendet wird. Im Gegensatz dazu werden für *Rhizopus arrhizus* keine oder nur geringe toxische Effekte von Trioctylammoniumverbindungen beschrieben[16]. Die höhere Sensitivität von *E. coli* für Aliquat 336 könnte mit der unterschiedlichen Enzymausstattung der beiden Organsimen zusammenhängen. *Rhizopus* gehört zu den Fusarien und lebt im Boden. Er hat daher ein sehr breites Substratspektrum. *E. coli* dagegen ist ein Darmbewohner mit einem sehr schmalen Substratspektrum. Zu der höheren Lösungsmitteltoleranz der Fusarien gibt es weitere Literaturhinweise[138]. Aufgrund der komplexen Umwelt der Fusarien haben sie eine sehr umfangreiche Enzymausstattung, die es den Pilzen erlaubt, sogar Lösungsmittel als Substrate zu nutzen. *E. coli* dagegen ist auf ein sehr schmales Substratspektrum angewiesen und verfügt nicht über eine so große Enzymausstattung, um Lösungsmittel zu metabolisieren.

Da Aliquat 336 nicht biokompatibel ist und auch nicht im technischen Maßstab eingesetzt werden kann, ist es für den weiteren Einsatz in dieser Arbeit ungeeignet.

7.1.3 Schwefelsäureester

Bei dem Schwefelsäureester Di-Nonyl-Naphtalinschwefelsäure (DNNSA) handelt es sich um einen Kationentauscher. Daher wird der pH-Wert im Raffinat auf unter 3,1 eingestellt. Der niedrige Flammpunkt von –1,1°C fällt bereits vor der Diskussion der experimentellen Ergebnisse unangenehm auf.

Die Ergebnisse der satzweisen Extraktionen zeigen eine schlechte Reproduzierbarkeit und ein ungünstiges Absetzverhalten der Phasen voneinander. Es werden nahezu hundert prozentige Extraktionen von L-Phe gemessen. Jedoch kommt es zu einer sehr starken Mulmbildung an den Phasengrenzen. Wie oben bereits gezeigt, kann ein technischer Einsatz bei so starker Mulmbildung nicht funktionieren.

Neben den satzweisen Extraktionen sollen an dieser Stelle auch die Ergebnisse zur Biokompatibilität beleuchtet werden. Wie Abb. 5-32 zeigt, wird das Wachstum der *E. coli* Zellen durch die Zugabe des DNNSA nicht beeinflußt. Die Wachstumskurve verläuft ähnlich der Kurve der Referenzfermentation. Auch die Produktivität wird durch einen Puls von 1,2 g/l nicht maßgeblich beeinflußt (s. Abb. 5-33). Die Effekte der DNNSA Dosage werden noch mit drei weiteren Konzentrationen genauer untersucht. Wie in Abb. 5-34 zu sehen ist, hat selbst ein Puls von 2,4 g/l (entsprechend der doppelten Löslichkeit) nur eine Reduktion des L-Phe Titers um etwa 50 % zur Folge. Es würde sogar bei einem starken Einbruch der organischen Phase ins Raffinat nicht zu einem totalen Prozeßabsturz kommen. Leider haben aber auch die Carrierdosen, wie sie im regulären Betrieb erwartet werden können (10 %v/v und 20 %v/v), bereits einen nachteiligen Effekt auf die Produktbildung. Hier wird der L-Phe Titer schon um 22 % bzw. 40 % reduziert.

Das Extraktionsmittel DNNSA zeigt sehr gute Extraktionsleistungen. Aufgrund der instabilen Phasengrenzen wird jedoch von einem technischen Einsatz Abstand genommen. Die zunächst sehr vielversprechenden Ergebnisse zur Biokompatibilität zeigen bei genauerer Untersuchung eine erhebliche Reduktion der Produktivität im Anwendungsbereich 10 % und 20 %. DNNSA wird daher im weiteren Verlauf der Arbeit nicht mehr eingesetzt.

7.1.4 Phosphorsäureester

Die eingesetzte Di-2-ethylhexylphosphorsäure (D_2EHPA) zeigt bei allen verwendeten Verdünnungsmitteln sehr gute Extraktionsleistungen zwischen 76 % und 58 % (s.Abb. 5-2). Die besten Resultate werden mit dem Alkangemisch Kerosin erzielt, während die reinen Alkane in den Extraktionsleistungen etwas niedriger liegen. Mit steigender C-Zahl der Verdünner nimmt die Extraktionsleistung ab. Das hängt vermutlich mit der abnehmenden Polarität der Verdünner und der damit einhergehenden geringeren Affinität des L-Phe zur Phase zusammen[139]. Eintrübungen der Phasen - wie in den oben genannten Experimenten beobachtet - traten bei Extraktionen mit D_2EHPA nicht auf.

Die Ergebnisse mit Aliquat 336 haben gezeigt, daß Stoffsysteme die im Labormaßstab gut funktionieren, im Pilotmaßstab aufgrund der höheren Drücke und der größeren Membranfläche nicht mehr kontrollierbar sind und erhebliche technische Probleme aufweisen können. Daher wird ein scale-up in den Pilotmaßstab bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Untersuchungen durchgeführt. So soll vermieden werden, daß nach langen Voruntersuchungen das ausgewählte System dann nicht scale-up fähig ist[140]. Im technischen Einsatz des D_2EHPA (s. Abb. 5-11) kommt es zu keinen Betriebsstörungen in Form von Phasendurchbrüchen oder Mulmbildung. Die Extraktion von L-Phe im Pilotmaßstab funktioniert bei vollständiger Rückextraktion der Aminosäure zufriedenstellend (s. Abb. 5-14).

Neben den guten Ergebnissen im technischen Maßstab fällt auch die Überprüfung der Biokompatibilität positiv aus. Dazu werden kleine Mengen des Extraktionsmittels als Pulse in Fermentationen im Zulaufverfahren gegeben. Die Fermentationen werden im Miniaturmaßstab in pH geregelten Schüttelkolben durchgeführt. Bei einem 100 %-Puls (s. Abb. 5-32) wird etwa 25 % mehr Biomasse gebildet als in den Referenzfermentationen. Im

selben Experiment fällt jedoch die Produktbildung mit D_2EHPA Puls auf 50 % des Referenzwertes ab. Diese starke Inhibierung der Produktivität macht einen integrierten Einsatz der Reaktivextraktion mit D_2EHPA unmöglich. Aufgrund der Tatsache, daß der Carrier immer verdünnt eingesetzt wird, entspricht der 100 %-Puls nicht der tatsächlich eingetragen Menge an Carrier. Daher werden die Toxizitätstests wie bei DNNSA mit geringeren Extraktionsmittel-Konzentrationen wiederholt. Laut Literaturangaben[128] hängt die Löslichkeit des D_2EHPA in Wasser stark von der Carrierkonzentration im Lösungsmittel und dem gewählten pH-Wert des Raffinats ab. Wie in Abb. 5-23 zu sehen ist, liegt dieser Wert im pH-Bereich der Fermentation (pH 6,8) und bei einem D_2EHPA Gehalt zwischen 5 %v/v und 30 %v/v immer unter 20 mg/l. Eigene Messungen in der Pilotanlage ergaben bei einem Carrieranteil von 10 %v/v und pH 6,8 einen Eintrag des D_2EHPA in die wäßrigen Phasen von ca. 17 mg/l (s. Abb. 5-22). In den folgenden Toxizitätstests wird daher ein Puls gemäß der Literaturangaben für 10 %v/v und 20 %v/v gegeben. Als zusätzlicher Ansatz wird eine Meßreihe mit der doppelten Löslichkeit („200 %“) durchgeführt. Wie Abb. 5-35 zeigt hat der 200 %-Puls einen weitgehenden Zusammenbruch der L-Phe-Produktion zur Folge. Der 10 % Puls steigert die Produktivität um etwa 30 %. Der 20 % Puls hat keinen Einfluß auf die Produktivität. Bei einem technischen Einsatz von D_2EHPA zur integrierten Produktabtrennung in einem Konzentrationsbereich von 10 %v/v bis 20 %v/v sind also keine negativen Einflüsse auf die Produktivität zu erwarten.

Die Ergebnisse der Untersuchungen im Miniaturmaßstab werden im Laborreaktor verifiziert. Diese Fermentationen werden ebenfalls im Zulaufverfahren durchgeführt. Das Arbeitsvolumen beträgt dabei 5 l. Im Gegensatz zu den oben gezeigten Ergebnissen wird der Carrier jedoch nicht als Puls dosiert. Statt dessen werden entsprechend der Löslichkeit 25 mg/l D_2EHPA in das Permeat der Filtration gegeben und zurück in den Fermenter geleitet. Auf diese Weise sollte der Eintrag des Extraktionsmittels möglichst ähnlich zu dem verlaufen, was im integrierten Prozeß zu erwarten ist. Die Ergebnisse dieser Ansätze und der Vergleich mit den Referenzfermentationen liefern ähnliche Ergebnisse wie bereits im Miniaturmaßstab gezeigt. Die gebildete Biomasse ist mit Carriereintrag jedoch etwas geringer als die der Referenz (s. Abb. 5-36 und Abb. 5-38). Dieser Effekt ist bei pulsweiser Zugabe gerade andersherum. Im Schüttelkolben ist die optische Dichte mit D_2EHPA Zugabe höher als die der Referenz (s. Abb. 5-32). Der positve Effekt auf die Produktbildung bestätigt sich im Labormaßstab. Nach einem kurzen Einbruch der Produktbildungsrate steigt diese auf den Referenzwert (0,07 g/gh) an und hält sich dort länger auf hohem Niveau. Das resultiert in einem beinahe doppelt so hohen Produkttiter zum Ende der Fermentation. Die positiven Ergebnisse der Schüttelkolbenansätze können also im Labormaßstab durch die sukzessive D_2EHPA Zugabe bestätigt werden.

Aufgrund der guten Ergebnisse sowohl in satzweisen Extraktionen als auch im technischen Einsatz und in den Toxizitätstests, wird im weiteren Verlauf der Arbeit ausschließlich mit dem Stoffsystem D_2EHPA in Kerosin als Extraktionsphase gearbeitet.

Die biologischen Ursachen für die interessanten Wechselwirkungen der *E. coli*-Zellen mit dem Extraktionsmittel werden in einem eigenen Kapitel diskutiert.

7.1.5 Einfluß der L-Phenylalaninkonzentration

Bei einem Aufarbeitungsprozeß gilt es, das gewünschte Produkt möglichst vollständig aus der Fermentationslösung zu entfernen. Das gilt uneingeschränkt auch für integrierte Ansätze. Daher wird in satzweisen Experimenten die Konzentrationsabhängigkeit der Extraktion vom vorgelegten L-Phe untersucht. In Abb. 5-7 ist der Extraktionsgrad über der Phenylalaninkonzentration aufgetragen. Die Extraktion beginnt mit einer Konzentration von etwa einem Gramm pro Liter. Der Extraktionsgrad steigt dann bis auf 45 % für eine Konzentration von 5 g/l an. Oberhalb von 5 g/l bleibt der Extraktionsgrad konstant, und die in Abb. 5-9 gezeigten Sorptionsisothermen steigen linear an. Mit 1 g/l scheint eine Grenzkonzentration erreicht zu sein. Unterhalb dieser Schwelle reicht die Konzentration an L-Phe im Raffinat nicht mehr aus, um das Proton vom Carrier zu verdrängen.

Den Übergangsbereich zwischen Reaktions- und Transportlimitierung bezeichnet man als Mischkinetik. In diesem Fall wird der Stoffübergang sowohl von der Reaktion als auch vom Transport beeinflußt. Dabei besteht zwischen Stofftransport und Konzentration ein linearer Zusammenhang, während die Reaktionsrate proportional zum Produkt der Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer verläuft. Zwischen 1 g/l und 5 g/l kann eine Reaktionslimitierung angenommen werden, die von der Konzentration der Reaktionspartner abhängt. Die Berechnung des Gleichgewichts (Kap. 5.1.7) zeigt anhand des linearen Verlaufs der Sorptionsisotherme im Beladungsdiagramm, daß die Extraktion oberhalb von 5 g/l bis 30 g/l vorgelegtem L-Phe konzentrationsunabhängig ist.

Aufgrund der Ergebnisse sollte es dennoch möglich sein, auch in der Pilotanlage das vorgelegte L-Phe bis auf eine Konzentration von 1 g/l abzutrennen. Damit wäre ein technischer Einsatz aus Sicht der Ausbeute zufriedenstellend.

7.1.6 Reversibilität der Extraktion

Eine vollständige Rückextraktion des Produkts vom Extraktionsmittel ist zwingend erforderlich, da ansonsten Ausbeuteverluste durch die Aufarbeitung auftreten, die vermeidbar wären. Wie die Untersuchungen zu Aliquat 336 gezeigt haben, kann es durch irreversible Carrierbeladung zu Stoffsenken in der organischen Phase kommen. In satzweisen Experimenten wird die organische Phase (10 %v/v D_2EHPA in Kerosin) viermal hintereinander zur Extraktion eingesetzt. Die Rückextraktion erfolgt mit H_2SO_4. Abb. 5-8 zeigt, daß der Carrier vollständig regeneriert werden kann und der Extraktionsgrad von ca. 45 % in allen Ansätzen erreicht wird. In der Hohlfaserextraktion ist demnach ein Verlust des L-Phe durch irreversible Carrierbeladung nicht zu erwarten. Wie in Abb. 5-14 zu sehen ist, kann die Massenbilanz in der Pilotanlage vollständig geschlossen werden, und es treten keine Produktverluste auf.

7.1.7 Einsatz von Extraktionsmitteln unterschiedlicher Reinheit

Vergleicht man die mit dem Stoffsystem D_2EHPA erzielten Ergebnisse in Kapitel 5.1 mit denen der Kapitel 5.1.4 bis 5.1.6, fallen die erheblichen Unterschiede im Extraktionsgrad auf. In den Vorversuchen liegt der Extraktionsgrad bei 76 %. In den folgenden Experimenten werden jedoch nur noch maximal 45 % erreicht. Während dieser Arbeit wurde der D_2EHPA Lieferant gewechselt. Während die Vorversuche mit kleineren Mengen von einem Laborchemikalien Lieferanten (Fluka) durchgeführt wurden, kam im weiteren Verlauf Carrier aus größeren Gebinden (Hoechst) zum Einsatz. Aufgrund dieser starken Diskrepanzen werden die beiden Rohstoffe einer ^{31}P-NMR-Messung unterzogen.

In Abb. 7-1 sind die beiden erhaltenen Spektren einander gegenübergestellt. Im oberen Spektrum des Fluka-Produkts ist deutlich zu erkennen, daß zwei Phosphorsäureester

vorliegen. Einmal das Dimer (2,8 ppm) und zum anderen das Monomer (3,7 ppm). In dem Spektrum des Hoechst-Produkts findet sich nur ein Peak für das Dimer bei 2,8 ppm. Tatsächlich besteht das Fluka-Produkt zu 68 % aus dem monomeren und zu 32 % aus dem dimeren Phosphorsäureester. Das Hoechst Produkt besteht dagegen nur aus dem Dimer. Das erklärt auch die wesentlich höheren Extraktionsleistungen. Das Dimer ist mit 322 g/mol erheblich schwerer als das Monomer (194 g/mol).

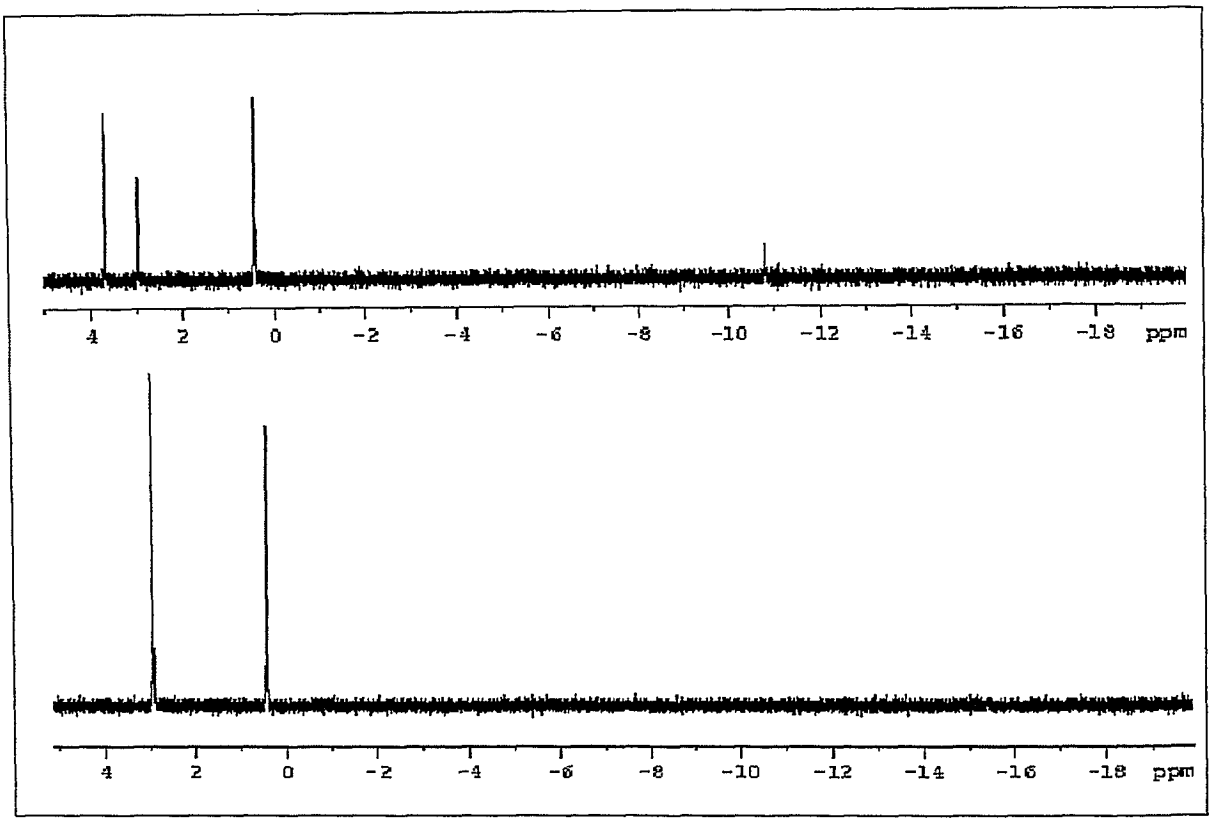


Abb. 7-1: ^{31}P-NMR Spektrum der beiden verwendeten D_2EHPA Lösungen (oben: Produkt der Fa. Fluka; unten: Produkt der Fa. Hoechst)

Bei einem Carrieranteil von 10 g pro 100 ml bedeutet das beim Hoechst Produkt einen molaren Anteil von 31,06 mmol/100 g. Bei Fluka liegt dieser Anteil bei 45 mmol/100 g. Bei der Extraktion des Phenylalanins reagiert die protonierte Ammoniumgruppe des L-Phe mit der Enolatgruppe des Esters, die durch diese Reaktion ein Proton abgibt. Während das Dimer ein Enolation bilden kann, ist das Monomer in der Lage, zwei Enolatfunktionen zu bilden. Es kann demzufolge zwei Phenylalanin binden und das Dimer nur eins. Dem Hoechst Produkt stehen im Vergleich zum Fluka-Produkt demzufolge nur 45 % der Bindungstellen für das L-Phe zur Verfügung. Die starken Unterschiede in den Extraktionen mit verschiedenen Phosphorsäureestern lassen sich also mit der unterschiedlichen Reinheit der Extraktionsmittel erklären. Trotz der geringeren Extraktionsleistung wird in dieser Arbeit mit dem reinen D_2EHPA-Produkt der Firma Hoechst gearbeitet. Das hat verschiedene Vorteile. Für die Charakterisierung der Extraktion und der Anlage ist ein definiertes Stoffsystem nötig. Die kleinen Mengen, in denen das Fluka Produkt erhältlich ist, würden eine regelmäßige Qualitätskontrolle jeder einzelnen Charge per ^{31}P-NMR erforderlich machen. Für die Entwicklung eines Verfahrens bis in den Pilotmaßstab ist es zudem zwingend erforderlich, einen sicheren Lieferanten für Kilogramm-Mengen zur Verfügung zu haben.

Für eine spätere industrielle Anwendung sollte jedoch die Erhöhung der Extraktionsleistung um über 55 % nur durch die Verwendung des Gemisches aus Di-2-Ethylhexylphosphorsäureester und 2-Ethylhexylphosphorsäureester in Erinnerung bleiben. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte allerdings noch kein Lieferant gefunden werden, der das reine Monomer in größeren Mengen liefern kann.

7.1.8 Extraktionsausbeute bei verschiedenen Carrierkonzentrationen

Die Extraktionsausbeute beim Einsatz verschiedener Konzentrationen an D_2EHPA in Kerosin ist in Abb. 5-5 über dem pH-Wert aufgetragen. Der Extraktionsgrad steigt mit dem Carrieranteil linear an. Die Veränderung des pH-Wertes hat oberhalb der Säurekonstante des Carriers ($pK_A = 3,9$) keinen Effekt und E bleibt konstant. Durch eine Änderung des Carrieranteils läßt sich das Gleichgewicht in der Extraktion erheblich beeinflussen. Die Änderung des Verteilungskoeffizienten durch Variation des D_2EHPA Anteils wird am besten deutlich, wenn man die Sorptionsisothermen vergleicht. Aus den satzweisen Experimenten konnte der Verteilungskoeffizient errechnet werden, so daß die Darstellung der satzweisen Extraktionen in Beladungsdiagrammen möglich ist. Neben Abb. 5-9 für 10 %v/v D_2EHPA in Kerosin sind in Abb. 9-2 bis Abb. 9-4 im Anhang die Beladungsdiagramme für weitere Konzentrationen berechnet worden.

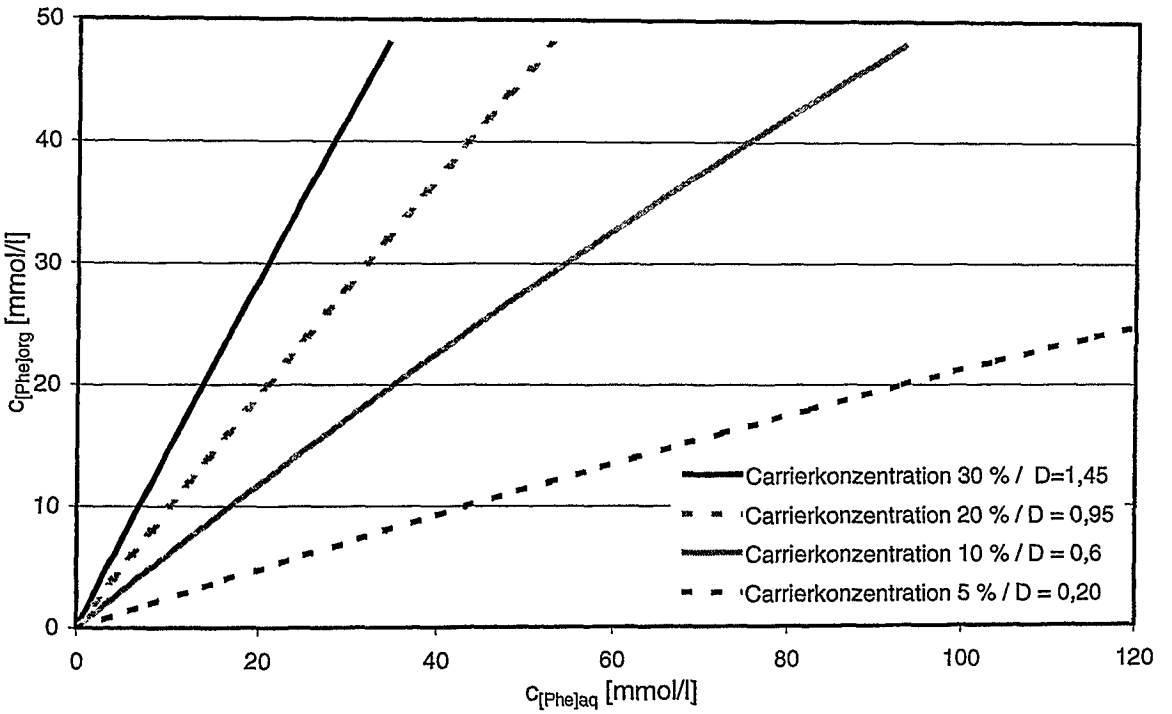


Abb. 7-2: Beladungsdiagramm für verschiedenen D_2EHPA Anteile bei einem Extraktions pH von 5,8

In Abb. 7-2 sind für pH 5,8 die berechneten Sorptionsisothermen aufgetragen. Bei Erhöhung der L-Phe Konzentration stellt sich ein Sättigungseffekt bei der Extraktion ein. Dieser Effekt ist anhand der Sättigungstendenzen, wie sie in den Sorptionsdiagrammen zu erkennen sind bereits festzustellen. Da hier eine Zunahme des Sättigungseffekts mit steigender L-Phe Konzentration zu erwarten ist und oberhalb einer Konzentration von 20 g/l L-Phe (entspr. 120 mmol/l) keine Daten vorliegen, sollten die Sorptionsisothermen ab einer L-Phe Gesamtmenge von 120 mmol/l entsprechend sensibel bewertet werden. Es ist deutlich zu erkennen, daß der Anteil des Extraktionsmittels einen erheblichen Einfluß auf den Verteilungskoeffizienten hat. Die Extraktionsleistung in Gleichgewichtsreaktionen und in der Pilotanlage könnte also theoretisch weiter erhöht werden, indem man den Carrieranteil erhöht. Wie bereits gezeigt werden konnte, sind dem jedoch Grenzen gesetzt. Bis zu einem Carrieranteil von 20 %v/v ist die Produktivität der *E. coli*-Zellen ebenso hoch wie in Referenzansätzen. Höhere Konzentrationen sollten nicht gewählt werden.

Beim Einsatz der verschiedenen D_2EHPA Konzentrationen in der Extraktionsanlage bestätigt sich der deutliche Einfluß auf die Extraktionsleistung. Nach ca. einer Stunde Extraktionsdauer kann mit einem D_2EHPA Gehalt von 30 %v/v etwa 70 % des vorgelegten L-Phe extrahiert werden (s. Abb. 5-15). In der gleichen Zeit extrahiert eine 10-prozentige

organische Phase nur etwa die Hälfte. Während jedoch in satzweisen Extraktionen mit einer Verdopplung des Carrieranteils von 5 %v/v auf 10 %v/v auch eine Verdopplung der Extraktionsleistung einhergeht, ist dieser Effekt im technischen Einsatz nicht so stark. Der Stoffübergangskoeffizient β steigt bei einer Verdreifachung des D_2EHPA (s. Abb. 5-17) nur um etwa 32 % an. Durch die Erhöhung der Carrierkonzentration werden die Gradienten an den Phasengrenzflächen steiler. Dadurch kommt ein verbesserter Stofftransport zustande. Diese Erhöhung fällt jedoch aufgrund der laminaren Grenzschichten in der Hohlfaserextraktionsanlage geringer aus.

7.2 Einfluß des pH-Wertes

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Extraktion wurde bereits mehrfach angesprochen und soll hier diskutiert werden. Laut Literaturangaben sind die besten Extraktionskoeffizienten für die Extraktion von L-Phe mit Kationentauschern im Sauren zu erwarten, da hier die Aminosäure vollständig protoniert, also als Kation, vorliegt. Die Dissoziation des L-Phe ist in Abb. 2-20 dargestellt. Der erwartete Mechanismus ist der Couple-Counter-Transport, wie er in Abb. 2-13 gezeigt ist. Dabei ist A das protonierte L-Phe-Kation, C der Carrier und D das Gegenion in Form eines Protons.

Die bisher gezeigten Experimente haben jedoch deutlich gemacht, daß die Extraktion im neutralen und basischen pH-Bereich erheblich besser funktioniert als im Sauren. Auch die Ergebnisse zur Gleichgewichts- und Sorptionsisothermenberechnung unterstützen dieses Resultat.

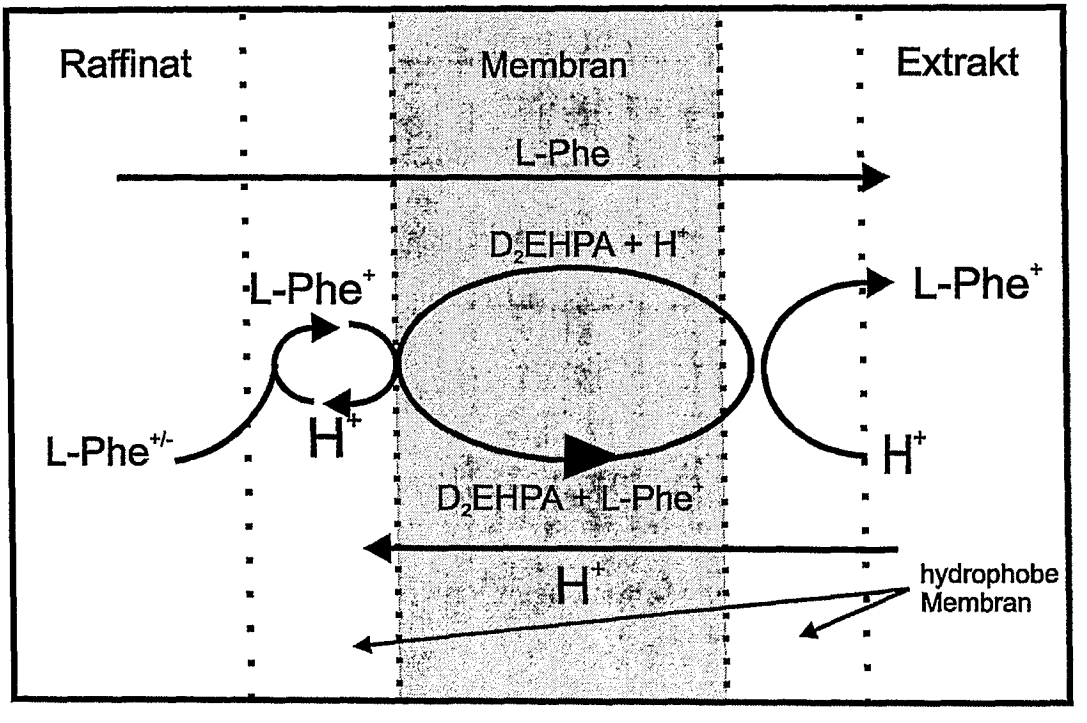


Abb. 7-3: Mechanismus der Phenylalaninextraktion mit Protonierung in der Phasengrenze

Daher sollen die Vorgänge bei der Extraktion auf molekularer Ebene durch eine mechanistische Modellvorstellung beschrieben werden. Abb. 7-3 zeigt eine Möglichkeit wie der Stoffübergang im neutralen pH-Bereich ablaufen könnte. Grundsätzlich gibt es im pH-Bereich zwischen 4 und 8, d.h. wenn nahezu ausschließlich Zwitterionen vorliegen, zwei Möglichkeiten für den Stoffübergang. Zum Einen besteht für die Zwitterionen die Möglichkeit direkt an die protonisierte Spezies des Carriers zu addieren. Die andere Möglichkeit ist ein Proton in der wäßrigen Phase zu addieren und so als L-Phe-Kation an den Carrier zu binden. Formal ist der Übergang eines L-Phe-Kations unter Freisetzung eines Protons des

Carriers dasselbe wie die Addition eines Zwitterions an den protonisierten Carrier. Für die Extraktion zwischen pH 4 und 8 gilt dann, daß es durch die Extraktion des L-Phe nicht zu einer pH-Wert Änderung kommen kann, da die Protonen entweder nicht in die wäßrige Phase gelangen oder aber nach der Freisetzung in die wäßrige Phase ein L-Phe$^{+/-}$ protonieren und so bei Extraktion des Aminosäure-Kations die Raffinatphase wieder verlassen. Im Gegensatz dazu fällt der pH-Wert bei einer Extraktion unterhalb einem pH von 4, durch die dann zunehmend vorliegenden und extrahierten Kationen, ab. Bei Extraktion aus einem sauren Raffinat liegen in Abhängigkeit des pH-Niveaus Kationen und Zwitterionen vor (vergl. Abb. 2-20) Wird ein Kation in die organische Phase extrahiert, geht dafür ein Proton in das Raffinat über und reduziert (in Abhängigkeit der Pufferkapazität) den pH-Wert. Dieser Effekt konnte bei den satzweisen Extraktionen mit D_2EHPA (Kapitel 5.1.1.) beobachtet werden.

In Abb. 7-3 ist eine Variante des oben beschriebenen Mechanismus dargestellt. Es ist jedoch nicht möglich aufgrund der experimentellen Daten die eine oder die andere Variante zu favorisieren. Die Protonierung des L-Phe-Zwitterions wie sie in Abb. 7-3 dargestellt ist, kann in der Phasengrenzschicht auf wäßriger oder organischer Seite oder in der Phasengrenze stattfinden. Zur Veranschaulichung ist die Phasengrenze (bzw. die Membran) entsprechend überdimensioniert dargestellt.

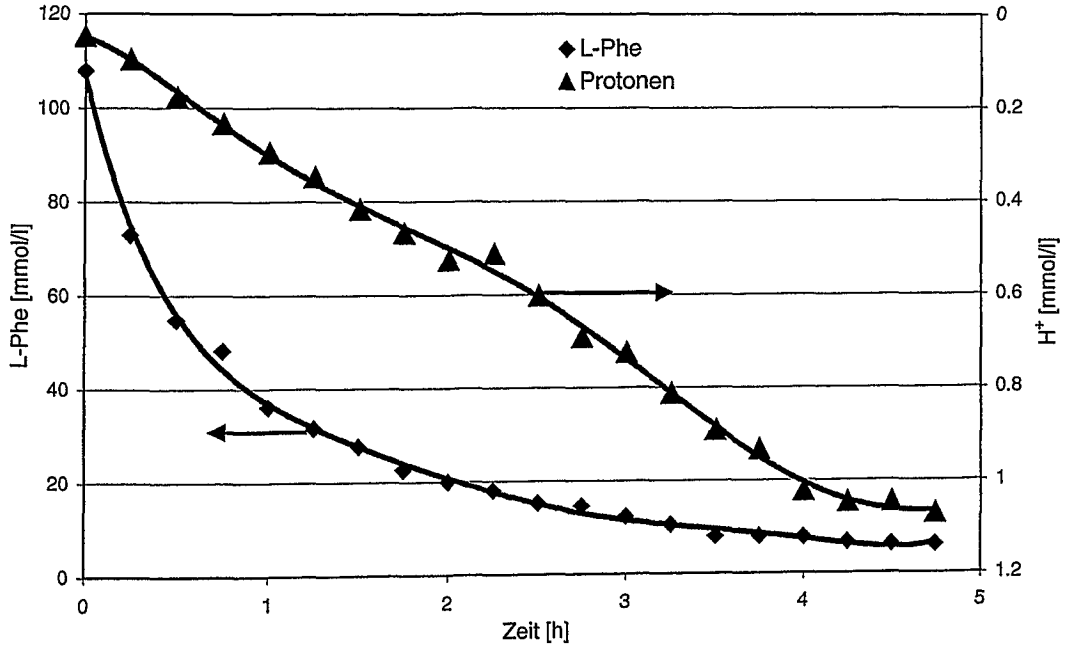


Abb. 7-4: Verlauf der L-Phe- und Protonenkonzentrationen während einer Hohlfaserextraktion (rechte Ordinate invers und 100-fach überhöht / Änderung der Protonenkonzentration entspricht einer pH-Wert-Änderung von 4,3 auf 3)

Anhand des pH-Verlaufs bzw. der Protonenkonzentration eines Extraktionsexperiments in der Technikumsanlage (Abb. 7-4) lassen sich die beschriebenen Annahmen zum Stoffübergang weiter stützen. In Abb. 7-4 ist die Änderung der Protonenkonzentration zwischen pH 4,3 und 3 im Verhältnis zur extrahierten L-Phe Menge über der Zeit aufgetragen. Die Pufferkapaziät der Aminosäure hat zwischen pH 4 und 3 einen geringen Einfluß auf die Abhängigkeit zwischen pH-Wert und tatsächlich vorhandenen Protonen. Das Ergebnis in Abb. 7-4 kann als ein weiteres Indiz für die Richtigkeit der Thesen zum Mechanismus des Stoffübergangs angesehen werden.

Unter Berücksichtigung dieser Thesen, ist die Dissoziation des L-Phe in Abhängigkeit des pH-Werts der Raffinatphase nicht für den Grad der Extraktion ausschlaggebend. Viel eher ist der pK_S-Wert des Carriers (=3,9) in Verbindung mit dem pH-Wert des Raffinats und damit

der Grad der möglichen Deprotonierung des D_2EHPA für hohe Extraktionsleistungen ausschlaggebend. Die in Abb. 5-2 gezeigten hohen Extraktionsgrade (76 %) bei geringem L-Phe-Kationen-Anteil im Raffinat (<10 %) lassen sich durch den Mechanismus gut erklären.

Das erklärt die steigende Extraktionsleistung mit steigendem pH-Wert im Raffinat. Da die pH-abhängige Dissoziation des L-Phe im Inneren der Phase für die Extraktion nach oben beschriebenen Mechanismen nicht relevant ist, hat nur die Konkurrenz zwischen Protonen und L-Phe am Carrier einen Einfluß auf den Extraktionsgrad.

Bei der bisherigen Betrachtung des pH-Einflusses und der Änderung der Protonenkonzentration wurde die Pufferkapazität des Systems außer Acht gelassen. Die Änderung des pH-Wertes einer Lösung kann mit Hilfe der Pufferkapazität bestimmt werden. Dem vorliegenden System wird zwar keine Säure zugegeben, jedoch ändert sich durch die Extraktion bei diskreten pH-Werten die Menge der Wasserstoffionen in der wäßrigen Phase. Da die Aminosäure sowohl eine Carboxyl- als auch eine Aminogruppe besitzt, können diese als Säure-Base-Paare fungieren und die freiwerdenden Wasserstoffionen abfangen[141]. Aufbauend auf eine Wasserstoffionenbilanz läßt sich der freie Anteil der gebildeten Wasserstoffionen $F[H^+]$ in einer Aminosäurelösung mit Gl. 7-1 berechnen.

Gl. 7-1
$$F[H^+] = (1 + \frac{1}{1+10^{pH-pK_S}} - \frac{1}{1+10^{pK_B-pH}})$$

In Abb. 7-5 ist der freie Anteil der gebildeten Wasserstoffionen in einer L-Phe-Lösung in Abhängigkeit des pH-Wertes aufgetragen. Unterhalb von einem pH-Wert von 2 liegt ein Überschuß an Wasserstoffionen vor, so daß es zu einer starken Konkurrenz zur Aminosäure um den Platz am Carrier kommt. Im Gegenzug ist die Affinität der Protonen auf dem Carrier zum Raffinat relativ gering. So läßt sich der vergleichsweise geringe Extraktionsgrad in tiefen pH-Bereichen, wie er in Abbildung 5-5 zu erkennen ist, erklären. Anhand der starken Steigung der Kurve zwischen pH 1 und 3 und zwischen pH 8 und 10 läßt sich gut der Pufferbereich der Aminosäurelösung ablesen.

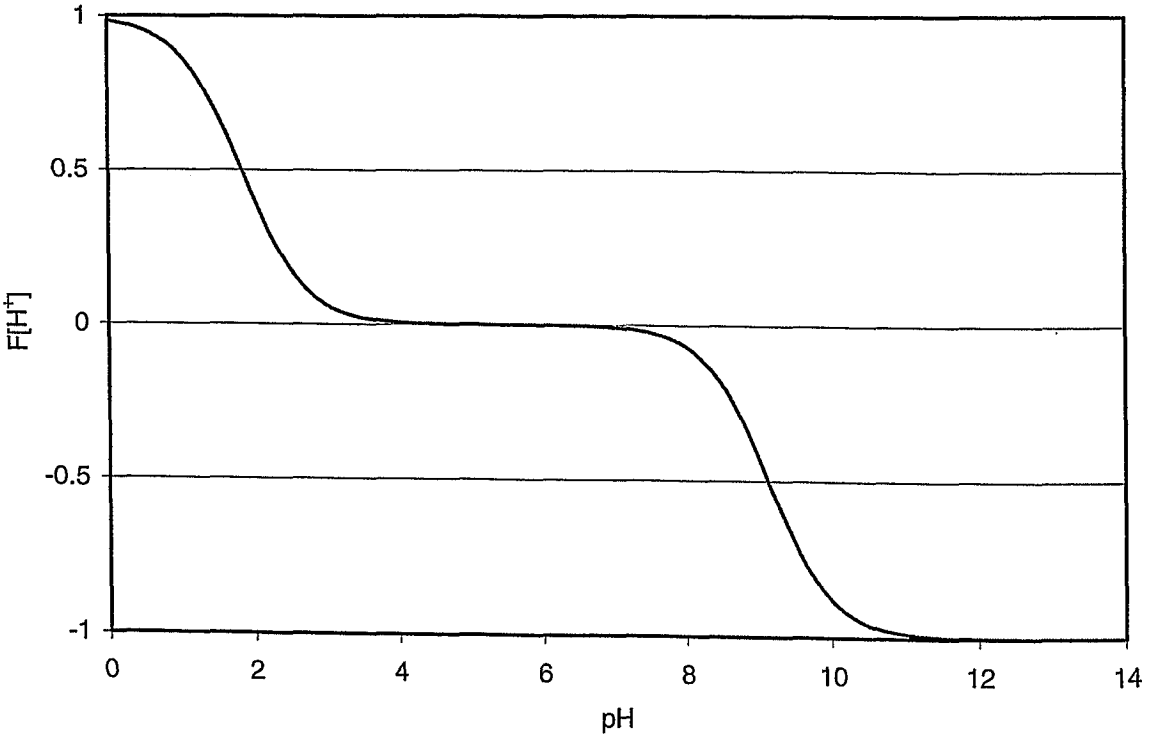


Abb. 7-5: Freier Anteil F[H+] der gebildeten Wasserstoffionen in Abhängigkeit vom pH-Wert

Oberhalb von pH 2 bis pH 8 liegen keine freien Wasserstoffionen vor, so daß in diesem Bereich keine Konkurrenz zwischen Protonen und Aminosäure zu erwarten ist. Der Extraktionsgrad sollte also im Vergleich zum Sauren steigen, sich jedoch zwischen pH 2 und 8 nicht wesentlich ändern. Die Ergebnisse in Abb. 5-5 bestätigen dies.

Oberhalb von pH 9 liegt eine Senke an Wasserstoffionen vor. Es kann demnach davon ausgegangen werden, daß keine Konkurrenz mehr zwischen Protonen und L-Phe besteht. Daher ist in diesem Bereich eine weitere Erhöhung der Extraktionsleistung zu erwarten. Wie in Abbildung 5-5 zu sehen ist, fällt diese Erhöhung vergleichsweise gering aus. Auch die Sorptionsisothermen im Beladungsdiagramm (Abb. 5-8) zeigen keine erhebliche Änderung bei Erhöhung des pH-Wertes vom neutralen in den alkalischen Bereich. Dieser Effekt läßt sich ebenfalls mit dem oben beschriebenen mechanistischen Modell erklären. Im Alkalischen müssen die vorliegenden L-Phe Anionen zweifach protoniert werden, um an den Carrier zu binden. Pro Carrier wird jedoch nur ein Proton bereitgestellt. Das bedeutet, daß zur Bildung des Carrier-Aminosäure-Komplexes ein weiteres Proton aus der Lösung entzogen und der pH-Wert weiter nach oben verschoben wird. Da der Widerstand gegen diese Reaktion mit Erhöhung des pH-Wertes immer größer wird, fällt diese Erhöhung in Relation zu der pH-Verschiebung vom Sauren ins Neutrale geringer aus.

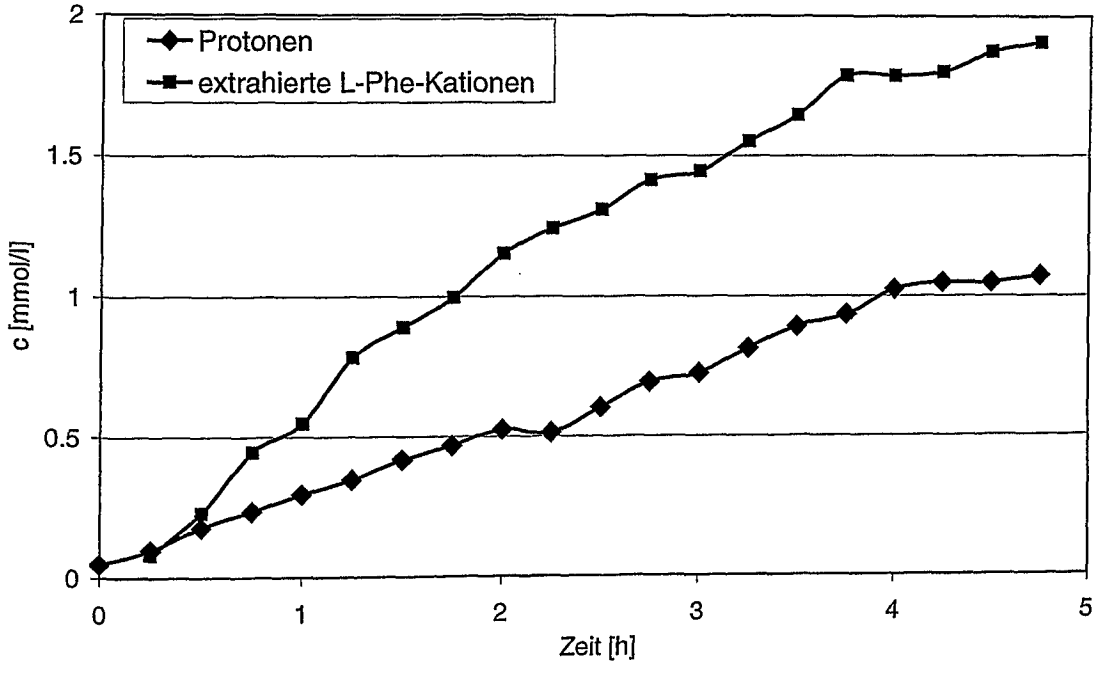


Abb. 7-6: Gegenüberstellung der Konzentrationsänderung von Protonen und L-Phe-Kationen

Zur Interpretation der pH-Werte bzw. der Protonenkonzentration in Abb. 7-4 während der Extraktion soll Abb. 7-6 herangezogen werden. Aus der Konzentrationsänderung des L-Phe und dem entsprechenden pH zum jeweiligen Zeitpunkt läßt sich mit Gl. 2-15 der Anteil des Phenylalanins abschätzen, der als Kation im Raffinat vorlag und in den Extrakt übergegangen ist. Da für diesen Anteil keine Protonierung vor dem Übergang auf den Carrier notwendig war, muß dafür die entsprechende Menge an Protonen in das Raffinat übergegangen sein. Wie in Abb. 7-6 zu sehen ist, liegen die Mengen an übergehenden Kationen und Protonen im Gegensatz zu Abb. 7-4 in derselben Größenordnung. Die geringe quantitative Diskrepanz läßt sich mit der Ungenauigkeit der pH-Wert-Messung und der bereits einsetzenden Pufferwirkung der Aminosäurelösung interpretieren. Ein weiterer Grund ist die Löslichkeit des Carriers in Wasser, welche eine zusätzliche Absenkung des pH-Wertes hervorruft. Die gezeigte Beobachtung der Änderung der Protonenkonzentration in Zusammenhang mit der Menge an übergehenden -bereits als Kation vorliegenden- L-Phe-Ionen steht im Einklang mit den oben gemachten Thesen zum Mechanismus des Stoffübergangs.

Die Extraktion von Phenylalanin mit D_2EHPA und H^+-Gegenionen hat im Hinblick auf den oben beschriebenen Mechanismus erhebliche Vorteile. Die Extraktion ist in weiten Bereichen pH-Wert unabhängig und der pH des Raffinats wird im Bereich des Fermentations-pH durch den Übergang der Gegenionen nicht wesentlich abgesenkt, da diese an dem $L\text{-}Phe^+$ wieder extrahiert werden.

7.3 Auswahl der Gegenionen

Zur Rückextraktion des D_2EHPA in den Extrakt werden verschiedene Lösungen von Gegenionen überprüft. Es kommen $(NH_4)_2SO_4$, KOH, NaOH, KCl und H_2SO_4 zum Einsatz. Die experimentellen Ergebnisse für alle Gegenionen sind in Abb. 5-4 zusammengefaßt.

7.3.1 $(NH_4)_2SO_4$

Bei Verwendung von ein und zwei molarer Ammoniumsulfatlösung werden Rückextraktionsgrade von 19 % und 28 % erreicht. Es kommt zu keiner Eintrübung der Phasen. Die geringen Werte können mit der Molekülgröße und der geringen Affinität des NH_4 zur organischen Phase zusammenhängen. Die große Hydrathülle des Moleküls erschwert vermutlich den Übergang aus der wäßrigen Extraktphase in die organisch Membranphase. Wegen der räumlichen Ausdehnung des Moleküls kann das L-Phe außerdem nicht vollständig vom Carrier verdrängt werden. Aufgrund der niedrigen Werte und dem vergleichsweise hohen Preis von Ammoniumsulfat wird nicht weiter mit dieser Extraktphase gearbeitet.

7.3.2 KCl

Beim Einsatz von KCl kommt es zu keiner Eintrübung der Phasen. Das als Gegenion eingesetzte Kalium-Kation hat gegenüber dem Ammonium (s.o.) einige Vorteile. Zum einen hat es aufgrund seiner geringeren Größe einen höheren Diffusionskoeffizienten. Die Größe erleichtert auch die Verdrängung des L-Phe vom Carrier. Schließlich ist die Affinität zur organischen Phase aufgrund der kleinen Hydrathülle des Ions höher als beim Ammonium. Trotz dieser Vorteile kann beim Einsatz KCl nur ein Extraktionsgrad von 28 % erreicht werden.

Der technische Einsatz der KCl-Extraktphase in der Pilotanlage verläuft problemlos (Abb. 5-11). Es kommt zu keiner Eintrübung der Phasen oder zu Phasenbrüchen, und das Experiment läuft sieben Stunden stabil. Die Analyse der Proben zeigt jedoch eine Bilanzlücke von 20 % und damit eine unvollständige Rückextraktion des L-Phe. Vermutlich ist die Affinität zum Chlorid-Ion in der wäßrigen Phase höher als zum D_2EHPA in der organischen[142]. Daher kann die Aminosäure durch das Kalium nicht vom Carrier verdrängt werden, was auch die geringen Extraktionsgrade in satzweisen Extraktionen erklärt.

Für einen technischen Einsatz kommt KCl wegen der unvollständigen Regeneration des Carriers damit nicht in Frage.

7.3.3 KOH

Beim Einsatz von KOH werden sehr hohe Extraktionsgrade gemessen. Der Effekt durch die Konzentrationsänderung ist hier sehr deutlich. Mit ein molarer KOH werden 45 % und mit zwei molarer 80 % rückextrahiert. Die Ausbildung von Mikroemulsionen in der wäßrigen Phase könnte jedoch bereits hier auf Probleme beim technischen Einsatz hinweisen.

Beim Einsatz in der Pilotanlage kommt es bereits zu Beginn des Experiments zu einer starken Eintrübung der organischen Phase. Zwar kann der Niederschlag zunächst über einen Zyklon abgetrennt werden, bildet sich im weiteren Verlauf jedoch neu und manifestiert sich in Form eines schwerlöslichen Gels. Dieses Gel kann durch Änderung der Temperatur teilweise, jedoch nicht vollständig gelöst werden. Die Analyse der Proben (s. Abb. 5-12)

zeigt, daß zwar eine Extraktion, jedoch keine Rückextraktion stattgefunden hat. Vermutlich bleibt das L-Phe irrerversibel in dem Gel gebunden.

Bei den beobachteten Effekten handelt es sich um sogenannte Winsor Systeme[143], die bereits 1987 von Kahlweit[144] beobachtet wurden. Es werden drei verschiedenen Typen von Winsor Systemen unterschieden.

Winsor 1: zweiphasig; Ölphase neben Mikroemulsion,

Winsor 2: zweiphasig; wäßrige Phase neben Mikroemulsion,

Winsor 3: dreiphasig; Öl, Mikroemulsion, wäßrige Phase.

Welches System vorliegt, wird durch die Salzkonzentration bestimmt. Erhöht man in Winsor 2 Systemen die Salzkonzentration weiter, kommt es zur Gelbildung. Nach Ausbildung hochviskoser Gele kann die Hohlfaserextraktionsanlage nicht mehr betrieben werden und muß aufwendig gereinigt werden, da sowohl Mantelraum als auch Hohlfasern verstopfen. Für den Einsatz von D_2EHPA zur Schwermetallextraktion hat Geist[115] Konzentrationsbereiche zur Vermeidung von Winsor Systemen ermittelt. Unterhalb von 0,4 mol/l NaOH im Extrakt kommt es bei der Extraktion von Nickel zu keiner Ausbildung von Winsor Systemen.

7.3.4 NaOH

Entsprechend den Daten zur Ausbildung von Winsor Systemen, kommt es bei satzweisen Extraktionen mit ein und zwei molarer Natronlauge zu Eintrübungen in den Phasen (s. Kap. 5.1.3). Die NaOH Konzentration hat keinen signifikanten Einfluß auf den Extraktionsgrad; es werden Werte zwischen 60 % und 66 % gemessen.

Zur Vermeidung der Gelbildung[145] wird in der Pilotanlage die Salzkonzentration drastisch reduziert. Im Extrakt kommt 0,3 molare NaOH-Lösung zum Einsatz. Abb. 5-12 zeigt den Konzentrationsverlauf in den Phasen und die Massenbilanz während des Experiments. Während der ersten Stunde arbeitet die Pilotanlage störungsfrei. Danach kommt es jedoch wiederum zu einer Eintrübung. Wie zu sehen ist, kann ab diesem Zeitpunkt kein verläßlicher Meßwert mehr ermittelt werden.

Entgegen den Angaben von Geist kommt es auch bei einer NaOH Konzentration unter 0,4 mol/l zur Ausbildung von Winsor Systemen. Das kann verschiedene Gründe haben. Durch den hohen Volumenstrom in den Fasern werden immer wieder Reaktionspartner an die Phasengrenze herangetragen. Wenn die Ausbildung der Winsor Systeme konzentrationsabhängig ist, dann kann durch den Gegenstrombetrieb ein hoher Gradient über den gesamten Modul angeboten werden. So kann es auch unterhalb der angegebenen Grenzwerte zur Bildung von Mikroemulsionen und Gelen kommen. Ein anderer Grund könnte die Vorbeladung der organischen Phase mit Phenylalanin - statt wie bei Geist mit Nickel - sein. Aufgrund der Wechselwirkungen mit den funktionellen Gruppen der Aminosäure und der tensidischen Eigenschaften kommt es schon eher zur Emulsionsbildung[146].

Um den Schwierigkeiten beim Einsatz der basischen Extraktphasen aus dem Wege zu gehen, sollen im nächsten Kapitel die Beobachtungen beim Einsatz einer sauren Extraktphase diskutiert werden.

7.3.5 H_2SO_4

Beim Einsatz von ein und zwei molarer Schwefelsäure zur satzweisen Rückextraktion kommt es zu keiner Eintrübung der Phasen. Die Extraktionsgrade liegen in einem zufriedenstellenden Bereich von ca. 65 %.

Der Einsatz dieses Stoffsystems zeigt in der Pilotanlage sehr vielversprechende Ergebnisse (s. Abb. 5-14). Die Extraktion verläuft über 4½ h stabil, und es kommt zu keinen Störungen in

Form von Phasenbruch oder Emulsionsbildung. Die Permeabilität über die Membran beträgt 7,7 g/m²h und der Stoffübergangskoeffizient β liegt bei $71{,}1*10^{-7}$ cm/s. Die Massenbilanz kann mit 100 % geschlossen werden. Es treten also keine Produktverluste in der Extraktion auf.

Entgegen der Ergebnisse der satzweisen Extraktionen kann im technischen Maßstab der Stoffübergang durch eine Erhöhung der Gegenionenkonzentration sehr wohl verbessert werden. Wie Abb. 5-17 zeigt, wird der Stoffübergangskoeffizient durch eine Verdopplung der H_2SO_4 Konzentration um etwa 20 % von $105*10^{-7}$ auf $128*10^{-7}$ cm/s erhöht. Der Grund dafür liegt wiederum im Gegenstrombetrieb der Extraktion. Im Gegensatz zur Emulsionsbildung (s.o.) hat das hier jedoch den gewünschten positiven Effekt. Durch den Gegenstrom bleibt ein konstant hoher Gradient erhalten, so daß die höhere H_2SO_4 Konzentration auch Wirkung in Form eines besseren Stoffübergangs zeigen kann. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird dadurch in Richtung der Protonierung des Carriers verschoben, so daß die Aminosäure schneller vom D_2EHPA verdrängt wird. Im Vergleich zur Verbesserung durch Erhöhung der Carrierkonzentration ist dieser Effekt jedoch eher gering. Diese geringe Erhöhung zeigt, daß die maximalen Konzentrationsgradienten an der Grenzschicht schon fast eingestellt sind.

Mit dem Extraktionsmittel D_2EHPA in Kerosin und einer schwefelsauren Extraktphase ist das Stoffsystem für die Hohlfaserextraktion im Pilotmaßstab definiert. Im folgenden werden die Hydrodynamik und die Einflüsse auf den Stoffübergang diskutiert.

7.4 Einfluß der Hydrodynamik

Im untersuchten Konzentrationsbereich zeigen die Ergebnisse sowohl für die Protonen als auch für den Carrier eine Abhängigkeit von der Konzentration und damit eine Reaktionslimitierung für den Stoffübergang. Die Phenylalaninkonzentration hat im relevanten Bereich keinen Einfluß auf den Stoffübergang und läßt für die Extraktion eine Transportlimitierung erwarten. Der Einfluß der Hydrodynamik wird daher in allen drei Phasen untersucht. Dabei wird jeweils nur der Volumenstrom der betreffenden Phase variiert, während alle anderen Parameter konstant sind.

Die Variation des Volumenstroms im Raffinat zwischen 160 l/h und 500 l/h zeigt bis 250 l/h eine Abhängigkeit des Stoffübergangs von der Hydrodynamik (s. Abb. 5-18). Oberhalb von 250 l/h ist diese Abhängigkeit nicht zu erkennen. Vermutlich handelt es sich hier um den Übergangsbereich zwischen Reaktions- und Transportlimitierung.

Die Variation des Volumenstroms in der organischen Phase zeigt keinen Effekt auf den Stoffübergang (s. Abb. 5-19).

Die Variation des Volumenstroms im Extrakt zeigt ebenfalls keinen Effekt.

Der Stoffübergang bei der Reaktivextraktion kann durch Messungen der Kinetik in der Rührzelle und in Hohlfasermodulen untersucht werden.

7.5 Beschreibung des Stoffübergangs

Zur Beschreibung des Stoffübergangs wird der Stoffübergangskoeffizient β (Gl. 2-34) herangezogen, der sich aus der Konzentrationsänderung über der Zeit berechnen läßt.

7.5.1 Messung der Stoffübergangskinetik

Bei Messung der Stoffübergangskinetik in einer Rührzelle nach Nitsch konnte für die Extraktion eine deutliche Transportlimitierung festgestellt werden. In Abb. 5-28 steigt β von $900*10^{-7}$ cm/s bei einer Rührerdrehzahl von 100 min^{-1} auf einen Wert von $2200*10^{-7}$ cm/s für 200 min^{-1} an. Im Gegensatz dazu ist die Rückextraktion eindeutig reaktionslimitiert. Im untersuchten Drehzahlbereich ändert sich der Stoffübergangskoeffizient nicht.

Berechnet man β aus den Ergebnissen in der Pilotanlage, bestätigen sich die Ergebnisse aus der Rührzelle. Wie in Abb. 5-29 deutlich zu sehen ist, hat eine Variation der Reynoldszahl im Extrakt von 10 bis 32 keinen Effekt auf β. Der Stoffübergang der Rückextraktion ist in diesem Bereich von der Hydrodynamik entkoppelt und damit reaktionslimitiert.

Bei der Extraktion aus dem Raffinat verhält es sich anders (s. Abb. 5-29). Bis zu einer Reynoldszahl von 12 steigt der Stoffübergangskoeffizient bis auf $125*10^{-7}$ cm/s an. Eine weitere Erhöhung des Volumenstroms hat keinen Effekt. Es handelt sich also um eine Mischkinetik im Übergangsbereich zwischen Reaktions- und Transportlimitierung.

Eine Variation der Strömung im Mantelraum und damit in der organischen Membranphase hat nur einen marginalen Effekt auf den Stoffübergang (s. Abb. 5-29). Es ist davon auszugehen, daß auch hier Reaktionslimitierung herrscht.

Die gemessenen Werte für den Stoffübergangskoeffizienten stimmen mit den Literaturwerten überein. Für die Extraktion von L-Phe in Hohlfasern mit Aliquat 336 nennt Cardoso einen Wert von $\beta = 116*10^{-7}$ cm/s[94]. Mit dem gleichen Stoffsystem geben Escalante et al.[147] maximal $112*10^{-7}$ cm/s an. Für Zitronensäure-Extraktionen wird bei Basu ein Wert von $1500*10^{-7}$ cm/s genannt[58]. Der höhere Wert hat seine Ursache vermutlich in den höheren Diffusionkoefizienten, die für Zitronensäure gemessen wurden. Bei der Extraktion von Cadmium in Hohlfasermodulen ist β noch höher. Daiminger fand für Cadmium einen Wert von $200*10^{-5}$ cm/s[96].

Die Untersuchungen in der Rührzelle nach Nitsch und in der Pilotanlage liefern qualitativ die selben Ergebnisse im Bezug auf die Kinetik der Reaktivextraktion. Die quantitativen Unterschiede in den Stoffübergangskoeffizienten in Höhe von einer Zehnerpotenz zwischen den Untersuchungen mit (Pilotanlage) und ohne (Rührzelle) Membran liegen vermutlich in den längeren Diffusionswegen. Bei der membrangestützten Extraktion werden zu jeder Seite der beiden Phasengrenzflächen Grenzschichten etabliert. Aufgrund der laminaren Verhältnisse können diese Grenzschichten durch eine Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit nicht mehr abgebaut bzw. verringert werden.

Aufgrund der Erfordernisse einer dispersionsfreien Extraktion ist es jedoch nicht möglich, auf eine Stützung der organischen Membran durch die Hohlfasern zu verzichten. Beim Einsatz komplexer Stoffgemische in der Rührzelle würde die Phasengrenze aufgrund der niedrigen Scherkräfte innerhalb kürzester Zeit von oberflächenaktiven Bestandteilen der Fermentationslösung belegt werden. Diese Adsorbatschichten führen dann zur Hemmung des Stoffübergangs[148].

Für eine Erhöhung der Extraktionsleistung hat das folgende Bedeutung. Wie gezeigt werden konnte, ist die Extraktion von der L-Phe-Konzentration unabhängig und bis Re = 12 transportlimitiert. Darüber hinaus kann der Stoffübergang durch die Hydrodynamik nicht mehr verbessert werden. In der organischen Phase und im Extrakt ist das Maximum des Stoffübergangs durch Variation der Hydrodynamik bereits erreicht. Eine weitere Erhöhung des Stoffübergangs kann demnach nur durch eine Erhöhung der Carrier- und Gegenionenkonzentration oder durch eine Vergrößerung der Membranfläche erfolgen. Die Untersuchungen zur Biokompatibilität haben jedoch gezeigt, daß eine Konzentration über 20 %v/v Carrier sich negativ auf die Produktbildung auswirken würde. Die Konzentration an H_2SO_4 im Extrakt kann aus Gründen der Materialbeständigkeit (Pumpen; Armaturen, Hohlfasermodule) nicht weiter angehoben werden.

Die unterschiedlichen Extraktionsgrade in satzweisen Experimenten bei Verwendung verschiedener Reinheitsgrade an D_2EHPA (Kap. 7.1.7) zeigen jedoch eine einfache Möglichkeit auf, wie der Stoffübergang maßgeblich verbessert werden kann. Sollte in Zukunft neben D_2EHPA auch das Monomer des Esters auf dem Markt erhältlich sein, könnte man die optimale Mischung des Extraktionsmittels verwenden. Dadurch wäre es möglich, den Stoffübergang erheblich zu steigern.

Im Verlauf dieser Arbeit konnte die Permeabilität in der Pilotanlage von einem Anfangswert von ca. 6 g/m²h durch den Einsatz von höher konzentriertem D_2EHPA in der organischen Membran und stärkerer Gegenionenkonzentrationen bis auf einen Wert von 11 g/m²h gesteigert werden. Insgesamt liegen diese Werte um Faktor 10 bis 20 über den Literaturwerten für trägergestützte Flüssigmembranen[149].

7.6 Modellbildung

Eine mathematische Beschreibung der Reaktivextraktion ist laut Cardoso über die Abhängigkeit der Sherwoodzahl von der Reynolds- und der Schmidtzahl möglich. Cardoso fand für die Reaktivextraktion von Phenylalanin mit Aliquat 336 und inversen Micellen im Extrakt folgende Abhängigkeit (vergl. Kap. 2.10):

$$Sh = 0{,}03\ Re^{0,6}\ Sc^{0,33}$$

Der Stoffübergang bei der Reaktivextraktion von L-Phe in Hohlfasermodulen für einen D_2EHPA Anteil von 10 %v/v kann in dieser Arbeit über die gesamte Anlage mit

$$Sh = 0{,}027\ Re^{0,15}\ Sc^{0,33}$$

beschrieben werden. Der um Faktor vier kleinere Exponent der Reynoldszahl resultiert aus den Versuchsbedingungen. Da Cardoso für die Extraktion ein System aus inversen Micellen einsetzt ist der konvektive Anteil und damit der Einfluß der Reynoldszahl hier wesentlich größer. Die Ergebnisse in Kap. 5.3 zeigen, daß im untersuchten Bereich der Reynoldszahlen nur die Hydrodynamik im Raffinat Einfluß auf den Stoffübergang hat. Cussler et al.[150] haben bei der nicht integrierten Extraktion von Penicillin G dasselbe beobachtet. Durch eine Erhöhung der Carrierkonzentration auf 20 % D_2EHPA können bei gleichen Strömungsverhältnissen die Gradienten verändert werden, so daß ein verbesserter Stoffübergang resultiert:

$$Sh = 0{,}035\ Re^{0,15}\ Sc^{0,33}.$$

Die Schmidtzahl für das betrachtete System beträgt 1675 und liegt in dem von Levenspiel angegeben Bereich[151].

Die Veränderung der Gradienten und der damit verbesserte Stoffübergang äußert sich in der Änderung des Multiplikators von 0,027 auf 0,035. Durch die steileren Konzentrationsgradienten wird eine Verschiebung der Reaktionszone in der Phasengrenzfläche bewirkt. Dadurch kommt es zu einem schnelleren Stoffübergang. Diese Steigerung durch Änderung der Gradienten wird von Levenspiel[151] durch einen Enhancementfaktor beschrieben. Der Enhancement- oder Beschleunigungsfaktor ist das Verhältnis von Stoffübergang mit Reaktion zum Stoffübergang bei physikalischer Extraktion. In Abb. 5-31 ist die hohe Übereinstimmung zwischen den gemessenen und berechneten Werten für β zu erkennen. Die Reaktivextraktion von L-Phe in Hohlfasermodulen läßt sich demzufolge mit einer einfachen Korrelation $Sh = a\ Re^b\ Sc^c$ beschreiben und modellieren.

Das vorliegende Modell beschreibt mit einer ausreichenden Genauigkeit die Abhängigkeit des Stoffübergangs von der Hydrodynamik. Der Multiplikator ist mit wenigen Experimenten im Labormaßstab für verschiedene D_2EHPA Konzentrationen bestimmbar. Mit der Berechnung der Sherwoodzahl aus Re und Sc, ist der Stoffübergangskoeffizient leicht zugänglich. So kann der optimale Betriebspunkt (größtmöglicher Stoffübergang bei kleinstem Volumenstrom) schnell und zuverlässig bestimmt werden. Im Gegensatz zu den in der Literatur gezeigten Modellansätzen[152/153/154/155/156/157] sind für dieses Modell weniger Anpassungsparameter und damit weniger Experimente nötig. Ein weiterer großer Vorteil ist der geringe rechentechnische Aufwand.

7.7 Aufkonzentrierung und weitere Verfahrensschritte

Die Möglichkeit der Aufkonzentrierung von Phenylalanin aus wäßrigen Modelllösungen und aus Fermentationspermeat wird anhand von Extraktionen im Pilotmaßstab demonstriert. In

Abb. 5-25 wird eine wäßrige Modelllösung eingesetzt. Ausgehend von 80 l Raffinat mit einem L-Phe Gehalt von 1 % (entspr. 10 g/l), können im Verlauf von 9 Stunden 4 g/l abgetrennt werden. Diese 4 g/l werden im Extrakt (V = 8 l) aufgenommen und bis auf 40 g/l konzentriert. Ein Konzentrationsfaktor von 10 ist also ohne weiteres möglich. Die Permeabilität beträgt dabei 10 g/m²h.

Ob diese Ergebnisse auch mit Permeat aus realen Fermentationsprozessen reproduzierbar sind, wird in Abb. 5-26 gezeigt. Ausgehend von 40 l Permeat (= Raffinat) mit einem L-Phe Gehalt von 2,2 % (entspr. 22 g/l), werden innerhalb von 13,5 Stunden 14 g/l abgetrennt. Im Extrakt wird die extrahierte Menge auf 82 g/l aufkonzentriert. Das entspricht einem Konzentrationsfaktor von 6. Die Permeabilität und damit die Trennleistung dieses Experiments liegt bei 10 g/m²h. Eine Elemantaranlyse des Extrakts zeigt, daß 97 % der übergegangenen Ionen L-Phe-Ionen sind. Dieser hohe Wert konnte von Stuckey et al.[158] bei der nicht integrierten L-Phe Extraktion mit Aliquat 336 selbst bei sehr hohen Aminosäurekonzentrationen im Raffinat nicht erreicht werden.

Mit 82 g/l in schwefelsaurer Lösung ist eine Präzipitation des Produkts leicht möglich. Nach Fällung der Aminosäure durch pH-Wert-Verschiebung, wird der Kristallbrei zum Trocknen lyophilisiert. Eine Analyse der trockenen Substanz auf anorganische und biogene Komponenten zeigte eine Reinheit von >99%. Aus dem Extrakt des Demonstrationsexperiments (s. Kap. 5.5) konnte so im Kilogramm Maßstab hochreines L-Phenylalanin gewonnen werden. Der L-Phe-Gehalt in der Mutterlauge ist am Auslauf ca. 5 g/l. Das entspricht den Werten, die in der Literatur für die Fällung von Aminosäuren genannt werden[159].

7.8 Ausbeute des integrierten Verfahrens

Da der gesamte Inhalt des Fermenters im Kreis gefahren wird, treten keine Produktverluste auf. Eine Abreicherung aus der Fermentationslösung ist bis auf ca. 1 g/l möglich. Bei einem Gesamtproduktttiter von ca. 30 g/l liegt die Ausbeute der Reaktivextraktion bei ungefähr 97 %. Bei der Präzipitation des L-Phe kann bis auf einen Gehalt von 5 g/l in der Mutterlauge das gesamte Phenylalanin abgetrennt werden. Ausgehend von der Konzentration im Extrakt (82 g/l) ergibt sich die Ausbeute von 94 %. Da die Reaktivextraktion verlustfrei arbeitet, kann dafür eine Ausbeute von 100 % angenommen werden. Die Gesamtausbeute des entwickelten Aufarbeitungsprozesses liegt damit bei 91 %. Physikalisch sollte eine Aufkonzentrierung im Extrakt bis 100 g/l möglich sein. Mit diesem Wert läge die theoretische Ausbeute der Präzipitation bei 97 % und die des gesamten Verfahrens bei 94 %.

Rechnerisch läßt sich die Ausbeute demnach mit folgender Formel berechnen:

$$y_{total} = \left(\frac{c_{L-Phe,gesamt} - 1}{c_{L-Phe,gesamt}} \right) \cdot \left(\frac{c_{L-Phe,Extrakt} - 5}{c_{L-Phe,Extrakt}} \right)$$

dabei berücksichtigt der erste Term die Abreicherung der Fermentationslösung und der zweite die Präzipitation.

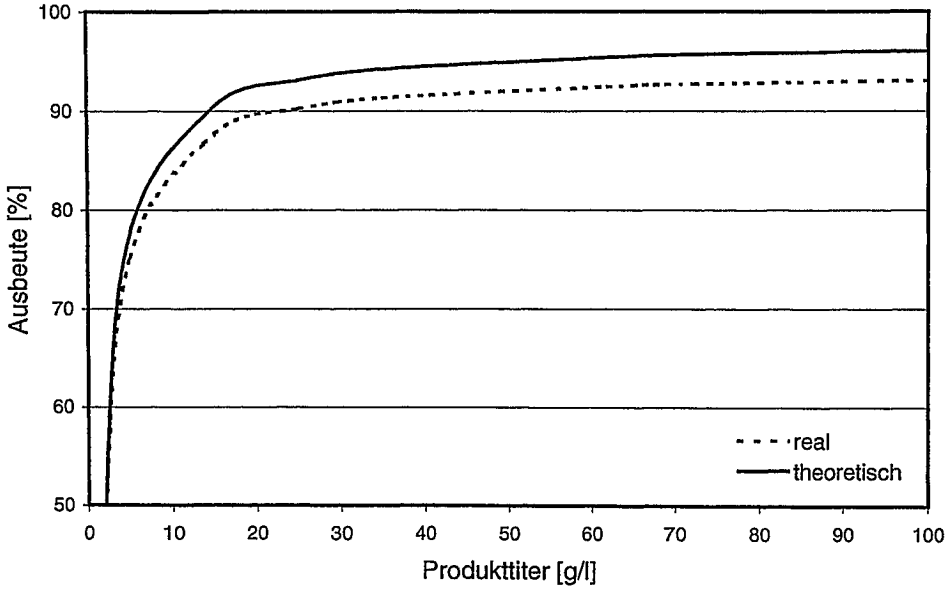


Abb. 7-7: Abhängigkeit der Gesamtausbeute von der Produktivität der Fermentation

Eine wesentliche Verbesserung ist aufgrund physikalischer Grenzen nur durch die Erhöhung der Gesamtproduktivität des Fermentationsverfahrens möglich. In Abb. 7-7 ist die mögliche Gesamtausbeute y_{total} des entwickelten Verfahrens in Abhängigkeit des Produkttiters aufgetragen. Mit „real" sind Berechnungen für eine Extraktkonzentration von 82 g/l, mit „theoretisch" für 100 g/l gemeint. Es ist deutlich zu erkennen, daß eine weitere Steigerung des Produkttiters nicht unbedingt eine direkte Erhöhung der Ausbeute zur Folge hat. Wenn man bedenkt, wieviel Kosten und Zeit für eine Erhöhung des Titers um wenige Gramm nötig sind, muß im Einzelfall immer abgewogen werden, ob sich dieser Aufwand lohnt. Anhand von Abb. 7-7 wird einer der großen Vorteile der integrierten Extraktion deutlich. Die Gesamtausbeute des Prozesses ist von der Produktkonzentration weitgehend entkoppelt. So kann die Aufarbeitung in weiten Konzentrationsbereichen an die Produktivität des Fermentationsverfahrens angepaßt werden.

7.9 biologische Effekte des Phosphorsäureesters

Die Erhöhung der Produktivität von *E. coli* Zellen durch den Eintrag eines organischen Reagenz ist ausgesprochen ungewöhnlich. Zur Erklärung dieser Effekte sollen folgende vier Hypothesen aufgestellt werden, um sie im Anschluß zu diskutieren.

1. D_2EHPA erhöht die Phosphatzufuhr
2. D_2EHPA komplexiert Metallionen
3. D_2EHPA wirkt als Detergenz
4. D_2EHPA wirkt als aktiver Transporter über die Zellmembran

zu 1. D_2EHPA erhöht die Phosphatzufuhr

D_2EHPA ist ein Phosphorsäureester. Wenn die Zellen die 2-Ethylhexyl-Seitenketten abspalten können, liegt ortho-Phosphat vor. Der D_2EHPA Puls in den Schüttelkolben entspricht einer um 12% gesteigerten KH_2PO_4-Zugabe. Der Phosphorbedarf von Bakterien läßt sich abschätzen: Bakterien enthalten durchschnittlich 1,5% Phosphor[172]. Zur Produktion von 40 gl^{-1} werden demnach 19,37 mmol/l Phosphor benötigt, dem steht eine Zugabemenge von 22,04 mmol/l im Medium gegenüber. Allerdings bezieht sich der zitierte Wert für den Phosphorgehalt von Bakterien nicht auf produzierende Organismen. Für die Überproduktion

von L-Phenylalanin ist der Energiebedarf der Zelle gesteigert[160], so daß die zugegebene Phosphatmenge limitierend wirken könnte.

Der Einfluß auf eine Phosphatlimitierung und mögliche Transportmechanismen wird in pH geregelten Schüttelkolben untersucht (s. Kap. 5.4.3). D_2EHPA wirkt den hier erhaltenen Ergebnissen zufolge nicht über einen zusätzlichen Phosphateintrag auf die Zellen. Die Produktivität mit Phosphatzugabe ist geringer als die der Referenz. Hypothese 1 scheint demnach nicht zuzutreffen.

zu 2. D_2EHPA komplexiert Metallionen

D_2EHPA ist ein Komplexbildner für Schwermetalle. Die Komplexierung von Metallen aus dem Medium mit anschließender, gleichgewichtsabhängiger Lösung der Komplexe kann für die Mikroorganismen zu einer verbesserten Versorgung mit Metallen über den gesamten Fermentationszeitraum führen. Aufgrund der biologischen Aktivität kommt es zu ständigen Veränderungen der Medienzusammensetzung nach Beginn der Fermentation, was z.B. ein Ausfallen der Salze oder eine Reduzierung der Metallionen zur Folge haben kann, so daß diese für die Mikroorganismen nicht mehr zur Verfügung stehen. Eisen wird z.B. nur als Fe^{3+} aufgenommen, unter reduzierenden Bedingungen ist es für die Mikroorganismen nicht verfügbar.

In Abb. 5-40 ist zwischen der Referenz, der Phosphatzugabe und der sukzessiven D_2EHPA Zugabe kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Lediglich die Fermentationen mit einem D_2EHPA Puls zeigen eine tendenzielle Erhöhung des Produkttiters. Eine Komplexierung von Metallionen führt bei einer pulsartigen D_2EHPA-Zugabe zu einer ausreichenden Versorgung mit Spurenelementen bis zu einem späten Zeitpunkt der Fermentation. Mit sukzessiv zugegebenem D_2EHPA ist die Versorgung der Organismen schlechter, weil viele Metallionen nicht mehr in einer für die Organismen zugänglichen Form vorliegen, wenn das D_2EHPA zugegeben wird. In den Ansätzen ohne D_2EHPA-Zugabe ist die Metallverfügbarkeit am geringsten, dadurch kann die allgemeine Enzymaktivität gesenkt werden, so daß nur geringere Produkttiter erreicht werden. Hypothese 2 könnte demzufolge eine Erklärung für die höhere Produktivität sein.

zu 3. D_2EHPA wirkt als Detergenz

Durch die Einlagerung in die Zellmembran kann das D_2EHPA eine detergente Wirkung entfalten[161]. Es kann Proteine aus der Membran lösen. Durch die erhöhte Membranpermeabilität könnte das L-Phenylalanin dann besser aus der Zelle diffundieren.

zu 4. D_2EHPA wirkt als aktiver Transporter über die Zellmembran

Die aktive Transportwirkung könnte D_2EHPA auch in der Lipiddoppelschicht der Zellen entfalten, also ein Transport von der zellinternen, wäßrigen Matrix über eine hydrophobe Phase in das umgebende wäßrige Medium durchführen.

Für die Hypothesen 3 und 4 muß eine zellinterne Akkumulation des L-Phenylalanins vorliegen. Diese Akkumulation kann zur Schädigung der Zellstrukturen durch ausgefallene Phenylalaninkristalle führen, vielleicht findet bei hohen Konzentrationen aber auch eine Inhibierung der DAHP-Synthase statt. Die Produktivität wird in jedem Fall gesenkt. Durch die Zugabe von D_2EHPA wird der Konzentrationsgradient verringert, das L-Phenylalanin kann aus der Zelle diffundieren.

Um eine Veränderung des L-Phenylalaninexports der Zellen erkennen zu können, wurde von allen Ansätzen ein Zellaufschluß durchgeführt (s. Abb. 5-41). In Kontrollansätzen konnte gezeigt werden, daß im Medium gelöstes L-Phenylalanin zu weniger als 0,15% in die Perchlorsäurephase übertritt. So läßt sich das Verhältnis von interner zu externer Konzentration bestimmen. Dieses Experiment läßt keine Schlüsse auf die Wirkung der Akkumulation von L-Phenylalanin in den Zellen zu, weil dafür die zellinterne Metabolitkonzentration gemessen werden muß. Für ihre Bestimmung muß das Zellvolumen bekannt sein, dieses wurde im Zuge der durchgeführten Experimente nicht bestimmt.

D_2EHPA scheint, wie Abb. 5-41 zeigt, auf die Membran zu wirken. Das Verhältnis der internen zur externen L-Phenylalaninkonzentration ist am Fermentationsende ca. 15% niedriger, wenn D_2EHPA in die Kolben gegeben wurde. Ohne Carrier akkumuliert das Phenylalanin in den Zellen und kann zu einer Senkung der Produktivität führen. Der Phosphorsäureester bewirkt eine ausgeglichenere Verteilung der Aminosäure zwischen zellexternem und –internem Raum.

Bei einer Erhöhung der Membranpermeabilität ist eine Schädigung der Zellen in den Ansätzen mit pulsartiger D_2EHPA-Zugabe zu erwarten, denn zum Zeitpunkt der Zugabe war die Biomassekonzentration gering (< 10 g/l). Die Mikroorganismen werden durch einen D_2EHPA-Puls dieses Volumens aber nicht beeinträchtigt. Die hier dargestellten Ergebnisse lassen in Kombination mit den Ergebnissen der vorangegangenen Experimente vermuten, daß ein Schwellenwert für die D_2EHPA-Zugabe existiert, bei dessen Überschreitung ein negativer Effekt auf Wachstum und Produktbildung ausgeübt wird. Die Ergebnisse aus Abb. 5-35 lassen vermuten, daß dieser Schwellenwert oberhalb einer Konzentration von 20 %v/v liegt. Wahrscheinlich ist die detergente Wirkung des Esters ab dieser Konzentration so stark, daß die Zellwände ihre Funktion nicht mehr erfüllen können.

Die oben genannten Ergebnisse deuten darauf hin, daß die detergente Wirkung des Carriers die Permeabilität der Zellwand erhöht. Damit wäre auch mit Hypothese 3 eine Erklärung möglich.

Gegen die Gültigkeit von Hypothese 4 spricht das Absterben der Zellen bei zu hohen Konzentrationen.

Die Effekte des Carriers auf die Bakterien im Zusammenhang mit den hier diskutierten Hypothesen lassen folgende Vermutung zu:

Der Carrier wirkt als Siderophor und komplexiert Schwermetalle (Hypothese 2) oder;

Die Permeabilität der Zellwand wird durch den Carrier erhöht, so daß die zellinterne L-Phe-Konzentration sinkt (Hypothese 3). Es könnte sich jedoch auch um synergistische Effekte aus den Hypothesen 3 und 4 handeln.

Diese Theorien sollen nach wie vor nur als Thesen verstanden werden, da signifikante experimentelle Beweise fehlen. Die weitere Untersuchung der Carriereffekte werden in einer eigenen Arbeit behandelt und ausführlich diskutiert[162].

7.10 Demonstrationsexperiment zur integrierten Produktabtrennung

Das Demonstrationsexperiment zur integrierten Produktabtrennung im Pilotmaßstab sollte als eine Machbarkeitsstudie verstanden werden. Es gilt, die entwickelte Technologie an einen realen Fermentationsprozeß anzuschließen und die im Vorfeld untersuchten Wechselwirkungen zu überprüfen. Die Ergebnisse des Experiments sind in Kapitel 5.5 zusammengefaßt.

Das Demonstrationsexperiment ist als Erfolg zu werten. Die Aufkonzentrierung des L-Phe aus der Fermentation hat sehr gut funktioniert. Eine direkte Rückführung des Raffinats in den Fermenter ist ohne Sterilitätsprobleme oder negative Effekte durch den Eintrag organischer Substanzen möglich.

Die produzierte Gesamtmenge an Phenylalanin kann im Vergleich zur Referenz um Faktor 3,75 gesteigert werden. Diese hohe Steigerung läßt sich nicht mit den genannten Effekten durch des D_2EHPA erklären. Statt dessen liegt der Schluß nahe, daß eine Produktinhibierung durch das Phenylalanin in der Referenzfermentation durch die integrierte Aufarbeitung reduziert und daher durch die Organismen mehr produziert wird.

Diese höhere Produktbildungsrate zeigt sich in der nicht mehr ausreichenden spezifischen Extraktionsausbeute von 0,6 (s. Abb. 5-43). Für einen nicht integrierten Ansatz –ohne die positiven Effekte der Produktabtrennung- wäre die Trennleistung ausreichend. Durch die

integrierte Abtrennung des L-Phe ist jedoch die Produktivität soweit erhöht, daß um etwa 40 % größere Trennleistungen benötigt würden.

Der eingesetzte *Escherichia coli* Produktionsstamm sollte jedoch, aufgrund der genetischen Modifikationen, keine Sensitivität für L-Phe aufweisen. Untersuchungen im Institut für Biotechnologie haben jedoch gezeigt, daß dieses Expressionssystem bereits durch 3 g/l L-Phe im Medium auf 30 % seiner Aktivität inhibiert wird[163]. Es handelt sich demnach trotz der genetischen Modifikationen um einen L-Phe sensitiven Organismus. Die positiven Effekte der integrierten Aufarbeitung auf Produktivität und Selektivität sind somit tatsächlich auf eine Vermeidung der Produktinhibierung durch L-Phenylalanin zurückzuführen.

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit konnte damit durch das Demonstrationsexperiment erreicht werden. Durch integrierte Ansätze lassen sich Produktinhibierungen vermeiden oder mindestens reduzieren. Es ist also möglich, durch die Art der Aufarbeitungsstrategie die Raum-Zeit-Ausbeute einer Fermentation erheblich zu steigern.

Für ökonomische Betrachtungen ist jedoch auch die erhebliche Steigerung der Glucoseselektivität von entscheidender Bedeutung. Eine Steigerung von 4 % auf 20 % um Faktor fünf steigert die Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses erheblich. Der Grund für die erhöhte Selektivität könnte in der Abtrennung des L-Phe aus dem Fermenter zu finden sein. Dadurch ist die zellexterne Konzentration geringer und das gebildete L-Phe kann besser aus den Zellen heraus diffundieren. Trotz der hohen Membrankosten und der aufwendigen Anlagentechnik könnte das entwickelte Verfahren aufgrund der hohen Selektivität und Produktreinheit und durch die Einsparung von Prozeßschritten bei hohen Ausbeuten eine ökonomisch sinnvolle Alternative zu etablierten Industrieprozessen darstellen.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Die membrangestützte Reaktivextraktion in Hohlfasermodulen ist als integrierte Produktabtrennung im Pilotmaßstab etabliert worden. Dabei sind maximale Trennleistungen von 11 g/m²h über die Hohlfasermembran erreichbar. Der Extraktionsprozeß ist über eine einfache Beziehung der Sherwoodzahl (Sh) in Abhängigkeit von Reynolds- und Schmidtzahl (Re, Sc) mathematisch zu beschreiben.

$$Sh = 0{,}03\ Re^{0{,}15}\ Sc^{0{,}33}$$

Anhand dieses Modells können Einflüsse der Hydrodynamik für Auslegungsprozesse abgeschätzt werden. Es läßt sich der Stoffübergangskoeffizient β in Abhängigkeit der Reynoldszahl berechnen. Die berechneten Stoffübergangskoeffizienten stimmen mit den experimentell ermittelten Werten weitgehend überein. Im Vergleich zu Literaturdaten liegen die in dieser Arbeit erreichten Werte für β in der selben Größenordnung. Im Maximum sind sie jedoch um etwa 10 % höher.

Ein biokompatibles Stoffsystem, bestehend aus Extraktions- (Di-2-ethylhexylphosphorsäure, D_2EHPA) und Lösungsmittel (Kerosin), mit ausreichenden Extraktionsleistungen für L-Phe steht zur Verfügung. Die Toxizitätsschwelle des Extraktionsmittels liegt dabei oberhalb 20 %v/v. Unterhalb dieses Grenzwerts hat der Eintrag des Carriers in die Fermentation einen positiven Effekt auf die Produktbildung, der jedoch in dieser Arbeit nicht vollständig aufgeklärt werden kann.

Eine reversible Extraktion mit vollständiger Carrierregeneration wird durch den Einsatz von Schwefelsäurelösung als Extraktphase erreicht. Mit dieser Extraktphase ist ein stabiler Betrieb der Pilotanlage über mindestens 50 Stunden ohne Phasenbruch möglich.

Mit der membrangestützten Reaktivextraktion kann L-Phenylalanin aus Fermentationspermeat im Pilotmaßstab bis mindestens 82 g/l aufkonzentriert werden. Der maximal erreichte Konzentrationsfaktor liegt bei 10.

Die Abtrennung von Phenylalanin aus Fermentationspermeat mittels Reaktivextraktion zeigt eine so hohe Selektivität, daß der L-Phe-Anteil im Extrakt bei 97 % liegt.

Die Präzipitation des aufkonzentrierten Phenylalanins aus dem Extrakt liefert eine weißliche Trockensubstanz mit einer Reinheit von über 99 %.

Mit der entwickelten Technologie kann im Pilotmaßstab aus laufenden Fermentationsprozessen L-Phenylalanin im Kilogramm Maßstab abgetrennt und präzipitiert werden. Der Aufarbeitungsprozeß besteht damit aus nur drei Einzelschritten. Durch die integrierte Produktabtrennung wird die Produktivität der Fermentation um Faktor 3,75 erhöht.

Mit dem entwickelten Prozeß steht ein technologisches Werkzeug zur Verfügung, mit dem ein Vielzahl von biotechnologisch hergestellten Produkten kontinuierlich abgetrennt werden können. Neben den Möglichkeiten zur Aminosäureabtrennung finden sich in der Literatur Hinweise auf Möglichkeiten zur Prozessierung wesentlich wertvollerer Produkte. So kann beispielsweise fermentativ hergestelltes Shikimat[164] durch Reaktivextraktion[165/166] mit Tridodecylamin selektiv abgetrennt werden. Shikimat liegt im Weltmarktpreis um etwa Faktor hundert über L-Phenylalanin.

Die beim Einsatz der verschiedenen Extraktionsmittel beobachtbaren toxischen Effekte könnten durch geeignete genetische Veränderungen des Expressionsystems umgangen werden. So modifizierte lösungsmittelresistente *E. coli* werden bereits eingesetzt[167]. Damit wäre es möglich, selektive Extraktionsmittel für andere Molekülklassen zu verwenden, deren integrierter Einsatz zur Zeit aus Gründen der Biokompatibilität nicht denkbar ist.

Ein weiterer vielversprechender Einsatzbereich ist die Racematentrennung von chemisch synthetisierten Aminosäuren. Aus Phenylalanin-Isomeren-Gemischen konnten durch Reaktivextraktion mit Kupfer-2-N-decyl-L-hydroxyprolin Enantionselektivitäten von bis zu 2,4 und Ausbeuten von 80% erreicht werden[168]. Ähnliche Angaben finden sich auch für Leucin[169].

Mit der vorliegenden Arbeit kann die simultane Produktabtrennung aus Fermentationsprozessen mit direkter Raffinatrückführung erstmalig im Pilotmaßstab gezeigt werden. Aufgrund des großen Potentials dieser Technologie ist sie daher bereits zum Patent angemeldet worden[170].

In zukünftigen Arbeiten sollten die Effekte des Phosphorsäureesters auf die Biokompatibilität näher betrachtet und verstanden werden. Eine weitere Erhöhung der Extraktionsleistung sollte untersucht werden. Dabei könnten Gemische aus Di-2-ethylhexylphosphorsäure und Mono-2-ethylhexylphosphorsäure zum Einsatz kommen.

Um das vielversprechende Potential der integrierten Produktabtrennung mit Reaktivextraktion weiter auszuloten, ist die Untersuchung anderer Fermentationsprodukte mit potentiell inhibierenden Eigenschaften ein interessantes Thema für folgende Arbeiten.

9 Anhang

9.1 Ergebnisse der Durchlaufexperimente

Die Konzentrationsänderung ist bei einmaligem Durchlauf durch den Modul sehr klein. Die gemachten Annahmen zur Modellierung des Stoffübergangs sind damit richtig (vergl. Kap. 2.10). Der Volumenstrom der wäßrigen Phasen beträgt in Abb. 9-1 50 l/h. Die Konzentrationsänderung bei einem einmaligem Moduldurchlauf beträgt demnach 0,8 g/l bis 1,5 g/l.

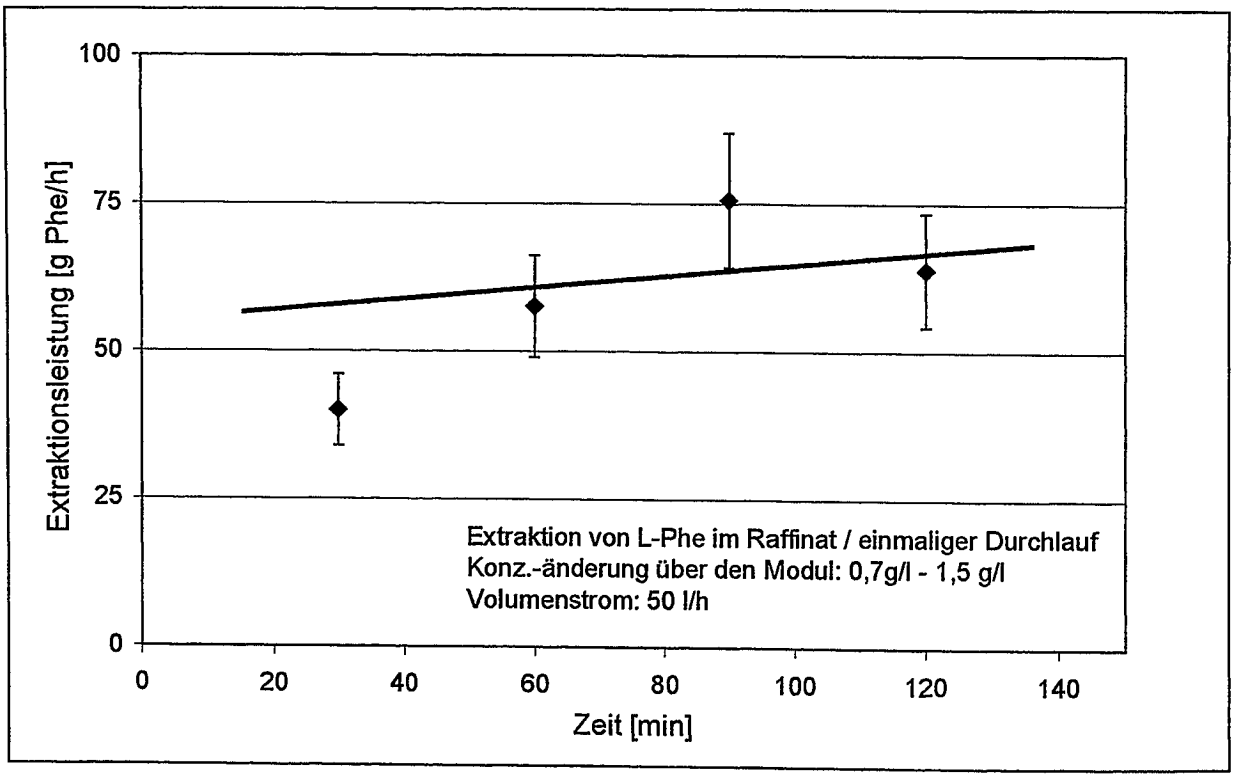


Abb. 9-1: Extraktionsleistung bei einmaligem Durchlauf des Moduls, im Raffinat wurden bei pH 6,5 10 g/l L-Phe vorgelegt

9.2 Beladungsdiagramme für verschiedene D_2EHPA-Anteile

Neben dem in Abb. 5-9 gezeigten Beladungsdiagramm wurden für weitere Gehalte an D_2EHPA die Sorptionsisothermen berechnet.

Für Abb. 5-9 soll anhand der folgenden Beispielrechnung der Rechenweg verdeutlicht werden. Die experimentellen Bedingungen bei denen die Rechenwerte ermittelt wurden sind: pH 5,9; 10% D_2EHPA; 10 g/l L-Phe.

Gemäß Gl. 2-27 läßt sich die Gleichgewichtskonstante aus dem L-Phe-Gehalt in wäßriger und organischer Phase und der Gleichgewichtskonzentration an Protonen (aus Gleichgewichts pH in wäßriger Phase) und der Menge an unbeladenem Carrier in der organischen Phase berechnen.

$$K_{ges} = \frac{c[C_n F_{org}] \cdot c\,[H^+_{aq}]^n}{c[F_{aq}] \cdot c\,[CH_{org}]^n} = \frac{22{,}8\,\text{mmol/l} \cdot 2{,}03\,\text{mmol/l}}{37{,}2\,\text{mmol/l} \cdot 278{,}4\,\text{mmol/l}} = 4{,}4 \cdot 10^{-3}$$

Gemäß Gl. 2-28 ist es möglich aus der Gleichgewichtskonstanten, der Protonenkonzentration und der Menge an unbeladenem Carrier den Verteilungskoeffizienten D zu berechnen.

$$D = K_{ges} \cdot \frac{c\,[CH_{org}]^n}{c[H^+_{aq}]} = 4{,}4 \cdot 10^{-3} \frac{278{,}4\,\text{mmol/l}}{2{,}03\,\text{mmol/l}} = 0{,}6 = \frac{c[C_n F_{org}]}{c\,[F_{aq}]^n}$$

Der Verteilungskoeffizient ist definitionsgemäß die Konzentration des Wertstoffs in der organischen Phase im Verhältnis zu der in der wäßrigen Phase.

Bei bekanntem D läßt sich für angenommene L-Phe Konzentrationen in einer der beiden Phasen die dazugehörige Gleichgewichtskonzentration in der anderen Phase abschätzen. Im Folgenden sind die Beladungsdiagramme die sich aus den jeweiligen Verteilungskoeffizienten ergeben, für 5 %v/v, 20 %v/v und 30 %v/v D_2EHPA in Kerosin abgebildet.

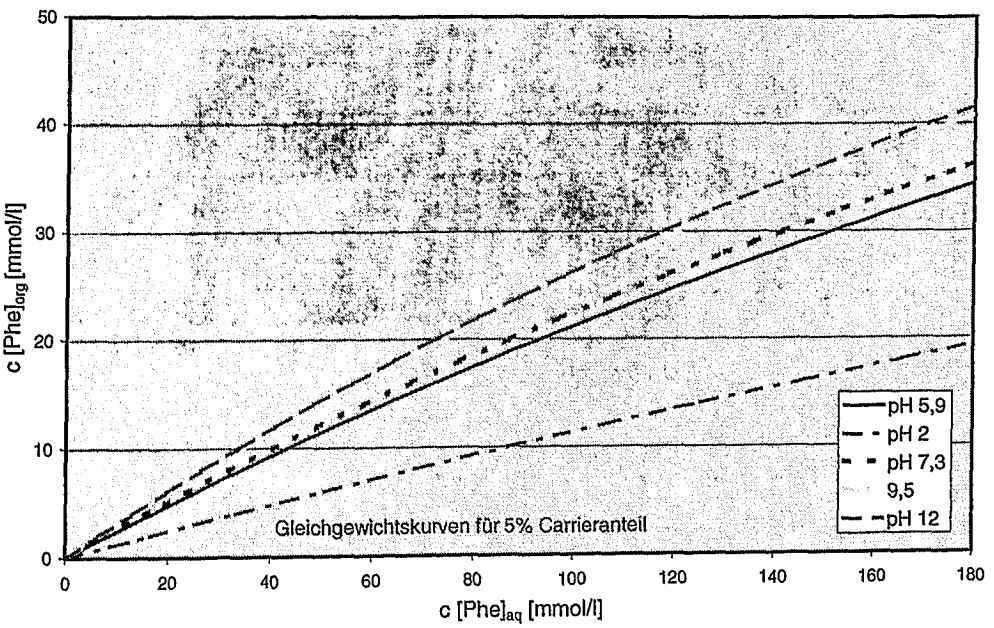


Abb. 9-2: Beladungsdiagramm für einen D_2EHPA Anteil von 5 % bei pH 12; 9,5; 7,3; 5,9 und 2

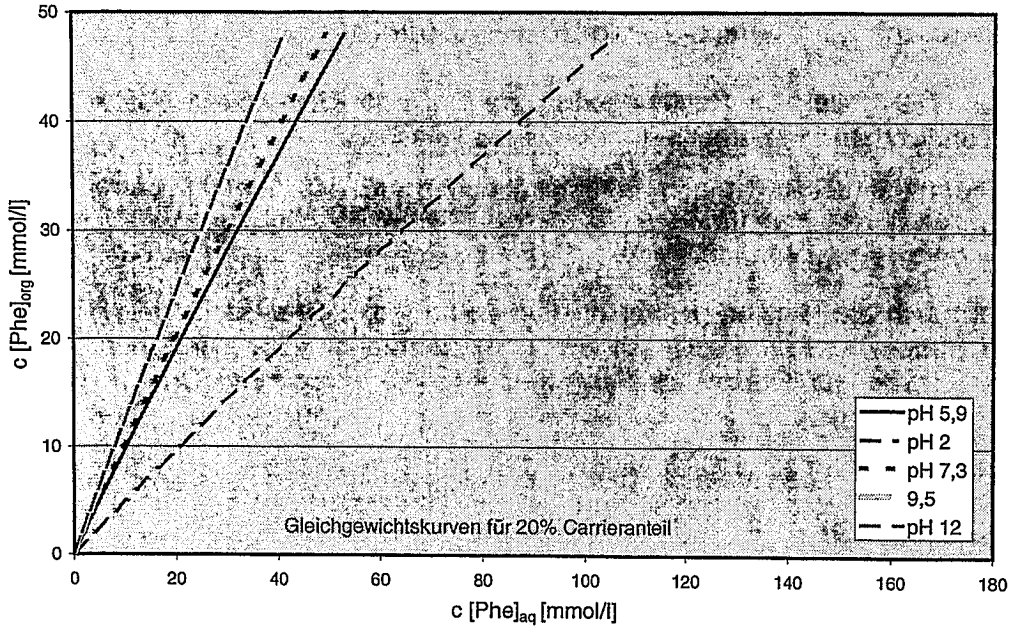


Abb. 9-3: Beladungsdiagramm für einen D_2EHPA Anteil von 20 % bei pH 12; 9,5; 7,3; 5,9 und 2

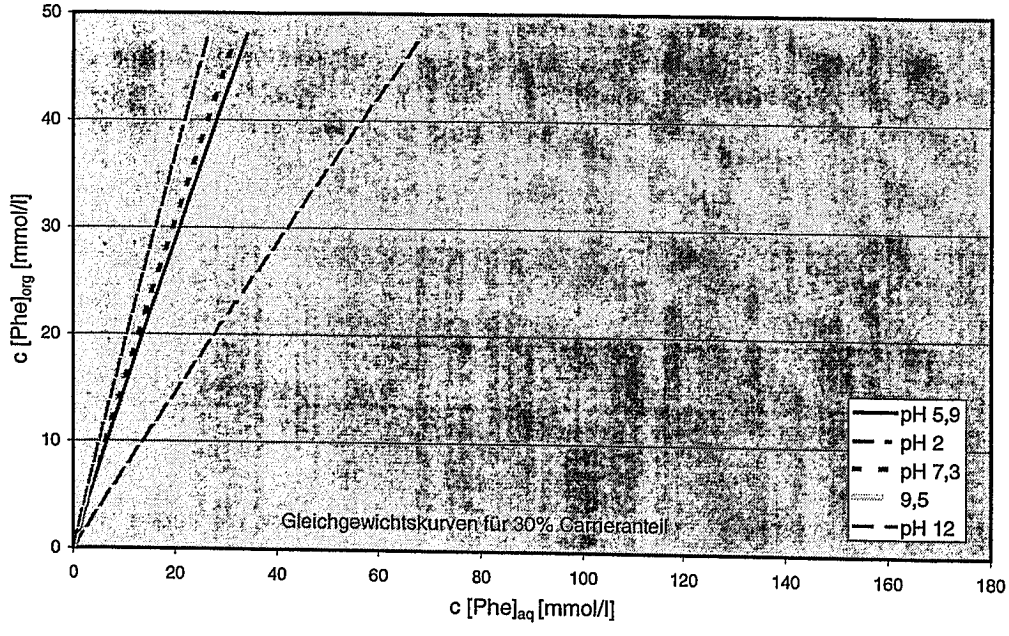


Abb. 9-4: Beladungsdiagramm für einen D_2EHPA Anteil von 30 % bei pH 12; 9,5; 7,3; 5,9 und 2

9.3 Medien und Lösungen

9.3.1.1 Stammlösungen der Salze

$MgSO_4*7\ H_2O$	300 g/l
$CaCL_2*2\ H_2O$	15 g/l
KH_2PO_4	150 g/l
K_2HPO_4	600 g/l
NaCl	100 g/l
$(NH_4)_2SO_4$	250 g/l
$FeSO_4*7\ H_2O$/Na-Citrat	7,5/100 g/l
Vitamin B1 (Thiamin*HCl)	1 g/l
Glucosemonohydrat	550 g/l
Ampicillin	0,1 mg/ml

Die Salze wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und bei Raumtemperatur gelagert. Die Eisensulfat-Natriumcitrat-Lösung wurde dunkel aufbewahrt, die Thiaminstammlösung wurde bei 4°C gekühlt. Die Glucose wurde autoklaviert und ebenfalls gekühlt. Das Ampicillin wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt und über einen Sterilfilter ins Medium gegeben.

9.3.1.2 Spurenelementestammlösung

$Al_2(SO_4)_3*18\ H_2O$	0,003 g/l
$CoSO_4*6\ H_2O$	0,00105 g/l
$CuSO_4*5\ H_2O$	0,00375 g/l
H_3BO_4	0,000775 g/l
$MnCl_2*4\ H_2O$	0,03 g/l
$Na_2MoO_4*2\ H_2O$	0,0045 g/l
$NiSO_4*3\ H_2O$	0,003 g/l
$ZnSO_4*7\ H_2O$	0,0225 g/l

Die Spurenelemente wurden gemeinsam in bidestilliertem Wasser gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.

9.3.1.3 Vorkulturmedium

	$[ml]_{Stammlösung}/[l]_{Medium}$	$[g/l]_{Vorkultur}$
MgSO4*7 H2O	1 ml/l	0,3
CaCL2*2 H2O	1 ml/l	0,015 g/l
KH2PO4	20 ml/l	3 g/l
K2HPO4	20 ml/l	12 g/l
NaCl	1 ml/l	0,1 g/l
(NH4)2SO4	20 ml/l	5 g/l
FeSO4*7 H2O/Na-Citrat	10 ml/l	0,075/ 1 g/l
Spurenelementelösung	1 ml/l	-
Vitamin B1 (Thiamin*HCl)	5 ml/l	0,005 g/l
L-Tyrosin	-	0,08 g/l
Glucose	11,25 ml/l	0,562 g/l
Ampicillin	0,75 ml/l	0,075 g/l

Um das L-Tyrosin in der Salzlösung zu lösen, muß diese einige Zeit gerührt werden. Das Medium wird so auf Erlenmeyerkolben verteilt, daß diese zu 10% gefüllt sind, und kann dann autoklaviert werden. Da die Glucose und das Ampicillin nicht hitzestabil sind, werden die Lösungen vor dem Animpfen der Vorkultur steril hinzufiltriert.

9.3.1.4 Hauptkulturmedium

	$[ml]_{Stammlösung}/[l]_{Medium}$	$[g/l]_{Medium}$
$MgSO_4*7\ H_2O$	10 ml/l	3 g/l
$CaCL_2*2\ H_2O$	1ml/l	0,015 g/l
KH_2PO_4	20 ml/l	3 g/l
NaCl	10 ml/l	1 g/l
$(NH_4)_2SO_4$	20 ml/l	1 g/l
$FeSO_4*7\ H_2O$/Na-Citrat	15 ml/l	0,1125/ 1,5 g/l
Spurenelementelösung	1,5 ml/l	-
Vitamin B1 (Thiamin*HCl)	0,075 ml/l	0,075 mg/l
L-Tyrosin	-	0,24 g/l
Glucose	30 ml/l	15 g/l

Alle Komponenten wurden gelöst und durch einen Sterilfilter in den zuvor autoklavierten Fermenter gepumpt. Der pH-Wert wurde mit Hilfe der pH-Regelung des Fermenters auf 6,5 eingestellt. Die angegebenen Medienkonzentrationen beziehen sich auf das inokulierte Medium.

9.3.1.5 Zulaufmedium 1

Glucosemonohydrat 770 g/l

In den Versuchen in der Schüttelkolbenanlage wurde eine Glucoselösung mit 550 g/l Glucosemonohydrat verwendet.

9.3.1.6 Zulaufmedium 2

L-Tyrosin	25 g/l
Ammoniaklösung 25%	200 ml/l

Das L-Tyrosin wurde in der Ammoniaklösung und Wasser gelöst. Vor Gebrauch wurde es in die zuvor autoklavierte Zulaufflasche gefüllt.

9.3.1.7 Lauge

Für die pH-Regelung wurde 25%ige Ammoniaklösung (autosteril) verwendet.

9.3.1.8 Antischaummittel

Um eine zu starke Schaumbildung zu unterbinden, wurde 50%iges Sigma 289 eingesetzt. Dieses wurde in Portionen zu ca. 0,5 ml durch ein Septum direkt in den Fermenter gespritzt.

9.3.1.9 IPTG- Lösung

Die Produktion des L-Phenylalanins wurde durch Zugabe von einer IPTG- Lösung induziert. Die IPTG- Konzentration im Fermenter betrug 100µmol/l des Ansatzvolumens.

9.3.1.10 Lösungen für den Zellaufschluß

$HClO_4$- Lösung	20%
Silikonöl	δ=1,06 g/cm^3
Neutralisationslösung mit:	
KOH	5 M
Triethanolamin×HCl	1 M

10 Biologische Grundlagen

Escherichia coli, ein gut untersuchter Prokaryont, zählt zu den ersten vollständig sequenzierten Organismen. Viele Erkenntnisse über genetische und stoffwechselphysiologische Vorgänge in Prokaryontenzellen wurden durch die Arbeit mit ihm gewonnen. *E.coli* ist ein schnell wachsender, einfach zu kultivierender Organismus mit einem relativ kleinen Genom (~$5 \cdot 10^6$ Kilobasenpaare).

E.coli ist gram-negativ, beweglich, und bildet keine Sporen. Als Darmbewohner gehört es zur Gruppe der Enterobacteriaceae (lat. „enteron": Darm). Aufgrund begrenzter Überlebensfähigkeit außerhalb des Darmes dient es als Indikator für die fäkale Verunreinigung von Wasser[171].

Die Energiegewinnung erfolgt bei *E.coli* sowohl durch Atmung als auch durch gemischte Säuregärung. Das befähigt *E.coli* zu einer fakultativ anaeroben Lebensweise.

10.1 Glucoseverwertung bei *Escherichia coli*

Escherichia coli nutzt Glucose als Energie- und Kohlenstoffquelle. Sie wird unter aeroben Bedingungen zu über 70% über den Fructose-1,6-bisphosphat- Weg (FBP- Weg) und zu fast 30 % über den Pentosephosphat- Weg (PP- Weg) abgebaut. Der 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconatweg spielt nur eine untergeordnete Rolle.

Der PP- Weg dient dabei der Bereitstellung wichtiger Intermediate, z.B. Ribose-5-phosphat für die Nucleotidsynthese, Erythrose-4-phosphat für die Synthese aromatischer Aminosäuren und $NADPH_2$ als Reduktionsäquivalent[172].

Der Glucoseabbau über den FBP- Weg führt unter aeroben Bedingungen in den Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus) (s. Abb. 1). Dabei werden ATP und Reduktionsäquivalente in Form von $NADH_2$ und $FADH_2$ gebildet, die in der Atmungskette zur Bildung von ATP verwendet werden können. Die dabei freiwerdenden Elektronen werden auf Sauerstoff übertragen. Gebildetes $NADPH_2$ findet im anabolischen Stoffwechsel als Reduktionsmittel Verwendung. Die Glucose wird neben der Oxidation zu CO_2 im aeroben Stoffwechsel auch als Kohlenstoffquelle für die Synthese von Biomasse und Produkten verwendet.

Neben der Erzeugung von Energie- und Reduktionsäquivalenten spielt auch der TCA-Zyklus eine wichtige Rolle in der Bereitstellung von Vorstufen für die Biosynthese. Da ihm dabei die organischen Säuren entzogen werden, muß der Zyklus durch sogenannte anaplerotische Reaktionen wieder aufgefüllt werden. Die wichtigsten anaplerotischen Reaktionen sind die Carboxylierung von PEP und Pyruvat zu Oxalacetat[173].

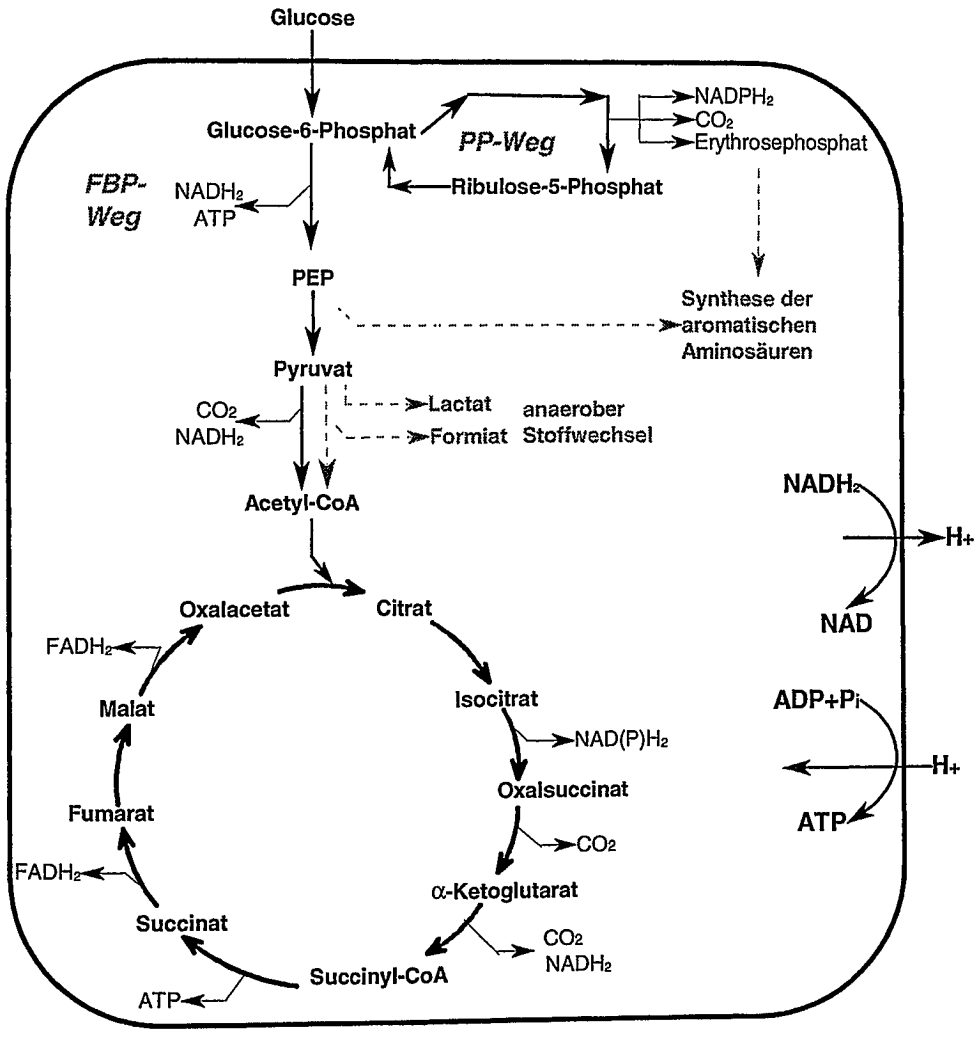


Abb. 10-1: Schema der Glucoseverwertung bei *Escherichia coli*

Escherichia coli ist neben der aeroben Lebensweise auch in der Lage, unter anaeroben Bedingungen zu leben. Sauerstoff steht den Zellen dann als terminaler Elektronenakzeptor nicht zur Verfügung. Bei obligaten Aerobiern kommt die Atmungskette zum Erliegen und die Zellen sterben ab.

Viele Anaerobier haben durch Gärung die Möglichkeit, organische Substrate zu Spaltprodukten, CO_2 und Protonen abzubauen. Die Spaltprodukte dienen als Elektronenakzeptoren und werden ausgeschieden, Art und Zusammensetzung der Gärprodukte variieren dabei von Spezies zu Spezies.

Escherichia coli scheidet verschiedene Gärprodukte aus, z.B. Acetat, Lactat, Ethanol, Succinat und Formiat.

Die Energieausbeute ist unter anaeroben Bedingungen wesentlich schlechter als bei aeroben Verhältnissen: bei der Veratmung von 1 mol Glucose kann E.coli 26 mol ATP regenerieren, die Vergärung von 1 mol Glucose führt- je nach Stoffwechselweg- zu 1 bis 4 mol ATP[171].

Die Organismen reagieren auf Sauerstoffmangel mit einem gesteigerten Substratumsatz, da für die Gewinnung einer der Atmung entsprechenden Menge an ATP ein Vielfaches an Substrat umgesetzt werden muß.

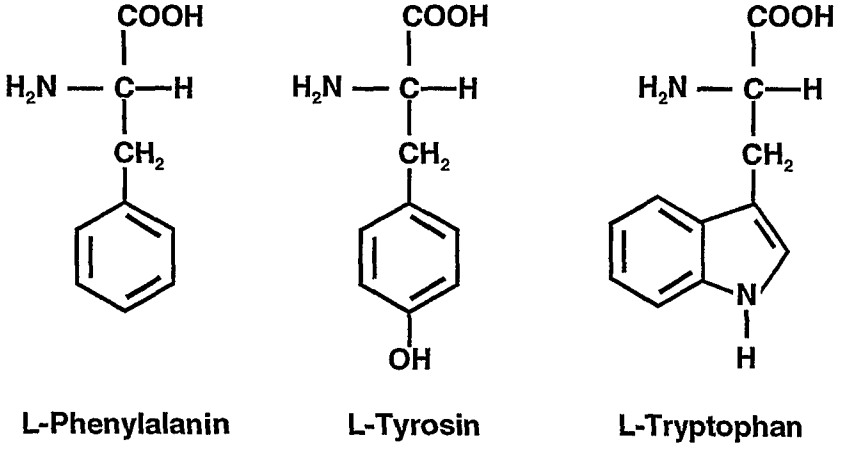
Der Substratumsatz wird auch durch hohe Glucosekonzentrationen bei ausreichender Sauerstoffversorgung erhöht. Dabei tritt der sogenannte Crabtree Effekt auf. Die Glucose reprimiert die Synthese verschiedener Enzyme des TCA-Zyklus und der Atmungskette. Statt dessen erfolgt der Energiegewinn durch Gärung.

Für die Biotechnologie ist die Kenntnis dieser Stoffwechselvorgänge von großer Bedeutung. So ist die aerobe Prozeßführung für die Produktion einer Aminosäure mit Escherichia coli unerläßlich, weil das Substrat beim Auftreten der Gärung oder des Crabtree- Effektes in unerwünschte Nebenprodukte umgewandelt wird. Dadurch sinkt die Produktausbeute, und die Aufarbeitung wird aufwendiger[174].

Neben der Bereitstellung von Sauerstoff und Substrat muß bei vorliegenden Prototrophien eine Versorgung der Zellen mit Spurenelementen und Vitaminen als Cofaktoren für Enzyme gewährleistet werden.

10.2 Synthese aromatischer Aminosäuren bei *Escherichia coli*

Zu der Familie der aromatischen Aminosäuren gehören das L-Phenylalanin, das L-Tyrosin und das L-Tryptophan (s. Abb. 10-2).



L-Phenylalanin **L-Tyrosin** **L-Tryptophan**

Abb. 10-2: Die Familie der aromatischen Aminosäuren

Das Kohlenstoffgerüst der aromatischen Aminosäuren stammt von Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-Phosphat, also Intermediaten der Glycolyse bzw. des PP-Weges (s.Abb. 10-1). Bis zum Chorismat ist der Syntheseweg für alle drei Aminosäuren gleich (s.Abb. 10-3).

Aus Chorismat wird Prephenat gebildet, wenn Phenylalanin oder Tyrosin hergestellt werden sollen. Für die Synthese von Tryptophan muß aus Chorismat zunächst Anthranilat gebildet werden. Die Aminogruppe wird erst im letzten Syntheseschritt auf das Kohlenstoffgerüst übertragen.

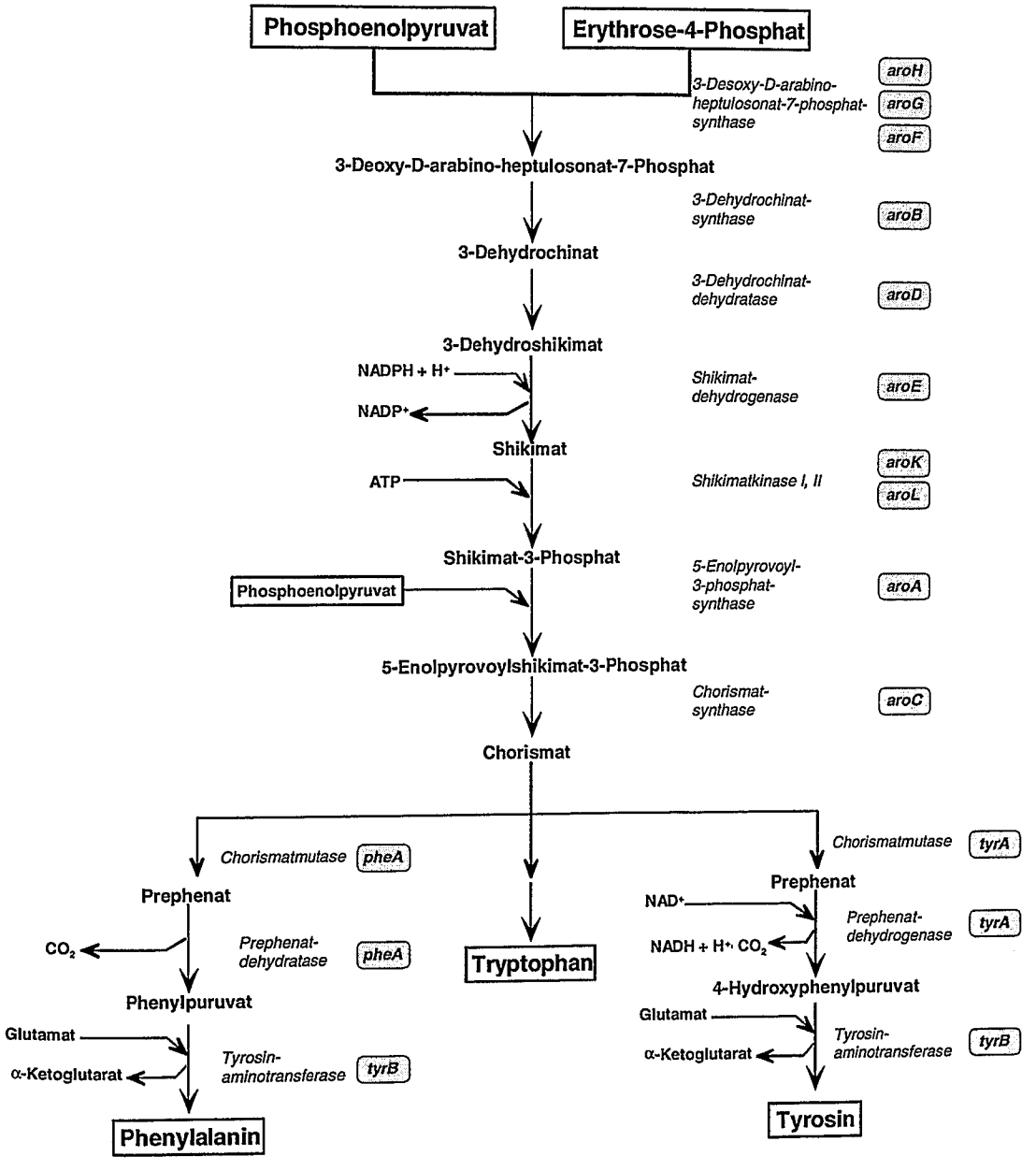


Abb. 10-3: Schema der Synthese aromatischer Aminosäuren bei *E. coli*

Die Aktivität einiger Enzyme dieses Stoffwechselwegs ist von der Anwesenheit von Metallen abhängig. Zum Beispiel benötigen die durch Phenylalanin inhibierbare DAHP- Synthase (Desoxy-D-arabinoheptulosonat- Phosphat- Synthase, s.Abb. 10-3) und die Chorismatsynthase Eisen, die Aktivität der Shikimatkinase ist magnesiumabhängig[175]. Bei der Fermentation ist deshalb auf eine ausreichende Versorgung mit Spurenelementen zu achten.

Für die Zelle ist es energetisch sinnvoll, ähnliche Substanzen über die gleichen Synthesewege herzustellen und nicht alle Enzyme konstitutiv bereitzustellen. Dafür ist die Existenz von effektiven Regulationsmechanismen unerläßlich, um die Biosynthese an den aktuellen Bedarf der Zelle anpassen zu können.

Im ersten Schritt der Synthese aromatischer Aminosäuren, der Verknüpfung von PEP und Erythrose-4-Phosphat zu DAHP, werden Feedbackinhibierung und Reprimierung als Regulationsmechanismen angewandt. Für diese Umwandlung gibt es drei isofunktionelle Metalloenzyme, die sich in ihrer Struktur unterscheiden. Sie werden von den Genen aroH, aroG und aroF codiert. Die Synthese und die Aktivität jedes Enzyms werden durch die

Konzentration von jeweils einer aromatischen Aminosäure reguliert. So reprimiert L-Tyrosin die Transkription des Gens aroF und inhibiert die durch aroF codierte DAHP- Synthase.

Durch die aktuelle Konzentration der drei aromatischen Aminosäuren kann außerdem die Chorismatumwandlung gesteuert werden: Phenylalanin inhibiert die Chorismat-Mutase/ Prephenatdehydratase (codiert durch pheA), Tyrosin inhibiert die Chorismat-Mutase/ Prephenatdehydrogenase, die durch tyrA codiert wird.

Vor allem durch diese beiden Regulationsschritte ist der Organismus in der Lage, das Ausmaß der Chorismatbildung und die weitere Umwandlung des Chorismats an seinen aktuellen Bedarf an aromatischen Aminosäuren anzupassen.

Die Überproduktion einer aromatischen Aminosäure wie L-Phenylalanin in einem Wildstamm von *Escherichia coli* ist wegen der Regulationsmechanismen nicht möglich, weil die gebildete Menge an Aminosäure immer nur dem Bedarf der Zelle entspricht[176]. Durch eine integrierte Produktabtrennung läßt sich hier eingreifen.

Bei gentechnischen Modifikationen ist zu beachten, daß die Verfügbarkeit der Vorstufen für die Aminosäuresynthese gewährleistet werden muß. PEP wird in vielen Stoffwechselwegen als Phosphorylgruppenüberträger genutzt, z.B. wird Glucose durch das Phosphoryltransferase- System (PTS) zum Transport durch die Zellmembran phosphoryliert. Das Erythrose-4- Phosphat wird im Zellstoffwechsel auch in Ribose-5- Phosphat umgewandelt, welches für die DNA- Synthese erforderlich ist. Für die Produktion der aromatischen Aminosäuren stehen dann weniger PEP und Erythrose-4- Phosphat zur Verfügung.

Neben der Bereitstellung der Vorstufen und der Deregulation des Stoffwechsels ist bei der Entwicklung und Optimierung eines Hochleistungsstamms für die industrielle Produktion einer aromatischen Aminosäure der Transport der Zielsubstanz aus der Zelle wichtig. Für L-Phenylalanin ist nicht geklärt, ob ein Mechanismus für den Export aus der Zelle existiert. Einerseits weisen durchgeführte Untersuchungen auf einen Export durch Diffusion hin[177], andererseits werden Stämme mit einem selektiv verstärkten L-Phenylalaninexport durch die Membran beschrieben, was auf einen enzymatisch geregelten Export der Aminosäure deutet. L-Phenylalanin wurde dabei im gleichen Maß hergestellt wie bei deregulierten Stämmen. Der Export des Phenylalanins aus den Zellen hat demnach einen extrem großen Einfluß auf die extrazelluläre Konzentration dieser Aminosäure.

10.3 Prozeßführung in Bioreaktoren

Für Fermentationsprozesse unterscheidet man grundsätzlich drei Betriebsarten der Prozeßführung. Man betrachtet die Bioreaktoren als ideale, d.h. als homogen durchmischte Reaktoren (2). Für diese Reaktoren gilt die allgemeine Bilanzgleichung:

Gl. 10-1
$$\frac{d\,(V \cdot c)}{d\,t} = \dot{v}_{in} \cdot c_{in} - \dot{v}_{out} \cdot c_{out} \pm R_i$$

mit: R_i: volumenenbezogene Reaktionsrate (Produktbildungsrate π oder Substratverbrauchsrate σ)

$\dot{v}_{in}$: Volumenstrom in Reaktor

$\dot{v}_{out}$: Volumenstrom aus dem Reaktor

c: Konzentration

In der folgenden Abbildung ist das Schema eines idealen Rührkessels abgebildet:

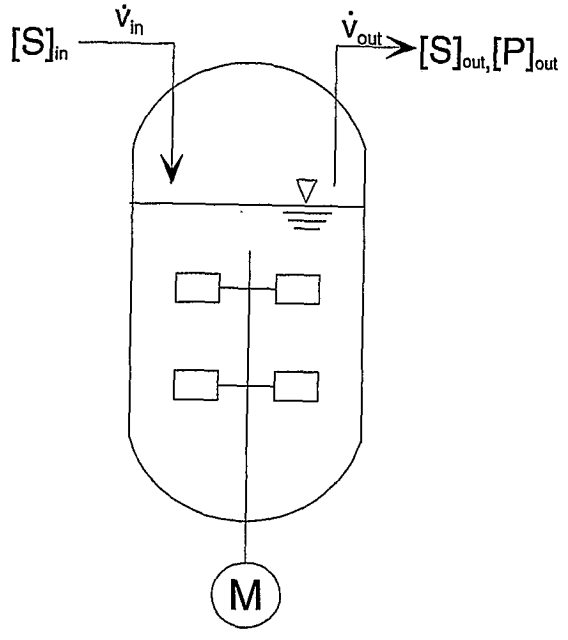


Abb. 10-4 Schema eines idealen Rührreaktors. Die Konzentrationen im Ablauf entsprechen den Konzentrationen im Reaktor.

In *batch- oder ansatzweisen Verfahren* werden alle Substrate vorgelegt, während der Fermentation werden nur Sauerstoff und Korrekturmittel (Säure, Lauge, Antischaummittel) zugegeben. Der batch- Prozeß zeichnet sich durch einen geringen apparativen Aufwand aus. Für ihn gilt:

$$c(X,S,P) = f(t)$$

$$V_{Ferm} = \text{const.}$$

$$\dot{v}_{in} = \dot{v}_{out} = 0$$

Beim *kontinuierlichen Verfahren* wird nach der Anwachsphase ständig frisches Medium im gleichen Maß in den Fermenter dosiert, wie Fermentationslösung abgezogen wird, so daß ein Fließgleichgewicht erreicht wird. Das Wachstum im Chemostaten wird durch die limitierte Zugabe eines Substrates reguliert. Im kontinuierlichen Verfahren gilt:

$$c(X,P,S) = \text{const.}$$

$$V_{Ferm} = \text{const.}$$

$$\dot{v}_{in} = \dot{v}_{out} = \text{const.}$$

Die Prozeßdauer kann bis zu mehreren Wochen betragen. Den gut definierten, reproduzierbaren Bedingungen eines funktionierenden Verfahrens stehen oft die Probleme gegenüber, die das Erreichen des Fließgleichgewichts erschweren oder verhindern. Diese stellen sich z.B. durch eine falsche Steuerung, Immobilisierung an der Reaktorwand oder die Anreicherung von Mutanten[178].

Bei *Fermentationen im Zulaufverfahren* (engl.: fed-batch) werden nicht alle Substrate im Fermenter vorgelegt, sondern man führt ein oder mehrere Substrate im Laufe des Prozesses zu. Es wird keine Fermentationslösung abgezogen. Bei Fermentationen im Zulaufverfahren gilt:

$$c(X,P) = f(t) \qquad c(S) = \text{const.} \qquad \text{(für nutristatische Substratregelung)}$$

$$V_{Ferm} = f(t)$$

$$\dot{v}_{in} = f(t) \vee \dot{v}_{in} = f(\sigma) \qquad \dot{v}_{out} = 0$$

Die Konzentration der Substrate im Reaktor bleibt gering. Dadurch ist eine Prozeßführung bei Katabolitrepression, bei der Forderung nach kontrollierter Zugabe von Precursor-Substanzen oder von Regulatoren, erhöhter oder schneller zu erreichender Zelldichte oder einer Verlängerung der stationären Phase sinnvoll.

Die Wahl der Betriebsart für einen Prozeß wird maßgeblich von der Reaktionskinetik bestimmt. Beispielsweise verzögern katabolitreprimierte Prozesse das Wachstum in einer ansatzweisen Fermentation. Der Mehraufwand des fed-batch- Verfahrens lohnt sich hier, weil durch eine geringe Substratkonzentration im Reaktor eine Verzögerung des Wachstums vermieden wird[179].

10.4 Prozeßkinetische Größen

10.4.1 Wachstum

Mikrobielles Wachstum kann als Änderung der Biotrockenmassekonzentration über die Zeit beschrieben werden. Das Differential d[X]/dt bezogen auf die Biomassekonzentration ist dann die Wachstumsrate μ, also ein Maß für das Wachstum.

Gl. 10-2
$$\mu = \frac{1}{[X]} \cdot \frac{d[X]}{dt}$$

Durch Integration von Gleichung über die Zeit erhält man mit t_2-t_1=Δt Gleichung. Dabei ist darauf zu achten, daß man bei größer gewähltem Δt stark fehlerbehaftete Werte erhält.

Gl. 10-3
$$\mu = \frac{\ln[X_2] - \ln[X_1]}{\Delta t} \qquad \text{mit } \Delta t = t_2 - t_1$$

Substratverbrauch und Produktbildung

Analog zur Wachstumsrate beschreiben die auf die Biomassekonzentration bezogenen Differentiale d[S]/dt und d[P]/dt die Substratverbrauchsrate σ bzw. die Produktbildungsrate π:

Gl. 10-4
$$\sigma = \frac{1}{[X]} \cdot \frac{d[S]}{dt}$$

Gl. 10-5
$$\pi = \frac{1}{[X]} \cdot \frac{d[P]}{dt}$$

Die Produktbildungsrate wird häufig volumenbezogen als π_V angegeben, der Bezug auf die Biomassekonzentration entfällt dann. Die integrale volumenbezogene Produktbildungsrate über den gesamten Fermentationszeitraum wird üblicherweise als Raum- Zeit- Ausbeute (RZA, in $[gl^{-1}h^{-1}]$) bezeichnet.

Damit ergeben sich für die integrale Biomasseselektivität $Y_{X/S}$ und die integrale Produktselektivität $Y_{P/S}$ über die gesamte Fermentationsdauer folgende Zusammenhänge:

Gl. 10-6
$$Y_{X/S} = \frac{\Delta[X]}{\Delta[S]}$$

und

Gl. 10-7 $$Y_{P/S} = \frac{\Delta[P]}{\Delta[S]}$$

10.4.2 Bilanzierung von O_2 und CO_2

Der Sauerstoffverbrauch und die Kohlendioxidbildung werden über die Massenbilanz in der Gasphase bestimmt. Da die Konzentrationen in der Flüssigphase sehr gering sind, werden sie vernachlässigt. Die Sauerstofftransferrate (OTR) und die Kohlendioxidtransferrate (CTR) können wie folgt berechnet werden:

Gl. 10-8 $$OTR = \frac{\dot{v}_g \cdot ([O_2]_{in} - [O_2]_{out})}{V_R}$$

Gl. 10-9 $$CTR = \frac{\dot{v}_g \cdot ([CO_2]_{out} - [CO_2]_{in})}{V_R}$$

11 Literaturverzeichnis

[1] Behrens; 10 Years of EFB, BTF Biotech Forum, 5/88-EFB Newsletter publiziert im BTF-Biotech-Forum, Heidelberg: Hüthig Verl., 1988

[2] Leuchtenberger, W.; Amino Acids – Technical production and use. In: Rehm, H.J.; Reed, G.; Pühler, A.; Stadtler; Biotechnology 6, 1996, S. 465-502

[3] Ager, D.J.; Pantaleone, D.P.; Henderson, S.A.; Katrizka, A.R.; Prakash, I.; Walters, D.E.; Synthetische nicht nutritive Süßstoffe, Angewandte Chemie, 110, S. 1901-1916, 1998

[4] Park, J.G.; Rogers, P.L.; Kinetic Equations for L-Phenylalanine production by a hyperproducing mutant of *E. coli*, Biocatalysis, 2, S. 79-87, 1989

[5] Neidhart F.C.; Curtis, R.; Ingraham, J.L.; Lin, E.C.C.; Low, K.B.; Magansnik, B.; Reznikoff, W.S.; Riley, M.; Schaechetr, M.; Umberger, H.E.; Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology, Vol 1, ASM Press, Washington, D.C.

[6] Frost, J.W.; Draths, K.M.; Biocatalytic synthesis of aromatics from D-Glucose: renewable microbial sources of aromatic compounds, Annual Rev Microbiology, 49, 1995, S.557-79

[7] Tsuchida, T.; Kubota, K.; Yoshinaga, F.; Production of L-Phenylalanin by a mutant of Brevibacterium lactofermentum 2256, Agricultural and Biological Chemistry, **51**, 8, S. 2095-2101, 1987

[8] 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; J.A. Chem. Soc., 115, 1993, S. 11581-11589

[9] Grinter, N. J.; Developing an L-Phenylalanine Process, Chemtech, S. 33-37, July 1998

[10] Backman, K.; O'Connor,J.; Venkatasubramanian, K.; Genetic Engineering of metabolic pathways applied to the production of phenylalanine, Annals of the New York Academy of Science, 89, 5, S. 16-24, 1990

[11] Vandak, D. ; Zigova, J.; Sturdik, E.; Schlosser, S.; Evaluation of solvent and pH for axtractive fermentation of butyric acid, Process Biochemistry, **32**, 3, S. 245-251, 1997

[12] Leuchtenberger, W.; Amino Acids – Technical production and use. In: Rehm, H.J.; Reed, G.; Pühler, A.; Stadtler; Biotechnology 6, 1996, S. 465-502

[13] Heath, C.A.; Belfort, G.; Synthetic Membranes in Biuotechnology: Realities and Possibilities, Advances in Biochemical Engineering: Biotechnology, **47**, S. 45-88, 1992

[14] Wieczorek, S.; Brauer, H.; Continuous production of citric acid with recirculation of the fermentation broth after product recovery, Bioprocess Engineering, 18, S. 75-77, 1998

[15] Mattiasson, B.; Holst, O.; Extractive Bioconversions, Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong, 1991

[16] Martak, J.; Sabalova E.; Schlosser, S.; Toxicity of organic solvents used in situ in fermentation of lactic acid by rhizopus arrhizus, Biotechnology Techniques, 11, 2, S. 71-75, 1997

[17] Freeman, A.; Woodley, J.M.; Lilly, M.D.; In situ product removal as a tool for bioprocessing, Biotechnology, 11, S. 1007-1012, 1993

[18] Chmiel, H.; Integrated Downstream Processing with Membranes, Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, **2**, 4, S. 184-191, 1988

[19] van der Wielen, L.A.M.; Potters, J.J.M.; Straathof, A.J.J.; Luyben, K.Ch.A.M.; Integration of Bioconversion and continuous product separation by means of countercurrent adsorption, Chemical Engineering science, **45**, 8, S. 2397-3404,1990

[20] Thömmes, J.; Zur Fließbettadsorption als Primärschritt in der Proteinaufreinigung, Habilitationscshrift, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, 1999

[21] Saunders, M.S; Vierow, J.B.; Carta, G.; Uptake of Phenylalanin and Tyrosine by a strong-acid cation exchanger, AIChE Journal, **35**, 1, S. 53-68, 1989

[22] Grzegorczyk, D.S.; Carta, G.; Adsorption of Amino Acids on porous polymeric adsorbents - 1. Equilibrium, Chemical Engineering Science, 51, 5, S. 807-817, 1996

[23] Thömmes, J.; Heinrich Heine Universität Düsseldorf, persönliche Mitteilung, 9/97

[24] v. Eysmondt, J.; Einsatz der Elektrodialyse bei der anaeroben Essigsäure-Produktion, Dissertation, Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 1990

[25] Kuppinger, F.F.; Neubrand, W.; Rapp, H.J.; Eigenberger, G.; Elektromembranverfahren Teil 1: Grundlagen und Modellbildung, Chemie Ingenieur Technik, 67, 4, S. 441-448, 1995

[26] Moresi, M.; Sappino, F.; Effect os some Operating Variables on Citrate Recovery from Model solutions by Electrodialysis, Biotechnology and Bioengineering, 59, 3, S. 344-350, 1998

[27] Yoshiyuki Nomura, Masayoshi Iwahara, Motoyoshi Hongo; Acetic Acid Production by an Electrodialysis Fermentation Method with a computerized Control System, Applied and Environmental Microbiology, **54**, 1, S. 137ff., 1988

[28] Schärtges, D.; Zum Einsatz von Membranverfahren bei der fermentativen Aminosäure-Gewinnung am Beispiel von L-Isoleucin, Disssertation RWTH Aachen, 1993

[29] Kuppinger, F.F.; Neubrand, W.; Rapp, H.J.; Eigenberger, G.; Elektromembranverfahren Teil 2: Anwendungsbeispiele, Chemie Ingenieur Technik, 67, 6, S. 731-739, 1995

[30] Miyoshi, H., Donnan dialysis with ion-exchange membranes. I. Theoretical equations; Separation Science Technology, 31, 15, S. 2117-2129, 1996

[31] Miyoshi, H, ; Yamagami, M.; Donnan dialysis with ion-exchange membranes. II. Diffusion coefficients using same valence ions, Sep. Sci. Technol., **31**, 16, S. 2183-2194, 1996

[32] Alonso, K. ; The Transport of amino acids, amino acid derivatives and ions across ion-exchange membranes, Biochimica and Biophysica Acta, 860, S. 484-490, 1986

[33] Rush, W.E.; Baker, B.L.; Quantitative description of ion transport in Donnan ion exchange membrane systems, Separation Science Technology, 15, 4, S. 1153-1169, 1980

[34] Strathmann, H. Universität Twente, NL, persönliche Mitteilung 10/97

[35] Sato, K.; Sakairi, T.; Yonemoto, T.; Tadaki, T.; Ionic transport of a continuous Donnan dialyzer with two parallel-plate channels, Journal of Chemical Engineering of Japan (Tokio), 24, 5, S. 575-580, 1991

[36] Bödekker, K.; Schorn, C., Windmöller, D.; Verfahren zur Separierung organischer Säuren aus einem Fermentationsmedium, Patentschrift DE 196 04 700, 1997

[37] Tanabe, T.; Ohmori, K.; Heat treatment of fermentation broth obtained by culturing E. coli - culture broth heat pre-treatment and UF or MF for recombinant protein purification, Patentschrift EP-770-676, 23.10.95 / 95jp-273814

[38] Panke, S.; Held, M.; Schmid, A.; Wubbolts, M.G.; Witholt, B.Suske, W.; Kohler, H.-P. E.; Engesser, K.-H.; Solid phase extraction for biocatalytic production of toxic compounds, Bioworld, **5**, S. 2-9, 1999

[39] Held, M.; Schmid, A.; Wubbolts, M.G.; Witholt, B.; Suske, W.; Kohler, H.-P. E., An integrated Process for the Production of toxic catechols from toxic phenols based on a designer Biocatalyst, Biotechnology and Bioengineering, 62, **6**, S. 641-648, 1999

[40] Held, M.; Schmid, A.; Wubbolts, M.G.; Witholt, B.; Suske, W.; Kohler, H.-P. E.; Engesser, K.-H.; Preparative scale production of 3-substituted catechols using a novel monooxygenase from Pseudomonas azelaica HBP 1, Journal of molecular catalysis B: Enzymatic, **5**, S. 87-93, 1998

[41] Kawakita, T.; Ogura, T.; Saeki, M.; Hayasaki, H.; Selectivity Coefficients of Amino Acids for the Ammonium Ion on a strong cation exchange resin, Agric. Biol. Chem.; 54, 1, S. 1-8, 1990

[42] Chmiel, H.; Integration von Membranverfahren in kontinuierliche Bioprozesse, Chemie Ingenieur Technik, **65**, 7, S. 848-852, 1993

[43] Hampe, M.; Bäcker, W.; Abtrennung und Rückgewinnung von Stoffen durch Flüssig-Flüssig-Extraktion und Flüssigmembranverfahren; Tagung: "Stofftrennverfahren in der Umwelttechnik", GVC, Köln, 1990

[44] Mulder, M.; Tholen, J.; Maaskant, W.; European Membrane Guide, Alinea, Enschede, NL, 1997

[45] Zha, F.F.; Fane, A.G.; Fell, C.J.D.; Phenol Removal by Supported Liquid Membranes, Separation Science and Technology, 29, **17**, S. 2317-2343, 1994

[46] Reed, B.W.; Semmens, M.J.; Cussler, E.L.; Membrane Contactors, in Membrane Separations Technology; Nodle, R.D.; Stern, S.A., Elsevier Science, 1995

[47] Knutsson, M.; Lundh, J.; Mathiason, L.; Jönsson, J.; Sundin, P.; Supported Liquid Membranes for the extraction of phenolic acids from circulating nutrient solutions, Analytical Letters, **9**, 29, S. 1619-1635, 1996

[48] Schulz, G.; Separation Techniques with supported liquid membranes; Desalination, 68, p. 203-209, 1988

[49] Danesi, P.R.; Reichley-Yinger, L.; Rickert, P.G.; Lifetime of supported liquid membranes: The influence of interfacial Properties, chemical composition and water transport on the longterm stability of the membranes, Journal of membrane science, 31, 1987

[50] Teramoto, M.; Tanimoto, H.; Mechansim of Copper Permeation through Hollow Fiber Liquid Membranes, Separation Science and Technology, 18(10),S. 871ff., 1983

[51] Deblay, S.; Delepine, S.; Minier, M.; Renon, H.; Selection of organic phases for optimal stability and efficiency of flat sheet supported liquid membranes, Separation Science and Technology, **26**, 1, S. 97-116, 1991

[52] Loicano, O.; Drioli, E.; Molinari, R.; Metal Ion Separation and Concentration with supported Liquid Membranes, Journal of Membrane Science, 28, S. 123ff., 1986

[53] Chan, C. C.; Yang, J.F.; Separation and Concentration of Phenylalanine by Emulsion Liquid Membrane in CSTR Extraction Process, Separation Science and Technology, **30**, 15, S. 3001-3024, 1995

[54] Eyal, Aharon M.; Bressler, Industrial Separation of carboxylic and Amino Acids by Liquid Membranes: Applicability, Process Consideration, Potential Advantages (Mini Review), Biotechnology and Bioengineering, **41**, S. 287-295, 1993

[55] Schneider, K.; Rintelen, T.H.; Rückgewinnung von Metallen mit Hilfe trägergestützter Flüssigmembranen, Chemie Ingenieur Technik, 58, 10, S. 800ff., 1986

[56] TNO Environmental and Energy Research, Emulsie Pertractie, NL, Patentschrift 8903039, 1991

[57] Sengupta, A.; Basu, R.; Sirkar, K.K.; Separation of solutes from aqueous solutions by contained liquid membranes, AIChE Journal, 34 (10), S.1698ff., 1988

[58] Basu, R.; Sirkar, K.K.; Citric Acid separation using a hollow fiber liquid membrane system, Membrane Technology, 13, S. 7ff., 1991

[59] Reed, B.W.; Semmens, M.J.; Cussler, E.L.: Membrane Contactors / Membrane Separations Technology. Principles and Applications. Hrsg. Noble, R.D.; Stern, S.A.; Bd. 2; Amsterdam Lausanne New York Oxford Shannon Tokyo, Elsevier Science B.V. 1995, S. 467-498

[60] Danesi, P.R.: Principles and Practices of Solvent Extraction. New York Basel Hong Kong, Marcel Dekker Inc., 1992

[61] Lewis, W.K.; Whitmann, W.G.: Industrial Engineering Process, 16, 1992, S. 1215-1250

[62] Mecklenburgh, J.C.; Hartland, S.: The Theory of Backmixing. London New York Sidney Toronto, John Wiley and Sons, 1975

[63] Happel, J.; Brenner, H.: Viscous Flow in Multiparticle Systems: Motion of Spheres and a Fluid in Cylindrical Tube. in: AIChE. Journal 3, 1957, S.506 – 513

[64] Schneider, J., Celanese AG: mündliche Mitteilungen, 1999

[65] Hartmann, H.; Soika, M.; Gerigk, M.; Bäcker, W.; Flüssigmembranextraktion in Hohlfasermodulen, Preprints Aachener Membrankolloqiuim, Aachen, 14. - 16.3.95

[66] Vauck, W.; Müller, H.: Grundoperationen chemischer Verfahrenstechnik

[67] Ananthakrishnan, V.; Gill, W.N.; Barduhn, A.J.; Laminar Dispersion in Capillaries: Part 1. Methamatical Analysis, A.I.Ch.E.Journal, **11**, 6, S. 1063-1072, 1965

[68] Celanese AG, Wiesbaden: Produktinformation zu 4x28 Kontaktoren

[69] Sengupta A.; Celgard, Charlotte, USA: schriftliche Mitteilung, 1999

[70] Sengupta, A.; Peterson, P.A.; Miller, B.D.; Schneider, J.; Fulk, C.W.: Large-scale application of membrane contactors for gas transfer from or to ultrapure water, Separation and purification technology, 14, 1998, S. 189-200

[71] Coulson, J.M.; Richardson, J.F.: Chemical Engineering, Vol.I, Pergamon Press, Oxford, 1977

[72] Schöner, P.; Plucinski, P.; Nitsch, W.; Daiminger, U.: Mass Transfer in the shell side of cross flow hollow fiber modules; Chemical Engineering Science, Vol.53, No.3, 1998, S. 2319-2326

[73] Grassmann, P.; Physikalische Grundlagen der Verfahrenstechnik, Salle + Sauerländer, Frankfurt, 1983

[74] Coulson, J.M.; Richardson, J.M.: Chemical Engineering, Vol.II, Pergamon Press Oxford, 1986

[75] Verfahrenstechnische Berechnungsmethoden, Teil 5; Chemische Reaktoren, Ausrüstung und ihre Berechnung, VCH Weinheim, 1987

[76] Schlichting, E.; Halwachs, W.; Schügerl, K.; Reactive extraction of salicylic acid and D/L-Phenylalanine in a stirred cell, Chem. Eng. Comm., 151, 1987, S. 193-205

[77] Abbasian, K.; Degener, W.; Schügerl, K.; Reactive extraction of primary and secondary metabolites; Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 93, 1989, S. 967-980

[78] Schügerl, K; Hänsel, R, Schlichting, E; Halwachs, W.; Reaktivextraktion, VDI-Berichte Nr. 607, 1986, S. 779-803

[79] Hänsel, R.; Halwachs, W.; Schügerl, K.; Reactive Extraction of d,l-Phenylalanine with Trioctylmethylammoniumchloride (TOMAC) as a carrier - III. equilibrium and mass transfer investigations; Chemical Engineering Science; **41**, 7, S. 1811-1815, 1986

[80] Schügerl, K., Solvent Extraction in Biotechnology, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, 1994

[81] Lukhezo, M.; Kelly, N.A.; Reuben, B.G.; Dunne L.J.; Verrall, M.S.; Reactive Solvent Extraction of Amino Acids, Proceedings ISEC 96, S. 87-92, 1996

[82] Scheler, C.; Popovich, M.; Bajpai, R.; Reaktiv-Extraktion von Milchsäure aus einer Fermentationsbrühe in einem Hohlfasermembranmodul, Chemie Ingenieur Technik, **69**, 7, S. 951-955, 1997

[83] Wieczorek, S.; Brauer, H.; Continuous production of citric acid with recirculation of the fermentation broth after product recovery, Bioprocess Engineering, 18, S. 75-77, 1998

[84] Thien, M.P.; Hatton, T.A.; Wang, D.I.C.; Separation and Concentration of Amino Acids Using Liquid emulsion Membranes, Biotechnology and Bioengineering, 32, S. 604-615, 1988

[85] Schlichting, E.; Untersuchungen zur Reaktivextraktion von Salicylsäure und d,l-Phenylalanin in einer pulsierten Siebbodenextraktionskolonne, Dissertation Universität Hannover, 1984

[86] Escalante, H.; Ortiz, M.I.; Irabien, J.A.; Concentration of L-Phenylalanine by non-dispersive Extraction in Hollow Fibre Modules, ISEC 96, Melbourne, Australia, S. 1493-1498, 1996

[87] Cohn, E.J.; Strong, L.E.; Hughes, W.L.; Mulford, D.J.; Ashworth, J.N.; Melin, N,; Taylor, J. Am. Chem. Soc.; 68, S. 459, 1946

[88] Weast, R.C.; Astle, M.J.; Handbook of chemistry and physics. A ready-reference book of chemical and physical data, 60. Auflage, CRC-Ress, Inc.; Boca Raton, FL, USA, 1979

[89] Reader FSA, Thermal Separations in Biotechnology, Institute for Biotechnology Studies Delft Leiden (BODL), Delft University of Technology, Delft, NL, 1997

[90] v. Eysmondt, J.; Kontinuierliche Reaktivextraktion von L-Leucin, Diplomarbeit, Universität Bonn, 1987

[91] Holleman, A.F.; Wiberg, E.; Lehrbuch der anorganischen Chemie, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1985

[92] Barret, G.C.; Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids, London, New York, Chapman and Hall, 1985

[93] Schügerl, K.; Hänsel, R.; Schlichting, E.; Halwachs, W.; Reaktivextraktion, Chemie Ingenieur Technik, **58**, 4, S. 308-317, 1986

[94] Cardoso, M.M.; Viegas, R.M.C.; Crespo, J.P.S.G., Extraction end re-extraction of phenylalanine by cationic reversed micelles in hollow fibre contactors, Journal of membrane science, 156, S.303-319, 1999

[95] Schöner, P.; Plucinski, P.; Nitsch, W.; Daiminger, U., Mass Transfer in the shell side of cross flow hollow fiber modules, Chemical Engineering Science, **53**, 13, S.2319-2326, 1998

[96] Daiminger, U.A.; Geist, A.G.; Nitsch, W. ;Plucinski, P.K., Efficiency of hollow fibre modules for nondispersive chemical extraction., Ind. Eng. Chem. Res., **35**, 1, S.184-191, 1996

[97] Feron, P.H.M.; Jansen, A.E.; Klaasen, R.; Ter Meulen, B.Ph.; Akkerhuis, J.J.; van Maanen, H.C.H.J., Development of Membrane based absorption and extraction processes and Equipment, TNO Scientific Report, Apeldoorn, NL, 1993

[98] Kertes, A.S.; King, C.J.; Extraction chemistry of Fermentation Product Carboxylic Acid, Biotechnology and Bioengineering, 28, S. 269-282, 1986

[99] Teramoto, M.; Yamashiro, T.; Inoue, A.; Matsuyama, H.; Miyake, Y.; Extraction of amino acids by liquid membranes containing di(2-ethyl)Phosphoric acid as a carrier, Journal of membrane science, 58, S. 11-32, 1991

[100] Boyadzhiev, L.; Atanassova, I.; Extraction of Phenylalanine from dilute solutions by rotating film pertraction, Process Biochemistry, 29, S. 237-243, 1994

[101] Yagodin, G.A.; Yurtov, E.V.; Golubkov, A.S.; Liquid Membrane Extraction of Amino Acids, International Solvent Extraction Conference 86, Preprints Volume 3, DECHEMA 86, 1986

[102] King Industries, Norwal, USA: Product Bulletin SY2-378, 1998

[103] Uddin, M. S.; Hidajat, Kus; Bee-Gim L.; Chi-Bun, C.; Interfacial Mass Transfer in Stripping of Phenylalanine in a Liquid-Liquid Extraction Process, Journal of Chemistry Technology Biotechnolgy, 53, S. 353-357, 1992

[104] Deblay, P.; Minier, M.; Renon, H.; Separation of L-Valine from Fermentation Broths Using a supported liquid Membrane, Biotechnology and Bioengineering, 35, S. 123-131, 1990

[105] Uddin, M. S.; Hidajat, K.; Lim, B.G.; Ching, C.B.; Interfacial Mass Transfer in Extraction of Amino Acid by ALIQUAT 336 in Organic Phase, Journal of Chemistry Technology Biotechnolgy, 48, S. 415-426, 1990

[106] Jaquet, A.; Marison, I.W.; von Stockar, U.; Meyer, H.P.; Choice of a Method for in situ recovery of 3-Pyridylacetic acid formed by biotransformation with pseudomonas oleovorans, Chimia, **50**, 9, S. 426-427, 1996

[107] Thien, M.P.; Hatton, T.A.; Wang, D.I.C.; Separation of Amino Acids from Fermentation Broth using liquid emulsion membranes, International Solvent Extraction Conference 86, Preprints Volume 3, DECHEMA 86, 1986

[108] Adarkar, J.A.; Sawant, S.B.; Joshi, J.B.; Pangarkar, V.G.; Extraction of Amino Acids Using an Immobilized Liquid Membrane, Biotechnology Progress, 13, S. 493-495, 1997

[109] Cardoso, J.P.; Purification of penicilin G Amidase using Quarternary Ammonium salts and effect on the activity of the imobilised enzymes, Bioprocess Engineering, 16, S. 209-218, 1997

[110] Hampe, M.; Flüssig/Flüssig-Extraktion: Einsatzgebiete und Lösungsmittel-Auswahl, Chemie Ingenieur Technik, **50**, 8, S. 647-655, 1978

[111] Abbasian, K,; Degener, W.; Schügerl, K.; Reactive Extraction of salicylic acid and D,L-Phenylalanine in a stirred cell; Chemical Engineering Communications, **41**, 7, S. 1811-1815, 1986

[112] Stuckey, D.C.; Solvent Extraction in Biotechnology, ISEC 96, S. 25-34

[113] Hänsel, R.; Halwachs, W.; Schügerl, K.; Physical and reactive extraction of salicylic acid 1. Investigations on fixed, freely suspended and pulsed droplets; Chemical engineering science, **41**, 3, S. 555-565, 1986

[114] Cockrem, M.C.M.; Flatt, J.H.; Lightfoot, E.N.; Solvent Selection for Extraction from Dilute Solution, Separation Science and Technology, **24**, 11, S. 769-807, 1989

[115] Geist, A.; Modellierung der Multikationenextraktion in Hohlfasermodulen auf der Basis von kinetischen Messungen und Gleichgewichtsdaten, Dissertation, Technische Universität München, 1997

[116] Nitsch, W.; Schoor, A. van; Zur Stoffaustauschkinetik von Salpetersaeure zwischen Wasser und mit Tributylphosphat beladenem Hexan, Chemie Ingenieur Technik, **54**, 6, S. 614-615; 1982

[117] Nitsch, W.; Kruis, B.; The Influence of Flow and Concentration on the Mass Transfer Mechansim in Chelating Liquid/Liquid Extractions, J. Inorg. Nucl. Chemistry, 40, S. 857ff, 1978

[118] Nitsch, W. Raab, M.; Wiedholz, R.; Transport mechanism of heat and mass transfer between turbulent liquid phases, Chemie Ingenieur Technik, **45**, 16, S. 1026-1032, 1973

[119] Hänsel, R.; Halwachs, W., Schügerl, K., Physical and reactive extraction of salicylic acid 1. Thermodynamic and kinatic investigations in a stirred cell, Chemical Engineering Science, **41**, 1, S. 135-141, 1986

[120] Schneider, J.: Celanese AG, mündliche Mitteilung 10/99

[121] Liqui-Cell® Extra-Flow Membrankontaktor Reinigungsanleitung; Separation Products, Hochst Celanese Corporation, 1996

[122] Daiminger, U. ; Nitsch, W.; Plucinski, P., Geist. A.; Nondispersive Chemical Extration in Hollow Fiber Modules, ISEC 96, S. 1161-1166, 1996

[123] Liqui-Cell® Chemical Resistance Guide; Separation Products, Hochst Celanese Corporation, 1996

[124] Schneider, J.: Celanese AG, mündliche Mitteilung4/98

[125] Salz, R.; Watson Marlow Deutschland; mündliche Mitteilung 10/97

[126] Gerigk, M.R.; Prozeßebtwicklung zur fermentativen Produktion von L-Phenylalanin, Dissertation TU Berlin, in Bearbeitung

[127] Gerigk, M.R.; Takors, R.; Wandrey, C.; Entwicklung eines Fermentationsprozesses zur Herstellung von L-Phenylalanin mit *E. coli* unter Einsatz verschiedener Regelungsstrategien, GVC-Fachausschußsitzung am 08.05.00 in Bamberg, 2000

[128] Bulowsky, H.; Uhlemann, E.; Gloe, K.; Mühl, P.; The separation of calcium and magnesium from lithium chloride by liquid-liquid extraction with D_2EHPA, Hydrometallurgy, **28**, S. 323ff., 1992

[129] Wubbolts, M.; DSM Biotech Jülich, mündliche Mitteilungen, 8/2000

[130] Cardoso, M.M.; Viegas, R.M.C.; Crespo, J.P.S.G.; Extraction end re-extraction of phenylalanine by cationic reversed micelles in hollow fibre contactors; Journal of membrane science, 156, S.303-319, 1999

[131] Gerigk, M.R.; Takors, R.; Schmidt, K.; Bongaerts, J.; Wandrey, C.; Fed-Batch Fermentation Process for the Characterization of L-Phenylalanine producing *E. coli* Strains, 4th International Congress on Biochemical Engineering, Stuttgart, 2000

[132] Gerigk, M.R.; Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich GmbH, mündliche Mitteilungen, 2000

[133] Michael, G.; Henrion, G.; Untersuchungen zur Derivatisierung von Aminosäuren mit o-Phtalsäuredialdehyd, GIT Fachz. Lab., 9, S. 769-773, 1995

[134] Kreutzer, A.; Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich GmbH, persönliche Mitteilung 2000

[135] Daiminger, U.; Plucinski, P.; Nitsch, W.; Leistungspotentiale von Hohlfasermodulen für die nichtdispersive chemische Extraktion, Chemie Ingenieur Technik, **67**, 2, S. 217-221, 1995

[136] Siebold, M.; v. Frieling, P.; Schügerl, K.; Comparison of the production of lactic acid by three different lactobacilli and its recovery by extraction and electrodialysis, Process biochemistry, **30**, 1, S. 81-95, 1995

[137] Rautenbach, R.; Membranverfahren; Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1997

[138] Reaktionstechnische Untersuchungen zur oxidativen Biotranformation hydrophober Substrate, Günter Neveling geb. Schmitz, Inaugural-Dissertation, Universität Bonn, 1999

[139] Liquidchromatographie, Aced, G.; Möckel, H.J., VCH Weinheim, 1991

[140] Dworzak, W.R.; Naser, A.J.; Pilot scale evaluation of supported Liquid membrane Extraction; Separation science and technology, **22**, 2/3, S. 677-689, 1987

[141] Wandrey, C.; Reaktionstechnische Untersuchungen an Enzymkatalysatoren zur Entwicklung kontinuierlicher Verfahren; Habilitationsschrift, TU Hannover, 1977

[142] Weber, M.E.; Vera, J.H.; Wang, W.; Effect of the concentration of DODMAC and 1-Decanol on the Behaviour of Reverse Micelles in the Extraction of Amino Acids, Biotechnology and Bioengineering, 46, S. 343-350, 1995

[143] Rosane, Henry L.; Clausse, M.; Microemulsion Systems; in: Proceedimgs of the 59 Colloid and Surface Science Symposium and the 5 international Conference on Surface and colloid science, Postdam 85, New York, Marcel Dekker, 1987,

[144] Kahlweit, M.; Strey, R.; in Microemulsion Systems (Hg.: Rosano, H.; Clausse, M.), Marcel Dekker Inc., New York, 1987

[145] Lu, J.-F.; Li, Y.-G.; Ding, H.-B.; Teng, T.; Salting effect of di(2-ethylhexyl) phosphoric acid in chloride solutions, Fluid Phase equilibira, 51, S. 119-131, 1989, Elsevier Science, Amsterdam, NI

[146] Czapla, C.; Barth, H.J.; Acetic Acid Extraction under the Influence of Chemical Adsorption Layers, CHISA 98, Prag, CZ, 1998

[147] Escalante, H.; Alonso, A.I.; Irabien, A.; Separation of L-Phenylalanin by nondispersive extraction and backextraction, Separation Science and Technology, **33**, 1, S. 119-139, 1998

[148] Czapla, C.; Bart, H.J.; Charakterisierung und Modellierung der Extraktionskinetik organischer Säuren unter Berücksichtigung der Grensflächenladungseffekte, Chemie Ingenieur Technik, **71**, 12, S. 1395-1399, 1999

[149] Bryjak, M.; Wieczorek, P.; Kafarski, P.; Lejczak, B.; Transport of Amino Acids and their phosphoric acid analogues through supported liquid membranes containing macrocyclic carriers. Experimental, Journal of Membrane Science, 56, S. 167-180, 1991

[150] Cussler, E.L.; Chuanfang, Y.; Reactive Extraction of Penicillin G in Hollow-Fiber and Hollow-Fiber Fabric Modules, Biotechnology and Bioengineering, **69**, 1, S. 66 – 73, 2000

[151] Levenspiel, O.; The Chemical Reactor Omnibook, OSU Bookstores, Corvallis, Oregon, USA, 1993

[152] Kemena, L.L.; Noble, R.D.; Kemp, N.J., Optimal regimes for facilitated Transport, Journal of membrane science, 15, S. 259-274, 1983

[153] Teramoto, M.; Approximate solution of Facilitation Factors in Facilitated Transport, Industrial Engineering Chemistry Research, 33, S. 2161-2167, 1994

[154] Jemaa, N.; Noble, R.D.; Improved analytical prediction of facilitation factors in facilitated, Journal of Membrane Science, 70, S. 289-293, 1992

[155] Hatzinikolaou, D. G.; Wang, H.G.; Extractive Fermentation Systems for Organic Acids Production, Canadian Journal of chemical engineering, 70, S. 543-552, 1992

[156] Sengupta, A.; Basu, R.; Sirkar, K.K.; Separation of solutes from aqueous solutions by contained liquid membranes, **34**, 10, S. 1698-1708, 1988

[157] Ivanov, A.B.; Tarasov, V.V.; Yagodin, G.A.; Mathematical Model of diffusion with chemical reactions in relation to the description of extraction - reextraction kinetics, Plenum Publishing Corporation, 79, S. 100-102, 1979

[158] Scarpello, J.T.; Stuckey, D.C.; The Reactice Extraction of Phenylalanine with Aliquat 336: Buffer Co-Extraction Equilibrium and Mass Transfer Kinetics, Biotechnology and Bioengineering, **69**, 5 S. 469 – 477, 2000

[159] Advanced Course on Downstream Processing, 15.-19.6.1999, Delft University of Technology, Delft, NL, 1999

[160] Konstantinov, K.B.; Nishio, N.; Seki, T.; Yoshida, T., Physiologically Motivated Strategies for Control of the Fed-Batch Cultivation of Recombinant *E. coli* for Phenylalanine Production

[161] Kinugasa, T.; Hisamatsu, A.; Watanabe, K.; Takeuchi, H., A reversed micellar system using mixed surfactants of sodium bis(2-ethylhexyl)- sulfosuccinate and di(2- ethylhexyl)phosphoric acid for extraction of proteins; Journal of Chemical Engineering of Japan (1994), *27*, 557-562

[162] Engfeld, A.; Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich GmbH, Diplomarbeit in Bearbeitung, 2000

[163] Jossek, R.; Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich GmbH, mündliche Mitteilungen, 2000

[164] Draths, K.M.; Knop, D.R.; Frost, J.W.; Shikimic Acid and Quinic Acid: Replacing Isolation from Plant Sources with Recombinant Microbial Catalysis, Journal of the American Chemical Society, 121, S. 1603-1604, 1999

[165] Sadaka, M.G.; Garcia, A.A.; The effect of temperature on Forward/Back extraction Using an Amine extractant for the recovery of cyclic hydroxy carboxylic Acids, Separation Science and Technology, **33**, 11, S. 1667-1680, 1998

[166] Miles, D.; Garcia, A.A.; Sadaka, M.; Whited, G.; Recovery of shikimic acid Using Temperature-Swing Complexation Extraction and displacement Back Extraction, Isolation and Purification, 2, S. 75-82, 1994

[167] Aono, R.; Kobayashi, H.; Cell Surface properties of Organic Solvent Tolerant Mutants of *E. coli* K-12, Applied environmental microbiology, **9**, 63, S. 3637-3642, 1997

[168] Pickering, P.J.; Chaudhuri, J.B.; Chiral Extraction of (D)-Phenylalanine from(D/L)-Phenylalanine using emulsion liquid membranes, International Solvent Extraction Conference 96, Melbourne, Australia, 1996

[169] Ding, H. B.; Carr, P. W.; Cussler, E. L.; Racemic leucine separation by hollow-fibre extraction, American Journal of Chemical Engineering, **38**, 10, S. 1493-1498, 1992

[170] Patentanmeldung DE 199 19 490.44, Verfahren zur Abtrennung organischer Substanzen aus einem wäßrigen Gemisch, 29. April 99; Veröffentlichung der Patentschrift im Nov. 2000

[171] Schlegel, H. G.; Allgemeine Mikrobiologie, Thieme Verlag, Stuttgart (1992), 7. Auflage

[172] Hartmeier, W.; Biotechnologie I- Mikrobiologische, biochemische und technische Grundlagen, Unterlagen zur Vorlesung, Lehrstuhl für Biotechnologie, RWTH Aachen (1995)

[173] Stryer, L.; Biochemie, Spektrum Verlag, Heidelberg Berlin (1996), 4. Auflage

[174] Diekmann, H.; Metz, H.; Grundlagen und Praxis der Biotechnologie, Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1991

[175] Pittard, A. J.; Biosynthesis of the Aromatic Amino Acids, In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, ASM Books, Washington (1996)

[176] Grinter, N.J.; Developing an L-Phenylalanine Process, ChemTech. (1998), July, 33-37

[177] Sprenger, G.; Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich GmbH, Persönliche Mitteilungen, 1999

[178] Krijgsmann, J.; Solid Liquid Separations: Filtration, Fa. Gist Brocades, Delft (1998), 3. Auflage

[179] Büchs, J.; Bioreaktionstechnik, Unterlagen zur Vorlesung, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, RWTH Aachen (1997)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rainer Buchholz möchte ich für die Übernahme des Hauptreferats und der Betreuung dieser extern durchgeführten Arbeit danken. Trotz der seltenen Gelegenheiten zur Diskussion waren die Treffen immer sehr fruchtbar und voller interessanter Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Christian Wandrey möchte ich für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen, das große Engagement bei der Betreuung und die Übernahme des Korreferats danken. Die vergangenen drei Jahre waren für mich eine große Bereicherung.

Für den Vorsitz im Promotionsauschuß danke ich Herrn Prof. Dr. H. Görisch.

Mein Dank gilt meinem Arbeitsgruppenleiter Dr.-Ing. Ralf Takors. Die vielen kontroversen Diskussionen haben zum Gelingen einer „runden Sache" beigetragen und meine Zeit am IBT2 mit dem nötigen mathematischen Inhalt gefüllt.

Herrn Dr.Ing. Norbert Gerbsch danke ich für die kritische Durchsicht der Version 1.0 und die Einführung in die „Promoviererei" am Fachgebiet Bioverfahrenstechnik.

Meinen Diplomandinnen Frau Dipl.-Chem. Nicole Kaftzik, Frau Dipl.-Biol. Katja Silberbach und meinem Praktikanten Jan Silberbach danke ich für die gute Zusammenarbeit und den Glauben an die Sache.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Kollegen und Leidensgenossen auf dem Weg zum Abschluß der Arbeit. Die zahlreichen Diskussionen im kleinen und großen Rahmen und die lieb gemeinten „Dämpfer" waren immer ein Schritt weiter in die richtige Richtung. Insbesondere gilt hier mein Dank Herrn Dipl.-Biol. Simon Curvers, Frau Dr. Susanne Dilsen, Herrn Dr. Leon Raeven und Herrn Dr. Günter Neveling. Herrn Dipl.-Ing. Marc Gerigk danke ich für die sehr erfolgreiche Zusammenarbeit in den Tagen des scale-up und der direkten Ankopplung im Pilotmaßstab.

Dem gesamten Team der Fermentationsgruppe am IBT2 danke ich für die immerwährende Unterstützung und den vielen Spaß den wir miteinander hatten. Im besonderen gilt mein Dank: Frau Dipl.-Ing. Andrea Kreutzer für die Durchführung und Unterstützung bei den Untersuchungen zur Biokompatibilität, Frau Heidi Haase-Reiff für die Analytik und die Geduld bei zu vielen zerstörten HPLC Säulen, Herrn Dipl.-Ing. Hans-Jürgen Brandt in seiner Funktion als „Oberschwester" des Technikums, Herrn Horst Kiehl, Frau Regine Fabig und Herrn Dipl.-Ing. Andreas Franz danke ich für jedwede Unterstützung in Fragen der Datenerfassung und Prozessierung.

Mein weiterer Dank gilt:

Den Mitarbeitern der Werkstätten ohne deren aktives Engagement es nie zu einer Anlage im Pilotmaßstab gekommen wäre.

Den Mitarbeitern der DSM-Biotech insbesondere Frau Dipl.-Ing. Susanne Müschen und Herrn Dipl.-Ing. Holger Paschold, die mir das Wesen der industrienahen Prozeßentwicklung näher gebracht haben.

Meinen Eltern danke ich für ihre Geduld und die Unterstützung vom Anfang bis zum Ende meiner Ausbildung.

Meiner Frau Sandra Maaß danke ich von ganzem Herzen für die stetige Unterstützung und Motivation, auch in den harten Phasen der Doktorandenzeit, und die große Geduld mit einem zeitweise recht unausstehlichen Gefährten.

Forschungszentrum Jülich

Jül-3888
Juli 2001
ISSN 0944-2952