

Entwicklung eines nachhaltigen Verfahrens zur prozessintegrierten rekombinanten Biokatalyse für hochselektive Epoxidierungen.

AZ 13095

Projektkoordinator: *Prof. Dr. Andreas Schmid, Institut für Biotechnologie, ETH Zürich, seit 10. 2004: Lehrstuhl für Biotechnik, Fachbereich für Bio- und Chemieingenieurwesen, Universität Dortmund*

und

Prof. Dr.-Ing. Horst Chmiel, Gesellschaft für umweltkompatible Prozeßtechnik mbH (upt), Saarbrücken

Projektpartner: *Dr. Bruno Bühler, ETH Zürich, seit 10. 2004: Universität Dortmund*

Dr.-Ing. Bernhard Schlichter und M.Sc. Dipl.-Ing. Markus Mohrdieck, upt GmbH, Saarbrücken

Dr. Rudolf Krumbholz, K.D.-Pharma GmbH, Bexbach

Dr. Bernd Bauer, FuMA-Tech GmbH, St. Ingbert

Prof. Dr. Bernhard Hauer, Dr. T. Habicher und Dr. M. Breuer, BASF, Ludwigshafen

Projektbeginn: 1.8.2003

Laufzeit: 1.8.2003 – 31.7.2005

Dortmund, 2005

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
TABELLENVERZEICHNIS	6
1 ZUSAMMENFASSUNG	7
2 ANLASS UND ZIELSETZUNG	8
3 VERWENDETE METHODEN	11
3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	11
3.2 KULTIVATION – PROZESSFÜHRUNG.....	11
3.3 ANALYTISCHE METHODEN:.....	12
3.4 ENGINEERING, AUFBAU UND INBETRIEBNAHME EINES LABOR-VERSUCHSTANDES FÜR DIE PROZESSINTEGRIERTE BEGASUNG UND PRODUKTISOLIERUNG:	12
3.5 MEMBRANENTWICKLUNG UND -CHARAKTERISIERUNGEN:.....	12
3.6 MEMBRANMODULENTWICKLUNG:.....	12
3.7 PRODUKTAUFARBEITUNG MIT ÜBERKRITISCHEM CO ₂	12
4 ERGEBNISSE	13
4.1 PROZESSETABLIERUNG UND -OPTIMIERUNG IM HINBLICK AUF PRODUKTEXTRAKTION UND BEGASUNG MIT MEMBRANMODULEN	13
4.1.1 <i>Kontinuierliche Kultivierung</i>	15
4.1.2 <i>Wiederholtes Zulaufverfahren (repeated fed-batch)</i>	17
4.2 BIODKATALYSATORENGINEERING — ERHÖHUNG DER STYB-EXPRESSION	19
4.3 BIODKATALYTISCHE STYROLEPOXIDATION MIT RUHENDEN ZELLEN.....	21
4.4 AUFBAU EINER LABORVERSUCHSANLAGE	25
4.5 MEMBRAN- UND MODULENTWICKLUNG.....	26
4.5.1 <i>Membranentwicklung</i>	27
4.6 UNTERSUCHUNGEN ZUM SAUERSTOFFEINTRAG	37
4.6.1 <i>Begasung in einer Kreislaufströmung (Bypass)</i>	37
4.6.2 <i>Membrangestützte integrierte Begasung im Reaktionsraum</i>	39

4.6.3	<i>Einsatz im Reaktor integrierter Membranen unter Prozess-bedingungen – $k_L a$-Wertbestimmung in kontinuierlichen Kulturen.....</i>	40
4.7	UNTERSUCHUNGEN ZUR INTEGRIERTEN PRODUKTABTRENNUNG	47
4.7.1	<i>Produktisolierung mittels Pertraktion</i>	48
4.7.2	<i>Produktisolierung mittels Pervaporation</i>	55
4.8	EVALUATION DER ÜBERKRITISCHEN FLUIDTECHNOLOGIE FÜR DIE PRODUKTAUFREINIGUNG	63
4.8.1	<i>Überkritische Fluide - Merkmale</i>	64
4.8.2	<i>Supercritical Fluid Extraction (SFE) und Chromatography (SFC).....</i>	66
4.8.3	<i>Ergebnisse.....</i>	69
4.8.4	<i>Zusammenfassung und Ausblick.....</i>	71
5	DISKUSSION.....	72
5.1	WIRTSCHAFTLICHKEITS- UND UMWELTBETRACHTUNGEN.....	72
5.1.1	<i>Stellungnahme der BASF bezüglich biokatalytischer Epoxidierung und der geplanten detaillierten Ökoeffizienzstudie.....</i>	73
5.2	SOLL-/IST-VERGLEICH – BEGRÜNDUNG FÜR ABWEICHUNGEN	75
5.3	KOOPERATION INNERHALB DES PROJEKTS.....	78
6	ÖFFENTLICHKEITSARBEIT.....	78
7	FAZIT.....	80
8	LITERATUR.....	82
9	ANHANG	83

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schema der Biotransformation von Styrol zu (S)-Styrolepoxid.	9
Abbildung 2. Schematischer Aufbau einer SFC-Apparatur.	13
Abbildung 3. Biotransformation im Zweiphasensystem im 2 L Massstab mit <i>E. coli</i> JM101 (pSPZ10) als Biokatalysator und BEHP als organischem Lösungsmittel.	14
Abbildung 4. Kontinuierliche Kultivationen von <i>E. coli</i> JM101 (pSPZ10) mit voller (4.2 mM DCPK) und reduzierter (0.17 mM DCPK) Induktion.	15
Abbildung 5. Kontinuierliche Kultivation von <i>E. coli</i> JM101 (pSPZ10) im Zweiphasensystem bei reduzierter Induktion.	16
Abbildung 6. Wachstumsrate von <i>E. coli</i> JM101 in Minimalmedium in Abhängigkeit der Styroloxid- und 2-Phenylethanolkonzentration.	18
Abbildung 7. „Repeated fed-batch“-Verfahren mit <i>E. coli</i> JM101 (pSPZ10) als Biokatalysator und BEHP als organischem Lösungsmittel.	18
Abbildung 8. Vergleich von <i>E. coli</i> JM101 (pSPZ10) und <i>E. coli</i> JM101 (pTEZ400) bezüglich Proteingehalt und Reduktaseaktivität des Rohextrakts.	20
Abbildung 9. Vergleich von nicht-wachsenden <i>E. coli</i> JM101 (pSPZ10) und <i>E. coli</i> JM101 (pTEZ400) bezüglich Styrolumsatz nach Induktion mit Oktan und Styrol.	20
Abbildung 10. Styrolumsatz mit nicht-wachsenden <i>E. coli</i> JM101 (pSPZ10) im Zweiphasensystem.	22
Abbildung 11. Styrolumsatz mit nicht-wachsenden <i>E. coli</i> JM101 (pSPZ10) bei verschiedenen anfänglichen Styrolkonzentrationen im Zweiphasensystem.	22
Abbildung 12. Vergleich von ruhenden <i>E. coli</i> JM101 (pSPZ10) und <i>E. coli</i> JM101 (pTEZ400) bezüglich Stabilität der Aktivität und des StyAB-Gehalts.	23
Abbildung 13. Einfluss der Styroloxidkonzentration auf die Styrolepoxidation mit ruhenden <i>E. coli</i> JM101 (pTEZ400).	24
Abbildung 14. Laboranlage der upt für die integrierte Begasung und Produktabtrennung via Lösungs-Diffusionsmembranen.	26
Abbildung 15. Neuartige keramische Hohlfasermembranen, basierend auf dem Konzept einer asymmetrischen Unterstruktur und einer symmetrischen Unterstruktur.	28
Abbildung 16. Einzelfasermembranmodul aus Edelstahl für die Charakterisierung der keramischen Hohlfasermembranen mittels Bubble-Point- und Flowpore-Analyse.	29
Abbildung 17. Einfluss der Porengröße auf den aufzubringenden Druck bei der Begasung wässriger Medien.	30
Abbildung 18. Photos der keramischen Membranen zur Begasung.	31

Abbildung 19. REM-Aufnahmen der beschichteten keramischen Hohlfasermembranen mit symmetrischer Unterstruktur.	33
Abbildung 20. Glasmembranmodule unterschiedlicher Dimension für die keramischen Hohlfasermembranen.	35
Abbildung 21. Edelstahl-Membranmodul mit KF-Flansch für die keramischen Hohlfasermembranbündel.	36
Abbildung 22. Prozessdesign im Labormaßstab für die membrangestützte Begasung im Bypass.	38
Abbildung 23. Begasungsversuche mit Hohlfasermembranmodul (oben, Porengröße 1,4 μm) und Monokanalrohrmembran (unten, Porengröße 6 μm).	38
Abbildung 24. Prozessdesign für die im Bioreaktor integrierte Begasung über Monokanalrohrmembranen im Labormaßstab.	39
Abbildung 25. Im Bioreaktor integrierte Begasungsmembran (Monokanalrohrmembran) mit Zuführung der Luft durch den Reaktorboden.	40
Abbildung 26. Versuchsaufbau zur kontinuierlichen Kultivierung mit im Reaktor integrierten Monokanalrohrmembranen.	41
Abbildung 27. Gebrochene feinporige Keramikmembran (1,2 μm Porendurchmesser).	42
Abbildung 28. Begasungstests mit grobporigen (6 μm ; A, B) und feinporigen (1,2 μm ; C, D) Membranen nach deren Einsatz in kontinuierlichen Kultivierungen während 150-170 h.	43
Abbildung 29. Vergleich der mit Membran (6 μm Porendurchmesser) und Begasungsring im wässrigen Einphasensystem erreichten $k\text{La}$ -Werte in Abhängigkeit von der Rührrate.	44
Abbildung 30. Vergleich der mit Membran (6 μm Porendurchmesser) und Begasungsring im Zweiphasensystem erreichten $k\text{La}^*$ -Werte in Abhängigkeit von der Rührrate.	46
Abbildung 31. Verfahrensprinzip der Pertraktion mit beschichteten keramischen Hohlfasermembranen.	48
Abbildung 32. Verfahrensfließbild der Laboranlage im Pertraktionsmodus für die integrierte Produktisolierung.	49
Abbildung 33. Produktisolierung mittels Pertraktion mit einer TEFLON beschichteten keramischen Hohlfasermembran bei mittleren Drücken um 1.5 bar lumenseitig und 1.0 bar shellseitig.	52
Abbildung 34. Produktisolierung mittels Pertraktion mit einer TEFLON beschichteten keramischen Hohlfasermembran bei mittleren Drücken um 2.5 bar.	53
Abbildung 35. Verfahrensprinzip der Pervaporation mit dichten Lösungs-Diffusionsmembranen.	55
Abbildung 36. Verfahrensfließbild der Laboranlage im Pervaporationsmodus für die integrierte Produktisolierung.	56

Abbildung 37. Styroloxidflüsse während der Pervaporation mit Zulaufgemisch ohne BEHP Phase bei 30 °C für die neuen keramischen Hohlfasermembranen und eine kommerzielle PDMS beschichtete Hohlfasermembran mit polymerer Unterstruktur.	59
Abbildung 38. Styrolflüsse der Pervaporation mit der Emulsion aus Wasser / BEHP bei 30°C und 50°C.	61
Abbildung 39. Styroloxidflüsse der Pervaporation mit der Emulsion aus Wasser / BEHP bei 30°C und 50°C.	61
Abbildung 40. Prinzip der Gegenstrom-Hochdruckextraktion mit überkritischem CO ₂ .	66
Abbildung 41. Prinzip der Hochdruckchromatographie mit überkritischen CO ₂ als mobiler Phase.	67
Abbildung 42. Schematischer Aufbau einer semipräparativen SFC-Apparatur.	68
Abbildung 43. SFC-Analytik von Styrol und Styroloxid auf verschiedenen kieselgelbasierten Phasen.	70
Abbildung 44. Vorschlag für das Design einer (halb)kontinuierlichen SFE/SFC Pilotanlage zur Isolierung von Styroloxid, Styrol und weiteren Intermediaten aus der Wasser / BEHP Emulsion.	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Vergleich von Biotransformationen mit Fed-Batch Kulturen von <i>E. coli</i> JM101 (pSPZ10) und <i>E. coli</i> JM101 (pTEZ400)	21
Tabelle 2. Übersicht über getestete Dichtungsmaterialien bzw. Vergussmassen.	34
Tabelle 3. Übersicht über entwickelte und bereitgestellte Membranmodule.	36
Tabelle 4. Abstufung von Extraktionsprozessen mit überkritischen Fluiden.	63
Tabelle 5. Kritische Punkte einiger Stoffe für die überkritische Fluidtechnologie.	64
Tabelle 6. Vergleich der physikalischen Eigenschaften von Gasen, Flüssigkeiten und überkritischen Fluiden.	65
Tabelle 7. Peakflächen bei Druck- und Temperaturvariation.	69
Tabelle 8. Arbeitsprogramm und Meilensteine – Soll-/Ist-Vergleich.	77

1 Zusammenfassung

Oxygenasen katalysieren unter milden Bedingungen industriell interessante hoch spezifische Oxyfunktionalisierungen. Limitationen finden sich häufig in den Bereichen Substrat- und Produktinhibition, Sauerstofftransfer, Enzymstabilität, und Kofaktorre-generation. Hier wird die Charakterisierung und Optimierung eines Emulsionsprozesses zur enantioselektiven Styrolepoxidierung, die auf Styrolmonooxygenase enthaltenden rekombinanten *E. coli* beruht, beschrieben. Bis-(2-ethylhexyl)phthalat (BEHP) wurde dabei als organische Phase zur Produktextraktion benutzt. Für die Prozessführung wurden kontinuierliche Kultivation inklusive Metabolismusbetrachtungen und das Zulaufverfahren evaluiert, wobei NADH-Limitation bzw. Produkttoxizität als Hauptlimitationen gefunden wurden. Basierend auf dem Zulaufverfahren wurde ein semikontinuierliches „repeated fed-batch“-Verfahren mit einer durchschnittlichen Produktivität von 5.3 g/L_{tot}/h entwickelt. Durch Erhöhung der Reduktaseexpression und Untersuchungen mit wachsenden wie auch nicht wachsenden, ruhenden Zellen im Ein- und Zweiphasensystem wurde gefunden, dass weder Massentransfer noch intrinsische Enzymstabilität limitierend waren, obwohl sich die Reduktase als relativ instabil erwies. Die zeitliche Abnahme der spezifischen Aktivität ruhender Zellen war ebenfalls aber nicht ausschließlich durch Produktinhibition bedingt.

Zur Produktabtrennung aus der Emulsion und Begasung wurden lösungsmittelbeständige Membranen und Membranmodule entwickelt. Diesbezüglich stehen nun keramische Hohlfasermembranen mit unterschiedlichen Porenweiten (20 nm bis 1400 nm) und dampfsterilisierbare Module aus Edelstahl mit austauschbaren Membranelementen (Fläche 0.05 m² bis 5 m²) zur Verfügung. Alternativ können die Membranen neuerdings auch vollkeramisch ausgeführt werden. Für die Begasung erwiesen sich die Hohlfasermembranen als sehr effizient, und ermöglichten eine bis zu 13-fache Steigerung des Sauerstoffeintrags – einer Hauptlimitation beim Scale-Up. Für die selektive Produktabtrennung wurden die keramischen Hohlfasermembranen mit Polydimethylsiloxan (PDMS) sowie einem perfluorierten Polymer (Teflon) beschichtet. Erstere war besser geeignet für die Pervaporation, letztere für die Pertraktion. Trotz viel versprechender Resultate konnten die für den Bioprozess benötigten Produktextraktionsraten noch nicht erreicht werden. Für die in Zukunft angestrebte Optimierung der Membranmodule bieten vor allem Supportunterstruktur und Beschichtung der Membranen sowie eine Vergrößerung der Membranfläche

großes Potential. Derartige Konzepte für lösemittelbeständige Membranen, die für Pertraktion wie auch Pervaporation genutzt werden können, sind bisher unbekannt und stellen eine viel versprechende innovative Neuentwicklung dar.

Trennversuche mit einem modifizierten SFE-Verfahren (Extraktion mit scCO_2) bei variablen Drücken und Temperaturen zeigten, dass Styrol und Styroloxid problemlos aus BEHP sowie der Emulsion extrahiert werden können. Des Weiteren konnten Styrol und Styroloxid mittels Chromatographie mit scCO_2 (SFC) und Kieselgel-basierter Festphase voneinander getrennt werden. In Zukunft soll die Kopplung von Biotransformation, Membrantechnologie und scCO_2 -Technologie die Produktion von chiralen Epoxiden in einem nachhaltigen integrierten Prozess erlauben.

2 Anlass und Zielsetzung

In der chemischen Industrie gibt es bisher, abgesehen von Fermentationen zur Alkohol- oder Aminosäureproduktion, wenige Beispiele für großtechnische Anwendungen (über 1000 Jahrestonnen) von Bioprozessen [1]. Biotransformationen in diesem Maßstab werden fast ausschließlich mit hydrolytischen Enzymen durchgeführt, z.B. in der Antibiotikaproduktion. Oxidoreduktasen katalysieren unter anderem hoch spezifische Oxyfunktionalisierungen von Kohlenwasserstoffen und erlauben so die Herstellung von funktionalisierten hochwertigen Grundchemikalien (Synthons), wie z.B. chiralen Epoxiden, mit bis zu 100% Ausbeute. Solche, für die chemische Industrie relevanten Reaktionen sind mit organisch chemischen Methoden schwierig durchführbar. Traditionelle chemische homogen- oder heterogenkatalytische Verfahren für stereoselektive Epoxidierungen oder Hydroxylierungen basieren auf Schwermetallkatalysatoren. Ein biotechnologischer Ansatz stellt daher eine ökonomisch sowie ökologisch interessante Alternative dar. Oxygenasen sind besonders interessant, da sie solche Reaktionen unter milden Bedingungen (Vermeidung von umweltgefährdenden Reagenzien wie Schwer- oder Edelmetallkatalysatoren, Temperaturen um 30°C) via Einbau von Luftsauerstoff katalysieren und so enzymdestabilisierende Peroxide als Kosubstrate oder Koppelprodukte vermeiden. Durch die Selektivität von enzymkatalysierten Prozessen können Reaktionssequenzen verkürzt und Nebenprodukte vermieden werden. Ein biokatalytisches Verfahren bietet also die Perspektive erheblicher Energie- und Stoffökonomie durch eine milde und selektive enzymatische Reaktionsführung.

Viele enzymatische Oxygenierungen wurden beschrieben, aber wenige davon sind kommerzialisiert. Dies liegt an der Komplexität solcher Biokatalysatoren und an der im Vergleich zu hydrolytischen Biotransformationen wesentlich anspruchsvolleren Prozessführung. Oxygenasen sind häufig relativ instabil, bestehen aus mehreren teilweise membrangebundenen Proteinkomponenten und benötigen teure Kofaktoren wie NAD(P)H. Deswegen wurden Oxygenasen bisher vor allem in ganzen, lebenden Zellen, die kontinuierliche Enzymproduktion und Kofaktorregeneration gewährleisten, eingesetzt.

Das hier beschriebene Projekt befasst sich mit der Lösung verschiedener Probleme der Oxygenase-basierten Biokatalyse mit lebenden Zellen und baut auf kürzlich entwickelten Prozessen zur spezifischen Oxygenierung von Styrol zu (S)-Styrolepoxid und von Pseudocumol zu 3,4-Dimethylbenzaldehyd auf [2,3,4]. Diese Prozesse mit Produktivitäten von 1-2 g pro Liter Totalvolumen pro Stunde basieren auf im Zulaufverfahren (Fed-Batch) kultivierten rekombinanten *Escherichia coli* als Biokatalysatoren und auf einem Zweiphasensystem bestehend aus wässrigem Medium und einem organischen Lösungsmittel. Solche Emulsionsprozesse ermöglichen die Zugabe und Produktion hoher Mengen an toxischen und schwer wasserlöslichen Substraten und Produkten. Für die Modellreaktion von Styrol zu (S)-Styrolepoxid, auf deren Optimierung und Prozessimplementierung das Projekt abzielt, ist das Konzept in Abbildung 1 dargestellt.

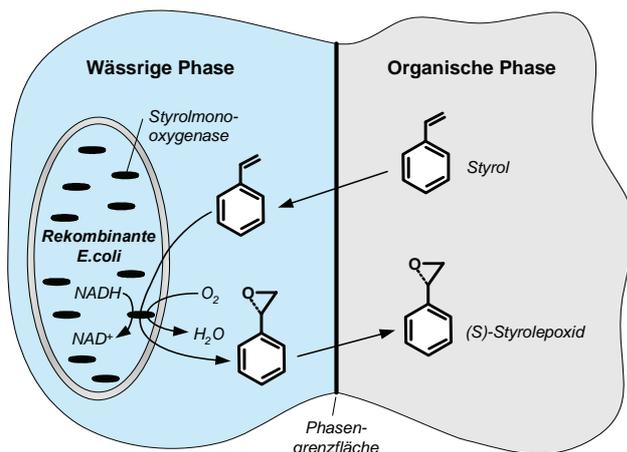


Abbildung 1. Schema der Biotransformation von Styrol zu (S)-Styrolepoxid.

Wachsende rekombinante *E. coli* exprimieren die Gene der Styrolmonooxygenase von *Pseudomonas* sp. VLB120 und gewährleisten die Regeneration von NADH. Substrat und Produkt liegen vor allem in der organischen Phase vor, wodurch deren Toxizität minimiert wird [2,3].

Das rekombinant in *E. coli* JM101 (pSPZ10) eingesetzte Enzym, die Styrolmonooxygenase von *Pseudomonas* sp. VLB120, besteht aus zwei als Homodiemere vorliegenden Proteinkomponenten, der Oxygenasekomponente StyA und der Reduktasekomponente StyB. StyB überträgt dabei Reduktionsequivalente von NADH via FAD auf StyA. Aktivierung von molekularem Sauerstoff durch FADH₂ im aktiven Zentrum von StyA führt zur stereoselektiven Epoxidierung von verschiedenen Styrolen [5]. Auf dem Plasmid pSPZ10 stehen die *styAB*-Gene unter der Kontrolle des durch Alkane (Oktan) oder Dicyclopropylketon (DCPK) induzierbaren *alk*-Regulationssystems von *Pseudomonas putida* GPo1 [2].

Aus ökonomischen sowie ökologischen Gründen ist eine halbkontinuierliche oder kontinuierliche Prozessführung vorteilhaft für industrielle Anwendungen. Dies erfordert neben der kontrollierten Zugabe der erforderlichen Edukte eine effektive Rückextraktion der Produkte aus der Emulsion sowie eine gewisse Langzeitstabilität des Biokatalysators. Die Ziele dieses Projektes umfassen die Charakterisierung und Optimierung von Katalysator und Prozess, die Entwicklung eines Pertraktionsverfahrens zur Produktaufbereitung in einem (halb)kontinuierlichen Prozess, sowie die Integration einer effizienten Begasung mittels Membranen. Letzteres soll mittels neuartigen hochporösen keramischen Membranen auch auf technischem Maßstab mit limitiertem mechanischem Energieeintrag hohe Sauerstoffeintragsraten ermöglichen. Zur Pertraktion wurden bislang zumeist Hohlfasermembranen auf Polymerbasis in wenig lösemittelbeständigen Kunststoffmodulen eingesetzt. Im Rahmen dieses Projektes wird der Einsatz neuer keramischer Hohlfasermembranen untersucht, die zum einen mit Polydimethylsiloxan (PDMS) und zum anderen mit einem Teflon[®]-Polymer beschichtet sind.

Ein weiteres Ziel war es, zu evaluieren, inwiefern überkritische Fluidtechnologie verwendet werden kann, um die am Prozess beteiligten Substanzen voneinander zu separieren. Durch die Verwendung von CO₂ als Lösemittel entfallen mögliche giftige Lösemittelrückstände und Destillationsschritte. Diese Technologie bietet den zusätzlichen Vorteil des Ausschlusses von Sauerstoff. Somit kann die Entstehung von unerwünschten Oxidationsprodukten vermieden werden. CO₂ ist zudem einfach zu recyceln, da es nach Entspannung ohne größeren Reinigungsaufwand als Gas wieder in den Vorratstank zurückgeführt werden kann. Dies reduziert das Potenzial der Umweltgefährdung erheblich.

3 Verwendete Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Für Restriktionsanalyse, Klonierung, Agarosegelelektrophorese und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden Standardprozeduren nach Sambrook et al. [6] verwendet. Zur Erhöhung des StyB-Gehalts wurde mittels Restriktionsverdau eine *NotI*-Kassette mit *styB* unter der Kontrolle des *alk*-Regulationssystems von *Pseudomonas putida* GPO1 (bestehend aus Promotor P_{alkB} und Regulatorgen *alkS*) aus pTEZ302 [5] ausgeschnitten und in *NotI*-verdautes pSPZ10 (mit *styAB* unter der Kontrolle des *alk*-Regulationssystems) ligiert.

3.2 Kultivation – Prozessführung

- Zur Kultivation in Schüttelflaschen wurde mit Kanamycin versetztes Komplexmedium LB und das Minimalmedium M9 verwendet [6].
- Zur Induktion wurde Oktan oder Dicyclopropylketon (DCPK) verwendet.
- Zur kontinuierlichen Kultivierung wurde M9-Medium mit Kanamycin verwendet [6].
- Für kontinuierliche Kultivierungen bei hoher Zelldichte zur Bestimmung der $k_L a$ -Werte wurde RB-Medium [7] bei pH 7 mit 2% Glukose als Kohlenstoff- und Energiequelle verwendet
- Hochzelldichtekultivationen im Satz- und Zulaufverfahren wurden wie früher beschrieben [7] mit kanamycinhaltigem Minimalmedium RB durchgeführt
- Aktivitätsbestimmungen mit ruhenden Zellen wurden in glukosehaltigem Phosphatpuffer wie früher beschrieben [8] durchführt.
- Für Biotransformationen mit ruhenden Zellen wurden diese nach Wachstum im Zulaufverfahren inklusive Induktion in glukosehaltigem Phosphatpuffer (fakultativ mit Spurenelementen, Kanamycin, $MgSO_4$, Thiamin) oder M9-Medium ohne Stickstoffquelle resuspendiert und in den Reaktor zurückgegeben. Glukoselimitation wurde durch Zufütterung vermieden.
- Alle Biotransformationen wurden im Kleinlaborfermenter KLF 2000 von Bioengineering (Wald, Schweiz) durchgeführt. In Emulsionsprozessen wurde Bis-(2-ethylhexyl)phthalat (BEHP) im Phasenverhältnis 1:1 verwendet.

3.3 Analytische Methoden:

- Styrol/Styroloxid/2-Phenylethanol/BEHP/Glukose/Acetat-Analysen mittels GC, GC-MS und HPLC.
- Glukose und Essigsäurekonzentrationen wurden mit kommerziell erhältlichen Kits bestimmt (TC D-Glucose, TC Acetic acid, DispoLab, Dielsdorf, Schweiz).

3.4 Engineering, Aufbau und Inbetriebnahme eines Labor-Versuchstandes für die prozessintegrierte Begasung und Produktisolierung:

Planung und Aufbau einer geeigneten Vorrichtung zur integrierten Begasung (sowohl unmittelbar im Bioreaktor, als auch in einem externen Kreislauf) sowie einer Vorrichtung zur Produktabtrennung bzw. -extraktion via Lösungsdiffusionsmembranen.

3.5 Membranentwicklung und -charakterisierungen:

- Bestimmung der Porengrößenverteilungen mittels Bubble-point und Flow-pore Methode für anorganische, keramische Rohr- und Hohlfasermembranen.
- Beschichtung (Coating) der keramischen Hohlfasermembranen mit selektiven Polymeren für die Produktseparation.
- Rasterelektronenmikroskopische-Analysen (REM-Aufnahmen) und Gasselektivitätstests zur Charakterisierung und Kontrolle der Membranherstellung für die Produktseparation.
- Membranmodulentwicklung: Untersuchungen zur Beständigkeit der Einklebungen der Membranen (Potting).

3.6 Membranmodulentwicklung:

Untersuchungen zur chemischen und mechanischen Beständigkeit der Einklebungen der Membranen (Potting).

3.7 Produktaufarbeitung mit überkritischem CO₂

Zur Verifizierung der Löslichkeit von Stoffen in überkritischem CO₂, wurde sowohl die SFE (**S**upercritical **F**luid **E**xtraction) als auch die SFC (**S**upercritical **F**luid

Chromatography) eingesetzt. Abbildung 2 zeigt den prinzipiellen Aufbau einer SFC-Apparatur.

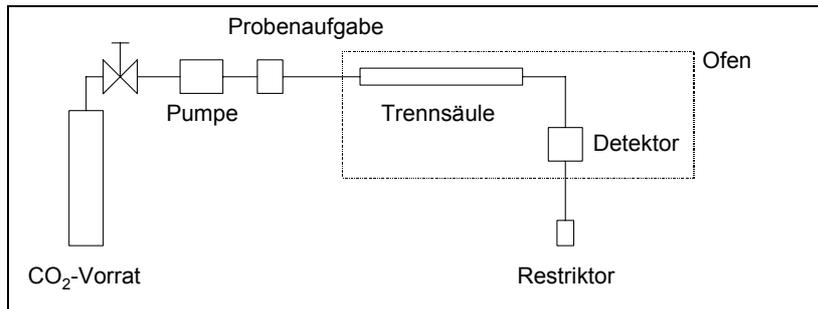


Abbildung 2. Schematischer Aufbau einer SFC-Apparatur.

Der Aufbau entspricht weitestgehend dem einer HPLC-Apparatur. Jedoch muss um in der gesamten Apparatur den entsprechenden Druck aufrechterhalten zu können, am Ende des Systems ein Restriktor vorhanden sein. Im optimalen Falle ist er variabel, so dass jeder beliebige Druck eingestellt werden kann.

Für die hier durchgeführten Löslichkeitsversuche wurde die SFC-Apparatur dahingehend modifiziert, dass keine chromatographische Trennsäule verwendet wurde. Stattdessen kam eine inerte Mischsäule (250 x 4,6 mm, Seesand) zum Einsatz, die sicherstellen sollte, dass das in der Probenaufnahme enthaltene Probevolumen mit dem Eluent homogen durchmischt wird. Dies ist notwendig, da ansonsten die Gefahr besteht, dass die Probe als Pfropf durch die Säule geschoben wird, ohne mit dem Eluent vermischt zu werden.

4 Ergebnisse

4.1 *Prozessetablierung und -optimierung im Hinblick auf Produktextraktion und Begasung mit Membranmodulen*

An der ETH Zürich wie auch an der upt wurde als gemeinsame Plattform ein neues Reaktorsystem von Bioengineering (KLF2000) angeschafft. Als Erstes wurde die Biotransformation von Styrol zu (S)-Styroloxid in diesem neuen Reaktorsystem im 2 L-Maßstab etabliert. Abbildung 3 zeigt den typischen Verlauf einer Biotransformation mit rekombinanten *E. coli* (pSPZ10), die im Zulaufverfahren (Fed-Batch) auf Glukose wuchsen.

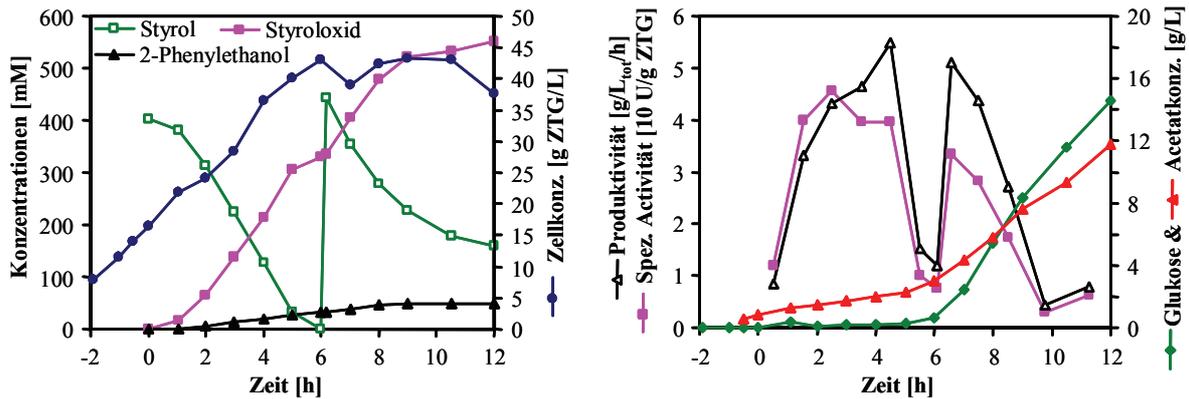


Abbildung 3. Biotransformation im Zweiphasensystem im 2 L Masstab mit *E. coli* JM101 (pSPZ10) als Biokatalysator und BEHP als organischem Lösungsmittel.

Die organische Phase mit Styrol und Oktan wurde zum Zeitpunkt 0 zugegeben. Styrol und Oktan wurden nach 6 bzw. 8.5 h nochmals separat zugegeben. Die Styrol-, Styroloxid- und 2-Phenylethanolkonzentrationen repräsentieren die Summe der jeweiligen Konzentrationen in der organischen und wässrigen Phase. Die spezifischen Styroloxidbildungsraten und volumetrischen Produktivitäten wurden für die Intervalle zwischen zwei Probenahmen berechnet. ZTG: Zelltrockengewicht.

Nach einer 1 L-Satzkultur (Batch) in Minimalmedium mit Glukose als Wachstumssubstrat wurde das Zulaufverfahren gestartet (Zeitpunkt -2 h). Nach 2 h (Zeitpunkt 0 h) wurde 1 L organische Phase bestehend aus BEHP, dem Biotransformationssubstrat Styrol (400 mM) und dem Induktor Oktan (70 mM) zugegeben. Zwischenzeitliche Substratlimitation wurde durch Styrolzugabe nach 6 h aufgehoben. Danach stoppte das Zellwachstum, die spezifische Biokatalysatoraktivität und die Glukoseaufnahmerate nahmen ab (Glukoseakkumulation) und die Essigsäurebildungsrate nahm zu, wofür Produkttoxizität (Styroloxid oder 2-Phenylethanol) und/oder rekombinante Proteinexpression und deren Einfluss auf den Zelletabolismus der Grund sein könnten. In diesen neuen Reaktoren konnte die maximale Produktivität auf Anhebung von 3.8 g/L_{tot}/h (optimierter Prozess in einem älteren Reaktorsystem) auf 5.5 g/L_{tot}/h gesteigert werden. Die durchschnittliche Produktivität betrug 3.5 g/L_{tot}/h. Dies wurde durch Zellwachstum zu hohen Zell- (Biokatalysator)konzentrationen, was durch effizienteren Sauerstoffeintrag möglich wurde, erreicht. Der hohe Sauerstoffeintrag im Bioengineering Reaktorsystem basiert auf intensiver Begasung und Durchmischung (Rührgeschwindigkeit: 2800 rpm), was in diesem Ausmass in grösserem Masstab nicht möglich ist. Für die Begasung werden in Kapitel 6 Alternativlösungen vorgestellt.

Als Basis für die Prozessführung und zur weiteren Charakterisierung des Biokatalysators wurden Versuche zur kontinuierlichen Kultivierung mit

kontinuierlicher Biotransformation und zum „repeated fed-batch“-Verfahren (wiederholtes Zulaufverfahren inklusive Biotransformation mit zwischengeschalteten Batchkulturen ohne Induktion und Biotransformation) durchgeführt

4.1.1 Kontinuierliche Kultivierung

Bei kontinuierlicher Kultivierung ($D = 0.1 \text{ h}^{-1}$) im 1 L-Maßstab (0,5 L organische und 0.5 L wässrige Phase) wurde nach Oktan- und Styrolzugabe kein Fließgleichgewicht (steady state) erreicht. Nach 15-20 Stunden wurde eine Auswaschkinetik beobachtet. Eine kontinuierliche Kultur ohne organische Phase und ohne Substrat zeigte nach Induktion mit 4.2 mM DCPK dasselbe Verhalten (Abbildung 4). Aus früheren Studien ist bekannt, dass die Induktion des *alk*-Expressionssystems durch die Induktorkonzentration reguliert werden kann [8]. Um den Einfluss der rekombinanten Proteinexpression auf das Wachstum zu untersuchen, wurde eine tiefere DCPK-Konzentration (0.17 mM) eingesetzt, die bei Aktivitätsbestimmungen (mit ruhenden, nicht wachsenden Zellen in Phosphatpuffer) eine spezifische Aktivität von 52 statt den mit Vollinduktion erreichten 90-100 U/g ZTG ergab. Mit so reduzierter Induktion stellten sich sowohl im Einphasensystem ohne Substrat (Abbildung 4) als auch im Zweiphasensystem mit Styrol (Abbildung 5) Fließgleichgewichte ein.

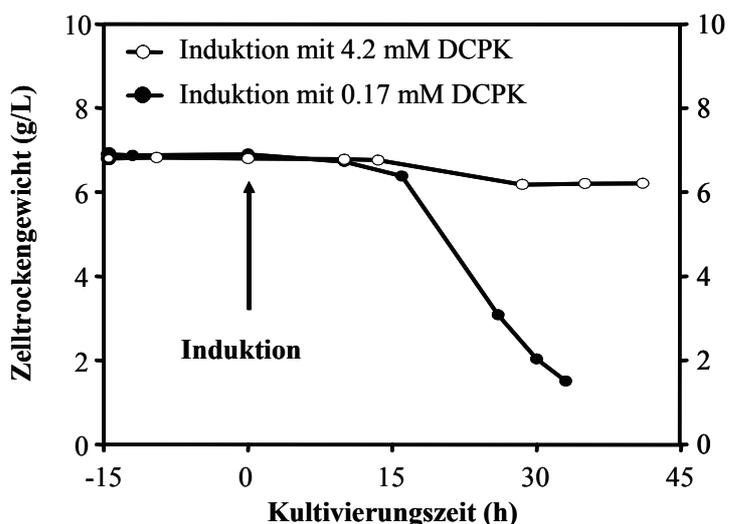


Abbildung 4. Kontinuierliche Kultivierungen von *E. coli* JM101 (pSPZ10) mit voller (4.2 mM DCPK) und reduzierter (0.17 mM DCPK) Induktion.

Die schrittweise Erhöhung der Styrolkonzentration im Zulauf der organischen Phase hatte die Einstellung von neuen Fließgleichgewichten mit abnehmender

Zellkonzentration und zunehmender Styroloxidkonzentration und spezifischer Aktivität zur Folge (Abbildung 5). Letztere scheint sich einem Maximum zu nähern, das deutlich unter dem theoretischen Maximum von 52 U/g ZTG liegt, und entsprach schließlich einer Produktivität von 0.41 g/L_{tot}/h.

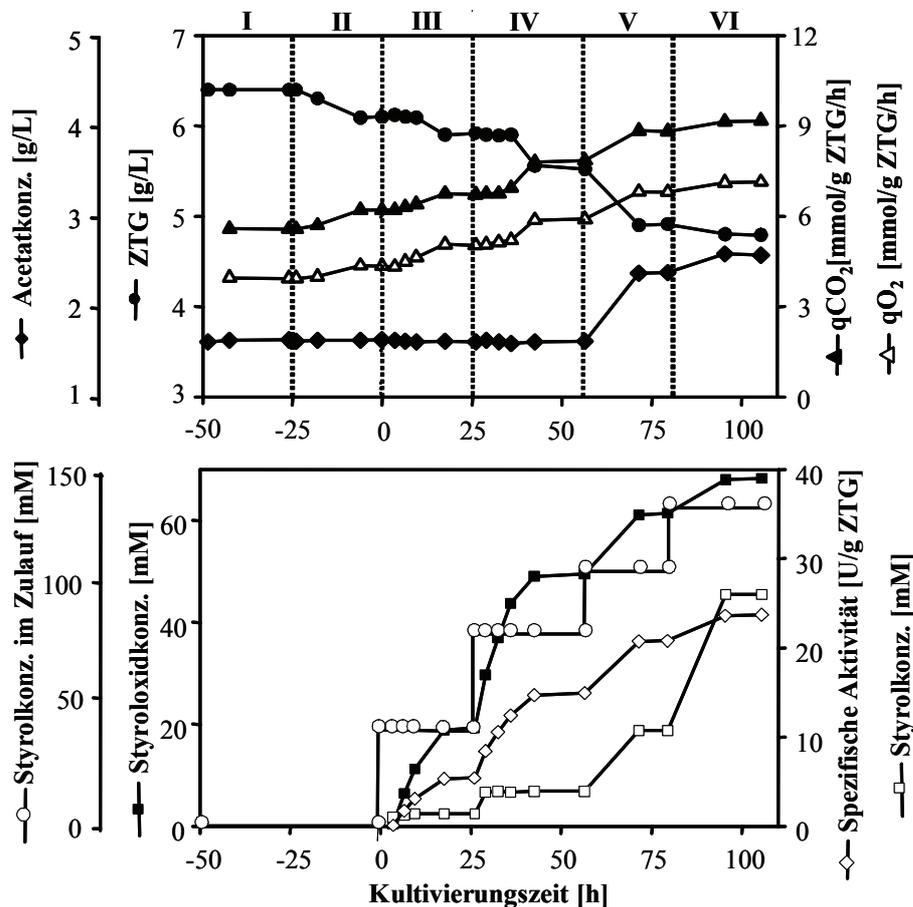


Abbildung 5. Kontinuierliche Kultivierung von *E. coli* JM101 (pSPZ10) im Zweiphasensystem bei reduzierter Induktion.

Zu den Zeitpunkten -25 und 0 h wurde induziert bzw. Styrol zugegeben, gefolgt von einer schrittweisen Erhöhung der Styrolkonzentration im Zulauf. Die Konzentrationsangaben für Zelltrockengewicht (ZTG) und Acetat beziehen sich auf die wässrige, für Styrol und Styroloxid auf die organische Phase. q_{CO_2} : spezifische CO_2 -Bildungsrate; q_{O_2} : spezifische O_2 -Aufnahmerate.

Kinetische Analysen bei voller und reduzierter Induktion zeigten, dass die Ganzzellbiokatalyse im Einphasen- wie auch im Zweiphasensystem der Michaelis-Menten Kinetik folgt ($K_m = 64 \pm 14 \mu M$; $V_{max} = 107 \pm 5$ U/g ZTG für Styrol in wässriger Phase bei Vollinduktion und $K_m = 14.0 \pm 2.8$ mM; $V_{max} = 53 \pm 11$ U/g ZTG für Styrol in organischer Phase bei reduzierter Induktion). Die Verteilungskoeffizienten zwischen den beiden Flüssigphasen betragen 2990 ± 200 für Styrol, 170 ± 17 für Styroloxid und 6.0 ± 0.5 für 2-Phenylethanol. Aus diesen Kinetiken konnte geschlossen werden,

dass Styrol von den Zellen auch durch direkten Kontakt aus der organischen Phase aufgenommen wird, und dass in Fließgleichgewicht VI die Styrolkonzentration nicht mehr limitierend war. Da die Sauerstoffkonzentration bei über 50% der Sättigungskonzentration lag, bleibt NADH als wahrscheinlichste Hauptlimitation. Die Zunahme der spezifischen Glukoseaufnahme- und CO₂-Bildungsraten bei gleichzeitiger Abnahme der Zellkonzentration widerspiegelt den erhöhten Energiebedarf (NADH, ATP) hervorgerufen durch rekombinante Proteinexpression (II) und Biokatalyse (III-VI). Die steigende Acetatbildungsrate (V, VI) deutet bei weiter steigendem Energiebedarf auf die Sättigung des Zitratzyklus und somit ebenfalls auf eine NADH-Limitation hin. Dies wurde durch Kohlenstoffbilanzen und eine Abschätzung der Flüsse durch den zentralen Kohlenstoffmetabolismus von biokatalytisch aktiven wachsenden Zellen, die viel Energie (ATP, NADH) für Anabolismus und Stressmetabolismus verbrauchen, bestätigt.

4.1.2 Wiederholtes Zulaufverfahren (repeated fed-batch)

Hier wurde nach erfolgter Biotransformation jeweils ein kleiner Teil der Emulsion als im Reaktor verbleibendes Inokulum für eine neue Batch-Kultur, auf die eine weitere Biotransformation folgte, benutzt. Die zentrale Frage war, ob sich die Zellen von Vollinduktion und hoher Produktkonzentration am Ende der Biotransformation erholen können. Um diese Frage zu beantworten, wurden Biotransformationen mit zunehmender Substratkonzentration in dieser repetitiven Verfahrensweise zum Komplettumsatz gefahren. Es zeigte sich, dass die Zellen sich von der Vollinduktion gut erholten. Die Produkttoxizität beeinträchtigte jedoch die folgende Batchkultivierung wie auch Biokatalysatoraktivität und Zellwachstum gegen Ende der Biotransformationen. Toxizitätsuntersuchungen untermauerten diesen Sachverhalt. Abbildung 6 zeigt, dass die während der Biotransformation erreichten wässrigen 2-Phenylethanol- und vor allem Styroloxidkonzentrationen das Wachstum klar inhibieren. Angesichts des zusätzlichen Stresses durch *styAB*-Expression, Biokatalyse und direkten Kontakt mit der produktenthaltenden organischen Phase kann die Produkttoxizität als Hauptlimitation im Zulaufverfahren betrachtet werden.

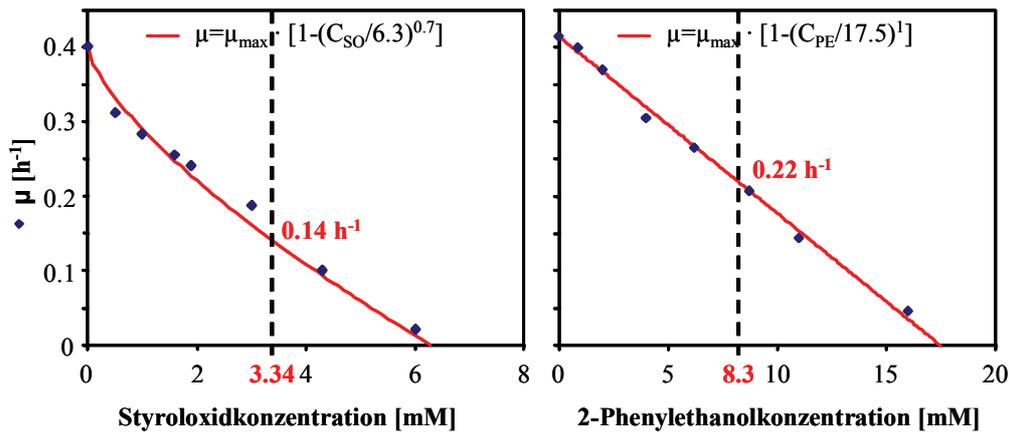


Abbildung 6. Wachstumsrate von *E. coli* JM101 in Minimalmedium in Abhängigkeit der Styroloxid- und 2-Phenylethanolkonzentration.

Die Wachstumsinhibitions Gleichung von Luong [9] erlaubte gutes Fitting. Die gestrichelten Linien zeigen die im Zulaufverfahren maximal erreichten Produktkonzentrationen.

Abbildung 7 zeigt den Verlauf des optimierten „repeated fed-batch“-Verfahrens. Um die wässrige Styroloxidkonzentration niedrig und somit die unproduktive Batchkultivierung kurz zu halten, wurde der Reaktor nach erfolgter Biotransformation fast komplett geleert ($OD_{450} < 0.6$ nach Zugabe von 1 L frischem Medium) und vor der Batchkultivierung 100 ml BEHP zugegeben.

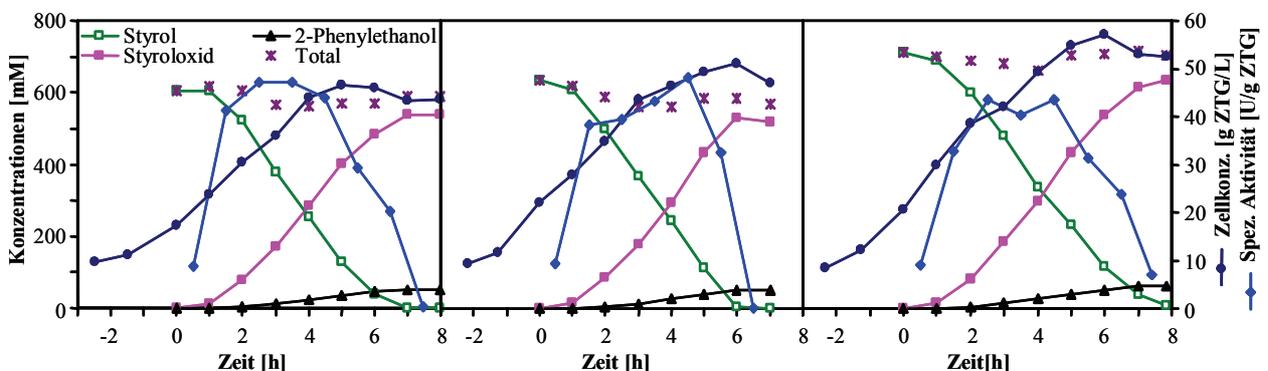


Abbildung 7. „Repeated fed-batch“-Verfahren mit *E. coli* JM101 (pSPZ10) als Biokatalysator und BEHP als organischem Lösungsmittel.

Nach den gezeigten Fed-Batch-Kultivationen inkl. Biotransformation wurde der Reaktor bis auf einen zur Inokulation verwendeten Rest geleert. BEHP mit Styrol und Oktan wurde jeweils zum Zeitpunkt 0 zugegeben. Die Styrol-, Styroloxid- und 2-Phenylethanolkonzentrationen repräsentieren die Summe der jeweiligen Konzentrationen in der organischen und wässrigen Phase. Die spezifischen Styroloxidbildungsrate wurden für die Intervalle zwischen zwei Probenahmen berechnet. ZTG: Zelltrockengewicht.

In solchen Biotransformationen wurden Produktkonzentrationen von 64-76 g/L_{org} und eine bisher in der Oxygenasekatalyse unerreichte [10, 11] durchschnittliche Produktivität von 5.3 g/L_{tot}/h erreicht. Bezogen auf die Gesamtprozesszeit (turnover)

von ca. 24 h entspricht dies 1.58 g/L_{tot}/h. Die spezifischen Aktivitäten von 40-50 U/g ZTG lagen klar unter dem mit ruhenden Zellen erreichten Maximum von 90-100 U/g ZTG ($V_{\max} = 107$ U/g ZTG). Der Grund dafür könnte wie bei kontinuierlicher Kultivierung der hohe Anabolismus-bedingte Energiebedarf von wachsenden Zellen und eine daraus resultierende NADH-Limitation sein. Das Wachstum garantiert jedoch konstant hohe Proteinproduktion und metabolische Aktivität. Die Charakterisierung von ruhenden Zellen als Biokatalysatoren folgt in Kapitel 3.

Aufgrund der höheren Produkt- und Biokatalysatorkonzentrationen, der höheren Produktivität, der höheren Ausbeute (fed-batch: 87%, kontinuierlich: 60%) wie auch der Produkttoxizität als Hauptlimitation wurde entschieden das „repeated fed-batch“-Verfahren der kontinuierlichen Kultivierung vorzuziehen und auf dieser Basis die Entwicklung von innovativen Begasungs- und Produktextraktions-technologien voranzutreiben. Das Ziel dieser Bestrebungen ist unter anderem, hohe Zellkonzentrationen auch auf Pilot- und Produktionsmaßstab zu ermöglichen und die Produktkonzentration niedrig zu halten.

4.2 Biokatalysatorengineering — Erhöhung der *styB*-Expression

Um zu evaluieren, ob für die Styrolepoxidierung mehr NADH aus dem Metabolismus abgegriffen werden kann, ob also die Reduktasekomponente StyB limitierend ist, wurde eine zweite Expressionskassette mit einem *styB*-Gen unter der Kontrolle des *alk*-Promotors in pSPZ10 kloniert. Daraus resultierte pTEZ400 mit zwei *styB*-Genkopien. Der neue Biokatalysator *E. coli* JM101 (pTEZ400) zeigte im Vergleich mit *E. coli* JM101 (pSPZ10) einen markant erhöhten StyB-Gehalt (StyB-Bande wird sichtbar) und wildtypbereinigt die 22-fache NADH-Oxidationsaktivität (Abbildung 8).

Zudem wurde gefunden, dass Styrol das *alk*-Regulationssystem induziert, wenn auch in geringerem Ausmass als Oktan oder DCPK (Abbildung 9). Während bei Vollinduktion mit Oktan der erhöhte StyB-Gehalt keinen Einfluss auf die spezifische Aktivität von ruhenden Zellen hatte, wurde bei Induktion mit Styrol eine Aktivitätserhöhung beobachtet.

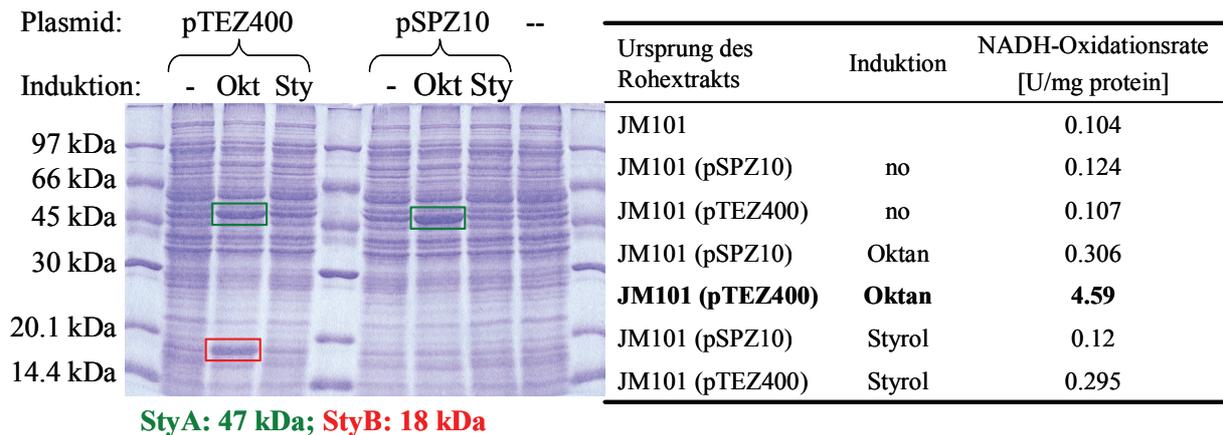


Abbildung 8. Vergleich von *E. coli* JM101 (pSPZ10) und *E. coli* JM101 (pTEZ400) bezüglich Proteingehalt und Reduktaseaktivität des Rohextrakts.
Okt: Induziert mit Oktan; Sty: Induziert mit Styrol.

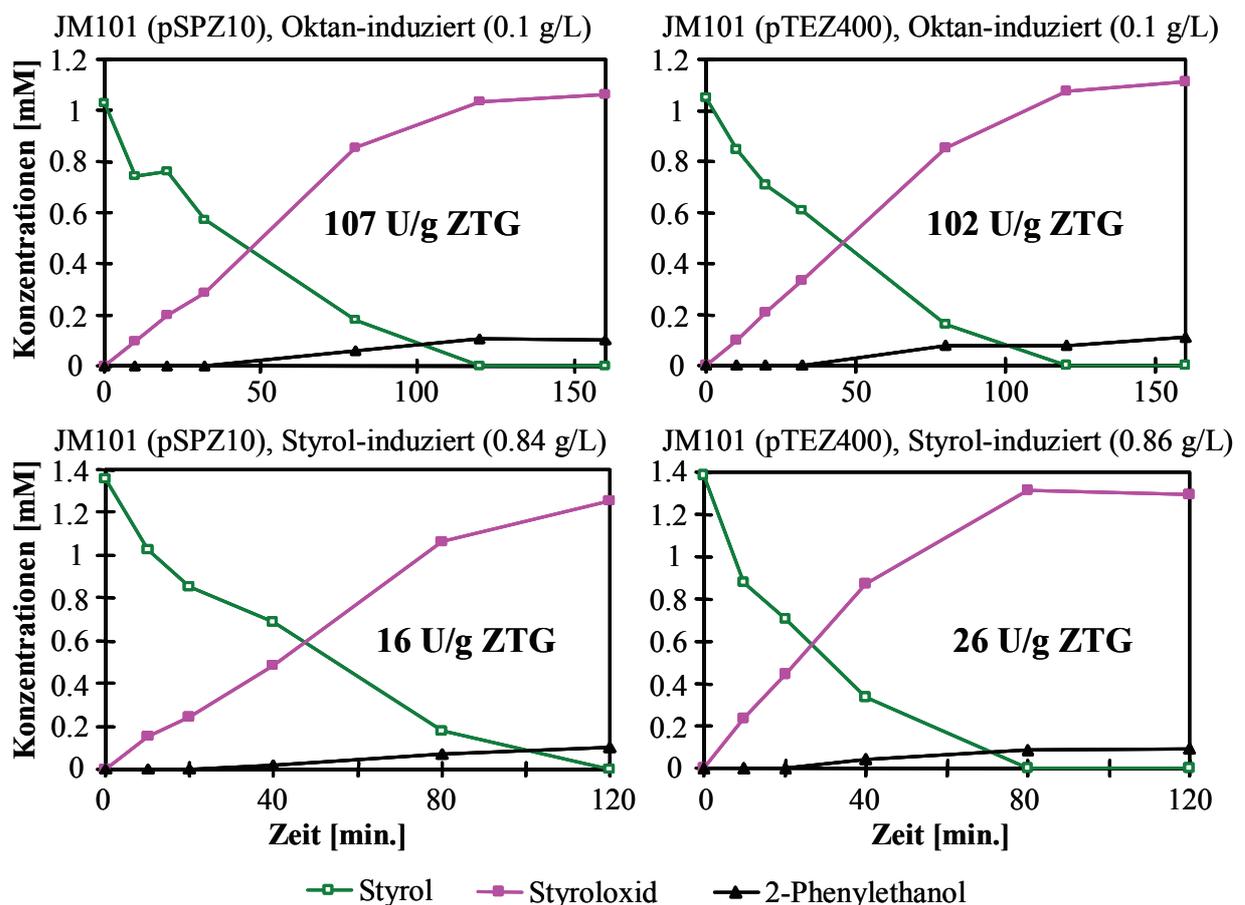


Abbildung 9. Vergleich von nicht-wachsenden *E. coli* JM101 (pSPZ10) und *E. coli* JM101 (pTEZ400) bezüglich Styrolumsatz nach Induktion mit Oktan und Styrol.
Nach Wachstum in Minimalmedium inklusive Induktion wurden die Zellen in glukosehaltigem Phosphatpuffer resuspendiert und bei 30°C im Schüttler inkubiert. Nach Styrolzugabe wurde die Produktbildung via GC-Analyse verfolgt. ZTG: Zelltrockengewicht.

Auch bei Biotransformationen mit im Zulaufverfahren wachsenden Zellen konnte kein signifikanter Effekt des höheren StyB-Gehalts beobachtet werden (Tabelle 1). Dies und die unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten von wachsenden und ruhenden Zellen deuten darauf hin, dass bei wachsenden Zellen die NADH-Verfügbarkeit und bei ruhenden Zellen die StyA-Aktivität und/oder die NADH-Verfügbarkeit die Aktivität limitieren.

Tabelle 1. Vergleich von Biotransformationen mit Fed-Batch Kulturen von *E. coli* JM101 (pSPZ10) und *E. coli* JM101 (pTEZ400)

Parameter	Einheit	Plasmid in <i>E. coli</i> JM101		
		pSPZ10	pTEZ400(1)	pTEZ400(2)
Biotransformationszeit	h	7	8	6
[Styrol] zu Beginn	mM	710	780	700
[Styroloxid] am Ende	mM	616	588	490
[2-Phenylethanol] am Ende	mM	60	54	47
Molare Ausbeute	%	87	75	70
Max. spez. Epoxidationsrate	U (g ZTG)⁻¹	44	36	42
Max. vol. Epoxidationsrate	U L _{aq} ⁻¹	2275	2035	2140
Maximale Produktivität	g L_{tot}⁻¹ h⁻¹	8.2	7.3	7.7
Ø-Produktivität	g L _{tot} ⁻¹ h ⁻¹	5.3	4.4	4.9

4.3 Biokatalytische Styrolepoxidation mit ruhenden Zellen

Da sich ruhende Zellen nicht nur als hochaktive sondern auch als überraschend stabile Biokatalysatoren erwiesen (Abbildung 9), wurden deren Produktivität und Stabilität im Zweiphasensystem untersucht. Nach Kultivation im Zulaufverfahren wurden die Zellen in verschiedenen stickstofffreien Puffersystemen resuspendiert und zur Styrolepoxidation eingesetzt. Dabei wurde durch Zufütterung eine Glukoselimitation vermieden. Abbildung 10 zeigt den Verlauf von zwei mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen durchgeführten Experimenten. Dabei wurden in der organischen Phase Styroloxidkonzentrationen von 300-400 mM (36-48 g/L_{org}) erreicht und die Zugabe von Spurenelementen, Thiamin, Antibiotikum und Magnesiumsulfat hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Biotransformation. Die Biokatalysatoraktivität nahm jedoch stetig ab, umso schneller je höher die

Zellkonzentration war. Dies kann auf Substratlimitation (Massentransferlimitation), tiefe Enzymstabilität oder Produktinhibition/toxizität zurückzuführen sein. Um eine mögliche Substratlimitation zu testen, wurde die organische Styrolkonzentration variiert, was keinen Effekt auf den Biotransformationsverlauf hatte (Abbildung 11). Somit kann Substratlimitation ausgeschlossen werden.

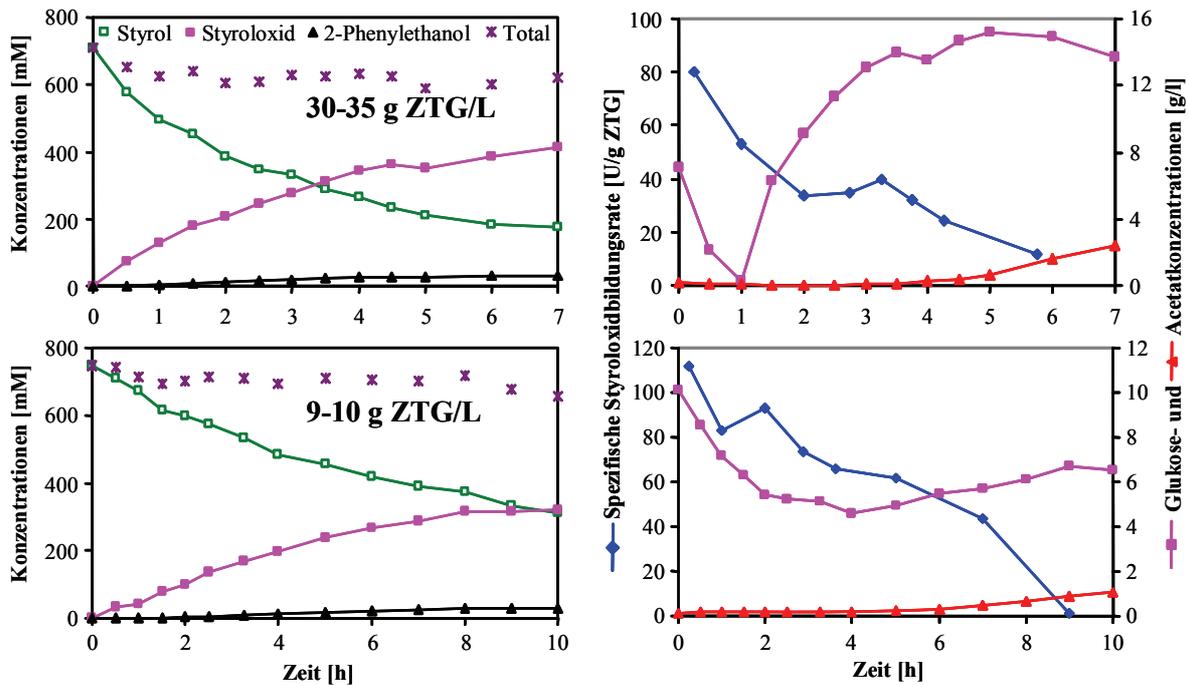


Abbildung 10. Styrolumsatz mit nicht-wachsenden *E. coli* JM101 (pSPZ10) im Zweiphasensystem.

Nach Wachstum im Zulaufverfahren inklusive Induktion mit DCPK wurden die Zellen in glukosehaltigem Phosphatpuffer resuspendiert, in den Reaktor zurückgegeben und im Verhältnis 1:1 mit styrolhaltigem BEHP versetzt. Glukoselimitation wurde durch Zufütterung vermieden. Dabei wurden zwei verschiedene (konstant bleibende) Zellkonzentrationen getestet. ZTG: Zelltrockengewicht.

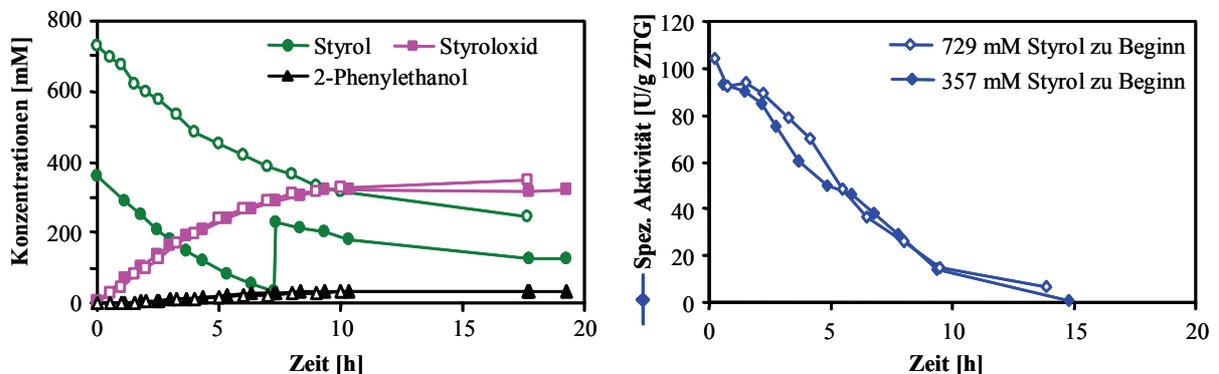


Abbildung 11. Styrolumsatz mit nicht-wachsenden *E. coli* JM101 (pSPZ10) bei verschiedenen anfänglichen Styrolkonzentrationen im Zweiphasensystem.

Siehe Legende zu Abbildung 10. Biokatalysatorkonzentration: 9-10 g ZTG L⁻¹, ZTG: Zelltrockengewicht.

Um zu testen, ob tiefe intrinsische Enzymstabilität zur Aktivitätsabnahme führt, wurden *E. coli* JM101 (pSPZ10) und *E. coli* JM101 (pTEZ400) in glukosehaltigem Phosphatpuffer inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten deren Proteingehalt (SDS-PAGE) und Aktivität bestimmt (Abbildung 12A,B). Während der StyA-Gehalt in beiden Stämmen konstant blieb, wurde in *E. coli* JM101 (pTEZ400) eine Abnahme des StyB-Gehalts beobachtet (Abbildung 12B). Dies und die viel stabilere Aktivität der Zellen mit hohem StyB-Gehalt (Abbildung 12A) weisen darauf hin, dass StyB die stabilitätslimitierende Enzymkomponente ist. In Zweiphasen-Biotransformationen mit ruhenden Zellen zeigte *E. coli* JM101 (pSPZ10) erstaunlicherweise eine höhere Stabilität als bei Inkubation ohne Umsatz (Abbildung 12A,C). *E. coli* JM101 (pTEZ400) wies in solchen Biotransformationen im Vergleich zu *E. coli* JM101 (pSPZ10) zwar eine leicht höhere jedoch keine stabilere spezifische Aktivität auf (Abbildung 12C,D). Diese Resultate deuten darauf hin, dass die Aktivitätsabnahme nicht auf mangelnde intrinsische StyAB-Stabilität zurückzuführen ist.

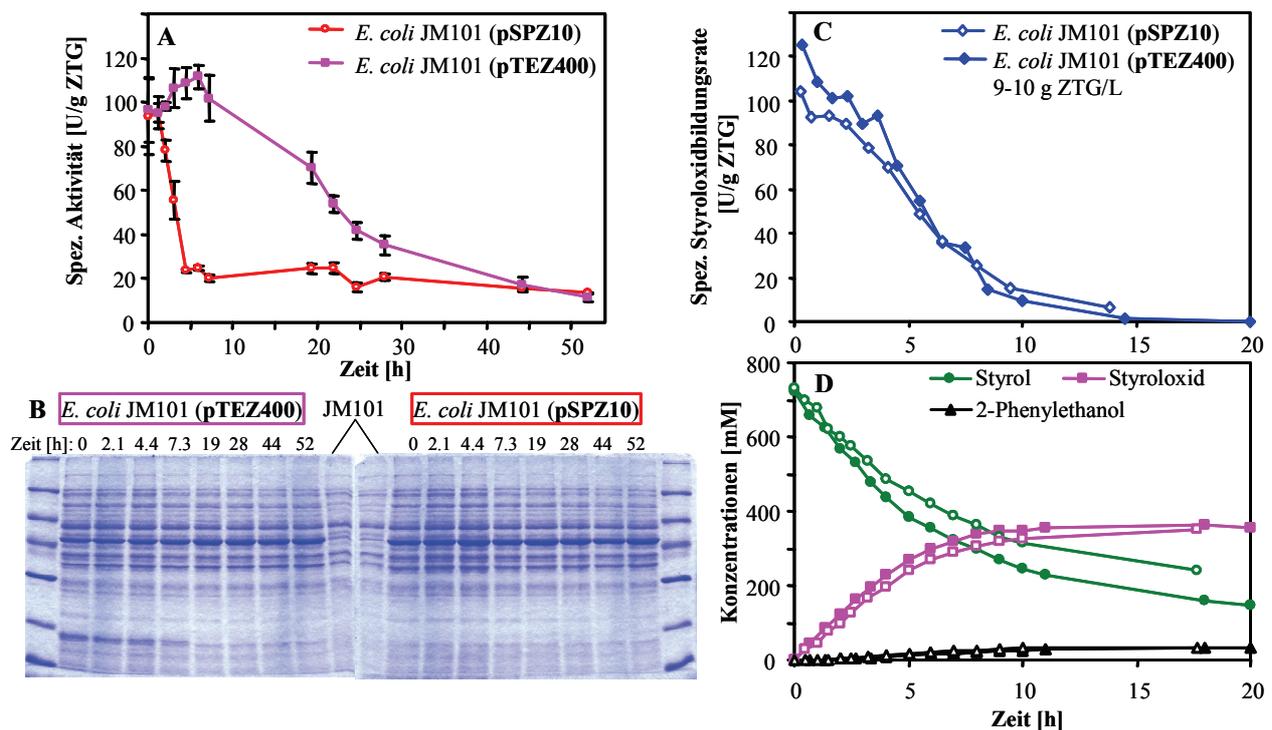


Abbildung 12. Vergleich von ruhenden *E. coli* JM101 (pSPZ10) und *E. coli* JM101 (pTEZ400) bezüglich Stabilität der Aktivität und des StyAB-Gehalts.

Von in glukosehaltigem Phosphatpuffer resuspendierten induzierten Zellen (0.5 g ZTG L^{-1}) wurden in regelmässigen Abständen die Aktivität (A) und, via SDS-PAGE (für Grössenangaben siehe Abbildung 8), der Proteingehalt bestimmt (B). Die Figuren C und D zeigen den Vergleich der ruhenden Stämme ($9\text{-}10 \text{ g ZTG L}^{-1}$) in Zweiphasenbiotransformationen (siehe Legende zu Abbildung 10). ZTG: Zelltrockengewicht.

Um den Einfluss von Styroloxid auf die spezifische Epoxidierungsrate ruhender Zellen zu untersuchen, wurde bei Zweiphasenbiotransformationen Styroloxid zu Beginn zugegeben (Abbildung 13A,B) und die Biokatalysatorkonzentration erniedrigt (Abbildung 13C,D). Die anfängliche Styroloxidzugabe reduzierte die spezifische Epoxidierungsrate deutlich, wobei trotzdem eine sehr hohe Styroloxidkonzentration von 600 mM (72 g/L_{org}) erreicht wurde. Die Erniedrigung der Zellkonzentration und die somit langsamere Produktakkumulation verzögerte zwar die Aktivitätsabnahme, jedoch nur um ca. 2 h. Diese Resultate zeigen, dass Inhibition durch Styroloxid auch bei ruhenden Zellen eine Hauptlimitation darstellt, weisen jedoch darauf hin, dass die Aktivität nicht nur durch die absolute Produktkonzentration beeinträchtigt wird, sondern auch mit zunehmender Biokatalysatordauer abnimmt. Der Grund dafür könnte bei der biokatalysebedingten Deaktivierung von StyA oder des Kohlenstoffmetabolismus und somit der NADH-Regeneration liegen. Die stetige Abnahme der spezifischen Glukoseaufnahmerate spricht für letztere Möglichkeit.

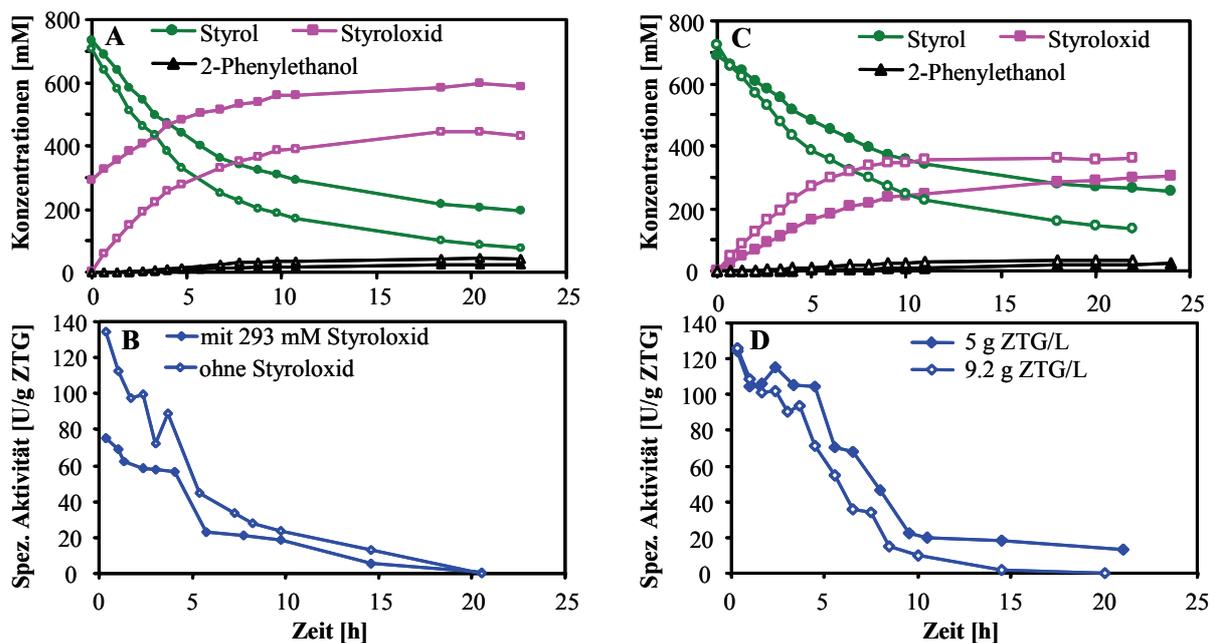


Abbildung 13. Einfluss der Styroloxidkonzentration auf die Styrolepoxidation mit ruhenden *E. coli* JM101 (pTEZ400).

Siehe Legende zu Abbildung 10. Die Figuren A und B zeigen den Biotransformationsverlauf mit 293 mM und ohne Styroloxid in der organischen Phase und 10-11 g ZTG L⁻¹ in der wässrigen Phase. Die Figuren C und D zeigen den Biotransformationsverlauf mit unterschiedlichen Biokatalysatorkonzentrationen. ZTG: Zelltrockengewicht.

Im Vergleich mit im Zulaufverfahren wachsenden Zellen wurden mit ruhenden Zellen klar höhere Aktivitäten erreicht. Diese waren jedoch weniger stabil und führten zu tieferen Produktkonzentrationen. Beim Einsatz ruhender Zellen muss auch der durch den Medienwechsel entstehende Zusatzaufwand, deren begrenzte Lagerfähigkeit (*E. coli* JM101 (pSPZ10) verlor ca. 25% der Aktivität nach 24 h bei 4°C) und, als Vorteil, der geringere Sauerstoffbedarf beachtet werden. Die Untersuchung ruhender Zellen ergab interessante Einblicke in Massentransfer, Biokatalysatoraktivität und -stabilität, sowie Produktinhibition. Weitere Erkenntnisse bezüglich des Metabolismus biokatalytisch aktiver wachsender Zellen werden im nun bewilligten Nachfolgeprojekt mittels ¹³C-Flussanalyse angestrebt.

4.4 Aufbau einer Laborversuchsanlage

Die Planung und der Aufbau der verwendeten Laborversuchsanlage wurde an den Maßstab der Kleinlaborfermentieranlage vom Typ KLF 2000 von Bioengineering angepasst. Der Kleinlaborfermenter wurde von der upt GmbH eigens für dieses Projekt angeschafft.

Die Ausarbeitung des Anlagenkonzepts erfolgte dergestalt, dass Untersuchungen für die Begasung (interne und auch externe Kreislaufführung) und Produktseparation mittels Pertraktion als auch Pervaporation möglich waren. Das erlaubte eine größtmögliche Flexibilität der Anlage innerhalb des Projektes, führte jedoch zu Kompromissen in Detaillösungen.

Mit der isolierten Untersuchung der Begasung besteht die Möglichkeit den Sauerstoffeintrag unabhängig von der Rührgeschwindigkeit des Mischorgans zu steuern. Die Emulsions- und Stofftransporteigenschaften sind Funktionen der Rührgeschwindigkeit (Energieeintrag), deren Identifizierung im Zusammenhang mit dem Scale-up des Prozesses sehr wichtig sind, lassen sie doch Aussagen über den Sauerstofftransport im Produktionsmaßstab zu.



Abbildung 14. Laboranlage der upt für die integrierte Begasung und Produktabtrennung via Lösungs-Diffusionsmembranen.

Bei der Planung der Laboranlage war insbesondere auf die Beständigkeit sämtlicher Anlagenkomponenten, im speziellen der Kreislaufpumpen und der Dichtungsmaterialien, gegenüber den werkstoffschädigenden Prozessmedien (BEHP, Styrol, Styroloxid) zu achten.

Darüber hinaus musste die Möglichkeit der thermischen oder auch chemischen Sterilisierbarkeit gewährleistet werden. Um die genannten Kriterien zu erfüllen, wurden sämtliche Komponenten der Versuchsanlage in Edelstahl ausgeführt. Als Dichtungsmaterialien kamen ausschließlich Werkstoffe aus Viton oder Kalrez zum Einsatz.

Abbildung 1 zeigt die konzipierte Laboranlage, die für die Untersuchungen zur Pertraktion und Pervaporation, als auch für Begasungstests mit Sauerstoff bzw. Luft eingesetzt wurde. Die verfahrenstechnischen Fließbilder dazu befinden sich im Ergebnisteil weiter unten.

4.5 Membran- und Modulentwicklung

Zentrale Aufgabe der upt war die Entwicklung von Membranen und Membranmodulen und deren Bereitstellung für prozessintegrierte Untersuchungen. Der Untersuchungsmaßstab war durch den Partner ETHZ / Uni-Dortmund mit dem Bioengineering Kleinlaborfermenter KLF 2000 vorgegeben, an dessen Maßstab die Laboranlage und die Membranentwicklung angepasst wurde.

Der modulare Aufbau der Membranverfahren erlaubt prinzipiell - in bestimmten Grenzen - einen wenig problematischen Scale-up. Der Down-Scale der Membran- und Modulkonzepte, welcher im Rahmen dieses Projektes u.a. für die Begasungsmembranen notwendig war, stellt besondere Anforderungen. Im speziellen betraf dies die Integration der mikroporösen anorganischen Membranen in den Bioengineering Kleinlaborfermenter, der durch Mess- und Regelsensorik sowie Heiz- und Kühlelemente den konstruktiven Freiraum stark einschränkte. Entsprechendes traf auf die Entwicklung der Membranen und Membranmodule für die Produktabtrennung zu, für die eine maximale Packungsdichte (=Membranfläche) pro Modulvolumen nötig ist.

Folgende Kriterien standen bei der Membran- und Modulentwicklung im Vordergrund:

- Stabilität der Werkstoffe, insbesondere gegenüber dem BEHP,
- Auswahl von Membranen mit geeigneter Porengröße / Porengrößenverteilung für die Begasung,
- Sterilisierbarkeit der Membranen und Membranmodule,
- Auswahl geeigneter keramischer Hohlfasern für die Beschichtung mit selektiven Polymeren (Produktisolierung),
- Herstellung von Lösungs-Diffusionsmembranen durch Beschichtung der keramischen Hohlfasern mit selektiven Polymeren,
- Erreichen einer möglichst hohen Packungsdichte im Membranmodul, d.h. große Membranflächen auf geringem Raum durch geschicktes Moduldesign,
- geringes Foulingpotential der Membranen,
- Entwicklung der Membranmodule unter Berücksichtigung der Anforderungen an einen Prozess auf technischem Maßstab.

4.5.1 Membranentwicklung

Aus Sicht der Lösemittelbeständigkeit gegenüber dem BEHP schließen sich gängige polymere Membranen für die hier angestrebte Anwendung aus. Daher wurden neuartige **keramische Hohlfasermembranen** ausgewählt, für die ein geeignetes Moduldesign mit ausreichender Membranfläche und günstigem Verhältnis von Membranfläche zu Reaktorvolumen entwickelt wurde.

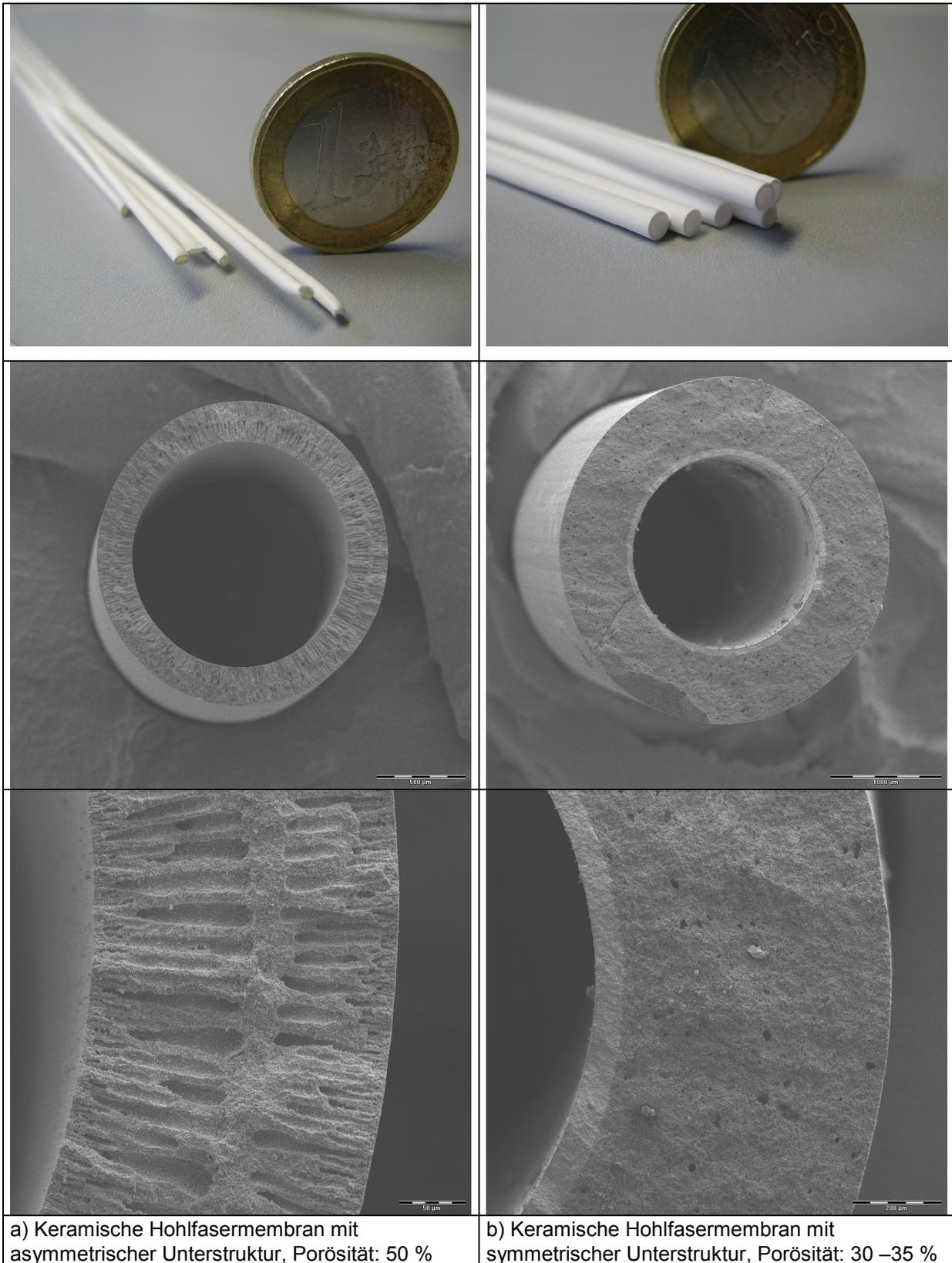


Abbildung 15. Neuartige keramische Hohlfasermembranen, basierend auf dem Konzept einer asymmetrischen Unterstruktur und einer symmetrischen Unterstruktur.

Für die Entwicklung der Membranmodule wurden der upt seitens des Projektpartners FuMA-Tech zwei unterschiedliche Hohlfasermembranen zur Verfügung gestellt (siehe Abbildung 15), die vorzugsweise für die Produktisolierung zum Einsatz kommen sollten, jedoch auch für Begasung (Abschnitt 4.5.1.1) einsetzbar sind:

- a.) Hohlfasermembran aus Al_2O_3 mit einer Wandstärke von ca. 230 μm , einer nominellen Porengröße von 0,3 μm und einem Außendurchmesser von 1,6 mm
- b.) Hohlfasermembran aus Al_2O_3 mit einer Wandstärke von ca. 500 μm , einer Porengröße von wahlweise 0,02 μm bis 1,4 μm und einem Außendurchmesser von 3,0 mm

Die Charakterisierung der porösen Membranen erfolgte mit den unter „Verwendete Methoden“ genannten Verfahren. Für die Bubble-Point Untersuchungen (Bestimmung der Porengröße) der keramischen Einzelfasermembranen musste eigens dafür ein Edelstahl-Einzelfasermembranmodul pro zur Verfügung stehender Membrandimension gebaut werden (vgl. Abbildung 16).



Abbildung 16. Einzelfasermembranmodul aus Edelstahl für die Charakterisierung der keramischen Hohlfasermembranen mittels Bubble-Point- und Flowpore-Analyse.

4.5.1.1 Membranen für die Begasung

Die unbeschichteten keramischen Membranen von FuMA-Tech lassen sich auch für die feinblasige, scherkraftarme Begasung einsetzen. Kleine Blasen erzeugen naturgemäß eine größere volumenspezifische Oberfläche bei längeren Verweilzeiten in der flüssigen Phase und somit einen deutlich besseren Sauerstoffeintrag. Von der membrangestützten Begasung wird daher erwartet, dass die $k_L a$ -Werte um Größenordnungen über denen kommerzieller Begasungssysteme liegen.

Untersuchungen zum Sauerstoffeintrag haben gezeigt, dass die Porengröße großen Einfluss auf den Energiebedarf der Begasung hat. In Abbildung 17 ist zu erkennen, dass der Druckverlust der Begasungsmembran exponentiell mit kleiner werdender Pore zunimmt. Daher muss ein Optimum zwischen maximaler Porengröße und Druckverlust gefunden werden. Nach bisherigen Erkenntnissen liegt die optimale Porengröße für die membrangestützte Begasung mittels mikroporöser keramischer Membranen – je nach gewünschter Blasengröße – im Bereich von 0,5 bis 10 μm . Oberhalb von 10 μm Porengröße agglomerieren die Blasen schnell, was unmittelbar die Leerrohrgeschwindigkeit erhöht. Die membrangestützte Begasung verliert an Effektivität. Wird der Sauerstoff über Membranen mit einem Porendurchmesser kleiner als 0,5 μm eingetragen, müssen der hohe Druckverlust und die Konsequenzen für die Sicherheitstechnik (z.B. Bruch der Membran) berücksichtigt werden (Drücke größer als 6 bar). Außerdem koaleszieren feinste Blasen bereits vor dem Austritt aus der Membran mit der Nachbarblase, so dass die Effizienz per se reduziert wird.

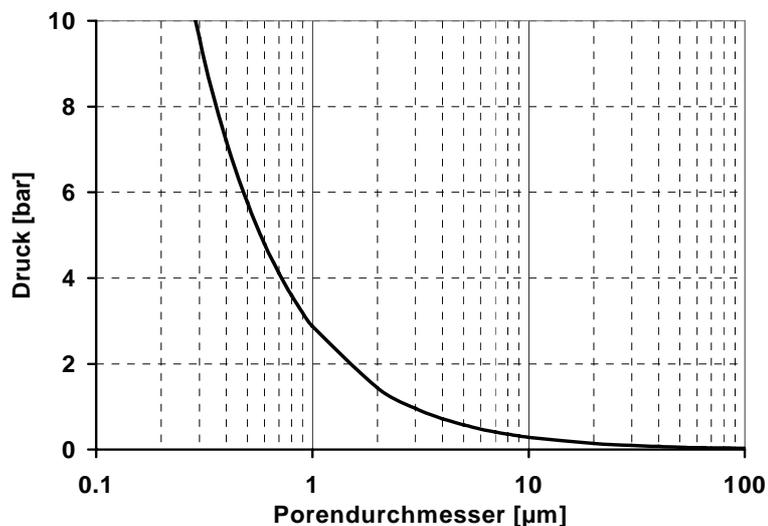


Abbildung 17. Einfluss der Porengröße auf den aufzubringenden Druck bei der Begasung wässriger Medien.

Für die Untersuchungen zum Sauerstoffeintrag wurden wiederum zwei unterschiedliche Membrantypen eingesetzt (vergleiche Abbildung 18):

- a.) kommerziell verfügbare Monokanalrohrmembranen mit 10 mm Außendurchmesser, 2 mm Wandstärke und mit Porengrößen von 1,2 μm ; 1,4 μm und 6-8 μm ,

b.) Hohlfaser-Membranelemente von FuMA-Tech aus keramischen Fasern mit 3 mm Außendurchmesser, 500 µm Wandstärke und 1.4 µm Porengröße.

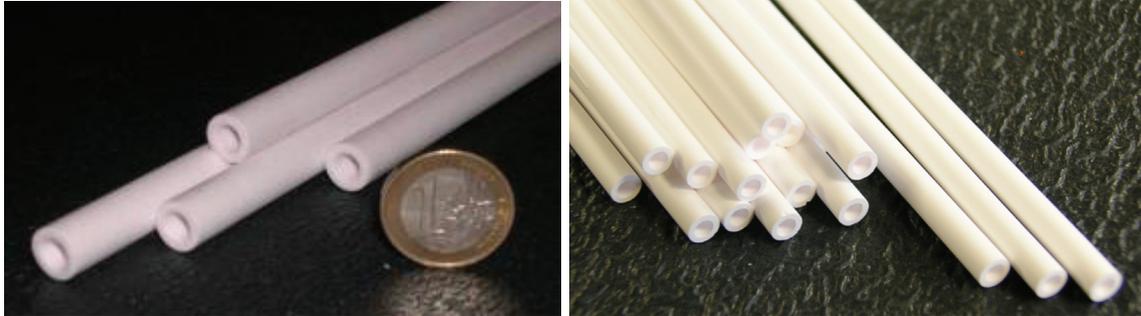


Abbildung 18. Photos der keramischen Membranen zur Begasung.
Links: Monokanalrohr. Rechts: Keramische Hohlfasern.

Die Ermittlung der Porengröße und Porengrößenverteilung erfolgte mittels der Bubble-Point und Flowpore Analyse, für die Monokanalrohrmembranen verfügt die UPT hierzu über standardisierte Methoden. Für die keramischen Hohlfasern wurden die Methoden dazu entsprechend modifiziert und stehen nun standardisiert zur Verfügung.

4.5.1.2 Membranen für die Produktabtrennung

Ein wichtiges Projektziel ist die Extraktion von Styroloxid aus der Emulsion (Biosuspension / BEHP). Zu diesem Zweck wurden zunächst Pertraktionsversuche mit den beschriebenen keramischen Hohlfasermembranen durchgeführt. Dabei diente reines BEHP permeatseitig als Extraktionsmittel für die Aufnahme des Styroloxids aus der feedseitigen Emulsion (siehe Verfahrensfliessbild Abbildung xx). Diese Untersuchungen zeigten, dass eine mikroporöse keramische Membran auf Grund ihres hydrophilen Charakters auch für die wässrige Phase permeabel ist. Darüber hinaus hatte die unbeschichtete Membran keine Selektivität für das zu trennende Stoffgemisch, womit letztlich nur die Abtrennung des Biokatalysators hätte gewährleistet werden können.

Aus diesem Grund war es erforderlich, eine hydrophobe Lösungs-Diffusionsmembran zu entwickeln, die ausreichende chemische Stabilität für diese Trennaufgabe besitzt. Dafür wurden erstmals keramische Hohlfasern mit verschiedenen Trenngrenzen jeweils mit Polydimethylsiloxan (PDMS) bzw. einem perfluorierten Teflon[®]-Polymer

beschichtet. Von diesen Materialien ist bekannt, dass sie gegenüber BEHP beständig sind. Beides sind Polymere mit einem hohen freien Volumen für Lösungs-Diffusions, wobei das Teflonpolymer zu den Ultra High Free Volume Polymeren gehört. Ultra High Free Volume Polymere sind Polymere mit besonders großem freien inneren Volumen, was schnelle Platzwechselforgänge für die Diffusion ermöglicht. Das PDMS Membran-Polymer zeichnet sich durch hohe Flussleistungen, das Teflon Membran-Polymer durch höhere Selektivitäten aus.

Die Optimierung der Beschichtung der keramischen Hohlfasermembranen mit den selektiven Polymeren orientierte sich zum einen an einer möglichst dünnen Polymerschicht auf dem Keramiksupport, andererseits an einer maximalen Porengröße des Support, um Transportwiderstände zu minimieren. Das Finden eines Optimums zwischen einem möglichst großen Porendurchmesser und der so genannten „Intrusion“ der Membranpolymere gestaltete sich als sehr aufwendiger Prozess bei der Membranentwicklung. Es ist notwendig, dass das Membranpolymer einen guten Verbund mit der Unterstruktur hat, wozu ein geringes Eindringen (Intrusion) der beim Beschichten flüssigen Polymere hilfreich ist. Nach anschließender Polymerisation verzahnen sich die Polymere in der Unterstruktur und sind gegenüber prozessbedingten Druckschwankungen hinreichend stabil. Dringen die Membranpolymere jedoch bei der Beschichtung zu tief in die Unterstruktur ein, vergrößert sich die effektive Dicke der aktiven Schicht, was hohe Transportwiderstände und eine inhomogene Dicke der aktiven Membranschicht zur Folge hat. Daher wurden unterschiedliche keramische Hohlfasern mit Porengrößen zwischen 20 und 800 nm mit den Membranpolymeren beschichtet und anschließend untersucht. Am Geeignetsten erwiesen sich dabei keramische Hohlfasermembranen mit Porengrößenverteilungen zwischen 20 bis 100 nm.

Auswertungen von rasterelektronenmikroskopischen (REM) Aufnahmen der neu entwickelten Membranen haben gezeigt, dass die Dicke der Polymerschicht auf der Innenseite der keramischen Hohlfaser für beide Polymere ca. 4 - 5 μm beträgt (siehe Abbildung 19) und dass die Membranpolymere einen sehr guten Verbund mit der Unterstruktur aufweisen. Des Weiteren wurde durch mikroskopische Untersuchungen sowie Gasselektivitätstests sichergestellt, dass die Beschichtung an der Oberfläche weitgehend homogen ist und keine Defekte, d.h. Löcher, Risse o. ä. aufweist.

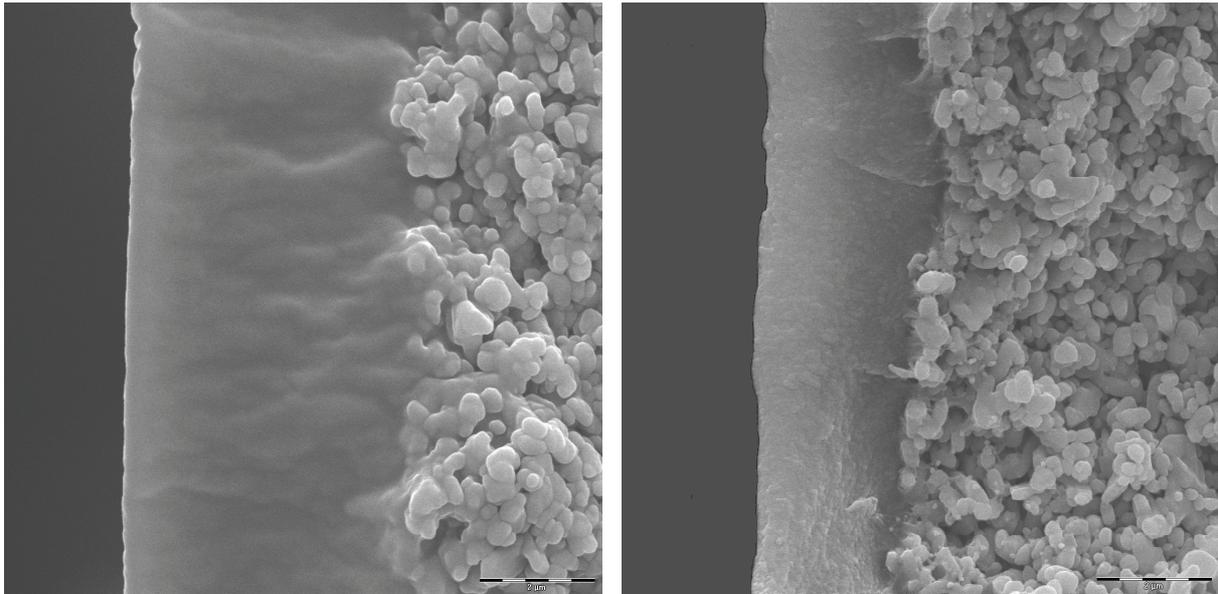


Abbildung 19. REM-Aufnahmen der beschichteten keramischen Hohlfasermembranen mit symmetrischer Unterstruktur.

Links: Beschichtung mit PDMS-Polymer. Rechts: Beschichtung mit Teflon-Polymer.

4.5.1.3 Entwicklung von Membranmodulen

Der im biotechnologischen Prozess eingesetzte Weichmacher BEHP stellt nicht nur besondere Anforderungen an die Membranauswahl sondern auch an die Modulkonstruktion. Entscheidend ist dabei, einen geeigneten Werkstoff zu finden, der zur Abdichtung der keramischen Membranelemente gegen das Modulgehäuse genutzt werden kann. Zunächst wurden 7 verschiedene Dichtwerkstoffe getestet (Tabelle 2), wobei sich das Silikonpolymer Hylosil und das Epoxidharz Araldit als am besten für den Einsatz in der BEHP-Emulsion geeignet erwiesen.

Langzeitstabilitätstests und Sorptionsuntersuchungen für diese Vergussmassen über einen Zeitraum von mehreren Monaten zeigten, dass das Epoxidharz gegenüber dem Hylosil Vorteile in der Stabilität und dem Werkstoffverbund aufweist. Die endgültige Eignung kann erst nach längeren Pilotversuchen garantiert werden.

Tabelle 2. Übersicht über getestete Dichtungsmaterialien bzw. Vergussmassen.

Vergussmasse	Zusammensetzung	Chemische Beständigkeit (Herstellerangaben)	Eignung
PTFE – Teflon	Polytetrafluorethylen	Beständig gegenüber BEHP, Quellung kaum feststellbar	Nicht verarbeitbar als Vergussmasse für keramische Membranen
Suprasil 594 N	Silikon (Oxymssystem)	Beständig gegenüber Einwirkung von verdünnten Säuren und Laugen	Quellung in BEHP, Ungenügende Haftung auf Keramik
Wacker Einkomponenten Silikone A234, N10 und E43	Einkomponenten-Polydimethylsiloxan	Sehr gute Chemikalienbeständigkeit, sehr hohe Temperaturfestigkeit	Quellung in BEHP, als Vergussmasse wenig geeignet
Wacker PDMS-Silikon (Elastosil RT604)	2-Komponenten Polydimethylsiloxan	Sehr gute Chemikalienbeständigkeit, sehr hohe Temperaturfestigkeit	Quellung in BEHP, als Vergussmasse wenig geeignet
Hylosil – Einkomponentenwerkstoff auf Silikonbasis	1-Komponenten-Silikon	Sehr gute Chemikalienbeständigkeit, sehr hohe Temperaturfestigkeit	Ungenügender Verbund zur Keramik
Weicon-Epoxyd-Minutenkleber	Epoxidharz Härter: Polyaminoamid	Gute Beständigkeit gegenüber Ölen und den meisten Chemikalien	Gute Haftung und Beständigkeit in BEHP, für dynamisches Verpotten nicht geeignet
Araldit 2020	Methacrylat	Sehr gute Beständigkeit gegenüber Chemikalien und BEHP	Sehr guter Verbund zur Keramik, erlaubt dynamisches Vergießen der Hohlfasern

Eine viel versprechende Alternative zum Vergießen der Hohlfasern in einer Verbundmasse ist der Einsatz so genannter vollkeramischer Membranelemente. Erste Prototypen dazu sind für Forschung und Entwicklung verfügbar. Dabei erfolgt die Abdichtung der keramischen Fasern gegen das Modulgehäuse bzw. gegen die benachbarten Fasern durch eine undurchlässige, dichte Keramik. Infolge dessen ist auch das Problem der Werkstoffstabilität während der thermischen Sterilisation gelöst, da die thermischen Ausdehnungskoeffizienten der verwendeten Materialien nahezu identisch sind. Aufgrund der noch sehr hohen Kosten für diese vollkeramischen Membranbündel erfolgten die Stoffübergangsuntersuchungen (s.u.) mit den epoxidharzvergossenen Membranen.

Umfangreiche Versuche zum Einfassen eines Hohlfaserbündels aus den keramischen Hohlfasern (Verpotten) in geeigneten Glasgehäusen unterschiedlicher Dimension (vergleiche Abbildung 20) haben gezeigt, dass die asymmetrische,

dünnwandige Hohlfasermembran besonders brüchig ist und auf Grund ihres geringen Außendurchmessers nur sehr schwierig gegen ein Modulgehäuse abgedichtet werden kann. Darüber hinaus stellte sich die Problematik des bündigen Abtrennens der Hohlfasern und der elastischen Vergussmasse nach dem Einfassen der Membranen in das Glasgehäuse. Die stark unterschiedlichen Werkstoffeigenschaften der Keramikmembranen und der Vergussmasse erforderten die Suche nach neuen Konzepten des bündigen Abtrennens der Hohlfasermembranen. Versuche mit der Wasserstrahlschneidtechnik (haarfeiner Wasserschneidstrahl, Druck über 3000 bar) erwiesen sich für die asymmetrischen Membranen als am brauchbarsten. Das Verfahren zeigt aber noch Optimierungspotenzial auf.

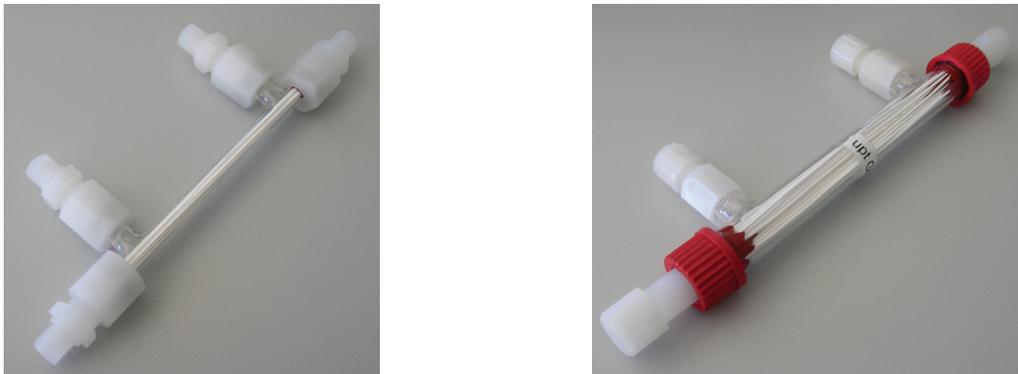


Abbildung 20. Glasmembranmodule unterschiedlicher Dimension für die keramischen Hohlfasermembranen.

Das Konzept diente der Evaluierung der Vergusstechnik und der mechanischen Stabilität, sowie der Charakterisierung der Membranen.

Die symmetrische, dickerwandige Hohlfasermembran erwies sich als mechanisch äußerst robust und besser in ihrer Handhabung hinsichtlich der Modulherstellung. Außerdem ist die symmetrische Membranhohlfaser in verschiedenen Porengrößen (0.02-1400 μm) verfügbar, weshalb im weiteren Verlauf des Projektes die Entwicklungen auf Basis dieser keramischen Hohlfaser erfolgten.

Von FuMa-Tech wurden auf Basis dieser keramischen, symmetrischen Hohlfasermembranen epoxidharzeingefasste Membranbündel mit dazu passenden Edelstahlmembranmodulen zur Verfügung gestellt (Abbildung 21). Die Membranbündel lassen sich beliebig oft auswechseln, sind dampfsterilisierbar und mechanisch sehr robust. Die Membranmodule sind in Größen von ca. 0.05 m² bis ca. 5 m² Membranfläche pro Membranmodul verfügbar. Für die Membranen zur

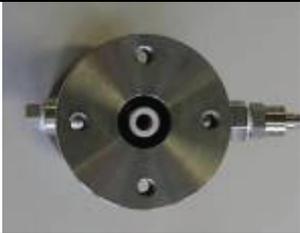
Produktisolierung erfolgte die Beschichtungen mit den selektiven Polymeren in 0.05 m² Modulen mit geringem Totvolumen.

Für die Monokanalrohrmembranen, die für die interne Begasung im Bioreaktor eingesetzt wurden, konzipierte die UPT eine Edelstahleinfassung mit Epoxidharzverguss. Dieses Konzept wurde im Laufe des Projektes weiter optimiert.



Abbildung 21. Edelstahl-Membranmodul mit KF-Flansch für die keramischen Hohlfasermembranbündel.

Tabelle 3. Übersicht über entwickelte und bereitgestellte Membranmodule.

Membranmodule	Membranfläche [m ²]	Anwendungen	Abbildungen
fest eingefasste keramische Monokanal – Rohrmembran	0,006	integrierte Begasung	
keramische Monokanal – Rohrmembran im Edelstahl Wechselgehäuse	0,004	Begasung im Kreislauf	
keramisches Hohlfasermembranelement im Edelstahl Wechselgehäuse	0,060	Begasung im Kreislauf, Produktextraktion mittels Pertraktion oder Pervaporation	

4.6 Untersuchungen zum Sauerstoffeintrag

Für die bisherigen Untersuchungen zur Epoxidierung von Kohlenwasserstoffen im Laborfermenter wurde die Transportlimitierung des Sauerstoffes durch extrem hohe Drehzahlen des Rührwerkes reduziert. Ein Scale-up dieser Verfahrensweise ist schon im Pilotmaßstab (z.B. 30 L Fermenter) technisch nicht mehr zu realisieren bzw. nicht mehr wirtschaftlich darzustellen. Für den Scale-up auf den industriellen Maßstab ist es daher notwendig, die Begasung in den Produktionsprozess so zu integrieren, dass der Sauerstoff hocheffizient und entkoppelt vom Rührwerk eingetragen werden kann. Dazu wurden in diesem Projekt folgende Konzepte verfolgt:

- Membrangestützte Begasung über einen Bypass
- Membrangestützte Begasung über eine in den Bioreaktor integrierte Membran

4.6.1 Begasung in einer Kreislaufströmung (Bypass)

Zur Begasung im Bypass wurden sowohl die beschriebenen Monokanalrohrmembranen mit Porengrößen von 1.2 bis 6-8 μm , als auch ein Hohlfasermembranelement mit einer Porengröße von 1.4 μm getestet (vgl. Tabelle 3). Beide Membrantypen wurden in entsprechenden Edelstahlmodulen eingefasst und in der Laboranlage eingesetzt. Den Versuchsaufbau dazu zeigt Abbildung 22.

Um einen möglichst effizienten Sauerstoffübergang zu gewährleisten, wurde das Zweiphasengemisch (Gas & Fluid) nach der membrangestützten Begasung über einen statischen Mischer in den Bioreaktor zurückgeführt. Untersuchungen bei unterschiedlichen Volumenströmen (100 l/h und 300 l/h) konnten grundsätzlich zeigen, dass die benötigten Begasungsraten sowohl mit Monokanalrohrmembran, wie auch mit Hohlfasermembranelement problemlos erreicht werden können (Abbildung 23).

Aufgrund der sehr erfolgreichen Demonstration der Begasung von kontinuierlichen Kulturen mit im Reaktionsraum integrierten Membranen (Untersuchungen der Uni Dortmund, Abschnitt 4.6.3) wurde das Konzept im Bypass unter realen Bedingungen nicht weiter verfolgt.

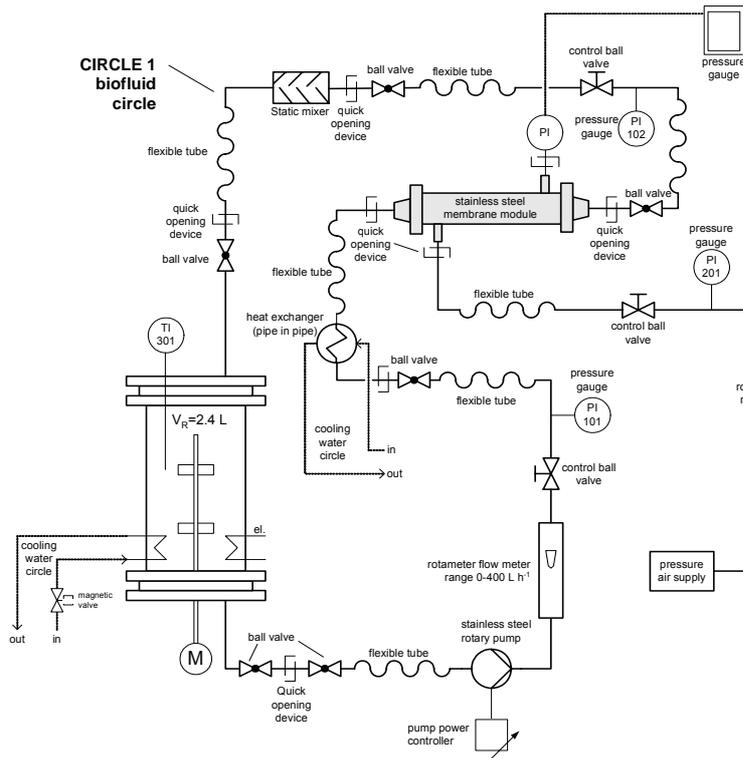


Abbildung 22. Prozessdesign im Labormaßstab für die membrangestützte Begasung im Bypass.

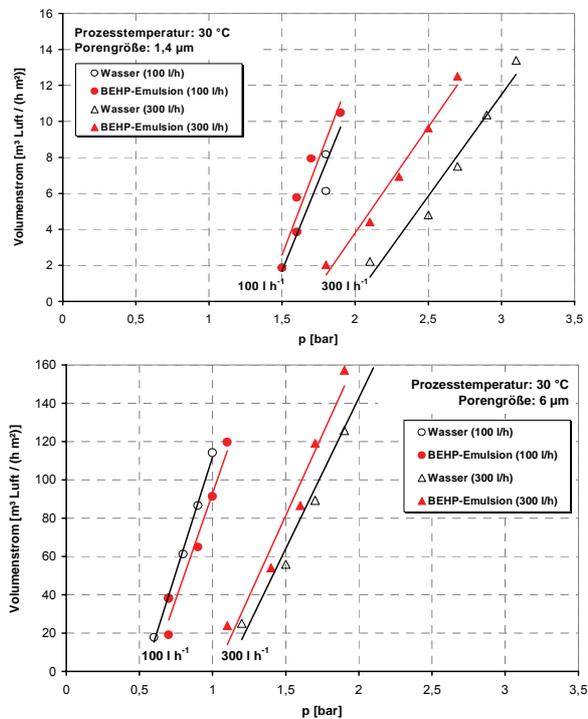


Abbildung 23. Begasungsversuche mit Hohlfasermembranmodul (oben, Porengröße 1,4 µm) und Monokanalrohrmembran (unten, Porengröße 6 µm). Prozesstemperatur: 30 °C.

4.6.2 Membrangestützte integrierte Begasung im Reaktionsraum

Zur integrierten Begasung im Bioreaktor wurden keramische Monokanalrohrmembranen mit Porengrößen von 1.2 bis 6.0 μm eingesetzt und getestet. Die keramischen Rohrmembranen wurden dazu an einem Ende versiegelt und am anderen Ende in eine Edelstahlverschraubung mit Epoxydharz eingefasst. Die Edelstahlverschraubung diente der Verbindung mit der Luftversorgung. Abbildung 24 zeigt den prinzipiellen Versuchsaufbau dazu.

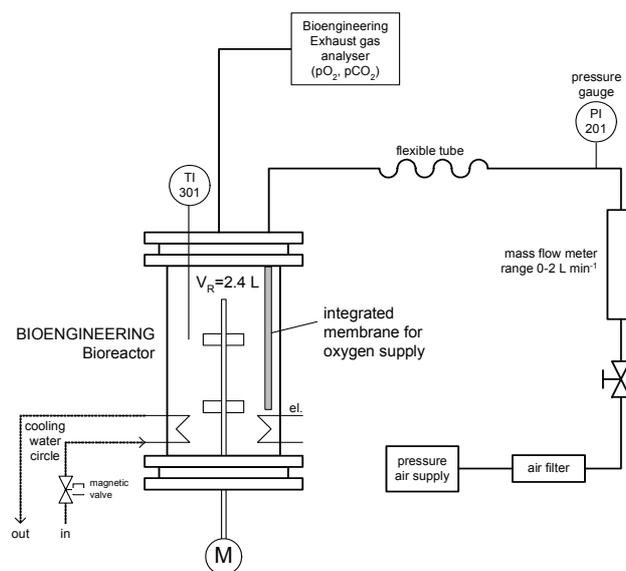


Abbildung 24. Prozessdesign für die im Bioreaktor integrierte Begasung über Monokanalrohrmembranen im Labormaßstab.

Auf Basis der Erfahrungen mit dem Schadensfall (Membranbruch, siehe Abbildung 27) erfolgte eine Optimierung der integrierten Begasungsmembran. Das optimierte Konzept sah vor, dass die Membran statt in den Bioreaktordeckel in den Bioreaktorboden integriert wird. Die Membranlänge kann dadurch reduziert und folglich die angreifenden Kräfte und Drehmomente verringert werden. Abbildung 25 zeigt das optimierte Konzept.

Eine Evaluierung dieses Konzeptes unter realen Prozessbedingungen erfolgte im Rahmen dieses Projektes nicht mehr. Es ist jedoch davon auszugehen, dass ähnliche k_{La} -Werte erreicht werden wie bei Zuführung der Luft über den Reaktordeckel, da lediglich eine konstruktive Optimierung vorgenommen wurde.

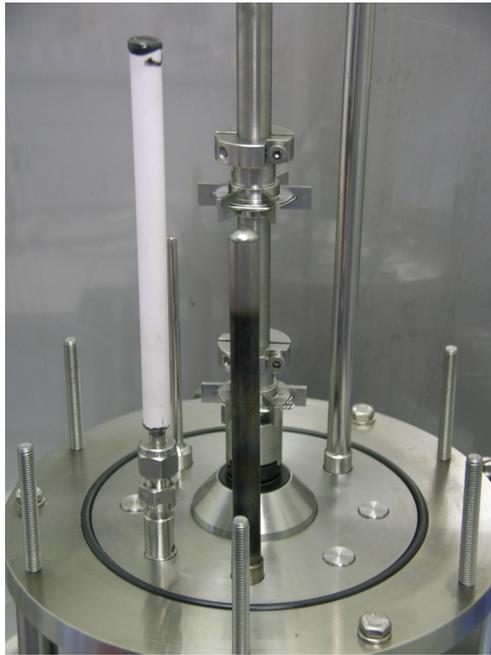


Abbildung 25. Im Bioreaktor integrierte Begasungsmembran (Monokanalrohrmembran) mit Zuführung der Luft durch den Reaktorboden.

Die Konstruktion wurde an das Bioengineering Equipment angepasst, so dass ein schneller Austausch und Einbau möglich ist.

4.6.3 Einsatz im Reaktor integrierter Membranen unter Prozessbedingungen – k_La -Wertbestimmung in kontinuierlichen Kulturen

Die von der upt-GmbH-Saarbrücken entwickelten Monokanal-Membranen wurden in Dortmund auf ihre Eigenschaften und Beständigkeiten in Fermentationsprozessen untersucht. Hierzu wurden kontinuierliche Kultivationen mit *E. coli* JM101 im Labormaßstab durchgeführt. Es kamen die beiden Membranen mit Porendurchmessern von 1,2 μm und 6 μm zum Einsatz. Die Charakterisierung der Membranen erfolgte anhand der Bestimmung der k_La -Werte über die Fließgleichgewichtsmethode (Oxygen-Balance-Methode), wobei sich die k_La -Werte während des Fließgewichts einer kontinuierlichen Kultur über die Messung des Sauerstoffpartialdrucks im Abgas sowie im Kulturmedium bestimmen lassen. Bei verschiedenen Rührerdrehzahlen und Begasungsraten wurden die mit keramischen Membranen erreichten k_La -Werte mit den über die Standardbegasung (Begasungsring) erreichten Werten verglichen. Die Messungen erfolgten sowohl in einem wässrigen Einphasensystem (Riesenbergmedium), als auch in einem wässrig-organischen Zweiphasensystem (Riesenbergmedium/BEHP). Abbildung 26 zeigt den Versuchsaufbau mit den beiden im Reaktor integrierten Membranen vor der Sterilisation (A) und während der kontinuierlichen Kultivation (B).

A**B**

Abbildung 26. Versuchsaufbau zur kontinuierlichen Kultivation mit im Reaktor integrierten Monokanalrohrmembranen.

Um die Begasungsart während des Versuches zu wechseln, wurden zwei Membranen sowie der Begasungsring eingebaut. (A), vor der Sterilisation; (B), während der kontinuierlichen Kultivation von *E. coli* JM101.

Die Sterilisation der Membranen erfolgte in situ im Reaktor. Das nachträgliche Anschließen der Luftzufuhr an den Klickverschluss der Membranen im Reaktor erwies sich als praktikabel. In einem Sterilttest konnte keine Kontaminierung festgestellt werden. Die Begasungseigenschaften der Membranen mit 6 μm Porendurchmesser blieben über die Dauer der kontinuierlichen Kultivationen konstant, während die Begasung über Membranen mit 1,2 μm Porendurchmesser zu tieferen k_{La} -Werten und einigen Unregelmäßigkeiten führte. Offensichtlich bauten sich während der Sterilisation in den feinporigen Membranen (1,2 μm Porendurchmesser) erhebliche Druckdifferenzen auf, welche zum Bruch derselben führen konnten (Abbildung 27). Zudem zeigten visuelle Untersuchungen der Membranen nach der Kultivation eine ungleichmäßige Begasungsverteilung über die Membranfläche (Abbildung 28). Als Ursache für diese Unregelmäßigkeiten kommen einerseits Materialfehler in Frage. Andererseits könnten die Defekte auch während der Sterilisation bzw. dem Betrieb des Fermenters, z.B. durch große Druckdifferenzen oder Verstopfen der Poren mit Zellmaterial, aufgetreten sein.



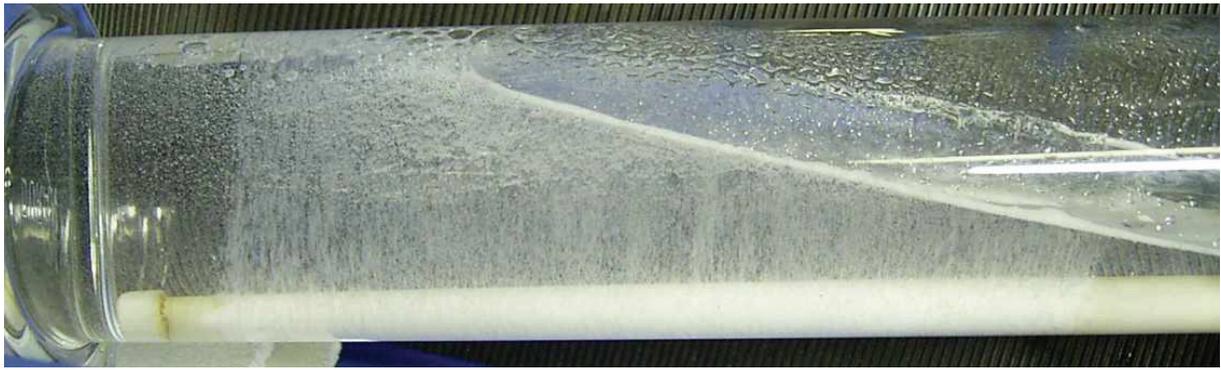
Abbildung 27. Gebrochene feinporeige Keramikmembran (1,2 μm Porendurchmesser).

Als Fazit bleibt festzuhalten, dass sich grobporige Membranen mit einem Porendurchmesser von 6 μm für einen Einsatz in Bioreaktoren eignen. Im Folgenden soll auf die Begasungseigenschaften dieser grobporigen Membranen näher eingegangen werden.

4.6.3.1 Begasungseffizienz der Membranen im wässrigen Einphasensystem

Um die Sauerstoffaufnahme zu variieren, wurden während Glukose-limitierten kontinuierlichen Kultivationen bei drei verschiedenen Verdünnungsraten (0,3 h^{-1} , 0,15 h^{-1} und 0,05 h^{-1}) Fließgleichgewichte eingestellt und die $k_{\text{L}a}$ -Werte bestimmt. In Abbildung 29 sind diese bei verschiedenen Begasungsraten (2, 3 und 4 NI/min) gegen die Rührerdrehzahl aufgetragen. Wie eindeutig zu sehen ist, trägt die Membran speziell bei tiefen Rührgeschwindigkeiten den Sauerstoff wesentlich besser ein als der Begasungsring. Aber auch bei hohen Rührgeschwindigkeiten, die allein schon sehr hohe $k_{\text{L}a}$ -Werte ermöglichen, führte die Membranbegasung zu einer weiteren Erhöhung der Begasungseffizienz. Die Werte sind im direkten Vergleich mit dem Begasungsring nicht nur höher, es konnte auch bei niedrigeren Rührgeschwindigkeiten begast werden, ohne dass Sauerstoff limitierend wurde. So reichte bei einer Verdünnungsrate von 0,05 h^{-1} eine Rührerdrehzahl von 100 rpm immer noch aus, um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden ($p\text{O}_2$: 29-33%). Es muss jedoch erwähnt werden, dass die Membranbegasung speziell bei tiefen Rührgeschwindigkeiten zu verstärkter Schaumbildung führte, was die Zugabe von Antischaum nötig machte. Die Begasungsrate hatte kaum Einfluss auf den $k_{\text{L}a}$.

A



B



C



D



Abbildung 28. Begasungstests mit grobporigen (6 μm ; A, B) und feinporigen (1,2 μm ; C, D) Membranen nach deren Einsatz in kontinuierlichen Kultivationen während 150-170 h. (A), Begasungsrate 0,2 NI/min; (B, C, D), Begasungsrate 2 NI/min.

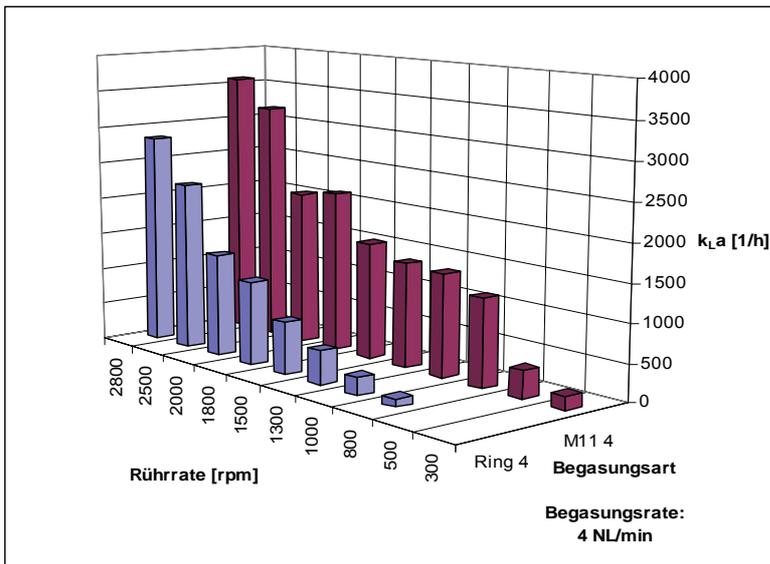
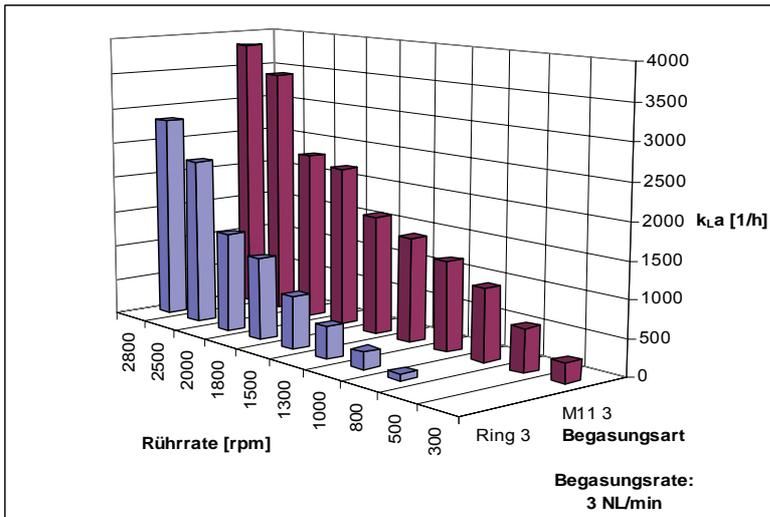
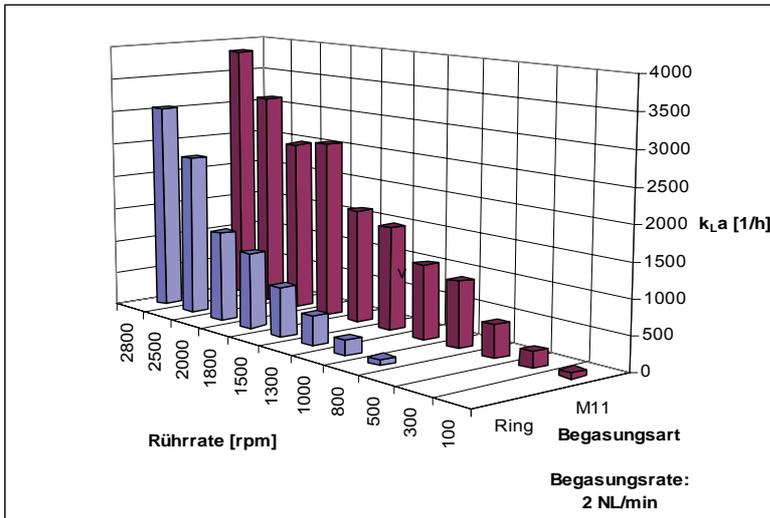


Abbildung 29. Vergleich der mit Membran (6 μm Porendurchmesser) und Begasungsring im wässrigen Einphasensystem erreichten k_{La} -Werte in Abhängigkeit von der Rührrate.

Die k_{La} -Werte beziehen sich auf den Sauerstofftransfer in wässriges Minimalmedium während einer kontinuierlichen Kultivierung von *E. coli* JM101. Die Begasungsrate betrug 2 NL/min (A), 3 NL/min (B) oder 4 NL/min (C).

Die keramische Monokanalrohrmembran mit 6 μm Porengrösse erlaubt also im Vergleich zum Begasungsring eine erheblich effizientere Begasung (bis zu 13-fach höhere $k_{\text{L}a}$ -Werte). Selbst bei geringer Rührerdrehzahl ist ein ausreichender Sauerstoffeintrag in den Fermenter noch möglich, wobei dann Schaumbekämpfung nötig wird.

4.6.3.2 Begasungseffizienz der Membranen im Zweiphasensystem

Für die Bestimmung der $k_{\text{L}a}$ -Werte im Zweiphasensystem wurden bei zwei verschiedenen Verdünnungsraten ($0,3 \text{ h}^{-1}$ und $0,05 \text{ h}^{-1}$) Fließgleichgewichte eingestellt. Im Zweiphasensystem gibt es für Sauerstoff drei Phasenübergänge zu beachten: von der Gasphase in die wässrige Phase, von der Gasphase in die organische Phase und von der organischen Phase in die wässrige Phase. Es wurde gezeigt, dass in einem solchen System der Sauerstofftransfer zwischen den zwei flüssigen Phasen nicht limitierend ist [12]. Da die Sauerstofflöslichkeit in BEHP unbekannt ist, wird hier nur der Sauerstoffeintrag in die wässrige Phase betrachtet. Als Vereinfachung wird für die verschiedenen Möglichkeiten des Sauerstofftransfers in die wässrige Phase (via organische Phase oder direkt von der Gasphase) nur ein Übergangskoeffizient definiert: $k_{\text{L}a}^*$. Es gilt zu beachten, dass $k_{\text{L}a}^*$ nicht direkt mit dem $k_{\text{L}a}$ -Wert in einem rein wässrigen System verglichen werden kann.

In Abbildung 30 sind die $k_{\text{L}a}^*$ -Werte bei verschiedenen Begasungsraten gegen die Rührerdrehzahl aufgetragen. Im Vergleich zur Begasung über den Begasungsring führte die Begasung über die Membran wiederum zu verbesserter Begasungseffizienz. Der Unterschied war jedoch nicht so markant wie beim wässrigen Einphasensystem. Unterhalb einer Rührerrate von 1500 rpm konnten mit Begasung über die Membran keine Messungen mehr durchgeführt werden, da die Schaumbildung zu stark war. Die Zugabe von Antischaum reduzierte die Schaumbildung nur leicht, was aber eine Messung bei einer Rührerdrehzahl von 1300 rpm ermöglichte. Bei dieser Messung wurde mit allen getesteten Begasungsraten ein deutlicher Anstieg des $p\text{O}_2$ und somit der $k_{\text{L}a}^*$ -Werte beobachtet (Abbildung 30). Das immer noch relativ hohe Schaumniveau begünstigte offensichtlich den Sauerstofftransfer.

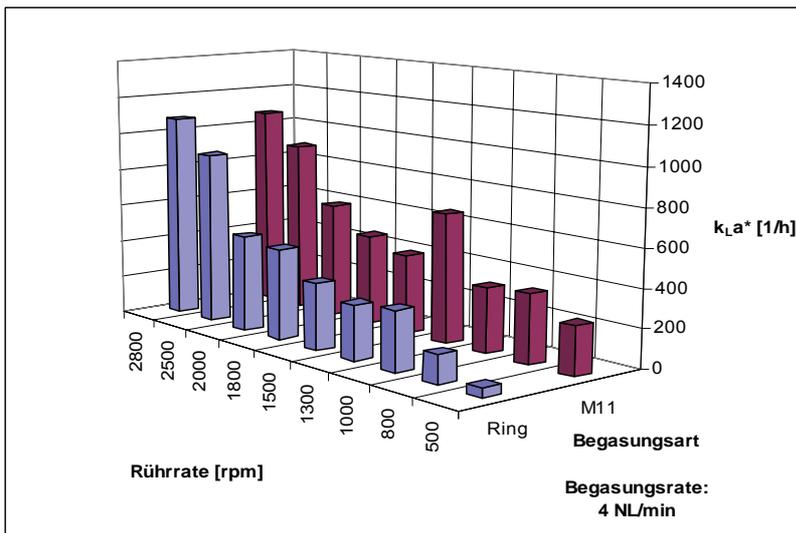
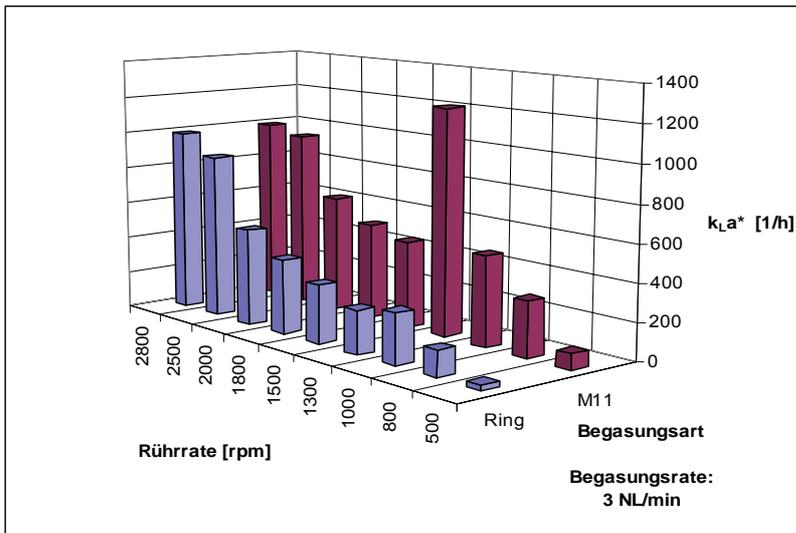
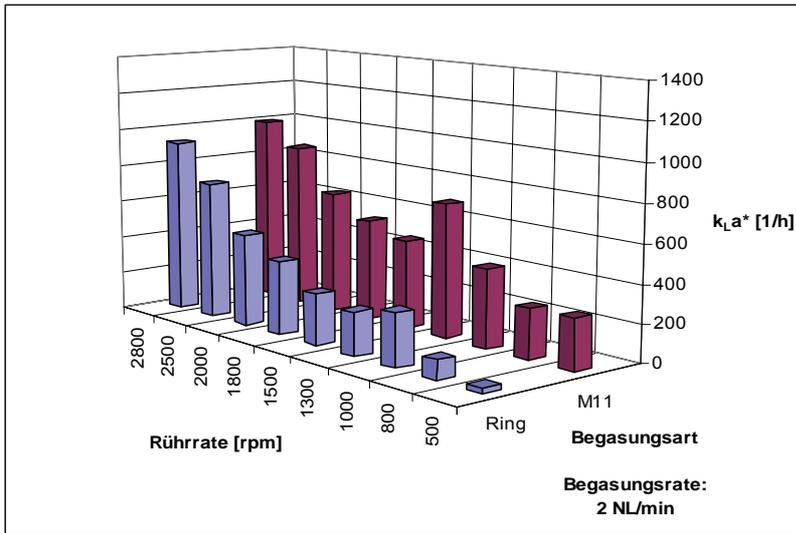


Abbildung 30. Vergleich der mit Membran (6 µm Porendurchmesser) und Begasungsring im Zweiphasensystem erreichten kLa*-Werte in Abhängigkeit von der Rührrate.

Die k_La*-Werte wurden während einer kontinuierlichen Kultivierung von *E. coli* JM101 bestimmt und beziehen sich auf den Sauerstofftransfer in die wässrige Phase eines Zweiphasensystems bestehend aus BEHP und wässrigem Minimalmedium. Die Begasungsrate betrug 2 NL/min (A), 3 NL/min (B) oder 4 NL/min (C).

Bei niedrigen Rührerdrehzahlen war eine Begasung über die Membran nur durch minimales paralleles Öffnen der Begasungszufuhr über den Begasungsring möglich. Das Antischaummittel hatte bei diesen Rührraten keinen signifikanten Effekt, was möglicherweise auf dessen gute Löslichkeit in BEHP zurückzuführen ist. Eine solche Parallelbegasung ermöglichte bis zu 11-mal höhere $k_L a^*$ -Werte als die Standardbegasung über den Begasungsring.

Auch im Zweiphasensystem war die Begasung über die grobporige Membrane wesentlich effizienter als über den Begasungsring. Hier zeigte sich die Problematik der Schaumbildung jedoch deutlicher als im Einphasensystem.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die eingesetzten Membranen mit einem Porendurchmesser von 6 μm den Sauerstoff in ein wässriges System um bis zu 13-fach besser eintragen als ein vergleichbarer Begasungsring. Im Zweiphasensystem konnten diese Membranen den Sauerstoff immerhin noch bis zu 11-fach besser eintragen. Das Ziel erhöhter Begasungseffizienz bei tiefen Leistungseinträgen konnte somit erreicht werden. Hierdurch bestätigten sich die Erwartungen, dass die feinblasige Begasung über die Membranen eine Vergrößerung der Phasengrenzfläche bewirkt und sich somit der Sauerstofftransfer von der Gasphase in die Flüssigphase effektiver gestaltet als bei Begasung über den Begasungsring.

Die verstärkte Schaumbildung bei feinblasiger Begasung in Anwesenheit von biogenen oberflächenaktiven Substanzen könnte unter anderem mit der teilweise oberflächennahen Begasung zusammenhängen. Im beantragten Folgeprojekt sollen weitere Membranengeometrien entwickelt und deren Effekt auf die Schaumbildung untersucht werden. Dabei wird eine bodennahe Begasung und ein reguliertes Zuschalten der Membranbegasung ins Auge gefasst. Auch eine externe Begasung soll als Alternative getestet werden. Des Weiteren soll das Konzept auf größerem Massstab getestet werden.

4.7 Untersuchungen zur integrierten Produktabtrennung

Die integrierte Produktabtrennung erfolgt im Bypass mit den neu entwickelten Lösungs-Diffusionsmembranen. Als Verfahren kommen sowohl die Pertraktion als auch die Pervaporation in Frage. Die Pertraktion bietet gegenüber der Pervaporation den Vorteil, dass kein Phasenwechsel der permeierenden Komponenten in die

Gasphase stattfindet. Für die an die Pertraktion anschließende weitere Aufarbeitung des Produktes mittels thermischer Trenntechnik – hier SFE / SFC – kann daher auf Kondensatoren verzichtet werden, was den apparativen Aufwand verringert. Der Vorteil der Pervaporation besteht jedoch darin, dass die Triebkräfte für den Stofftransport im Vergleich zu den Triebkräften bei der Pertraktion deutlich höher sind und darüber hinaus auch über den Permeatdruck gezielt geregelt werden können.

4.7.1 Produktisolierung mittels Pertraktion

Die Pertraktion ist eine Kombination eines Permeations- und eines Extraktionsprozesses. Die Membran dient hier lediglich als Kontaktapparat für die zwei getrennten Phasen. Das Verfahrensprinzip der Pertraktion zeigt Abbildung 31. Das Lösemittel bzw. Extraktionsmittel, hier BEHP, dient als aufnehmende Phase für das Produkt Styroloxid. Andere Lösemittel als BEHP kommen nicht in Frage, da diese infolge einer hohen Triebkraft durch die Membran in den Bioreaktorkreislauf permeieren und dort die Biokatalyse negativ beeinflussen.

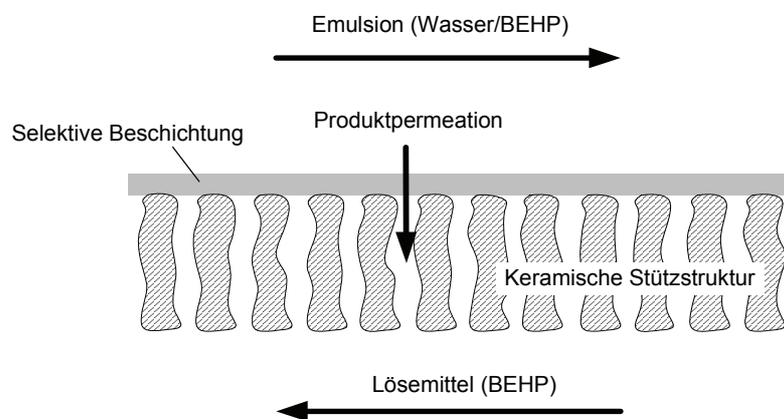


Abbildung 31. Verfahrensprinzip der Pertraktion mit beschichteten keramischen Hohlfasermembranen.

Triebkraft für den Stoffaustausch bei der Pertraktion ist die transmembrane Differenz des chemischen Potentials der übergehenden Komponente, die letztlich als Konzentrationsdifferenz formuliert werden kann. Verringert sich diese Konzentrationsdifferenz über die Prozessdauer, reduziert sich die Flussleistung. Die Transportgeschwindigkeit wird über die Diffusion der permeierenden Komponente durch die selektive Schicht und durch die Grenzschichten zu beiden Seiten der Membran bestimmt.

Die Stofftransportuntersuchungen erfolgten auf der von der upt aufgebauten Downstream-Processing Anlage (Vergleiche Abschnitt 4.4), die dazu im Pertraktionsmodus betrieben wurde. Das Verfahrensfließbild hierzu zeigt Abbildung 32. Der statische Mischer im Bioreaktorkreislauf dient der Unterstützung der Emulsionsbildung. Er kann bei Bedarf zugeschaltet werden. Damit kann eine von der Rührerdrehzahl entkoppelte Untersuchung sowohl des Stoffaustausches als auch der damit zusammenhängenden Begasung erfolgen.

Die Temperatur kann sowohl im Extraktionskreislauf als auch im Fermenterkeislauf unabhängig voneinander geregelt werden. Dadurch ist es möglich, die Triebkraft über die Membran durch Temperaturgradienten zu erhöhen, sofern die Diffusionskoeffizienten von Styrol und Styroloxid in BEHP klassisches Verhalten zeigen.

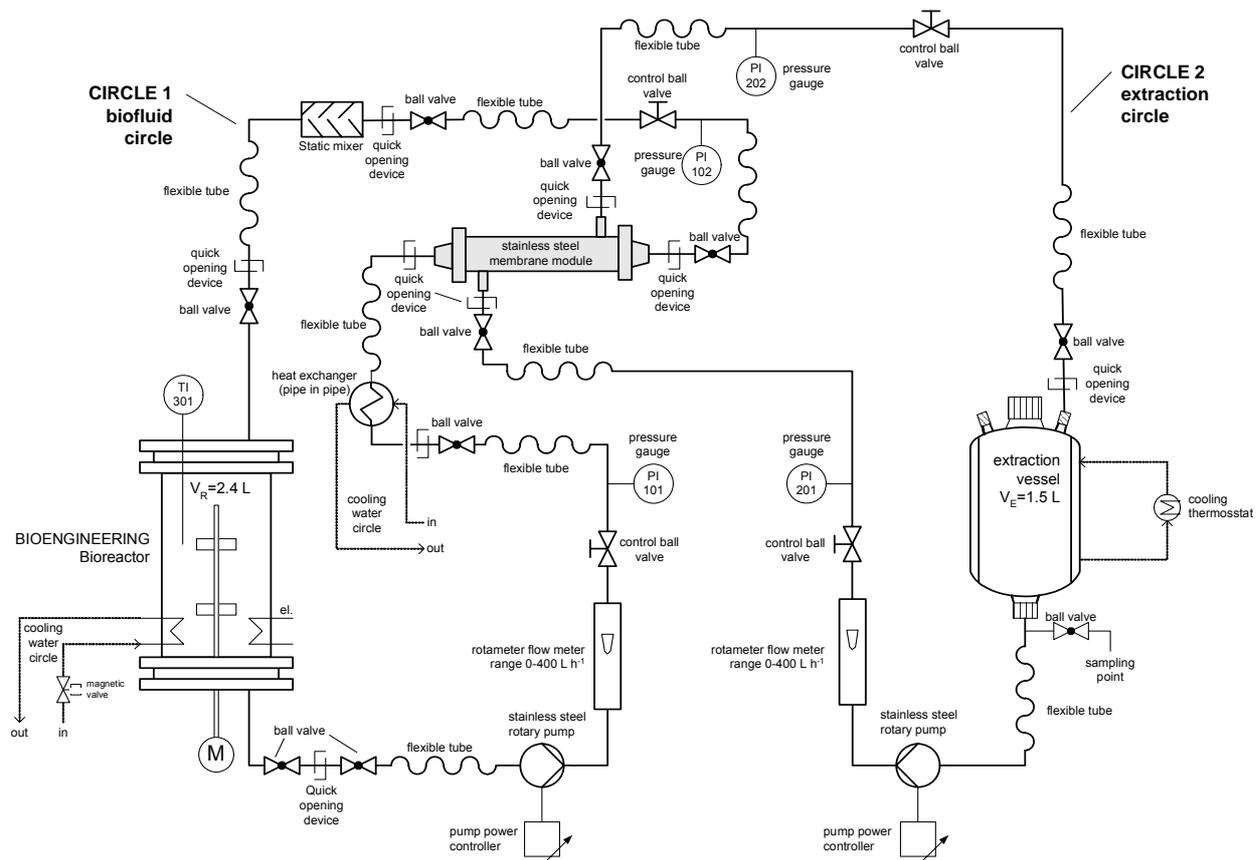


Abbildung 32. Verfahrensfließbild der Laboranlage im Pertraktionsmodus für die integrierte Produktisolierung.

Die Diffusionskoeffizienten sowohl des Produktes als auch des Substrates als Funktion der Temperatur und der Konzentration in BEHP und Wasser lagen nicht

vor. Eine diesbezügliche intensive Literaturrecherche der UPT gemeinsam mit der BASF blieb erfolglos. Die BASF gab daraufhin eine Auftragsanalyse in Arbeit, bei der mittels Streulichtexperimenten die binären Diffusionskoeffizienten ermittelt werden sollten. Das Ergebnis dieser Auftragsanalyse ist, dass aus Streulichtexperimenten aufgrund der zu geringen Unterschiede der Brechungsindizes der untersuchten Stoffe die Diffusionskoeffizienten nicht eindeutig bestimmt werden können.

Als Alternative zu den Streulichtexperimenten zur Bestimmung der binären Diffusionskoeffizienten kommt die konfokale inverse Raman-Spektrometrie in Frage. Für ein Folgeprojekt sind derartige Analysen zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten in BEHP und Wasser unbedingt anzustreben, damit Stofftransportlimitationen identifiziert werden können. Die Raman-Spektrometrie bietet darüber hinaus den entscheidenden Vorteil, dass Diffusionskoeffizienten zeit- und orts aufgelöst im Membranpolymer bestimmt werden können. Dies sollte die Entwicklung selektiver, für das spezifische Trennproblem optimierter Membranen erleichtern.

Die Charakterisierung der Membranen erfolgte mittels abiotischer Modellgemische. Dazu wurde eine 1:1 Emulsion aus Wasser / BEHP oder Medium / BEHP angesetzt und in den Fermenterkreislauf gegeben. Im Lösemittelkreislauf wurde reines BEHP als Extraktionsmittel vorgelegt. Zuvor wurde das Membranmodul mit der beschichteten Membran in die Anlage eingebaut. Vor dem eigentlichen Versuchsbetrieb wurden die Kreisläufe mit den Gemischen für einige Zeit betrieben, damit sich ein hydrodynamisches und thermisches Gleichgewicht einstellen konnte. Beim Versuchsstart wurden dann Styrol und Styroloxid in den Fermenterkreislauf gegeben. Über die gesamte Versuchsdauer erfolgten alle 20-30 Minuten Probenentnahmen aus dem Fermenter- und dem Lösemittelkreislauf.

Untersucht wurden keramische Hohlfasermembranen mit unterschiedlicher Unterstruktur sowie mit PDMS- und TEFLON-Beschichtung. Die Überströmungsgeschwindigkeit wurde zwischen 250 l h^{-1} und 400 l h^{-1} variiert, was lumen- und shellseitig Re-Zahlen zwischen 1100-1800 bzw. 100-200 entspricht. Die shellseitigen Re-Zahlen (laminare Hydrodynamik) werden hauptsächlich durch die im Vergleich zu Wasser um den Faktor 70-80 höhere Viskosität des BEHP bestimmt. Höhere Überströmgeschwindigkeiten führen zu keiner signifikanten Verschiebung in turbulente Strömungsbereiche auf der Shellseite der Membran. Eine Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeiten über 400 l h^{-1} hinaus macht keinen Sinn.

Der Druck entlang dem Membranmodul im Fermenterkreislauf betrug während der Versuche im Mittel circa 1.5 bar, im Lösemittelkreislauf etwa 1.0 bar. Untersuchungen mit Drücken bis zu 2.5 bar (sowohl im Extraktions- als auch im Lösemittelkreislauf) zeigten eine Verringerung des Stofftransports. Für den pertraktiven Produktaustrag sollten die Drücke in beiden Kreisläufen daher nicht über 1.5 bar liegen.

Das Verhalten bei Variation der Prozesstemperatur wurde zwischen 30 und 40°C untersucht. Für die Identifikation möglicher Einflüsse im Transportverhalten reichen Temperaturunterschiede von 10 K aus. Hier wurden keine Änderungen der Transportgeschwindigkeiten der Komponenten Styrol und Styroloxid festgestellt. An dieser Stelle hätte die Kenntnis der Diffusionskoeffizienten als Funktion der Temperatur zur Identifikation der Transportlimitationen führen können. Das Ergebnis wird nun so interpretiert, dass die aus dem Arrheniusterm bekannte Aktivierungsenergie für die Permeation durch das Membranpolymer keine starke Temperaturabhängigkeit aufweist.

Bei Untersuchungen mit Wasser / BEHP und Medium / BEHP als Fermenteremulsion konnte keine Unterschiede im Transportverhalten festgestellt werden, so dass davon ausgegangen wird, dass die nicht über die Membran permeierenden Substanzen wie Nährsalze, Vitamine, Glukose etc. keinen Einfluss auf die Permeation von Styrol und Styroloxid haben.

Grossen Einfluss auf das Transportverhalten zeigte die Auswahl des selektiven Polymers. Bei allen Untersuchungen mit PDMS beschichteten Membranen konnte keine Permeation bzw. eine lediglich extrem geringe Permeation von Styrol und Styroloxid beobachtet werden. Mit der Kenntnis des Löslichkeitsparameters (Hansen-Parameter) für BEHP, Styrol und Styrolepoxid in PDMS – die Parameter liegen in der gleichen Größenordnung – wird daraus geschlossen, dass sich die Komponenten Styrol, Styroepoxid und BEHP zwar im PDMS-Polymer lösen, dass jedoch die Diffusion von Styrol und Styrolepoxid wegen Fehlendem Freiraum im PDMS-Polymer sehr langsam verläuft. Die freien Stellen im Polymer (free-volume) werden durch BEHP besetzt, das selbst wegen seines großes Molekulargewichtes große Aktivierungsenergien für die Diffusion benötigt. Man spricht in diesem Fall von internem Membranfouling. Hinzu kommt das bei lumen- und schellseitiger Verwendung desselben Lösungsmittels relativ geringe Konzentrationsgefälle über die Membran. Im Zusammenhang mit weiteren Charakterisierungen könnte untersucht

werden, ob eine vorherige Konditionierung der Membran mit Styrolepoxid Einfluss auf das Permeationsverhalten hat.

Bei den mit TEFLON beschichteten Membranen konnte das Styrol und das Styrolepoxid in gleicher Größenordnung aus der Fermenteremulsion extrahiert werden. Die Abbildungen 28 und 29 zeigen zwei Untersuchungen mit TEFLON beschichteten Membranen mit einer Porengrößenverteilung um 100 nm bei unterschiedlichen Drücken. Membranen mit Porenweiten kleiner als 100 nm wurden nicht untersucht, da davon ausgegangen werden kann, dass deren Extraktionsleistung geringer ist.

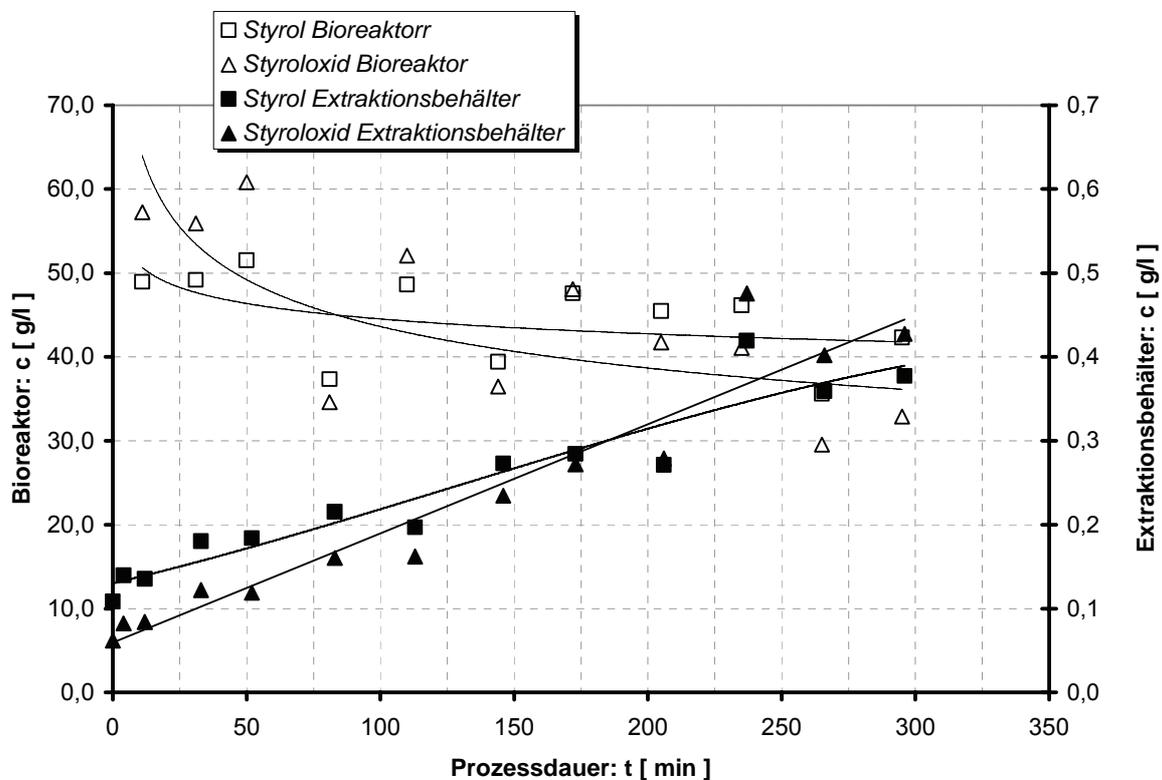


Abbildung 33. Produktisolierung mittels Pertraktion mit einer TEFLON beschichteten keramischen Hohlfasermembran bei mittleren Drücken um 1.5 bar lumenseitig und 1.0 bar shellseitig.

Aus den Versuchen mit der TEFLON Membran (Abbildung 33) bei mittleren Drücken um 1.5 bar lumenseitig und 1.0 bar shellseitig erhält man für Styrol wie auch für Styrolepoxid eine integrale Extraktionsleistung von etwa 0.4-0.5 g / m² h. Der Funktionsverlauf für die Konzentrationen im Extraktionsbehälter wurde hier für die gegebene Prozessdauer als linear angenommen. Es muss jedoch berücksichtigt

werden, dass die Extraktionsleistung mit der Dauer der Extraktion sinkt, da das treibende Konzentrationsgefälle über die Membran sinkt.

Aus dem Versuch mit der TEFLON Membran (Abbildung 34) bei mittleren Drücken um 2.5 bar (lumen- und shellseitig) erhält man eine integrale Extraktionsleistung von etwa 0.05-0.07 g / m² h für Styrol und Stylolepid. Gegenüber der Untersuchung mit der TEFLON Membran mit Drücken um 1.5 bar / 1.0 bar bedeutet das eine Verringerung der Extraktionsleistung um etwa den Faktor 5-10.

Auffallend in Abbildung 34 ist die starke Abnahme der Styroloxidkonzentration im Bioreaktorkreislauf. Nach diesen Daten läge die Extraktionsleistung der Membran im Mittel bei 40 g / m² h Stylolepid. Allerdings konnte das Styroloxid nicht im Extraktionsbehälter nachgewiesen werden.

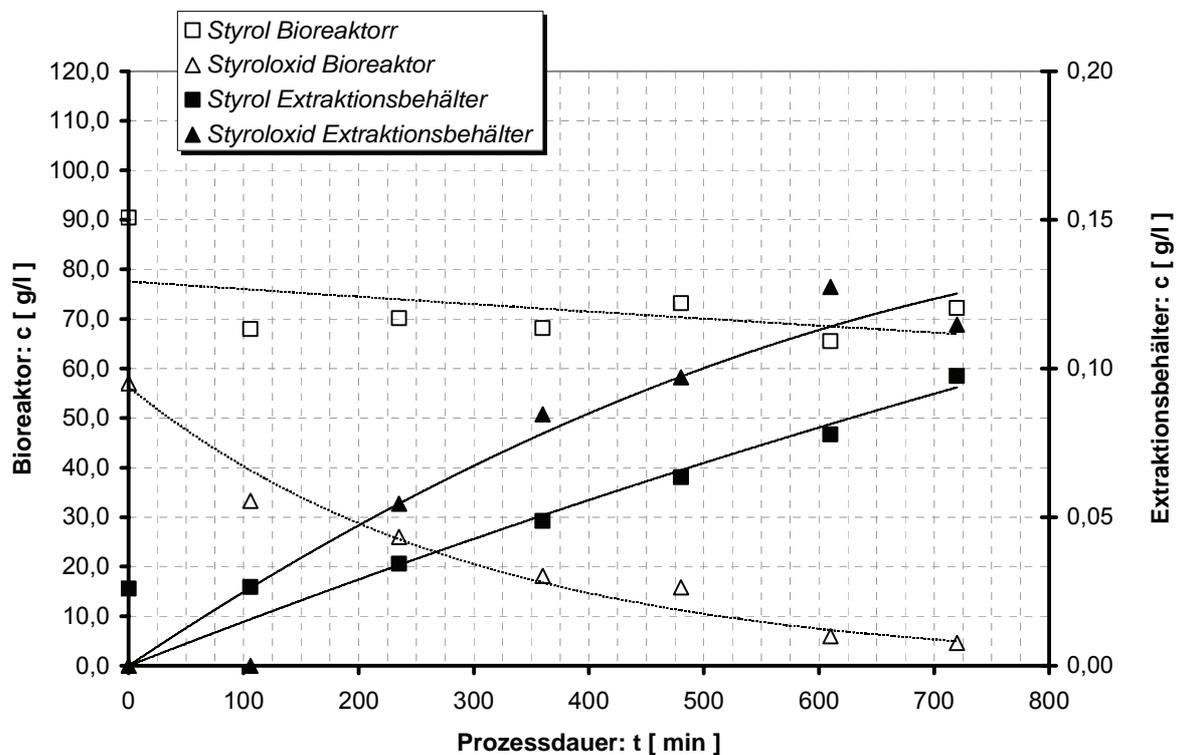


Abbildung 34. Produktisolierung mittels Pertraktion mit einer TEFLON beschichteten keramischen Hohlfasermembran bei mittleren Drücken um 2.5 bar.

Eine Anreicherung des Styroloxids im Membranpolymer kann nicht ausgeschlossen werden. Gewissheit kann eine Analyse des Sorptionsverhaltens des Styroloxids im TEFLON-Polymer mittels inverser konfokaler Raman-Spektrometrie verschaffen.

Die bei einer Membranfläche von 0.06 m² pro Membranmodul mittels Pertraktion erreichten Flussleistungen reichen für eine prozessintegrierte Produktisolierung bei

gegebenen Produktivitäten von bis zu 8 g Styroloxid $L_{\text{tot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nicht aus. Für die in situ Produktisolierung via Pertraktion mit einer TEFLON-beschichteten Membran ist eine Membranfläche von 40 bis 60 m^2 erforderlich. Diese Membranfläche lässt sich in das Setup der Downstream-Processing Anlage nicht integrieren. Mit den erhaltenen Flussleistungen kommt es beim Einsatz der Membranmodule mit 0.06 m^2 Membranfläche zu einer Aufkonzentration des Produktes im Fermenter, und somit zu einer Inhibition des Bioprozesses.

Die Hauptgründe für den geringen Stofftransport liegen im Bereich des Extraktionsmittels, dessen hoher Viskosität und der Diffusionslimitierung infolge der Dicke der Membran. Alternative Extraktionsmittel wie n-Hexadekan, das in der Gruppe von Prof. Schmid auch schon erfolgreich für die biokatalytische Styrolepoxidation eingesetzt wurde (BEHP stellte sich allerdings als das biologisch kompatiblere Lösungsmittel heraus und ermöglichte eine höhere Produktextraktionseffizienz), sollten diesbezüglich getestet werden.

Die Produktextraktion sollte auch mittels poröser hydrophober keramischer Hohlfasermembranen oder hydrophober Hohlfaser-Teflonmembranen ohne Beschichtung möglich sein. Derartige Membranen sind derzeit noch nicht kommerziell erhältlich. Die noch im Entwicklungsstadium befindlichen Membranen stehen für FuE Zwecke zur Verfügung. Die Membran wird hierbei als Kontaktapparat mit hoher spezifischer Austauschfläche eingesetzt. Die Phasen werden in der porösen Struktur immobilisiert.

Als Option für weitere Entwicklungen sollte die membrangestützte Reaktivextraktion untersucht werden. Es ist bekannt, dass sich Phenol mittels membrangestützter Reaktivextraktion mit hohen Transportleistungen (vergleichbar mit der Leistung offenporiger Membranen) aus wässrigen Lösungen entfernen lässt, wenn Natronlauge als Extraktionsmittel eingesetzt wird. Bei diesem Verfahren wird die chemische Potenzialdifferenz zu beiden Seiten der Membran durch die Reaktion des Phenols zum Natriumphenolat drastisch erhöht, wodurch ein hohes treibendes Konzentrationsgefälle entsteht.

Ob diese Möglichkeit für das (S)-Styroloxid existiert, müsste in einem proof-of-principle eruiert werden.

4.7.2 Produktisolierung mittels Pervaporation

Die Pervaporation ist die selektive Verdampfung von Molekülen aus einer Flüssigkeit durch eine Lösungs-Diffusionsmembran. Die notwendige Verdampfungsenthalpie wird dem flüssigen Zulaufgemisch entzogen. Triebkräfte für den Stofftransport werden in der Regel durch Anlegen eines permeatseitigen Vakuums realisiert. Abbildung 35 zeigt das Verfahrensprinzip.

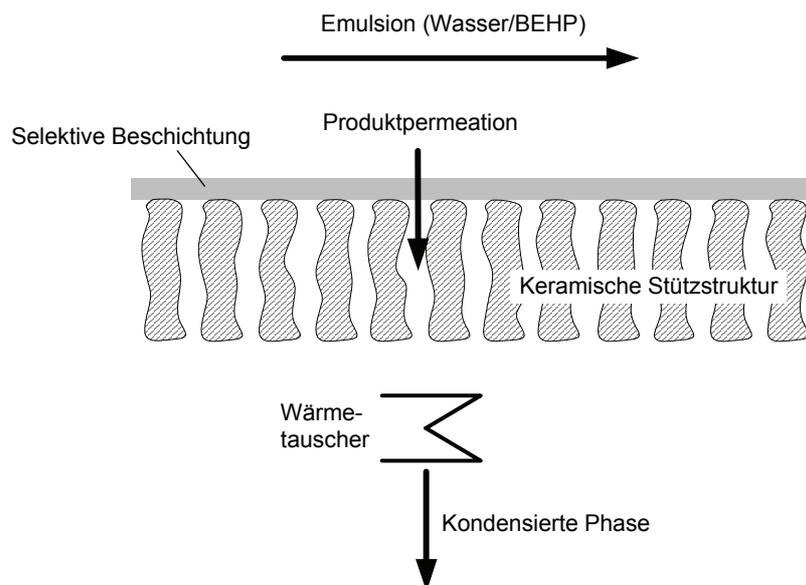


Abbildung 35. Verfahrensprinzip der Pervaporation mit dichten Lösungs-Diffusionsmembranen.

Die Wasser / BEHP Emulsion überströmt die Membran, wobei im günstigsten Fall durch die selektive Beschichtung der Membran lediglich das Produkt aus dem Zulaufgemisch abtransportiert wird. Es ist jedoch davon auszugehen, dass BEHP sich im Membranpolymer löst und durch die Membran permeiert. Kritisch ist dann der sehr niedrige Dampfdruck des BEHP von etwa 10^{-4} mbar bei 25 °C. Eine Überführung in die Dampfphase ist bei üblichen Permeatdrücken von 1 mbar bis 10 mbar nicht möglich.

Die Untersuchungen erfolgten auf der von der upt aufgebauten Downstream-Processing Anlage (Vergleiche Abschnitt 4.4), die dazu im Pervaporationsmodus betrieben wurde. Das Verfahrensbild hierzu zeigt Abbildung 36. Der statische Mischer im Bioreaktorkreislauf dient wiederum der Unterstützung der Emulsionsbildung und kann bei Bedarf zu geschaltet werden.

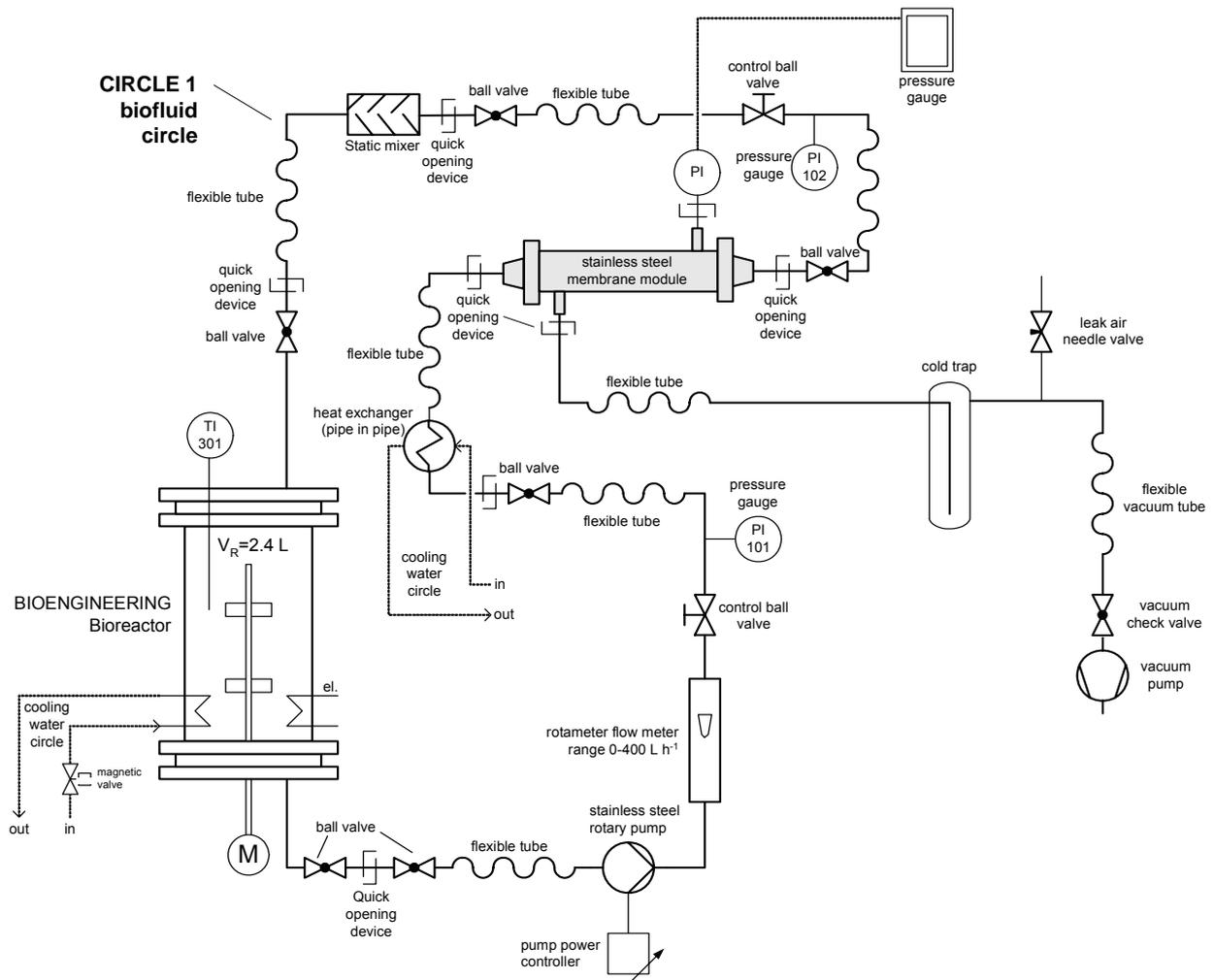


Abbildung 36. Verfahrensfießbild der Laboranlage im Pervaporationsmodus für die integrierte Produktisolierung.

Die Temperatur im Fermenterkeislauf wird über die Wärmetauschereinrichtung (Heizfinger und Kühlfinger) im Bioreaktor geregelt. Der Temperaturregelkreis wird über einen im Kreislauf befindlichen Rohr-in-Rohr-Wärmetauscher unterstützt. Für die Permeatseite existiert keine Thermostatisierung.

Das Permeat wird in Glaskühlfallen aufgefangan, die mit flüssigem Stickstoff (-196°C) gekühlt werden. Auf das Konzept einer zweiten, parallel geschalteten Kühlfalle wurde hier verzichtet. Die Breite der Fehlervalenzbänder sollte durch lange Permeationsdauern möglichst klein gehalten werden. Als Vakuumpumpe diente eine Vakuummembranpumpe, die auf einen Druck von 2 mbar ohne Gasballast limitiert war. Der permeatseitige Druck wurde mit einem Pirani-Drucksensor erfasst. Die Druckregelung erfolgt manuell mittels Falschluffventil.

Die Diffusionskoeffizienten sowohl des Produktes als auch des Substrates als Funktion der Temperatur und der Konzentration in BEHP und Wasser lagen nicht

vor. Eine Diskussion bezüglich der Diffusionskoeffizienten und deren Bestimmung findet sich im vorangegangenen Abschnitt 4.7.1.

Die Charakterisierung der Membranen erfolgte mittels abiotischer Modellgemische. Im Fermenterkreislauf wurden dazu rein wässrige Modellgemische oder Modellgemische mit Wasser/BEHP im Kreislauf vorgelegt. Vor dem eigentlichen Versuchsbetrieb wurden der Kreislauf mit den Gemischen für einige Zeit betrieben, damit sich ein hydrodynamisches und thermisches Gleichgewicht einstellen konnte. Mit Versuchsstart wurden dann definierte Mengen Styrol und Styroloxid in den Kreislauf gegeben. Über die gesamte Versuchsdauer erfolgten alle 20-30 Minuten Probenentnahmen aus dem Bioreaktor. Das Permeat wurde nach Versuchsende gravimetrisch und volumetrisch erfasst. Der Gesamt-Permeatfluss berechnet sich aus Permeateinwaage pro Zeit pro Membranfläche. Die Partialflüsse wurden aus den Ergebnissen der chemischen Analysen berechnet.

Untersucht wurden die neu entwickelten keramischen Hohlfasermembranen mit PDMS- und TEFLON-Beschichtung und unterschiedlicher Porengrößenverteilung der Unterstruktur (100 nm und 40 nm). Zum Vergleich diente eine handelsübliche PDMS-Hohlfasermembran mit polymerer Unterstruktur. Die Überströmgeschwindigkeit wurde zwischen 250 l h^{-1} und 400 l h^{-1} variiert, was Re-Zahlen zwischen 1100-1800 entspricht.

Das Verhalten bei Variation der Prozesstemperatur wurde bei 30°C und 50°C untersucht. Der Druck entlang dem Membranmodul im Fermenterkreislauf wurde zwischen 1.0 bar und maximal 3.6 bar variiert.

Untersuchungen mit Wasser / BEHP und Medium / BEHP als Fermenteremulsion zeigten keine Unterschiede im Transportverhalten, so dass auch hier davon ausgegangen wird, dass nicht über die Membran permeierende Substanzen wie Nährsalze, Vitamine, Glukose etc. keinen Einfluss auf die Permeation haben. Es ist jedoch bekannt und in der Literatur belegt [13], dass impermeable Substanzen wie Nährsalze großen Einfluss auf das Permeationsverhalten zeigen können. Da hier jedoch kein Einfluss festgestellt werden konnte, wird davon ausgegangen, dass BEHP die Aktivitätskoeffizienten für den Transport im Polymer wesentlich bestimmt und die Aktivitätsänderungen in Anwesenheit impermeabler Substanzen überlagert. Bei rein wässrigen Zulaufgemischen ohne BEHP ist jedoch mit einer Selektivitätssteigerung zu rechnen.

Die Aktivitätskoeffizienten in den Prozessgemischen als Funktion der Konzentration und Temperatur insbesondere bei Anwesenheit impermeabler Substanzen lagen nicht vor. Eine intensive Literaturrecherche blieb erfolglos. Für die Auslegung und Weiterentwicklung des Membranprozesses sind diese Daten jedoch äußerst wichtig. Näherungen könnten aus thermodynamischen Berechnungen über Exzessenthalpiemodelle wie NRTL, UNIQUAC, UNIFAC erhalten werden.

Die Membranpolymere PDMS und TEFLON zeigen deutlich unterschiedliche Transportraten (siehe unten). Die Löslichkeitsparameter (Hansen-Parameter) von BEHP, Styrol und Styroloxid in PDMS sind näherungsweise gleich. Für das TEFLON Polymer lagen keine Hansen-Parameter vor. Es ist jedoch davon auszugehen, dass diese von den Parametern in PDMS abweichen. Das kann aus den Beständigkeitsuntersuchungen der Pottingpolymere abgeleitet werden.

In beiden Membranpolymeren - PDMS und TEFLON - lösen sich die Komponenten Styrol, Styroloxid wie auch BEHP. Das große BEHP Molekül, bekannt als typischer Weichmacher, besetzt den verfügbaren Freiraum – das sogenannte free volume - im Polymer. Die Permeation von Styrol und Styroloxid reduziert sich dadurch. Man spricht auch hier von internem Membranfouling. Die Folge sind große Aktivierungsenergien für die Permeation und damit verbunden wird eine große Triebkraft für den Stofftransport nötig.

Die Triebkräfte für die Pervaporation, realisiert über den Unterdruck auf der Permeatseite, gelangen jedoch nicht bis unter die aktive Polymerschicht der Membran, da flüssiges BEHP durch die aktive Polymer-Schicht in die poröse Unterstruktur gelangt. Die hohe Viskosität des BEHP, der symmetrische Aufbau der keramischen Membran und deren Dicke behindert ein leichtes Abfließen von BEHP aus der porösen Unterstruktur.

4.7.2.1 Produktisolierung aus rein wässrigen Gemischen

Die Charakterisierung der neu entwickelten Membranen erfolgte nicht nur mit zweiphasigen sondern auch mit rein wässrigen Modellgemischen. Zum Leistungsvergleich wurde eine übliche mit PDMS beschichtete Polymerhohlfasermembran mit gleicher aktiver Schichtdicke und ähnlicher Porengrößenverteilung der Unterstruktur herangezogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt. Der Vergleich mit der kommerziellen PDMS Pervaporationsmembran bei ähnlichen Untersdrücken mit der PDMS Membran mit

40 nm Porendurchmesser zeigt, dass die Gesamt-Flussleistung der neuen Hohlfasermembran mit keramischer Unterstruktur um den Faktor 1.6 größer ist. Die Partialflüsse und die Selektivität für das Styroloxid liegen für die neue Membran über denen der Hohlfasermembran mit polymerer Unterstruktur. Ähnliche Partial-Flussleistungen, jedoch höhere Selektivitäten im Vergleich zur kommerziellen Membran bei 4 mbar Permeatdruck zeigt die neue Membran bei erhöhtem Permeatdruck von 35 mbar.

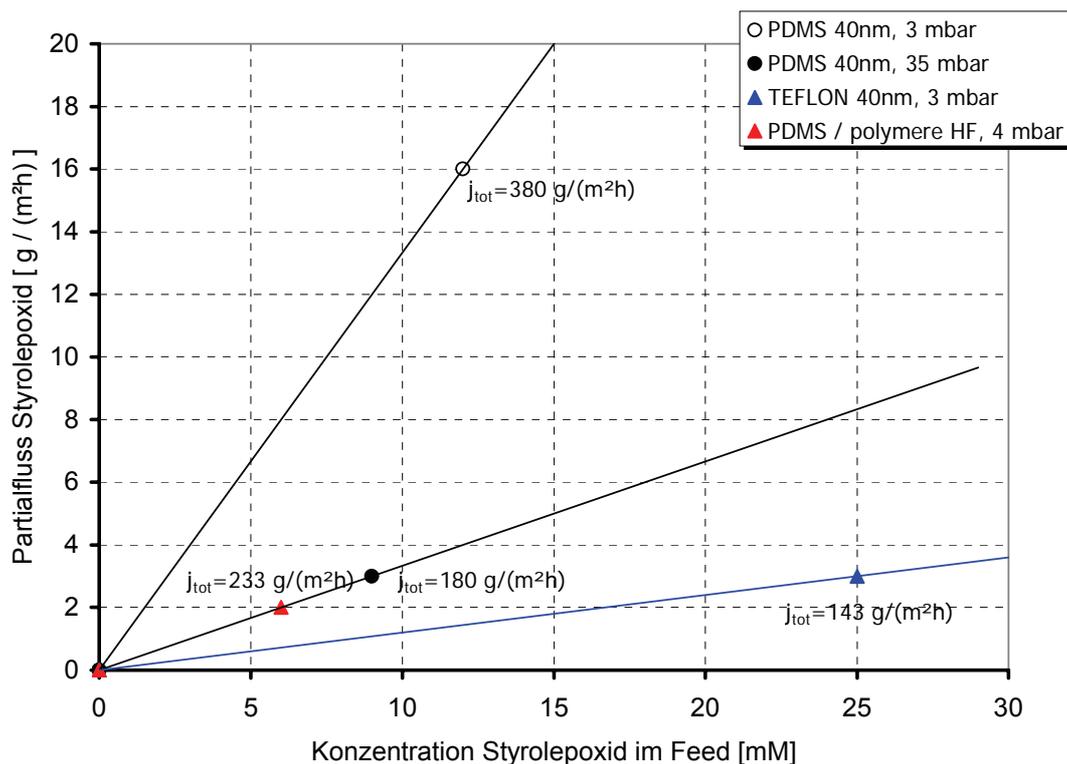


Abbildung 37. Styroloxidflüsse während der Pervaporation mit Zulaufgemisch ohne BEHP Phase bei 30 °C für die neuen keramischen Hohlfasermembranen und eine kommerzielle PDMS beschichtete Hohlfasermembran mit polymerer Unterstruktur.

Die Totalflüsse setzen sich jeweils aus Wasser- und Styroloxidflüssen zusammen.

Die Auswahl der Unterstruktur einer Pervaporationsmembran hat einen großen Einfluss auf die Flussleistungen. Bei der keramischen Membran kommt es zu keiner Kompaktierung in der Unterstruktur der Membran, wenn transmembrane Druckdifferenzen – hier 1 bar - angelegt werden. Die Kompaktierung sorgt für einen steigenden Druckverlust in der porösen Unterstruktur; die Flussleistungen sinken.

Für die mit TEFLON beschichtete keramische Hohlfaser mit 40 nm Unterstruktur wurde ein Gesamtfluss von etwa 143 g / m²h und ein Styroloxidfluss von etwa 3 g / m²h bei 25 mM Feedkonzentration gemessen. Mit einer 100 nm Unterstruktur für die

TEFLON beschichtete Membran sollte der Gesamtfluss und der Partialfluss höher liegen. Die Ergebnisse zeigen, dass die mit TEFLON beschichtete Membran für den pervaporativen Produktaustrag weniger gut geeignet ist als die PDMS beschichtete keramische Hohlfasermembran.

4.7.2.2 Produktisolierung aus der Wasser / BEHP Emulsion

Die Partialflüsse für Styrol und Styroloxid über die mit TEFLON und PDMS beschichteten keramischen Hohlfasermembranen sind in der gleichen Größenordnung (siehe Abbildungen 33 und 34). Eine effizientere Permeation einer der beiden Komponenten (Selektivität für eine der beiden Komponenten) konnte weder in TEFLON noch in PDMS festgestellt werden.

Der Gesamtfluss und die Partialflüsse über die mit TEFLON beschichtete Membran ist bei großer angelegter Triebkraft (transmembrane Druckdifferenz ca. 3 bar) deutlich geringer als der Fluss über die mit PDMS beschichtete Membran (Vergleiche hierzu Abbildungen 33 und 34). Die TEFLON Membran ist für das gegebene Stoffsystem aufgrund ihrer geringen Flussleistungen weniger gut geeignet.

Die experimentellen Daten zeigten, dass Styrol und Styroloxid bei der Pervaporation in Anwesenheit von BEHP ohne signifikante Selektivität gegenüber dem BEHP aus dem Zulaufgemisch auf die Permeatseite transportiert wurden. Dies gilt sowohl für die mit TEFLON beschichtete Membran als auch für die mit PDMS beschichtete Membran. Der geringe Einfluss der Polymerschicht auf die Selektivität ist auf die BEHP Phase zurückzuführen, die über die Polymerschicht diffundiert und in der keramischen Unterstruktur akkumuliert.

Eine Erhöhung des lumenseitig angelegten Druckes bei konstanter Temperatur von 30 °C – Variation zwischen 1.3 bar und maximal 3.6 bar – führte bei der PDMS Membran zu Flussteigerungen, jedoch zu keiner Erhöhung der Partialflüsse in Bereiche die den Produktivitäten der Biokatalyse entspricht.

Die Porengrößenverteilung der Unterstruktur hatte in Anwesenheit der BEHP Phase keinen signifikanten Einfluss auf den Gesamtfluss, jedoch wurden bei der Membran mit der 100 nm Unterstruktur etwa 1.8-fach höhere Partialflüsse gemessen.

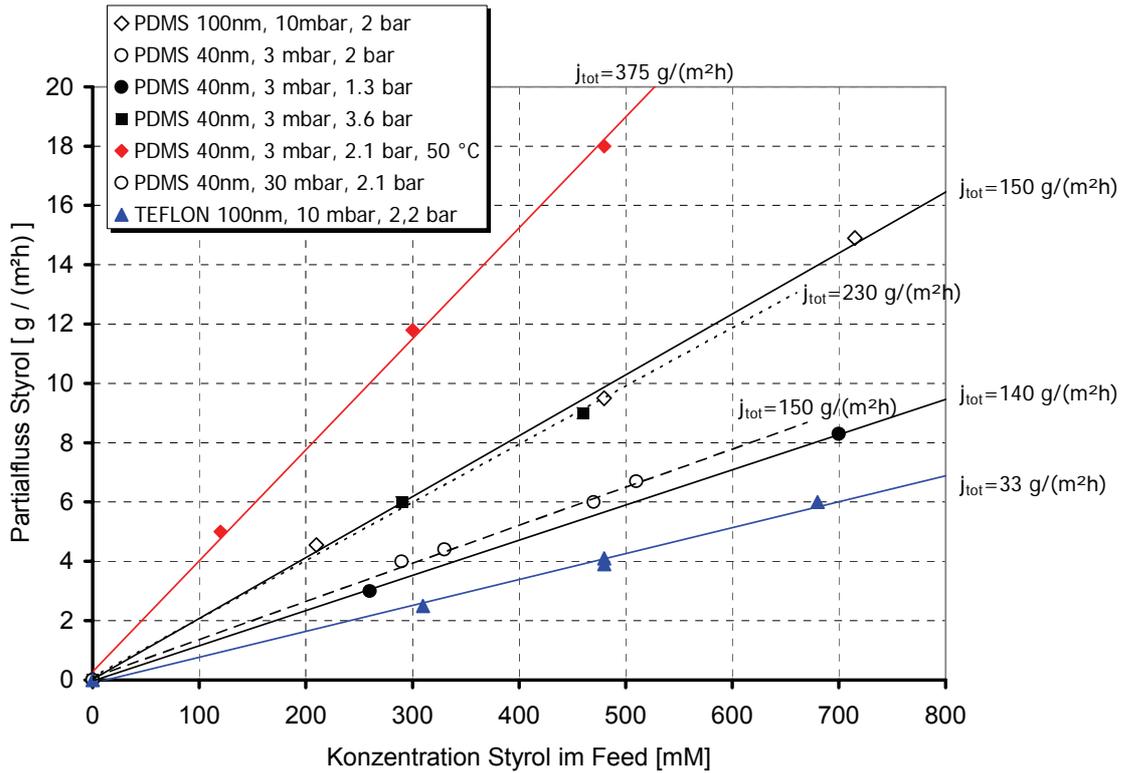


Abbildung 38. Styrolflüsse der Pervaporation mit der Emulsion aus Wasser / BEHP bei 30°C und 50°C.

Die Totalflüsse setzen sich jeweils aus BEHP-, Wasser- und Styrolflüssen zusammen.

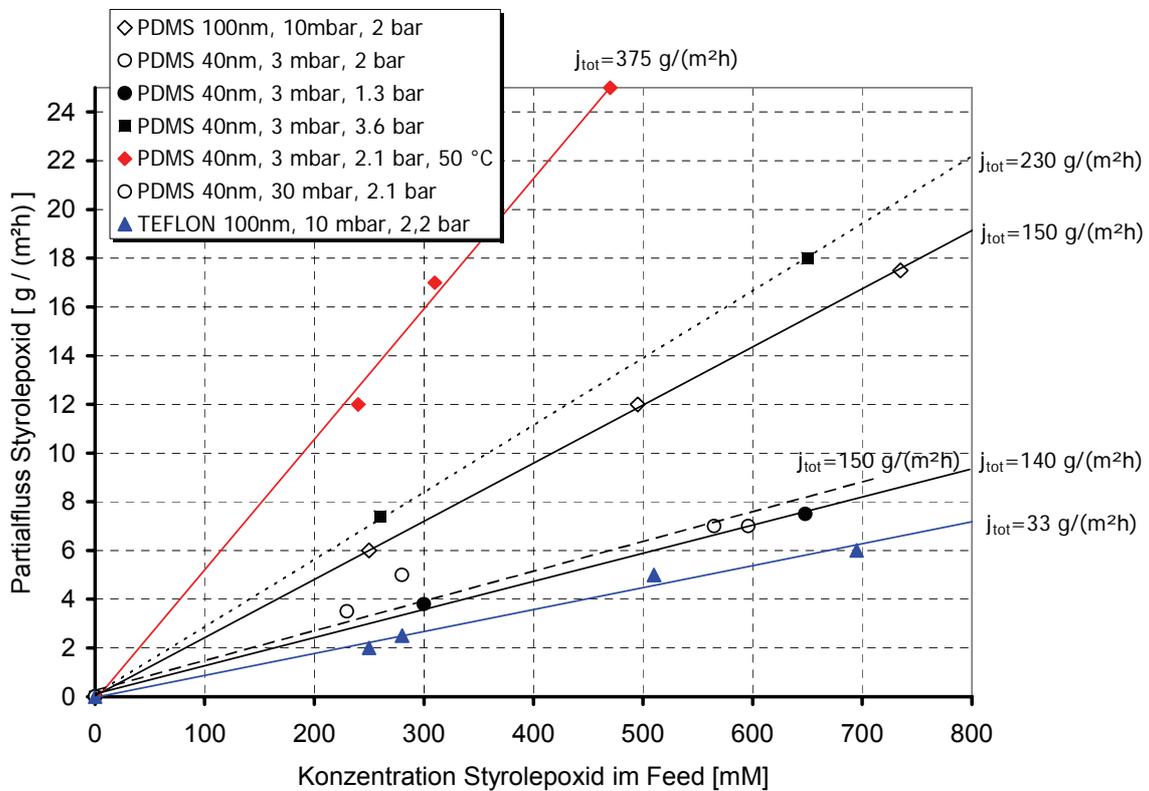


Abbildung 39. Styroloxidflüsse der Pervaporation mit der Emulsion aus Wasser / BEHP bei 30°C und 50°C.

Die Totalflüsse setzen sich jeweils aus BEHP-, Wasser- und Styroloxidflüssen zusammen.

Erklärung dafür liefert das Flussverhalten der BEHP Phase durch die Membran. Die BEHP Moleküle lösen sich im Membranpolymer und treten auf der Membranrückseite aus. Dort verdampfen die BEHP Moleküle jedoch nicht. BEHP akkumuliert in der keramischen Unterstruktur. Die Komponenten Styrol und Styroloxid diffundieren unter der Wirkung des angelegten Unterdruckes durch die BEHP Phase in der Unterstruktur zur permeatseitigen Membranoberfläche, wobei diese Diffusion bei der 40 nm Membran infolge des höheren Impulsaustausches mit der Membranoberfläche langsamer vonstatten geht.

Der Gesamtfluss einschließlich des Partialflusses kann durch Temperaturerhöhung – hier 50°C – deutlich gesteigert werden (Abbildung 38 und 39). Bei gleichzeitiger Druckerhöhung über 2 bar hinaus, werden Gesamtflüsse von etwa 550 g / m²h und circa 45% höhere Partialflüsse erwartet. Die Biologie kann jedoch nicht bei Temperaturen über 30°C betrieben werden. Eine Produktisolierung bei erhöhten Temperaturen bedarf eines neuen Prozesskonzeptes, das mit der aufgebauten Downstream-Processing Laboranlage nicht zu realisieren war.

Die Flussleistungen mittels Pervaporation und bei gegebener Membranfläche ($A = 0.06 \text{ m}^2$ pro Membranmodul) reichen für eine prozessintegrierte Produktisolierung bei gegebenen Produktivitäten von etwa 5-10 g Styroloxid $L_{\text{tot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nicht aus. Für die Produktisolierung mit einer mit PDMS beschichteten Membran bei 30°C und etwa 4 bar transmembraner Druckdifferenz wäre bei einem Arbeitsvolumen von 2.4 l im Reaktor eine Membranfläche zwischen 1.2 m² und 2.4 m² erforderlich. Dafür hätten zwischen 20 und 40 Membranmodule mit 0.06 m² in der Downstream Processing Anlage installiert werden müssen. Konzeptuell ist eine Installation so vieler Membranmodule in die Laboranlage nicht vernünftig. Technisch wäre es darüber hinaus auch nicht möglich gewesen. Eine oder zwei 1 m² Module können in der aufgebauten Downstream Processing Laboranlage ebenfalls nicht betrieben werden. Mit den erhaltenen Flussleistungen kommt es beim Einsatz der Membranmodule mit 0.06 m² Membranfläche zu einer Aufkonzentration des Produktes im Fermenter, und somit zu einer Inhibition des Bioprozesses. Höhere Flussleistungen werden in Zukunft über eine Optimierung der Membranbeschichtung und -unterstruktur sowie über eine Erhöhung der Membranfläche angestrebt.

4.8 Evaluation der überkritischen Fluidtechnologie für die Produktaufreinigung

Die KD-Pharma GmbH beschäftigt sich seit mehr als zehn Jahren mit überkritischen Fluiden für Stofftrennprozesse. Innerhalb des Projektes hat die KD-Pharma im semipräparativen Maßstab Trennungen von Styrol, Styroloxid und BEHP mittels überkritischer Fluidtechnologie charakterisiert.

Ziel der Evaluation war es, ob mit der überkritischen Fluidtechnologie die am Prozess beteiligten Substanzen voneinander separiert werden können. Die Technologie mit überkritischen Fluiden bietet die Möglichkeit ein umweltschonendes Verfahren einsetzen zu können. Durch die Verwendung von CO₂ als Lösemittel im überkritischen Zustand entfallen giftige und umweltschädliche Lösemittelströme. Ebenso ist zur Gewinnung der Produkte kein energetisch aufwendiger Destillationsschritt notwendig, da nach der Trennung das CO₂ durch Entspannung in die Gasphase übertritt und die Produkte in ihren Fraktionen flüssig zurückbleiben. Daraus resultiert, dass das CO₂ im geschlossenen Kreislauf durch wiederholtes Verdichten und Entspannen einfach zu recyceln ist. Bei üblichen flüssigen Löse- oder Extraktionsmitteln ist ein größerer Reinigungsaufwand - meist destillativ - notwendig. Nach der Evaluierung der Trennmöglichkeiten der Substanzen, soll abgeschätzt werden, ob ein „Upscaling“ in den präparativen Maßstab sinnvoll und möglich ist (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4. Abstufung von Extraktionsprozessen mit überkritischen Fluiden.

Maßstab	Säulen- durchmesser	Packungsmaterial bezogen auf Standardsäulenlänge 250 mm	Produktmengen
Labor- maßstab	4...10 mm	3...14 g	von µg bis einige mg
semi- präparativ	25...45 mm	70...270 g	einige mg bis einige g
Pilot- maßstab	bis 80 mm	bis 900 g	einige 100 g bis einige 100 kg
Produktions- maßstab	bis 150 mm	bis 3000 g	einige 100 kg bis zu einigen Tonnen.

4.8.1 Überkritische Fluide - Merkmale

Kritischer Druck ($p_{\text{krit.}}$) und kritische Temperatur ($T_{\text{krit.}}$) einer Substanz bestimmen eindeutig den kritischen Punkt ($P_{\text{krit.}}$). Überschreitet eine Substanz $p_{\text{krit.}}$ und $T_{\text{krit.}}$, wird sie als „überkritisches“ Fluid bezeichnet. Das Verschwinden jeglicher Phasengrenzflächen identifiziert phänomenologisch den Übergang ins überkritische Stadium. Theoretisch kann jede Substanz in den überkritischen Zustand überführt werden. Ob dies technisch realisierbar und für eine Anwendung sinnvoll ist, hängt von der Lage des kritischen Punktes ab¹. Tabelle 5 enthält einige Substanzen, die im überkritischen Zustand derzeit als Lösemittel in der Prozesstechnik eine Anwendung finden.

Tabelle 5. Kritische Punkte einiger Stoffe für die überkritische Fluidtechnologie.

Stoff	Summenformel	Kritische Temperatur, $T_{\text{krit.}}$ [°C]	Kritischer Druck, $p_{\text{krit.}}$ [bar]
n-Pentan	C_5H_{12}	196,6	33,7
Schwefelhexafluorid	SF_6	45,6	37,6
Propan	C_3H_8	96,8	42,5
Trifluormethan	CHF_3	26,2	48,6
Xenon	Xe	16,6	58,4
Kohlendioxid	CO_2	31	73,8
Ammoniak	NH_3	132,5	113,5

Von den aufgeführten Stoffen wird das Kohlendioxid am weitesten häufigsten eingesetzt, da es die folgenden Eigenschaften aufweist:

- moderater kritischer Punkt
- toxikologisch unbedenklich
- unbrennbar
- nicht explosiv

¹ Im allgemeinen nimmt die kritische Temperatur mit dem Molekulargewicht, mit der Polarität oder den intramolekularen Wasserstoffbindungen zu.

- umweltschonend
- chemisch inert
- in großen Mengen zu niedrigen Preisen verfügbar
- Lebensmittelzulassung

Aus den Eigenschaften des Kohlendioxid ergeben sich für einen großtechnischen Einsatz im Vergleich zu üblichen Lösemittel einer flüssig-flüssig Extraktion oder eines chromatographischen Trennschrittes deutlich geringere Expositionsgefahren, was das Potenzial der Umweltgefährdung erheblich reduziert.

Die dynamischen Viskositäten überkritischer Fluide sind klein und mit den Viskositäten von Gasen vergleichbar. Die Diffusionskoeffizienten gelöster Stoffe in überkritischen Fluiden liegen größenordnungsmäßig zwischen denen in Flüssigkeiten und denen in Gasen (Tabelle 6). Dies bedeutet, dass überkritische Fluide trotz ihrer flüssigkeitsähnlichen Dichte eine gasähnliche Viskosität aufweisen und im Vergleich zu Flüssigkeiten höhere Diffusionskoeffizienten erlauben. Daraus resultiert eine Erhöhung des lösemittelseitigen Stoffübergangs bei Prozessen in überkritischen Fluiden, was sich z.B. speziell bei der Hochdruckextraktion in hohen Bodenzahlen niederschlägt. Der flüssigkeitsseitige Stoffübergang wird ebenfalls erhöht, da das überkritische Fluid die Viskosität von flüssigen, hochmolekularen Stoffen herabsetzt. Die Oberflächenspannung überkritischer Fluide ist praktisch Null. Das vereinfacht die Penetration in mikroporöse Strukturen.

Tabelle 6. Vergleich der physikalischen Eigenschaften von Gasen, Flüssigkeiten und überkritischen Fluiden.

	Gas	SF	SF (4*P _{krit.})	Flüssigkeit
Dichte [kg/m ³]	0,6-2	200-500	400-900	600-1600
Dyn. Viskosität [Pa s]	(1-3) · 10 ⁻⁵	(1-3) · 10 ⁻⁵	(3-9) · 10 ⁻⁵	(0,2-3) · 10 ⁻³
Diffusionskoeffizient [m ² /s]	(1-4) · 10 ⁻⁵	7 · 10 ⁻⁸	2 · 10 ⁻⁸	(0,2-2) · 10 ⁻⁹

Die Verwendung überkritischer Fluide als Lösemittel hat den Vorteil, dass die Dichte über die Wahl des Druckes und der Temperatur in einem weiten Bereich kontinuierlich variiert werden kann, wohingegen Flüssigkeiten bei niedrigen Temperaturen als inkompressibel betrachtet werden. Über die Dichte des

überkritischen Fluids werden dessen Dielektrizitätskonstante und dessen Lösefähigkeit beeinflusst, sodass das Fluid die Eigenschaft verschiedene Stoffe zu lösen gewinnt oder verliert.

4.8.2 Supercritical Fluid Extraction (SFE) und Chromatography (SFC)

4.8.2.1 SFE

Die superkritische Fluidextraktion (SFE) unterscheidet sich von gängigen Extraktionsprozessen in Füllkörperkolonnen hauptsächlich durch den Einsatz der hochkomprimierten Gase und der angepassten Hochdruck-Apparatetechnik. Der Trennprozess selbst besteht aus zwei Teilschritten, einer Trennstufe und einer Regenerationsstufe. In der Trennstufe erfolgt ein intensiver Stoffaustausch, der meist mit Füllkörpermaterialien unterstützt wird. In der Regenerationsstufe wird das überkritische Fluid entspannt, wobei die gelösten Fraktionen dann flüssig ausfallen. Ein thermischer Reinigungsschritt entfällt an dieser Stelle (Abbildung 40). Die Betriebsweise dieses Trennverfahrens ist meist kontinuierlich.

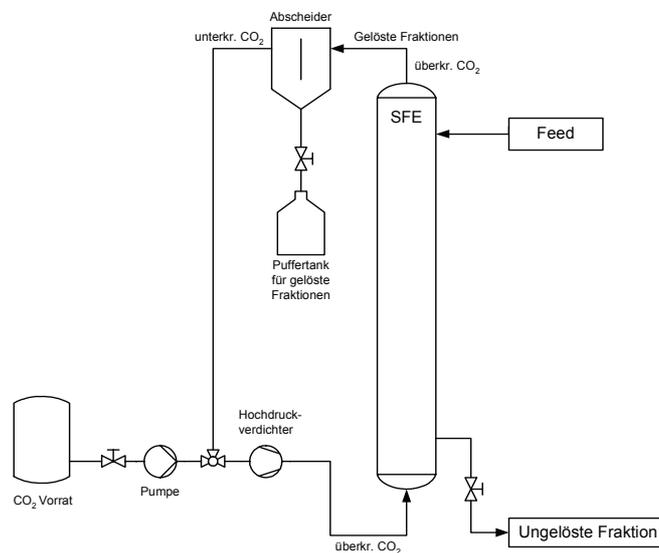


Abbildung 40. Prinzip der Gegenstrom-Hochdruckextraktion mit überkritischem CO₂.

4.8.2.2 SFC

Die Chromatographie mit überkritischen Fluiden (SFC) nutzt anstelle von Gasen oder organischen Lösungsmitteln überkritische Fluide als mobile Phase. Die SFC bildet

eine Ergänzung zu den üblichen chromatographischen Trennprozessen wie HPLC oder GC, bzw. nimmt eine Zwischenstellung zwischen diesen Verfahren und der SFE ein. Das zeigt sich im Bereich der stationären Phasen, die für die Chromatographie mit überkritischen Fluiden eingesetzt werden. In der SFC ist sowohl die Verwendung von gepackten Säulen, ähnlich denen in der HPLC, als auch der Einsatz von Kapillarsäulen, wie sie in der Gaschromatographie bekannt sind, üblich.

Für gepackte Säulen spricht deren im Vergleich zu den Kapillarsäulen größere chemische Vielfalt und die damit verbundenen große Auswahl an verschiedenen Säulen sowie deren Probenbelastbarkeit, die auch präparative Trennungen ermöglicht.

Die absoluten Bodenzahlen bei der SFC sind durch die Länge der Trennsäule begrenzt, die wegen des Druckabfalls über die Säule nicht beliebig erhöht werden kann. Der Druckabfall in der Säule spielt eine Schlüsselrolle in der SFC. Am Säulenausgang darf dieser einen bestimmten Wert nicht unterschreiten, da für eine Säule bei gegebener Temperatur und gegebenem Vordruck ein Maximum für den erlaubten Druckverlust existiert.

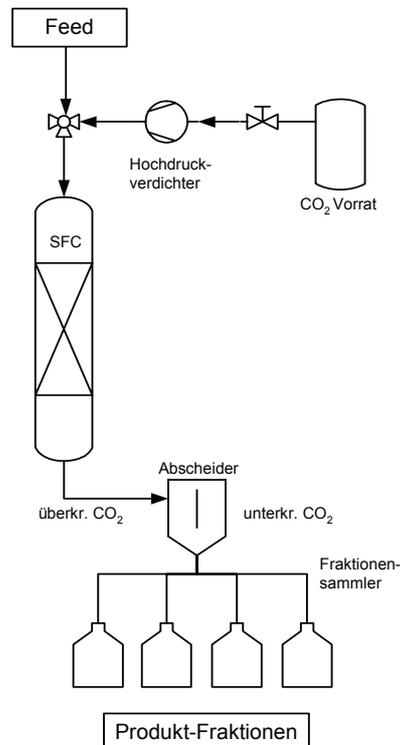


Abbildung 41. Prinzip der Hochdruckchromatographie mit überkritischen CO₂ als mobiler Phase.

Der apparative Aufbau einer SFC-Anlage mit gepackten Säulen entspricht weitestgehend dem einer HPLC-Anlage. Der Betrieb erfolgt abschnittsweise (Abbildung 41). Apparatetechnisch kann der Kreislauf des CO₂ auch geschlossen werden, wodurch lediglich Verluste des CO₂ ergänzt werden müssen.

4.8.2.3 *Verwendete Methode*

Zur Verifizierung der Löslichkeit von Stoffen in überkritischem CO₂ ist sowohl die SFE (**S**upercritical **F**luid **E**xtraction) als auch die SFC (**S**upercritical **F**luid **C**hromatography) geeignet. Hier wurde eine semipräparative SFC-Apparatur verwendet, deren prinzipieller Aufbau in Abbildung 42 dargestellt ist.

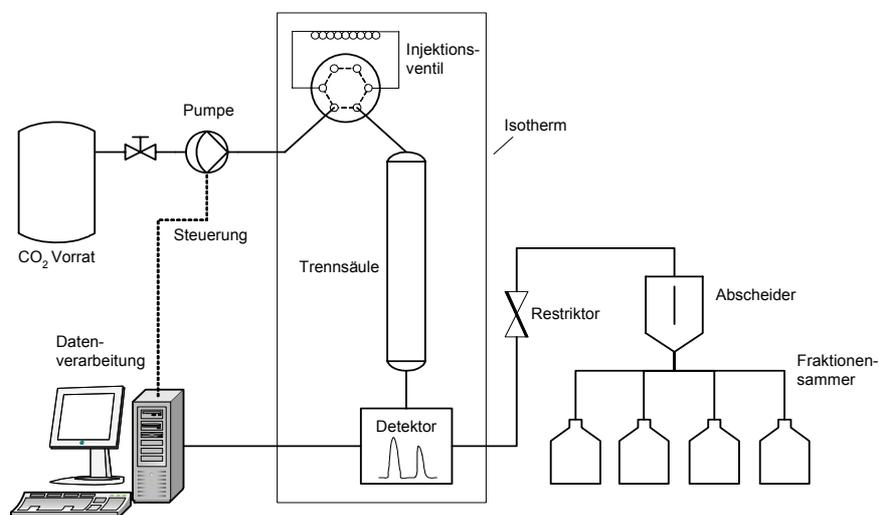


Abbildung 42. Schematischer Aufbau einer semipräparativen SFC-Apparatur.

Der Aufbau entspricht weitestgehend dem einer HPLC-Apparatur. Für die hier durchgeführten Löslichkeitsversuche wurde eine solche SFC-Apparatur dahingehend modifiziert, dass keine chromatographische Trennsäule verwendet wurde. Stattdessen kam eine inerte Mischsäule (250 x 4,6 mm, Seesand) zum Einsatz, die sicherstellen sollte, dass das in der Probenaufgabe enthaltene Probevolumen mit dem Eluent homogen durchmischt wird. Dies war notwendig, da ansonsten die Gefahr bestand, dass die Probe als Pfropf durch die Säule geschoben wird, ohne mit dem Eluent vermischt zu werden. Auf solchen Phänomenen beruht die FIA (Fließ-Injektions-Analyse).

4.8.3 Ergebnisse

4.8.3.1 Ergebnisse der SFE

Als experimentelle Parameter wurden folgende 4 Druck-Temperatur-Paare untersucht: 50°C / 80 bar, 50°C / 150 bar, 50°C / 180 bar und 90 °C / 80 bar. Der Druck entspricht jeweils dem Druck am Auslass.

Dabei sollte sich, falls sich eine Veränderung der Löslichkeit mit der Variation der Lösemittelstärke zeigt, die Peakfläche im Chromatogramm verändern. Falls überhaupt keine Löslichkeit vorliegt, würde das Signal im Detektor vollständig ausbleiben. Tabelle 7 zeigt die gemittelten Ergebnisse der Peakflächen für Styrol und Styroloxid bei den vier verschiedenen Versuchsbedingungen.

Tabelle 7. Peakflächen bei Druck- und Temperaturvariation.

Bedingungen	Styrol	Styroloxid
50°C / 80bar	158,5 ± 11	137 ± 44
50°C / 150bar	153 ± 14	121 ± 10
50°C / 180bar	164 ± 9	115 ± 11
90°C / 80bar	159 ± 25	126 ± 9

Wie aus den Werten abgeleitet werden kann, ergibt sich weder für Styrol, noch für Styroloxid bei der Veränderung von Druck und Temperatur eine signifikante Änderung der Löslichkeit. Weder die Erhöhung des Drucks, die mit einer Steigerung der Lösemittelstärke einhergeht, noch die Erhöhung der Temperatur bewirken eine Veränderung der Löslichkeit der beiden Substanzen. Eine Trennung der beiden Substanzen von einander ist demnach mit Hilfe der SFE nicht möglich.

Im Gegensatz zu Styrol und Styroloxid war BEHP unter den gewählten Bedingungen nicht in überkritischem CO₂ löslich, was eine Isolierung von Styrol und Styroloxid mittels SFE wie auch SFC aus BEHP bzw. der Wasser / BEHP-Emulsion prinzipiell ermöglicht.

Mittels SFC sollte jedoch auch eine Trennung von Styrol und Styroloxid möglich sein. Hier kommt zur Selektivität des überkritischen Fluids, die man mit Hilfe von Temperatur und Druck steuern kann, die Selektivität der stationären Phase einer chromatographischen Säule hinzu.

4.8.3.2 Ergebnisse der SFC

Für die Trennung von Gemischen aus Styrol und Styroloxid mittels SFC wurde die Hochdrucksäule der semipräparativen SFC-Apparatur mit verschiedenen stationären Phasen betrieben. Die Eignung der stationären Phase zur Trennung im präparativen Maßstab erfolgt anhand der Kriterien Selektivität, Retentionsunterschiede und Beladbarkeit. Abbildung 43 zeigt das Ergebnis der Untersuchungen. Die Diol-Säule (Diol-derivatisiertes Kieselgel) erfüllt die genannten Kriterien am besten und bietet daher die Möglichkeit, das Styrol-Styroloxid Gemisch präparativ zu trennen.

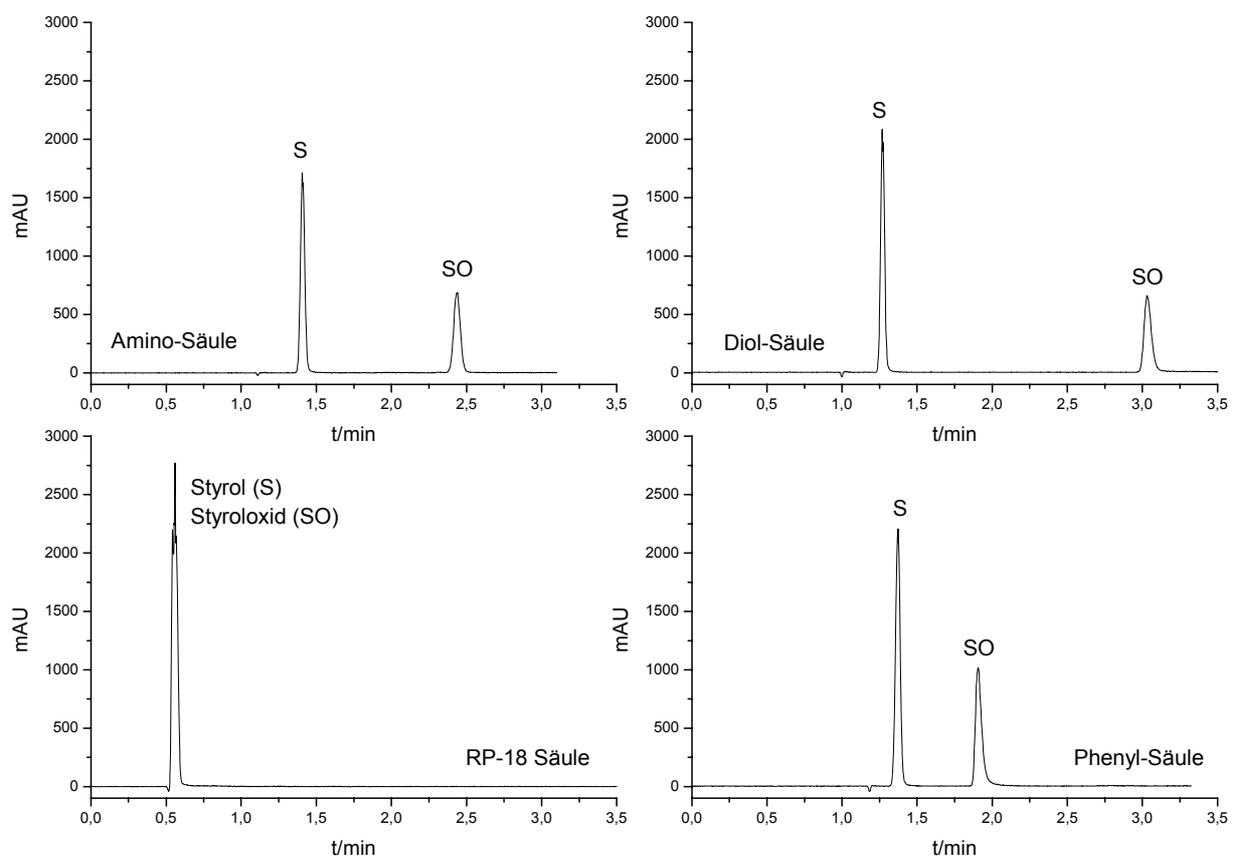


Abbildung 43. SFC-Analytik von Styrol und Styroloxid auf verschiedenen kieselgelbasierten Phasen.

Zu Stoffmengen, Massen- und Energiebilanzen können hier noch keine Aussagen getroffen werden. Hierzu muss eine präparative Anlage aufgebaut und gefahren werden, was ein Ziel des nachfolgenden Kooperationsprojektes darstellt.

4.8.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Styrol und Styroloxid mit der hier verwendeten SFE Technologie von der BEHP/Wasser-Emulsion hochselektiv getrennt werden kann. Für das Gemisch aus Styrol und Styroloxid wurde mit der hier verwendeten SFE keine weitere Trennung erzielt. Untersuchungen im analytischen Maßstab haben gezeigt, dass eine Isolierung dieser Substanzen mit Hilfe einer so genannten counter current-SFC (cc-SFC) möglich ist. Hier kommt zu der Selektivität des Lösemittels, die man mit Hilfe von Temperatur und Druck steuern kann, die Selektivität der stationären Phase hinzu. Die Eruierung dazu (Trennung von Styrol und Styroloxid) zeigte, dass mit einer auf kieselgelbasierenden stationären Phase eine Trennung des Gemisches im präparativen Maßstab möglich ist. Demnach ist zur Abtrennung von Styroloxid aus dem Reaktionsgemisch eine Kombination beider Trennverfahren sinnvoll.

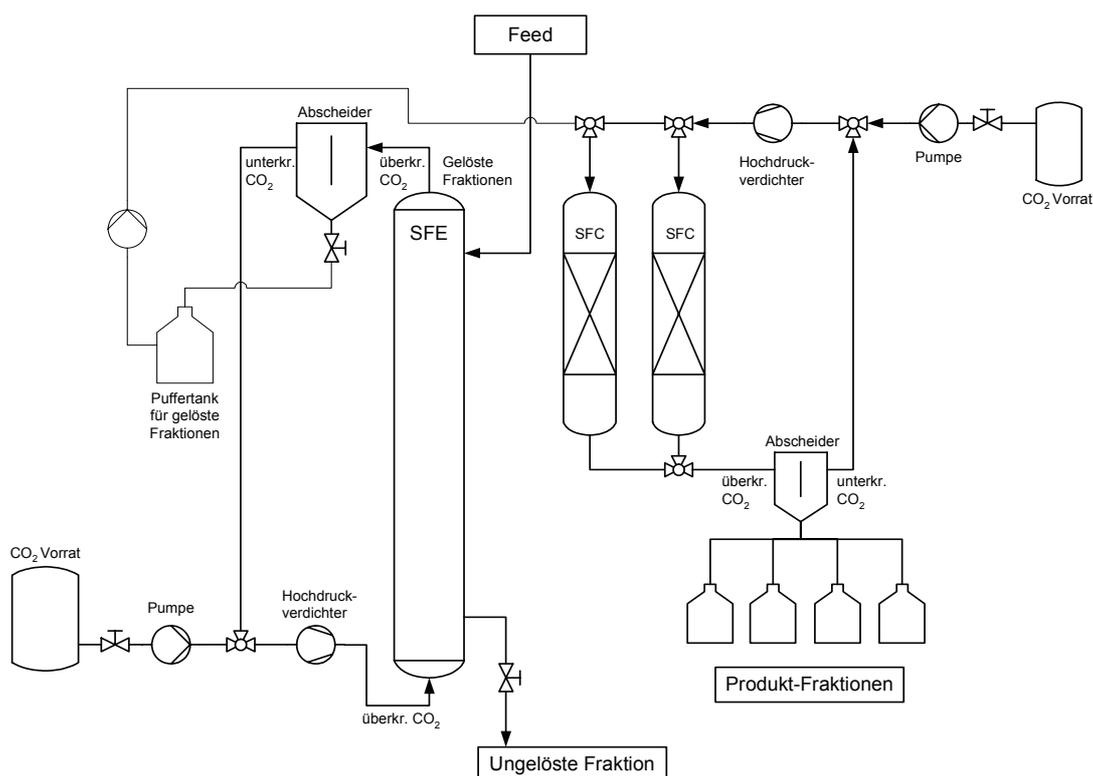


Abbildung 44. Vorschlag für das Design einer (halb)kontinuierlichen SFE/SFC Pilotanlage zur Isolierung von Styroloxid, Styrol und weiteren Intermediaten aus der Wasser / BEHP Emulsion.

Diese Kombination aus beiden Trennverfahren – SFE / SFC – in einem einzigen Prozess zeigt Abbildung 44. In der SFE Trennstufe werden die apolaren Substanzen – Styrol und Styroloxid - aus der BEHP / Wasser Emulsion isoliert und anschließend

in der SFC Trennstufe weiter aufgereinigt. Für die Kombination aus SFC und SFE besitzt die KD-Pharma ein Patent (EP 0712651).

Die KD-Pharma verfügt über eine solche Technologie im Pilot-Maßstab. Für weitere Versuchszwecke ist es jedoch sinnvoll, eine kleinere präparative Anlage gemeinsam mit dem Partner upt zu bauen. Mit bereits vorhandenem Material aus einer semipräparativen SFC-Anlage und Material im Wert von ca. 25.000 € ist eine solche Anlage zu realisieren und könnte für diesen Zweck ideal eingesetzt werden. Mit dieser Scale-up Anlage können dann präzise Daten zu Stoffmengen, Massen- und Energiebilanzen eruiert werden. Investitionskosten für kommerzielle Apparate liegen in der Größenordnung zwischen 150.000-300.000,- €.

5 Diskussion

5.1 *Wirtschaftlichkeits- und Umweltbetrachtungen*

Biotransformationen basierend auf Oxygenasen/Hydroxylasen wurden bisher sehr selten auf industriellem Maßstab etabliert. Bekannte Beispiele im Maßstab 1 bis 150 to/Jahr sind HPOPS, BASF (D), Simvastatin (Merck SD, USA), div. Epoxyalkane (Japan Energy, JP), Hydroxyprolin (Kyowa Hakko Kogyo, JP) und die Produktpalette hydroxylierter N-Heteroaromaten der Lonza AG (CH). Selbst diese kommerzialisierten Prozesse zeigen niedrige Produktivitäten und Produktkonzentrationen. Ökonomische industrielle Anwendungen basieren auf Produktivitäten von 1–10 g L⁻¹h⁻¹ bei Produktkonzentrationen von 5–10 % [11]. Hier wurden im „repeated-fed-batch“-Verfahren, bezogen auf die wässrige Phase, durchschnittliche Produktivitäten um 10.6 g L_{aq}⁻¹ h⁻¹ oder 5.3 g L_{tot}⁻¹ h⁻¹ und, bezogen auf die organische Phase, Produktkonzentrationen bis zu 7.6 % erreicht. Dies veranschaulicht die industrielle Eignung der biokatalytischen Oxyfunktionalisierung. Der biologische Prozess ist dem auf dem Jacobsen-Katalysator basierenden chemischen Prozess speziell bezüglich Enantioselektivität überlegen. Um 86% e.e. zu erreichen ist im chemischen Prozess eine Umkristallisation notwendig, während im biologischen Prozess direkt über 99% ee erreicht werden. Die integrierte Produktisolierung mittels einer Pertraktion aus dem Reaktionsgemisch in einem (halb)kontinuierlichen Verfahren sollte zu einer signifikanten Erhöhung der Produkt/Substrat-Ausbeute und Reduzierung der Abfallmengen durch

Kreislaufschließung der Prozesslösungen führen. Dieser integrierte ISPR-Ansatz (In Situ Product Removal) reduziert laufende Prozesskosten, wodurch das Verfahren wirtschaftlich betrieben werden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden allgemein die Entwicklung neuartiger Bioprozesse ermöglichen, deren Produktivität (und damit Wirtschaftlichkeit) hoch genug ist, um herkömmliche Prozesse der Petrochemie für die Funktionalisierung von Kohlenwasserstoffen durch kostengünstige und umweltfreundliche biotechnologische Alternativen zu ersetzen.

Im Nachfolgeprojekt (AZ 13145) sollen nun von unabhängiger Seite wie auch von der BASF detaillierte Ökoeffizienzstudien durchgeführt werden.

5.1.1 Stellungnahme der BASF bezüglich biokatalytischer Epoxidierung und der geplanten detaillierten Ökoeffizienzstudie

Die Optimierung von Produktionsverfahren in der Chemie ist in der heutigen Zeit nicht nur vor dem Hintergrund der rein wirtschaftlichen Interessen der Unternehmen zu sehen, sondern es wird verstärkt Wert auf „Sustainable Development“ und auf „Responsible Care“ und somit auf Nachhaltigkeit, gelegt. Eine auf solche Ziele ausgerichtete Prozess- und Produktentwicklung setzt einerseits auf neuartige Synthesewege, neue Katalysatoren und andererseits auf innovative Technologien und innovative Methoden zu deren Bewertung.

Im abgeschlossenen Projekt wie auch im Nachfolgeprojekt (AZ 13145) soll die Nachhaltigkeit neuer Synthesen im Bereich der enantioselektiven Epoxidierung von Styrol und anderen Precursoren unter Einbau von Molekularem Sauerstoff untersucht werden. Laborsynthesen mit diesen Systemen und technisch durchgeführte Epoxidierungsreaktionen an Aromaten und Heteroaromaten können durch unselektive Reaktionen zur Bildung von unerwünschten Nebenprodukten und Abfällen beitragen. Daher ist der Innovationsbedarf zur Verbesserung dieser Synthesen besonders groß. Dieser Innovationsbedarf wird für die westeuropäische Chemie verstärkt durch zunehmende Konkurrenzprodukte und -verfahren aus asiatischen Schwellenländern, die allerdings mit anderen Kostenstrukturen unter geringeren Umweltschutzauflagen arbeiten.

Die Unterstützung der Forschungsaktivitäten mit einer etablierten und auf Nachhaltigkeitskriterien ausgerichteten Bewertungsmethode, kann wertvolle

Hinweise zur zielgerichteten, effektiven und effizienten Synthesebearbeitung liefern. Dadurch können Forschungsressourcen besser eingesetzt und die Ergebnisse ständig hinsichtlich ihrer Nachhaltigkeit geprüft werden, Fehlentwicklungen werden zurückgedrängt, Forschungsziele u.U. schneller erreicht und im technischen Maßstab realisiert. Mit dem zunehmenden Informationsfluss bei der weiteren Synthesebearbeitung kann auch das Analyseergebnis forschungsbegleitend verfeinert werden. Frühere Projekte z.B. in Zusammenarbeit mit EuropaBio haben gezeigt, dass beim Wechsel von chemischen zu biotechnologischen Synthesen deutliche Verbesserungen hinsichtlich der mit diesen Verfahren verbundenen Umweltbelastungen erzielt werden können. So konnten z.B. Reduktionen bei der Verwendung von Ressourcen von über 25 % realisiert werden bei gleichzeitiger Absenkung der Produktionskosten von mehr als 40 %. Diese Reduktionen schlugen sich dann in einer deutlich verbesserten Ökoeffizienz der neu entwickelten Verfahren nieder. Verbesserungen in ähnlicher Größenordnung sind prinzipiell auch für die neuen Epoxidierungsverfahren denkbar, müssen aber immer im Einzelfall überprüft und berechnet werden.

Die Ökoeffizienz-Analyse der BASF ist ein strategisches Bewertungsinstrument zur Ermittlung der Nachhaltigkeit von Produkten und Prozessen. Sämtliche ökonomischen und ökologischen Auswirkungen werden aus Sicht des Endkunden ermittelt. Somit wird der gesamte Lebensweg des Produkts von der Wiege bis zur Bahre betrachtet, beginnend mit der Entnahme der Rohstoffe aus der Erde bis zur Verwertung nach dem Gebrauch. Prozessstufen, welche der eigenen Produktion vor- oder nachgelagert sind, werden gleichrangig mit den unternehmensinternen Prozessen analysiert. Die Ökoeffizienz-Analyse identifiziert Vor- und Nachteile einzelner Alternativen, die alle denselben Kundennutzen erfüllen.

Die ökologischen Kennzahlen werden mittels einer Ökobilanz nach DIN/ISO 14 040 ff ermittelt und in spezifische Wirkkategorien überführt. Die Ergebnisse werden den einzelnen Kriterien Energieverbrauch, Stoffverbrauch, Emissionen, Toxizitätspotenzial, Landnutzung und Risikopotenzial zugeordnet.

Nach der Abbildung von Einzeldaten für die jeweiligen Umweltkriterien wird die Position jeder Alternativen gegeneinander im Ökologie-Fingerprint aufgetragen.

Bei der Kostenberechnung bedient man sich betriebswirtschaftlicher und volkswirtschaftlicher Modelle. Auch Abschreibungen, Lagerhaltung,

Entsorgungskosten etc. gehen in die ganzheitliche, lebenswegbezogene Kostenbilanzierung ein.

Nachdem sowohl ökologische als auch ökonomische Kennzahlen erarbeitet worden sind, kann man die Positionen der Alternativen auf der Umweltbewertungssachse mit denen der Gesamtkostenachse zusammenführen. Im daraus resultierenden Ökoeffizienz-Portfolio werden beide Achsen gemeinsam abgebildet und anschaulich dargestellt. Es ergibt sich ein 4-Quadranten-System. Produkte, die sich im rechten oberen Quadranten befinden, haben gleichzeitig eine niedrige Umweltbewertung und niedrige Kosten. Diese Produkte oder Systeme werden als ökoeffizient bezeichnet. Neben der Ist-Aufnahme werden zusätzlich Szenarien berechnet, um die aus der Ökoeffizienz-Analyse resultierenden Entscheidungen auf ihre Zukunftsfähigkeit hin zu überprüfen. Dabei können ganz unterschiedliche Synthesewege gegen einander verglichen werden mit dem Ziel, wichtige Stellgrößen des Systems zu erkennen und zu optimieren.

In früheren Arbeiten wurden bereits Forschungssynthesen bilanziert und bewertet. Die Nützlichkeit derartiger Bewertungen wurde u.a. im BMBF-Projekt „Nachhaltige Aromatenchemie“ unter Beweis gestellt. Dabei wurde auch die SEEbalance® entwickelt. Die SEEbalance® ist ein Instrument das neben den ökologischen und ökonomischen Belastungen auch die sozialen Aspekte eines Produktes oder Verfahrens analysiert.

Inzwischen wurden über 250 Ökoeffizienz-Analysen für unterschiedlichste Produkte und Anwendungen erfolgreich durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass in den Bereichen Forschung und Entwicklung, Marketing, Politikberatung und Strategieplanung wertvolle Hinweise gewonnen werden können, um Produkte und Verfahren nachhaltiger gestalten zu können.

5.2 Soll-/Ist-Vergleich – Begründung für Abweichungen

Tabelle 8 zeigt für die verschiedenen Partner grob welche Ziele erreicht wurden. In den Bereichen Biokatalysatorcharakterisierung und Prozessentwicklung/optimierung wurden große Fortschritte erzielt. Die Produktivität konnte von 1 auf 5.3 g/L_{tot}/h und die Produktkonzentration in der organischen Phase von 300 auf 600 mM gesteigert werden. Zudem wurde ein für die integrierte Prozessführung geeignetes repeated fed-batch Verfahren entwickelt. Als Hauptlimitationen wurden Produkttoxizität und

NADH-Limitation gefunden. Neben der Untersuchung des Kohlenstoff- und NADH-Metabolismus über kontinuierliche Kultivation wird in Dortmund auch eine ^{13}C -Flussanalyse für wachsende Zellen vorbereitet. Diese wird durch einen neu bestellten triple-quadrupole-GC-MS-MS und die vorhandenen Metabolismusmodelle (Dr. Lars Blank) in Dortmund möglich werden.

Nach intensiver Membran- und Modulentwicklung stehen nun u.a. keramische Hohlfasermembranen mit unterschiedlichen Porenweiten (20 nm bis 1400 nm) und dampfsterilisierbare Module aus Edelstahl mit austauschbaren Membranelementen (Fläche 0.05 m² bis 5 m²) zur Verfügung. Zudem wurde ein vielseitig verwendbarer Laborversuchsstand aufgebaut. Die Begasungseffizienz konnte mittels Keramikmembranen bis um das 13-Fache gesteigert werden. Der zeitliche Aufwand für die Entwicklung der Membranen und Membranmodule war größer als zu Projektbeginn angenommen. Dies führte zu einer zeitlichen Verzögerung der Stofftransportuntersuchungen. Solche Untersuchungen bei verschiedenen Bedingungen ergaben, dass vor allem die mit Pertraktion aber auch die mit Pervaporation erreichten Produktextraktionsraten zu niedrig waren, um die Verfahren erfolgreich an die Biotransformation zu koppeln. Eine erfolgreiche Kopplung wird nun im Nachfolgeprojekt (AZ 13145) über verschiedene Strategien zur Optimierung der Membrantrennverfahren angestrebt. Es wurde entschieden sich in Zukunft intensiver auf die Pervaporation zu konzentrieren. Hier bieten vor allem Supportunterstruktur und Beschichtung der Membranen sowie eine Vergrößerung der Membranfläche großes Optimierungspotential. Die Pertraktion wird parallel weiterverfolgt. Alternative Extraktionsmittel verbunden mit der Optimierung des Membransupports sollten hier zu deutlichen Flussteigerungen führen.

Trennversuche mit überkritischem CO₂ zeigten, dass Styrol und Styroloxid problemlos aus BEHP sowie der Emulsion extrahiert werden können. Untersuchungen zur Produktivität des Biokatalysators in direktem Kontakt mit scCO₂ sind nicht sinnvoll, da dieses auf rekombinante *E. coli* toxisch wirkt. Deshalb wurde von KD-Pharma die Isolation von Styrol und Styroloxid aus BEHP (nach Membranextraktion) sowie die Styrol/Styroloxidtrennung mittels SFC evaluiert. Die erreichten positiven Resultate führten dazu, dass im Nachfolgeprojekt eine Kombination aus SFE und SFC als letzter Schritt des Down-stream-processing angestrebt wird.

Tabelle 8. Arbeitsprogramm und Meilensteine – Soll-/Ist-Vergleich.

Partner	Aufgaben	1. HJ	2. HJ	3. HJ	4. HJ
ETH Zürich Uni-Do	Expressionssystem; Analyse C-Flux und NADH	XX	XX		
	Metabolismus (für <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i>)	✓	✓		
	Katalysator-Engineering (<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i>)	XX	XX		
		✓	✓		
	Prozessentwicklung (mit upt) (semi/ kontinuierlich)		XX	XX	XX
		✓	✓	✓	✓
	Reaktionstechnische Optimierung & Scale-up (mit upt)			XX	XX
				○	○
upt GmbH FuMA-Tech	Pertraktions-Setup, Beständigkeits- untersuchungen, Materialauswahl	XX			
		✓			
	Membrancharakterisierung		XX	XX	
			✓	✓	
	Modulkonstruktion, Optimierung und Bereitstellung		XX	XX	XX
			✓	✓	✓
	Stofftransportuntersuchungen mit synthetischen Medien		XX	XX	
				✓	✓
	realer Prozess Zusammen mit Uni-Do			XX	XX
				○	○
BASF	Beratung industrielle Machbarkeit		XX	XX	XX
			✓	✓	✓
	Prozessevaluierung (Technikum BASF & Bilanz)			XX	XX
				✓	✓
KD-Pharma	Extraktion von Styroloxid aus Emulsionen mit superkritischem CO ₂ (mit upt und Uni-Do)	XX	XX		
		✓	✓		
	Produktivität des Biokatalysators in Kontakt mit SC CO ₂ (mit Uni-Do).			XX	XX
				--	--
	Alternative: Untersuchungen zur Trennung von Styrol und Styroloxid mittels SFC			XX	XX
				✓	✓

X Vorgabe aus Zeitplan Projektantrag **○** Aktuell bearbeitete Aufgabe
✓ Erledigte Aufgabe **--** Nicht in Angriff genommen

5.3 Kooperation innerhalb des Projekts

Im Rahmen des Projektes besuchten Herr Dr. Schlichter und Herr M.Sc. Mohrdieck unabhängig voneinander die Arbeitsgruppe Prof. Schmid zum Erfahrungsaustausch. An der ETH Zürich wurden gemeinsam auf Fed-Bach-Kultivierung basierende Biotransformationen durchgeführt, damit sich die Verfahrensentwickler der upt GmbH ein Bild vom bisherigen Prozess machen konnten. Die gesammelten Erfahrungen flossen vor allem in die Planung der Laboranlage wie auch in die Membran- und Modulentwicklung mit ein. Zu Begasung und Produktextraktion über keramische Membranen fanden im letzten Halbjahr in Dortmund gemeinsame Experimente statt. Dafür reiste Herr Mohrdieck mehrmals für mehrere Tage nach Dortmund. Für diese Untersuchungen im Hinblick auf eine biotische Anwendung wurde der DSP Teststand von der upt nach Dortmund gebracht und wurde dort für einige Wochen betrieben. In Dortmund erfolgte zudem unter Betreuung von Herrn Dr. Bühler mit dem DSP Teststand eine Masterarbeit eines Studenten der Universität Dortmund. Nach Abschluss der Untersuchungsphase wurde der DSP Teststand wieder nach Saarbrücken an die upt transferiert. Darüber hinaus stand die upt GmbH ständig in Kontakt mit den Partnern Fumatech hinsichtlich der Membran- und Modulentwicklung und mit dem Partner KD Pharma hinsichtlich der Möglichkeiten zur Produktextraktion bzw. Separation mittels überkritischem CO₂. Es wurden 3 Projekttreffen abgehalten, die am 7.8.03 in Vaihingen (FuMA-Tech GmbH), am 29.1.04 in Saarbrücken (upt GmbH) und am 15.6.04 in Zürich (ETH) stattfanden. Im Zusammenhang mit dem Statusseminar, dem Abschluss des Projektes und der Ausgestaltung des Nachfolgeprojektes fanden 2005 nochmals mehrere Treffen statt.

Die Zusammenarbeit zwischen den Partnern zeichnete sich durch große Interdisziplinarität aus, bei der jeder Kooperationspartner vom anderen in Denk- und Vorgehensweise hinzugelernt hat, was für die Bearbeitung weiterer FuE Vorhaben nützlich sein wird.

6 Öffentlichkeitsarbeit

Am 7.11.2005 wurde ein Artikel, der u.a. die innerhalb dieses Projektes generierten Toxizitätsdaten enthält, an die Zeitschrift „Applied and Environmental Microbiology“ geschickt (The Efficiency of Recombinant *Escherichia coli* as Biocatalyst for

Stereospecific Epoxidation; Jin Byung Park, Bruno Bühler, Tilo Habicher, Bernhard Hauer, Sven Panke, Bernard Witholt, and Andreas Schmid). Ein weiteres Manuskript, das die Untersuchung des Kohlenstoff- und NADH-Metabolismus katalytisch aktiver Zellen über kontinuierliche Kultivierung umfasst, ist in Arbeit (The Productivity of Biocatalytic Asymmetric Epoxidation is Affected by the NADH Regeneration Capacity in Recombinant *Escherichia coli*; Bruno Bühler, Jin Byung Park, Lars Blank, Bernard Witholt, and Andreas Schmid). Dieses soll zu „Biotechnology and Bioengineering“ geschickt werden. Bezüglich den Eigenschaften ruhender Zellen sowie der Begasung und Produktextraktion über keramische Membranen sind weitere Publikationen in Fachzeitschriften geplant. Die Ergebnisse aus der Membrancharakterisierung sollen beispielsweise im Journal of Membrane Science des Elsevier Verlag veröffentlicht werden. Das Journal of Membrane Science ist das weltweit anerkannteste Fachjournal der Membrantrenntechnik. Über limitierende Faktoren in der oxidativen Biokatalyse mit wachsenden wie auch ruhenden Zellen im Zweiphasensystem wurde am BioCatalysis Workshop in Manchester (Biocatalysis in non-conventional media; 13./14.4.05) von Bruno Bühler eine Präsentation gegeben (Whole-Cell Bio-oxidation in a Two-Liquid Phase System. What are the Limiting Factors? Bruno Bühler, Jin Byung Park, Adrie J. J. Straathof, and Andreas Schmid).

Die Entwicklung, Charakterisierung und Optimierung von Ganzzellkatalysatoren zur biokatalytischen Oxyfunktionalisierung für nachhaltige Anwendungen in der Chemieindustrie wird unter anderem in einem durch die DBU geförderten Nachfolgeprojekt (AZ 13145) weiter verfolgt. Parallel dazu wird im genannten DBU-Projekt auch die Entwicklung und Optimierung von keramischen Hohlfasermembranen weitergeführt. Derartige Membransysteme für die Bioprozesstechnik existieren noch nicht kommerziell, zeigen jedoch bei weiterer Optimierung sehr großes Potenzial als verlässliche Werkzeuge für das Downstream-Processing in der Weißen Biotechnologie. Im hier beschriebenen Projekt konnten entscheidende Fortschritte und Kenntnisse in der Membranentwicklung erzielt werden, die für eine zukünftige Kommerzialisierung der Membransysteme wichtig sind. Zukünftige Anwendungen der Biokatalysatoren wie auch der Membrantechnologie werden in erster Linie in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern BASF und Fluka AG (Sigma-Aldrich) angestrebt.

Zudem soll mit der innovativen Verfahrenskombination aus Membrantrenntechnik – Pertraktion oder Pervaporation – und überkritischer Fluidtechnologie – SFE und SFC

– das gesamte Downstream-Processing intensiviert werden. Das Konzept der Prozessintensivierung wird wegen der Einsparpotenziale derzeit in der Verfahrenstechnik intensiv diskutiert. Unter Prozessintensivierung versteht man die signifikante Verbesserung von Verfahren mittels intensivierender Technologien zur Ausbeute- und Stoffstrommaximierung bei gleichzeitiger Energieminimierung. Die Prozessintensivierung beinhaltet demnach das Konzept der Nachhaltigkeit. Im Rahmen des beschriebenen Projektes erfolgte ein „proof-of-principle“ für die überkritische Fluidtrenntechnologie noch getrennt von der Membrantrenntechnik. Die Entwicklung eines integrierten Prozesses aus beiden Verfahren wird ebenfalls im Rahmen des Nachfolgeprojektes (AZ 13145) stattfinden und ist verbunden mit einer Reduzierung der DSP-Schritte, wodurch eine Prozessintensivierung und damit ein nachhaltiger Umgang mit Ressourcen und eine Kostensenkung angestrebt wird.

7 Fazit

Neben der erreichten hohen Produktivität wurden durch Biokatalysator-Engineering und das Testen verschiedener Verfahrensweisen interessante Erkenntnisse bezüglich Biokatalysator und Prozess gewonnen. Substratlimitation (Massentransferlimitation) konnte in allen Verfahrensweisen ausgeschlossen werden. Produkttoxizität war sowohl mit wachsenden als auch mit ruhenden Zellen die Hauptlimitation. Bei tiefen Produktkonzentrationen scheint die Aktivität wachsender Zellen durch die NADH-Verfügbarkeit limitiert zu sein, während dafür bei ruhenden Zellen neben der NADH-Verfügbarkeit auch die intrinsische StyA-Aktivität in Frage kommt. Bezüglich intrinsischer StyAB-Stabilität ist StyB die limitierende Komponente. Trotzdem war die intrinsische StyAB-Stabilität auch in ruhenden Zellen (ohne Stickstoffquelle und somit verminderter Proteinsynthese) nicht limitierend. Vielmehr scheint neben der Produkttoxizität die Katalyse selbst den Metabolismus ruhender Zellen zu destabilisieren. Der Zellmetabolismus soll nun u.a. mit ^{13}C -basierter Flussanalyse genau untersucht werden, um katalysatorbedingte Limitationen ausfindig zu machen und nach Möglichkeit zu beheben (DBU-Projekt AZ 13145). Das Ziel dabei ist, die nun schon sehr effizienten Biokatalysatoren besser zu charakterisieren, um deren Aktivität und vor allem deren Stabilität weiter zu steigern und so diese nachhaltige Oxyfunktionalisierungsmethode in der chemischen Industrie zu implementieren.

Bei der Upt lag der Schwerpunkt zu Beginn auf der Entwicklung und Bereitstellung geeigneter Membransysteme und -module für den Bioprozess. Kriterien wie Beständigkeit gegenüber BEHP, Sterilisierbarkeit des Moduls und Verfügbarkeit eines Membranmoduls mit größerer Membranfläche (1 - 5 m²) für den beabsichtigten Scale-Up des Prozesses standen dabei im Mittelpunkt der Entwicklungsarbeiten.

Untersuchungen des Stofftransportes über die Membranmodule zeigten, dass die notwendigen Extraktionsraten für den pertraktiven Produktaustrag mit den neu entwickelten Membransystemen nicht erreicht werden konnten. Deswegen wurde abweichend vom Projektantrag auch die Pervaporation als Produktabtrennungsmethode untersucht. Die dabei erreichten Extraktionsraten waren zwar höher, reichten jedoch ebenfalls nicht aus, um die Membransysteme sinnvoll an den Bioprozess zu koppeln. Für eine weitere Optimierung der Membranmodule besteht membrantechnisch vor allem beim porösen Membransupport, bei der Beschichtung mit den selektiven Membranpolymeren, sowie über eine Vergrößerung der Membranfläche erhebliches Optimierungspotenzial. Zusätzliche Möglichkeiten bieten alternative Lösungsmittel als Extraktionsmittel für den pertraktiven Produktaustrag. Mit solchen Optimierungen der Membransysteme sollte es in Zukunft (DBU-Projekt AZ 13145) gelingen, die Extraktionsleistungen der Membranen an die Produktivität der Biotransformation anzupassen.

Der Bioprozess an sich stellt aufgrund des Einsatzes von BEHP eine besonders große Herausforderung an die „Hardware“ der Membrantechnik dar. Mit den im Projekt erreichten Entwicklungen stehen hochbeständige Membransysteme und Module für eine Vielzahl von Bioprocessen zur Verfügung, die bei weiterer Optimierung großes Potenzial als Plattform für Membransysteme in der Biotechnik zeigen. Die keramischen Hohlfasermembranen können kostengünstig und in hoher Qualität für die Anwendungen produziert werden. Das Spektrum der Einsatzmöglichkeiten der neuen Membranen ist äußerst umfangreich und eröffnet so den Zugang zur Darstellung kompetitiver nachhaltiger Verfahren durch Einsatz innovativer Membrantechnologie. Zum Beispiel lassen sich die Hohlfasermembranen als Begasungsmembranen einsetzen, wofür sie sich in diesem Projekt als sehr effizient erwiesen und eine bis zu 13-fache Steigerung des Sauerstoffeintrags – einer Hauptlimitation beim Scale-Up – ermöglichten. Zudem lassen sich die Membranen mit entsprechender Beschichtungen für die Produktextraktion einsetzen. Dabei sind die neu entwickelten Hohlfasermembransysteme (mit Polymerbeschichtung) sowohl

für die Pertraktion als auch für die Pervaporation nutzbar. Somit eröffnet sich der Zugang zur kompetitiven, integrierten und selektiven Produktabtrennung aus komplexen Bioreaktionsgemischen für vielerlei Anwendungen in der Biotechnologie. Zudem wurde gezeigt, dass Styroloxid mit Trenntechnologien in überkritischem CO₂ effizient aus BEHP extrahiert und aufkonzentriert werden kann. Weitere Aufarbeitungsschritte können eingespart werden. Eine einfache, kostengünstige und umweltfreundliche Produktaufarbeitung wird ermöglicht. Diese Technologie soll im Nachfolgeprojekt (AZ 13145) effizient an die Membrantechnologie gekoppelt werden.

8 Literatur

- [1] Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B., *Nature* 409 (2001), 258-268.
- [2] Panke, S., Wubbolts, M.G., Schmid, A., Witholt, B., *Biotechnol. Bioeng.* 69 (2000), 91-100.
- [3] Panke, S., Held, M., Wubbolts, M.G., Witholt, B., Schmid, A., *Biotechnol. Bioeng.* 80 (2002), 33-41.
- [4] Bühler, B., Bollhalder, I., Hauer, B., Witholt, B., Schmid, A., *Biotechnol. Bioeng.* 82 (2003), 833-842.
- [5] Otto, K., Hofstetter, K., Röthlisberger, M., Witholt, B., Schmid, A., *J. Bacteriol.* 186 (2004), 5292-5302.
- [6] Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [7] Bühler, B., Bollhalder, I., Hauer, B., Witholt, B., Schmid, A., *Biotechnol. Bioeng.* 81 (2003), 683-694.
- [8] Bühler, B., Schmid, A., Hauer, B., Witholt, B., *J. Biol. Chem.* 275 (2000), 10085-10092.
- [9] Luong, J.T.H., *Biotechnol. Bioeng.* 29 (1987), 242-248.
- [10] Bühler, B., Schmid, A., *J. Biotechnol.* 113 (2004), 183-210.
- [11] Straathof, A., Panke, S., Schmid, A., *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002), 548-556.
- [12] Nielsen, D. R., Daugulis, A. J., McLellan, P. J., *Biotechnol. Bioeng.* 91 (2005), 773-777.
- [13] Lipnizki, F., Hausmanns, S., Field, R. W., *J. Membr. Sci.* 228 (2004), 129-138.

9 Anhang

Abstract für die Präsentation am BioCatalysis Workshop in Manchester (Biocatalysis in non-conventional media; 13./14.4.05):

Whole-cell bio-oxidation in a two-liquid phase system. What are the limiting factors?

B. Bühler 1, A. J. J. Straathof 2, and A. Schmid 1

1. University of Dortmund, Department of Biochemical and Chemical Engineering, Chair of Chemical Biotechnology, 44227 Dortmund, GER

2. Delft University of Technology, Kluyver Laboratory for Biotechnology, Julianalaan 67, 2628 BC Delft, NL

Oxygenases catalyze highly selective hydrocarbon oxyfunctionalizations, which are important in industrial organic synthesis but difficult to achieve by chemical means¹. By the use of *E. coli* containing recombinant oxygenases, we achieved high productivities for the specific oxygenation of hydrocarbons to corresponding alcohols, epoxides, aldehydes, and acids^{2,3}. Thereby, we employed an aqueous-organic two-liquid phase system, primarily to circumvent substrate and product toxicity and facilitate down-stream processing. With a focus on limitations and possible improvements, we will discuss two processes for the production of aromatic aldehydes from xylenes and epoxides from styrene by means of xylene and styrene monooxygenase, respectively.

The two-liquid phase concept allowed to exploit the complex kinetically controlled multistep oxidation of pseudocumene^{4,5} for the production of 3,4-dimethylbenzaldehyde by means of the non-heme diiron enzyme xylene monooxygenase⁶. Here, we will present a mathematical process model including a description of bioconversion kinetics, mass transfer kinetics, cell growth, and mass balances for both the aqueous and the organic phase. Consistent process simulation allowed conclusions on substrate uptake, NADH availability, pH dependency, product inhibition and aqueous-organic mass transfer with enzyme stability and physiological stress being the key limitations.

E. coli containing the more stable flavo-enzyme styrene monooxygenase for the highly enantiospecific production of (*S*)-styrene oxide from styrene were employed to evaluate and compare the performance of growing and resting cells. Despite the use of the two-liquid phase system, product toxicity was the main limiting factor in both cases. Resting cells showed a higher specific activity whereas growing cells enabled a higher product concentration. With resting cells, the time of catalysis also seemed to be a critical factor.

In general, the limitations were specific for the biocatalyst and the substrate/product pair. However, in both processes, organic substrate mass transfer was not limiting and cell metabolism, especially of growing cells, seemed to have an impact on biocatalyst activity. Oxygen mass transfer can be expected to become limiting for scale-up.

1 Schmid et al. 2001. *Nature*. **409**: 258-268.

2 Bühler et al. 2003. *Biotechnol. Bioeng.* **82**: 833-842.

3 Panke et al. 2002. *Biotechnol. Bioeng.* **80**: 33-41.

4 Bühler et al. 2000. *J. Biol. Chem.* **275**: 10085-10092.

5 Bühler et al. 2002. *Appl. Env. Microbiol.* **68**: 560-568.

6 Bühler et al. 2003. *Biotechnol. Bioeng.* **81**: 683-694.