

**Presselektrofiltration –
ein Membranverfahren für
die Enzymproduktion
AZ 13114**

Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten

**Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik,
Universität Karlsruhe (TH)**

Abschlussbericht

Projektbeginn: 01.08.04

Laufzeit: 24 Monate

Karlsruhe

2006

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung – Kurzfassung des Berichts	6
Anlass und Zielsetzung des Projekts	8
Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden	12
Enzymaktivität	12
Amylaseaktivität	12
Proteaseaktivität mit DMC.....	12
Lysozymtest	13
HPLC	13
Gesamtproteinbestimmung.....	13
Bestimmung nach Bradford ¹²	14
Biuret-Reaktion	14
Methode nach Lowry.....	14
Advanced Protein Assay (APA) ^{12,15,16}	15
Protein Assay ESL	16
Durchführung der Filtrationsversuche.....	16
Anlagenverbesserung: Temperierung	18
Kultivierung.....	19
Kultivierung eines Modellsystems zur Produktion extrazellulärer Enzyme:	21
Kultivierung von <i>Porphyridium purpureum</i> :.....	23
Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> :.....	24
Ergebnisse	25
Biomasseabtrennung (Primärseparation)	25
Abtrennung von <i>Bacillus licheniformis</i>	25
Biomasseseparation bei Novozymes (Kopenhagen, Dänemark)	29
Biomasseseparation: <i>Porphyridium purpureum</i>	31
Biomasseseparation: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
Enzymkonzentrierung	34
Enzymfraktionierung	36
Enzymstabilität in der Elektrofiltration	40
Elektrokerzenfilter	41
Polymermembranabdichtung im EKF.....	45
Ergebnisse EKF	48
Diskussion.....	52

Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen	53
Pressfiltration – Presselektrofiltration	53
Konventionelle Bioseparation - Presselektrofiltration	53
EKF	55
Energierescycling	58
Überprüfung CIP- und SIP-Fähigkeit EKF, evtl. Anpassen der Konstruktion	58
Umweltenlastung	59
Kooperationen innerhalb des Projekts	59
Öffentlichkeitsarbeit.....	61
Literatur/Präsentation/Patente	61
Fazit	61
Anhang.....	64
Literaturangaben:	64
Anlagen	66

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Elektro-Filterkammer.....	17
Abbildung 2: Aufbau der Elektrofiltrationsanlage.....	19
Abbildung 3: Kultivierungsverlauf von <i>Bacillus licheniformis</i> für unterschiedliche C- Quellen (1 OD-Einheit entspricht ca. 0,3 g BTM/l)	22
Abbildung 4: Aktivitätssteigerung (Protease) während der Kultivierung durch Induktion mit Casein.....	23
Abbildung 5: Kultivierungsverlauf von <i>Porphyridium purpureum</i>	24
Abbildung 6: Filtrat über der Zeit für eine Pressfiltration, der bei ca. 10000 s ein elektrisches Feld überlagert wird	26
Abbildung 7: Filtrationskinetik im Vergleich zwischen Pressfiltration und Elektrofiltration für eine Biomasseabtrennung.....	27
Abbildung 8: Vergleich der Kathoden (links)- und Anodenseite (rechts) der Filterkammer nach einer Elektrofiltration von <i>Bacillus licheniformis</i>	27
Abbildung 9: Aktivitätsausbeute über dem Filtratvolumen für die Filtration mit und ohne Feld in der Laboranlage	28
Abbildung 10: Filtratmasse über der Zeit bei Versuchen mit realer Biosuspension bei Novozymes mit unterschiedlich starkem E-Feld	29

Abbildung 11: Filtratmasse über der Zeit bei Versuchen mit realer Biosuspension bei Novozymes mit und ohne E-Feld. Elektrofiltration für pH 5 und pH 7	30
Abbildung 12: Ausbeute an aktivem Enzym (Protease) nach Filtrationen mit und ohne E-Feld zur Biomasseabtrennung bei Novozymes	31
Abbildung 13: Filtratvolumen über die Filtrationszeit bei der Filtration von <i>P. purpureum</i> mit und ohne elektrischem Feld	32
Abbildung 14: Filtration der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
Abbildung 15: Konzentrierung von Enzym S – Lösung von Novozymes (Retentat Ultrafiltration ist Ausgangslösung).....	35
Abbildung 16: Wiedergewonnene Aktivität ($A(\text{gemessen})/A(\text{berechnet})$) für Amylase-Press- und Presselektrofiltrationen bei unterschiedlichen pH-Werten	36
Abbildung 17: Vorgänge bei der zweiseitigen Elektrofiltration zur Fraktionierung eines binären Proteingemisches.....	37
Abbildung 18: Proteintransmission bei einer binären Fraktionierung mit und ohne elektrisches Feld	38
Abbildung 19: Einfluss des E-Felds auf Selektivität und Filtratfluss bei einer Fraktionierung	39
Abbildung 20: Filtratvolumen über die Zeit bei Fraktionierungen mit verschiedenen Drücken mit und ohne E-Feld	40
Abbildung 21: Transmissionswerte bei verschiedenen Experimenten, die mit Aktivitäts- und Konzentrationsbestimmungen ermittelt wurden.....	41
Abbildung 22: Konstruktion des Elektrokerzenfilters; Grafik zeigt den Prototyp;	43
Abbildung 23: Kritische Stellen bei der Verklebung der zylindrischen Membran.....	47
Abbildung 24 : Elektrokerzenfilter mit Klebestellen an den beiden Membranen.....	48
Abbildung 25: EKF-Versuch zur Konzentrierung von Xanthan ($c_0 = 5 \text{ g/l}$) mit und ohne elektrischem Feld ($p = 1 \text{ bar}$)	49
Abbildung 26: Einteilung der Elektrofiltration in 3 Phasen nach Hofmann und Posten (2003) ²¹ (Filtration von Xanthan in Filterplatte)	50
Abbildung 27: 3 Phasen bei der Filtration mit dem Elektrokerzenfilter	51
Abbildung 28: Vergleich der EKF-Filtration mit verschiedenen Spannungen	52
Abbildung 29: Berechnetes Verhältnis des spezifischen Energieverbrauchs zwischen EKF und Filterplatte über dem Radienverhältnis.....	57
Abbildung 30: Konstruktion des Rings zur besseren Abdichtung der Membran mittels O-Ring.....	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des synthetischen Mediums zur Produktion von <i>Bacillus licheniformis</i>	20
Tabelle 2: Zusammensetzung des Salzwassermediums zur Produktion von <i>Porphyridium purpureum</i>	21
Tabelle 3: Zusammensetzung des komplexen Mediums zur Produktion von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Tabelle 4: Berechnete Kräfte auf die unterschiedlichen Mikroorganismen.....	34
Tabelle 5: Maße und Betriebsparameter für den Elektrokerzenfilter	42
Tabelle 6: Spezifischer Energieverbrauch nach Beendigung der zweiten Phase bei verschiedenen Differenzdrücken und angelegten Spannungen im EKF und in der ebenen Anwendung (Filterpresse) (* Annahme, dass 36 % der Filterfläche nicht genutzt wurden)	51

Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
BTM	Biotrockenmasse
EKF	Elektrokerzenfilter
GF-PP	Glasfaserverstärktes Polypropylen
HPLC	High performance liquid chromatography
NPU	Novozymes Protease Unit
PEF	Presselektrofiltration
PF	Pressfiltration
SEC	Size exclusion chromatography

Formelzeichen

A	Fläche	cm ²
c _i	Konzentration	kg/m ³
E	Elektrische Feldstärke	V/mm
F	Kraft	N
I	Stromstärke	A
P	Leistung	W

r_h	Hydrodynamischer Teilchenradius	m
r	Radius	m
R	elektrischer Widerstand	Ω
T_i	Transmission	-
t	Filtrationszeit	s
U	Spannung	V
v	Relativgeschwindigkeit	m/s
V	Filtratvolumen	cm ³
V_K	Filterkammervolumen	cm ³
W	Energie	J
ε_0	Elektrische Feldkonstante	As/(V · m)
ε_r	relative Permittivität	[-]
κ	spezifische Leitfähigkeit	S/m
η	Dynamische Viskosität	kg/(m · s)
ζ	Zetapotential	mV

Projektpartner:

Universität Karlsruhe, Institut für Mechanisch Verfahrenstechnik und Mechanik,
Bereich Bioverfahrenstechnik

LENSER Filtration GmbH & Co., 89250 Senden

Projektbearbeiter: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten, Tobias Käppler, Claus Bäurle, Dr.-
Ing. Ulrich Hüsgen, Thomas Kaufmann

Zusammenfassung – Kurzfassung des Berichts

Die Bioproduktaufarbeitung ist einer der wesentlichen Schritte bei der Bioproduktion. Zu den Forschungsschwerpunkten Upstream und Bioreaktion kam erst in den letzten Jahren das bis dahin vernachlässigte Gebiet der Bioproduktaufarbeitung hinzu. Der Aufarbeitungsprozess nach einer Bioproduktion ist meist der aufwändigste und damit kostenintensivste Schritt eines Bioprozesses. Dies gilt auch für Enzymproduktionen. Viele Verfahrensschritte werden hintereinander geschaltet, um das gewünschte

Produkt möglichst vollständig, rein und konzentriert zu erhalten. Jedoch sind mit jedem Schritt Enzymverluste, zum einen durch Totvolumina und nicht abgetrennte Restgehalte etc., zum anderen durch die verstreichende Zeit, welche die Enzymaktivität reduziert, verbunden ¹. Ziel dieses Projektes war es daher, ein verbessertes Verfahren zu entwickeln. Dazu wird die konventionelle Druckfiltration mit den positiven elektrokinetischen Effekten, Elektrophorese und Elektroosmose, verbunden.

Die so genannte Elektrofiltration ist in unserem Fall ein Dead-End-Verfahren, also ein statisches Verfahren, bei welchem einer zweiseitigen Filtration ein elektrisches Feld überlagert wird. Durch die Reduktion der Dicke der Filterkuchen, bzw. der Konzentrationspolarisationsschicht auf einer der beiden Membranen, kann die Filtrationskinetik deutlich verbessert und damit wesentlich höhere Endkonzentrationen der einzudickenden Substanz erreicht werden. Dieses Verfahren wurde insbesondere für die Primärseparation, die Biomasseabtrennung, und für die Enzymaufkonzentrierung- und fraktionierung eingesetzt.

Für die Biomasseabtrennung konnte die Filtrationsgeschwindigkeit um eine von einer Größenordnung für den Organismus *Bacillus licheniformis* erhöht werden. Auch für andere Organismen wurde der Einsatz der Elektrofiltration evaluiert, wobei vor allem eine geringe Gesamtionenstärke in der Biosuspension und ein hohes Zetapotential für die erfolgreiche Nutzung der Elektrofiltration nötig sind. Bei der Primärseparation ist neben der Filtrationsgeschwindigkeit auch die Ausbeute an aktivem extrazellulären Enzym wichtig. Diese konnte ebenfalls durch den Einsatz des elektrischen Feldes deutlich gesteigert werden, wobei noch Probleme für die direkte Anwendung in einem industriellen Prozess bestehen.

Nach Abtrennung der Mikroorganismen muss das produzierte Enzym weiter verarbeitet und dabei aufkonzentriert werden. Auch für diesen Ultrafiltrationsschritt wurde der Einsatz der Elektrofiltration untersucht, wobei vor allem eine geringe Salzkonzentration in der Lösung wichtig ist, um unerwünschte Nebenreaktionen (Ausfällungen etc.) zu vermeiden. Unter Berücksichtigung dieser Randbedingungen konnten auch hier deutliche Steigerungen der Filtrationsperformance erzielt werden.

Da auch Protein- bzw. Enzymgemische nach der Biomasseabtrennung häufig voneinander getrennt werden müssen, wurde dies ebenfalls mit elektrischen Feldern untersucht, wobei ein binäres Modellgemisch mit äußerst hohen Selektivitäten von

einander getrennt werden konnte. Eine Beschleunigung des Prozesses konnte wiederum nachgewiesen werden.

Die Enzyme, welche bei den Elektrofiltrationsverfahren evtl. in direkten Kontakt mit der Elektrode kommen, sollten hier nicht zerstört oder beschädigt werden. Bei all unseren Untersuchungen konnte kein Aktivitätsverlust durch Berührung mit den Elektroden beobachtet werden. Dies ist eine sehr wichtige Voraussetzung für die Einsetzbarkeit dieses elektrokinetischen Verfahrens.

Da das eingebrachte elektrische Feld neben den gewünschten Effekten auch unerwünschte mit sich bringt, wie die elektrolytische Zersetzung von Wasser unter Energieverbrauch, wurde ein Konzept entwickelt, das die Effizienz des Energieverbrauchs in der Elektrofiltration steigern soll: Die Verwendung eines inhomogenen E-Felds in einem Elektrokerzenfilter ermöglichte einen reduzierten Energieverbrauch im Vergleich zur ebenen Anwendung. Die erzielte Energieersparnis konnte allerdings aufgrund von konstruktiven Hindernissen nicht auf das erhoffte Niveau gebracht werden.

Das Projekt als Ganzes demonstriert, dass die Elektrofiltration ein Verfahren ist, das im Bereich der Enzymproduktion gleich an mehreren Stellen eingesetzt werden könnte. Allerdings müssen wichtige Randbedingungen unbedingt eingehalten werden, wie beispielsweise ein hohes Zetapotential bei den zu beeinflussenden Molekülen. Dem Anwender einer Filtrationsanlage ist durch das elektrische Feld ein weiterer Freiheitsgrad gegeben, um seinen Prozess so auszulegen, dass hohe Reinheit in kurzer Zeit erzielt und so die Umwelt geschont werden kann. Die Verbesserung von Bioseparationsmethoden ist nötig, um biotechnologische Verfahren zu stärken, von welchen eine deutlich geringere Umweltbelastung im Vergleich zu konkurrierenden Methoden zu erwarten ist ².

Anlass und Zielsetzung des Projekts

Die größer werdende Nutzung biotechnologischer Verfahren zur Bildung von Produkten verlangen technisch ausgereifte Lösungen zur Handhabung und Verarbeitung von biologischen Medien. Biotechnologische Prozesse, bei denen ganze Zellen als Biokatalysatoren eingesetzt werden, haben die Eigenschaft niedrige Produktivitäten im Vergleich zu chemischen Prozessen zu bieten. Der Produktstrom ist meist sehr verdünnt und eine lange Kette von hintereinander geschalteten Aufarbeitungsschritten ist zur Isolation und Reinigung des Zielprodukts nötig. Ein

Weg, den biotechnologischen Prozess zu verbessern, ist es, die Stämme durch Mutanten-Screening oder rekombinante DNA-Technologien zu verbessern. Weiterhin können verfahrenstechnische Lösungen angestrebt werden. Hierbei kann der Fermentationsprozess optimiert werden, wobei der am meisten verwendete Ansatz die Erhöhung der Zell-Zahl im Fermenter ist ³. Neben diesen Verbesserungen im Upstream und in der Bioreaktion kann die Bioproduktaufarbeitung so verändert werden, dass möglichst der Produktverlust in den einzelnen Aufarbeitungsschritten minimiert und die Anzahl der benötigten Schritte reduziert wird. Diese Verbesserungen im Downstream-Prozess standen zunächst nicht im Zentrum der biotechnologischen Prozessverbesserung. Das Potential hierbei ist jedoch sehr hoch, so dass seit einigen Jahren verstärkt in diesem Bereich geforscht und untersucht wird.

Downstream-Prozesse in biotechnologischen Produktionsverfahren erfordern häufig einen großen prozesstechnischen Aufwand und können aufgrund der instabilen Biopolymere zu einer geringen Ausbeute des Zielprodukts führen. Für Enzyme gilt im allgemeinen, dass sie in ihrer physiologischen Umgebung, d.h. in der intakten Zelle oder im lebenden Gewebe am stabilsten sind. Während der Aufarbeitung werden die Enzyme Bedingungen ausgesetzt, die nicht den physiologischen Bedingungen entsprechen und die sich daher negativ auf die Enzymaktivität auswirken können. Im Fall von intrazellulären Enzymen kommt hinzu, dass beim Zellaufschluss häufig Proteasen freigesetzt werden, die das Zielenzym zerstören können. Nach Kaufmann nimmt die Aktivität und damit die Ausbeute an technisch verwertbarem Produkt exponentiell mit der Verarbeitungszeit ab ¹. Verglichen mit der Stabilität während der verschiedenen Aufarbeitungsschritte, ist die Stabilität des gereinigten und adäquat gelagerten Endproduktes sehr groß. Die Konsequenz hieraus ist, dass der gesamte Enzymaufarbeitungsprozess so kurz wie möglich gestaltet werden sollte, um Verluste zu vermeiden.

Häufig werden Membranfiltrationen in der Aufarbeitung von Enzymen eingesetzt. Damit werden Feststoffe, wie Biomasse abgetrennt, Biopolymergemische fraktioniert, Enzyme aufkonzentriert oder in einer Diafiltration gereinigt bzw. ein definierter Salzgehalt eingestellt. Die Filtrationsschritte bilden jedoch häufig den Engpass beim Downstream von Bioprozessen, denn Biopolymere und Biomasse weisen nahezu undurchlässige, kompressible Filterkuchen mit großem spezifischem Kuchenwiderstand auf. Daher sind klassische Dead-End-Filtrationen großtechnisch

meist nicht anwendbar. Um eine ausreichende Filterperformance und damit moderate Filtrationszeiten zu erreichen, muss der Aufbau einer Deckschicht auf der Membran (Fouling) so weit wie möglich verhindert werden. Daher werden bei der Enzymherstellung meist Querstromfiltrationen (CFF) eingesetzt. Bei diesen erzeugt die tangentielle Überströmung der Membran ein Scherkräftfeld, das einen stetigen Abtrag der Membrandeckschicht bewirkt. Die Nachteile der CFF sind neben einer zu geringen Filterperformance und damit langen Filtrationszeiten, die hohen Scherkräfte, die auf die Biopolymere wirken und zu deren Deaktivierung führen können ^{4,5}. Ferner sind Biodispersionen häufig sehr viskos. Das Einstellen einer turbulenten Strömung im Filtermodul erfordert deshalb einen großen Pumpenenergieeintrag bzw. macht das Aufkonzentrieren auf hohe Endkonzentrationen nahezu unmöglich.

In der Literatur werden weitere Möglichkeiten zur Reduzierung der Deckschichtdicke auf der Membran diskutiert. Biopolymere sind durch ihre funktionellen Gruppen, z. B. Carboxyl- und Aminogruppen, vergleichsweise stark geladen. So kann durch ein elektrisches Feld, das auf die Biopolymere wirkt, der Filterkuchenaufbau drastisch reduziert werden. Die Vorteile einer Elektrofiltration im Vergleich zur CFF liegen in der schonenderen und trotzdem effektiveren Reduzierung der Deckschichtdicke. Mit ihr sind bei kürzeren Filtrationszeiten höhere Endkonzentrationen möglich. Trotzdem werden Elektrofiltrationsverfahren derzeit noch nicht industriell angewendet, da Probleme wie chemische Reaktionen an den Elektroden, hoher Energiebedarf und Wärmeentwicklung mit dem Verfahren assoziiert werden ⁶. Die Elektrofiltration besitzt jedoch ein großes Optimierungspotential im Hinblick auf die oben genannten Nachteile. Durch entsprechende Weiterentwicklungen kann sie für die großtechnische Enzymproduktion zu einer vielversprechenden Alternative zur CFF werden.

Etwa 60 % der weltweit hergestellten großtechnischen Enzyme sind Proteasen ⁷. Sie finden Ihre Anwendung vor allem in der Lebensmittel- und Waschmittelindustrie. Extrazelluläre Proteasen für diesen Bereich werden in großen Chargen produziert. Das Downstream-Processing beschränkt sich im wesentlichen auf die Biomasseabtrennung und die Enzymaufkonzentrierung. Eine aufwendige Reinigung der Enzyme ist meist nicht notwendig.

Alkalische Proteasen sind ein Standardinhaltsstoff von Wasch- und Reinigungsmitteln. 25 % der weltweit verkauften Enzyme sind Proteasen für die

Wasch- und Reinigungsmittelindustrie. Ein Schlüsselparameter von Proteasen für Waschmittel ist ihr isoelektrischer Punkt ⁷. Dieser sollte ungefähr dem pH der Waschlauge entsprechen, also im neutralen bis basischen Bereich liegen. Unterhalb des isoelektrischen Punktes sind Enzyme positiv geladen. Die Biomasseabtrennung mit Hilfe der Elektrofiltration sollte idealerweise in diesem pH-Bereich durchgeführt werden, da Biomasse Feststoffe, DNS und Polysaccharide meist negativ geladen sind. Während der Filtration wirkt auf das positiv geladene Enzym zusätzlich zur Konvektion eine elektrophoretische Kraft mit gleicher Richtung. Dies führt zu einer Anreicherung des Enzyms im Filterkuchen, welcher auf der Anodenseite abgeschieden ist. Das positiv geladene Proteasenmolekül wird durch die Kathode angezogen und gelangt somit durch die kathodenseitige Membran ins Filtrat.

Daher wurden in diesem Projekt die Elektrofiltration für diesen Bereich der industriellen Produktion untersucht werden. Zum einen wurde die Abtrennung der Biomasse, also die Primärseparation, zum anderen die Enzymkonzentrierung untersucht werden. Des Weiteren kann die Fraktionierung von Gemischen, die ein Protein bzw. Enzym enthalten durch die Elektrofiltration eine viel versprechende Alternative zu gängigen Methoden sein. Man kann dabei neben der sterischen Trennwirkung der Membran die unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten der Biomoleküle nutzen. Weiterhin sollte das Verfahren der Elektrofiltration weiterentwickelt werden, um eine effizientere Nutzung der eingebrachten elektrischen Energie zu bewirken.

Bei der Abtrennung eines enzymatischen Produkts von der Biomasse sollte durch die höhere Konzentrierung, welche mit dem überlagerten E-Feld möglich ist, die Ausbeute an Enzym in der Filtratflüssigkeit gesteigert. Zum anderen kann eine normalerweise nötige Verdünnung der Ausgangslösung, welche einer Ausbeutesteigerung an Enzym dient, vermieden werden. Dies bedeutet z.B. bei einer Verdopplung der möglichen Endkonzentration eine Reduktion der Verdünnungsflüssigkeit um 1 Liter pro Liter Ausgangssuspension.

Als weitere Zielsetzung sei die Einsparung an Verfahrenseinheiten erwähnt. Durch eine starke Konzentrierung einer Enzymlösung, erübrigt sich das Eindampfen der Enzymlösung. Weiterhin können eventuell nötige Chromatographieschritte eingespart werden, wenn durch eine fraktionierende Elektrofiltration bereits eine ausreichende Reinheit des Produkts erreicht wurde.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Enzymaktivität

Enzymaktivitätstests spielen eine wesentliche Rolle bei der Untersuchung der Elektrofiltration. Zum einen sollen Konzentrationen mit den Aktivitäten verglichen werden, um nötige Aussagen über eventuell auftretende Denaturierungen treffen zu können, zum anderen können Aussagen über die Ausbeuten und Verteilungen des Produkts in Filtrat und Retentat möglich gemacht werden.

Amylaseaktivität

Die Amylaseaktivität wird mit Hilfe des Phadebatests (Pharmacia AB, Uppsala) durchgeführt ⁸. Diese Phadebas-Tabletten bestehen aus einem quervernetzten, unlöslichen und blaugefärbten Stärke-Polymer und anderen Inhaltsstoffen.

Nachdem man die unlösliche Tablette in wässrigem Puffer suspendiert und eine Amylasenprobe hinzugegeben hat, hydrolysiert die α -Amylase das Polymer und es entstehen lösliche blaue Fragmente. Die Absorption der blauen Lösung, gemessen bei 620 nm, ist eine Funktion der α -Amylase-Aktivität.

Proteaseaktivität mit DMC

Das Substrat, NN-dimethyl Casein (DMC) (Fluka, Buchs), wird durch das proteolytische Enzym in niedrig-molekulare Peptide und Aminosäuren hydrolysiert ⁹. Die freien Aminogruppen, die während der Hydrolyse gebildet werden, reagieren mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) (Sigma-Aldrich, Seelze). Die Aktivität wird mit Hilfe einer Kalibrierkurve über die optische Dichte bei 425 nm berechnet, welche mit Savinase®, der Firma Novozymes, welches eine Aktivität von 6 kNPU/g besitzt, erstellt.

Lysozymtest

Für die Bestimmung der Lysozymaktivität wurde ein Verfahren der Firma SIGMA verwendet, das auf einer Prozedur von Ruckenstein et al. basiert ¹⁰. Es handelt sich dabei um ein Verfahren, bei dem zu einer Zellsuspension des *Micrococcus lysodeikticus* mit bestimmter Konzentration die zu untersuchende lysozymhaltige Lösung zugegeben wird. Das Lysozym in der Probe löst die Polysaccharidstruktur der Zellwände des *Micrococcus*, wobei der OD-Wert, der bei 450 nm determiniert wird, sinkt. Aus der Steigung des anfänglich linearen Abfalls der OD wird die Lysozymaktivität bestimmt.

HPLC

Bei dieser Arbeit wurde das SEC-Prinzip (Größenausschlusschromatographie) angewendet. Hier findet die Flüssigchromatographische Trennung polymerer Vielstoffgemische durch Größenausschluss an makroporösen Gelen statt: Die Moleküle werden entsprechend ihres hydrodynamischen Volumens eluiert.

Es wurde eine Säule mit TSK-Gel 4000 SW (Silicate Water), 300 x id 7,5 mm, Volumen 13,25 ml, Granulometrie 10 µm, Porosität 4000 A verwendet. Der pH lag zwischen 7,2 – 7,5, das Eluent bestand aus 826 ml 1/15 M KH_2PO_4 und 1174 ml 1/15 M Na_2HPO_4 bei pH 7. Der Eluentenfluss betrug 0,5 ml/min bei einer Analysendauer von 35 Minuten. Der Säulendruck betrug 11 bar bei einer Säulentemperatur von 20°C.

Gesamtproteinbestimmung

Um die Gesamtkonzentration von Proteinen in Lösungen zu bestimmen, werden häufig kolorimetrische Bestimmungsmethoden verwendet. Die Zahl dieser Methoden hat sich in den letzten Jahrzehnten stark vermehrt, was in einem Anstieg an Empfindlichkeit und Genauigkeit resultierte ¹¹. Es werden mehrere verwendete Methoden vorgestellt.

Bestimmung nach Bradford ¹²

Bei der Methode nach werden die Proteine in saurem Milieu an den Farbstoff Coomassie-Blau G-250 gebunden. Dadurch entsteht ein Protein-Farbstoff-Komplex, wodurch sich eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm ergibt. Die Extinktion bei 595 nm kann dann als Maß für die Konzentration der Proteine verwendet werden. Sedmak und Grossberg beobachteten, dass nur Peptide mit einem Molekulargewicht größer als 3000 Da einen Komplex mit Coomassie-Blau bilden können ¹³. Diese Bestimmungsmethode ist unter anderem Basis für den verwendeten „Advanced Protein Assay“ APA (s.u.).

Biuret-Reaktion

Die Biuret-Reaktion basiert auf der Bildung eines Komplexes von Cu^{2+} -Ionen mit Proteinen in alkalischer Lösung. Kupfersulfat wird der Proteinlösung zugegeben, wobei sich eine purpur-violette Farbe bildet, die auf die Komplexbildung von Cu^{2+} -Ionen mit der Peptidbindung zurückgeht.

Eine Weiterentwicklung dieser Methode wurde von Matsushita et al. beschrieben, bei der es sich um eine umgekehrte Biuret-Reaktion handelt. Überschüssige Cu^{2+} -Ionen, die nicht in einem Proteinkomplex gebunden sind, werden mit Zitronensäure zu Cu^+ -Ionen reduziert, wonach sie mit Bathocuproin komplexiert und somit gemessen werden können ¹⁴. Die Menge an Cu^+ -Bathocuproin-Komplex ist umgekehrt proportional zur Proteinkonzentration. Diese umgekehrte Biuret-Reaktion hat den Vorteil, dass sie empfindlicher als die klassische Biuret-Reaktion ist, wodurch geringere Proteinkonzentrationen gemessen werden können.

Generell gilt für die Biuret-Reaktion, dass es keine Abhängigkeit von der Proteinzusammensetzung gibt. Der umgekehrte Biurettest stellt die Basis für den ESL-Test von Roche dar (s.u.)

Methode nach Lowry

Bei der Methode nach Lowry gehen die Proteine mit alkalischem Cu^{2+} -Reagenz eine dem Biuret-Komplex ähnliche Verbindung ein. Im Folgenden reduzieren die komplexierten Proteine das Folin-Reagenz ¹⁵. Die Reduktion dieses Reagenzes

bewirkt einen Farbumschlag von gelb nach blau und kann dann photometrisch gemessen werden. Das Prinzip des Lowrytests geht in den APA (s.u.) ein.

Advanced Protein Assay (APA) ^{12,15,16}

Der „Advanced Protein Assay“ (APA) von Fluka ist ein kommerziell gehandelter Proteintest. Die bereits beschriebenen Theorien sind die Basis für diesen Test, außerdem geht noch laut Hersteller ein Testverfahren nach Fujita mit ein ¹⁶. Der APA verbindet laut Hersteller (Fluka, Schweiz) die besten Eigenschaften von Bradford, Lowry und Fujita. Die Abweichungen zwischen unterschiedlichen Proteinen sind gering und die Nachweisgrenze liegt bei kleinen Konzentrationen

Durchführung:

Zunächst wird das UV/Vis Spectrophotometer der Firma Unicam, bei dem jeweils die Differenz der Extinktion zweier Proben gemessen wird, auf eine fixe Wellenlänge von 590 nm eingestellt. Es werden mit einer Pipette von Eppendorf 200 µl APA in eine 1,5 ml-Einmal-Küvette gegeben, wobei wegen der Zähflüssigkeit der Lösung, die Pipette mindestens zweimal aufgezogen werden sollte, damit kein Fehler durch die Benetzung des Inneren der Pipettenspitze entsteht. Um verschiedene Konzentrationsbereiche gut messen zu können, wurden mehrere Kalibrierkurven mit unterschiedlicher Verdünnung der Proteinlösung erstellt. Dies wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) von Roth durchgeführt. Für konzentrierte Proteinlösungen (0,1-1 g/l, bezogen auf den BSA-Standard) wird zu den 200 µl APA 800 µl bidestilliertes Wasser zupipettiert und dann 10 µl Probe zugefügt. Nach kurzem Durchmischen wird die Optische Dichte bei 590 nm gegen eine Referenzküvette mit reinem Wasser bzw. Puffer gemessen. Ist die Konzentration zu niedrig, so dass die OD einen Wert kleiner 0,050 hat, kann eine zweite Methode verwendet werden, bei der statt 10 µl nun 100 µl Probe bei sonst gleicher Prozedur verwendet werden. Diese Methode ist sinnvoll für Konzentrationen im Bereich 0,01–0,1 g/l Protein. Bei noch verdünnteren Proteinlösungen wird zu den 200 µl APA kein Wasser gegeben, sondern direkt 800 µl Probe.

Protein Assay ESL

Der „Protein Assay ESL (Exact, Sensitive, Low interference)“ der Firma Roche basiert auf der umgekehrten Biuret-Reaktion (s.o.)

Durchführung:

In eine 1,5 ml-Einmal-Küvette werden 100 µl „Reagenz A“ (alkalische Kupfertartratlösung) und 50 µl Probe gegeben und vermischt. Nach mindestens 5 Minuten wird dann 1000 µl „Reagenz B“ (Ascorbinsäure, Bathocuproindisulfonsäure-Lösung) zugegeben, durchmischt und nach exakt 30 Sekunden die Extinktion bei 485 nm gemessen. Da das Reagenz B zähflüssig ist, sollte die Pipette mehr als einmal aufgezogen bevor es in die Küvette einpipettiert wird. Eine Kalibrierkurve wurde mit BSA erstellt. Bei jeweiliger Durchführung einer Messreihe sollte der Nullwert, also der Wert, der sich ergibt, wenn kein Protein in der Lösung ist, neu bestimmt werden. Dies ist der Wert mit der maximalen OD.

Durchführung der Filtrationsversuche

Von der zu filtrierenden Suspension wird zunächst die Leitfähigkeit mit dem Conductivity Meter LF 538 der Firma WTW und der pH-Wert bestimmt. Dann wird die Filterkammer (Abbildung 1) gefüllt, wonach die restliche Ausgangslösung in den Druckbehälter gegeben wird. Der Aufbau des Elektrokerzenfilters (EKF) ist ähnlich der in Abbildung 1 gezeigten. Auf die Details hierbei wird im Ergebnisteil eingegangen.

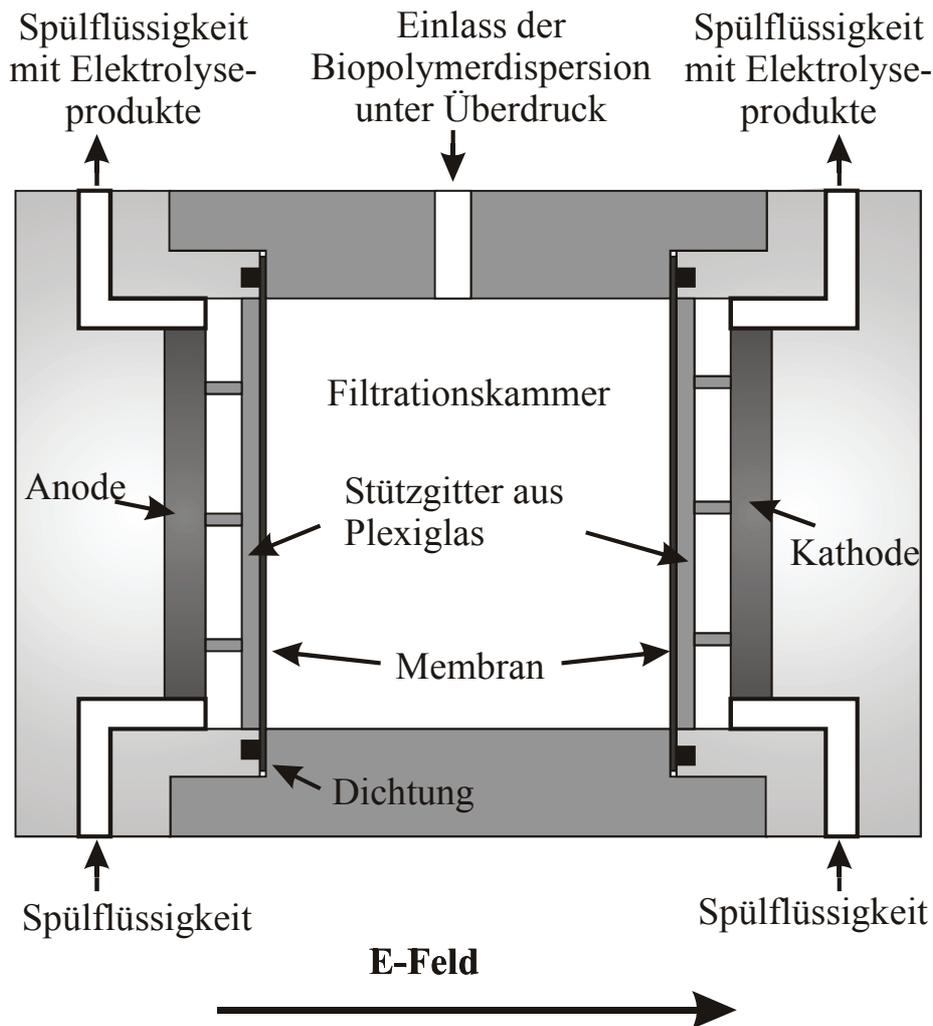


Abbildung 1: Aufbau der Elektro-Filterkammer

Für den Spülkreislauf (siehe Abbildung 2) wird eine Lösung hergestellt, die die gleiche Leitfähigkeit wie die zu filtrierende Suspension hat. Hierfür wurde meist Pufferlösung, z.B. Kaliumdihydrogenphosphat und Dikaliumhydrogenphosphat, verwendet. Eine genau gewogene Menge Spülflüssigkeit wird in den Vorlagebehälter gegeben. Diese Menge muss bei der Konzentrationsbestimmung des Filtrats wieder herausgerechnet werden. Sie betrug jeweils 200-400 ml in der Laboranlage, 1-3 l bei Versuchen in der Pilotanlage bzw. mit dem Elektrokerzenfilter.

Mit einer Schlauchpumpe werden die beiden Spülkreisläufe betrieben. Der Druckbehälter wird mit Hilfe der Manometer mit dem gewünschten Druck beaufschlagt. Mittels PC wird das Steuer- und Messprogramm gestartet, welches eine Aufnahme von Strom-, Spannungs- und Filtratmassenwerten über der Filtrationszeit zulässt.

Während der Elektrofiltrationsversuche werden einige Filtratproben von maximal 2,5 ml Menge zur Analyse genommen, um die Proteinkonzentration bzw. Enzymaktivität

des Filtrats während der Filtration zu untersuchen. Um die Spülflüssigkeit herauszurechnen, wurden folgende Gleichungen verwendet, die aufgrund der Massenbilanz gelten:

$$c_{\text{Filtrat},1} = \frac{c_{\text{Probe},1} \cdot (V_{\text{Filtrat},1} + V_{\text{Spülflüssigkeit}})}{V_{\text{Filtrat},1}} \quad (1)$$

$$c_{\text{Filtrat},n} = \frac{c_{\text{Probe},n} \cdot (V_{\text{Filtrat},n} + V_{\text{Spülflüssigkeit}}) + \sum_{i=1}^{n-1} c_{\text{Probe},i} \cdot V_{\text{Probe},i}}{V_{\text{Filtrat},n} + \sum_{i=1}^{n-1} V_{\text{Probe},i}} \quad (2)$$

Gleichung 1 für die erste Probe, für alle folgenden muss der sich durch das Probenziehen ergebende Fehler herausgerechnet werden (mittels Gleichung 2). Hierbei ist $c_{\text{Probe},n}$ die Konzentration der gezogenen Probe n , $V_{\text{Filtrat},n}$ das Filtratvolumen der Probe n , das bis zur Probenentnahme filtriert wurde, $V_{\text{Spülflüssigkeit}}$ das Volumen der eingesetzten Spülflüssigkeit. Statt der Konzentration kann auch die Aktivität der Probe eingesetzt werden, um die Aktivität des Filtrats zu bestimmen.

Nach Beendigung des Versuchs wird die Anlage mit Hilfe eines Spülprotokolls gereinigt. 4 Reinigungsschritte wurden nacheinander durchgeführt: Enzymatische Reinigung mit P3-Ultrasil 53 der Firma ECOLAB, zur Entfernung von Restprotein. Säurereinigung mit P3-Ultrasil 75 der Firma ECOLAB zur Deaktivierung und Entfernung der Enzyme. Danach wurde mit Leitungswasser und VE-Wasser gespült.

Anlagenverbesserung: Temperierung

Die aus Vorgängerprojekten vorhandene Elektrofiltrationsanlage wurde zunächst verbessert, indem eine Kühlung eingebaut wurde. Zum einen sollte dies der Reproduktionsgenauigkeit dienen, zum anderen auch verhindern, dass thermosensible Biopolymere, wie Enzyme, denaturiert werden. Da Versuche mit Enzymen durchgeführt werden sollten, war dies nötig. Es existieren zwei verschiedene Filterkammern, eine Laborfiltrationseinheit (Kammervolumen 10 ml) und eine Pilotfiltrationsanlage (Kammervolumen 340 ml). Der in Abbildung 2 dargestellte Anlagenaufbau zeigt wie die Kühlung integriert wurde. Bei den beiden Anlagen wurde sie unterschiedlich realisiert. Bei der kleinen Anlage wurde in den Vorlagebehälter eine Kühlschlange eingebracht, bei der größeren Einheit wurde das Filtrat über einen Wärmeübertrager geleitet, womit das gesamte System gekühlt werden konnte. Der zu konstruierende Elektrokerzenfilter wird ähnlich der Pilotfiltrationsanlage dimensioniert, wodurch ermöglicht wird, dass die komplette

Peripherie dieser Anlage für den EKF genutzt werden kann. Kühlwasser steht über die Hauskühlwasseranlage zur Verfügung. Die Dimensionierung der Kühlung wurde durch Abschätzung mit Hilfe von Erfahrungswerten vergangener Versuche und durch Bilanzierung durchgeführt. Die Temperatur während der Versuche kann somit auf 13 °C konstant gehalten werden.

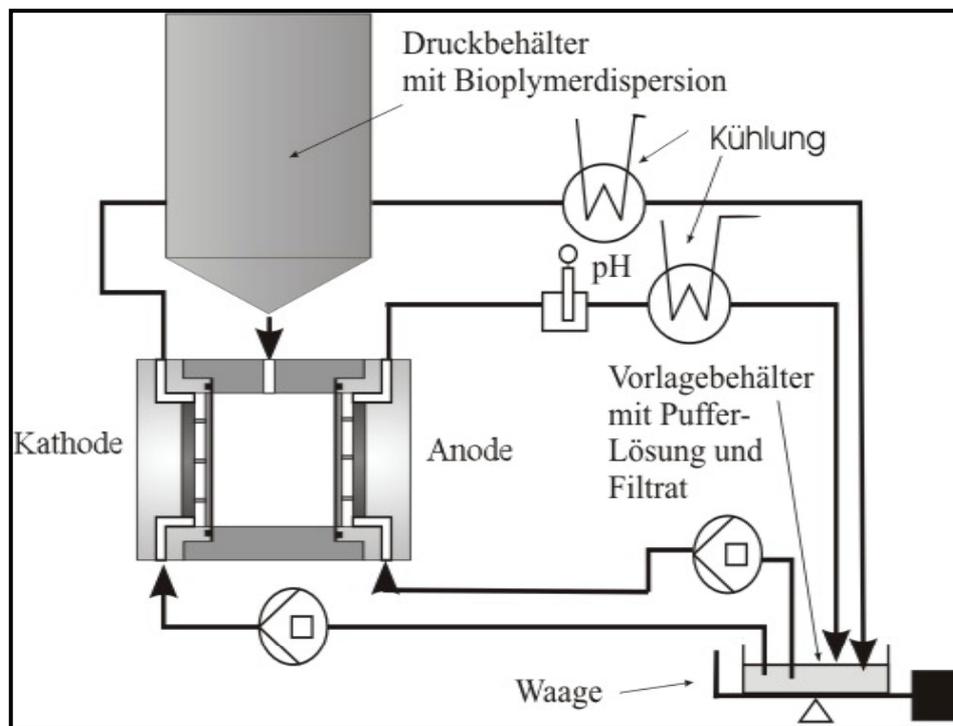


Abbildung 2: Aufbau der Elektrofiltrationsanlage

Kultivierung

Zur Untersuchung der Biomasseabtrennung wurden verschiedene Systeme kultiviert. Zum einen der wichtigste Mikroorganismus *Bacillus licheniformis*. Dieser wurde von der DSMZ (Stamm 1969) erhalten und in verschiedenen Medien kultiviert. Er zeichnet sich dadurch aus, dass er extrazelluläre Enzyme (Alpha-Amylase, Proteasen (neutral und alkalisch) produziert¹⁷. Daher wurde dieser Stamm als Modell für die Proteasenproduktion verwendet und seine Filtrierbarkeit untersucht.

Weiterhin wurde die Mikroalge *Porphyridium purpureum* filtriert. Algen sind viel versprechende Organismen zur Produktion von verschiedensten Stoffen². Der gewählte Stamm sondert ein extrazelluläres Polysaccharid aus, welches dazu führt, dass die Kultivierungsbrühe schlecht filtrierbar ist. Die Mikroalge bildet durch die an jede Zelle anhaftende Polysaccharidschicht einen schleimigen Filterkuchen, der

jedoch elektrophoretisch beeinflussbar ist. Die Alge ist deutlich größer als ein Bakterium (Durchmesser ca. 6,5 µm).

Als drittes System wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kultiviert und filtriert. Sie besteht im Vergleich zum Bakterium ebenfalls aus großen Zellen (6-8 µm), bildet jedoch keine Polysaccharid-Hülle aus und ist daher deutlich einfacher zu filtrieren.

Die verschiedenen Systeme wurden untersucht, um die Forschung möglichst breit zu gestalten. Die Produktion von Enzymen im sehr großen, industriellen Maßstabe (Proteasen, Amylasen) geschieht momentan hauptsächlich mit der Gattung *Bacillus*. Allerdings werden andere Enzyme mit anderen Organismen produziert. Um heraus zu finden, ob die Elektrofiltration eine geeignete Methode zur Primärseparation ist, müssen verschiedene Parameter variiert werden, die zeigen, wann ein wirtschaftlicher und ökologischer Einsatz der Technik möglich ist.

In den Tabellen 1-3 sind die Medienzusammensetzungen der Kultivierungen zu sehen, welche sich als geeignet erwiesen haben.

Komponente	Konzentration [g/l]
Na-Citrat	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	5
MgSO ₄	0,2
KH ₂ PO ₄	0,037
K ₂ HPO ₄	0,068
Glukose/Stärke	25-30
Komponente	Konzentration [mg/l]
CaCl ₂	2,2
Na ₂ MoO ₄	0,24
FeSO ₄ *7 H ₂ O	5,2
ZnSO ₄ *7 H ₂ O	7,2
CuCl ₂ *2 H ₂ O	0,85

Tabelle 1: Zusammensetzung des synthetischen Mediums zur Produktion von *Bacillus licheniformis*

Komponente	Konzentration [g/l]
NaCl	297
MgSO ₄ *7H ₂ O	72,6
MgCl ₂ *6 H ₂ O	61,6
CaCl ₂ *2 H ₂ O	16,5
KNO ₃	11
KH ₂ PO ₄	0,77
NaHCO ₃	0,44
TrisHCl	34,672

pH 7,6

Tabelle 2: Zusammensetzung des Salzwassermediums zur Produktion von *Porphyridium purpureum*

Komponente	Konzentration [g/l]
Hefeextrakt	3
Malzextrakt	3
Pepton	5
Glukose	20

Tabelle 3: Zusammensetzung des komplexen Mediums zur Produktion von *Saccharomyces cerevisiae*

Kultivierung eines Modellsystems zur Produktion extrazellulärer Enzyme:

Bacillus licheniformis produziert extrazellulär Enzyme. Sowohl eine alkalische Protease als auch eine Alpha-Amylase werden sekretiert ¹⁷. Um eine genaue Analytik der Enzyme zu ermöglichen, wurde versucht ein synthetisches Medium zu finden, welches gutes Wachstum ermöglicht, dabei jedoch genau definiert ist. Tabelle 1 zeigt die Medienzusammensetzung, die sich als gut geeignet erwiesen hat. Komplexe Medien haben sich für die Analytik als schwierig erwiesen, da sie undefinierte Mengen verschiedener Proteine und Peptide enthalten. Das gefundene synthetische Medium garantierte ein gutes Wachstum bei gleichzeitig einfacher Analytik.

Somit konnte das Bakterium so kultiviert werden, so dass innerhalb von einem Tag eine BTM von ca. 6 g/l erreicht wurde. Der Verlauf der OD einer Kultivierung ist in Abbildung 3 zu sehen.

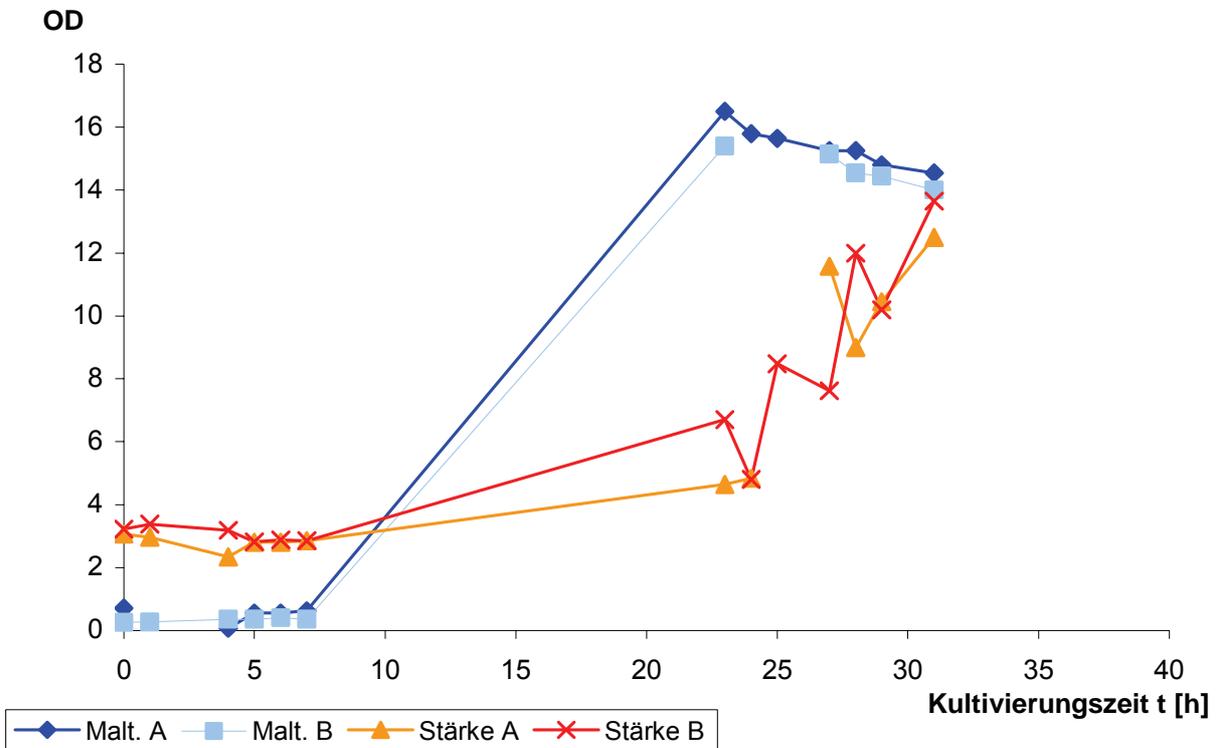


Abbildung 3: Kultivierungsverlauf von *Bacillus licheniformis* für unterschiedliche C-Quellen (1 OD-Einheit entspricht ca. 0,3 g BTM/l)

Um ausreichend Enzym zu produzieren wurde Stärke als C-Quelle benutzt, da diese höhere Proteasenproduktionsraten erwarten lässt¹⁸. Durch die Induktion mit Casein nach einem Tag Wachstum konnte eine Aktivität von ca. 70 NPU/ml erreicht werden (siehe Abbildung 4). Für die Amylasenproduktion wurde ebenfalls Stärke als C-Quelle genutzt und ca. 10 U/ml erreicht. *Bacillus licheniformis* hat sich daher als ein geeigneter Mikroorganismus erwiesen, mit dem Kultivierungen zur anschließenden Filtrationsuntersuchung durchgeführt werden können.

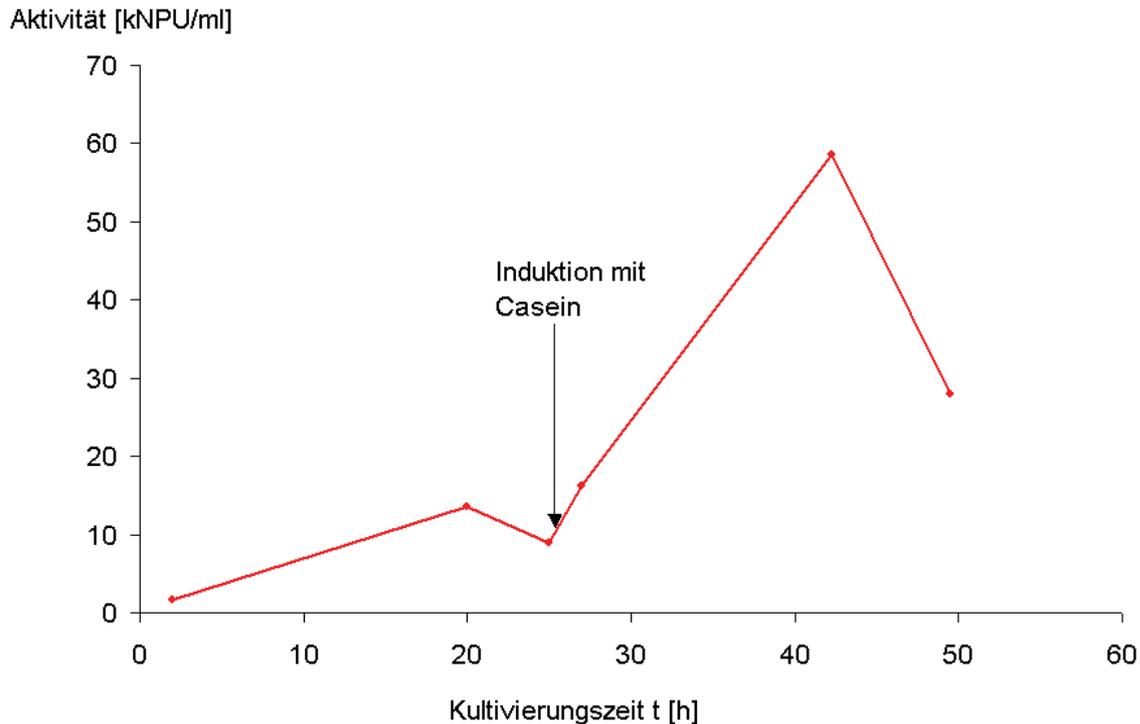


Abbildung 4: Aktivitätssteigerung (Protease) während der Kultivierung durch Induktion mit Casein

Kultivierung von *Porphyridium purpureum*:

Porphyridium purpureum ist eine einzellige Rotalge, die unter vielen anderen Produkten das für die chemische und pharmazeutische Industrie wichtige Pigment Phycobillin (Nutzung als Fluoreszenzfarbstoff) produziert.

Bei Mikroalgen liegt der Anteil von hoch ungesättigten C 20-Fettsäuren mit bis zu 45 % der gesamten Fettsäuren besonders hoch. Ihre präventive Wirkung gegen Herz-Kreislaufkrankungen ist erwiesen. Die biotechnologische Nutzung der Mikroalgen weitet sich aber auch auf verschiedene andere Anwendungsgebiete, wie z.B. Abwassertechnik zur Reinigung von schwermetallbelasteter Abwässer; Beurteilung der Wasserqualität; aber auch in der Nanotechnologie, wo die biologischen Feinstrukturen als Produkte betrachtet werden ¹⁹.

Die Rotalge wächst sehr gut in einem künstlichen Salzwassermedium (ASW: artificial salt medium) siehe Tabelle 2.

Ihre Größe beträgt ca. 6,5 µm. Die verwendeten Anreicherungsbedingungen sind: Temperatur: 20 °C (Rührreaktor) 24 °C (Schüttelkolbenkultur); CO₂-Konzentration: 3

% (d.h. Begasungsrate: 60ml/l/min); pH-Wert: 7,6; Schüttlerfrequenz: 300 U/min; Wachstumsrate: 0,16 / Tag Lichtintensität: 25 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$.

Wie in Abbildung 5 zu erkennen ist, dauert die Kultivierung mehrere Tage, um eine gewisse Biomassenkonzentration zu erhalten. Diese ist immer noch relativ gering. Nach einer solchen Batchphase wurde die Kultivierungsbrühe filtriert, um den Einfluss des elektrischen Feldes auf die Filtrationskinetik zu untersuchen.

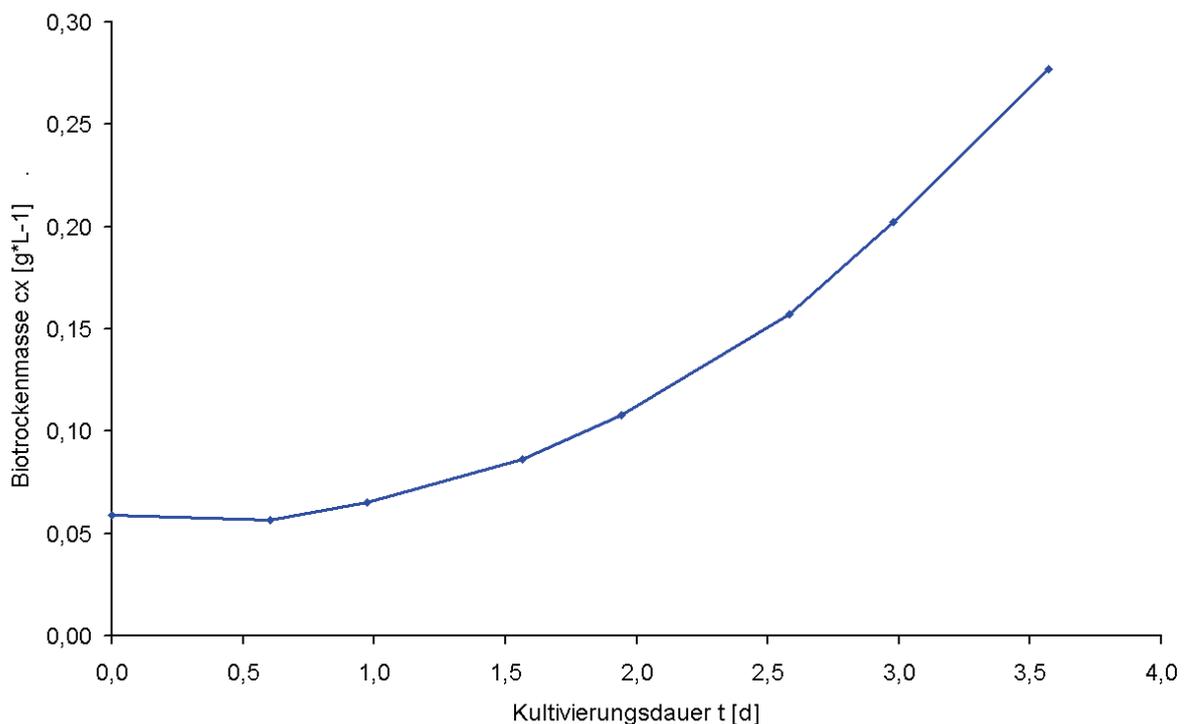


Abbildung 5: Kultivierungsverlauf von *Porphyridium purpureum*

Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*:

Saccharomyces cerevisiae wurde nach Übertragung der Stammkultur auf Universalnährboden für etwa 48 Stunden bei 30 °C Celsius wachsen gelassen. Danach wurden die frisch gewachsenen Kulturen ausschließlich in Schüttelkolben mit YM-Medium (vgl. Tabelle 3) zwischen 24 bis 48 Stunden bei 30 °C Celsius kultiviert. Die von uns gewählten Anreicherungsbedingungen für *Saccharomyces cerevisiae* in Schüttelkolben sind: Temperatur: 30 °C Celsius; Glukosegehalt: 30 g/l; Schüttelfrequenz: 100 Umdrehungen pro Minute; pH-Wert: 5,8; Kultivierungszeit: 24-48 Stunden.

In dieser Zeit wurde etwa eine BTM-Konzentration von 5-6 g/l erreicht (Daten nicht dargestellt). Die Biosuspension wurde anschließend in Filtrationsversuchen eingesetzt.

Ergebnisse

Biomasseabtrennung (Primärseparation)

Abtrennung von *Bacillus licheniformis*

Das erste Einsatzgebiet der Elektrofiltration sollte die Primärseparation nach einer Fermentation sein. Hierbei sollte die Biomasse abgetrennt und eingedickt werden, das extrazellulär gebildete Enzymprodukt aber möglichst vollständig ins Filtrat gelangen. Das elektrische Feld bewirkt hierbei eine Filterkuchenreduktion durch Elektrophorese. Dies resultiert in einer Erhöhung der Filtrationsgeschwindigkeit. Die Reduktion der als Sekundärmembran wirksamen Filterdeckschicht kann weiterhin die Produkttransmission erhöhen.

Nach einer *Bacillus*-Kultivierung wurde die Biosuspension konventionell in der Filterpresse filtriert. In Abbildung 6 ist die Filtratmasse über der Zeit aufgetragen. Nach ca. 10000 s wird dem Prozess ein elektrisches Feld überlagert, wodurch sich die Filtrationsgeschwindigkeit deutlich erhöht. Einerseits bewirkt die Elektroosmose einen erhöhten Filtratfluss, andererseits bewirkt die elektrophoretische Bewegung der geladenen Bacillen (Zetapotential -20 - -30 mV) in Richtung Anode einen Kuchenabbau auf der Kathodenseite. Durch diese Effekte kann innerhalb von einem Fünftel der Zeit, die bisher zur Filtration benötigt wurde, das Filtratvolumen verdoppelt werden.

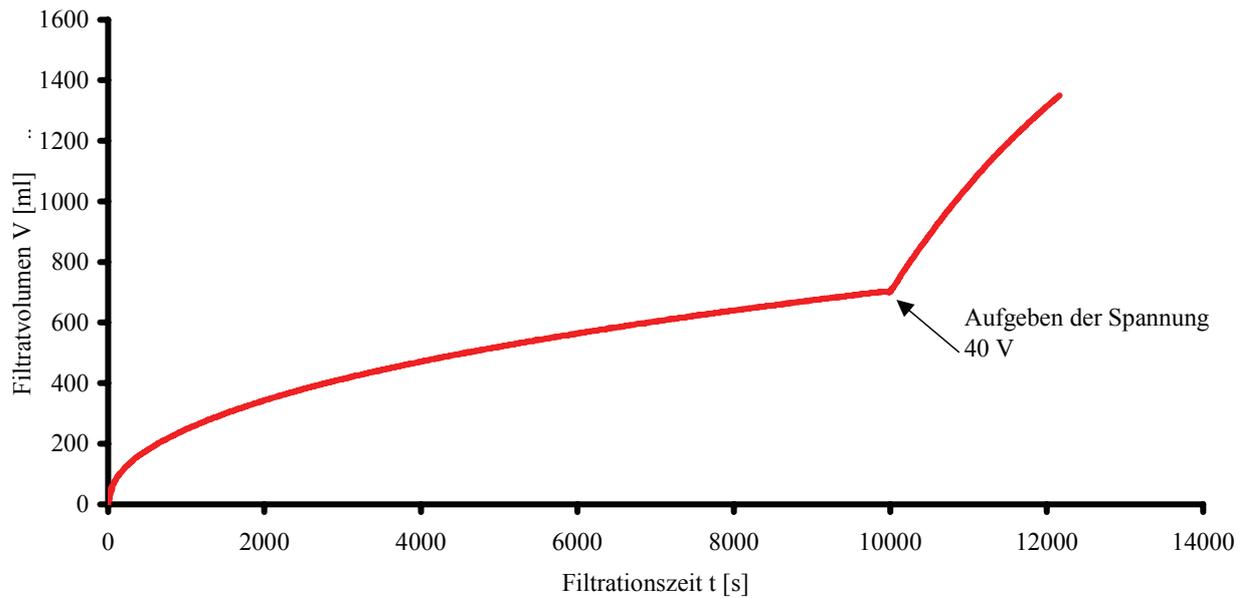


Abbildung 6: Filtrat über der Zeit für eine Pressfiltration, der bei ca. 10000 s ein elektrisches Feld überlagert wird

Wird von vorneherein eine Elektrofiltration durchgeführt, so ist der Effekt noch deutlicher. In Abbildung 7 ist ein t/V über V -Diagramm einer Filtration mit und ohne E-Feld dargestellt. Die Steigung in dieser Art der Auftragung ist proportional zum Filtrationswiderstand. Je geringer die Steigung, desto weniger Widerstand, also desto besser die Filtration. Wie zu erkennen ist, kann mit E-Feld die Steigung deutlich reduziert werden, so dass ein Filtratvolumen von etwa 700 ml in einem Zehntel der Zeit erreicht wird.

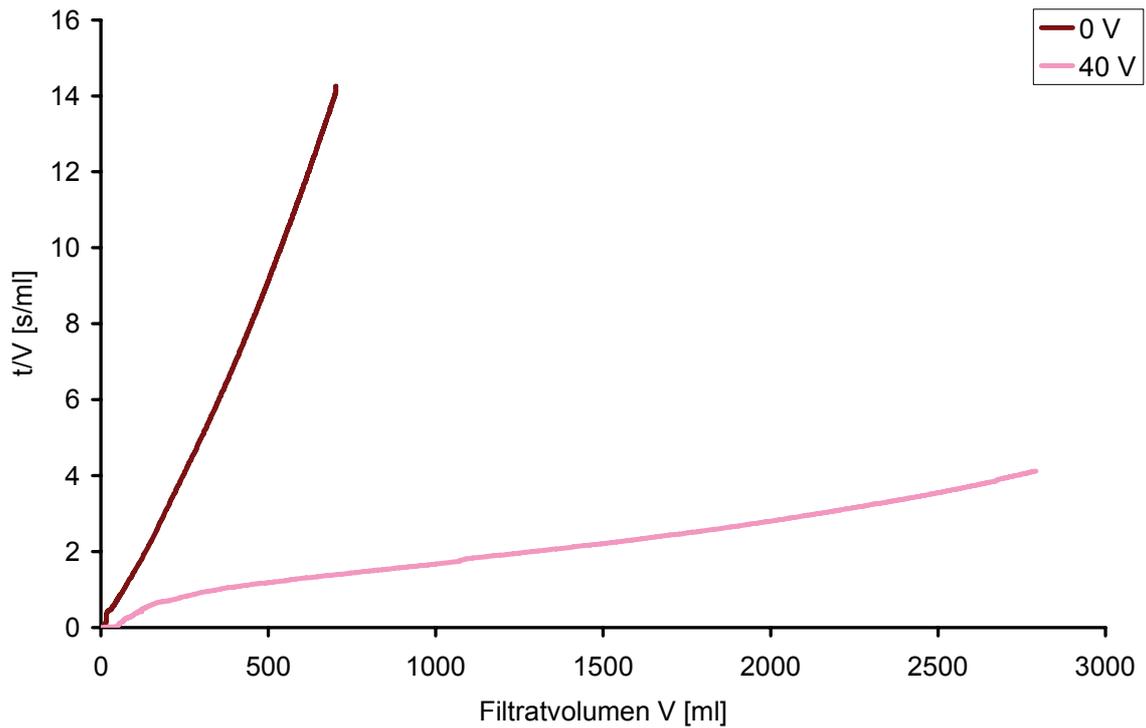


Abbildung 7: Filtrationskinetik im Vergleich zwischen Pressfiltration und Elektrofiltration für eine Biomasseabtrennung



Abbildung 8: Vergleich der Kathoden (links)- und Anodenseite (rechts) der Filterkammer nach einer Elektrofiltration von *Bacillus licheniformis*

Die Frage, ob Mikroorganismen tatsächlich elektrophoretisch wandern, also die Filtrationsgeschwindigkeit nicht etwa nur durch elektroosmotische Effekte gesteigert

wird, kann klar positiv beantwortet werden. Abbildung 8 zeigt die beiden Filterplattenseiten nach einer Filtration mit überlagertem E-Feld. Wie zu erkennen ist, unterscheiden sich die beiden gebildeten Deckschichten deutlich. Auf der Kathodenseite, von welcher die Partikeln abgestoßen werden, ist ein erkennbar kleinerer, weniger kompakter Filterkuchen zu erkennen als auf der Anodenseite. Das Messen der Filterkuchenmassen ergab, dass bei diesen Versuchen ca. 5-7 mal mehr Filterkuchen auf der Anodenseite abgeschieden wurde.

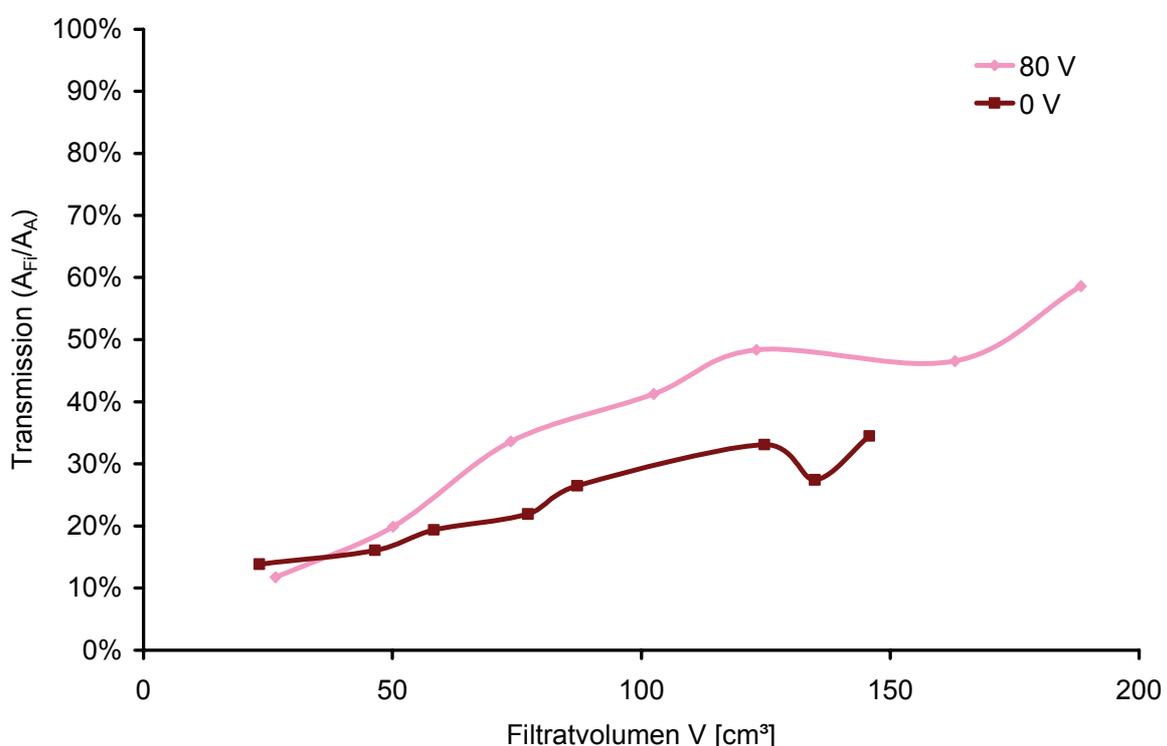


Abbildung 9: Aktivitätsausbeute über dem Filtratvolumen für die Filtration mit und ohne Feld in der Laboranlage

Die Ausbeute an aktivem Enzym ist neben der Filtrationsgeschwindigkeit von entscheidender Bedeutung. Hier ist die Frage, ob durch den Einsatz des E-Feldes diese Ausbeute gesteigert werden kann oder ob etwa die Enzyme an den Elektroden, mit denen sie nach einer Transmission durch die Membran in Kontakt kommen können, merklich zerstört werden. Zur Untersuchung wurden zunächst Versuche in einer Labor-Elektrofiltrations-Apparatur durchgeführt, bei welchen Filtratproben während des Versuchs gezogen wurden. Abbildung 9 zeigt die Ausbeute an aktivem Enzym (Protease) über dem Filtratvolumen im Vergleich

zwischen Elektrofiltration und Pressfiltration. Durch das E-Feld konnte die Ausbeute an Enzym sichtlich gesteigert werden, so dass zum Ende der Versuche ca. 20-30 % mehr Protease erhalten wurden. Die Befürchtung, dass an den Elektroden merkliche Enzymzerstörung stattfindet, kann hier daher nicht bestätigt werden.

Biomasseseparation bei Novozymes (Kopenhagen, Dänemark)

Zusätzlich zu den in unseren Labors durchgeführten Versuchen, hat Novozymes (Novo Nordisk, Dänemark) auch Versuche in den dortigen Forschungslabors ermöglicht. Biosuspensionen wurden dort bereitgestellt, welche mit unserer Pilotanlage filtriert wurden. Abbildung 10 zeigt, dass auch mit den realen Biosuspensionen, welche deutlich höher konzentriert als unsere Laborsuspensionen waren, durch eine E-Feldsteigerung ein positiver Effekt eintritt. Die Verdopplung des E-Feldes brachte eine starke Steigerung der Filtrationsgeschwindigkeit.

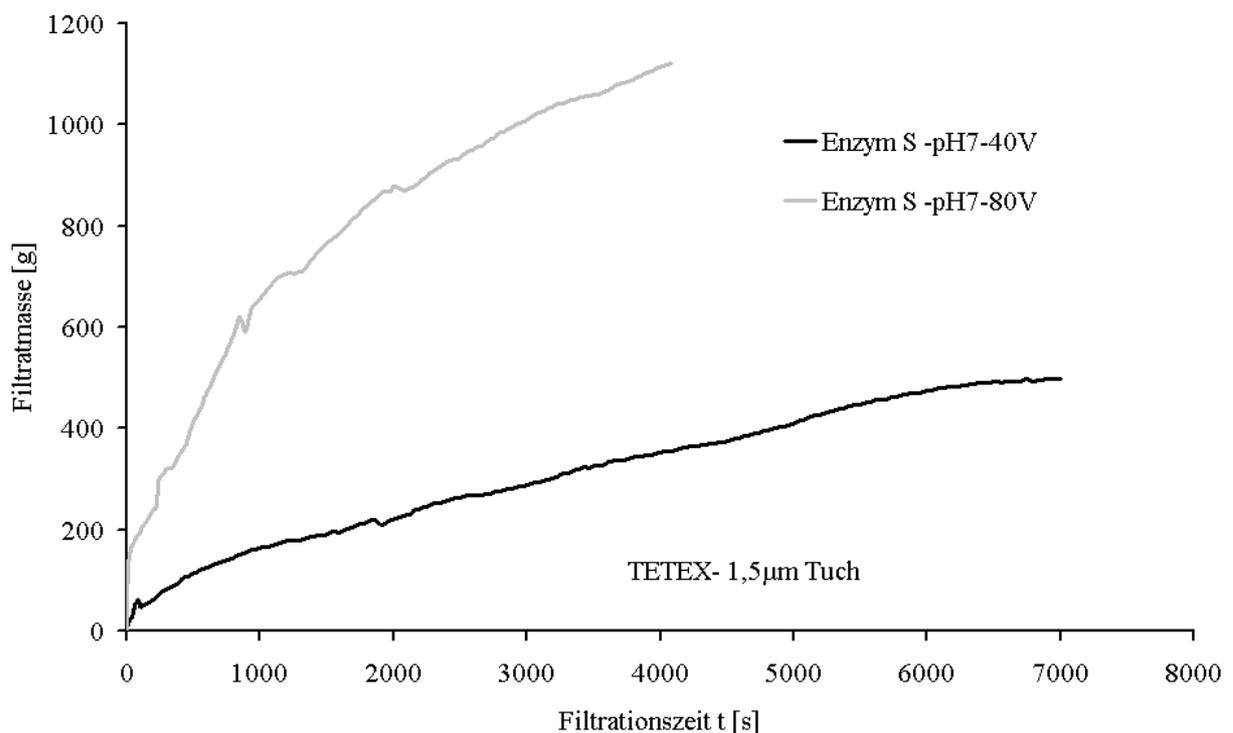


Abbildung 10: Filtratmenge über der Zeit bei Versuchen mit realer Biosuspension bei Novozymes mit unterschiedlich starkem E-Feld

Abbildung 11 stellt ebenfalls dar, dass durch das Anlegen von 30 V Spannung (1400 V/m) der Filtratfluss deutlich erhöht werden kann.

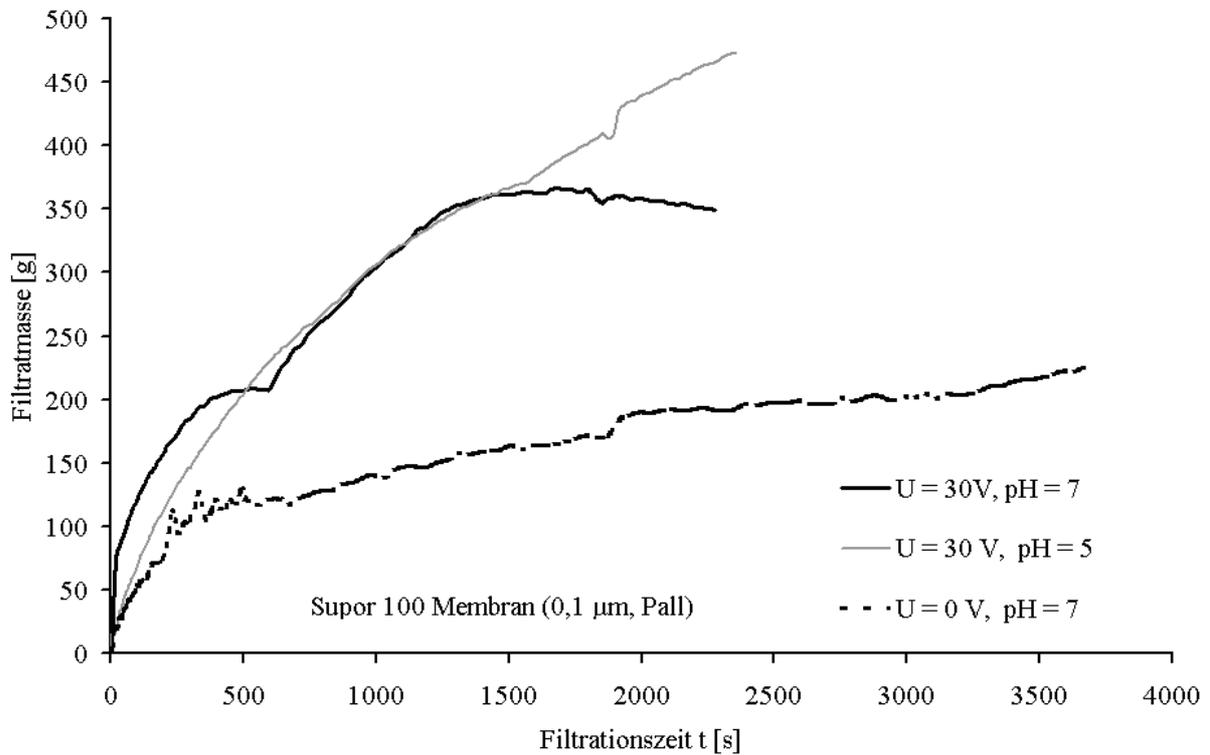


Abbildung 11: Filtratmenge über der Zeit bei Versuchen mit realer Biosuspension bei Novozymes mit und ohne E-Feld. Elektrofiltration für pH 5 und pH 7

Die Werte der beiden Abbildungen sind aufgrund nicht geeigneten Equipments (Waagen, Pumpen, Behälter) bei Novozymes zustande gekommen. Die von uns mitgebrachten Systeme waren im Maßstab zu groß.

Bei der Ausbeute an aktivem Enzym konnte jedoch nicht der gewünschte Effekt gezeigt werden. Filtrationen mit und ohne E-Feld zeigten eine Enzymtransmission von etwa 50 % (siehe Abbildung 12).

Aktivität Filtrat / Aktivität
Biosuspension

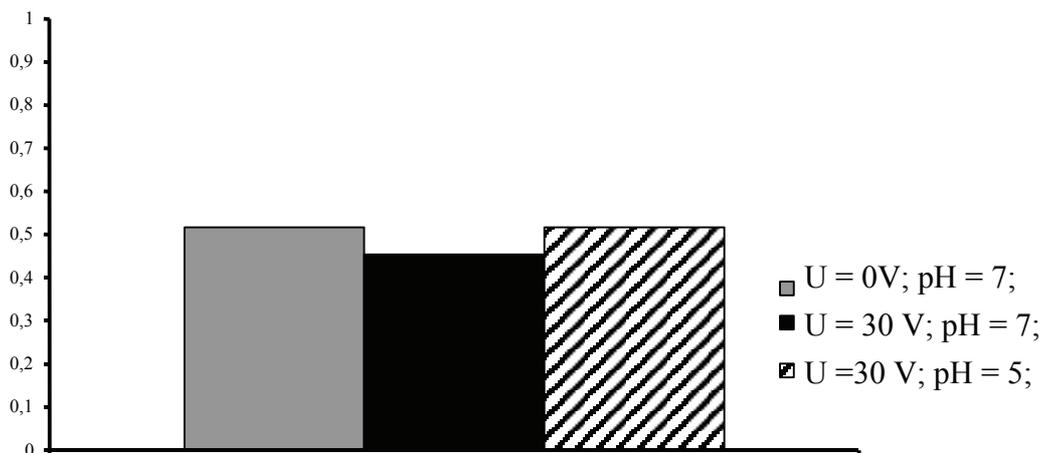


Abbildung 12: Ausbeute an aktivem Enzym (Protease) nach Filtrationen mit und ohne E-Feld zur Biomasseabtrennung bei Novozymes

Biomasseseperation: *Porphyridium purpureum*

Auch die Mikroalge *Porphyridium purpureum* wurde filtriert. Hierbei ergab sich der Filtrationsverlauf, der in Abbildung 13 wiedergegeben wird. Zu Beginn der Filtration konnte durch das elektrische Feld eine deutliche Beschleunigung des Filtratflusses erreicht werden. Zwar ist die Steigung beider Kurven nach etwa 500 s parallel, jedoch ist zu beachten, dass der Filtrationsdruck beim Versuch mit elektrischem Feld nur etwa halb so groß war wie beim Versuch ohne der E-Feld. Die in der Legende des Diagramms angegebenen Parameter unterscheiden sich von den bisherigen Angaben dahin gehend, dass hier der Strom, nicht die Spannung geregelt wurde. Dies hatte den Grund darin, dass das für *P. purpureum* nötige Salzmedium eine sehr hohe Leitfähigkeit hatte und daher ein relativ großer Strom bei geringer angelegter Spannung zu verzeichnen war. Da die Kabel nur bis 15 A vorgesehen sind und auch die Bildung von Elektrolyse-Produkten bis zu dieser Stromstärke ohne weiteren Aufwand gehandhabt werden kann, wurde in diesem Fall auf eine maximale Stromstärke von 15 A geregelt. Der Spannungsverlauf zeigt jedoch, dass die Spannung sich nur leicht im Verlauf des Versuchs ändert, von 13 auf 16 V.

Es kann festgehalten werden, dass die Filtrationskinetik von der relativ großen Mikroalge deutlich durch das elektrische Feld beeinflusst werden konnte und somit

dieses System prinzipiell für die Anwendung der Elektrofiltration geeignet wäre, wenn nicht die Leitfähigkeit des Mediums so hoch gewesen wäre.

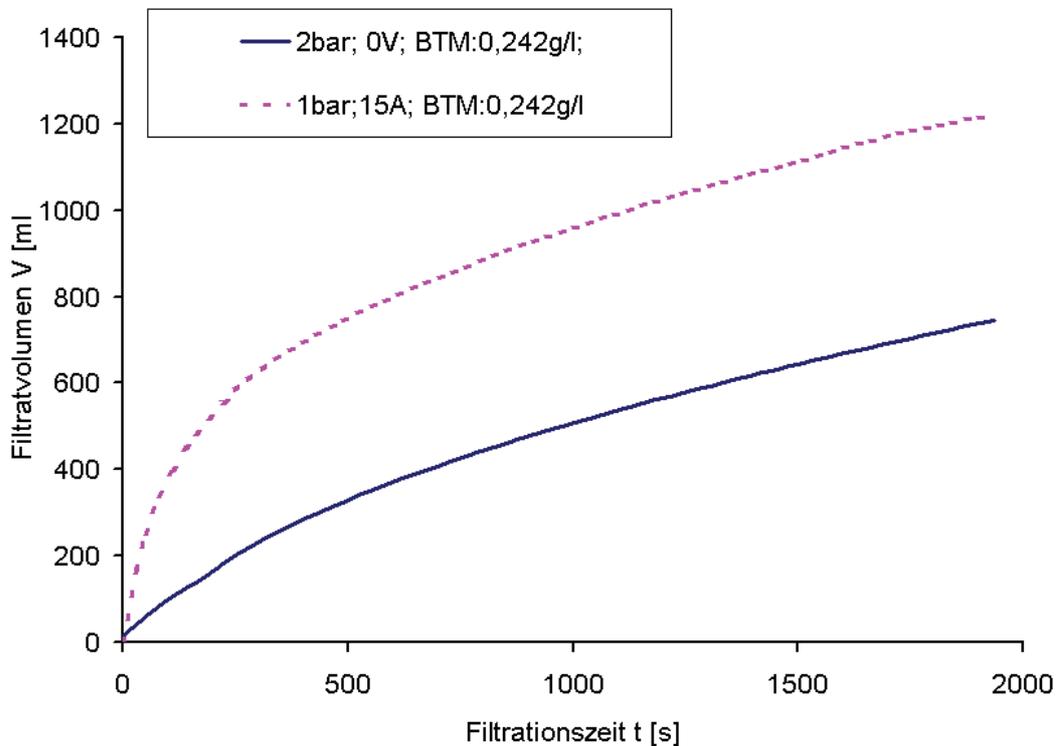


Abbildung 13: Filtratvolumen über die Filtrationszeit bei der Filtration von *P. purpureum* mit und ohne elektrischem Feld

Biomasseseperation: *Saccharomyces cerevisiae*

Als dritter Mikroorganismus wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Diese ist deutlich leichter zu filtrieren als die vorherig beschriebenen Organismen. In Abbildung 14 ist die Filtration für verschiedene angelegte Spannungen zu ersehen. Es ist kaum ein Unterschied zwischen den Versuchen zu erkennen, obwohl das Zetapotential etwa gleich groß war wie bei Bacillus oder der Alge. Der Grund hierfür ist die generell relativ einfache Filtrierbarkeit der Hefe, die zu hohen Filtratströmen führt. Die somit ebenfalls hohen hydrodynamischen Widerstandskräfte übersteigen die elektrische Kraft um etwa zwei Größenordnungen:

$$F_{el} = 4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot r_h \cdot \zeta \cdot E \quad (3)$$

$$F_r = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_h \cdot v \quad (4)$$

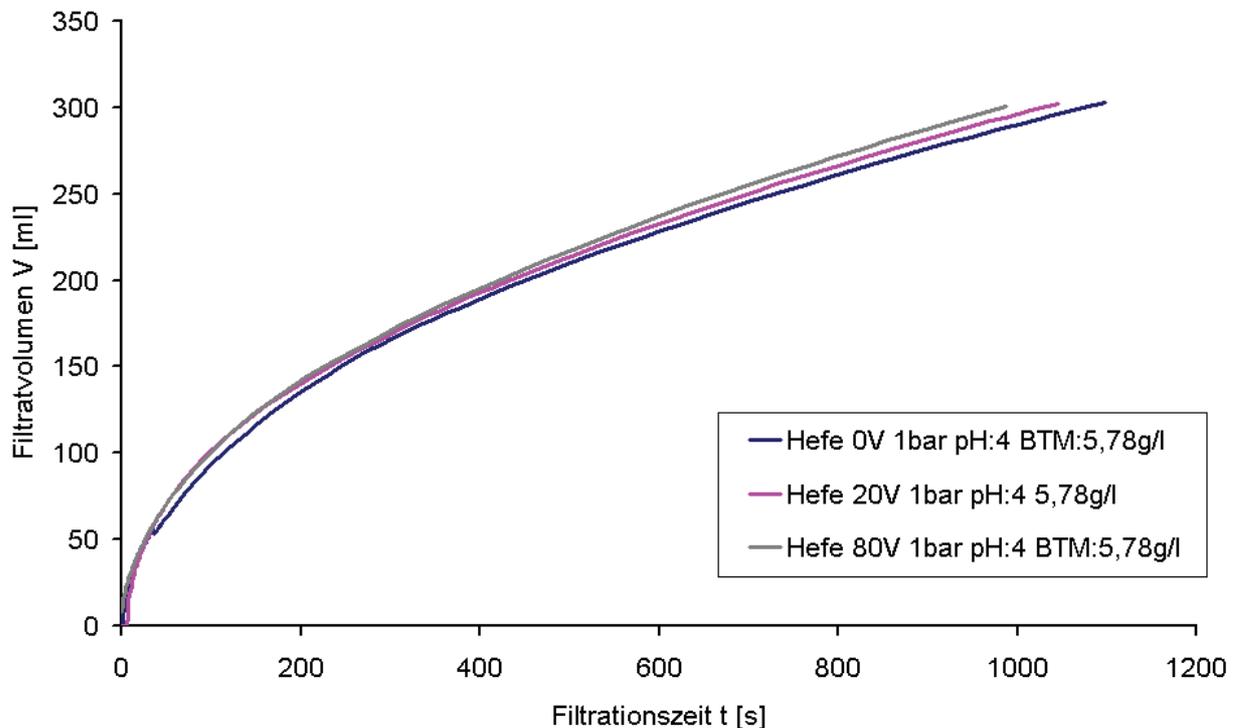


Abbildung 14: Filtration der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

In Tabelle 4 sind Daten für die Berechnung der Kräfte auf die Mikroorganismen gegeben. Das Verhältnis aus hydrodynamischem Widerstand und elektrischer Kraft sollte für die Elektrofiltration möglichst gering sein. Für die Berechnung der hydrodynamischen Widerstandskraft wurde ein Mittelwert des spezifischen Filtratflusses verwendet, der sich in eine Strömungsgeschwindigkeit umrechnen lässt. Wie zu erkennen ist, ist das Verhältnis der Kräfte für *Bacillus licheniformis* am besten, was auch in den Versuchen gezeigt werden konnte. Die Werte des elektrischen Feldes unterscheiden sich jeweils, da es unterschiedliche Leitfähigkeiten gab und darum auch unterschiedliche Spannungen angelegt werden mussten. Das effektiv in der Kammer wirksame elektrische Feld wurde mit folgender Gleichung berechnet, die voraussetzt, dass sich die Leitfähigkeit innerhalb der Kammer isotrop und über die Versuchsdauer konstant verhält:

$$E_{\text{eff}} = \frac{I}{\kappa \cdot A} \quad (5)$$

	hydrodyn. Durchm. [μm]	E [V/m]	Zetapotential [mV]	F_{hyd} [N]	F_{el} [N]	$F_{\text{hyd}}/F_{\text{el}}$
<i>Bacillus licheniformis</i>	0,8	392	-25	2,4E-14	3,5E-14	0,69
<i>Porphyridium purpureum</i>	6,5	222	-27,5	1,0E-11	1,8E-13	57
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7	697	-30	9,6E-11	6,5E-13	147

Tabelle 4: Berechnete Kräfte auf die unterschiedlichen Mikroorganismen

Enzymkonzentrierung

Neben der Primärseparation in einem Mikrofiltrationsschritt, sollte auch die Elektrofiltration für die Enzymkonzentrierung in einer Ultrafiltration eingesetzt werden. Hierzu ergaben Voruntersuchungen mit BSA Ergebnisse, die eine Steigerung der Filtrationsgeschwindigkeit um einen Faktor 2 durch das E-Feld zeigten. Für die realen Systeme wurden Enzyme von Novozymes verwendet. Es wurde eine Protease (Enzym S) konzentriert. Abbildung 15 zeigt die Kinetik einer Presselektrofiltration und einer Pressfiltration (Steigung ist Maß für Filtrationswiderstand). Die Kinetik konnte deutlich durch den Einsatz des E-Felds verbessert werden.

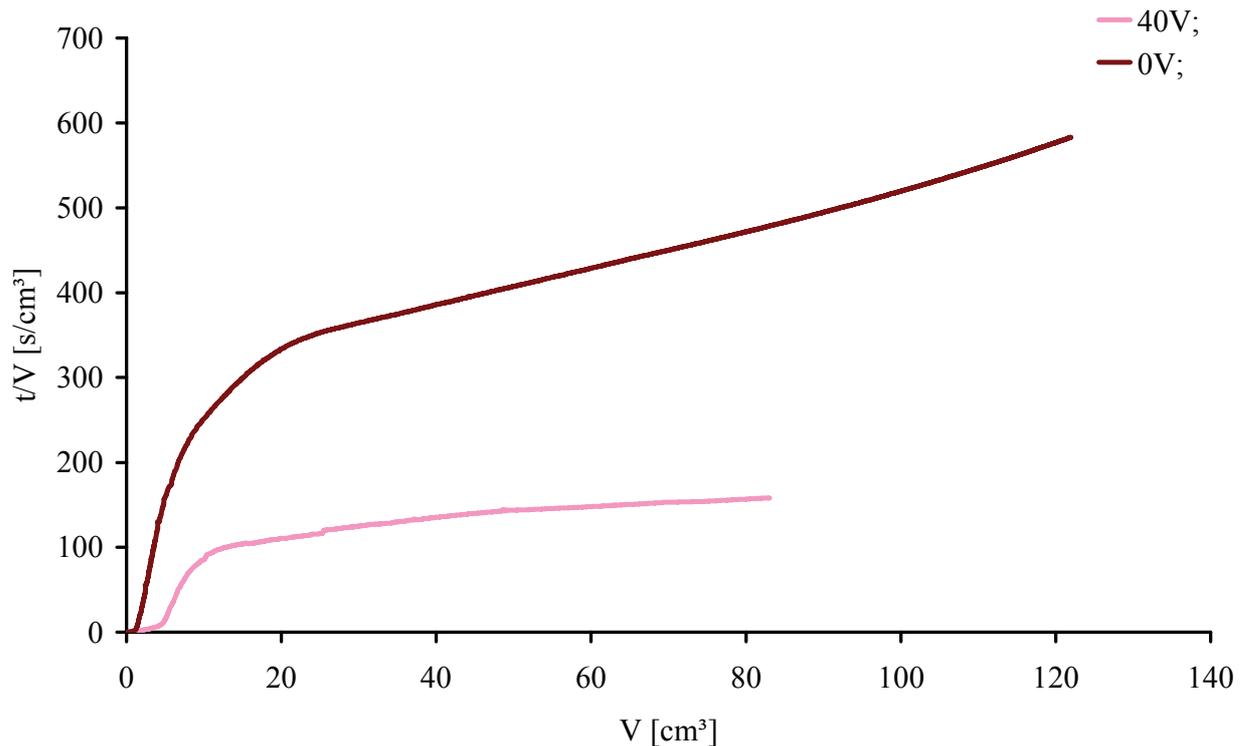


Abbildung 15: Konzentrierung von Enzym S – Lösung von Novozymes (Retentat Ultrafiltration ist Ausgangslösung)

Neben den kinetischen Untersuchungen sollte auch eine Evaluierung der Enzymaktivität bzw. deren Steigerung durchgeführt werden.

Bei Experimenten zur Konzentrierung stark salzhaltiger Enzymlösungen kommen die Proteine nicht direkt mit den Elektroden in Kontakt. Es flossen jedoch relativ hohe elektrische Ströme, da die realen Suspensionen eine hohe Leitfähigkeit hatten. Ausfällungen in der Filterkammer waren zu beobachten. Daher wurde die Gesamtzymaktivität in diesem Versuch reduziert. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die elektrische Wanderung von höher geladenen Ionen (z.B. Ca^{2+} oder Mg^{2+}), welche sich in der Lösung befinden. Diese treffen auf die Konzentrationspolarisationsschicht der Enzyme, wo sehr hohe Konzentrationen herrschen. Diese beiden Umstände führen zu einem Ausfällen, bzw. zur Denaturierung der Enzyme. Weiterhin kann bei hohen Stromstärken evtl. die Migration von H_3O^+ -Ionen in die Filterkammer möglicherweise nicht vollständig verhindert werden, sodass auch pH-Gradienten entstehen, die zur Aktivitätsabnahme beitragen. Hier könnte ein Dialyseschritt vor der eigentlichen Filtration sinnvoll sein. Für das Enzym Amylase, das ebenfalls untersucht wurde, wurde durch Novozymes entsalztes, konzentriertes Enzym bereitgestellt. Hier waren die Verluste an Aktivität

durch das E-Feld nicht mehr vorhanden. Der pH-Wert spielt hier jedoch für die Stabilität eine wichtige Rolle. Abbildung 16 zeigt die Ausbeuten, also die gesamte Enzymaktivität in Filtrat und Retentat dividiert durch die mittels der Ausgangslösung errechneten, für Versuche mit der Amylase. Der Einfluss des E-Felds scheint nicht vorhanden, jedoch ist eine klare Abhängigkeit vom pH-Wert zu sehen. Bei pH 9 bleiben die Amylasemoleküle relativ stabil.

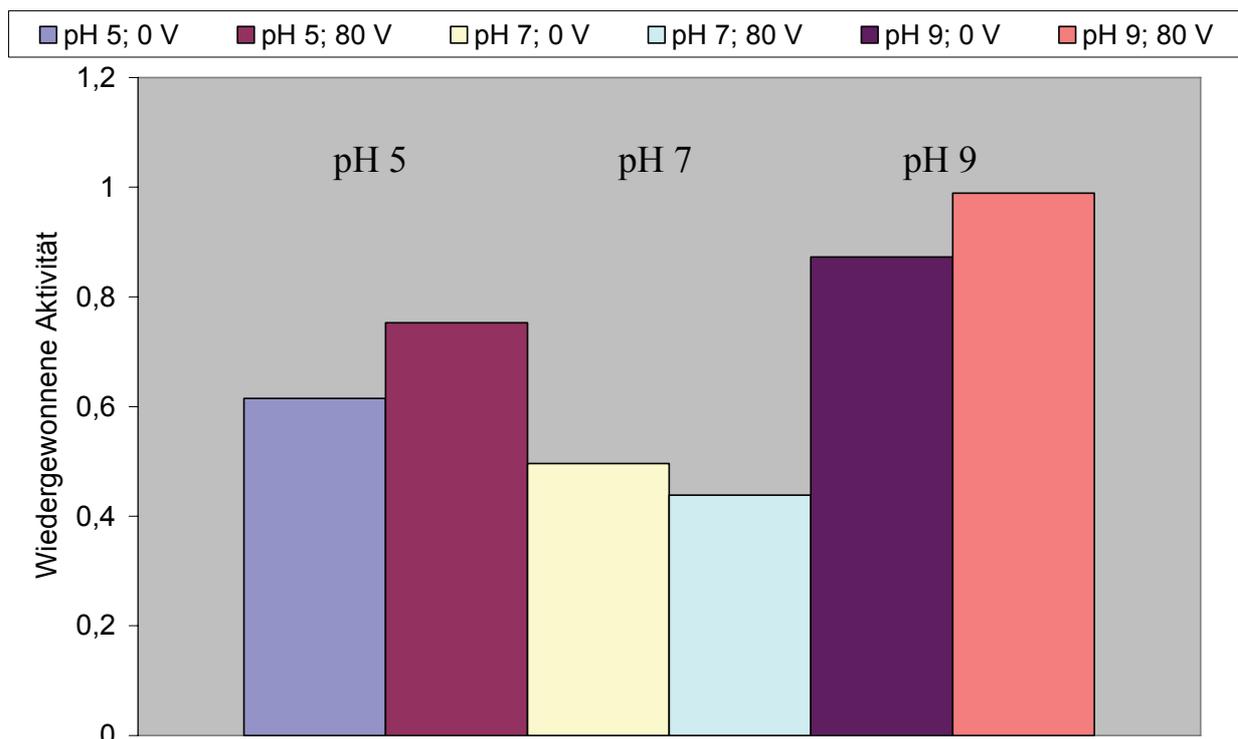


Abbildung 16: Wiedergewonnene Aktivität ($A(\text{gemessen})/A(\text{berechnet})$) für Amylase-Press- und Presselektrofiltrationen bei unterschiedlichen pH-Werten

Enzymfraktionierung

Neben Enzymkonzentrierungen, ist auch die Fraktionierung von Proteinen eine wichtige Aufgabe in der Enzymproduktion. Dies wird häufig im größeren Maßstab durch chromatographische Verfahren bewerkstelligt, falls sehr hohe Selektivitäten benötigt werden. Der Einsatz der Elektrofiltration in diesem Bereich könnte auch eine Alternative bringen, da neben der Nutzung der sterischen Eigenschaften bei der konventionellen Ultrafiltration auch die elektrische Ladung als Separationsmerkmal

genutzt wird. Abbildung 17 zeigt die Vorgänge bei einer Elektro-Ultrafiltration zur Enzym- bzw. Proteinfractionierung. Es wurden zwei verschiedene Ultrafiltrationsmembranen verwendet, um das Gemisch sowohl sterisch als auch elektrophoretisch zu trennen.

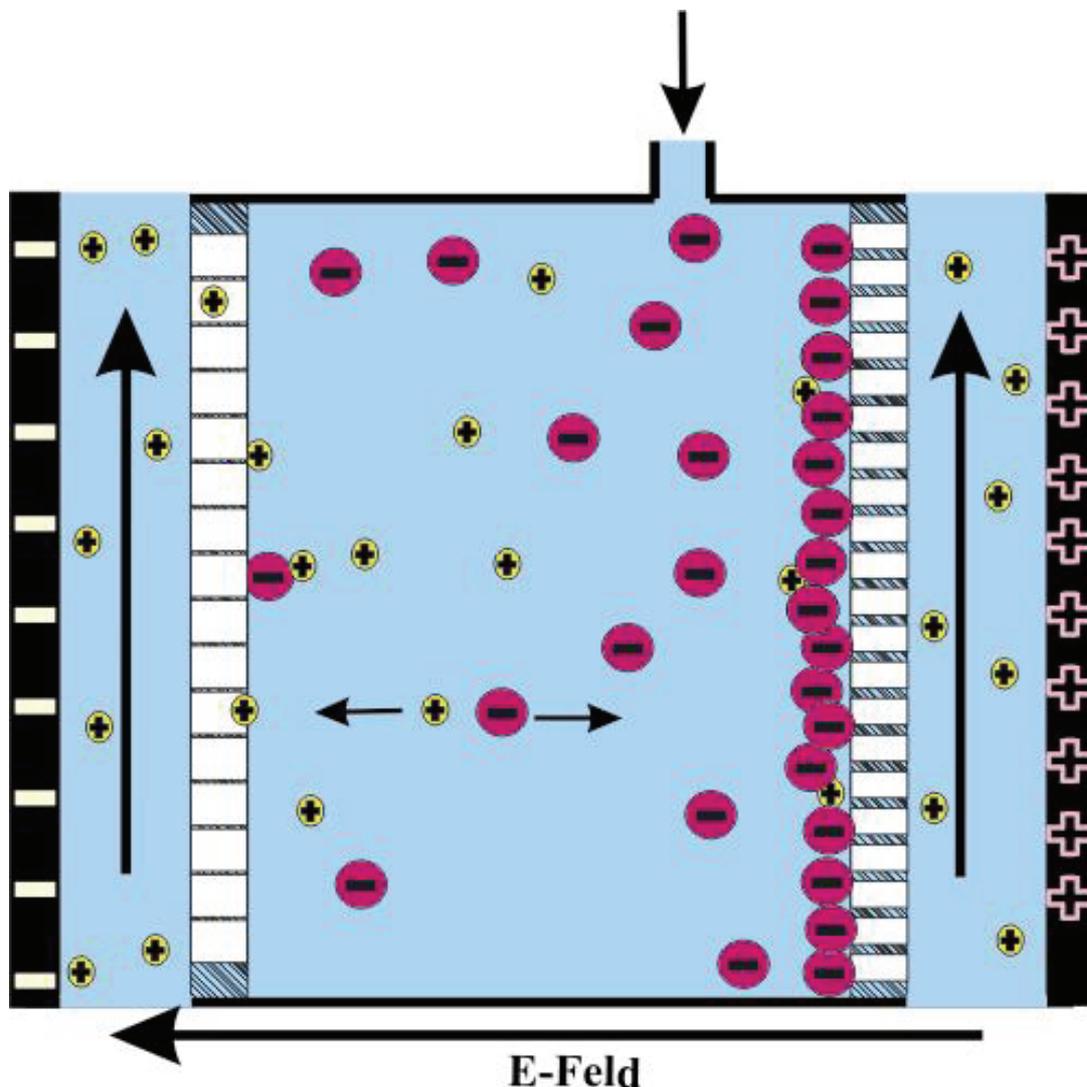


Abbildung 17: Vorgänge bei der zweiseitigen Elektrofiltration zur Fraktionierung eines binären Proteingemisches

Die Separierung des Modellsystems BSA (pI 4,9, 69 kDa) und Lysozym (pI 10,8, 14 kDa) zeigte deutliche Steigerungen der Transmission von Lysozym und Reduzierungen für die BSA-Transmission (Abbildung 18). Dies führte zu sehr hohen erreichten Selektivitäten im Prozess. Die Reinheit des als Produkt anzunehmenden Lysozyms ist dadurch äußerst hoch. Weiterhin konnte ein starker Anstieg der Filtrationsgeschwindigkeit durch das E-Feld erreicht werden (siehe Abbildung 19).

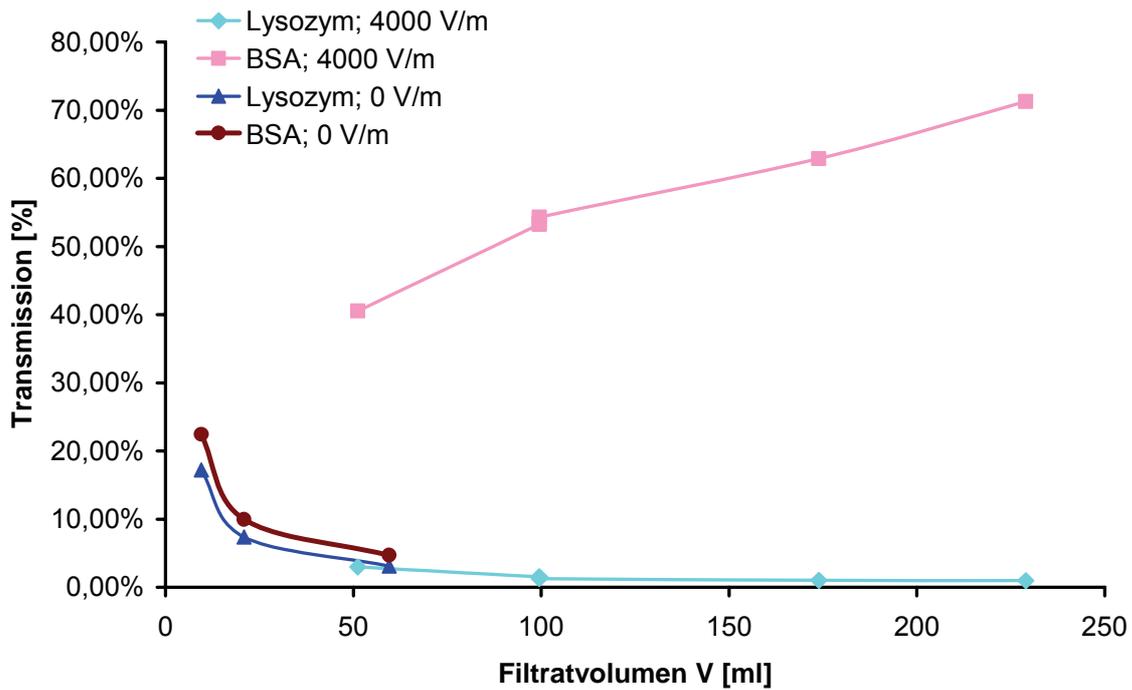


Abbildung 18: Proteintransmission bei einer binären Fraktionierung mit und ohne elektrisches Feld

Die fraktionierende Ultrafiltration ist daher neben der Enzymkonzentrierung und der Biomasseabtrennung ein weiteres mögliches Einsatzgebiet der E-Filtration innerhalb der industriellen Enzymproduktion. In weiteren Versuchen wurden Selektivitäten von über 800 ermittelt.

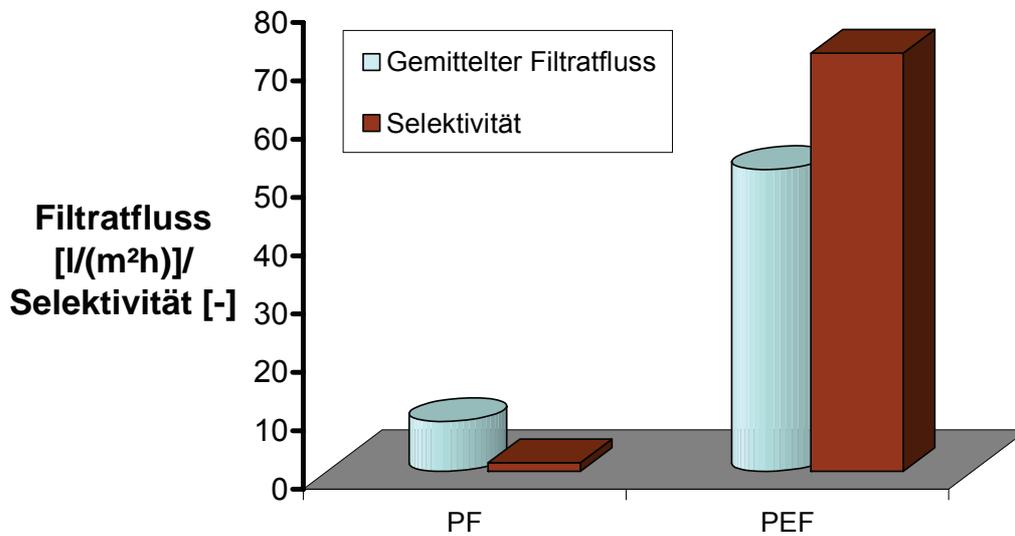


Abbildung 19: Einfluss des E-Felds auf Selektivität und Filtratfluss bei einer Fraktionierung

Das elektrische Feld dient bei der fraktionierenden Filtration nicht nur der Selektivitätsverbesserung, sondern kann die Filtration auch deutlich in deren Kinetik verbessern. Filtrationen können gewöhnlich durch die Erhöhung des angelegten Differenzdruck beschleunigt werden. Allerdings ist bei kompressiblen Medien oft eine Grenze erreicht, ab der die Erhöhung des Filtrationsdruckes nur eine Komprimierung der Deckschicht auf der Membran bewirkt, die diese wiederum weniger permeabel werden lässt. Daher kann eine Erhöhung des Druckes in einem solchen Fall keine wesentliche Erhöhung der Filtrationsgeschwindigkeit bringen. In Abbildung 20 ist die Fraktionierung des Gemisches aus BSA und Lysozym dargestellt, indem das Filtratvolumen über die Zeit gezeichnet wurde. Die Erhöhung des angelegten Druckes von ein auf zwei bar bringt bei den Versuchen ohne elektrisches Feld nichts, allerdings steigert die Anlegung eines elektrischen Feldes die Ausbeute an Filtrat enorm. Sowohl durch elektrophoretische Wanderung des BSA, das im Fall ohne E-Feld auf beiden Filterkammerseiten eine Deckschicht bildet, auf die Anodenseite, als auch elektroosmotische Effekte bewirken diese Beschleunigung.

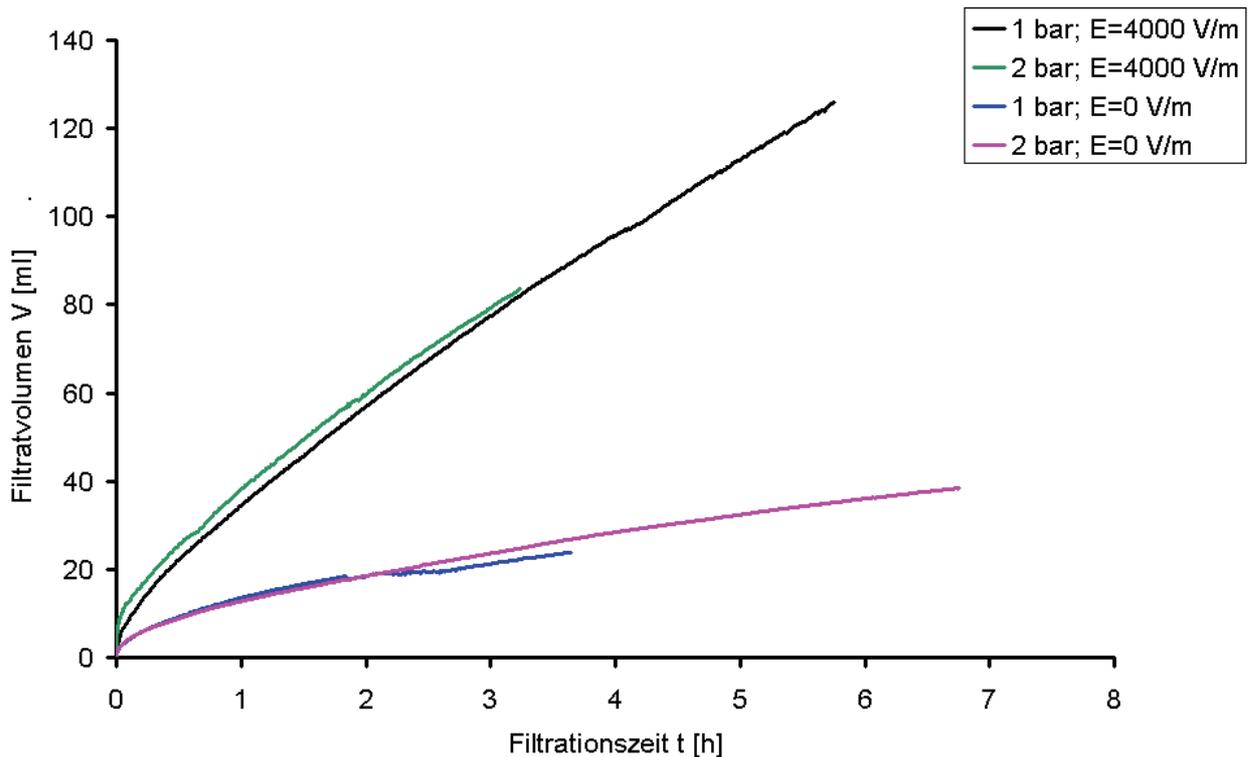


Abbildung 20: Filtratvolumen über die Zeit bei Fraktionierungen mit verschiedenen Drücken mit und ohne E-Feld

Enzymstabilität in der Elektrofiltration

Da Enzyme in der Elektrofiltration auch direkt in Kontakt mit den Elektroden kommen können, ist die Frage nahe liegend, ob diese an den Elektroden evtl. beschädigt oder zerstört werden können. Um dies zu untersuchen wurden die im Filtrat vorliegenden Enzyme sowohl mit Konzentrationsbestimmungsmethoden als auch mit Enzymaktivitätstests bestimmt. Sollten Enzyme geschädigt werden, so müsste sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Werten ergeben. In Abbildung 21 ist das Ergebnis solcher Untersuchungen in Form von Transmissionswerten gegeben. Wie zu erkennen ist, waren die Unterschiede zwischen Konzentration und Aktivität nur gering und durch Messfehler zu erklären. Laut Literatur können Enzyme durch elektrische Felder geschädigt werden²⁰. Allerdings war der Effekt erst ab Feldstärken zu beobachten, welche um 3 Größenordnungen höher lagen als sie in der Elektrofiltration vorkommen. Dennoch war die Untersuchung notwendig, da bei der Elektrofiltration längere Zeiten ein Einwirken des E-Felds auf die Enzyme stattfinden kann und in Elektrodennähe (Helmholtzschicht) durchaus Felder der Höhe erreicht werden, die zu einer Schädigung führen können.

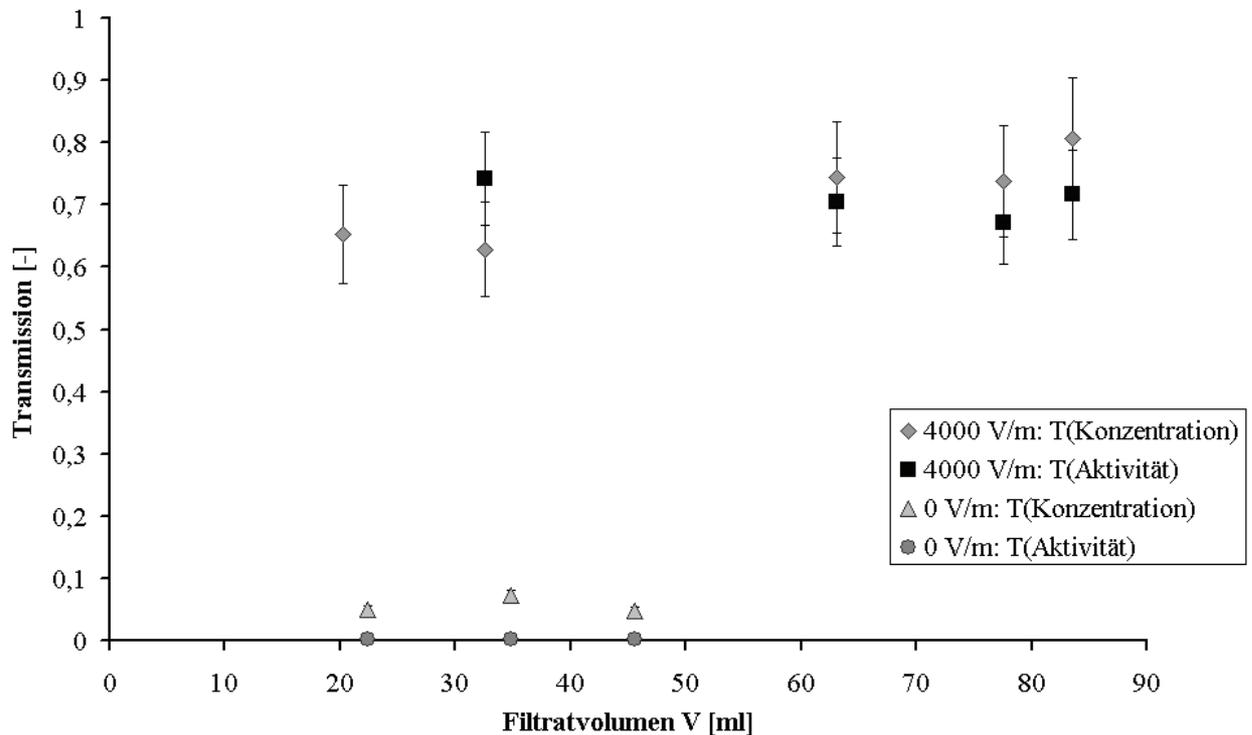


Abbildung 21: Transmissionswerte bei verschiedenen Experimenten, die mit Aktivitäts- und Konzentrationsbestimmungen ermittelt wurden.

Elektrokerzenfilter

Die Geometrie der ebenen Elektro-Filterplatten hat sich, wie in den Versuchen gezeigt, bewährt, jedoch sollte durch ein neues Konzept die Effizienz des Energieverbrauchs gesteigert werden. Die Konstruktion des Elektrokerzenfilters (EKF) war eine der wesentlichen Aufgaben innerhalb dieses Forschungsprojekts. Durch diese Entwicklung sollte das Elektrofiltrationsprinzip vor allem hinsichtlich des Energieverbrauchs verbessert werden. Um eine Vergleichbarkeit mit der vorhandenen Filterplatte zu gewährleisten, wurde der Filter so konstruiert, dass die Membranflächen der Arbeitsmembran gleich groß sind. Weiterhin sollte das Radienverhältnis der beiden Membranen möglichst groß sein, jedoch noch so, dass auch die Elektrodenabstände und Kammervolumina bei EKF und ebener Platte möglichst im gleichen Bereich liegen. Die Maße sind in Tabelle 5 angegeben. Abbildung 22 zeigt die Konstruktion und den gebauten Apparat.

Konstruktion

Randbedingungen:

Es wurde ein Kerzenfilter konstruiert, der folgenden Anforderungen genügen soll:

- Dichtigkeit nach außen, Druckfest bis 10 bar
- Keine Kurzschlüsse zwischen Filterkammer und Elektrodenspülkammer. Die Elektroden sollen gleichmäßig überströmt werden.
- Demontierbarkeit und Montierbarkeit im „Ein Mann“-Betrieb
- Reinigbarkeit
- SIP Fähigkeit
- Sicherheit für Anwender

Kammervolumen: 485 cm³

Abmessungen: Höhe 250, Ø_{mem innen} 30, Ø_{mem außen} 58,
Elektrodenabstand 20 mm

Spannungsbereich: 0-80 V

Maximaler Strom: 15 A

Elektrodenmaterial: Ti, IrO₂

Maximaler Betriebsdruck: 10 bar

Tabelle 5: Maße und Betriebsparameter für den Elektrokerzenfilter

Elektroden: Gelb, Membran+Stützgewebe: Grün, Spülzuführung innen: Blau, Spülzuführung außen: Rot,Grau

-Befüllung der Kammer von unten, zentral angeordnet

-Spülzuführungen und Filtratabläufe sind ringförmig angeordnet

-Außenelektrode ist mit Spülzuführung außen (Rot,Grau) dicht verschraubt,

-Spülzuführung innen (Blau) mit über Zentralmutter verschraubter Innenelektrode ist durch Lösen der Haltescheiben demontierbar

Bild EKF (rechts), 2-d-Ansicht (oben)

Bei dem Apparat muss der Raum zwischen der Elektrode und der Membran von einer Spülflüssigkeit durchströmt werden, um entstehende Elektrolysegase auszutragen und einen negativen Effekt auf die Homogenität des elektrischen Feldes sowie chemische Reaktionen zwischen Substrat und Elektrolyseprodukten zu verhindern. Um den dafür notwendigen Abstand zwischen Elektrode und Membrane zu gewährleisten, muss dieser Raum mit einem nicht leitfähigen, hochporösen Stützmaterial gefüllt werden. Um eine gleichmäßige Durchströmung des Stützmaterials zu gewährleisten, muss die Aufgabe der Spülflüssigkeit gleichmäßig auf dem gesamten Umfang erfolgen.

Die Filtrations- und Spülkammern dürfen nicht durch einen Kurzschluss verbunden sein, die Filtrationsmembranen müssen aber möglichst leicht ausgewechselt werden können und es sollen sowohl Mikro- wie auch Ultrafiltrationsmembranen eingesetzt werden können.

Die Filtrationskammer ist entlüftbar.

Es war auf eine Konstruktion ohne Totzonen zu achten, da sowohl die CIP- wie auch die SIP-Fähigkeit gewährleistet sein sollte.

Bedingt durch die vorgegebenen Durchmesser der Elektroden gestaltete sich die konstruktive Lösung der Abdichtung/Klemmung bei den Membranen als die größte Hürde.

Inbetriebnahme

Bei einem Montage/Funktionstest ergaben sich folgende Probleme:

- Montage des unteren Spannrings Außenelektrode; Hier musste Spezialwerkzeug angefertigt werden

- Dichtringe: die verwendeten Standard O-Ringe mussten gegen der Geometrie angepasste, gegossene Konturringe aus Silikon o.ä. getauscht werden.

Abschließend bleibt anzumerken, dass das Design des Prototypen nicht einer industriell einsetzbaren Variante entspricht. Hierfür müssen u.a. Spritzgussteile zum Einsatz kommen; Für die Klemmung der Membranen sind Kaufteile zu ermitteln, das Stützgewebe und die Membranen müssen ringförmig vorkonfektioniert erhältlich sein, z.B. in Form einer Keramikmembran.

Polymermembranabdichtung im EKF

Eines der Hauptprobleme ergab sich, die zylinderförmige Membran in dichtem Zustand in die Apparatur einzubauen. Sowohl an der Ober- bzw. Unterseite als auch an der Klebstrecke entlang der Membran musste eine Lösung gefunden werden, die garantiert, dass keine Ausgangslösung ins Filtrat gelangen kann. Zunächst war ein Konzept vorgesehen, das die Dichtung an der Ober- und Unterseite mit O-Ringen und deren Andrücken auf die Membran bewerkstelligt. Da allerdings das unter der Membran befindliche Stützgitter zur Spülung der Elektroden nicht eben ist, konnte kein ausreichender, gleichmäßiger Druck auf die Berührstelle Membran-O-Ring aufgebracht werden. Eine Lösung des Konzepts könnte der Austausch der letzten Stücke des Stützgitters durch einen glatten Ring sein, der mit Rillen versehen ist, damit die Spülflüssigkeit weiterhin hindurch treten kann (siehe Abbildung 30 im Anhang). Allerdings ist dann noch die Überlappungsstelle der Membran eine Unförmigkeit, die ebenfalls zu einer Undichtigkeit führen kann. Daher wurde beschlossen zunächst die Ober- und Unterseite mit Silikon zu dichten. Der Nachteil dabei ist, dass die Membran nicht zerstörungsfrei ausgebaut werden kann, sondern im EKF gereinigt werden muss.

Neben der Ober- bzw. Unterseitendichtung musste auch ein geeignetes Verfahren zur Dichtung an der Fügestelle der Membran gefunden werden (Abbildung 23). Der Grund für dieses Problem liegt u.a. darin, dass keine zylinderförmigen Polymermembranen von den Herstellern geliefert werden. Die Empfehlung dieses Membranherstellers war, die Stelle zu kleben. Ein externer Fachmann wurde bzgl. der Auswahl des Klebstoffes befragt, jedoch war der vorgeschlagene Klebstoff nicht

geeignet, da er die Membran angriff. Eine weitere Recherche endete ohne Ergebnis. Vor allem die Information bzgl. der Verklebung des Materials Polyethersulfon war schwierig zu finden. Eine Alternative könnte das Schweißen sein, jedoch waren erste Versuche problematisch, da die Verschweißung über 26 cm Länge nicht einfach bewältigbar ist. Zu langes Erhitzen, kann zum Durchbruch der Schweißstelle führen, zu kurzes Erhitzen resultiert in nicht ausreichender Verschweißung.

Daher wurden weitere Kleber empirisch gesucht. Ein industrieller Klebhersteller (Weicon) wurde konsultiert, die großen Klebefirmen (Uhu, Tesa, Pattex) befragt. Nach Versuchen über die Verklebung, zeigte sich vor allem die Schwierigkeit, dass die Klebung in der Nässe halten muss. Als noch am besten geeigneter Kleber stellte sich UHU PVC heraus. Dieser hat zwar den Nachteil, dass die Membran bei der Verklebung Wellen schlägt und daher die Montage recht diffizil ist. Jedoch weist diese Verklebungsmethode ausreichende Nässebeständigkeit auf.

Für die Ober- und Unterseiten-Dichtung wurde ebenfalls empirisch ein geeigneter Silikonwerkstoff oder Silikonersatzstoff gesucht. Dieser musste auch im wässrigen die Dichtigkeit garantieren. Ein Problem ergab sich hierbei, dass die Einlagerung der Membranen nach dem Versuch in NaOH-Lösung, wie vom Membranhersteller empfohlen, für Silikone ungeeignet ist. Daher konnte die Membran nur in Wasser gelagert werden, das des öfteren ausgetauscht werden musste.

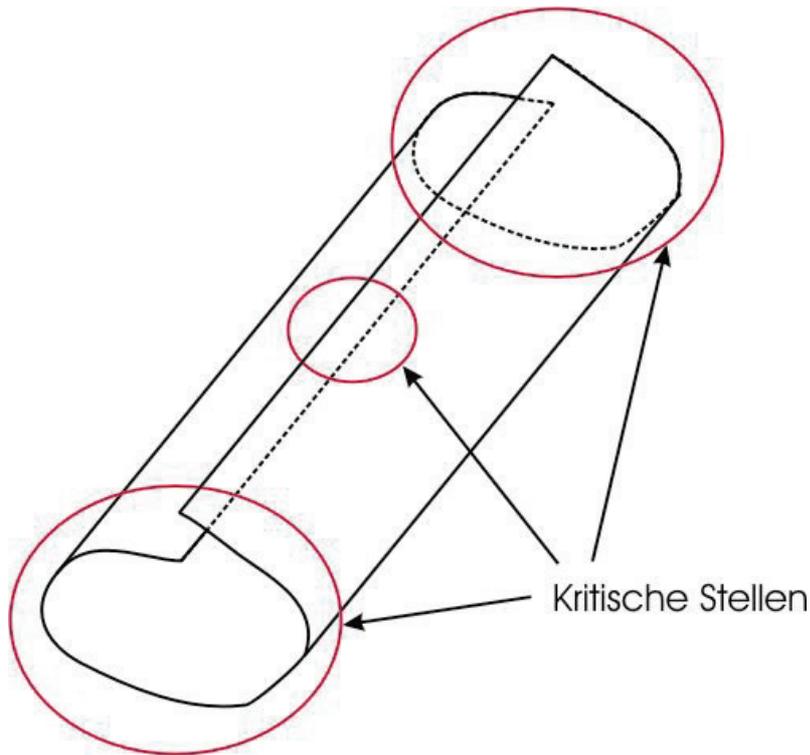


Abbildung 23: Kritische Stellen bei der Verklebung der zylindrischen Membran

Da die Klebestelle, die eine Dichtigkeit garantieren musste, auch gewisse Ausmaße von ca. 2 cm des Durchmesser hatte, konnte diese Fläche nicht als Filtrationsfläche genutzt werden. Zusammen mit den Silikondichtstellen an Ober und Unterseite (jeweils 2,5 cm Höhenverlust) wurde somit eine Fläche von ca. 36 % der Gesamtmembran verloren. Bei den Berechnungen wird diese Randbedingung berücksichtigt. Auch das elektrische Feld wird durch diesen Umstand verändert, jedoch sollte die Größe des E-Felds an der Innenmembran entweder größer oder gleich groß sein wie im wirklich radial homogenen Fall. Abbildung 24 zeigt die Verklebungen schemenhaft.

Das Membranmaterial (Polyethersulfon), wurde aufgrund seiner sehr guten Eigenschaften, wie hohe Porosität, pH-Stabilität, geringe Proteinadsorption, nicht durch ein einfacher zu klebendes Membranmaterial ausgetauscht. Das gewählte Membranmaterial hat sich in vielen Arbeiten für den Einsatz in der Elektrofiltration bewährt.

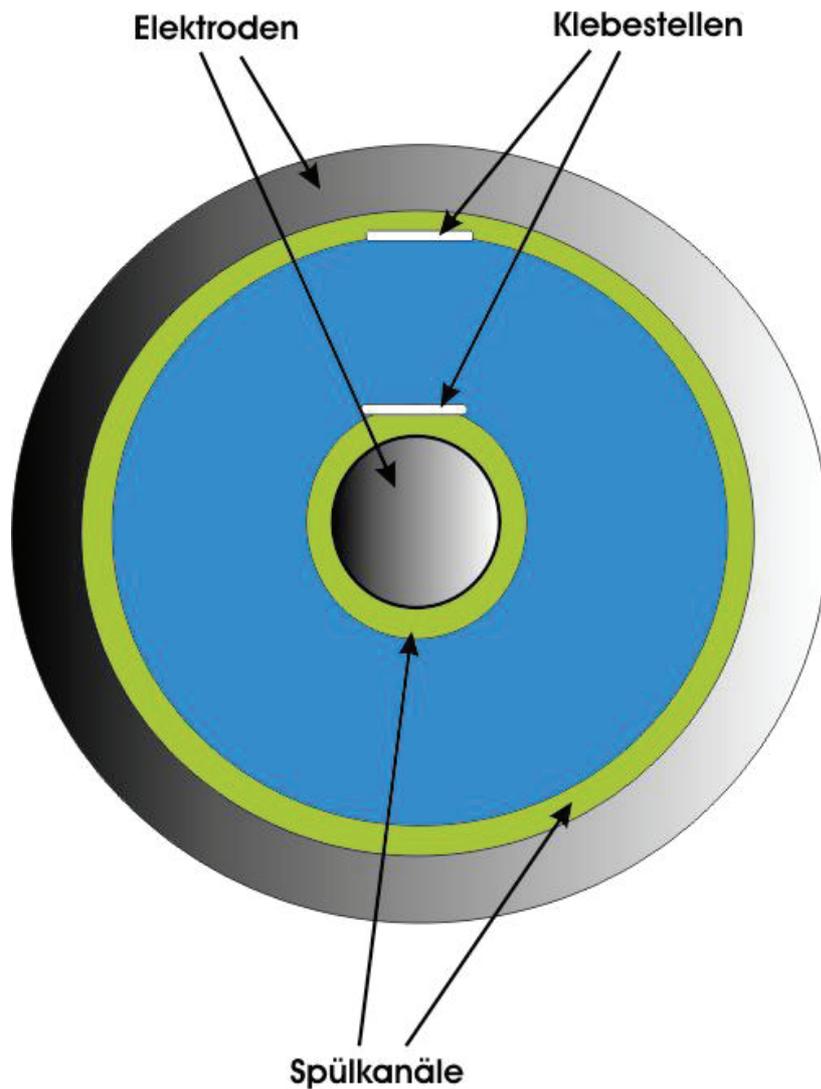


Abbildung 24 : Elektrokerzenfilter mit Klebestellen an den beiden Membranen

Ergebnisse EKF

Abbildung 25 zeigt das Ergebnis einer Filtration von Xanthan mit und ohne elektrischem Feld. Für die korrigierten Kurven wurde angenommen, dass 36 % der Filterfläche durch die Verklebung verloren geht. Für den Versuch mit E-Feld ist dies gerechtfertigt, da angenommen werden kann das der überwiegende Teil des Filtrats durch die Innenmembran strömt. Bei dem Versuch ohne E-Feld wird dadurch der Filtratfluss etwas überschätzt.

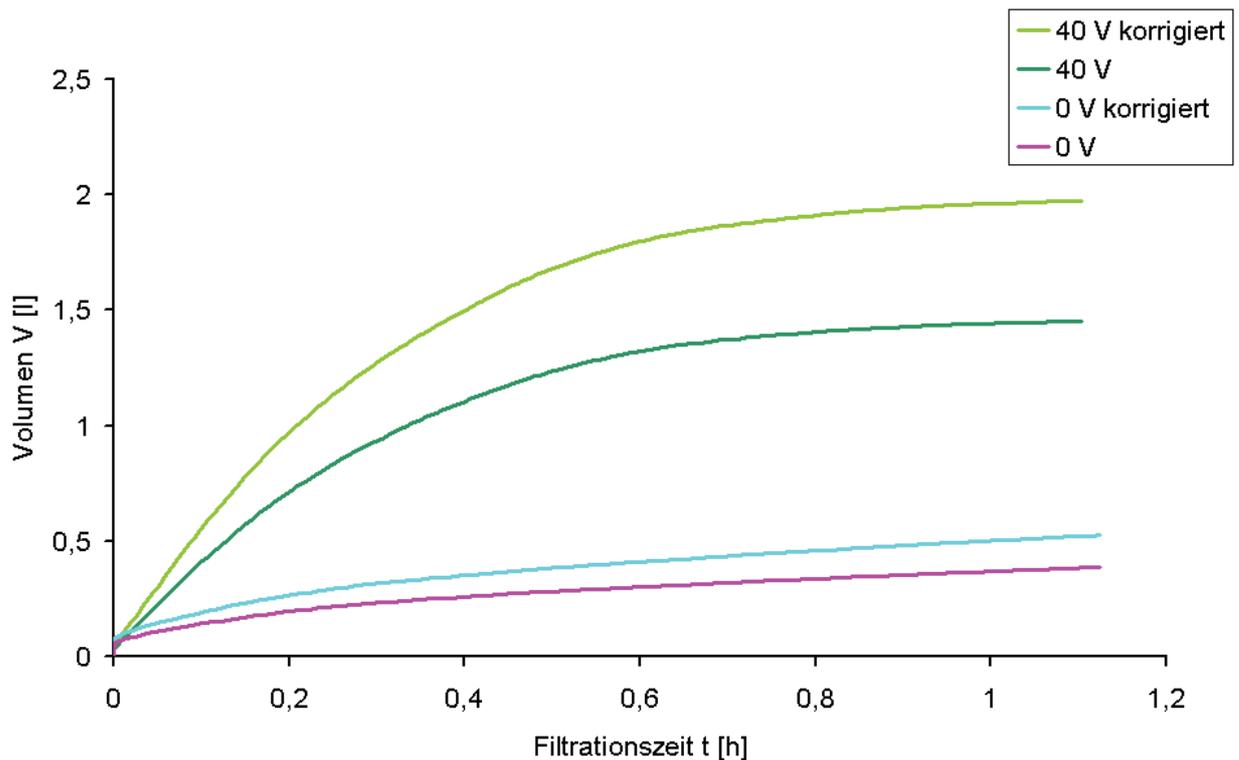


Abbildung 25: EKF-Versuch zur Konzentrierung von Xanthan ($c_0 = 5 \text{ g/l}$) mit und ohne elektrischem Feld ($p = 1 \text{ bar}$)

Betrachtet man den Wert bei 0,4 h so konnte der Filtratstrom durch das E-Feld um mehr als den Faktor 4 gesteigert werden. Somit lässt sich sagen, dass auch in der Kerzenfiltergeometrie die Filtration durch das angewandte E-Feld deutlich verbessert werden kann.

Von entscheidender Bedeutung ist auch, ob im Vergleich zur ebenen Filtration eine wirkliche Energieentlastung stattfinden konnte. Hierfür ist die Angabe des filtratspezifischen Energieverbrauchs entscheidend. Jedoch muss hierbei beachtet werden, dass dieser Wert nicht willkürlich für einen Filtrationszeitpunkt berechnet wird. Es sollte so sein, dass der Energieverbrauch an der Stelle berechnet wird, wo die Filtration quasi abbricht, bzw. der dritte Bereich der Elektrofiltration erreicht wird.

Abbildung 26 zeigt die Einteilung der Elektrofiltration in drei Phasen. Der dort gezeigte Versuch ist ebenfalls eine Konzentrierung von Xanthan.

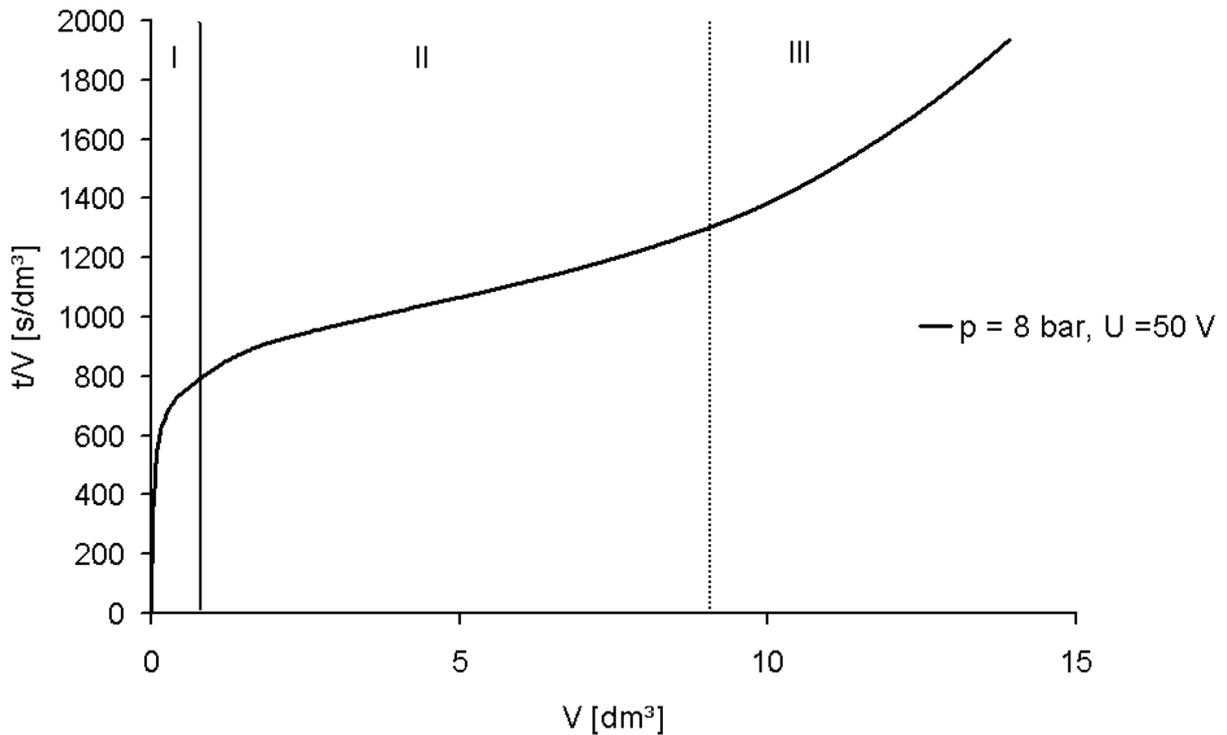


Abbildung 26: Einteilung der Elektrofiltration in 3 Phasen nach Hofmann und Posten (2003) ²¹ (Filtration von Xanthan in Filterplatte)

Dass auch bei den Versuchen mit dem EKF die Drei-Phasen-Einteilung vorhanden ist, kann in Abbildung 27 ersehen werden. Die relativ lange zweite Phase mit dem linearen, flachen Verlauf im t/V über V Diagramm ist die für die Prozessführung der Elektrofiltration geeignete Phase. Daher sollte das Ende dieser Phase als Zeitpunkt für die Berechnung des spezifischen Energieverbrauchs verwendet werden. In Tabelle 6 sind einige spezifische Energieverbrauchsdaten dargestellt. Der Vergleich des Verbrauchs des EKFs mit denen der Filterpresse zeigt, dass mit dem EKF ein relativ geringer Energieverbrauch erzielt werden kann. Allerdings muss beim direkten Vergleich unter gleichen Versuchsbedingungen (1 bar, 40 V) gesagt werden, dass die erwartete Energieersparnis von mehr als 40 % jedoch nicht erfüllt wurde. Einer der Gründe sind die nicht optimalen Versuchsbedingungen, die sich durch die Verklebung und Fixierung der Membran ergibt. Hierdurch ist nicht nur Filterfläche reduziert, sondern auch das symmetrische inhomogene E-Feld verzerrt.

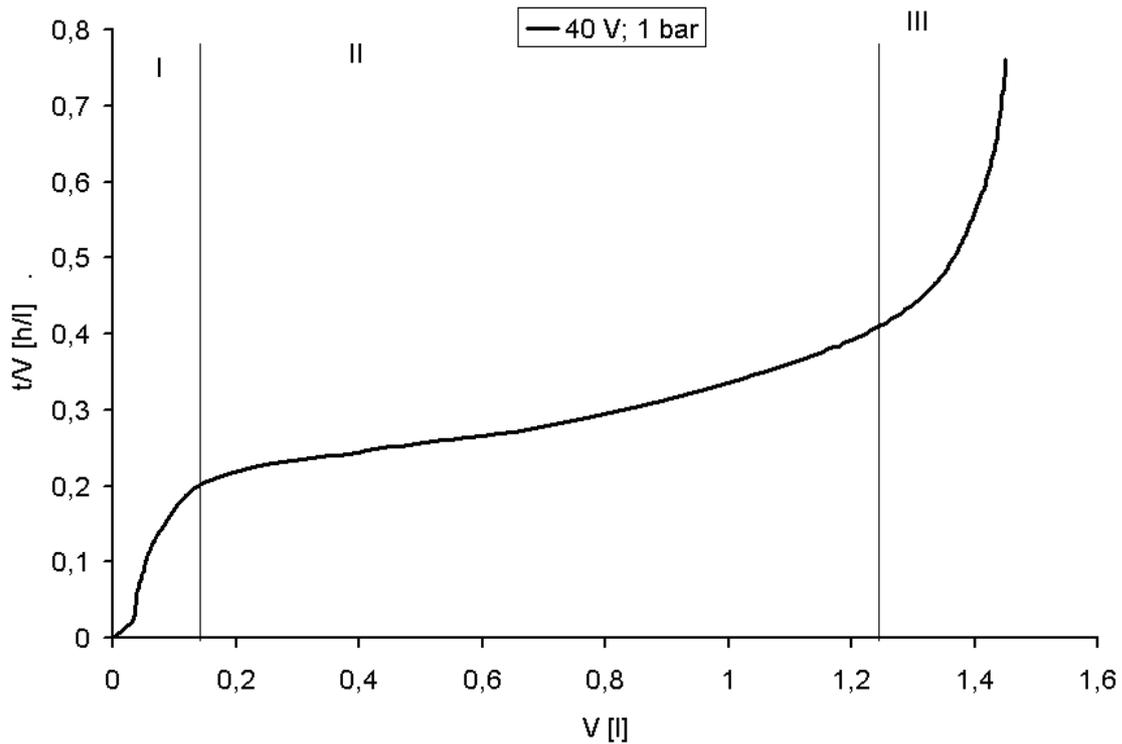


Abbildung 27: 3 Phasen bei der Filtration mit dem Elektrokerzenfilter

Anlage	Druck in bar	Spannung in V	Spez. Energieverbrauch in kJ/kg _{Filtrat}
Filterpresse	4	30	36
Filterpresse	4	80	95
Filterpresse	4	120	124
Filterpresse	8	80	101
Filterpresse	2	80	127
Filterpresse	1	40	76
EKF	1	40	68*

Tabelle 6: Spezifischer Energieverbrauch nach Beendigung der zweiten Phase bei verschiedenen Differenzdrücken und angelegten Spannungen im EKF und in der ebenen Anwendung (Filterpresse) (* Annahme, dass 36 % der Filterfläche nicht genutzt wurden)

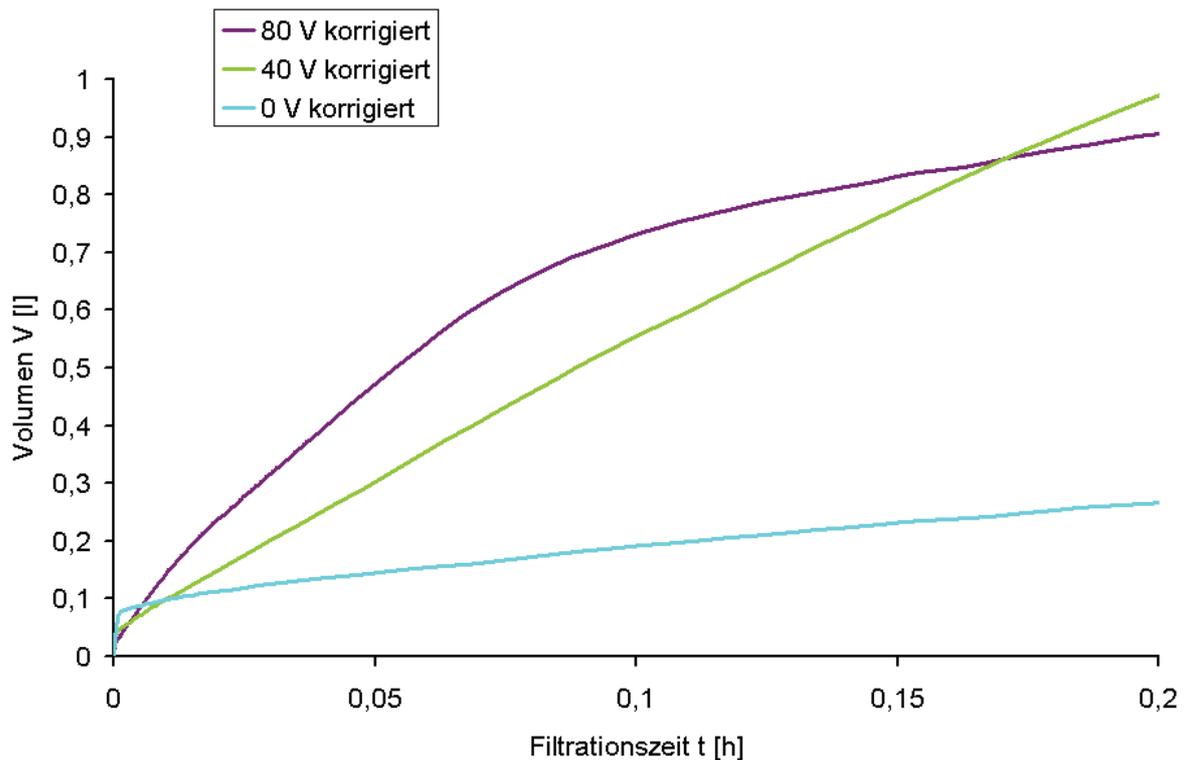


Abbildung 28: Vergleich der EKF-Filtration mit verschiedenen Spannungen

Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, kann die Steigung der Filtratmenge über der Zeit durch die erhöhte Spannung erhöht werden. Die anfängliche Spannung ist ungefähr proportional zum E-Feld. Das entspricht auch den Daten, wie sie in der ebenen Anwendung erzielt werden konnten.

Diskussion

Ziel des Vorhabens war es, die Einsetzbarkeit der Elektrofiltration in der Enzymproduktion zu untersuchen. Um Aussagen über die Ergebnisqualität treffen zu können, müssen die Versuche evaluiert werden und mit Alternativverfahren verglichen werden. Genaue Daten für Alternativverfahren sind häufig schwierig bei den Industriefirmen (sogar bei Projektpartnern) zu beschaffen. Daher wird die Evaluation der Spezifikationen anhand von vorhandenen Vergleichsdaten (z.B. Filtration ohne E-Feld) geschehen.

Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen

Zur Betrachtung der Wirtschaftlichkeit sind zwei Herangehensweisen sinnvoll. Zum einen ist die Presselektrofiltration eine Technik, die aus der klassischen Pressfiltration weiter entwickelt wurde. Als Basisvergleich bietet sich daher die Pressfiltration an.

Zum zweiten sollte in diesem Projekt speziell das Anwendungsgebiet Bioseparation betrachtet werden. Hier gibt es etablierte Methoden wie die Querstromfiltration oder die Zentrifugation, beispielsweise in einem Tellerseparator.

Pressfiltration – Presselektrofiltration

Diese Gegenüberstellung lässt einen direkten Vergleich zu, da experimentell neben den Presselektrofiltrationen auch Pressfiltrationen unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt wurden. Je nach Anwendung kann entschieden werden, ob eine Filtration eher schneller ablaufen oder zu höheren Endkonzentrationen führen soll.

Die Zusatzkosten, die bereit gestellt werden müssen, sind vor allem die Investitionskosten, zum anderen die Betriebskosten, welche mit dem eingebrachten elektrischen Strom zusammenfallen. In den vorliegenden Ergebnissen wurde die Beschleunigung des Prozesses um bis zu 500 % erreicht. Ist die Filtration in der Prozesskette die Engstelle, sind also alle folgenden Prozessschritte nicht limitierend, so kann auch mit einer Steigerung der Produktion um 500 % gerechnet werden. Durch Betrachtung des Produktpreises und des Marktes, kann folglich entschieden werden, ob der zusätzliche Einsatz der Energie sich wirtschaftlich lohnt.

Konventionelle Bioseparation - Presselektrofiltration

Der Vergleich der Wirtschaftlichkeit des neuen Verfahrens mit anderen gängigen Bioseparationsmethoden ist nicht durch einfache Vergleiche von experimentellen Daten möglich. Hier müssen Literaturwerte herangezogen werden, die einen Vergleich erlauben.

Die Cross-Flow-Filtration ist sicherlich ein der Elektrofiltration verwandtes Verfahren. Auch hier wird der Filtration eine zusätzliche Kraft überlagert, wobei die Scherkraft durch die Tangentialströmung einen Filterkuchenaufbau verringert. Jedoch ist bei der

Querstromfiltration keine große Eindickung möglich, da das Retentat gut pumpbar bleiben muss. Eine Elektrofiltration hat daher die Hauptanwendung in Prozessen, bei denen es um die Konzentrierung eines Stoffes geht, bei welchem jedoch auch ein Produkt abgetrennt werden muss. Beispielsweise könnte das noch fließfähige Retentat einer Querstromfiltration in einer Presseelektrofiltrationsanlage noch weiter „ausgepresst“, also eingedickt werden, wobei noch Produkt gewonnen wird. Auch einer durch Zentrifugation eingedickten Biosuspension kann auf diese Weise weiteres Wertprodukt entzogen werden.

Zur Wirtschaftlichkeitsbetrachtung muss nun die zusätzliche Verdünnungsmenge (Abwasser bzw. Entsorgungskosten), die im konventionellen Verfahren zur vollständigen Produktabtrennung genutzt würde, mit den Kosten für eine Elektrofiltration verglichen werden. Die Werte sind stark produkt- und systemabhängig.

Vergleicht man bei Hefeabtrennungen, die relativ häufig in der Literatur beschrieben werden, die Anwendung der Querstromfiltration mit der Elektrofiltration, so kann gesagt werden, dass die Elektrofiltration (ca. 500 l/(m²h) bei einer Konzentrierung von 5 auf 150 g/l) durchaus vergleichbare Werte der Filtrationsgeschwindigkeit liefern kann, obwohl bei Hefe das elektrische Feld nicht sonderlich stark wirksam ist, da hydrodynamische Widerstandskraft aufgrund der relativ großen Zellgröße und der hohen Filtrationsgeschwindigkeit deutlich über der elektrischen Feldkraft bleiben^{22,23}. Die Elektrofiltration in der Produktkonzentrierung sollte eine höhere Endkonzentration erbringen, wodurch im weiteren Prozessverlauf weniger Fällungsmittel nötig wäre, bzw. ein thermischer Verdampfungsschritt eingespart werden könnte. Ob die Fest-Flüssig-Trennung mittels Elektrofiltration günstiger wird, muss in einer ausführlichen Wirtschaftlichkeitsbetrachtung ermittelt werden. Hierbei müssen konkrete Daten genutzt werden und eine eventuell mögliche Einsparung von Fällungsmittel direkt mit den Kosten der Elektrofiltration verglichen werden.

Wie die Ergebnisse zeigen, kann eine Pressfiltration im biotechnologischen Bereich deutlich beschleunigt werden, indem ein elektrisches Feld zugeschaltet wird, bzw. in gleicher Zeit können merklich höhere Endkonzentrationen erreicht werden, bei gleichzeitiger Steigerung der Produktausbeute im Filtrat. Somit bietet die Elektrofiltration eine Alternative, welche die Verfahrenseinheitenzahl einer Aufarbeitung reduzieren und Verdünnungsflüssigkeit und Fällungsmittel einsparen hilft.

EKF

Der erste Teil der Diskussion bzgl. des EKFs ist bereits im Ergebnisteil gegeben. Hier wird jetzt speziell auf die Energieersparnis eingegangen.

Die Dauer der Konstruktion, des Baus und der Inbetriebnahme wurde unterschätzt. Allein die Elektrodenfertigung, welche ein aufwendiges Beschichtungsverfahren mit Iridiumoxid auf dem Titan-Grundmaterial beinhaltet, nahm einige Monate in Anspruch, was Folgeschritte verlangsamte. Weiterhin wurden die Versuche zwischen den Projektpartnern verschoben, so dass einige der Arbeiten, die laut Plan von dem Projektpartner Lenser Filtration durchgeführt werden sollten, nun von der Universität Karlsruhe bewerkstelligt wurden. Die im Ergebnisteil beschriebenen Probleme bei der Membranfixierung waren ebenfalls ein stark verzögerndes Element. Dies führte auch zu eingeschränkter Versuchsbreite im EKF-Bereich.

Um bewerten zu können, ob der Elektrokerzenfilter ein System ist, das wie vorausgesagt, hilft, die Energieeffizienz der Elektrofiltration zu erhöhen, müssen die Ergebnisse mit den Voraussagen verglichen werden.

Die Berechnung der Energieersparnis beruhte auf folgenden Zusammenhängen:

$$\text{Elektrische Energie: } W_{\text{el}} = P \cdot t_f = U \cdot I \cdot t_f = \frac{U^2}{R} \cdot t_f \quad (6)$$

$$\text{Filtrationsdauer: } t_f = \frac{V_L}{v_{F,1} \cdot A_1} \quad (7)$$

Der Elektrokerzenfilter entspricht in Bezug auf seine elektrische Schaltung einem Koaxialleiter. Somit gelten folgende Beziehungen:

$$R = \frac{1}{2\pi \cdot \kappa \cdot h} \cdot \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right); \quad (8) \quad E_1 = \frac{U}{r_1 \cdot \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right)} \Rightarrow U = E_1 \cdot r_1 \cdot \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right) \quad (9)$$

Damit kann der filtratspezifische Energieverbrauch in einem Elektrokerzenfilter mit folgender Beziehung berechnet werden (Kombination von Gl. 6, 7, 8 und 9):

$$W_{\text{el}} / V_L = E_1^2 \cdot r_1 \cdot \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right) \cdot \kappa \cdot \frac{1}{v_{F,1}} \quad (10)$$

Dieser ist unabhängig von der Kerzenhöhe h , da mit dieser sowohl das Filtrat als auch die verbrauchte Energie linear zunehmen. Für den filtratspezifischen Energieverbrauch bei der Filterplatte gilt:

$$\frac{W_{el}}{V_L} = \frac{U^2}{R} \cdot t_f \cdot \frac{1}{V_L} = E^2 \cdot d_{Platte}^2 \cdot \frac{\kappa \cdot A_{Platte}}{d_{Platte}} \cdot \frac{V_L}{v_F \cdot A_{Platte}} \cdot \frac{1}{V_L} = \frac{E^2 \cdot d_{Platte} \cdot \kappa}{v_F} \quad (11)$$

Unter der Bedingung, dass das Kammervolumen vom Kerzenfilter $V_{K,Kerze}$ und Filterplatte $V_{K,Platte}$ gleich groß sind, kann der Elektrodenabstand in der Filterplatte d_{Platte} als Funktion der Kerzenfilterradien r_1 und r_2 berechnet werden.

$$d_{Platte} = \frac{(r_2^2 - r_1^2)}{2 \cdot r_1} \quad (12)$$

Wird d_{Platte} in Gl. 11 durch die Beziehung in Gl. 12 ersetzt und die spezifischen Energieverbräuche für einen Elektrokerzenfilter (inhomogenes E-Feld) und eine Elektrofilterplatte (homogenes E-Feld) ins Verhältnis gesetzt, so ergibt sich folgende Beziehung:

$$\frac{\left(\frac{W_{el}}{V_f}\right)_{inhomogen}}{\left(\frac{W_{el}}{V_f}\right)_{homogen}} = \frac{2 \cdot \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right)}{\left(\frac{r_2^2}{r_1^2} - 1\right)} \quad (13)$$

In Abbildung 29 ist dieser Sachverhalt für ein realistisches Radienverhältnis dargestellt. Für Gleichung 13 wurde angenommen, dass die Radien der Membranfläche dem Radius der Elektrode annähernd gleich sind. Allerdings wurde durch die Notwendigkeit der Spülung ein nicht vernachlässigbar kleiner Raum zwischen Spülkreislauf und Elektrode nötig.

Die Radien sind:

Membran innen: 14,9 mm

Membran außen: 29,1 mm

Elektrode innen: 12,5 mm

Elektrode außen: 31,5 mm

Wie zu erkennen ist, unterscheiden sich die Radien jeweils um 2,4 mm. Berücksichtigt man diesen Unterschied in der Berechnung, so ergibt sich beim

Radienverhältnis, das in unserer Konstruktion verwendet wurde (Membranradien) von 1,9, eine Energieersparnis von etwa 43 %. Beim zunächst angenommenen Fall von gleichen Radien für Membran und Elektrode wäre die Ersparnis 52 % gewesen.

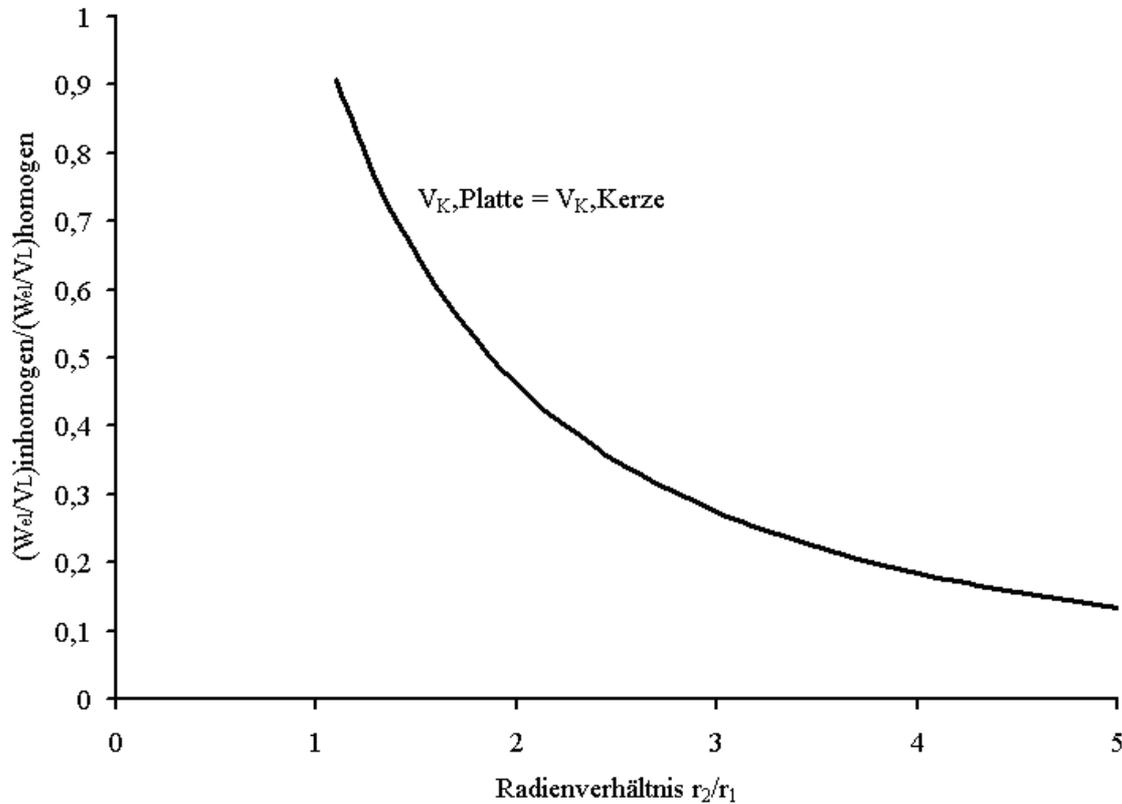


Abbildung 29: Berechnetes Verhältnis des spezifischen Energieverbrauchs zwischen EKF und Filterplatte über dem Radienverhältnis

Die erhaltenen Ergebnisse und die gewonnene Erfahrung führen allerdings zu dem Schluss, dass für die nächste Generation von EKF eine andere Membran genutzt werden sollte, welche eine Verklebung überflüssig macht. Schlauchmembranen aus Polymerwerkstoff könnten dies erfüllen, allerdings gibt es keinen Hersteller, der in den Geometrien, die beim EKF gegeben sind, Membranen schlauchförmig herstellt. Keramikmembranen sind viel versprechende Membranen, die aufgrund ihrer Steifheit für die Konstruktion vieles einfacher machen würden und auch zusätzliche Freiheitsgrade bieten würden. Daher soll die nächste Generation EKF mit diesen Membranen ausgestattet werden. Da diese Membranen auch nicht standardmäßig in allen Größen kommerziell erwerbbar sind, muss ein Partner für dieses Unterfangen gesucht werden, um gemeinsam die nächste Generation zu entwickeln.

Energierecycling

Die umgesetzte Energie im Elektrofiltrationsprozess generell (sowohl bei homogenem als auch bei inhomogenem E-Feld) wird zu einem großen Teil bei der Elektrolyse in Form von Umwandlung von elektrischer zu chemischer Energie verbraucht. Eine Möglichkeit des Energiercyclings ist die Wiederverwendung der Elektrolysegase in einer Brennstoffzelle. Jedoch ist dazu ein aufgereinigtes Gas nötig, das bei der Elektrofiltration im technischen Maßstab nicht direkt gegeben ist (bei Chlorid-haltigen Suspensionen entsteht z.B. auch Chlor). Beispielsweise darf für die Anwendung des Sauerstoffs in einer alkalischen Brennstoffzelle (AFC) kein CO₂ vorhanden sein, bzw. dieses abgetrennt werden. Daher muss der zur Aufreinigung des Gases nötige Aufwand in den Recycling-Wirkungsgrad eingerechnet werden, was möglicherweise dazu führt, dass ein ähnlicher Wirkungsgrad wie bei einer Energierückgewinnung durch Verbrennung erzielt wird.

Überprüfung CIP- und SIP-Fähigkeit EKF, evtl. Anpassen der Konstruktion

Ein CIP-fähiges EKF-System ist nicht absehbar. Es ist hierbei zu beachten, dass ein wesentlicher Vorteil der Elektrofiltration in einer sehr hohen erreichbaren Endkonzentration liegt. Die dadurch entstehende Masse kann nur mechanisch entfernt werden. Deshalb ist ein Ausbau nötig. Ein voreingedickter Kuchen könnte auch quasikontinuierlich ausgetragen werden.

SIP ist prinzipiell möglich. Bevor eine Biomasse filtriert wird, kann der Filtrationsverfahrensraum dampfsterilisiert werden. Hierbei sind allerdings die Materialien das Hauptproblem. Der EKF ist prinzipiell mit hitzebeständigem Polyvinyliden-Fluorid als Kunststoffmaterial herstellbar, die Membranen, die sich bisher als geeignet erwiesen haben (0,45 µm, PES, Pall) sind dampfsterilisierbar. Sollte in einem speziellen Anwendungsfall sterile, bzw. monoseptische Filtrationsbedingungen nötig sein, können die für diesen Zweck gefertigten EKF mit dem hitzebeständigen Material gefertigt werden. Da sich die Rohkunststoffe bereits um einen Faktor 6 in der Anschaffung unterscheiden, ist hier von Fall zu Fall zu entscheiden. Bei unseren Anwendungen war die SIP-Fähigkeit im Moment nicht nötig, weshalb kostengünstiges GF-PP verwendet wurde.

Umweltenlastung

Für die Umweltentlastung relevant sind zum einen der Energieverbrauch, der durch die Elektrofiltration erzielt werden soll, zum anderen die reduzierte Menge an Wasserverbrauch, der durch die höhere Endkonzentration erreicht wurde. Da beide Phänomene nicht unabhängig von einander sind, ist eine getrennte Evaluation nicht sinnvoll.

Durch das EKF-Prinzip, das zukünftig noch weiter verbessert werden sollte (in den nächsten Generationen der EKF), konnte der spezifische Energieverbrauch leicht gesenkt werden.

Die höhere Endkonzentration an einzudickender Substanz, die mit der erhöhten Filtrationsgeschwindigkeit einhergeht, kann zur Wasserersparnis führen. Hier ist zu beachten, dass durch das elektrische Feld ein erhöhter Energieeintrag nötig ist. Diese beiden Faktoren sind je nach Prozess bzw. Produkt unterschiedlich stark ausgeprägt und können hinsichtlich einer Umweltentlastung optimiert werden.

Kooperationen innerhalb des Projekts

06.-12.06.04	Versuchsreihe E-Filtration bei Novozymes in Kopenhagen
30.11./01.12.04	Kick-Off-Meeting in Hamburg + Besprechung des Projekts
17.12.04	Treffen Lenser-UniKa in Senden: Festlegung der Grundmaße des EKF
10.02.05	Treffen Lenser-UniKa in Karlsruhe: Weiterentwicklung EKF-Konstruktion
22.06.05	Treffen Lenser-UniKa: Gespräch mit Fachmann in Stromversorgung bzgl. großtechnischen Einsatzes der PEF
05.08.05	Treffen Lenser-UniKa in Karlsruhe: Weiterentwicklung EKF mit Elektroden-Dummies
28.09.05	Treffen UniKa-Novozymes in Kopenhagen: Besprechung der Versuchsergebnisse; Kontakt Doktorand (Prof. Wakeman)
28./29.11.05	Treffen Lenser-UniKa-Andritz in Karlsruhe: Vorstellung der Elektrofiltration an Andritz; Membrankonfektionierung am

	EKF
20.01.06	Treffen Lenser-UniKa in Karlsruhe: Besprechung des Stands, nächste Schritte.
10.02.06	Treffen Lenser-UniKa in Karlsruhe: Besprechung Statusseminar + Stand EKF
12.07.06	Treffen Weicon-UniKa in Karlsruhe: Besprechung Verklebung Membran
28.07.06	Treffen Lenser-UniKa in Karlsruhe: Besprechung EKF
27.-29.11.06	Treffen Lenser-UniKa in Karlsruhe: Abschließende Besprechung und Vorversuche für zukünftige Projekte

Die Kooperation zwischen der Universität Karlsruhe und Lenser gestaltete sich in einem offenen, sehr guten Verhältnis. Häufige Projekttreffen, Telefonate und E-Mails prägten die Arbeiten. Die sich ergebende Umschichtung der Arbeiten von Lenser zur Universität Karlsruhe wurden besprochen und während des Projekts der DBU mitgeteilt. Auch in Zukunft soll weiter im Bereich der Elektrofiltration zusammengearbeitet werden.

Novozymes war assoziierter Partner und es war eine Versuchswoche in deren Laboren in Dänemark möglich. Nach einem weiteren Treffen in Dänemark ergab sich, dass Novozymes im Verlauf des Projekts die Idee der Elektrofiltration selbst aufgenommen und einen eigenen Doktoranden eingestellt hat, der von Prof. Wakeman (Loughborough) betreut wird.

Weiterhin waren Kontakte zu einer Vielzahl von Firmen nötig, um vor allem die konstruktiven Elemente der Arbeiten zu verwirklichen.

Öffentlichkeitsarbeit

Literatur/Präsentation/Patente

Käppler T, Hofmann R, Posten C, Fractionation of Biosuspensions and Biopolymers with Pressure Electrofiltration; presented at the AFS annual conference, April 2005, Atlanta, Georgia

Käppler T, Hofmann R, Posten C, Fractionation of Biosuspensions and Biopolymers with Pressure Electrofiltration; präsentiert bei der FILTECH Konferenz, Oktober 2005, Wiesbaden, Deutschland

Käppler T, Hofmann R, Posten C, Elektrofiltration – Einsatzgebiet Enzymproduktion, akzeptiert bei Chemie Ingenieur Technik 2006, 78 (5)

Hofmann R, Käppler T, Posten C, Pilot-scale press electrofiltration of Biopolymers, Separation and Purification technology 2006, 51 (2)

Käppler T, Posten C, Fractionation of Proteins with two-sided Electro-Ultrafiltration, eingereicht bei Journal of Biotechnology

Käppler T, Posten C, Fractionation of BSA and Lysozyme by two-sided dead-end Electrofiltration, akzeptiert für den 5th World Congress on Particle Technology, April 2006, Orlando, USA

Käppler T, Posten C, Elektrofiltration – a multifunctional tool in bioseparation, eingereicht für die 6. ESBES Konferenz, August 2006, Salzburg, Österreich

Posten C, Herrenbauer M, Weber K, Hofmann R, Lenser Filtration, Europ. Patent Nr. 1351994

Fazit

Die Elektrofiltration ist ein Verfahren, das in der Enzymproduktion an verschiedenen Stellen eingesetzt werden kann. Das Potential hierzu konnte nachgewiesen werden. Es sind jedoch jeweils strenge Randbedingungen nötig, um das Verfahren wirtschaftlich und ökologisch sinnvoll einzusetzen. Hauptparameter ist die

Ionenstärke, welche sowohl auf den Energieverbrauch als auch auf die elektrische Feldkraft, welche auf die zu kontrollierenden Moleküle/Partikeln wirkt, Einfluss negativer Art hat. Daher ist der Einsatz in Suspensionen mit niedrigen Salzkonzentrationen am besten. Bei hoher Salzkonzentration könnte eine vorgeschaltete Dialyse den Gesamtprozess energetisch begünstigen, wobei der erhöhte Wasserverbrauch in der Dialyse berücksichtigt werden muss.

Der Erfolg der Elektrofiltration konnte bei der Enzymfraktionierung vor allem durch die hohe erzielte Selektivität gezeigt werden. Diese Selektivität ist für die Produktion hochreiner Enzyme (z.B. im Pharmabereich) von wichtiger Bedeutung. Für unsere Experimente konnte gezeigt werden, dass keine Enzymschädigung beobachtet werden konnte. Allerdings schließt dies nicht aus, dass eine kleine Menge, welche unterhalb des Messfehlers liegt nicht doch beschädigt wird. Für Pharmaprodukte ist diese Frage relevant, da selbst geringste Mengen an denaturierten Wirkstoffen fatale Wirkungen haben können.

Die Enzymkonzentrierung konnte zwar erhöht, jedoch nur in einem für sehr teure Produkte ökonomisch ausreichenden Maße gesteigert werden. Vor allem bei sehr hohen Salzkonzentrationen ist die Prozessführung schwierig. Daher ist auch hier eine vorangehende Dialyse zu erörtern. Oder aber, der Gesamtprozess wird in einer integrierten Prozessentwicklung so ausgelegt, dass die Verwendung von Salzen in vorangehenden Verfahrenseinheiten im Hinblick auf die Elektrofiltration optimiert wird.

Für die Biomasseseparation ist günstig, dass sowohl Ausbeute erhöht werden als auch der Filtratfluss gesteigert werden konnte. Diese beiden Faktoren dienen der Wirtschaftlichkeit des Verfahrens, so dass hier durchaus in der Industrie konventionelle Pressfiltrationen durch die neue Generation der Elektrofiltration ersetzt werden könnten. Die Hemmungen der industriellen Unternehmen, die Investitionskosten einzugehen, um ein günstigeres Verfahren zu nutzen, müssen in Zukunft weiterhin zu überwinden versucht werden. Dazu ist auch nötig, Informationen über die aktuellen und genauen Zahlen der in den Unternehmen verwendeten Prozessen zu erhalten, bzw. zu versuchen, diese zu beschaffen.

Die Untersuchung des Einsatzes bei verschiedenen Organismen zeigt, dass nicht jeder Organismus für das Elektrofiltrationsverfahren geeignet ist. Beispielsweise können einfach zu filtrierende Medien (wie Hefe) kaum durch das elektrische Feld besser filtriert werden.

Der Einsatz der Elektrofiltration ist auch in im industriellen Maßstab durch Upscale möglich ²⁴.

Der Bau des Elektrokerzenfilters war ein wesentlicher Bestandteil des Vorhabens. Hierbei ergaben sich zunächst Verzögerungen und anschließend auch Probleme, vor allem bei der Fixierung der gewählten Polymermembranen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Energieverbrauch, selbst in einem nicht optimalen System gesenkt werden konnte im Vergleich zur ebenen Platte. Als Fazit für zukünftige Arbeiten wird gezogen, den Elektrokerzenfilter so weiter zu entwickeln, dass Keramikmembranen eingesetzt werden können. Um dies zu erreichen wird nach Kooperationspartnern für Folgeprojekte gesucht.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Elektrofiltration ein hybrides Verfahren ist, bei dem die elektrische Energie, welche eingebracht wird, einen zusätzlichen Freiheitsgrad bietet, um Enzyme auf effizientere, in ökonomischer und ökologischer Hinsicht, aufzuarbeiten.

Anhang

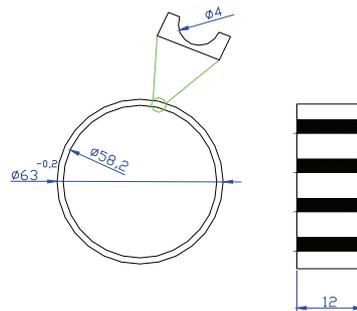


Abbildung 30: Konstruktion des Rings zur besseren Abdichtung der Membran mittels O-Ring

Literaturangaben:

- 1 Kaufmann, M. (1997) Unstable proteins: how to subject them to chromatographic separations for purification procedures. *Journal of Chromatography B* 699 (1-2), 347-369
- 2 Gavrilescu, M. and Chisti, Y. (2005) Biotechnology - a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances* 23 (7-8), 471-499
- 3 Stark, D. and von Stockar, U. (2003) In Situ Product Removal (ISPR) in Whole Cell Biotechnology During the Last Twenty Years. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 80, 149-175
- 4 Drost, M.A. (1999) Methoden zur Untersuchung der Auswirkungen mechanischer Belastung auf kolloidale Struktur, Rheologie und Filtrationsverhalten von Bier. In *Laboratorium für Lebensmittelverfahrenstechnik*, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH)
- 5 Charm, S.E. and Wong, B.L. (1981) Shear Effects on Enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* 3 (2), 111-118

- 6 Weber, K. (2002) Untersuchungen zum Einfluss eines elektrischen Feldes auf die kuchenbildende Pressfiltration. In *Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik*, Universität Karlsruhe (TH)
- 7 Rao, M.B. et al. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (3), 597-+
- 8 Jaeckle, M.G., O. (1988) Determination of alpha-amylase activity in whole egg and egg yolk by means of the Phadebas amylase test. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 77 (3), 420-434
- 9 Lin, Y. et al. (1969) Action of Proteolytic Enzymes on N,N-Dimethyl Proteins - Basis for a Microassay for Proteolytic Enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 244 (4), 789-&
- 10 Ruckenstein, E. and Zeng, X.F. (1997) Macroporous chitin affinity membranes for lysozyme separation. *Biotechnology and Bioengineering* 56 (6), 610-617
- 11 Sapan, C.V. et al. (1999) Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 29, 99-108
- 12 Bradford, M.M. (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2), 248-254
- 13 Sedmak, J.J. and Grossberg, S.E. (1977) Rapid, Sensitive, and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250. *Analytical Biochemistry* 79 (1-2), 544-552
- 14 Matsushita, M. et al. (1993) Determination of Proteins by a Reverse Biuret Method Combined with the Copper-Bathocuproine Chelate Reaction. *Clinica Chimica Acta* 216 (1-2), 103-111
- 15 Lowry, O.H. et al. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193 (1), 265-275
- 16 Fujita, Y. et al. (1995) Spectrophotometric Determination of Protein with Pyrocatechol Violet-Tin(IV) Complex. *Bunseki Kagaku* 44 (10), 733-738
- 17 Takac, S. et al. (2000) Separation of the protease enzymes of *Bacillus licheniformis* from the fermentation medium by crossflow ultrafiltration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 75 (6), 491-499
- 18 Ferrero, M.A. et al. (1996) Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: Isolation, production and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45 (3), 327-332

- 19 Csögör, Z. (2000) *Untersuchungen zur Modellierung des Wachstums und der Produktbildung bei Mikroalgen*, Shaker Verlag
- 20 Yang, R.J. et al. (2004) Effects of pulsed electric fields on the activity of enzymes in aqueous solution. *Journal of Food Science* 69 (4), C241-C248
- 21 Hofmann, R. and Posten, C. (2003) Improvement of dead-end filtration of biopolymers with pressure electrofiltration. *Chemical Engineering Science* 58 (17), 3847-3858
- 22 Bell, D.J. and Davies, R.J. (1987) Cell Harvesting of Oleaginous Yeast by Cross-Flow Filtration. *Biotechnology and Bioengineering* 29 (9), 1176-1178
- 23 Frenander, U. and Jonsson, A.S. (1996) Cell harvesting by cross-flow microfiltration using a shear-enhanced module. *Biotechnology and Bioengineering* 52 (3), 397-403
- 24 Hofmann, R. et al. (2006) Pilot-scale press electrofiltration of biopolymers. *Separation and Purification Technology* 51 (2), 303-309

Anlagen

An den Bericht angehängt sind die oben (unter Öffentlichkeitsarbeit) genannten Veröffentlichungen, soweit sie bereits publiziert wurden.