

Prozessentwicklung der wässrigen Zweiphasen- Flotation

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)

von der KIT-Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des

Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Lucas Jakob, M. Sc.

aus Sigmaringen

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2024

Erstgutachter: Prof. Dr.-Ing. Hermann Nirschl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Jürgen Hubbuch



This document is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (CC BY-NC-ND 4.0): <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.en>

Für meinen Sohn Carl Philipp.

Erst kommt die Physik, dann die Mechanik und danach die Verfahrenstechnik.
Hans Guigas

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik (MVM) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), in den Jahren 2018 bis 2023.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. Hermann Nirschl für das mir von Anfang an entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit zur freien Forschung. Neben den fachlichen Diskussionen und Anregungen hat vor allem die persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Hubbuch danke ich herzlich für seine Zeit als Zweitgutachter dieser Arbeit sowie einiger von mir betreuter Abschlussarbeiten.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen Mitarbeiter*innen der mechanischen und elektrischen Werkstatt, der PMT und der Verwaltung des Instituts für ihre stete Hilfsbereitschaft bedanken. Mein besonderer Dank gilt Hans Guigas für seine Unterstützung und Geduld bei seiner Einführung in die Konstruktionslehre. Der fachliche und persönliche Austausch mit den Kolleg*innen während der Seminare, Konferenzen und Kaffeepausen war nicht nur für das Voranschreiten dieser Arbeit wichtig, sondern machte die Zeit am MVM unvergesslich. Die vielen Freundschaften, die während meiner Zeit am Institut entstanden sind und weiter bestehen, sind für mich die wertvollsten Errungenschaften meiner Promotionszeit. Besonderer Dank gilt meinen Bürokollegen Patrick Morsch und Anshuman Chauhan für die gemeinsame Zeit auf engstem Raum sowie Büro 02 und Büro 09 für die stets offene Tür. Mein Dank gilt dem Circle of Trust.

Besonders viel Freude an der Forschung hat mir die Betreuung der vielen freundlichen und engagierten Studierenden im Rahmen von Abschlussarbeiten und Hiwi-Tätigkeiten bereitet. Ihre Unterstützung und die gemeinsamen Diskussionen von Fragestellungen waren der Motor dieser Arbeit. Vielen Dank an Felix Cronshagen, Wienke Förster, Maximilian Stockert, Timo Bohlig, Marcel Heinzmann, Jan Singer, Pascal Lang, Nejla Heydari, Anna Hofmann, Christina Litunenko, Franziska Wölfle, Noah Schwarz, Lukas Griesinger und Selina Krey. Außerdem möchte ich mich bei Marvin Winkler, Frank Rhein, Kim Lohfink und Timo Dobler für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Danke sagen möchte ich Ioanna, die mich nicht nur in meinem Wunsch zu promovieren bestärkt, sondern mich auch immer wieder aufgebaut und motiviert hat, diese Arbeit fertigzustellen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Helga und Rüdiger. Sie sind meine frühesten und größten Förderer und haben es mir immer ermöglicht, meinen eigenen Weg zu gehen. Ebenso danke ich meinem Bruder Philipp, der nicht nur Vorbild, sondern auch Freund und Stütze in meinem Leben ist.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Sohn Carl Philipp bedanken. Er ist die größte Freude und Motivation, die man sich wünschen kann. Seine liebevolle und fröhliche Art ist mein größter Antrieb, nicht nur für diese Arbeit.

Zusammenfassung

Biotechnologisch erzeugte Produkte finden aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften Anwendung als Wirkstoffe in Medikamenten, als funktionale Lebensmittelzusätze, als Hilfsstoffe in technischen Prozessen oder als Biokatalysatoren bei der Synthese chemischer Erzeugnisse. Neben der Isolation aus pflanzlichen oder tierischen Ausgangsstoffen werden biotechnologische Produkte oft durch mikrobielle Fermentation hergestellt. Geringe Produktkonzentrationen, sowie zahlreiche Verunreinigungen in den komplexen Biosuspensionen erschweren die Produktaufreinigung und erfordern oft mehrere Konzentrations- und Reinigungsstufen. Dies führt zu hohen Kosten und wachsenden Produktverlusten.

Ein effizienter Aufreinigungsprozess ist durch den Einsatz integrativerer Trennverfahren möglich, die es erlauben das Produkt direkt von anderen Bestandteilen der Biosuspension abzutrennen und aufzukonzentrieren. Ein solches Verfahren ist die wässrige Zweiphasen-Flotation (ATPF), die die Selektivität einer Extraktion mit dem hohen Massentransfer einer Flotation kombiniert. Grundlage für die ATPF ist das Ausbilden eines wässrigen Zweiphasen-Systems (ATPS) durch lösen phasenbildender Komponenten wie beispielsweise Polymere und Salze in hohen Konzentrationen in Wasser. Dadurch entsteht eine salzreiche, schwerere Unterphase und eine leichtere polymerreiche, leichtere Oberphase. Durch Beladen der Unterphase mit der Biosuspension und dem Eintrag von Gasblasen, lassen sich sowohl kleinere Moleküle, als auch makromolekulare Enzyme selektiv in die produktsammelnde Oberphase flotieren. Für einen hohen Abscheidegrad und eine hohe Aufkonzentrierung des Produkts in der Oberphase ist eine zielgerichtete Prozessentwicklung der ATPF nötig. Diese Arbeit beschreibt die Prozessentwicklung der ATPF am Beispiel des Lebensmittelenzyms Phospholipase A₂, mit dem Ziel eine auf andere biotechnologische Produkte übertragbare Strategie zu erarbeiten.

Der erste Schritt bei der Prozessentwicklung der ATPF ist die in Kapitel 4 beschriebene Auswahl eines geeigneten Zweiphasen-Systems, sowie die Charakterisierung stofflicher Schlüsselparamete-

ter und äußerer Einflussfaktoren auf die ATPF. Bei der Auswahl der phasenbildenden Komponenten des ATPS sind neben ökonomischen und ökologischen Gesichtspunkten auch die physikochemischen Eigenschaften des Produkts zu beachten. Insbesondere der Einsatz von biologisch abbaubaren Salzen wie z. B. Citrate, Tartrate oder Succinate steigern die Umweltverträglichkeit der ATPF, ermöglichen jedoch oft nur in bestimmten pH-Bereichen die Ausbildung eines stabilen Zweiphasen-Systems. Der pH-Wert ist ein Schlüsselparameter der ATPF, da durch ihn nicht nur die Produktstabilität, sondern auch die Anlagerung der Enzymmoleküle an die Blasenoberfläche sowie die Affinität zur polymerreichen Oberphase beeinflussbar sind. Letztere hängt zudem wesentlich von der Art und der Größe bzw. dem Molekulargewicht der Polymere ab. Durch Extraktionsversuche lassen sich geeignete phasenbildende Komponenten finden und das ATPS hinsichtlich einer hohen Aufkonzentrierung in einer möglichst kleinen Oberphase optimieren. Einfache Flotationsversuche zeigen die Robustheit der ATPF gegenüber äußeren Einflussfaktoren wie der Temperatur oder anderen Bestandteilen einer Fermentationsbrühe.

Der nächste Schritt bei der Prozessentwicklung der ATPF ist die in Kapitel 5 beschriebene Anpassung des Gasblaseneintrags an das optimierte Zweiphasen-System. Prinzipiell ermöglichen hohe Gasvolumenströme und geringe Blasengrößen einen gesteigerten Gasgrenzflächeneintrag und somit einen hohen flotationsbedingten Stofftransport. Jedoch lassen sich beide Prozessparameter nicht unabhängig voneinander einstellen. Hohe Gasvolumenströme führen zu großen Gasblasen, die zu einer Vermischung von Unter- und Oberphase (Phasenverwirbelung) führen und so einer Produktabtrennung aus der Unterphase und Aufkonzentrierung in der Oberphase entgegenwirken. Die Auftriebskraft zu kleiner Gasblasen reicht dagegen nicht aus, um die Grenzflächenkraft der wässrigen Phasengrenzfläche zwischen Unter- und Oberphase zu überwinden, und sie bleiben entweder an der Phasengrenzfläche hängen oder verbleiben in der Unterphase. In Abhängigkeit der Dichte, Viskosität und Grenzflächenspannung beider wässriger Phasen lässt sich ein optimales Blasengrößenfenster bestimmen, welches einen Aufstieg der Gasblasen in die Oberphase, sowie ein stabiles Zweiphasen-System gewährleistet. Durch verschiedene poröse Medien wie z. B. Metallgewebe, Lochsiebe oder Glasmembranen lassen sich unterschiedliche Blasenkollektive mit verschiedenen Blasengrößenverteilungen erzeugen und so ein Begasungsmedium mit bestmöglicher Übereinstimmung zu dem zuvor ermittelten Blasengrößenfenster auswählen.

Die Optimierung der Prozessführung und des Anlagendesigns steigert die Effizienz der ATPF und bildet den in Kapitel 6 beschriebenen abschließenden Schritt bei der Prozessentwicklung der ATPF. Im Batch-Betrieb der ATPF nimmt im Laufe der Flotationszeit der Massentransfer des

Produkts in die Oberphase ab, wenn das Konzentrationsverhältnis des Produkts zwischen Ober- und Unterphase sich einem Gleichgewichtswert nähert. Grund hierfür sind Diffusionseffekte, die neben der Flotation die Kinetik des Massentransfers bestimmen. Ist das thermodynamische Gleichgewicht während der ATPF erreicht, verhindert eine Rückdiffusion der Stoffe in die Unterphase eine weitere Aufkonzentrierung in der Oberphase. Eine kontinuierliche Prozessführung ermöglicht einen quasi-stationären Massentransfer in die Oberphase bei maximaler Aufreinigungsrate. Die kontinuierliche ATPF ist besonders effizient durch den Einsatz eines horizontalen Flotationsbeckens. Das Fördern der mit Biosuspension angereicherten Unterphase und der unbeladenen Oberphase im Gleichstrom steigert die Diffusion am Einlass des Beckens. Hier führt ein erhöhter Gaseintrag nicht nur zu einem höheren flotationsbedingten Stofftransport, sondern steigert durch eine in Maßen erfolgende Phasenvermischung auch die Diffusion in die Oberphase. Ein reduzierter Gaseintrag am Auslass des Beckens reduziert die Phasenvermischung und damit die Rückdiffusion von der produktbeladenen Oberphase in die aufgereinigte Unterphase. Der kontinuierliche Betrieb steigert nicht nur die Raum-Zeit-Ausbeute, sondern erlaubt ebenfalls den Einsatz der ATPF zur Produktaufreinigung bei kontinuierlichen Fermentationsprozessen. Dadurch reduziert sich der apparative Aufwand, da eine Zwischenlagerung entfällt und kleinere Apparategrößen ausreichend sind.

Die kontinuierliche ATPF als integratives Aufbereitungsverfahren präsentiert sich als eine kostengünstige Alternative zu herkömmlichen, vielstufigen Aufreinigungsprozessen, die eine direkte Abtrennung und Aufreinigung von biotechnologischen Produkten wie z. B. Enzymen aus Fermentationsbrühen ermöglicht. Je nach Anwendung und geforderter Reinheit kann die gewonnene produktbeladene Oberphase direkt eingesetzt, oder eine abschließende Produktformulierung, z. B. durch Sprühtrocknung, nachgeschaltet werden. Die in dieser Arbeit entwickelte Strategie zur Prozessentwicklung der ATPF umfasst sowohl die Charakterisierung stofflicher Schlüsselparameter, die Implementierung eines geeigneten Gasblaseneintrags, sowie die Optimierung der Prozessführung und des Anlagendesigns und ermöglicht einen effizienten Betrieb der ATPF.

Abstract

Due to their unique properties, biotechnologically produced products are used as active ingredients in medicines, as functional food additives, as auxiliary substances in technical processes or as biocatalysts in the synthesis of chemical products. In addition to isolation from plant or animal raw materials, biotechnological products are often produced by microbial fermentation. Low product concentrations and numerous impurities in the complex biosuspensions make product purification difficult and often require several concentration and purification steps. This leads to high costs and increasing product losses.

An efficient purification process is possible by using more integrative separation processes that allow the product to be separated and concentrated directly from other components of the biosuspension. One such process is the aqueous two-phase flotation (ATPF), which combines the selectivity of extraction with the high mass transfer of flotation. The basis for ATPF is the formation of an aqueous two-phase system (ATPS) by dissolving phase-forming components such as polymers and salts in high concentrations in water. This creates a salt-rich, heavier bottom phase and a lighter, polymer-rich top phase. By loading the bottom phase with the biosuspension and introducing gas bubbles, both smaller molecules and macromolecular enzymes can be selectively floated into the product-collecting top phase. For a high separation efficiency and a high concentration of the product in the top phase, a systematic process development of the ATPF is necessary. This paper describes the process development of ATPF using the example of the food enzyme phospholipase A2, with the aim of developing a strategy that can be transferred to other biotechnological products.

The first step in the process development of ATPF is the selection of a suitable two-phase system as described in Chapter 4, as well as the characterization of key material parameters and external factors influencing ATPF. When selecting the phase-forming components of the ATPS, the physicochemical properties of the product must be taken into account in addition to economic and

ecological aspects. In particular, the use of biodegradable salts such as citrates, tartrates or succinates increase the environmental compatibility of the ATPF, but often only allow the formation of a stable two-phase system in certain pH ranges. The pH value is a key parameter of the ATPF, as it influences not only the product stability, but also the attachment of the enzyme molecules to the bubble surface and the affinity to the polymer-rich top phase. The latter also depends significantly on the type and size or molecular weight of the polymers. Extraction experiments can be used to find suitable phase-forming components and optimize the ATPS with regard to a high concentration in the smallest possible top phase. Simple flotation tests show the robustness of the ATPF to external influencing factors such as temperature or other components of a fermentation broth.

The next step in the process development of the ATPF is the adaptation of the gas bubble input to the optimized two-phase system, as described in chapter 5. In principle, high gas volume flows and small bubble sizes enable an increased bubble surface area flux and thus a high flotation-related mass transfer. However, the two process parameters cannot be set independently of each other. High gas volume flows lead to large gas bubbles, which result in mixing of the bottom and top phases (phase turbulence) and thus counteract product separation from the bottom phase and concentration in the top phase. The buoyancy force of too small gas bubbles, on the other hand, is not sufficient to overcome the interfacial force of the aqueous phase interface between the bottom and top phase, and they either stick to the phase interface or remain in the bottom phase. Depending on the density, viscosity and interfacial tension of both aqueous phases, an optimal bubble size window can be determined, which ensures that the gas bubbles rise into the top phase and a stable two-phase system. Different porous media such as metal mesh, perforated sieves or glass membranes can be used to generate different bubble collectives with different bubble size distributions and thus a gassing medium with the best possible match to the previously determined bubble size window can be selected.

The optimization of the process and apparatus design described in chapter 6, increases the efficiency of the ATPF and represents the final step in the process development of the ATPF. In batch operation of the ATPF, the mass transfer of the product into the top phase decreases with flotation time as the concentration ratio of the product between the top or bottom phase approaches an equilibrium value. This is due to diffusion effects, which determine the kinetics of mass transfer in addition to flotation. Once thermodynamic equilibrium is reached during ATPF, back diffusion

of the substances into the bottom phase prevents further concentration in the top phase. Continuous process operation enables quasi-stationary mass transfer to the top phase at maximum purification rate. The continuous ATPF is particularly efficient due to the use of a horizontal flotation tank. Pumping the bottom phase enriched with biosuspension and the unloaded top phase in cocurrent increases diffusion at the inlet of the tank. Here, increased gas input not only leads to higher flotation-related mass transport, but also increases diffusion into the top phase due to moderate phase mixing. Reduced gas input at the outlet of the tank reduces phase mixing and thus back diffusion from the product-laden top phase into the purified bottom phase. Continuous operation not only increases the space-time yield, but also allows the ATPF to be used for product purification in continuous fermentation processes. This reduces the amount of equipment required, as there is no need for intermediate storage and smaller equipment sizes are sufficient.

Continuous ATPF as an integrative purification process presents itself as a cost-effective alternative to conventional, multi-stage purification processes, which enables the direct separation and purification of biotechnological products such as enzymes from fermentation broths. Depending on the application and the required purity, the obtained product-loaded top phase can be used directly or a final product formulation, e.g. by spray drying, can be carried out downstream. The strategy developed in this thesis for the process development of the ATPF includes the characterization of key material parameters, the implementation of a suitable gas bubble inlet, as well as the optimization of the process and apparatus design and enables an efficient operation of the ATPF.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	<i>i</i>
Zusammenfassung	<i>iii</i>
Abstract	<i>vi</i>
1 Motivation und Zielsetzung	1
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Stand der Technik.....	3
1.3 Zielsetzung.....	6
2 Theoretische Grundlagen	7
2.1 Technische Enzyme.....	7
2.1.1 Gewinnung durch mikrobielle Fermentation.....	7
2.1.2 Struktur und Aufbau von Enzymen.....	9
2.1.3 Biokatalytische Aktivität.....	11
2.2 Wässrige Zweiphasen-Extraktion (ATPE).....	13
2.2.1 Wässrige Zweiphasen-Systeme (ATPS).....	14
2.2.2 Stoffübergang durch Diffusion.....	17
2.2.3 Wechselwirkungen und Schlüsselparameter der ATPE.....	19
2.3 Wässrige Zweiphasen-Flotation (ATPF).....	24
2.3.1 Gaseintrag in das wässrige Zweiphasen-System.....	25
2.3.2 Aufstieg von Gasblasen im wässrigen Zweiphasen-System.....	27
2.3.3 Stofftransport durch Flotation.....	29
3 Materialien und Methoden	32
3.1 Materialien.....	32
3.1.1 Wässriges Zweiphasen-System.....	32
3.1.2 Phospholipase A ₂	33
3.1.3 Modellsuspensionen.....	34

3.2	Analysemethoden.....	34
3.2.1	Konzentrationsbestimmung der Phospholipase.....	34
3.2.2	Kolorimetrisches Enzymassay.....	35
3.2.3	Optische Blasengrößenanalyse.....	36
3.3	Extraktionsversuche.....	37
3.3.1	Ermittlung von Binodalen	37
3.3.2	Bestimmung von Konoden	38
3.3.3	Versuchsdurchführung der Extraktion	40
3.4	Flotationsversuche	40
3.4.1	Gasblaseneintrag in das ATPS	41
3.4.2	ATPF in der vertikalen Flotationszelle.....	42
3.4.3	Kontinuierliche ATPF im horizontalen Flotationsbecken.....	43
4	Charakterisierung stofflicher Schlüsselparameter	45
4.1	Auswahl eines wässrigen Zweiphasen-Systems	45
4.1.1	Vorauswahl von phasenbildenden Komponenten	45
4.1.2	PEG-Molekulargewicht.....	47
4.1.3	Volumenverhältnis und Konodenlänge	51
4.2	Äußere Einflussfaktoren auf die Flotation im wässrigen Zweiphasen-System	53
4.2.1	Einfluss von Temperatur, pH-Wert und additiven Salzen.....	53
4.2.2	Einfluss von Medienbestandteilen.....	60
4.2.3	Einfluss der Gasart auf die Enzymaktivität	64
4.3	Schlussfolgerungen.....	66
5	Implementierung des Gasblaseneintrags	69
5.1	Gaseintrag in ein wässriges Zweiphasen-System	69
5.1.1	Erzeugen von Gasblasen mit porösen Medien	70
5.1.2	Einfluss der Salzkonzentration und der Begasungsrate auf die Blasengröße.	72
5.2	Auswirkung des Gaseintrags auf die wässrige Zweiphasen-Flotation	75
5.2.1	Blasendurchtritt durch die wässrige Zweiphasen-Grenzfläche	75
5.2.2	Einfluss der Blasengrößenverteilung auf die Flotationskinetik.....	81
5.3	Schlussfolgerungen.....	84

6 Optimierung der Prozessführung und des Anlagendesigns	87
6.1 Charakterisierung von Prozessparametern.....	87
6.1.1 Einfluss der anfänglichen Enzymkonzentration.....	87
6.1.2 Einfluss der Blasenverweilzeit	91
6.1.3 Vergleich verschiedener Prozessführungen	94
6.2 Kontinuierliche wässrige Zweiphasen-Flotation	98
6.2.1 Entwicklung eines Flotationsbeckens.....	98
6.2.2 Charakterisierung der Phasenverwirbelung.....	102
6.2.3 Steigerung der Aufreinigungsgeschwindigkeit	107
6.3 Schlussfolgerungen.....	112
7 Fazit und Ausblick für zukünftige Arbeiten	115
7.1 Zusammenfassung	115
7.2 Einordnung der wässrigen Zweiphasen-Flotation	119
7.3 Ausblick.....	122
Anhang	125
A1. Chemikalien und technische Geräte	125
A2. Binodalen und Konodengleichungen.....	129
A3. Optische Blasengrößenanalyse	130
A4. Kolorimetrisches Aktivitätsassay	131
A5. Kalibrierungen für die Konzentrationsbestimmungen.....	133
A6. Versuchsaufbau Batch-Flotation.....	135
A7. Versuchsaufbau kontinuierliche Flotation.....	136
Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	139
Literaturverzeichnis	143

Kapitel 1

Motivation und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Mikroorganismen sind in der Lage einzigartige Stoffe umweltschonend aus nachwachsenden Rohstoffen zu erzeugen, die in vielen Bereichen des täglichen Lebens Einsatz finden. Wirkstoffe in Medikamenten und Kosmetika, technische Enzyme in Nahrungs- und Waschmitteln oder Ausgangsstoffe für biologisch abbaubare Kunststoffe sind nur einige Beispiele mikrobiell erzeugter Produkte [1].

Jedoch schränkt vor allem die aufwendige Trennung der biotechnologischen Produkte von den zahlreichen anderen Bestandteilen im wässrigen Fermentationsmedium die Anwendung in vielen Bereichen ein. Die Herstellungskosten industrieller Enzyme liegen zu über 50 % in den Aufbereitungskosten begründet [2]. Im Aufreiniungsprozess dominieren die geforderte Produktreinheit, sowie die Anzahl, Ausbeute und Effizienz der dafür benötigten Verfahrensschritte die Wirtschaftlichkeit. Mit jedem Trennschritt wird die Produktreinheit und/ oder die Produktkonzentration erhöht. Dies geht jedoch einher mit Produkt- und Materialverlusten und kostet Energie, Equipment und Zeit.

Häufig werden mehrere Trennverfahren in Reihe geschaltet, die auf verschiedenen Trennprinzipien beruhen. Die Verfahren klassieren dabei nach Partikelgröße, Dichte oder nach Stoff- und Oberflächeneigenschaften (z. B. Form, Ladung, Hydrophobizität). Ein Beispiel für die Reihenschaltung in der Enzymaufbereitung ist die Zellabtrennung durch Separatoren (Dichteunterschied), *Capturing* durch Fällung der Enzyme (Stoffeigenschaften), Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration (Größenabtrennung) und gegebenenfalls *Cleaning* durch Chromatographie oder Ionenaustauscher (spezifische Wechselwirkungen) [3].

Das Einsparen von Trennschritten ist durch die direkte Produktabtrennung in einem wässrigen Zweiphasen-System (*aqueous two-phase system*, ATPS) möglich. Durch Mischen von phasenbildenden Komponenten zweier verschiedener, wasserlöslicher Spezies (meist Polymere und Salze) in ausreichend hohen Konzentrationen bilden sich eine leichtere Ober- und eine schwerere Unterphase aus (siehe Abbildung 1-1). Wasser bildet den Hauptbestandteil beider Phasen und sorgt für eine hohe Biokompatibilität. In Polymer-Salz-Systemen hat die obere Phase meist eine hohe Polymer Konzentration und die Unterphase eine hohe Salzkonzentration. [4,5]

Die wässrige Zweiphasen-Extraktion (*aqueous two-phase extraction*, ATPE) ermöglicht Biomoleküle direkt aus komplexen Biosuspensionen abzutrennen und aufzukonzentrieren und ist durch eine hohe Selektivität gekennzeichnet. Dabei ist die Zusammensetzung des ATPS so gewählt, dass das Zielmolekül eine hohe Affinität zur Oberphase zeigt. Wird diese in Form kleiner Tropfen in der mit der Biosuspension beladenen Unterphase dispergiert, diffundiert das Zielmolekül in die Tropfen, während Verunreinigungen (z. B. Mikroorganismen) in der Unterphase verbleiben. Ohne Zufuhr von Mischenergie trennen sich die beiden wässrigen Phasen aufgrund ihres Dichteunterschieds und die Produktabtrennung ist erfolgt. Die ATPE ist ein etabliertes Aufbereitungsverfahren sowohl für Proteine, als auch kleinere Biomoleküle. [6]

Die wässrige Zweiphasen-Flotation (*aqueous two-phase flotation*, ATPF) kombiniert die Selektivität der ATPE mit dem hohen Stofftransport klassischer Flotation und konnte erstmals 2009 durch Bi *et al.* beschrieben werden [7]. In Abbildung 1-1 sind die Funktionsprinzipien der ATPE und ATPF dargestellt. Bei der ATPF werden Gasblasen am Boden einer Flotationszelle in die Unterphase eines ATPS eingeleitet. Biomoleküle mit hydrophoben Bereichen lagern sich an die Blasenoberfläche an, steigen mit den Gasblasen auf und gelangen so in die sammelnde Oberphase. Die ATPF kombiniert die hohe Selektivität des ATPS mit dem hohen Massentransfer der Flotation. Entscheidend für die Aufreinigung ist also nicht eine hohe Grenzfläche zwischen den wässrigen Phasen, sondern der Grenzflächeneintrag durch die Gasblasen. Als Resultat kann bei der ATPF auf eine große Menge an Oberphase verzichtet werden, wodurch sich die Materialkosten minimieren und eine höhere Aufkonzentrierung des Produkts im Vergleich zur ATPE möglich ist. [8]

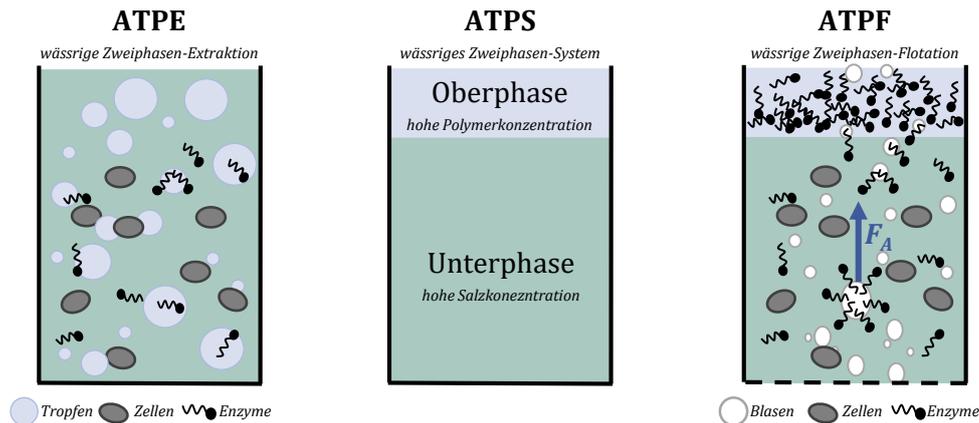


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung eines wässrigen Zweiphasen-Systems (ATPS, Mitte), der wässrigen Zweiphasen-Extraktion (ATPE, links) und der wässrigen Zweiphasen-Flotation (ATPF, rechts).

1.2 Stand der Technik

Die Flotation ist seit dem frühen 20. Jahrhundert ein etabliertes Trennverfahren in industriellen Bereichen wie der Erzaufbereitung und der Papierherstellung, sowie in der Abwasseraufbereitung [9]. In der Biotechnologie ist die Flotation seit den 1950er Jahren im Fokus. Zunächst beschränkt auf die Abtrennung von Biomasse [10–12] folgten später grundlegende Untersuchungen zur Schaumfraktionierung von Proteinen, um diese als Produkt zu gewinnen [13,14]. Die Studien zeigen, dass bei der Proteinflotation oft große Mengen stabilen Schaums mit hoher Feuchtigkeit anfallen. Dies bedingt den Transport und die Zerstörung des Schaums, sowie weitere Entwässerungsstufen und erschwert damit die weitere Prozessierung und vermindert die Aufkonzentrierung. Dadurch ist Wirtschaftlichkeit der Flotation als Aufbereitungsverfahren in der Biotechnologie reduziert. Die häufige Verwendung von Antischaummitteln während Fermentationsprozessen verhindert die Ausbildung eines stabilen Schaums und damit den Einsatz der Schaumfraktionierung.

Zu den nichtschäumenden Flotationstechniken gehört die *Solvent Sublation*, bei der das Produkt aus einer wässrigen Lösung in eine nicht mischbare, organische Phase flотиert wird. Das Verfahren ist erstmals von Fritz Sebba zur selektiven Ionenseparation beschrieben [15] und ermöglicht die Separation von selbst stark verdünnten Materialien aus einer Flüssigkeit durch Adsorption an aufsteigende Gasblasen und Übergang in ein nicht mischbares, leichteres Lösungsmittel oder in dessen Grenzfläche. Die hohe ausfällende Wirkung organischer Lösemittel limitiert die *Solvent*

Sublation in ihrem Einsatz für biologische Produkte. Durch Ersetzen der organischen Lösemittel durch ein wässriges Zweiphasensystem aus Ammoniumsulfat in der Unterphase und Polyethylenglykol (PEG) in der Oberphase konnte Peng-yu Bi 2009 erstmals die ATPF als eine Abwandlung der *Solvent Sublation* einführen [7]. Die Publikation zeigt, dass sich Penicillin, durch Adsorption an Stickstoffblasen, aus einer schweren salzreichen Phase entfernen und in einer leichten polymerreichen, wässrigen Phase anreichern lässt. Bei der Aufbereitung von biotechnologischen Produkten ist die ATPF eine mögliche Alternative zu Verfahrensschritten, welche sensitiv auf Oberflächenwechselwirkungen sind. Dazu zählen die Chromatographie, Adsorption, Lösungsmittelextraktion, ATPE und Schaumfraktionierung oder [16]. Die ATPF ist hochselektiv und ermöglicht ohne großen apparativen und energetischen Aufwand die direkte Abtrennung von Bioprodukten aus komplexen Biosuspensionen [17–23]. Damit hat sie laut Raja *et al.* das Potential zukünftig in verschiedensten Aufreinigungsprozessen von Biomolekülen mit erheblichen Vorteilen zum Einsatz zu kommen [24]. Die Forschungsergebnisse zur ATPF zeigen ein breites Anwendungspotential in der Aufbereitung von Biomolekülen. Diese können selektiv und mit großer Ausbeute in einer volumetrisch kleinen Oberphase gesammelt werden. Studien mit Lincomycin belegen den reduzierten Mengenbedarf an Polymer gegenüber der ATPE [25]. Show *et al.* Show erzielt einen Konzentrierungsfaktor von 16, einen Reinigungsfaktor (Zielenzymmenge/ Gesamtzymmenge) von über 14 und eine Ausbeute von 99,2% bei der ATPF einer Lipase aus einer Fermentationsbrühe [26].

Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht zur relevanten Literatur der ATPF. Die Informationen sind aufgegliedert in die Art der aufbereiteten Bioprodukte, den biologischen Ursprung bzw. Wirtsorganismus, das genutzte Zweiphasensystem, das Volumenverhältnis (V_R) von Ober- zu Unterphase und das Gesamtvolumen $V_{ges.}$. Ebenfalls aufgeführt ist die Art des Gaseintrags (Gas, Begasungsmedium und Porosität) und die maximal erreichte Ausbeute (Y). Neben den hohen Produktausbeuten sind vor allem die geringen Volumenverhältnisse zwischen Ober- und Unterphase hervorzuheben, die zu hohen Aufkonzentrierungen des Produkts und reduzierten Materialkosten führen. Jedoch nutzen die meisten Studien einen umfunktionierten Laborfilter als Standardaufbau und betreiben die ATPF im Batch-Betrieb und fokussieren sich auf die Konditionierung der Zweiphasen-Stoffsysteme für verschiedene Bioprodukte.

Tabelle 1.1: Literaturübersicht zur wässrigen Zweiphasen-Flotation (ATPF)

Pordukt	Ursprung	ATPS	V_R	V_{ges}	Begasung	Y	Quelle
Penicillin	<i>Pencillium chrysogenum</i>	PEG 1000 (50% v/v) + (NH ₄) ₂ SO ₄ (350 g/L)	0,05	315 mL	N ₂ (45 ccm) Glasmembran G4	>95%	[7]
Linco- mycin	Fermentati- onsbrühe	PEG 1000 (50% w/w) + K ₃ PO ₄ (500 g/L)	0,03	310 mL	N ₂ (60 ccm) Glasmembran G4	85%	[25]
Lipase	<i>Burkholderia cepacia ST8</i>	EOPO3900(50% w/w) + (NH ₄) ₂ SO ₄ (250 g/L)	0,05	210 mL	N ₂ (30 ccm) Glasmembran G4	>98%	[27]
Lipase	<i>Burkholderia cepacia ST8</i>	2-Propanol (50% w/w) + K ₃ PO ₄ (250 g/L)	0,04	1040 mL	N ₂ (30 ccm) Glasmembran G4	>99%	[26]
Bromelain	Annanas	PEG 1500 (14% w/w) + K ₃ PO ₄ (18% w/w)	n.a.	300 mL	N ₂ (30 ccm) Glasmembran G4	>91%	[28]
Lipase	<i>E. Coli</i> (rek.)	PEG 8000 + Na-Citrat (120 g/L)	0,30	300 mL	N ₂ (30 ccm) Glasmembran G4	>96%	[29]
CDGT*	<i>Bacillus cereus</i>	PEG 8000 (18% w/w) + K ₃ PO ₄ (7% w/w)	0,25	100 mL	N ₂ (5000 ccm) n.a.,	>97%	[21]
Polyphenole	Camu-Camu Planze	PEG 400 (80% w/w) + (NH ₄) ₂ SO ₄ (450 g/L)	0,10	2500 mL	Luft (37,5 ccm) Glasmembran G4	81%	[30]
α-Lact- albumin	Molke	PEG 1000 (50% w/w) + Na-Citrat (40% w/w)	0,14	40 mL	N ₂ (35 ccm) Glasmembran G4	87%	[19]
Astaxanthin	Mikroalge <i>H. pulvialis</i>	2-Propanol (rein) + (NH ₄) ₂ SO ₄ (350 g/L)	1	1500 mL	Luft (80 ccm) Glasmembran G4	84%	[31]
Xylanase	<i>Bacillus subtilis</i>	2-Propanol (28% w/w) + (NH ₄) ₂ SO ₄ (22% w/w)		25 g	Luft (30 ccm) Glasmembran G4	90%	[18]

* Die Abkürzung CDGT steht für Cyclodextringlycosyl-Transferase

Der Gasblaseneintrag in die Unterphase ist bisher nicht grundlegend untersucht. Show *et al.* definiert eine optimierte Begasung rein qualitativ auf der Abhängigkeit der Ausbeute zu der im Standardaufbau verwendeten Porosität G4 (5 – 15 μ m) der gesinterten Glasscheibe bei einem Gasvolumenstrom von 30 mL/min N₂ [26]. Jedoch ist sind sowohl die Porosität, als auch der Gasvolumenstrom nur für den hier verwendeten Aufbau gültig und nicht übertragbar. Auch zur Prozessführung oder zum Anlagenkonzept der ATPF sind bisher keine Forschungsarbeiten bekannt. Einzig Versuche im (semi-) Pilotmaßstab in vergrößerten Flotationszylindern mit Gesamtvolumen von 2500 mL [30] oder umgebauten Wasserspendern [32] mit einem Volumen von knapp über 1 L befassen sich mit dem Apparatedesign für die wässrige Zweiphasen-Flotation.

Für einen *scale up* der ATPF auf einen Industriemaßstab fehlen Erkenntnisse zum Einfluss des Gaseintrags, der Prozessführung und des Anlagendesigns. An dieser wissenschaftlichen Lücke

setzt diese Arbeit an. Bei der Auswahl eines geeigneten Zweiphasen-Systems liegt der Fokus auf der Identifikation allgemeiner Schlüsselparameter und nicht auf der Optimierung der Zusammensetzung für ein bestimmtes Produkt, wie es etwa durch *high-throughput-screenings* mit Hilfe von Pipettierrobotern möglich wäre [33]. Der Einfluss des Gaseintrags auf die ATPF wird grundlegend untersucht und eine übertragbare Optimierung der Prozessführungsstrategie und des Anlagendesigns vorgestellt.

1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit liegt in der Entwicklung einer Strategie für die Prozessentwicklung der wässrigen Zweiphasen-Flotation am Beispiel des technischen Enzyms Phospholipase A₂. Dabei gliedern sich die Untersuchungen in nachfolgende drei offene Fragestellungen, die in den Kapiteln 4 – 6 behandelt werden.

(1) *Charakterisierung stofflicher Schlüsselparameter*

Für eine hohe Aufkonzentrierung der Phospholipase in der Oberphase bedarf es eines geeigneten Zweiphasen-Systems. Welche phasenbildenden Komponenten kommen in Frage und wie ist die Zusammensetzung der Ober- und Unterphase zu definieren? Welche äußeren Faktoren und Bestandteile von Biosuspensionen beeinflussen die Aufreinigung des Enzyms?

(2) *Implementierung des Gasblaseneintrags in die Flotationszelle*

Der Eintrag von Gasblasen in der Unterphase bildet die Grundlage des Massentransfers der Enzyme in die Oberphase. Wie können Gasblasen effizient in die Flotationszelle eingetragen werden und welche Auswirkungen zeigen die Blasengrößenverteilung und der Gasvolumenstrom auf die wässrige Zweiphasen-Flotation?

(3) *Optimierung der Prozessführung und des Anlagendesigns*

Für eine möglichst schnelle und effiziente Aufreinigung ist eine ideale Prozessführung und ein optimiertes Anlagendesign nötig. Wie sind Prozessparameter zu wählen und welches Apparatkonzept ermöglicht eine maximale Raum-Zeit-Ausbeute der wässrigen Zweiphasen-Flotation?

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen

2.1 Technische Enzyme

Enzyme sind makromolekulare Biokatalysatoren, die unter milden Reaktionsbedingungen (pH, Temperatur und Druck) Reaktionen um einen Faktor $10^8 - 10^{20}$ beschleunigen und dabei Substrate selektiv umsetzen [2]. Diese Eigenschaften führen zu einem weit verbreiteten industriellen Einsatz in der Pharmazie, in der Lebensmittelverarbeitung, in Waschmitteln, bei der Gewinnung von Biokraftstoffen oder bei der Verarbeitung von Zellstoff in der Papierherstellung [34]. Xylanasen und Phytasen (weltweite Jahresproduktion zusammen 60 t/a) sorgen für eine bessere Verwertbarkeit von Futtermitteln. In Waschmitteln bauen Lipasen (20 t/a) Fette und Proteasen (2000 t/a) Proteine ab. Cellulasen (40 t/a) spalten Baumwollfasern und werden in der Textilverarbeitung eingesetzt, ebenso wie die stärkespaltenden Amylasen (1200 t/a) [1]. Der gestiegene Bedarf an technischen Enzymen wird mittlerweile zu 90 % durch mikrobielle Fermentation gedeckt [35]. Eine geeignete Produktaufbereitung und Formulierung ermöglicht die Herstellung geeigneter Enzympräparate (z. B. Pulver) [36].

2.1.1 Gewinnung durch mikrobielle Fermentation

Unter dem *Upstream* von Enzymen versteht man die mikrobielle Fermentation von Mikroorganismen in Bioreaktoren, welche die Enzyme produzieren. Dies umfasst ebenfalls die Nährmedienvorbereitung. Die Enzympaufbereitung wird als *Downstream* bezeichnet und beinhaltet alle Prozessschritte, die nach der Fermentation erfolgen, um das fertige Enzymprodukt herzustellen. [2]

Upstream von Enzymen

Als Mikroorganismen in der industriellen Enzymproduktion kommen vorwiegend Bakterienstämme wie *Bacillus* und Streptomyceten oder Pilzstämme der Gattungen *Aspergillus* und *Trichoderma reesei* zum Einsatz. Diese Mikroorganismen zeichnen sich dadurch aus, dass sie Enzyme extrazellulär in das Fermentationsmedium sekretieren und somit die anschließende Enzymaufreinigung erleichtern. Die Fermentation erfolgt in großen Bioreaktoren mit Volumen von bis zu 200 m³ und Enzymkonzentrationen von 15 – 30 g/L. [1]

Das Fermentationsmedium hat die Aufgabe den Mikroorganismen alle Nährstoffe zur Verfügung zu stellen, die sie für ihr Wachstum und die Enzymexpression benötigen. Diese lassen sich aus der elementaren Zusammensetzung der Mikroorganismen ableiten (Analogieschlussmethode). Bakterien, Hefen und Pilze bestehen zu ca. 50 % aus Kohlenstoff, zwischen 4 – 14 % aus Stickstoff und bis zu 2,6 % aus Phosphor. Die Anteile der Elemente Schwefel, Magnesium, Natrium, Calcium und Eisen sind kleiner 1 %. Spurenstoffe wie Mangan und Molybdän sind zwar teilweise nur im Promille-Bereich in Mikroorganismen zu finden, sind aber für das Wachstum wichtig. [2]

Definierte Medien enthalten auf den Bedarf des Produktionsstammes angepasste Zusammensetzungen an Nährstoffen und werden bei der Herstellung von Proteinen und Enzymen für Kosmetika oder pharmazeutische Produkte verwendet, um eine gute Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Batch-Fermentationen zu ermöglichen und um pathogene Bestandteile tierischen Ursprungs auszuschließen. Semi-definierte Medien setzen sich aus den Bestandteilen des definierten Mediums und einem weiteren, undefinierten Substrat (z. B. Hefeextrakt) zusammen. Komplexmedien bestehen zum Großteil oder ausschließlich aus solchen komplexen Nährstoffquellen. Weitere Beispiele hierfür sind Tryptone und Peptone. Insbesondere bei der Herstellung von Bulk-Enzymen dienen Nebenprodukte anderer Prozesse wie Melasse (Zuckerindustrie, enthält Sucrose) und Molke (Käseproduktion, enthält Lactose) als Kohlenstoffquelle, um die Kosten für das Fermentationsmedium so gering wie möglich zu halten. [37]

Downstream von Enzymen

Der Aufbereitungsprozess von Enzymen lässt sich in mehrere, nacheinander folgende Schritte unterteilen. Zunächst erfolgt die Abtrennung der Mikroorganismen durch Mikrofiltration oder Sedimentation aus der Fermentationsbrühe. Liegen die Enzyme extrazellulär vor, entfällt ein anschließender Zellaufschluss. Die Aufkonzentrierung der Enzyme erfolgt entweder durch Ultrafiltration, Kristallisation oder Präzipitation oder durch alternative Verfahren. Während bei pharmazeutischen Enzymen anschließend ein Reinigungsschritt durch beispielsweise Chromatographie notwendig ist, können technische Enzyme aufgrund der geringeren Produkthanforderungen bezüglich Reinheit hin zum fertigen Enzymprodukt konfektioniert werden. Dieses kann nach Zusatz von stabilisierenden Agenzien ein Enzymkonzentrat oder ein durch (Sprüh-)Trocknung erzeugtes Enzympulver sein. Integrative Verfahren wie die wässrige Zweiphasen-Extraktion oder Fließbettadsorption ermöglichen eine direkte Produktgewinnung aus Fermentationsbrühen und reduzieren so die benötigte Zahl an Trennschritten und die Wasserfracht im Prozess. Jedoch sind auch diese Verfahren eher bei der Aufreinigung hochpreisiger Enzyme verbreitet, die den Kostenaufwand für die dafür nötigen Materialien rechtfertigen. [2,3,5]

2.1.2 Struktur und Aufbau von Enzymen

Enzyme sind Proteine mit biokatalytischen Eigenschaften. Die Grundbausteine dieser makromolekularen Kohlenwasserstoffverbindungen sind 20 verschiedene Aminosäuren. Diese sind prinzipiell gleich aufgebaut: Am zentralen Kohlenstoffatom ist eine Aminogruppe (NH_3^+), eine Carboxylgruppe (COO^-), ein Wasserstoffatom (H) sowie eine variable Seitenkette (Rest, R) gebunden. Diese Seitenketten bewirken, dass Aminosäuren entweder negativ (z. B. Asparagin- und Glutaminsäure), positiv (z. B. Lysin, Arginin und Hystedin) geladen oder unpolar (z.B Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Tryptophan und Methionin) sind. Durch Peptidbindungen zwischen den Carboxyl- und Aminogruppen entstehen Polypeptidketten mit bis zu 2500 Aminosäureresten.

Die Primärstruktur beschreibt die Abfolge der gebundenen Aminosäuren und ist die erste von vier Strukturebenen zur Beschreibung des Aufbaus von Proteinen. Wasserstoffbrücken zwischen den Peptiden führen zu räumlichen Anordnungen innerhalb der Polypeptidkette. Die entstehenden Sekundärstrukturen können α -Helices oder β -Faltblätter sein. Diese wiederum falten sich durch

hydrophobe Wechselwirkungen, ionische Bindungen, Wasserstoff- und Disulfidbindungen zur übergeordneten, dreidimensionalen Tertiärstruktur. Dabei entstehen funktionale Einheiten, sogenannte Domänen, die für die Bindung des Substrats oder von Cofaktoren zuständig sind. Das aktive Zentrum, in welchem die katalysierte Reaktion stattfindet, liegt oft zwischen zwei Domänen im inneren des Enzyms, um von äußeren Einflüssen geschützt zu sein. Enzyme bestehen oft aus mehreren aggregierten Polypeptidketten, die so eine Quartärstruktur bilden. [3,37,38]

Die räumliche Ausdehnung von Enzymen erfolgt in verschiedensten Formen, und kann nicht als starr betrachtet werden. Deshalb wird die Größe von Enzymen meist durch ihr Molekulargewicht (charakterisiert, welches sich durch Sedimentationsversuche oder Gelfiltrationen bestimmen lässt und in der Einheit Dalton (*Da*) angegeben wird. Ein *Da* entspricht ca. $1,66 \cdot 10^{-27}$ kg. Die tatsächliche Abmessung von Enzymen lässt sich nur schwer abschätzen. Eine minimale Länge erhält man aus der vereinfachten Annahme einer Kugelform, deren Radius sich für typische Proteine im einstelligen Nanometerbereich befindet [39]. Insgesamt sind ca. 45 % der Proteinoberfläche mit hydrophoben Aminosäuren belegt, wobei bei wasserlöslichen Enzymen meist auch hydrophile (geladene) Aminosäuren nach außen gerichtet sind [2]. Die Größe und Oberflächeneigenschaften von Enzymen führen dazu, dass sie teils ähnliche Eigenschaften wie Partikeln aufweisen. Ein Beispiel hierfür ist die Existenz eines isoelektrischen Punkts, also einem pH-Wert bei welchem die Anzahl positiv und negativ geladener Gruppen auf der Oberfläche gleich ist [40]. Am isoelektrischen Punkt sind die elektrostatischen (Abstoßungs-)Kräfte stark reduziert und dadurch hydrophobe Wechselwirkungen verstärkt, was zu einer gesteigerten Anlagerung an Gasblasen in Flotationsprozessen führt [41]. Die fehlende Oberflächenladung reduziert jedoch gleichzeitig die Interaktion der Aminosäuren mit den umgebenden Wassermolekülen und damit die Löslichkeit [42], was zum Ausfällen der Enzyme führen kann. Neben dem pH-Wert beeinflussen weitere äußere Einflüsse wie die Temperatur die Eigenschaft von Enzymen. Niedrige Temperaturen verlangsamen die Biokatalyse und zu hohe Temperaturen können zur thermischen Denaturierung führen [3]. Eine *Pegylierung* schützt Enzyme vor äußeren Einflüssen und erhöht ihre Stabilität [37,43–45]. Dabei lagern sich langkettige Polyethylenglycol-Moleküle um das Enzym und schirmen dieses ab und erhalten so die räumliche Konformität und biokatalytische Aktivität des Enzyms.

2.1.3 Biokatalytische Aktivität

Enzyme zeichnen sich durch eine hohe Substrat- und Reaktionsspezifität aus. Die komplexe Struktur des aktiven Zentrums erlaubt die selektive Anlagerung eines speziellen Substratmoleküls. Die Unterscheidung ist dabei bei manchen Enzymen so sensitiv, dass nur die Umsetzung einzelner Enantiomere erfolgt. Die katalysierte Reaktion findet meist regiospezifisch an einer bestimmten Stelle des Substratmoleküls statt. Anhand der Art der Reaktion können Enzyme in sechs Hauptklassen unterschieden werden: Oxidoreduktasen (Reduktion/ Oxidation eines Moleküls), Transferasen (Transfer funktioneller Gruppen), Hydrolasen (Spaltung unter Freisetzung von Wasser), Lyasen (nicht hydrolytische Spaltung), Isomerasen (Intramolekulare Umwandlung) und Ligasen (Spaltung/ Bildung zweier Moleküle unter Energie Verbrauch).[3]

Im einfachsten Fall einer Enzymreaktion 1. Ordnung setzt ein Enzymmolekül (E) ein Substratmolekül (S) zu einem Produktmolekül (P) um. Dabei bildet sich entsprechend Gleichung (2.1) zunächst ein Enzym-Substrat-Komplex (ES), bevor das Produkt gebildet und das Enzym wieder freigesetzt wird. Die Geschwindigkeitskonstanten k_{-1} , k_1 und k_2 beschreiben dabei die Kinetik der einzelnen Reaktionsschritte.



Die exemplarischen Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 2-1 dargestellt.

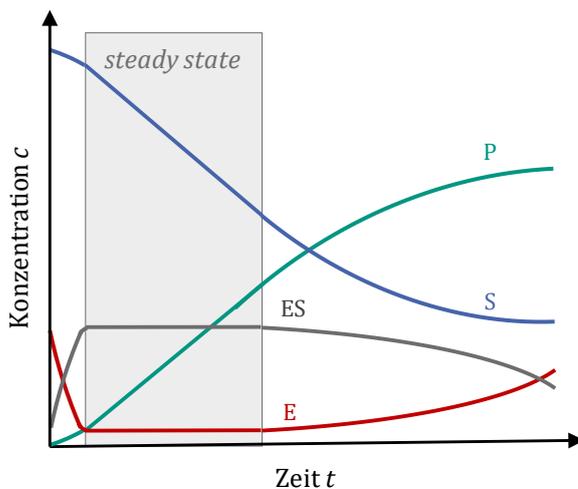


Abbildung 2-1: Zeit-Umsatz-Diagramm einer Enzymreaktion 1. Ordnung nach [46]

Die Reaktionsgeschwindigkeit (v) mit der ein Substratmolekül abgebaut und ein Produktmolekül gebildet wird, kann entsprechend der Michaelis-Menton-Gleichung¹ (2.2) beschrieben werden.

$$v = -\frac{dc_S}{dt} = \frac{dc_P}{dt} = \frac{v_{\max} c_S}{K_m + c_S} \text{ mit } K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.2)$$

In der Michaelis-Menton-Konstanten K_m sind die Reaktionskonstanten k_1 , k_{-1} und k_2 zusammengefasst. Bei niedrigen Substratkonzentrationen ($c_S \ll K_m$) folgt eine lineare Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (v) von der Substratkonzentration. Ist diese jedoch sehr hoch ($c_S \gg K_m$), so läuft die Reaktion mit der maximalen Geschwindigkeit (v_{\max}) ab. [3]

Enzymprodukte werden oft durch ihre **katalytische Aktivität a** spezifiziert. Diese gibt an, wieviel Substrat durch ein Enzymmolekül in einer Minute umgesetzt, bzw. wieviel Produkt gebildet wird (Gleichung (2.3)). Für eine maximale Aktivität müssen die Reaktionsbedingungen optimal sein. Das heißt die Temperatur und der pH-Wert des umgebenden Mediums müssen so gewählt werden, dass das Enzym bestmöglich arbeiten kann. Manche Enzyme benötigen ebenfalls Co-Faktoren, um eine Reaktion zu katalysieren. Beispielsweise ist die Abspaltung von Fettsäuren von Phospholipiden durch eine Phospholipase produziert von dem Mikroorganismus *Streptomyces violaceoruber* in einem pH-Wert Bereich zwischen 7.3 – 8.3 bei 50 °C sowie der Präsenz von Ca^{2+} Ionen maximal [47]. Die Aktivität mancher Enzyme kann auch durch eine zu hohe Substrat- oder Produktkonzentration eingeschränkt werden. Eine solche Substrat- bzw. Produktinhibierung gilt es ebenso zu vermeiden wie eine Substratlimitierung.[3]

$$a = \frac{\text{Umgesetztes Substrat}}{\text{Zeit } t} = \frac{\text{Gebildetes Produkt}}{\text{Zeit } t} \text{ in } \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \quad (2.3)$$

Mithilfe von Enzymassays lässt sich die Aktivität von Enzymen experimentell bestimmen. Dabei wird unter definierten Bedingungen (z. B. pH-Wert, Temperatur) die Bildung des Produkts oder die Substratabnahme während der Enzymreaktion verfolgt. Je nach Enzymreaktion ist dafür eine möglichst sensitive und selektive aber auch reproduzierbare und einfache bzw. schnell durchzuführende Methode zu wählen. [3,38]

¹ Herleitung und Anpassung an Reaktionen höherer Ordnungen in Lehrbüchern zur Enzymkinetik zu finden, z.B. [3,46]

Die Substrat- bzw. Produktkonzentration kann auf verschiedene Weise während der Enzymreaktion gemessen werden. Eine direkte Quantifizierung der einzelnen Spezies kann z. B. durch spektrometrische Messmethoden wie der UV/ VIS-, Fluoreszenz-, oder NMR-Spektroskopie erfolgen. Ist dies nicht möglich, lässt sich der Reaktionsfortschritt oft indirekt, z. B. durch eine mögliche Wärmeentwicklung (Kalorimetrie) oder pH-Wert Änderung des umgebenden Mediums ermitteln [46]. Letzteres kann sowohl durch Titration oder mithilfe von pH-Indikatoren erfolgen. Solche kolorimetrischen Assays ermöglichen beispielsweise die Abspaltung von Fettsäuren von Phospholipiden durch Phospholipasen zu quantifizieren. Die resultierende leichte Ansäuerung des umgebenden Mediums führt zu Farbänderungen von Indikatoren wie Bromthymolblau [48,49] oder Phenolrot [50,51], welche sich im Spektrophotometer quantifizieren lassen.

2.2 Wässrige Zweiphasen-Extraktion (ATPE)

Das Lösen zweier verschiedener, hydrophiler phasenbildender Stoffe in Wasser in ausreichend hoher Konzentration führt zu der Bildung eines wässrigen Zweiphasen-Systems (ATPS). Dabei bildet sich eine schwerere Unterphase und eine leichtere Oberphase aus. Hauptbestandteil beider Phasen ist neben Wasser jeweils eine der beiden phasenbildenden Komponenten. Diese sind meist Polymere, Alkohole, Salze oder auch Tenside und ionische Flüssigkeiten [4]. Die beiden wässrigen Phasen eines ATPS unterscheiden sich nicht nur in ihrer Zusammensetzung, sondern auch in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften. Diese führen dazu, dass Biomoleküle oft zu einer der beiden Phasen eine höhere Affinität aufweisen und sich in dieser Phase anreichern. Das unterschiedliche Verteilungsverhalten innerhalb eines ATPS von verschiedenen Bestandteilen einer Biosuspension kann genutzt werden, um das Produkt zu extrahieren und so von den anderen Bestandteilen zu trennen.

Bei der wässrigen Zweiphasen-Extraktion (ATPE) wird die Biosuspension zunächst mit beiden phasenbildenden Komponenten versetzt und durch Eintrag von Mischenergie homogenisiert. Anschließend erfolgt die Ausbildung einer kontinuierlichen und einer dispersen Phase in Abwesenheit des Energieeintrags. Welche der beiden Phasen kontinuierlich und welche dispers vorliegt, hängt dabei sowohl vom Zweiphasen-System, als auch vom Energieeintrag ab. Starkes Rühren führt meist zu einer kontinuierlichen Oberphase, während bei sanftem Rühren die Unterphase kontinuierlich vorliegt [52]. Während der Phasenausbildung diffundieren die Moleküle in die Tropfen der dispersen Phase oder verbleiben in der kontinuierlichen Phase. Durch Sedimentation

im Erd- oder Zentrifugalfeld lassen sich die beiden Phasen aufgrund ihres Dichteunterschieds voneinander trennen und so eine Phasenseparation erzielen. [52–55]

Im industriellen Maßstab kommen für Batch-Extraktionen meist einfache Rührkessel zum Einsatz. Eine kontinuierliche Extraktion ist hingegen mit Mischabscheidern (*mixer-settler*), Tellerseparatoren oder Extraktionskolonnen möglich. Dazu werden die beiden Phasen getrennt voneinander angesetzt, wobei eine der beiden Phasen die Biosuspension enthält. Anschließend werden die beiden Phasen im gewünschten Volumenverhältnis kontinuierlich in den Extraktionsapparat gepumpt und an anderer Stelle nach dem Stoffübergang und der Phasentrennung wieder abgeführt. [56]

Es gibt eine Vielzahl von Einflussfaktoren auf das Verteilungsverhalten eines Biomoleküls innerhalb eines ATPS, die sich teils gegenseitig bedingen. Allgemeingültige Zusammenhänge sind oft schwer zu finden, was die Auswahl eines geeigneten Extraktionssystems erschwert und den Einsatz von Hochdurchsatz-Screening rechtfertigt [4,33,57–61]. Generell ist bei der Prozessentwicklung der ATPE ein strategisches Vorgehen unabdingbar. Zunächst ermöglicht eine ökonomische Betrachtung zwischen einem Polymer-Salz System oder ein Polymer-Polymer System zu entscheiden [6]. Der Einsatz letzteres ist aufgrund der höheren Materialkosten für Polymere nur für hochwertige Produkte zu rechtfertigen [62]. Anschließend gilt es die physiochemischen Eigenschaften des Produkts und der Verunreinigungen in der Biosuspension zu charakterisieren. Dazu zählen insbesondere das Molekulargewicht, der isoelektrische Punkt und der hydrophobe Charakter. Dadurch lässt sich eine Vorauswahl der phasenbildenden Komponenten treffen. Durch Extraktionsversuche sind nachfolgend der Einfluss von Systemparametern wie beispielsweise das Polymermolekulargewicht, die Konodenlänge und das Volumenverhältnis, so wie der gewählte pH zu bestimmen. Erst nach der Wahl des Extraktionssystems können Prozessparameter wie z. B. die anfängliche Konzentration der Biosuspension, die Prozessführung oder die Geometrie des Extraktionsapparates optimiert werden.[6,62]

2.2.1 Wässrige Zweiphasen-Systeme (ATPS)

Die Mischungslücke eines wässrigen Zweiphasen-Systems kann durch Auftragung der Massenverhältnisse der beiden phasenbildenden Komponenten und des Lösungsmittels Wasser in einem Dreiecksdiagramm gezeigt werden. Eine einfachere Darstellung als Zweiphasendiagramm ergibt sich aus der Betrachtung des Wassers als kontinuierliche Phase und dem Auftragen der Massenkonzentrationen der beiden phasenbildenden Komponenten auf der Ordinate bzw. Abszisse.

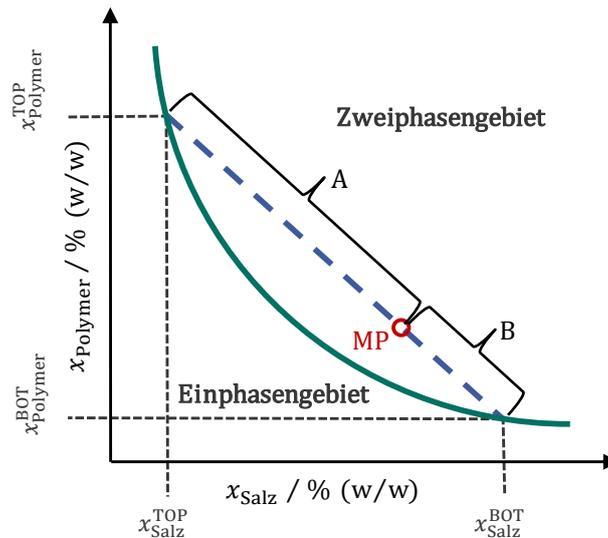


Abbildung 2-2: Beispiel eines Zweiphasen-Diagramms für ein Polymer-Salz Zweiphasen-System.

In Abbildung 2-2 ist beispielhaft das Zweiphasen-Diagramm eines Polymer-Salz-Systems gezeigt. Auf der Abszisse ist die Massenkonzentration des Salzes (x_{Salz}) und auf der Ordinate die Massenkonzentration des Polymeren (x_{Polymer}) aufgetragen. Beide phasenbildenden Komponenten lassen sich bis zu bestimmten Grenzkonzentrationen in einer einphasigen wässrigen Lösung lösen. Die Binodale (grüne, durchgezogene Linie) beschreibt die Grenze der Konzentrationsverhältnisse, ab welcher sich ein Zweiphasengebiet ausbildet. Liegt das Mischungsverhältnis bzw. der Mischungspunkt (MP, roter Kreis) im Zweiphasengebiet oberhalb der Binodalen, bildet sich eine schwerere Unterphase und eine Oberphase geringerer Dichte aus.

Die Zusammensetzungen der Unter- und Oberphase können an den Schnittpunkten der so genannten Konoden (blaue, gestrichelte Linie) mit der Binodalen abgelesen werden. Alle Mischungspunkte auf einer Konode führen zu gleichen Polymer- bzw. Salzkonzentrationen in der jeweiligen Phase und damit zu gleichen Phaseneigenschaften (z. B. Dichte, Oberflächenspannung, Viskosität). Jedoch unterscheiden sich für verschiedene Arbeitspunkte das Volumenverhältnis (V_R) der jeweiligen Ober- und Unterphase. Dieses ist experimentell bestimmbar oder lässt sich aus dem Strahlensatz ableiten (siehe Gleichung (2.4)) [63]. V steht dafür für das Volumen, m für die Masse und ρ für die Dichte. Die Indizes TOP und BOT stehen dabei für die Ober- bzw. Unterphase.

$$\begin{aligned}
 V_R &= \frac{V_{\text{TOP}}}{V_{\text{BOT}}} = \frac{m_{\text{TOP}} \rho_{\text{BOT}}}{m_{\text{BOT}} \rho_{\text{TOP}}} = \frac{B \rho_{\text{BOT}}}{A \rho_{\text{TOP}}} \\
 &= \frac{x_{\text{Salz}}^{\text{BOT}} - x_{\text{Salz}}^{\text{MP}}}{x_{\text{Salz}}^{\text{MP}} - x_{\text{Salz}}^{\text{TOP}}} \cdot \frac{\rho_{\text{BOT}}}{\rho_{\text{TOP}}} = \frac{x_{\text{Polymer}}^{\text{MP}} - x_{\text{Polymer}}^{\text{BOT}}}{x_{\text{Polymer}}^{\text{TOP}} - x_{\text{Polymer}}^{\text{MP}}} \cdot \frac{\rho_{\text{BOT}}}{\rho_{\text{TOP}}}
 \end{aligned} \tag{2.4}$$

Je nach Wahl des Mischungspunktes ergeben sich unterschiedliche Konoden. Die Konodenlänge (*tie-line length*, TLL) lässt sich mit Hilfe des Satzes des Pythagoras nach Gleichung (2.5) aus den Konzentrationsgradienten der jeweiligen phasenbildenden Komponenten zwischen Ober- und Unterphase berechnen [64].

$$\text{TLL} = A + B = \sqrt{\left(x_{\text{Salz}}^{\text{BOT}} - x_{\text{Salz}}^{\text{TOP}}\right)^2 + \left(x_{\text{Polymer}}^{\text{TOP}} - x_{\text{Polymer}}^{\text{BOT}}\right)^2} \tag{2.5}$$

Die Konoden innerhalb eines definierten Zweiphasen-Systems sind nahezu parallel. Die Steigung der Konoden (m) für eine ermittelte Konode folgt nach Gleichung (2.6). [63]

$$m = \frac{x_{\text{Polymer}}^{\text{TOP}} - x_{\text{Polymer}}^{\text{BOT}}}{x_{\text{Salz}}^{\text{BOT}} - x_{\text{Salz}}^{\text{TOP}}} \tag{2.6}$$

Das Verschieben der Konoden bei gleichbleibender Steigung in Richtung Binodalen führt zu dem kritischen Punkt. An ihm ist die Konodenlänge minimal ($\text{TLL} \rightarrow 0 \%$ (w/w)) und die Zusammensetzung sowie die Eigenschaften der Ober- und Unterphase identisch. Hingegen nehmen die Konzentrationsgradienten und damit die Unterschiede in den Phaseneigenschaften mit dem Abstand zum kritischen Punkt, also mit zunehmender Konodenlänge zu [4]. Dabei steigt vor allem die Polymerkonzentration in der Oberphase und die Salzkonzentration in der Unterphase (siehe Abbildung 2-2). Dies führt zu einem Anstieg der Viskosität in der Oberphase und zu einer erhöhten Dichte der Unterphase und damit zu einem gesteigerten Unterschied beider Parameter zwischen den Phasen [65]. Die Grenzflächenspannung zwischen Ober- und Unterphase steigt mit einer Potenz zwischen 3.5 – 4.2 zur Konodenlänge [64,66]. Allgemein zeichnen sich ATPS jedoch durch sehr kleine Grenzflächenspannung im Bereich von $10^{-4} - 10^{-3}$ mN/m aus und sind damit um den Faktor 1000 geringer als zwischen Wasser und Ölen, worin sich die hohe Biokompatibilität von ATPS begründet [4,63].

2.2.2 Stoffübergang durch Diffusion

Weißt ein Stoff Konzentrationsgradienten innerhalb einer kontinuierlichen Phase auf, kommt es zur Diffusion. Das heißt es entsteht ein Stoffstrom durch die Flüssigkeit, bis sich eine homogene Konzentration einstellt. Das 1. Fick'sche Gesetz (2.7) beschreibt die Abhängigkeit der Diffusionsstromdichte (J) durch eine Fläche (A) vom örtlichen molaren Konzentrationsgradienten ($\frac{\partial \tilde{c}}{\partial z}$) in Proportionalität zum Diffusionskoeffizienten (D).

$$J = -D A \frac{\partial \tilde{c}}{\partial z} \quad (2.7)$$

In einem abgeschlossenen Volumen ändert sich durch den Stoffstrom der Konzentrationsgradient des Stoffes innerhalb der Flüssigkeit über die Zeit. Die zeitliche Konzentrationsänderung wird durch das 2. Fick'sche Gesetz berücksichtigt. Gleichung (2.8) liefert einen Ausdruck für die zeitliche molare Konzentrationsänderung für den eindimensionalen Fall und unter Annahme eines konstanten Diffusionskoeffizienten, wobei z die Ortskoordinate und t die Zeit beschreibt.

$$\frac{\partial \tilde{c}}{\partial t} = -D \left(\frac{\partial^2 \tilde{c}}{\partial z^2} \right) \quad (2.8)$$

Ein prominenter Ansatz für den Ausdruck des Diffusionskoeffizienten ergibt sich aus der Stokes-Einstein-Beziehung (Gleichung (2.9)) für ein kugelförmiges Teilchen mit Radius r , in Abhängigkeit der Temperatur (T), und der Viskosität der Flüssigkeit (η) und unter Einbeziehung der Boltzmannkonstanten (k_B) [67].

$$D = \frac{k_B T}{6 \pi \eta r} \quad (2.9)$$

Aufgrund der Komplexität der räumlichen Anordnung sowie der Abhängigkeit von äußeren Faktoren wie der Ionenstärke oder dem pH-Wert der Lösung, lässt sich durch die Stokes-Einstein-Beziehung der Diffusionskoeffizient für Proteine nur schlecht abschätzen und auch experimentell nur unter hohem Aufwand bestimmen [68]. Allgemein liegen Diffusionskoeffizienten von Proteinen im Bereich zwischen $10 - 100 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [69] und sind neben der Temperatur abhängig vom Molekulargewicht des Proteins. Eine einfachere Möglichkeit D abzuschätzen kann durch einen empirischen Ansatz erfolgen. Durch Korrelation mit über 300 Proteinen stellten Young-Carroad und Bell ein empirisches Modell (Gleichung (2.10)) zur Abschätzung von D in Abhängigkeit der

Temperatur (T), des Molekulargewichts des Proteins (M) und der Viskosität der umgebenden Flüssigkeit (η) auf [70].

$$D = 8,34 \cdot 10^{-8} \frac{T}{\eta M^{1/3}} \quad D \text{ in } \frac{\text{cm}^2}{\text{s}} ; T \text{ in } ^\circ\text{C}; \eta \text{ in mPas}; M \text{ in kDa} \quad (2.10)$$

Aus Gleichung (2.8) wird sichtlich, dass der Stoffstrom zum Erliegen kommt, wenn sich eine homogene Konzentration innerhalb einer Flüssigkeit eingestellt. In mehrphasigen Systemen wie z. B. ATPS kann Diffusion über die Phasengrenze hinweg auch bei Konzentrationsgleichheit stattfinden. Dies führt bei der ATPE zu unterschiedlichen Konzentrationen in der Ober- bzw. Unterphase und damit zu einem Verteilungskoeffizienten (K_P) ungleich eins.

$$K_P = \frac{c^{\text{TOP}}}{c^{\text{BOT}}} \quad (2.11)$$

In Mehrphasigen Systemen eignet sich daher eine Abwandlung des Fick'schen Gesetz unter Einbeziehung des chemischen Potentials (μ) als treibende Kraft für den Stofftransport besser [71,72]:

$$J = -D \nabla \mu \quad (2.12)$$

Das chemische Potential lässt sich für Partikel in einer der beiden wässrigen Phasen mit Gleichung (2.13) beschreiben [68]. Dabei beschreibt μ^0 das chemische Standardpotential, k_B die Boltzmannkonstante, T die Temperatur, f den Aktivitätskoeffizienten, σ die Oberflächenspannung, c , A und q , beschreiben die Konzentration, die Oberfläche und die Ladung des Partikels, F die Faraday-, N_A die Avogardokonstante und ψ das electrostatische Potential.

$$\mu = \mu^0 + k_B T \ln(f c) + A \sigma + \frac{q F \psi}{N_A} \quad (2.13)$$

Das thermodynamische Gleichgewicht ist erreicht, wenn die freie Gibbs'sche Energie (G) minimal ist, was der Fall ist (Gleichung (2.14)) [73]. Demnach kommt der diffusive Stoffstrom in einem ATPS erst zum Erliegen, wenn sich über die Phasengrenzfläche hinweg ein Gleichgewicht des chemischen Potentials einstellt [64].

$$\frac{\partial G}{\partial t} = 0 = \mu^{\text{TOP}} - \mu^{\text{BOT}} \quad (2.14)$$

Aus Gleichung (2.14) und (2.13) folgt für den Gleichgewichtszustand

$$-k_B T \cdot \ln \left(\frac{c^{\text{TOP},\infty}}{c^{\text{BOT},\infty}} \right) = \Delta\mu^0 + k_B T \cdot \ln \left(\frac{f^{\text{TOP}}}{f^{\text{BOT}}} \right) + A \cdot \Delta\sigma + \frac{q \cdot F \cdot \psi}{N_A} \quad (2.15)$$

Dabei entspricht das Konzentrationsverhältnis $\frac{c^{\text{TOP},\infty}}{c^{\text{BOT},\infty}}$ dem Verteilungskoeffizienten (Gleichung (2.11)) im Gleichgewichtszustand.

2.2.3 Wechselwirkungen und Schlüsselparameter der ATPE

Die Verteilung eines Moleküls oder Partikel innerhalb des ATPS ist bestimmt durch verschiedene Wechselwirkungen mit der Ober- bzw. Unterphase sowie unterschiedlicher Effekte. Diese sind durch eine geschickte Wahl der Schlüsselparameter so zu beeinflussen, dass sich das Produkt möglichst in einer der beiden Phasen (meist der Oberphase) anreichert. Der Verteilungskoeffizienten K_P (Gleichung (2.11)) dient als Maß, um Extraktionsversuche zu bewerten [4,63]. Eine hohe Aufkonzentrierung des Produkts in der Oberphase führt zu hohen Werten von K_P . Ist der Wert hingegen kleiner eins, findet keine Aufkonzentrierung in der Oberphase statt und das Produkt verbleibt hauptsächlich in der Unterphase.

Das Verteilungsverhalten eines Proteins in einem Zweiphasen-System resultiert aus einem Zusammenspiel verschiedener Wechselwirkungen und Effekte. Der Verteilungskoeffizient kann als Produkt dieser ausgedrückt werden.

$$K_P = K_{\text{Elek}} K_{\text{Hfob}} K_{\text{Größe}} K_{\text{Affin}} K_{\text{Konf}} K_0 \quad (2.16)$$

K_{Elek} beschreibt dabei den Anteil der elektrostatischen- und K_{Hfob} der hydrophoben Wechselwirkungen auf K_P . Die Multiplikatoren $K_{\text{Größe}}$, K_{Affin} und K_{Konf} integrieren den Einfluss von Größe, Affinität und Konformität des Proteins. In K_0 sind alle weiteren Einflussfaktoren zusammengefasst. [65,74]

Die jeweiligen Wechselwirkungen und Effekte sind im Folgenden am Beispiel einer Enzymextraktion in einem Polymer-Salz-System erklärt.

Elektrostatische Wechselwirkungen

Zwischen gelösten Ionen und geladenen Molekülen und Partikeln können elektrostatische Wechselwirkungen auftreten. Insbesondere in der salzreichen Unterphase herrscht eine hohe Konzentration gelöster Ionen, welche eine abstoßende- oder anziehende Wirkung auf gleich- bzw.

entgegengesetzt geladene Stoffe ausüben. So kann ein Enzym je nach seiner Oberflächenladung entweder in der salzreichen Unterphase in Lösung gehalten, oder in die polymereiche Oberphase gedrängt werden. [4,65]

Hydrophobe Wechselwirkungen

Verschiedene Bestandteile einer Biosuspension unterscheiden sich in ihrer Polarität. Enzyme bestehen in unterschiedlichem Maße zu Teilen aus unpolaren Aminosäuren (siehe Abschnitt 2.1.2). Auch wenn beide Phasen eines ATPS wässrig sind, führen die langen Kohlenwasserstoffketten der Polymere zu einer reduzierten Polarität und damit quasi zu einem hydrophoben Charakter der Oberphase. Die auftretenden hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Enzymen und Polymermolekülen führen zu einer thermodynamisch günstigen Anreicherung der Enzyme in der Oberphase. [4,65]

Größe (Volumenausschlusseffekt)

Die meist hohe Polymerkonzentration in der Oberphase führt zu einem reduzierten freien Volumen im Wassergitter. Dadurch ist die Löslichkeitsgrenze für Makromoleküle wie Enzyme reduziert. Ist diese erreicht, tritt der Volumenausschlusseffekt ein, der eine weitere Anreicherung in der Oberphase verhindert. Dies tritt für große Enzyme bei geringeren Konzentrationen früher ein als für Enzyme mit geringerem Molekulargewicht. [4,65]

Affinitätseffekte

Gezielte Veränderungen (Funktionalisierung) der Polymermoleküle steigern die Affinität des Produkts zur polymerreichen Oberphase. Dabei werden die Polymere mit Liganden modifiziert, welche über hydrophobe oder geladene Gruppen verfügen und so die attraktiven Wechselwirkungen zwischen Enzymen und Polymeren erhöhen. [4,65]

Konformitätseffekte

Die räumliche Faltung eines Enzyms zu komplexen dreidimensionalen Strukturen resultiert in einer thermodynamisch günstigen Anordnung der Polypeptidketten (siehe Abschnitt 2.1.2). Die Konzentration und Art der phasenbildenden Komponenten in der Ober- und Unterphase kann die Ausbildung dieser komplexen Proteinstrukturen unterstützen oder verhindern und so das Verteilungsverhalten von Enzymen im ATPS beeinflussen. [4,65]

Verschiedene System- und Prozessparameter beeinflussen die zuvor beschriebenen Effekte und Wechselwirkungen. Im Folgenden ist der Einfluss einiger Schlüsselparameter für die ATPE eines Enzyms in einem Polymer-Salz-System beschrieben.

Art und Konzentration des Polymers

Als phasenbildende Polymere kommen sowohl natürliche Polymere (z. B. Dextran) als auch synthetische Polymere (z. B. PEG) in Frage. Werden diese durch einen Liganden funktionalisiert, können Affinitätseffekte zwischen den Enzymen und Polymeren ausgenutzt werden, um eine höhere und selektivere Anreicherung in der Oberphase zu erlauben.

Das Molekulargewicht des gewählten Polymers beeinflusst neben der Konodenlänge auch die hydrophoben Wechselwirkungen. Bei Polymeren, die nur an ihren Enden hydrophile Gruppen haben (z.B. Hydroxylgruppen bei PEG), nimmt mit zunehmenden Molekulargewicht auch das Verhältnis von hydrophoben zu hydrophilen Bereichen und damit die Hydrophobizität zu. Dadurch verstärken sich hydrophobe Wechselwirkungen und die Konformität des Enzyms kann beeinflusst werden. [4]

Ein geringeres Molekulargewicht des Polymers führt bei gleicher Konzentration zu geringeren Viskositäten. Dieser Vorteil kann jedoch nichtig werden, wenn für eine gleiche Konodenlänge eine höhere Polymerkonzentration nötig ist, welche wiederum zu einem Anstieg der Viskosität führt [64].

Art und Konzentration des Salzes

Bei der Wahl eines geeigneten Salzes als zweite phasendbildende Komponente müssen neben den ökonomischen und ökologischen Gesichtspunkten weitere Faktoren die das sich bildende ATPS und die Wirkung auf die Biosuspension betreffen, berücksichtigt werden.

Insbesondere die Anion des dissoziierenden Salzes unterscheiden sich in ihren Eigenschaften. Prinzipiell können hierbei anorganische Salze (z. B. Phosphate und Sulfate) als auch organische Salze (z. B. Citrate, Succinate und Tartrate) zum Einsatz kommen. Generell gilt jedoch, dass multivalente Anionen zu bevorzugen sind, da sie bereits bei geringeren Konzentrationen eine Phasenseparation bewirken [63]. Daraus folgend sind nicht alle Salze für den Einsatz bei jedem pH-Wert geeignet und es gilt die Dissoziationsstufen mehrwertiger Salze in Abhängigkeit des pH-Werts zu beachten. Citrate liegen erst ab einem pH-Wert von 6 zum Großteil vollständig dissoziiert vor [75] und auch Phosphate bilden erst ab einem pH-Wert von 6 stabile ATPS [6,76], während Sulfate bereits bei niedrigen pH-Werten einsetzbar sind [62].

Sowohl das phasenbildende Salz, als auch additive Salze beeinflussen den aussalzenden Effekt der Unterphase maßgeblich. In der Hofmeister Reihe „links stehende“ Anionen wie SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} oder CH_3OO^- und Kationen wie NH_4^+ , K^+ oder Na^+ sind kosmotroph und wirken daher aussalzend

[77]. Dies unterstützt die hydrophoben Wechselwirkungen und somit sowohl die Phasenseparation [4] als auch die aussalzende Wirkung auf Enzyme und deren Anreicherung in der Oberphase [76].

Konodenlänge

Die gewählte Konodenlänge des ATPS ist ein entscheidender Systemparameter für die Extraktion. Mit steigender Konodenlänge nimmt die Konzentration der phasenbildenden Komponenten in den jeweiligen Phasen sowie Viskosität der Oberphase, Dichte der Unterphase und die Grenzflächenspannung zwischen beiden Phasen zu (siehe Abschnitt 2.2).

Die erhöhten Polymer- und Salzkonzentrationen in den Phasen verstärken sowohl elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, als auch den Volumenausschlusseffekt. Die erhöhte Viskosität der Oberphase verringert den Diffusionskoeffizienten der Enzyme (siehe Gleichung (2.9)) und damit die Geschwindigkeit des Stoffübergangs. Ein erhöhter Dichteunterschied beeinflusst die Phasenseparation. Eine höhere Grenzflächenspannung führt dazu, dass sich gelöste Stoffe bevorzugt in der Oberphase anreichern, während sich partikuläre Stoffe an der Grenzfläche zwischen den beiden Phasen sammeln [64].

Insgesamt beeinflusst die Konodenlänge dadurch sowohl die Phasentrennung und damit die Auslegung des Extraktionsapparates, als auch die Verteilung des Enzyms zwischen den beiden Phasen. Die Konodenlänge ist innerhalb eines ATPS ein zu wählender Parameter, der über den Abstand des Mischungspunktes zur Binodalen einstellbar ist.

Volumenverhältnis

Das Volumenverhältnis ist ein wählbarer Systemparameter der ATPE. Je nach Mischungspunkt im Zweiphasen-Diagramm ergeben sich unterschiedliche Ober- und Unterphasenvolumen nach der Phasenseparation (siehe Abschnitt 2.2). Eine Steigerung des Volumenverhältnisses führt zu insgesamt mehr freiem Volumen in der Oberphase. Als Folge tritt der Volumenausschlusseffekt erst bei einer größeren absoluten Enzymmenge in der Oberphase ein. Es resultieren höhere Ausbeuten insbesondere bei großen Biomolekülen [4]. Idealerweise ist das gewählte Volumenverhältnis möglichst klein zu wählen um eine maximale Aufkonzentrierung zu erreichen, jedoch groß genug um ein Auftreten des Volumenausschlusseffekts zu vermeiden.

Bei konstanter Konodenlänge führen höhere Volumenverhältnisse in Batch-Extraktionen zu einer schnelleren Phasenseparation aufgrund gesteigerter Koaleszenzeffekte durch die höhere Anzahl dispergierter Oberphasentröpfchen [78]. Zusätzlich kann durch ein insgesamt höheres Oberpha-

senvolumen beim Dispergieren der Oberphase in der Unterphase während kontinuierlichen Extraktionen eine höhere Phasengrenzfläche erzeugt und so ein schnellerer Stofftransport durch Diffusion erzielt werden [56].

pH-Wert

Der gewählte pH-Wert ist ein entscheidender Systemparameter für die ATPE. Die Oberflächenladung von Partikeln und Makromolekülen wie Enzymen wird durch den umgebenden pH-Wert bestimmt. Bei niedrigen pH-Werten ist diese positiv, was die elektrostatische Abstoßung und damit den aussalzenden Effekt der Salz-Anionen reduziert und somit auch die Anreicherung in der hydrophoben Oberphase. Entspricht der pH-Wert exakt dem isoelektrischen Punkt, resultiert eine neutrale Oberflächenladung. Die fehlenden elektrostatischen Effekte verstärken hydrophobe Wechselwirkungen und können die Anreicherung in der hydrophoben Oberphase begünstigen. Jedoch ist hier auch die Löslichkeit der Enzyme am geringsten und es drohen ungewollte Fällungen [63]. Ist der gewählte pH-Wert größer als der isoelektrische Punkt des Zielenzym, resultiert eine negative Nettoladung. In PEG-Salzsyste men führt dies zu einer gesteigerten Affinität zur Oberphase aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit dem positiven Dipolmoment der endständigen Hydroxylgruppen des PEGs. Jedoch sollte der pH-Wert nicht deutlich über dem isoelektrischen Punkt des Zielenzym gewählt werden, da sonst die Affinität anderer Proteine und Kontaminaten zur Oberphase ebenfalls zunehmen [62].

Temperatur

Die Temperatur, bei welcher die Extraktion stattfindet, ist ein Prozessparameter, der sich auf mehrere Bereiche der ATPE auswirkt. Die Temperatur verändert die Viskosität, Dichte und Grenzflächenspannung der beiden wässrigen Phasen. Allgemein nimmt die Viskosität und Dichte mit der Temperatur ab, wobei die Viskositätsänderungen in einer polymerreichen Oberphase und die Dichteänderungen in einer salzreichen Unterphase deutlicher sind. Hingegen ist für die Grenzflächenspannung kein eindeutiger Trend zu beobachten [79]. Zudem wirkt sich die Temperatur auf den Diffusionskoeffizienten aus, welcher sowohl mit sinkender Viskosität, als auch steigender Temperatur zunimmt (siehe Gleichung (2.9)). Trotzdem kann die Temperatur nicht beliebig (hoch) gewählt werden, da die Stabilität der Biomoleküle, insbesondere des Zielenzym, beachtet werden muss. Zu hohe Temperaturen können zu irreversiblen Denaturierungen von Enzymen führen [3]. Temperaturänderungen nach Extraktionen können jedoch auch beim Einsatz von thermosensitiven Polymeren die Rückgewinnung von phasenbildenden Komponenten ermöglichen [63].

2.3 Wässrige Zweiphasen-Flotation (ATPF)

Die wässrige Zweiphasen-Flotation ist eine Flotation in einem wässrigen Zweiphasen-System. Bei der ATPF wird die Biosuspension in die untere Phase überführt oder mit den phasenbildenden Komponenten entsprechend der Zusammensetzung der Unterphase des gewählten Mischungspunktes (siehe Abschnitt 2.2.1) versetzt und in eine Flotationszelle gegeben. Die obere Phase wird separat angesetzt und anschließend auf die Unterphase gefüllt. Über poröse Medien wie z. B. Sinterglasmembranen, entstehen Gasblasen am Boden der Flotationszelle, die zunächst in der Unterphase aufsteigen. Dabei lagern sich an der Blasenoberfläche Stoffe mit hydrophoben Bereichen an. Der Blasenkomplex passiert die wässrige Phasengrenzfläche zwischen Unter- und Oberphase und gelangt in die Oberphase. Diese dient als produktaufnehmende Extraktionsphase, in welcher sich die flotierten Stoffe von der Blasenoberfläche ablösen oder nach Zerplatzen der Blasen in der Oberphase verbleiben. [7,8]

Wie bei der ATPE ist eine hohe Affinität des zu flotierenden Produkts zur Oberphase entscheidend für eine erfolgreiche Abreicherung aus der Unterphase und Aufkonzentrierung in der Oberphase, da auch bei der ATPF ein diffusiver Stoffübergang über die Phasengrenzfläche stattfindet, sofern das thermodynamische Gleichgewicht (siehe Abschnitt 2.2.2) zwischen den Phasen nicht erreicht ist. Durch den zusätzlichen Stofftransport der Flotation ist der Stoffstrom des Produkts in die Oberphase jedoch nicht wie bei der ATPE alleine durch die Oberfläche der Phasengrenze bestimmt (siehe Gleichung (2.7)), sondern maßgeblich vom Gasblaseneintrag [8]. Dies erlaubt bei der ATPF die Menge an eingesetzter Oberphase zu reduzieren und so geringere Volumenverhältnisse von Ober- zu Unterphase zu verwenden, auch wenn dies den diffusiven Stofftransport reduziert. Dadurch verringern sich die Kosten der eingesetzten phasenbildenden Komponenten und es können höhere Aufkonzentrierungen als bei der ATPE erzielt werden [17,25,29,80]. Trotzdem ist es für den Trennerfolg entscheidend die Systemparameter des APTS, z. B. Polymermolekulargewicht, Konodenlänge und pH-Wert mit Hinblick auf einen hohen Abscheidegrad des Produkts zu optimieren [26,81,82]. Wenn eine geeignete Zusammensetzung des ATPS gefunden ist, lassen sich Prozessparameter wie z. B. der Gasvolumenstrom, die Gasart und die Blasengröße optimieren [83]. Diese bestimmen neben der Prozessführung (diskontinuierliche oder kontinuierliche) und dem Design der Flotationszelle die Kinetik der ATPF [84,85].

2.3.1 Gaseintrag in das wässrige Zweiphasen-System

Grundlage jedes Flotationsprozesses bildet die Einleitung von Gasblasen in eine Flüssigkeit. Dies kann je nach Art der Flotationszelle auf verschiedene Weise und basierend auf unterschiedlichen physikalischen Prinzipien realisiert werden. Bei der Druckentspannungsflotation geht ein bei hohem Druck gelöstes Gas bei Dekompression der Flüssigkeit in die Gasphase über. Mechanische Flotationszellen nutzen eine Hohlwelle (Impeller), die durch einen sich ausbildenden Unterdruck Gas in die gerührte Flüssigphase verteilen. Ähnlich funktionieren hydraulische Flotationszellen, bei denen Gasblasen über eine Zweistoffdüse in der Flüssigkeit dispergiert werden. Hierbei handelt es sich oft um große, kontinuierliche Flotationsapparate, die bei Anwendungen in der Erzindustrie, Papierherstellung oder Abwasseraufbereitung Anwendung finden. In vertikalen Flotationskolonnen erzeugen poröse Medien oder einen Gasverteiler (*sparger*) Gasblasen direkt in der Flüssigkeit. [9,86,87]

Für die ATPF ist der Einsatz mechanischer oder hydraulischer Flotationszellen aufgrund eines zu hohen Turbulenzeintrags, der die Ausbildung einer stabilen Phasengrenze zwischen Ober- und Unterphase verhindert, ungeeignet. Auch die Druckentspannungsflotation ist für die ATPF nicht geeignet, da die hohen Konzentrationen der phasenbildenden Komponenten (v.a. von Salzen) die Löslichkeit von Gasen in der Flüssigkeit stark reduziert [88]. Flotationskolonnen finden oft Anwendung in der Schaumflotation zur Aufreinigung von Proteinen oder Mikroorganismen aus Fermentationsbrühen. Hier ist der Vorteil, dass der Gasvolumenstrom direkt regelbar und so die Schaumbildung und Produktabtrennung beeinflussbar ist [41]. In der ATPF erfolgt der Gasblaseneintrag ebenfalls direkt über poröse Medien. Dabei wird auf der Gasseite z. B. einer gesinterten Glasmembran ein Überdruck erzeugt, sodass das Gas durch die Poren gedrückt wird und sich auf den Porenoberflächen auf der Flüssigkeitsseite Gasblasen ausbilden [8,83].

Bei der Blasenbildung auf einer mit Flüssigkeit benetzten Pore, wächst das Volumen der Blase so lange an, bis die Auftriebskraft der Gasblase die Haltekräfte an der Porenoberfläche übersteigen. Für kleine Gasdurchsätze, das heißt wenn eine Beschleunigung der umgebenden Flüssigkeit durch das Blasenwachstum vernachlässigbar ist und bei kleinen Porendurchmessern (d_p) ergibt sich somit aus der Kapillaritätstheorie ein Kräftegleichgewicht (Gleichung (2.17)) zwischen der Auftriebskraft (F_A), der Gewichtskraft (F_G) und Grenzflächenkraft ($F_{\sigma_{GF}}$) zum Zeitpunkt der Ab-

lösung [89,90]. Der Term $F_A - F_G$ beschreibt die effektive Auftriebskraft, welche aus dem Dichteunterschied zwischen Gas und Flüssigkeit ($\Delta\rho_{GF}$), der Erdbeschleunigung (g) und dem Volumen der Blase (V_B) resultiert. Die Grenzflächenkraft lässt sich aus der Grenzflächenspannung zwischen dem Gas und der Flüssigkeit (σ_{GF}) und mit der Annahme runder Poren mit dem Durchmesser d_p berechnen [90].

$$F_A - F_G = F_{\sigma_{GF}} \quad (2.17)$$

$$\Delta\rho_{GF} g V_B = d_p \pi \sigma_{GF}$$

In der für kleine Blasen gerechtfertigten Annahme von Sphärizität [91] ergibt sich aus dem Kräftegleichgewicht der Ablösedurchmesser ($d_{B,0}$) nach Gleichung (2.18).

$$d_{B,0} = \sqrt[3]{\frac{6 d_p \sigma_{GF}}{g \Delta\rho_{GF}}} \quad (2.18)$$

Mit zunehmendem Gasvolumenstrom (\dot{V}_G) ist die Verdrängung der flüssigen Phase durch das schnelle Blasenwachstum nicht mehr vernachlässigbar und die Widerstandskraft kann nicht mehr vernachlässigt werden. Diese wirkt zusammen mit der Grenzflächenkraft der Auftriebskraft entgegen, was zu einem Anstieg des Ablösedurchmessers führt, der nach der Mersmann-Gleichung berechnet werden kann (Gleichung (2.19)) [90,92]. Der Faktor k_M resultiert dabei aus dem Widerstandsbeiwert der Blase und einem Formfaktor, der das Abweichen der Blasengeometrie von der Kugelform berücksichtigt. ρ_F beschreibt die Dichte der Flüssigkeit.

$$d_{B,0} = \sqrt[3]{\frac{3 d_p \sigma_{GF}}{g \rho_F} + \sqrt{\left(\frac{3 d_p \sigma_{GF}}{g \cdot \rho_F}\right)^2 + \frac{k_M \cdot \dot{V}_G^2 \cdot d_p}{g}}} \quad (2.19)$$

Die Mesmann-Gleichung zeigt die Abhängigkeit des Ablösedurchmessers vom Gasvolumenstrom, Porendurchmesser, der Grenzflächenspannung und der Dichte der Flüssigkeit. Sie dient jedoch nur einer ersten Abschätzung, da sie die Dynamik des Blasenabrisses nicht berücksichtigt, welche insbesondere bei höheren Gasdurchsätzen durch die Pore an Bedeutung gewinnt. Mit zunehmenden Gasdurchsatz steigt der Ablösedurchmesser an und der Einfluss der Grenzflächenkraft sinkt während Trägheitskräfte an Bedeutung gewinnen [90]. Strömt das Gas schnell genug durch die Pore, bildet sich eine neue Blase, bevor der Blasenabriss der vorherigen abgeschlossen ist und die Blasen wachsen zusammen. Dieses Verhalten wird als Strahlgasen bezeichnet [89,90].

Der Übergangsbereich von der Einzelblasenbildung zum Strahlgasen kann ab einer Weberzahl (Gleichung (2.20)) größer zwei angenommen werden [90]. Die Weberzahl beschreibt das Verhältnis aus Trägheitskraft zur Grenzflächenkraft und umfasst ebenfalls die Strömungsgeschwindigkeit des Gases durch die Pore (w_P), welche sich aus der Porengeometrie, dem Gasvolumenstrom und der Anzahl der Poren (z_P) ergibt. ρ_G beschreibt die Dichte des Gases.

$$We = \frac{w_P^2 d_P \rho_G}{\sigma_{GF}} \quad \text{mit} \quad w_P = \frac{4 \cdot \dot{V}_G}{d_P^2 \pi z_P} \quad (2.20)$$

Sind die Poren eines porösen Begasungsmediums verschieden groß, strömt das Gas zunächst nur durch die großen Poren, da hier der Druckverlust am geringsten ist. Erst im Grenzfall des Strahlgasens (ab $We > 2$) ist der Druckverlust insgesamt hoch genug, dass alle Poren durchströmt werden [90].

Findet die Blasenbildung nicht in einer ruhenden Flüssigkeit, sondern in einer parallel zur Porenoberfläche fließenden Strömung statt, wirkt neben der Auftriebskraft ebenfalls die Strömungskraft durch die Flüssigkeit als zusätzliche, ablösende Kraft und der Ablösedurchmesser reduziert sich. Die Komplexität in der Beschreibung des Ablösevorgangs nimmt in strömenden Medien auch durch die räumliche Verschiebung der Blase zur Porenoberfläche zu und erfordert eine dynamische Beschreibung der Auftriebskraft. [90]

Blasenkoaleszenz führt dazu, dass der Durchmesser der abgelösten Gasblasen nicht zwangsweise dem Ablösedurchmesser entspricht. Koaleszenz findet statt, wenn Blasen in Kontakt geraten und dabei der Flüssigkeitsfilm an der Kontaktlinie aufreißt und die Blasen zusammenwachsen. Dabei muss die Kontaktzeit hinreichend groß sein, damit sich durch Verdrängung der Flüssigkeitsfilm an der Kontaktlinie verschmälert, und die Bewegungsenergie muss die Grenzflächenenergie übersteigen, damit der Film einreißt [93]. Die Koaleszenzneigung sinkt mit der Blasengröße [94] und kann ebenfalls durch gelöste Salze herabgesetzt werden [95–97].

2.3.2 Aufstieg von Gasblasen im wässrigen Zweiphasen-System

Nach der Blasenbildung und Ablösung von der Porenoberfläche steigt die Gasblase aufgrund des Dichteunterschieds zur umgebenden Unterphase auf. Für den stationären Aufstieg einer einzelnen Blase in einer Flüssigkeit folgt ein Kräftegleichgewicht (Gleichung (2.21)) aus der Auftriebskraft

(F_A) und der Gewichtskraft (F_G) der Gasblase, sowie der Widerstandskraft (F_W) durch die verdrängte Flüssigkeit. Dabei beschreibt $\Delta\rho_{GF}$ den Dichteunterschied zwischen Gas und Flüssigkeit, g die Erdbeschleunigung, V_B das Volumen der Blase, A_B die Querschnittsfläche der Blase zur Strömungsrichtung, ρ_F die Dichte der Flüssigkeit, c_W den Widerstandsbeiwert und v_B die Aufstiegs geschwindigkeit der Blase. [98]

$$\begin{aligned} F_A - F_G &= F_W \\ \Delta\rho_{GF} g V_B &= c_W \frac{\rho_F}{2} v_B A_B \end{aligned} \quad (2.21)$$

Die Aufstiegs geschwindigkeit für eine kugelförmige Blase dem Durchmesser d_B ergibt sich demnach nach Gleichung (2.22).

$$v_B = \sqrt{\frac{4 d_B g \Delta\rho_{GF}}{3 c_W \rho_F}} \quad (2.22)$$

Der Widerstandsbeiwert ist eine Funktion der Reynoldszahl (Re). Diese lässt sich für eine kugelförmige Blase (Index B) mit nach Gleichung (2.23) unter Einbeziehung der dynamischen Viskosität der Flüssigkeit η_F berechnen.

$$Re_B = \frac{\rho_F d_B v_B}{\eta_F} \quad (2.23)$$

Für eine laminare Umströmung der Blase durch die Flüssigkeit gilt $c_W = 24/Re$ und es folgt die Aufstiegs geschwindigkeit nach Stokes mit Gleichung (2.24). [98]

$$v_{B,St} = \frac{d_B^2 g \Delta\rho_{GF}}{18 \eta_F} \quad (2.24)$$

Mit zunehmender Aufstiegs geschwindigkeit weicht die laminare Umströmung der Blase einer turbulenten Strömung, die durch das Ausbilden von Wirbeln im Nachlauf der Blase gekennzeichnet ist. Für die Einordnung der Strömungsbedingungen lassen sich charakteristische Reynoldszahlen heranziehen. Für starre Kugeln ist das Ausbilden von Toruswirbeln auf der strömungsabgewandten Seite bei $Re = 25$ und ein instationärer Abriss und damit ein oszillierender Nachlauf, der in der zweidimensionalen Betrachtung der Kármánschen Wirbelstraße entspricht, bei $Re > 130$ zu erwarten [99]. Zwar sind kleine Gasblasen ebenfalls kugelförmig, jedoch

besitzen sie keine starre Grenzfläche sondern zeigen eine innere Zirkulation und neigen mit steigendem Volumen zur Deformation zu rotationssymmetrischen Ellipsoiden bis hin zu regellos geformten Geometrien [100]. Die Abweichung von der Kugelform kann dabei in viskosen Flüssigkeiten schon ab $Re > 1$ auftreten [101]. Dies führt dazu, dass die Ausbildung von Wirbeln und Wirbelschleppen hinter aufsteigenden Gasblasen bereits bei geringeren Reynoldszahlen ($Re > 2$ bzw. $Re > 7$) im Vergleich zu starren Kugeln stattfindet, während der vollständige Strömungsabriss erst später eintritt [100,102].

Die Umströmung von aufsteigenden Gasblasen, lässt sich demnach durch die Reynoldszahl charakterisieren. Diese lässt sich jedoch nicht ohne die Kenntnis der Aufstiegsgeschwindigkeit bestimmen, welche wiederum selbst abhängig von der Reynoldszahl ist (Gleichung (2.23)). Abhilfe leistet die Einbeziehung der Archimedeszahl (Ar), die die Stoffdaten des Systems einbezieht, ohne auf geschwindigkeitsabhängige Größen zurückzugreifen (siehe Gleichung (2.25)). Sie lässt sich mit der Reynoldszahl korrelieren und ermöglicht so diese ohne Kenntnis der Aufstiegsgeschwindigkeit zu berechnen. [98]

$$Ar_B = \frac{d_B^3 g \rho_F \Delta\rho_{GF}}{\eta_F^2} \quad (2.25)$$

2.3.3 Stofftransport durch Flotation

Der Stofftransport von der Unterphase in die Oberphase während der ATPF resultiert neben Diffusion (siehe Abschnitt 2.2.2) hauptsächlich durch Flotation [7,8]. Die Flotation besteht aus vier grundlegende Schritten: Die Erzeugung von Gasblasen, der Kontakt von Blase und zu flotierendem Molekül oder Partikel (Kollision), die Anlagerung derer an die Blasenoberfläche (Adsorption) und anschließend der gemeinsame Aufstieg, bei welchem ein unerwünschtes Ablösen (Desorption) des flotierten Stoffes auftreten kann [86]. Die Kollisionswahrscheinlichkeit ist proportional zu dem quadratischen Verhältnis von Partikel- bzw. Molekülgröße zur Blasengröße [103]. Der Eintrag kleiner Gasblasen in das ATPS kann somit die Kollisionswahrscheinlichkeit erhöhen. Ob der zu flotierenden Stoff sich dabei an die Blasenoberfläche anlagert hängt von den Wechselwirkungen mit der Blase ab. Bei der Flotation von Proteinen entscheidet daher das konformationsabhängige Verhältnis zwischen hydrophilen zu hydrophoben Domänen (siehe Abschnitt 2.1.2) darüber, ob es zu hydrophoben Wechselwirkungen mit der Gasphase kommt [41].

Diese treten verstärkt bei einem pH-Wert in der Nähe des isoelektrischen Punktes des Proteins auf. Aufgrund der unterschiedlichen isoelektrischen Punkte der gelösten Stoffe lässt sich daher durch den gewählten pH-Wert eine selektive Flotation von Proteinen aus Fermentationsbrühen erzielen [41]. Nach der Adsorption folgt der Aufstieg des Blasen-Proteinkomplexes. Während bei der Flotation großer Partikel die Blasenströmung zu einem Ablösen führen kann, ist eine Desorption angelagerter Proteine aufgrund der geringen Größe im Nanometerbereich unwahrscheinlich. Die Desorptionswahrscheinlichkeit steigt erst ab Partikelgrößen größer 100 μm , da kleinere Partikel und Moleküle eine geringe Massenträgheit und geringen Strömungswiderstand aufzeigen [103,104].

Während dem Blasenanstieg in der Unterphase sammeln sich weitere Proteine an der Blasenoberfläche an und werden nach Überwindung der Grenzflächenspannung zwischen Unter- und Oberphase des ATPS in die Oberphase transportiert. Dort lösen sie sich aufgrund der Affinität zur Oberphase ab, oder verbleiben nach dem Platzen der Blase an der Oberfläche in der Oberphase. Auch wenn der flotative Stofftransport den Großteil des Massentransfers bedingt, spielt Diffusion bei der ATPF eine entscheidende Rolle. Die zunehmende Konzentration in der Ober- und abnehmende Konzentration in der Unterphase des Zielmoleküls verändert im Laufe der ATPF das Konzentrationsverhältnis und kann zu einer Rückdiffusion in die Unterphase führen. [8]

Kinetik der ATPF

Die Kinetik des Stoffübergangs während der ATPF lässt sich wie viele Flotationsprozesse analog zu einer Reaktion 1. Ordnung beschreiben (Gleichung (2.26)) [7,25]. Dabei ist die zeitliche Änderung der Konzentration des Zielmoleküls in der Unterphase (c^{BOT}) abhängig von der Flotationsratenkonstanten (k).

$$\frac{dc^{\text{BOT}}}{dt} = -k c^{\text{BOT}} \quad (2.26)$$

Das thermodynamische Gleichgewicht (siehe Abschnitt 2.2.2) während der ATPF ist meist erreicht, bevor das Zielmolekül vollständig aus der Unterphase abgetrennt ist. Für solche unvollständigen Flotationsprozesse muss Gleichung (2.26) durch eine Grenzwertbetrachtung ergänzt werden [105]. Die Einführung der Konzentration des Zielmoleküls in der Unterphase im thermodynamischen Gleichgewicht (c_{∞}^{BOT}) führt zu Gleichung (2.27).

$$\frac{dc^{\text{BOT}}}{dt} = -k (c^{\text{BOT}} - c_{\infty}^{\text{BOT}}) \quad (2.27)$$

Nach Integration über die Flotationszeit $t = 0$ bis t und Lösen der Differentialgleichung folgt

$$c^{\text{BOT}}(t) = c_{\infty}^{\text{BOT}} + (c_0^{\text{BOT}} - c_{\infty}^{\text{BOT}}) e^{-k t} \quad (2.28)$$

Ein Maß für die Abreicherung des Zielmoleküls aus der Unterphase ist der Abscheidegrad E . Er lässt sich durch die anfängliche Konzentration (c_0^{BOT}) und der Konzentration nach einer bestimmten Flotationszeit berechnen [7,17,25].

$$E(t) = \left(\frac{c_0^{\text{BOT}} - c^{\text{BOT}}(t)}{c_0^{\text{BOT}}} \right) 100\% \quad (2.29)$$

Einsetzen von Gleichung (2.28) in Gleichung (2.29) führt zu

$$\begin{aligned} E(t) &= \left(\frac{c_0^{\text{BOT}} - c_{\infty}^{\text{BOT}}}{c_0^{\text{BOT}}} - \frac{c_0^{\text{BOT}} - c_{\infty}^{\text{BOT}}}{c_0^{\text{BOT}}} e^{-k t} \right) 100\% \\ &= \left(\frac{c_0^{\text{BOT}} - c_{\infty}^{\text{BOT}}}{c_0^{\text{BOT}}} \right) (1 - e^{-k t}) 100\% \end{aligned} \quad (2.30)$$

Durch Einführung des Abscheidegrads im Gleichgewichtszustand E_{∞} lässt sich Gleichung (2.30) vereinfachen und es resultiert ein Ausdruck für den Gleichgewichtszustand der ATPF.

$$E(t) = E_{\infty} (1 - e^{-k \cdot t}) 100\% \quad (2.31)$$

Der Abscheidegrad ist also direkt abhängig von dem thermodynamischen Gleichgewicht sowie der Flotationsratenkonstanten. Oft lässt bei Flotationsprozessen eine lineare Korrelation zwischen der Flotationsratenkonstanten und dem spezifischen Gasgrenzflächeneintrag (S_b) bestimmen [106–108]. Dieser wiederum ist abhängig vom Gasvolumenstrom (\dot{V}_G) und dem Sauterdurchmesser ($d_{3,2}$) der Gasblasen und beschreibt die Grenzfläche zwischen Gas und Flüssigkeit, die pro Zeit die Querschnittsfläche der Flotationszelle (A_{FZ}) passiert. Der spezifische Grenzflächeneintrag gilt genau wie die Flotationsrate als Schlüsselparameter für Flotationsprozesse [106].

$$S_b = \frac{6 \dot{V}_G}{A_{FZ} d_{3,2}} \quad (2.32)$$

Kapitel 3

Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Eine Auflistung aller Chemikalien und Geräte ist dem Anhang A1 zu entnehmen. In den folgenden Abschnitten sind nur die wichtigsten Materialien und Methoden näher beschrieben.

3.1.1 Wässriges Zweiphasen-System

Tri-Natriumcitrat Dihydrat (Citrat) und Polyethylenglycol (PEG) bilden als phasenbildende Komponenten die Grundlage der in dieser Arbeit verwendeten wässrigen Zweiphasen-Systeme. Zur Charakterisierung stofflicher Schlüsselparameter (Kapitel 4) finden PEG unterschiedlicher mittlerer Molekulargewichte (1000, 4000 und 8000 g/mol) sowie additive Salze wie NaCl, Na₂SO₄ und Na₂HPO₄ Verwendung. Die nachfolgenden Flotationsversuche erfolgen mit einer optimierten Zusammensetzung des ATPS bestehend aus Citrat und PEG 1000 (siehe Abschnitt 4.1).

Für das getrennte Ansetzen der Unter- und Oberphase müssen die beiden phasenbildenden Komponenten PEG und Citrat in einem bestimmten Masseverhältnis gemischt werden. Die Herstellung konzentrierter Stocklösungen erleichtert die Dosierung und gewährleistet, dass sowohl das Polymer als auch das Salz bereits in Wasser gelöst sind.

Die PEG-Stocklösungen werden mit einem Masseanteil von 50 % angesetzt. Da PEG 1000 bei Raumtemperatur wachsartig vorliegt, ermöglicht ein Erhitzen auf 40 °C die flüssige Einwaage des Polymers. Entsprechend der gewünschten Menge an Stocklösung wird die gleiche Menge vollständig entsalztes Wasser (VE-Wasser) mit dem flüssigen PEG 1000 in einem Becherglas unter Rühren und Erwärmen (40 °C) für mindestens 1 h gemischt, bis sich eine homogene Lösung

einstellt. PEG mit höherem Molekulargewicht muss als Feststoff dem VE-Wasser zugegeben werden und löst sich unter Rühren und Erwärmen im Becherglas auf.

Beim Herstellen der 30 % (w/w) Citrat-Stocklösung ist das im körnigen Feststoff gebundene Wasser zu berücksichtigen. Dieses ist vom Hersteller mit einem mittleren Massenanteil von 12 % angegeben. Daraus resultierend erfolgt die Einwaage von 34,09 % des Natrium-Citrat-Dihydrats und 65,91 % VE-Wasser bezogen auf die gewünschte Gesamtmenge der Stocklösung.

3.1.2 Phospholipase A₂

Das in dieser Arbeit verwendete Modellenzym ist eine mikrobiell erzeugte Phospholipase A₂. Ausgang für die Enzymstocklösung ist ein gesprühgetrocknetes Pulver der Phospholipase (PLP 21159, SternEnzym). Die Menge der Phospholipase im Pulver ist von Seitens des Herstellers mit 20000 u/g (*unit*, u) angegeben. eine Einheit spaltet 1 μ mol des Substrats Lecithin in einer 2%-igen Lecithinlösung bei pH = 8 und 37 °C in einer Minute. Der Aktivitätsbereich für die Phospholipase ist für den pH-Wert zwischen 5 – 10 und einer Temperatur zwischen 30 – 50 °C angegeben, wobei ein Optimum für pH = 8 und 40 °C genannt ist (Siehe Datenblatt in Anhang A1) . Die Bestimmung des isoelektrischen Punkts über gängige Löslichkeitsversuche in hochkonzentrierten Salzlösungen oder organischen Lösemitteln [63] war für die verwendete Phospholipase A₂ nicht möglich, da sich kein Löslichkeitsminimum ermitteln lässt. In der Literatur ist für eine Phospholipase A₂ exprimiert durch den Mikroorganismus *Streptomyces violaceoruber* ein isoelektrischer Punkt bei pH = 8.6 und ein Molekulargewicht von 13.5 kDa dokumentiert [47].

Das Ansetzen der Enzymstocklösungen erfolgt durch Einwiegen von 20 % (w/w) des gesprühgetrockneten Pulvers zu VE-Wasser. Die Pulveragglomerate lösen sich während ca. 20-minütigem Rührern mit Hilfe eines Magnetrührers bei 200 rpm (*revolutions per minute*) in einem Becherglas auf. Nicht gelöste Trübstoffe sowie vereinzelte ungelöste Agglomerate werden anschließend in einem Zentrifugationsschritt abgetrennt. Dazu wird die angesetzte Stocklösung in 15 mL oder 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und mit 7000 ref (*relative centrifugal force*) für 30 min bei 20 °C beschleunigt. Der geklärte Überstand wird in eine weiteres Zentrifugenröhrchen überführt und dient als Enzymstocklösung, welche entsprechend der gewünschten Enzymkonzentration der Unterphase beigelegt wird.

3.1.3 Modellsuspensionen

Die einfachste Modellsuspension besteht ausschließlich aus gelöster Phospholipase A2. Dabei wird die entsprechende Menge an Stocklösung beim Ansetzen des ATPS (siehe Abschnitt 3.1.1) zugegeben, um eine, sofern nicht abweichend angegeben, Phospholipasekonzentration von 1.5 % (w/w) in der Unterphase einzustellen.

Verschiedene angesetzte Fermentationsmedien dienen der Herstellung einer komplexen Biosuspension als Modellsuspension einer Fermentationsbrühe. Die jeweiligen Fermentationsmedien werden dafür zusammen mit der Enzymstocklösung der Unterphase zugesetzt. Der Einfluss der verschiedenen Medienbestandteile auf die ATPF ist in Abschnitt 4.2.2) beschrieben. Bei dem Komplexmedium handelt es sich um ein CASO-Bouillion (TSB-Medium), welches Pepton aus Casein (17 g/L), Pepton aus Soja (3 g/L), NaCl (5 g/L), K_2HPO_4 (2,5 g/L) und Glucose (2,5 g/L) enthält. Bei dem entsprechenden Versuch ist ein Verbrauch des Mediums zu 95 % am Ende einer Fermentation unterstellt, was einer Konzentration der CASO-Bouillion von 0,13 % (w/w) entspricht. Zur Imitation eines Minimalmediums zu Beginn einer Fermentation ist der Unterphase 0,43 % (w/w) NaCl und je 0,21 % (w/w) H_2HPO_4 und Glucose zugegeben. Für das Restmedium sind der Unterphase ein Zehntel der Minimalmediumskonzentrationen beigefügt. Als Modellorganismus dient der lebensmittelverträgliche Organismus *Lactobacillus Acidophilus* in einer Konzentration von 0.5 % (w/w) in der Unterphase.

3.2 Analysemethoden

Die wesentlichen Analysemethoden zur Bestimmung der Enzymkonzentration und -aktivität sowie die optische Blasengrößenanalyse sind in diesem Kapitel näher beschrieben.

3.2.1 Konzentrationsbestimmung der Phospholipase

Die Phospholipasekonzentration in der Unter- und Oberphase während Extraktions- und Flotationsversuchen lässt sich durch Auswertung von Absorptionsprofilen in einem Bereich zwischen 200 – 800 nm Wellenlänge des auf die Probe gestrahlten Lichts mit Hilfe eines UV/Vis Spektrometers durchführen. Um unerwünschte Streueffekte durch die Binodalkonzentrationen der phasenbildenden Komponenten [63] zu verhindern, müssen die Proben mindestens zweifach

verdünnt werden. Eine Referenzmessung zu Wasser ermöglicht das Ermitteln einer Basislinie im Absorptionsprofil. Aromatische Aminosäuren bilden zum Teil Bausteine von Enzymen (siehe Abschnitt 2.1.2) und erlauben durch ihre Absorption von Lichtstrahlen mit 280 nm Wellenlänge und dem daraus resultierenden Peak im Absorptionsprofil ein Rückschluss auf die Enzymkonzentration. Über die Kalibrierung der Peak-Höhe im Spektrum auf bekannte Enzymkonzentrationen der jeweiligen Phasen ist ein empirisches Modell ableitbar (Kalibrierungen sind im Anhang A5 gezeigt). Für Proben der Unterphase (BOT) und der Oberphase (TOP) lässt sich die Massekonzentration in % der Phospholipase entsprechend Gleichung (3.1) und (3.2) bestimmen. Dazu muss die gemessene Absorption bei 280 nm zunächst mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden, um die realen Absorptionswerte $A_{280\text{nm}}^{\text{BOT}}$ bzw. $A_{280\text{nm}}^{\text{TOP}}$ zu errechnen. Die negativen Y-Achsenabschnitte der linearen Kalibrierungsgleichungen resultieren aus der Verschiebung der Basislinien durch die Absorptionen der jeweiligen phasenbildenden Komponenten. Die Kalibrierungsgleichungen sind im linearen Absorptionsbereich gültig, der für die Phospholipase in der Unter- und Oberphase für Absorptionswerte kleiner 0,6 bei 280 nm Wellenlänge liegt. Bei höheren Absorptionswerten bei 280 nm oder zu hohen Streueffekten, welche zu Absorptionswerten größer 0,01 bei 350 nm führen [63], muss die Probe weiter verdünnt werden.

$$x_{\text{PLP}}^{\text{BOT}} = -0,023 + 4,671 \cdot A_{280\text{nm}}^{\text{BOT}} \quad (3.1)$$

$$x_{\text{PLP}}^{\text{TOP}} = -0,315 + 3,937 \cdot A_{280\text{nm}}^{\text{TOP}} \quad (3.2)$$

3.2.2 Kolorimetrisches Enzymassay

Die Bestimmung der Phospholipaseaktivität beruht auf einem kolorimetrischen Assay nach Araújo und Edvanyi [50] und Yao et al. [49], welches an die Gegebenheiten des ATPS angepasst wurde. Die Phospholipase A2 spaltet bei Anwesenheit des Co-Faktors Ca^{2+} einen Fettsäurerest von Phospholipiden ab. Dabei entstehen Hydroniumionen, welche zu einer Ansäuerung des umgebenden Mediums führen (siehe Abschnitt 2.1.3). Diese ist zu gering, um direkt über eine pH-Elektrode erfasst zu werden, weshalb die Quantifizierung der pro Zeit freigesetzten Menge an H_3O^+ -Ionen durch die spektrometrische Verfolgung der Farbänderung des pH-sensitiven Indikators Phenolrot erfolgt.

Die Aufzeichnung der Enzymreaktion erfolgt direkt in der 1 mL Küvette des Spektralphotometers. In diese werden 475 μL einer auf 37 °C vortemperierte Substratlösung vorgelegt. Darin enthalten sind neben 0,25% (w/w) Lecithin ebenfalls 0,54 % (w/w) Natriumcitrat und 20 mM CaCl_2 , sowie 21 mM NaCl enthält. Das Dispergieren des Lecithins ist durch sonotrieren für 20 min bei 70 % Amplitude und kontinuierlichem Rühren im gekühlten Wasserbad möglich. Die Substratlösung wird anschließend mit 15 μL der fertigen Phenolrotlösung versetzt und durchmischt. Die aus der Unter- oder Oberphase entnommene Probe wird um den Faktor 2 bzw. 10 mit VE-Wasser verdünnt und ebenfalls auf 37 °C erwärmt, bevor 500 μL der Küvette zugesetzt werden. Diese befindet sich in einer Temperiereinheit (37 °C) im Spektralphotometer, wodurch direkt nach Zusetzen und Durchmischen der Probe die Absorptionsmessung gestartet werden kann. Dabei wird sekundlich für insgesamt 100 Sekunden die Absorption des Indikators bei der Wellenlänge 558 nm gemessen und so eine Zeit-Umsatzkurve erstellt. Eine vorherige Kalibrierung mit HCl erlaubt die Abnahme der Absorption durch den Indikator einer gebildeten molaren Menge H_3O^+ zuzuordnen. Diese entspricht bedingt durch die Enzymreaktion 1:1 der molaren Menge an gespaltenem Lecithin. Durch Ableiten der Zeit-Umsatzkurve lässt sich der lineare Bereich (*steady state*) der Enzymreaktion (siehe Abschnitt 2.1.3) bestimmen und für diesen Zeitabschnitt die maximale Aktivität nach Gleichung (2.3) berechnen. Beispielkurven sowie die Kalibrierung des Indikators sind in Anhang A4 gezeigt.

3.2.3 Optische Blasengrößenanalyse

Die Bestimmung der Blasengrößen der durch die unterschiedlichen Begasungsmedien erzeugten Gasblasen (siehe Kapitel 5.1) erfolgt durch Begasung in einer schmalen rechteckigen Glasküvette (32x11x260 mm). Mit der Digitalkamera Canon EOS 70D und einem Makroobjektiv von Sigma (150 mm Brennweite) lassen sich die Blasen fotografieren. Durch zentriertes Einsetzen eines Analysesiebs mit 500 μm Lochdurchmesser in die Fotoküvette lässt sich die Fokusebene der Kamera auf die Mitte der Küvette einstellen und ein Maßstabsbild für die Umrechnung von Pixelängen in Mikrometer erstellen. Nachdem Entfernen des Siebs, erfolgt der Gaseintrag am Boden der Küvette und Fotografieren der aufsteigenden Gasblasen. Eine Serienaufnahme von mind. 100 Bildern mit einer Aufnahmefrequenz von 5 Hz generiert einen Datensatz, der die Größenauswertung von mindestens 5000 Blasen ermöglicht. Die Bildauswertung geschieht mit dem Bildbearbeitungsprogramm Fiji (ImageJ). Dazu werden die Bilder automatisiert in das

Bildbearbeitungsprogramm eingelesen und zunächst ein Graustufenbild (8-Bit, Schwellenwertmethode nach „Otsu“) erzeugt. Nach einer Binarisierung erscheinen die Blasenurrisse weiß auf schwarzem Hintergrund. Die Blaseninneren werden gefüllt (Befehl „Fill Holes“), um nur eine Erfassung des Blasenurrisse beim nachfolgenden Befehl „Ellips Split“ zu erlauben. Dieser erlaubt überlappende Blasen voneinander zu unterscheiden und gibt neben der Fläche der zweidimensionalen Blasen ebenfalls die längere Achsenlänge (a_B) und kürzere Achsenlänge (b_B) der erfassten Ellipsen als .csv Datei aus [109,110]. Daraus lässt sich der äquivalente Blasendurchmesser d_B mit Gleichung (3.3) und daraus wiederum der charakteristische Sauterdurchmesser $d_{3,2}$ des Blasenkollektivs, bestehend aus einer endlichen Blasenanzahl N berechnen (siehe Gleichung (3.4)). Durch Vermessen von Glasblasen definierter Größe mit einem Durchmesser zwischen 150 μm und 1200 μm im selben Aufbau, lässt sich der Fehler der Blasengrößenanalyse auf unter 15 % abschätzen. Eine beispielhafte Auswertung ist im Anhang A3 gezeigt.

$$d_B = \sqrt[3]{a_B^2 b_B} \quad (3.3)$$

$$d_{3,2} = \frac{\sum_{i=1}^N d_{B,i}^3}{\sum_{i=1}^N d_{B,i}^2} \quad (3.4)$$

3.3 Extraktionsversuche

Grundlage der Extraktionsversuche bilden verschiedene wässrigen Zweiphasen-Systeme. Um eine definierte Zusammensetzung der Ober- und Unterphasen zu ermöglichen, müssen zunächst die Binodalen und Konoden der ATPS ermittelt werden. Das Vorgehen hierbei, sowie die Versuchsdurchführung der Extraktionsversuche ist in diesem Kapitel beschrieben.

3.3.1 Ermittlung von Binodalen

Die beiden phasenbildenden Komponenten PEG und Citrat sind in hohen Konzentrationen in Wasser löslich. Übersteigen die Konzentrationen jedoch die Mischungslücke, bildet sich ein Zweiphasen-System, bestehend aus einer polymerreichen, leichteren Oberphase und einer schweren Unterphase, in der sich das Citrat anreichert. Bei der Titration einer hochkonzentrierten Stocklösung einer der beiden Komponenten zu einer Lösung der jeweils anderen Komponente induziert das Überschreiten der Mischungslücke eine Trübung der Lösung, welche das Ausbilden zweier

Phasen visualisiert. Ein stufenweises Vorgehen bei der Trübungstitration ermöglicht die Binodale (siehe Abschnitt 2.2.1), welche das Einphasen-Gebiet vom Zweiphasen-Gebiet trennt, zu bestimmen [4,63].

Für die Trübungstitration wird zunächst 10 g der PEG-Stocklösung (50 % (w/w)) in einem Becherglas mit 250 mL Volumen vorgelegt und das Gesamtgewicht notiert. Anschließend wird die Citrat-Stocklösung (30 % (w/w)) tropfenweise mit einer Pasteurpipette zugegeben bis sich unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer bei 300 rpm eine dauerhafte Trübung der Mischung einstellt. Durch Wiegen wird die zugegebene Citratmenge notiert und anschließend VE-Wasser zugegeben bis sich die Mischung wieder klärt. Nach erneutem Wiegen zur Bestimmung der Menge an zugesetztem VE-Wasser wird erneut mit Citrat-Stocklösung bis zur Trübung titriert. Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt und so mehrere Massenzusammensetzungen bei auftretender Trübung notiert. Sobald die PEG-Konzentration in der Mischung weniger als 15 % (w/w) beträgt wird der Versuch beendet und die umgekehrte Titration durchgeführt. Dabei wird zunächst 5 g der Citrat-Stocklösung vorgelegt und dann PEG-Stocklösung bis zur Trübung und VE-Wasser bis zur nachfolgenden Klärung titriert und die jeweiligen Massenzugaben erfasst. So lässt sich der „untere Teil“ der Binodalen bis zu einer PEG-Konzentration von 15 % (w/w) in der Mischung bestimmen. Die Trübungstitration wird mehrfach wiederholt, um möglichst viele Binodalenpunkte zu bestimmen. Diese können durch den *Mistry-Fit* [111] angenähert und so eine Binodalengleichung ermittelt werden, welche die Massenkonzentrationen des PEGs (x_{PEG}) und des Citrats (x_{Citrat}) mit den Fit-Parametern A, B und C entlang der Binodalen beschreibt (Gleichung (3.5)). Die so ermittelten Fit-Parameter der unterschiedlichen Binodalen für PEG 1000, 4000 und 8000 mit Natriumcitrat sind im Anhang A2 aufgeführt.

$$x_{\text{PEG}} = \exp\{A + B x_{\text{Citrat}}^3 + C \sqrt{x_{\text{Citrat}}}\} \quad (3.5)$$

3.3.2 Bestimmung von Konoden

Durch Ansetzen eines Mischungspunktes oberhalb der zuvor bestimmten Binodalen, trennt sich die Mischung mit zunächst bekannten Konzentrationen in eine Ober- und eine Unterphase mit unbekanntem Konzentrationen der phasenbildenden Komponenten auf.

Die Messung der Absorption bei 250 nm ($A^{250\text{nm}}$) und eine Dichtebestimmung erlaubt mit Hilfe der Gleichungen (3.6) und (3.7) die Citrat- und PEG-Konzentration in der Oberphase zu ermitteln. Dabei beschreiben D_{PEG} und D_{Citrat} die aus Kalibrierungen bekannten Faktoren zur Bestimmung der Mischungsdichte ρ der Unter- oder Oberphase. Diese sind zusammen mit den ermittelten Extinktionsfaktoren ($\varepsilon_{\text{PEG}}^{250\text{nm}}$ und $\varepsilon_{\text{Citrat}}^{250\text{nm}}$) bei 250 nm der phasenbildenden Komponenten sowie der Brechungsindexbeiwerte (R_{PEG} und R_{Citrat}) im Anhang A2 gelistet.

Die Zusammensetzung der Unterphase resultiert aus der Messung des Brechungsindex (nD) und einer Bestimmung der Trockenmassenkonzentration (x_{TM}) durch Gefriertrocknung aus den Gleichungen (3.7) und (3.8).

$$\rho = 0,998 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} + D_{\text{PEG}} x_{\text{PEG}} + D_{\text{Citrat}} x_{\text{Citrat}} \quad (3.6)$$

$$A^{250\text{nm}} = \varepsilon_{\text{PEG}}^{250\text{nm}} x_{\text{PEG}} + \varepsilon_{\text{Citrat}}^{250\text{nm}} x_{\text{Citrat}} \quad (3.7)$$

$$nD = 1,3330 + R_{\text{PEG}} x_{\text{PEG}} + R_{\text{Citrat}} x_{\text{Citrat}} \quad (3.8)$$

$$x_{\text{TM}} = x_{\text{PEG}} + x_{\text{Citrat}} \quad (3.9)$$

Die Konzentrationen des Mischungspunktes und der Ober- und Unterphase bilden zusammen drei Punkte im Zweiphasendiagramm die auf derselben Konode liegen, welche durch einen Fit mit der Konodengleichung (3.10) definiert ist.

$$x_{\text{Polymer}} = n + m x_{\text{Salz}} \quad (3.10)$$

Die Steigung m der Konoden kann nach Gleichung (2.6) aus der PEG- bzw. Citratkonzentration in der Unter- und Oberphase berechnet werden. Die Steigungen der Konoden innerhalb eines ATPS sind nahezu gleich, sodass sich über den y-Achsenabschnitt n der Konodengleichung beliebige Konoden definieren lassen. Zusammen mit den Gleichungen (2.4) für das Volumenverhältnis und (2.5) für die Konodenlänge sowie den Gleichungen (3.6) bis (3.9) ergibt sich ein nichtlineares Gleichungssystem, durch welches sich für die verschiedenen PEG – Citrat Zweiphasensysteme (siehe Kapitel 4.1) Mischungspunkte definieren lassen, die in einer gleichen Konodenlänge und demselben Volumenverhältnis resultieren.

3.3.3 Versuchsdurchführung der Extraktion

Die Extraktionsversuche erfolgen in einem kleinen Maßstab in 15 mL Zentrifugenröhrchen. Zur Herstellung des ATPS wurden beide Phasen durch Einwiegen der zuvor angesetzten Stocklösungen der phasenbildenden Komponenten getrennt voneinander angesetzt und anschließend im gewünschten Volumenverhältnis durch Abmessen in einem Messzylinder oder durch Pipettieren nacheinander in die Zentrifugenröhrchen eingefüllt. Für das optimierte ATPS mit der Konodelänge von 45 % (siehe Abschnitt 4.1.3) setzt sich die Unterphase neben VE-Wasser und Phospholipase aus 25.8 % (w/w) Citrat und 0.7 % (w/w) PEG 1000 zusammen. Der pH-Wert der Unterphase liegt bei ca. 8.7 und lässt sich durch Zugabe von HCl oder NaOH einstellen. Die Oberphase besteht zu 39.4 % (w/w) aus PEG 1000 und 3.0 % (w/w) Citrat, den Rest bildet VE-Wasser. Die unterschiedlichen Phasenzusammensetzungen führen zu unterschiedlichen Dichten und dynamischen Viskositäten, die bei 20 °C für die Unterphase 1192 kg/m³ und 4.48 mPa*s und für die Oberphase 1091 kg/m³ und 15.72 mPa*s betragen.

Nach Zugabe der Unter- und Oberphase im gewünschten Volumenverhältnis und Mischen beider Phasen startet die Extraktion. Eine ausreichende Durchmischung lässt sich durch Verwendung eines Rotationsmischers bei 50 rpm erreichen. Nach der Mischzeit von 20 min werden die Proben für mindestens 8 h senkrecht bei 20 °C (oder anderer gewünschter Temperatur) gelagert, um eine vollständige Phasenseparation zu garantieren. Danach erfolgt die Beprobung der jeweiligen Phasen. Die Probe der Oberphase lässt sich direkt mit einer Pipette entnehmen, während die Probenahme in der Unterphase mit einer 1 mL Spritze bestückt mit einer Kanüle (0,2 mm Durchmesser) möglich ist. Dabei ist die Phasengrenzfläche zwischen Ober- und Unterphase möglichst schnell zu durchstoßen, und die Kanüle nach dem Herausziehen vorsichtig abzuwischen, um den Eintrag von an der Kanüle hängen gebliebener Oberphase zu vermeiden. Die Konzentrationsbestimmung der Phospholipase erfolgt mittels UV/Vis-Spektrometrie (siehe Abschnitt 3.2.1).

3.4 Flotationsversuche

Das Ansetzen der Unter- und Oberphase für die Flotationsversuche erfolgt analog zu den Extraktionsversuchen (siehe Abschnitt 3.3.3), jedoch in größeren Mengen aufgrund der höheren Volumina der vertikalen Flotationszelle (250 mL) und des Flotationsbeckens (750 mL). Anzumerken ist außerdem, dass die getrennt angesetzte Oberphase behutsam durch Einfüllen mit einer 10 mL

Pipette auf die Unterphase gegeben wird, um eine Vermischung der Phasen vor Flotationsbeginn zu verhindern. Die Flotationsversuche starten mit dem Gaseintrag, der ebenso wie die Durchführung der Batch- und kontinuierlichen ATPF in diesem Kapitel beschrieben ist.

3.4.1 Gasblaseneintrag in das ATPS

Der Gaseintrag während den Flotationsversuchen erfolgt über die Begasung mit unterschiedlichen porösen Medien, welche in 50-facher Vergrößerung in Abbildung 3-1 abgebildet sind. Bei dem Metallgewebe handelt es sich um ein dreilagiges Verbundgewebe, das neben zwei größeren Stützschichten ein feines, für Filtrationszwecke gedachtes, Köpergewebe besitzt. Die Maschenzwischenräume lassen keine Partikel größer 10 μm durch. Bei der Beaufschlagung von Druckluft an der Unterseite des Verbundgewebes bilden sich an den Poren des Köpergewebes Gasblasen aus, die dann in der Unterphase aufsteigen. Das Lochsieb, welches im Standardgebrauch ein Analysesieb für die Bestimmung von Partikelgrößenverteilungen darstellt, besitzt eine regelmäßige Anordnung kreisrunder Löchern mit 10 μm Durchmesser auf, durch welche das Gas durchströmt. Die Oberfläche der Glasmembran erscheint im Vergleich zu den beiden anderen Medien hingegen unregelmäßig. Die nur schwer zu erkennende Porenstruktur entsteht bei einem Sinterprozess von Glaskugeln zur Herstellung der 3 mm dicken Glasmembran. Die Porengrößenverteilung ist mit 10 – 16 μm angegeben.

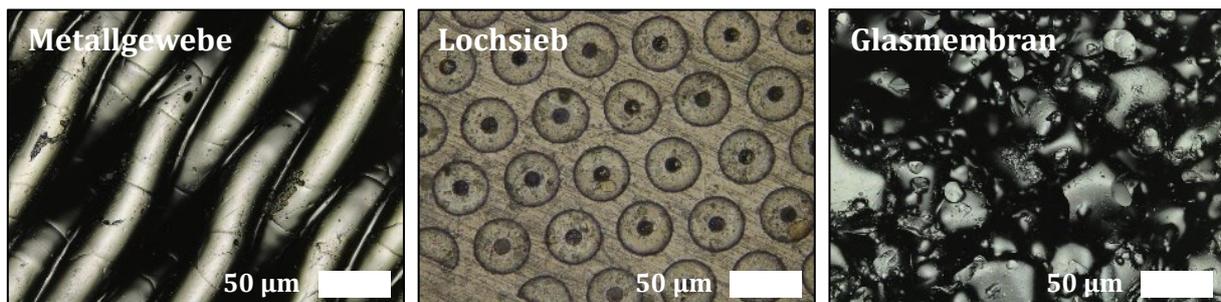


Abbildung 3-1: Verschiedene poröse Medien für den Gaseintrag während der wässrigen Zweiphasen-Flotation.

Zur Erzeugung der Gasblasen, sind kreisrunde Ausschnitte der porösen Medien in 3D-gedruckte Adapter eingelassen und am Rand durch Epoxidharzkleber verklebt. Auf der Unterseite des Adapters ist ein G $\frac{1}{4}$ Zoll Außengewinde gedruckt, über welches sich mittels passendem Gewindepassstück ein Druckluftschlauch mit 6 mm Innendurchmesser anbringen lässt. Für den Gaseintrag in die vertikale Flotationszelle wird eine dieser Begasungseinheiten von unten eingesteckt und über

einen O-Ring seitlich abgedichtet, um ein Austreten der Unterphase zu verhindern. Im horizontalen Flotationsbecken sind drei dieser Begasungseinheiten gleichmäßig über die Länge des Bodens verteilt. Die Gaszufuhr erfolgt durch die Versorgung mit Druckluft (3 bar) und lässt sich individuell für jede Begasungseinheit über einen separaten Massendurchflussregler einstellen.

3.4.2 ATPF in der vertikalen Flotationszelle

Eine breite Glasküvette (32x26x260 mm) dient als vertikale Flotationszelle für die Batch-ATPF Versuche. Am Boden der Flotationszelle ist eine Begasungseinheit für den Gasblaseneintrag, sowie ein mit einem Kugelhahn versehener Auslass integriert. Ein Bild des Batch-Versuchsaufbaus ist in Anhang A6 gezeigt. Das Einfüllen der mit Enzym beladenen Unterphase geschieht während einer geringen Begasung von 20 ccm, um ein Eindringen der Unterphase in die Begasungseinheit zu verhindern. Anschließend wird der Gaseintrag gestoppt und die Oberphase mit Hilfe einer 10 mL Pipette vorsichtig auf die Unterphase aufgegeben, um eine anfängliche Vermischung beider Phasen zu verhindern. Mit erneutem Start der Begasung und dem ersten Aufsteigen von Gasblasen am Boden der Flotationszelle, startet die Messung der Flotationszeit. Zu definierten Zeitpunkten erfolgt eine Probenahme analog zu der Beprobung während den Extraktionsversuchen (siehe Abschnitt 3.3.3), jedoch wird zuvor der Gaseintrag und die Zeitmessung gestoppt und gewartet, bis alle Gasblasen das ATPS verlassen haben und sich eine definierte Phasengrenze einstellt. Nach dem Beprobungsvorgang von ca. 30 Sekunden wird der Gaseintrag und die Zeitmessung fortgesetzt. Die Konzentrationsbestimmung der Phospholipasekonzentration in den Proben ist in Abschnitt 3.2.1 beschrieben.

Bei den semikontinuierlichen ATPF-Versuchen in der vertikalen Flotationszelle erfolgt die Beprobung analog zur Batch-ATPF. Jedoch wird zu gewählten Zeitpunkten die Hälfte der bereits beladenen Oberphase durch enzymfreie Oberphase mittels Pipettieren ausgetauscht. Der Austausch der Hälfte des Unterphasenvolumens erfolgt über mit einer 50 mL Spritze und einer 180 mm langen Kanüle.

Die kontinuierliche Prozessführung in der vertikalen Flotationszelle ist durch das Pumpen der Phasen mit einer 4-Kanal Peristaltikpumpe und der Integration von Schläuchen möglich. Der genaue Ablauf ist zum besseren Verständnis der Ergebnisse direkt in Abschnitt 6.1.3 beschrieben.

3.4.3 Kontinuierliche ATPF im horizontalen Flotationsbecken

Die Versuchsdurchführung der kontinuierlichen ATPF im horizontalen Flotationsbecken weicht nur in Bezug zum Phasenaustausch und der Probenahme von der ATPF in der vertikalen Flotationszelle ab. Das Befüllen des Beckens erfolgt zunächst analog zur Batch-ATPF. Während der Rezirkulationsphase werden die Unter- und Oberphase getrennt voneinander aus dem Becken gepumpt und über den Einlass wieder in das Becken gefördert. Während des kontinuierlichen Betriebs wird statt den abgeführten Phasen frische Unter- und Oberphase in das Becken gepumpt. Dazu wird sowohl die mit Enzym angereicherte Unterphase, als auch die unbeladene Oberphase in gerührten Schottflaschen in für die angestrebte Versuchszeit und in Abhängigkeit der Phasenaustauschrate nötigem Volumen vorgelegt. Der Versuchsaufbau für die kontinuierliche ATPF im horizontalen Flotationsbecken ist im Anhang A7 abgebildet.

Kapitel 4

Charakterisierung stofflicher Schlüsselparameter

4.1 Auswahl eines wässrigen Zweiphasen-Systems

In diesem Kapitel ist die Wahl eines geeigneten wässrigen Zweiphasen-Systems für die Flotation von Enzymen beschrieben. Das wässrige Zweiphasen-System bildet die Grundlage für die Optimierung des Aufreinigungsverfahrens und die damit verbundenen Versuche. Neben der strategischen Auswahl phasenbildender Komponenten sind Einflussfaktoren wie z. B. das Molekulargewicht von Polymeren und die genaue Definition der Phasenzusammensetzung durch das Volumenverhältnis und die Konodenlänge für eine erfolgreiche Aufkonzentrierung der Enzyme in der Oberphase entscheidend.

4.1.1 Vorauswahl von phasenbildenden Komponenten

Es gibt eine Vielzahl phasenbildender Komponenten die für die Ausbildung eines wässrigen Zweiphasen-Systems in Frage kommen. Weit verbreitet sind Polymer-Polymer, Polymer-Salz und Alkohol-Salz Systeme. Letztere finden meist Anwendung in der Extraktion von kleineren Molekülen und nur selten von Proteinen, da die Gefahr einer Denaturierung der sensiblen Makromoleküle bei einer Aufkonzentrierung in der alkoholischen Oberphase hoch ist. Im Gegensatz dazu gewährleisten niedrige Grenzflächenspannungen, sowie geringe Ionenstärken eine milde Umgebung für die Aufbereitung von empfindlichen biologischen Makromolekülen wie Aminosäuren und Proteinen, wenn verschiedenartige Polymere ein Zweiphasen-System ausbilden. Jedoch sind die Kosten für viele Polymere wie z. B. Dextran hoch, so dass deren Einsatz durch die Wertschöpfung des Produkts limitiert und meist auf Pharmaprodukte beschränkt ist. Polymer-

Salz-Systeme sind im Vergleich kostengünstiger, da die volumetrisch deutlich größere Unterphase zum Großteil aus gelöstem Salz besteht. Zusätzlich bietet die polymerreiche Oberphase eine verträgliche Umgebung, welche sich für die Extraktion von Proteinen eignet. [4]

Die Kosten für die phasenbildenden Komponenten fallen zum Großteil auf den Einsatz des Polymers, daher kommt bei großtechnischen Produktionen meist das kostengünstige Polymer PEG zum Einsatz [4,6]. PEG hat zudem den Vorteil, dass es in verschiedenen Kettenlängen erhältlich ist. Je nach Größe bzw. Molekulargewicht des aufzureinigenden Proteins eignen sich verschieden große PEG-Moleküle. Benavides und Rito-Palomares [62] empfehlen für große Makromoleküle über 10 kDa ein PEG-Molekulargewicht von kleiner 4000 Da und für kleinere Makromoleküle ein Molekulargewicht größer 6000 Da. PEG kann mit verschiedenen Salzen ein Zweiphasensystem ausbilden, jedoch muss bei dem Einsatz von Phosphaten oder Sulfaten als zweite phasenbildende Komponente das Prozesswasser aufbereitet werden, um lokale Grenzwerte der Salze für die Abwassereinleitung einzuhalten [63]. Aus diesem Grund finden immer häufiger biologisch abbaubare Salze wie Succinate, Tartrate oder Citrate Verwendung [112]. Letzteres ist bereits für die Aufreinigung eines Proteins durch die wässrige Zweiphasen-Flotation dokumentiert [19].

Eine Vorauswahl der phasenbildenden Komponenten für die wässrige Zweiphasen-Flotation zur Abtrennung und Aufkonzentrierung der Phospholipase erfolgt unter Berücksichtigung zuvor genannter ökonomischer und ökologischer Vor- bzw. Nachteile. Die Aufbereitung großer Mengen an Fermentationsbrühe bei der Herstellung von technischen Enzymen schließen den Einsatz eines Polymer-Polymer Systems aufgrund der hohen Polymerkosten aus. Als geeignetes Polymer für ein Polymer-Salz-System zeigt PEG den Vorteil, dass es bereits etabliert und in verschiedenen Größen verfügbar ist. Zwar sind biologisch abbaubare Salze meist teurer als mineralische Salze, jedoch rechtfertigt die Umweltverträglichkeit und das Einsparen eines zusätzlichen Abwasseraufbereitungsschritts ihren Einsatz. Im Vergleich zu Tartraten oder Citraten bilden Succinate erst bei höheren Konzentrationen Zweiphasen-Systeme aus [112], was zu einem erhöhten Bedarf führt. Citrat bietet den Vorteil günstig und in großen Mengen verfügbar zu sein.

4.1.2 PEG-Molekulargewicht

PEG ist in verschiedenen Kettenlängen verfügbar. Die Charakterisierung des Einflusses des PEG-Molekulargewicht auf die Ausbildung des ATPS setzt die Bestimmung der Mischungslücken bzw. Binodalen voraus. Extraktionsversuche mit verschiedenem PEG bei vergleichbaren Mischungspunkten (gleiche Konodenlängen und Volumenverhältnisse) offenbaren die Affinitätsunterschiede der Phospholipase zu den jeweiligen Oberphasen.

In Abbildung 4-1 sind die durch die Trübungstitration bestimmten Mischungspunkte (Symbole) von Citrat und PEG verschiedener Kettenlängen gezeigt. Die durchgezogenen Linien zeichnen die zugehörigen Mistry-Fits (Gleichung (3.5)) in das Diagramm. Für die betrachteten Molekulargewichte von 1000, 4000 und 8000 Da des PEGs zeigt sich der typische Verlauf für die Grenze zwischen Einphasen- und Zweiphasen-Gebiet. Liegt eine der beiden Komponenten in hoher Konzentration vor, führt die Zugabe einer geringen Konzentration der jeweils anderen Komponente zur Überschreitung der Mischungslücke. Ab einer Citrat-Konzentration von 15 % bildet sich bereits in Anwesenheit kleinster Mengen von PEG 8000 ein Zweiphasen-System. PEG 4000 lässt sich ab einer Citrat-Konzentration von 17% und PEG 1000 ab 25 % Citrat nicht mehr gemeinsam mit Citrat in Lösung bringen. Analog nimmt die Löslichkeit von Citrat mit steigender PEG-Konzentration ab. Ebenfalls ist der Trend erkennbar, dass mit steigendem PEG-Molekulargewicht geringere Konzentrationen der phasenbildenden Komponenten nötig sind, um ein Zweiphasen-System auszubilden. Dieser bekannte Zusammenhang ist auf die größer werdende Inkompatibilität zwischen den kleinen Salz-Molekülen und den langkettigen Polymeren zurückzuführen [64].

Um vergleichbare Mischungspunkte definieren zu können, sind neben den Binodalgleichungen die Bestimmung der Konoden erforderlich. Die Steigungen unterschiedlicher Konoden eines Zweiphasen-Systems sind nahezu konstant [63], unterscheiden sich aber je nach Kettenlänge des PEGs. Sind die Steigungen der Konodengleichungen (3.10) und die Parameter der Mistry-Fits (beide gelistet im Anhang A2) zur Darstellung der Binodalen bekannt, ist es möglich ein nichtlineares Gleichungssystem zusammen mit den Ausdrücken für die Konodenlängen (Gleichung (2.5)) und des Volumenverhältnisses (Gleichung (2.4)) aufzustellen. Dieses lässt sich für eine gewählte Konodenlänge und ein gewähltes Volumenverhältnis lösen und liefert so Mischungspunkte in den jeweiligen PEG-Citrat-Systemen die aufgrund gleicher Konodenlänge und Volumenverhältnisse untereinander vergleichbar sind.

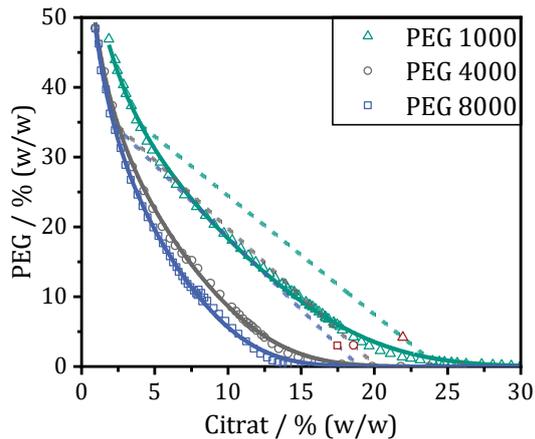


Abbildung 4-1: Durch Trübungstitration bestimmte Mischungspunkte, welche die Grenze zwischen dem Einphasen- und Zweiphasen-Gebiet von PEG unterschiedlicher Kettenlänge und Citrat definieren. Die roten Punkte definieren die Mischungspunkte für ein Volumenverhältnis von 0,1. Die durchgezogenen Linien zeigen die durch den Mistry-Fit bestimmten Binodalen und die gestrichelten Geraden die Konoden der Länge 38,46 %.

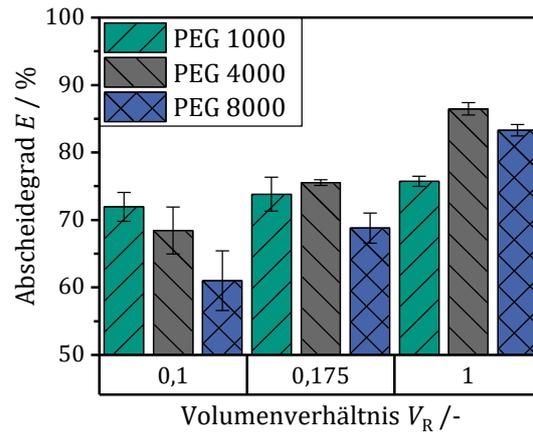


Abbildung 4-2: Abscheidegrade der Phospholipase bei Extraktionen mit unterschiedlichen Volumenverhältnissen und dem Einsatz verschiedener PEG-Molekulargewichte bei gleichbleibender Konodenlänge von 38,46 %

In Abbildung 4-1 sind neben den Binodalen auch die Konoden (gestrichelte Linien) der Länge 38,46 % der wässrigen Zweiphasen-Systeme von Citrat mit PEG der drei verschiedenen Molekulargewichte dargestellt. Die roten Datenpunkte kennzeichnen die Mischungspunkte, welche zu einem Volumenverhältnis von 0,1 führen. Die oberen Schnittpunkte der Konoden mit den jeweiligen Binodalen markieren die Zusammensetzung der jeweiligen Oberphase, die unteren Schnittpunkte die der jeweiligen Unterphase. Die Citrat- bzw. PEG-Konzentrationen der Phasen, sowie der Mischungspunkte sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Während die PEG-Konzentration in den Oberphasen fast identisch sind (im Mittel $34,50 \pm 0,16$ % (w/w)), unterscheiden sie sich in der Unterphase deutlich. Die PEG 1000-Konzentration ist über 33-mal, die PEG 4000-Konzentration 11-mal so hoch wie die PEG 8000 Konzentration, auch wenn die absolute Differenz maximal 1,31 % (w/w) beträgt. Die Citratkonzentration nimmt sowohl in der Oberphase, als auch in der Unterphase mit steigendem PEG-Molekulargewicht ab. Auch hier zeigt sich der größte Unterschied zwischen PEG 1000 und PEG 8000. Bei Verwendung von PEG 1000 beträgt die Citratkonzentration in der Oberphase das 1,9-fache im Vergleich zu PEG 8000 und das 1,6-fache im Vergleich zu PEG 4000. In der Unterphase befindet sich die 1,3-fache bzw. 1,2-fache Citratmenge in dem System mit PEG 1000 verglichen mit PEG 8000 bzw. PEG 4000.

Tabelle 4.1: Zusammensetzung der Ober- und Unterphase sowie der Mischungspunkte bei einem Volumenverhältnis von 0,1 für die Konoden mit 38.46 % der verschiedenen wässrigen Zweiphasen-System aus Citrat und PEG verschiedener Molekulargewichte.

Konode	$x_{\text{PEG}}^{\text{TOP}}$	$x_{\text{Citrat}}^{\text{TOP}}$	$x_{\text{PEG}}^{\text{BOT}}$	$x_{\text{Citrat}}^{\text{BOT}}$	$x_{\text{PEG}}^{\text{MP}}$	$x_{\text{Citrat}}^{\text{MP}}$
38,46 %	in %(w/w)	in %(w/w)	in %(w/w)	in %(w/w)	in %(w/w)	in %(w/w)
PEG 1000	34,50	4,09	1,35	23,59	4,16	21,94
PEG 4000	34,34	2,53	0,12	20,08	3,06	18,58
PEG 8000	34,67	2,20	0,04	18,92	3,02	17,48

Obwohl die Konodenlängen der untersuchten Mischungspunkte identisch sind, variieren die Zusammensetzungen der Ober- bzw. Unterphasen. Je länger die ungeladene Kohlenwasserstoffkette des PEGs, desto größer ist der Unterschied zu den kurzkettigen, geladenen Citratmolekülen und die Konzentrationen der phasenbildenden Komponenten in den Mischungspunkten nimmt ab.

Für die Flotation im wässrigen Zweiphasen-System verspricht die Verwendung von PEG 8000 das Einsparen von phasenbildenden Komponenten und damit verringerte Kosten für den Aufreinigungsprozess, vorausgesetzt eine hohe Aufkonzentrierung des Enzyms in der Oberphase ist möglich. Jedoch nimmt die Viskosität der Oberphase, die ausfällende Wirkung gegenüber Proteinen sowie die Grenzflächenspannung ebenfalls mit dem Polymergewicht zu [113,114].

Die Ermittlung vergleichbarer Mischungspunkte ermöglicht es, den Einfluss des PEG-Molekulargewichts durch Extraktionsversuche zu bestimmen. Die Abscheidegrade der Phospholipase bei gleichen Konodenlängen von 38.46 % und variierenden Volumenverhältnissen sind in Abbildung 4-2 in Abhängigkeit des gewählten PEGs gezeigt. Die höchsten Abscheidegrade während der Extraktionen resultieren bei einem Volumenverhältnis von 1 für die jeweiligen Systeme im untersuchten Bereich. Die Verwendung von PEG 4000 führt zu einem maximalen Abscheidegrad von 86,5 ($\pm 0,9$) %. Bei der Extraktion im PEG 8000-System stellt sich mit 83,3 ($\pm 0,8$) % ein ähnlich hoher Abscheidegrad ein. Deutlich geringer ist dieser mit 75,7 ($\pm 0,7$) % wenn das Zweiphasen-System aus Citrat und PEG 1000 besteht. Mit abnehmenden Volumenverhältnis sinkt der Abscheidegrad für alle drei PEG-Molekulargewichte. Beim Volumenverhältnis von 0,175 führt erneut PEG 4000 zu dem höchsten Abscheidegrad (75,5 ($\pm 0,4$) %). Bei der Verwendung von PEG 1000 ist dieser knapp 2 % und bei der Verwendung von PEG 8000 ca. 7 % niedriger. Bei noch geringerem Volumenverhältnis von 0,1 ergibt sich der höchste Abscheidegrad

(71,9 (\pm 2,1) %) für das System mit PEG 1000. Der Einsatz von PEG 4000 führt hier zu einem ca. 4 % und der Einsatz von PEG 8000 zu einem ca. 11 % niedrigeren Wert.

Die Verteilung der Phospholipasemoleküle begründet sich auf mehrere Eigenschaften der wässrigen Phasen. Zum einen führt die hohe Citratkonzentration in der Unterphase zu einem aussalzenden Effekt und zum anderen steigt die Affinität der Enzymmoleküle zur polymerreichen Oberphase mit dem PEG-Molekulargewicht. Dem Bestreben der Enzyme sich in der Oberphase anzureichern steht jedoch der Volumenausschlusseffekt durch reduzierten Platz im Gitter der Wassermoleküle aufgrund der langkettigen Polymere entgegen. Dieser Effekt ist am stärksten ausgeprägt bei der Extraktion mit dem langkettigen PEG 8000 und führt zu Einbußen im Abscheidegrad von über 22 % bei Reduzierung des Volumenverhältnisses von 1 auf 0,1. Die Limitierung der Anreicherung ist bereits bei einem hohen Volumenverhältnis von 1 ersichtlich, da hier der Abscheidegrad bei der Extraktion mit PEG 4000 ca. 3 % höher ist, obwohl der hydrophobe Charakter und damit die Affinität der Enzymmoleküle zur Oberphase geringer sind. Beim Vergleich der Extraktionen von PEG 4000 und PEG 1000 zeigt sich der Einfluss einer höheren Affinität der Phospholipase zur Oberphase und in höheren Abscheidegraden, sofern kein oder nur ein geringer Volumenausschlusseffekt auftritt. Der deutliche Unterschied bei einem Volumenverhältnis von 1 lässt zusätzlich darauf schließen, dass die Affinität zur Oberphase bei Verwendung von PEG 4000 die größere aussalzende Wirkung der Citrat-reicheren Unterphase bei PEG 1000 dominiert. Bei einem Volumenverhältnis von 0,1 ist das freie Volumen in der Oberphase noch entscheidender für das Extraktionsergebnis, da insgesamt weniger Oberphasenvolumen zur Verfügung steht. Der geringste Rückgang im Abscheidegrad mit nur 3,8 % ergibt sich bei der Extraktion mit PEG 1000 als phasenbildende Komponente.

Die Extraktionsversuche bei gleicher Konodenlänge zeigen, dass mit dem PEG 1000-Citrat-System die im Vergleich beste Aufreinigung bei einem geringen Volumenverhältnis von 0,1 resultiert. Fast 72 % der Phospholipase kann aus der Unterphase extrahiert und in einem Zehntel des Volumens angereichert werden. Daraus ergibt sich ein maximaler Aufkonzentrierungsfaktor von 7,2. Liegt der Fokus auf der Aufkonzentrierung und nicht auf der maximalen Ausbeute, ist das PEG 1000-Citrat-System gegenüber den Systemen mit höherem PEG-Molekulargewicht zu bevorzugen. Durch die mögliche Aufreinigung bei geringem Volumenverhältnis reduzieren sich neben den Betriebs- und Investitionskosten zusätzlich die Materialkosten. Obwohl bei der Verwendung von PEG 1000 insgesamt größere Mengen phasenbildender Komponenten nötig sind,

reduziert sich bei geringerem Volumenverhältnis die absolute Menge an teurerem Polymer im Vergleich zu der Verwendung von PEG 4000 und PEG 8000 und höheren Volumenverhältnissen. Dies ist insbesondere für einen ökonomischen Aufreinigungsprozess von technischen Enzymen aus großen Mengen Fermentationsbrühe entscheidend.

4.1.3 Volumenverhältnis und Konodenlänge

Die Flotation im wässrigen Zweiphasen-System zur primären Aufreinigung der Phospholipase aus einer Fermentationsbrühe ermöglicht eine hohe Aufkonzentrierung der Enzymmoleküle. Die Reduktion des produktführenden Volumens führt zu einer geringeren Wasserfracht und damit zu geringeren Betriebskosten in der weiteren Prozesskette aufgrund des Einsparens an Pump- und Beschleunigungskosten (bspw. bei Zentrifugationen), sowie verringerten Investitionskosten durch kleinere Apparatvolumen und den damit verbundenen geringeren Platzbedarf.

Nachdem die Wahl für ein PEG-Molekulargewicht getroffen ist, gilt es den Einfluss der Konodenlänge auf die Extraktion zu untersuchen. In Tabelle 4.2 sind die zugehörigen Phasenzusammensetzungen gelistet. In Abbildung 4-3 sind die Abscheidegrade in Abhängigkeit der Konodenlängen zwischen 37 % und 45 % aufgetragen. Der geringste Abscheidegrad von $68,6 (\pm 0,8) \%$ ergibt sich bei der Extraktion mit der kürzesten Konode von 37 %. Mit zunehmender Konodenlänge steigt auch der Abscheidegrad auf den höchsten Wert von $74,9 (\pm 0,7) \%$ bei der längsten untersuchten Konode mit 45 %. Beim Vergleich der einzelnen Konoden zeigt sich, dass mit zunehmender Konodenlänge, die PEG-Konzentration in der Oberphase zunimmt und in der Unterphase sinkt. Die Konzentration des Citrats erfolgt entgegengesetzt.

Tabelle 4.2: Zusammensetzung der Ober- und Unterphase sowie der Mischungspunkte für verschiedene Konoden der wässrigen Zweiphasen-System aus Citrat und PEG 1000 bei einem Volumenverhältnis von 0,1.

PEG 1000	$x_{\text{PEG}}^{\text{TOP}}$	$x_{\text{Citrat}}^{\text{TOP}}$	$x_{\text{PEG}}^{\text{BOT}}$	$x_{\text{Citrat}}^{\text{BOT}}$	$x_{\text{PEG}}^{\text{AP}}$	$x_{\text{Citrat}}^{\text{AP}}$
Konode	in %(w/w)	in %(w/w)	in %(w/w)	in %(w/w)	in %(w/w)	in %(w/w)
37 %	33,44	4,37	1,55	23,13	4,26	21,53
40 %	34,32	4,14	1,39	23,51	4,18	21,87
42 %	37,14	3,46	0,94	24,75	3,98	22,56
45 %	39,45	2,97	0,67	25,78	3,91	23,87

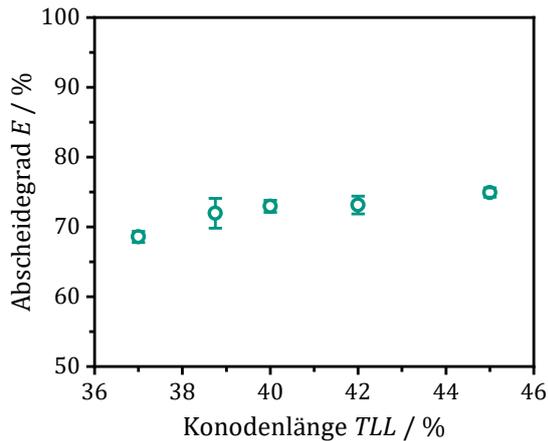


Abbildung 4-3: Abscheidegrade der Phospholipase bei Extraktionen in Abhängigkeit der Konodenlänge für ein PEG 1000-Citrat-System mit gleichbleibendem Volumenverhältnis von 0,1.

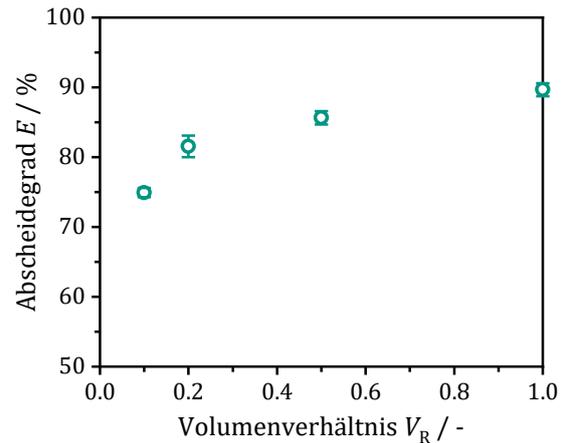


Abbildung 4-4: Abscheidegrade der Phospholipase bei Extraktionen in Abhängigkeit des Volumenverhältnisses für ein PEG 1000-Citrat-System mit gleichbleibender Konodenlänge von 45 %.

Mit der Konodenlänge steigt der Unterschied zwischen der Ober- und Unterphase, was zu einer veränderten Verteilung der Phospholipase führt. Der mit höherer PEG-Konzentration zunehmend hydrophobe Charakter führt zu einer steigenden Affinität der Enzyme zur Oberphase. Gleichzeitig wirkt die größere Menge an Citrat in der Unterphase stärker aussalzend und begünstigt damit den Übergang der Enzyme in die Oberphase. Eine Konodenlänge von 45 % liefert bei dem geringen Volumenverhältnis von 0,1 die besten Ergebnisse für das PEG 1000-Citrat-System.

Nachdem eine günstige Konodenlänge gewählt ist, lässt sich der Einfluss des Volumenverhältnisses für diese Konode ermitteln. Dieser ist für die Konode mit 45 % in Abbildung 4-4 gezeigt. Mit steigendem Volumenverhältnis nimmt der Abscheidegrad zu und ist mit 89,7 ($\pm 0,9$) % bei einem Volumenverhältnis von 1 maximal im untersuchten Bereich. Damit ist der Wert um ca. 14 % höher als bei einem Volumenverhältnis von 0,1. Im Vergleich zur kürzeren Konodenlänge von 38,46 % (Abbildung 4-2), bei welcher die Differenz lediglich bei ca. 4 % liegt, zeigt das Volumenverhältnis bei der Konodenlänge von 45 % einen deutlich größeren Einfluss auf das Extraktionsverhalten der Phospholipase.

Außerdem scheint das Bestreben der Phospholipase sich in der Oberphase anzureichern durch die längere Konode gesteigert. Die Abscheidegrade sind insgesamt höher und selbst bei einem geringen Volumenverhältnis von 0,1 entspricht der Wert dem Abscheidegrad bei der kürzeren Konode und dem hohen Volumenverhältnis von 1. Grund hierfür ist, dass die gesteigerte Konodenlänge

aufgrund des größeren Konzentrationsunterschieds der phasenbildenden Komponenten in der jeweiligen Phase zu einer höheren Affinität zur Oberphase und einem stärkeren aussalzenden Effekt führt. Gleichzeitig führt die um ca. 5 % höhere PEG-Konzentration in der Oberphase zu einem größeren Volumenausschlusseffekt, welcher den verstärkten Einfluss dieses Parameters bei der Konodenlänge von 45 % begründet.

Die Wahl der geeignetsten Konodenlänge und des richtigen Volumenverhältnisses kann folglich nicht pauschal und unabhängig voneinander getroffen werden. Liegt der Fokus auf einer möglichst hohen Aufkonzentrierung und dem Einsparen von phasenbildenden Komponenten, sind geringe Volumenverhältnisse und eine Konodenlänge, welche einen ausreichenden Abscheidegrad gewährleistet zu bevorzugen. Für die Phospholipase trifft dies bei der Konodenlänge von 45 % und einem Volumenverhältnis 0,1 zu. Steht eine möglichst hohe Produktausbeute im Vordergrund, ist eine Kombination aus Volumenverhältnis und Konodenlänge, welche einen maximalen Abscheidegrad verspricht, zu wählen.

4.2 Äußere Einflussfaktoren auf die Flotation im wässrigen Zweiphasen-System

Neben der Art der phasenbildenden Komponenten, dem PEG-Molekulargewicht sowie dem Volumenverhältnis und der Konodenlänge, verändern äußere Einflüsse die Verteilung von Enzymen im wässrigen Zweiphasen-System. In diesem Kapitel sind die Auswirkungen von Temperatur, pH-Wert, Anwesenheit additiver Salze und Medienbestandteilen auf die wässrige Zweiphasen-Flotation beschrieben. Außerdem offenbaren die gezeigten Untersuchungen zur Enzymaktivität den Einfluss des gewählten Gases für die Flotation.

4.2.1 Einfluss von Temperatur, pH-Wert und additiven Salzen

Der Einfluss der Temperatur auf den Verteilungskoeffizienten der Phospholipase während der Extraktion im PEG 1000-Citrat-System mit einer Konodenlänge von 45 % und einem Volumenverhältnis von 0,1 ist in Abbildung 4-5 gezeigt. Der höchste Verteilungskoeffizient von 33,8 ($\pm 1,1$) resultiert aus der Extraktion bei 15 °C. Mit steigender Temperatur nimmt der Verteilungskoeffizient bei 23,5 °C mit 31,1 ($\pm 0,8$) und 32,1 ($\pm 1,3$) bei 30 °C leicht ab. Eine weitere

Erhöhung der Temperatur auf 40 °C führt zu einer deutlichen Reduktion des Verteilungskoeffizienten auf 23,9 ($\pm 0,9$). Der niedrigste Wert von 7,7 ($\pm 0,8$) ist bei einer Abkühlung des Systems auf 4 °C zu beobachten.

Sehr hohe und sehr niedrige Temperaturen während der Extraktion beeinflussen die Verteilung der Phospholipase stark. Den abnehmenden Trend des Verteilungskoeffizienten mit zunehmender Temperatur beobachtet auch Saravan *et. al.* [115] und begründet dies mit einer Ausdehnung der PEG-Moleküle bei höheren Temperaturen und der damit verbundenen, reduzierten Interaktion mit Proteinen. Diese beschreibt ebenfalls Di Nucci, Nerli und Picó [116]. Denkbar ist ebenfalls, dass diese Vergrößerung der totalen Polymeroberfläche im Wassergitter bei höheren Temperaturen zu einem verstärkten Volumenausschlusseffekt führt, welcher die maximale Phospholipasekonzentration in der Oberphase reduziert.

Viele Fermentationsprozesse finden bei höheren Temperaturen statt, da die maximale Wachstumsgeschwindigkeit von z. B. *Saccharomyces cerevisiae* bei 30 °C, von *Bacillus subtilis* bei 37 °C und *Escherichia coli* bei 40 °C liegen [2]. Es erscheint daher sinnvoll, die Fermentationsbrühe vor der wässrigen Zweiphasen-Flotation auf 15 °C – 30 °C abzukühlen, um so eine hohe Aufkonzentrierung der Phospholipase in der Oberphase zu ermöglichen.

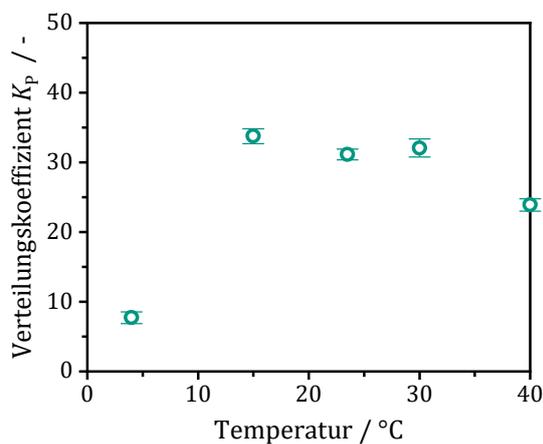


Abbildung 4-5: Verteilungskoeffizienten der Phospholipase bei der Extraktion in Abhängigkeit der Temperatur für ein PEG 1000-Citrat-System der Konodenlänge 45 % und Volumenverhältnis von 0,1.

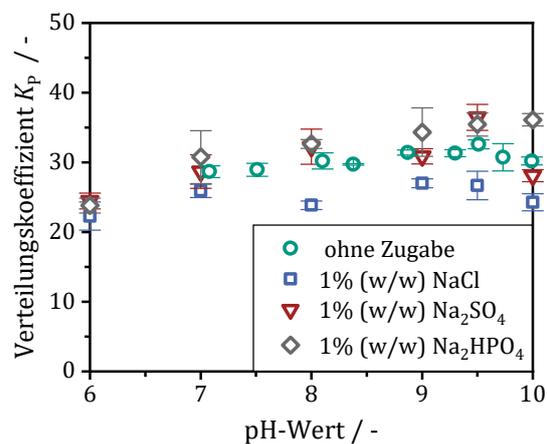


Abbildung 4-6: Verteilungskoeffizienten der Phospholipase bei der Extraktion in Abhängigkeit des pH-Werts und der Anwesenheit additiver Salze für ein PEG 1000-Citrat-System der Konodenlänge 45 % und Volumenverhältnis von 0,1.

Weitere wichtige Parameter für die Verteilung von Enzymen im wässrigen Zweiphasen-System sind der pH-Wert und die Anwesenheit additiver Salze. Der pH-Wert beeinflusst die Affinität der Enzyme zur Oberphase während additive Salze die aussalzende Wirkung der Unterphase verändern können. In Abbildung 4-6 sind die Verteilungskoeffizienten der Phospholipase während der Extraktion ohne Zugabe weiterer Salze, sowie in Anwesenheit von Natriumchlorid, Natriumsulfat und DiNatriumhydrogenphosphat in der Unterphase in Abhängigkeit des pH-Werts aufgetragen. Bei einem pH-Wert von 6 liegen alle ermittelten Verteilungskoeffizienten eng zusammen und betragen im gemeinsamen Mittel 23,5 ($\pm 1,4$), was dem niedrigsten Wert im untersuchtem pH-Bereich entspricht. Ohne Zugabe additiver Salze steigt der Verteilungskoeffizient bei zunehmenden pH-Wert bis zu einem Maximum von 32,6 ($\pm 0,6$) bei pH = 9,5 an. Eine weitere Erhöhung des pH-Werts hat eine Abnahme des Verteilungskoeffizienten auf 30,2 ($\pm 0,6$) bei pH = 10 zur Folge. Ein ähnlicher Verlauf ist bei der Zugabe von Natriumsulfat zu beobachten, wobei hier der Verteilungskoeffizient bei pH = 9,5 mit 36,5 ($\pm 1,9$) deutlich erhöht ist. Die Zugabe von Di-Natriumhydrogenphosphat führt im Vergleich zu dem System ohne Salzzugabe zu einer generellen Steigerung des Verteilungskoeffizienten und einem maximalen Wert von 36,1 ($\pm 0,9$) bei pH = 10. Die Anwesenheit von Natriumchlorid hingegen reduziert den Verteilungskoeffizienten bei allen pH-Werten und liegt im Bereich zwischen 22,3 ($\pm 2,0$) und 27,0 ($\pm 0,6$).

Ohne die Zugabe additiver Salze kann die unterschiedliche Verteilung der Phospholipase in Abhängigkeit des pH-Werts auf die Affinität zur PEG-reichen Oberphase und der aussalzenden Wirkung des in der Unterphase hoch konzentrierten Citrats zurückgeführt werden. Letztere hängt von der Dissoziationsstufe der Citronensäure ab. Bei pH-Werten unterhalb von ca. 6,4 liegt diese zum Großteil als zweiwertiges Anion vor [117]. Mit zunehmenden pH-Wert existiert vorwiegend die dreiwertige, anionische Dissoziationsform – das Citrat. Die reduzierte aussalzende Wirkung der zweiwertigen Anionen erklärt die niedrigen Verteilungskoeffizienten aller Ansätze bei einem pH-Wert von 6. Eine mögliche Begründung für den maximalen Verteilungskoeffizienten bei pH = 9,5 findet sich unter Berücksichtigung der Oberflächenladung der Phospholipase. Für die von *Streptomyces violaceoruber* A-2688 stammenden Phospholipasen A₂ sind zwei isoelektrische Punkte bei pH = 6,9 und pH = 8,6 bekannt [47]. Bei diesen pH-Werten ist die netto-Ladung der Enzymmoleküle neutral, was zu reduzierten elektrostatischen Wechselwirkungen und dadurch bedingt gesteigerten hydrophoben Wechselwirkungen zur polymerreichen Oberphase führt. Die Affinität zu den PEG 1000-Molekülen, welche ein leicht positives Dipol-Moment aufweisen, erhöht sich

bei pH-Werten leicht oberhalb des isoelektrischen Punktes aufgrund der dort vorliegenden leicht negativen Oberflächenladung der Enzyme zusätzlich [4]. Nimmt die negative Ladung der Phospholipase bei noch höheren pH-Werten weiter zu, überlagern die elektrostatischen Kräfte die hydrophoben Wechselwirkungen und der Verteilungskoeffizient nimmt wieder ab.

Eine mögliche Erklärung für die reduzierte Anreicherung der Phospholipase in der Oberphase bei Zugabe von Natriumchlorid findet sich bei Betrachtung der Hofmeister-Reihe. Chloridionen sind im Vergleich zur Carboxylgruppe des Citrats weniger kosmotroph und führen zu einer verstärkten Hydratisierung der Phospholipase in der Unterphase und der Aussalzeffekt nimmt ab. Diese stabilisierende Wirkung scheint den Einfluss des pH-Werts abzuschwächen, was sich in der geringen Differenz zwischen minimalem und maximalem Verteilungskoeffizienten widerspiegelt. Trotzdem sind auch hier bei $\text{pH} = 7, 9$ und $9,5$, also in der Nähe der isoelektrischen Punkte, vergleichsweise höhere Verteilungskoeffizienten zu beobachten. Sulfat- und Phosphationen befinden sich in der Hofmeister-Reihe weiter „links“ und erhöhen dadurch die aussalzende Wirkung der Unterphase. Dies resultiert in der Erhöhung der Verteilungskoeffizienten im Schnitt um $8,8\%$ für die Zugabe von Natriumsulfat und $9,5\%$ für die Zugabe von Di-Natriumhydrogenphosphat.

Die Anwesenheit von additiven Salzen in der Unterphase kann die Extraktion sowohl negativ, wie im Falle von Natriumchlorid, als auch positiv wie bei der Anwesenheit von Phosphat oder Sulfat beeinflussen. Da die untersuchten Salze oft Bestandteile von Fermentationsmedien sind, gilt es, ihren Einfluss zu berücksichtigen. Eine vorsätzliche Zugabe von Phosphaten oder Sulfaten zur Unterphase zur Steigerung des Verteilungskoeffizienten muss unter dem Gesichtspunkt der Umweltverträglichkeit betrachtet werden, da für beide Salze oft nationale oder lokale Beschränkungen in der Abwassereinleitung bestehen. Des Weiteren lässt sich ein ausgeprägter Einfluss des pH-Werts auf die Anreicherung der Phospholipase in der Oberphase erkennen. Findet die Extraktion bei einem pH-Wert von $9,5$ statt, ist sowohl die aussalzende Wirkung der Unterphase, als auch die Affinität der Phospholipase zur Oberphase erhöht. Beides ist wichtig für eine effiziente Abtrennung während der wässrigen Zweiphasen-Flotation. Jedoch muss für eine abschließende Wahl des optimalen pH-Werts dessen Einfluss auf die Anlagerung der Enzymmoleküle an die Blasenoberfläche untersucht werden.

Bei der Flotation im wässrigen Zweiphasen-System hängt die erfolgreiche Aufreinigung im Vergleich zur Extraktion neben einer hohen Affinität der Enzyme zur Oberphase auch von einem

weiteren Faktor, der Anlagerung der Enzyme an die Gasblasen, ab. Hierfür ist die Interaktion zwischen der hydrophoben Gasblase und den Enzymen entscheidend, welche vom pH-Wert der umgebenden Unterphase abhängt.

Für aus den Extraktionsergebnissen abgeleitete, entscheidende pH-Werte sind die Abscheidegrade der Flotation in Abbildung 4-7 über die Flotationszeit aufgetragen. Die gestrichelten Linien zeigen die exponentiellen Fits (Gleichung (2.31)), welche den Verlauf der durch Probennahmen bestimmten Messwerte verdeutlichen. Die maximalen Abscheidegrade sowie die Flotationsratenkonstanten, welche aus den exponentiellen Fits resultieren, sind in Abbildung 4-8 gezeigt. Zu Beginn der Flotation steigen die Abscheidegrade stark an. Nach 15 min ergeben sich die höchsten Abscheidegrade für die Versuche bei $\text{pH} = 7$ mit $49,8 (\pm 1,1) \%$ und $\text{pH} = 9,5$ mit $47,5 (\pm 5,7) \%$, während die pH-Werte von 8 und 10 mit $32,4 (\pm 4,3) \%$ bzw. $38,8 (\pm 2,8) \%$ in deutlich niedrigeren Werten resultieren. Nach ca. 30 – 45 min ist ein deutliches Abknicken in den Verläufen erkennbar und die Abscheidegrade verändern sich nach 60 min Flotationszeit nur geringfügig. Die maximalen Abscheidegrade betragen im Mittel $70,2 (\pm 1,5) \%$. Ein deutlicherer Unterschied zwischen den pH-Werten ist in der Flotationsratenkonstante sichtbar. Diese ist für $\text{pH} = 7$ mit $8,9 (\pm 0,8) \cdot 10^{-2} / \text{min}$ maximal und bei $\text{pH} = 8$ mit $4,5 (\pm 0,2) \cdot 10^{-2} / \text{min}$ minimal.

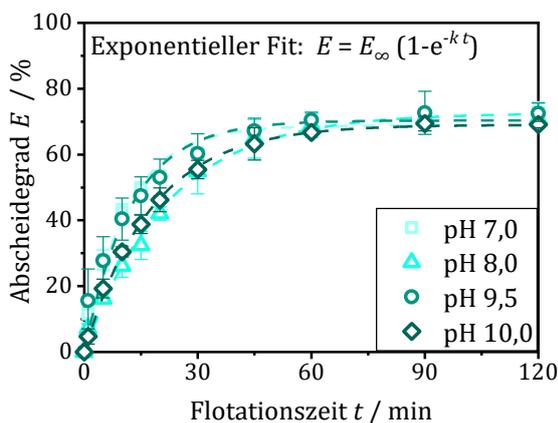


Abbildung 4-7: Abscheidegrade der Phospholipase während der Flotation im PEG 1000-Citrat-System in Abhängigkeit des pH-Werts bei einer Konodenlänge von 45% und einem Volumenverhältnis von 0,1.

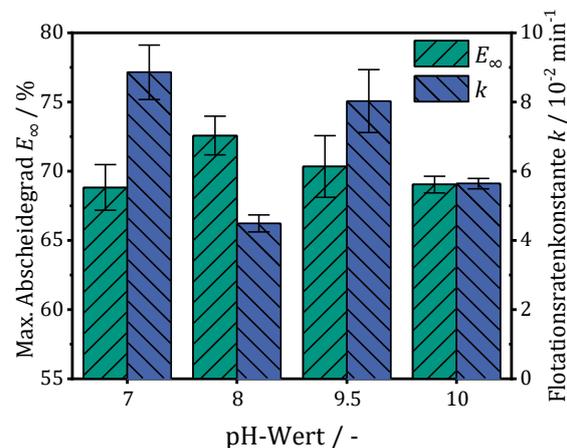


Abbildung 4-8: Die durch die exponentiellen Fits ermittelten maximalen Abscheidegrade und Flotationsratenkonstanten der in Abbildung 4-7 gezeigten Verläufe der Abscheidegrade für die Flotationen im wässrigen Zweiphasen-System bei unterschiedlichen pH-Werten.

Die Flotationsversuche im wässrigen Zweiphasen-System bei unterschiedlichen pH-Werten weisen unterschiedliche Kinetiken bei dem Übergang der Phospholipase von der Unter- in die Oberphase auf. Die schnellste Flotation erfolgt bei $\text{pH} = 7$ und pI-Punkten ($\text{pH} = 6,9$ und $\text{pH} = 8,6$ [47]). Bei den pH-Werten von 8 und 10 ist die Oberfläche der Phospholipase geladen und die daraus resultierende elektrostatische Abschirmung reduziert die Interaktion zu den hydrophoben Gasblasen und damit auch die Flotationsratenkonstanten. Eine schnelle Flotation der Enzyme ermöglicht bei geringer Flotationszeit bereits hohe Abscheidegrade zu erzielen. Für den Aufreinigungsprozess ist dies von Vorteil, da sich so bei gleichbleibendem Durchsatz die Größe der Flotationszelle reduziert.

Die Anwesenheit von additiven Salzen beeinflusst die Extraktion der Phospholipase positiv oder negativ je nach Art des Salzes. Der pH-Wert der Unterphase verändert sowohl die Affinität der Enzyme zur polymerreichen Oberphase während der Extraktion, als auch die Anlagerung an die Gasblasen während der Flotation. Um den Einfluss beider Schlüsselparameter für die Flotation im wässrigen Zweiphasen-System abschließend beurteilen zu können, ist ein Vergleich der beiden Aufreinigungsverfahren nötig.

In Abbildung 4-9 sind die Verteilungskoeffizienten der Phospholipase während der Extraktion und Flotation bei verschiedenen pH-Werten gegenübergestellt. Wie bereits zuvor beschrieben zeigt der pH-Wert einen großen Einfluss auf die Verteilung der Phospholipase während der Extraktion. Bei einem pH-Wert von 9,5 ist hier der Verteilungskoeffizient am höchsten. Dies gilt ebenfalls für die Flotation, jedoch liegt der Verteilungskoeffizient hier für einen pH-Wert von 7 unter Berücksichtigung der Fehlerbalken in einem ähnlichen Bereich. Bei einem pH-Wert von 9,5 verstärken die dreiwertigen Citrationen die aussalzende Wirkung der Unterphase und die Affinität der Phospholipase zur PEG-reichen Oberphase. Daraus resultiert der höchste Verteilungskoeffizient bei der Extraktion im untersuchten pH-Bereich. Durch die Nähe zu dem zweiten isoelektrischen Punkt der Phospholipase findet eine erfolgreiche Anlagerung an die Gasblasen statt und die Flotation ist beschleunigt. Die Wahl des pH-Wertes von 9,5 ist daher für die Aufkonzentrierung der Phospholipase durch die ATPF zu bevorzugen.

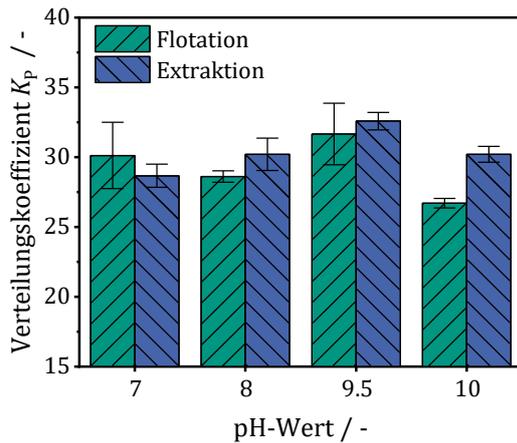


Abbildung 4-9: Verteilungskoeffizienten der Phospholipase bei der Extraktion und der Flotation in Abhängigkeit des pH-Werts für ein PEG 1000-Citrat-System der Konodenlänge 45 % mit Volumenverhältnis 0,1.

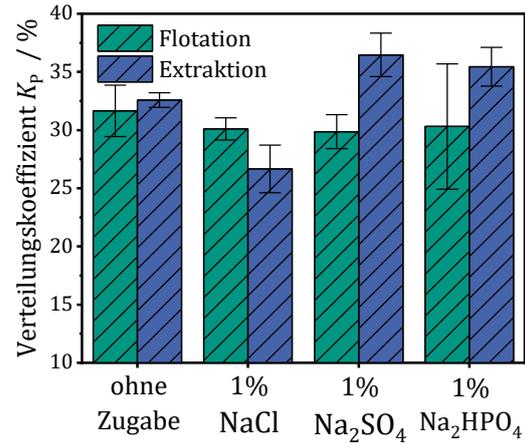


Abbildung 4-10: Verteilungskoeffizienten der Phospholipase bei der Extraktion und der Flotation bei einem pH-Wert von 9,5 und der Anwesenheit additiver für ein PEG 1000-Citrat-System der Konodenlänge 45 % mit Volumenverhältnis 0,1.

Inwiefern die Anwesenheit von additiven Salzen die Flotation beeinflusst, zeigt sich im Vergleich zu den Extraktionsergebnissen. In Abbildung 4-10 sind die Verteilungskoeffizienten der Flotation und Extraktion bei einem pH-Wert von 9,5 bei der Zugabe verschiedener additiver Salze dargestellt. Während bei der Extraktion ein klar positiver Effekt durch Sulfat- und Phosphationen zu beobachten ist und die Anwesenheit von Natriumchlorid den Verteilungskoeffizienten stark reduziert, weichen die bei der Flotation gemessenen Werte weniger stark voneinander ab. Im Mittel beträgt der Verteilungskoeffizient für die verschiedenen Flotationsversuche bei Zugabe von Salzen $30,1 (\pm 2,6)$ und liegt damit leicht unterhalb des Wertes von $31,7 (\pm 2,2)$ der ohne Zugabe resultiert. Die positive Wirkung von Sulfat- und Phosphationen tritt bei der Flotation nicht auf, jedoch scheint der negative Effekt von Natriumchlorid abgeschwächt. Hier ist der Verteilungskoeffizient bei der Flotation um 12,7 % höher als bei der Extraktion.

Bei der Extraktion erfolgt der Stoffübergang der Phospholipase von der Unter- in die Oberphase aufgrund von Diffusion und es stellt sich das thermodynamische Gleichgewicht der Phospholipasekonzentrationen zwischen den beiden Phasen ein. Dieses wird stark durch aus- oder einsalzende Wirkungen von additiven Salzen beeinflusst. Bei der Flotation erfolgt der Massentransfer aufgrund von Diffusion und durch aufsteigende Gasblasen [8]. Die geringe Auswirkung additiver Salze auf die Verteilung der Phospholipase zwischen der Ober- und Unterphase lässt darauf schließen, dass die Flotation die Diffusion dabei dominiert.

Zwar kann die Flotation durch die Zugabe von weiteren Salzen nicht begünstigt werden, jedoch verspricht die Anwesenheit von in der Biosuspension enthaltenen Mediensalzen die Aufkonzentrierung der Phospholipase nicht zu reduzieren. Insgesamt erscheint die Flotation im wässrigen Zweiphasen-System damit robuster im Vergleich zur Extraktion, was insbesondere bei schwankenden Zusammensetzungen der Biosuspension von Vorteil ist.

4.2.2 Einfluss von Medienbestandteilen

Für die Aufreinigung von Enzymen aus komplexen Biosuspensionen spielt neben der Zusammensetzung des wässrigen Zweiphasen-Systems die nach der Fermentation noch in der Fermentationsbrühe enthaltenen Medienbestandteile und Mikroorganismen eine Rolle. Ziel ist möglichst nur das Zielenzym in die Oberphase zu flotieren, um neben einer hohen Aufkonzentrierung auch eine Trennung von den anderen Bestandteilen der Biosuspension zu erzielen. Um deren Einfluss auf den Trenngrad der Phospholipase zu bestimmen, erfolgen Flotationsversuche mit der Zugabe von verschiedenen Medienbestandteilen zur Modellsuspension (siehe Abschnitt 3.1.3), welche ausschließlich Phospholipase enthält.

In Abbildung 4-11 sind die Trenngrade der Phospholipase für verschiedene Flotationen, bei welchen der Modellsuspension verschiedene Fermentationsmedien zugesetzt sind, mit dem Trenngradverlauf für die reine Modellsuspension (grüne Kreise) verglichen. Der Trenngrad der nicht verunreinigten Phospholipase steigt bei der Flotation der Modellsuspension im Vergleich am schnellsten an und knickt nach 20 min bei einem Wert von $60,1 (\pm 1,6) \%$ ab, bevor er sich anschließend langsam dem Endwert von $68,7 (\pm 2,4) \%$ nach 90 min annähert. Für die Flotation bei Zusatz des Komplexmediums steigt der Trenngrad der Phospholipase im Vergleich am langsamsten an und beträgt nach 20 min $33,3 (\pm 4,8) \%$ und ist nach 90 min mit $36,6 (\pm 2,7) \%$ maximal. Auch das Minimalmedium führt zu einer deutlichen Reduzierung des Trenngrades mit $38,3 (\pm 5,6) \%$ nach 20 min und $60,2 (\pm 3,9) \%$ nach 90 min. Ist lediglich ein Restmedium der Modellsuspension zugesetzt, reduziert sich der Trenngrad vergleichsweise gering. Nach 20 min ist ein Trenngrad von $52,8 (\pm 5,2) \%$ und nach 90 min von $64,6 (\pm 6,5) \%$ erreicht.

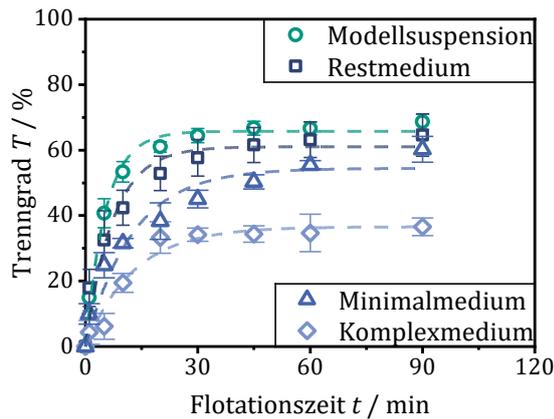


Abbildung 4-11: Einfluss verschiedener Medien auf den Trenngrad der Phospholipase bei der Flotation im PEG 1000-Citrat-System bei der Konodenlänge von 45 % und einem Volumenverhältnis von 0,1.

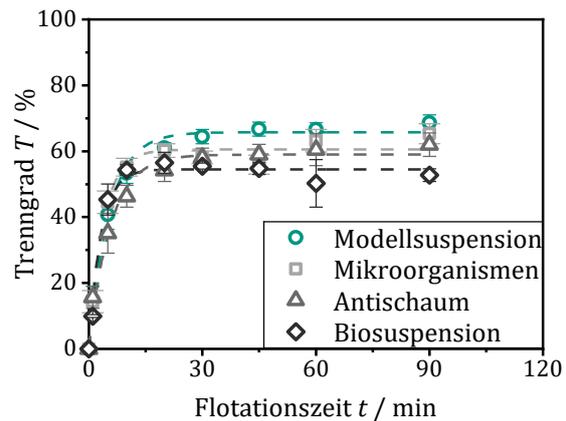


Abbildung 4-12: Einfluss komplexer Biosuspensionen auf den Trenngrad der Phospholipase bei der Flotation im PEG 1000-Citrat-System bei der Konodenlänge von 45 % und einem Volumenverhältnis von 0,1.

Die auf hydrophoben Wechselwirkungen begründete Anlagerung von Stoffen an die Blasenoberfläche findet nicht nur zwischen der Phospholipase und den Gasblasen, sondern auch zwischen anderen langkettigen Kohlenwasserstoffverbindungen in der Unterphase und den Blasenoberflächen statt. Lagern sich die Peptide und Aminosäuren des im Komplexmedium enthaltenen Peptons an die Gasblasen an, belegen sie freien Platz, an welchem sich sonst die Phospholipase anlagern könnte. Dadurch flотиert weniger Phospholipase pro Zeit, was in dem langsameren Anstieg des Trenngrades resultiert. Der um über 30 %-Punkte reduzierte Trenngrad am Ende der Flotation begründet sich in der Konkurrenz, um das freie Volumen in der Oberphase zwischen der Phospholipase und den flотierten Peptiden und Aminosäuren.

Das Minimalmedium enthält neben den beiden Salzen Natriumchlorid und Kaliumhydrogenphosphat auch Glucose als Kohlenstoffquelle. Das kurzkettige Zuckermolekül ist in Wasser gut löslich (über 500 g/L bei 25 °C [118]) und bildet im Schnitt 10,6 Wasserstoffbrücken zu den umgebenden Wassermolekülen aus [119]. Dieses hydrophile Verhalten führt dazu, dass Glucose sich in wässrigen Zweiphasen-System aus PEG und Citrat zu einem Großteil in der Unterphase anreichert [120] und lässt eine Interaktion mit den hydrophoben Gasblasen unwahrscheinlich erscheinen. Der langsamere Anstieg des Phospholipase-Trenngrades bei zugesetztem Minimalmedium ist deshalb nicht auf eine Konkurrenz auf freie Stellen auf der Blasenoberfläche zurückzuführen. Vielmehr scheint es wahrscheinlich, dass die Glucose auch Wasserstoffbindungen zur Phospholi-

pase ausgebildet, welche die hydrophoben Wechselwirkungen dieser zu den Blasenoberflächen reduzieren. Trotzdem findet eine Flotation der Phospholipase statt. Der Trenngrad nach 90 min liegt jedoch um ca. 8 % unterhalb der Referenz der Modellsuspension. Ursache hierfür ist vermutlich die zusätzliche Anwesenheit von Natriumchlorid, dessen hemmende Wirkung auf die Aufkonzentrierung der Phospholipase in der Oberphase bereits in Abschnitt 4.2.1 beschrieben ist.

Bei Zugabe des Restmediums zur Modellsuspension beträgt die Konzentration der Glucose und additiven Salze 10 % im Vergleich zur Zugabe des Minimalmediums. Dies hat eine deutliche Abschwächung der zuvor beschriebenen Effekte zur Folge, sodass der Trenngrad der Phospholipase während der Flotation schnell ansteigt und nach 90 min lediglich um ca. 4 % niedriger als die Referenz ohne Medienzugabe ist.

Komplexe Kohlenstoffquellen wie die im Komplexmedium enthaltenen Peptide und Aminosäuren reduzieren die Flotationsgeschwindigkeit und die Aufkonzentrierung der Phospholipase während der wässrigen Zweiphasen-Flotation. Auch einfache Zucker wie Glucose hemmen die Aufreinigung, sofern diese in hoher Konzentration vorhanden sind. Für eine erfolgreiche Abtrennung der Phospholipase aus einer Fermentationsbrühe ist es daher wichtig, dass die Kohlenstoffquellen am Ende der Fermentation durch die Mikroorganismen möglichst aufgebraucht sind. Dies steigert nicht nur die Effizienz des Fermentationsprozesses, sondern auch der nachfolgenden Aufreinigung der Enzyme im wässrigen Zweiphasen-System.

Bei der Gewinnung von Enzymen durch technische Enzyme liegt das Zielenzym in einer komplexen Biosuspension vor. Neben den Mikroorganismen sind auch Medienbestandteilen, die während des mikrobiellen Wachstums und der Enzymexpression nicht vollständig verbraucht wurden, Teil der Fermentationsbrühe. Da die Begasung von aeroben Organismen oft zu Schaumbildung führt, kann der Zusatz von Antischaummittel, meist auf Basis von Silikonverbindungen, unabdingbar sein, um ein Verstopfen der Peripherie des Bioreaktors zu vermeiden [2]. Um den Einfluss dieser möglichen Bestandteile von Fermentationsbrühen auf die wässrige Zweiphasen-Flotation zu untersuchen wird die Komplexität der Modellsuspension systematisch erhöht.

Der Verlauf des Trenngrads der Phospholipase bei Anwesenheit von Mikroorganismen, Antischaummittel, sowie innerhalb einer komplexen Biosuspension bestehend aus den beiden zuvor genannten Kontaminaten kombiniert mit einem 10 %-igen Komplexmedium sind in

Abbildung 4-11 über die Flotationszeit dargestellt. Im Vergleich zur Flotation der Modellsuspension die nur Phospholipase enthält, steigen die Trenngrade der Phospholipase bei Zusatz der verschiedenen Kontaminaten ähnlich schnell an. Nach 20 min Flotationszeit beträgt die maximale Differenz 4,5 %-Punkte zur Flotation mit zugesetztem Antischaummittel. Am Ende der Flotation ist der geringste Trenngrad von 52,8 ($\pm 1,9$) % bei der Flotation mit der Biosuspension zu verzeichnen, der damit 15,9 %-Punkte niedriger ist als bei der Flotation mit der Modellsuspension. Antischaummittel führt insgesamt zu einer geringeren Reduktion des Trenngrades um 6,7 %-Punkte nach 90 min. Bei der Flotation in Anwesenheit von Mikroorganismen ist der finale Trenngrad um 3,4 %-Punkte reduziert, jedoch überlappen sich die Fehlerbereiche mit den Versuchen der Modellsuspension.

Das Antischaummittel auf Silikonbasis ist amphiphil und lagert sich an den Grenzflächen zwischen hydrophoben Gasen und wässrigen Flüssigkeiten an. Daher ist es wahrscheinlich, dass das Antischaummittel sich an die Gasblasen anlagert und ebenfalls in die Oberphase flотиert wird. Die Antischaummoleküle treten mit der Phospholipase in Konkurrenz, um freie Stellen an der Blasenoberfläche, was zu dem etwas langsameren Anstieg im Trenngradverlauf führt. Dies ist bei der Flotation in Anwesenheit von Mikroorganismen nicht zu beobachten. Es ist also davon auszugehen, dass die Mikroorganismen sich nicht an die Blasen anlagern und in die Oberphase flотиert werden. Während den Versuchen konnte außerdem keine Trübung aufgrund von Mikroorganismenzellen in der Oberphase beobachtet werden, was die Vermutung stützt, dass diese in der Unterphase verbleiben. Da weder die Mikroorganismen, noch das Antischaummittel zu einer signifikanten Reduktion des finalen Trenngrades der Phospholipase führen, kann der deutliche Unterschied bei der Flotation mit der Biosuspension auf das darin enthaltende, 10 %-ige Komplexmedium zurückgeführt werden. Der bereits zuvor beschriebene negative Effekt der Peptide und Aminosäuren des Komplexmediums auf den Trenngrad (Vergleich Abbildung 4-11) ist auch bei der geringeren Konzentration zu beobachten, jedoch in geringerem Maße.

Die stufenweise Erhöhung der Komplexität der Modellsuspension zeigt den Einfluss verschiedener möglicher Bestandteile von Fermentationsbrühen. Mikroorganismen, welche nicht zur Flotation neigen, stören die Abtrennung der Phospholipase nicht. Auch die Anwesenheit von oft benötigtem Antischaummittel reduziert den Trenngrad der Phospholipase nur gering. Hier zeigt die wässrige Zweiphasen-Flotation deutliche Vorteile gegenüber herkömmlichen Flotationsverfahren. Bei diesen ist die Ausbildung eines produktkonzentrierenden Schaumes elementar, was

jedoch durch Antischaummittel verhindert wird. Ist Antischaummittelzugabe während des Fermentationsprozesses notwendig, ist die Schaumfraktionierung von Proteinen aus Fermentationsbrühen meist nicht möglich, oder bedarf den Zusatz von Schäumern nach der Fermentation [121]. Makromolekulare Kohlenwasserstoffverbindungen wie Aminosäuren und Peptide haben negative Auswirkungen auf den Trenngrad während der wässrigen Zweiphasen-Flotation. Daher sollte der Fermentationsprozess so ausgelegt sein, dass diese Medienbestandteile am Ende der Fermentation möglichst aufgebraucht sind und nur noch in geringer Konzentration vorliegen.

4.2.3 Einfluss der Gasart auf die Enzymaktivität

Technische Enzyme sind Biokatalysatoren, die chemische oder biologische Stoffe abbauen oder deren Eigenschaften in industriellen Prozessen, Lebensmitteln oder Kosmetika verändern können. Die Enzymaktivität beschreibt wieviel Substrat pro Zeit umgesetzt oder Produkt gebildet wird und ist damit ein Maß für die katalytische Fähigkeit von Enzymen. Eine Schädigung der Enzyme während der Herstellung und Aufbereitung dieser ist zu verhindern, um eine verminderte Qualität der gewonnenen Enzyme zu vermeiden. Der in der Luft enthaltene Sauerstoff kann dazu führen, dass Aminosäuren von Enzymen oxidiert werden und dadurch die Enzymaktivität herabgesetzt wird.

In Abbildung 4-13 sind die Phospholipaseaktivitäten in der Unter- bzw. Oberphase während der Flotation mit Luft über die Flotationszeit aufgetragen. Die Aktivität in der Oberphase steigt zu Beginn der Flotation stark an und beträgt nach 45 min den Höchstwert von $14,5 (\pm 0,6) \mu\text{mol}/\text{min}$. Analog nimmt die Aktivität der Phospholipase in der Unterphase von anfänglich $3,3 (\pm 1,1) \mu\text{mol}/\text{min}$ auf $0,72 (\pm 0,20) \mu\text{mol}/\text{min}$ ab. Im folgenden Verlauf nimmt die Aktivität in der Unterphase kontinuierlich ab und beträgt nach 120 min Flotationszeit $0,20 (\pm 0,20) \mu\text{mol}/\text{min}$. Nach Minute 45 steigt die Aktivität in der Oberphase jedoch nicht weiter an, sondern nimmt ebenfalls ab, bis sie den Wert von $11,9 (\pm 1,2) \mu\text{mol}/\text{min}$ nach 120 min Flotationszeit erreicht.

Der Aktivitätsverlauf in der Unterphase entspricht den bisherigen Erkenntnissen zum Stoffübergang während der wässrigen Zweiphasen-Flotation. Der steile Anstieg des Abscheidegrades der Phospholipase (Vergleich Abbildung 4-7) impliziert eine schnelle Konzentrationsabnahme in der Unterphase und erklärt die hier beobachteten großen Änderungen der Enzymaktivität während den ersten 45 min. Im weiteren Verlauf nähert sich der Abscheidegrad seinem Gleichgewichtswert an, und es ist nur eine geringe Aktivitätsänderung in der Unterphase zu sehen.

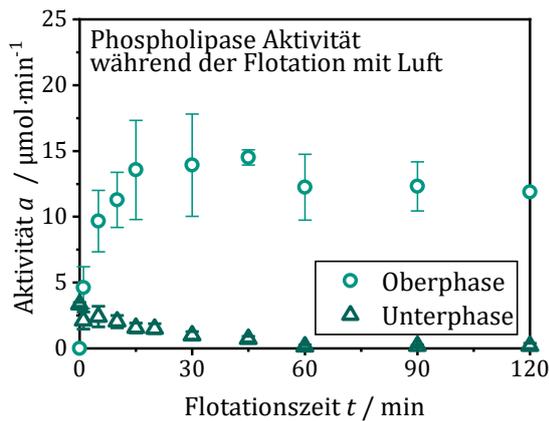


Abbildung 4-13: Aktivität der Phospholipase in der Unterphase und Oberphase während der wässrigen Zweiphasen-Flotation bei der Begasung mit Luft.

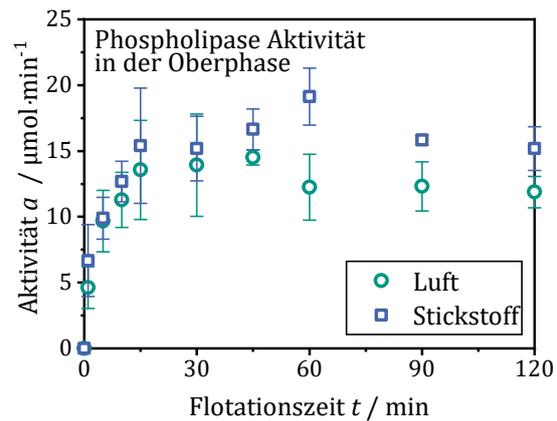


Abbildung 4-14: Aktivität der Phospholipase in der Oberphase während der wässrigen Zweiphasen-Flotation bei der Begasung mit Luft und Stickstoff.

Die Aktivität in der Oberphase nimmt nach zunächst steilem Anstieg zu Beginn jedoch nicht wie zu erwarten auch nach Minute 45 weiter zu, sondern leicht ab und beträgt nach 120 min nur noch ca. 82 % des maximalen Wertes. Der Rückgang der Phospholipaseaktivität mit zunehmender Flotationszeit lässt eine Schädigung der Enzyme durch den in der Luft enthaltenen Sauerstoff vermuten.

Flotationsversuche mit Stickstoff dienen der Überprüfung des möglicherweise schädlichen Einflusses von Luftsauerstoff auf die Phospholipaseaktivität. In Abbildung 4-14 sind die Aktivitäten in der Oberphase bei der Begasung mit Luft bzw. Stickstoff im Vergleich dargestellt. Bis zu einer Flotationszeit von 45 min ist kein signifikanter Unterschied der ermittelten Aktivitäten für die verschiedenen Gase festzustellen. Die zuvor beschriebene anschließende Abnahme der Aktivität bei der Flotation mit Luft ist bei der Verwendung von Stickstoff in diesem Maße nicht zu beobachten. Die Aktivität der Phospholipase beträgt nach 45 min $16,6 (\pm 1,5) \mu\text{mol}/\text{min}$ und nach 120 min $15,2 (\pm 1,7) \mu\text{mol}/\text{min}$.

Die Verwendung von Stickstoff statt Luft für die Begasung während der wässrigen Zweiphasen-Flotation verhindert eine Aktivitätsabnahme der Phospholipase in der Oberphase bei längerer Flotationszeit. Dies bestätigt die zuvor aufgestellte Vermutung, dass der Luftsauerstoff die Phospholipase schädigt und so zu einer Aktivitätsabnahme führt. Jedoch scheint der negative Einfluss nicht sehr stark zu sein, sodass der Effekt erst nach 45 min sichtbar ist.

Die Wirkung des Gases auf die Enzymaktivität ist bei der wässrigen Zweiphasen-Flotation von Enzymen zu beachten. Der in der Luft enthaltene Sauerstoff kann eine Abnahme der Enzymaktivität und damit der Qualität des Enzymproduktes zur Folge haben. Im Falle der Phospholipase kann ein negativer Einfluss bei der Begasung mit Luft verhindert werden, indem eine kurze Flotationszeit gewählt wird. Ist trotzdem ein hoher Abscheidegrad gewährleistet, spart die Begasung mit Luft aus der Umgebung statt gekauftem oder erzeugtem Stickstoff Kosten ein.

4.3 Schlussfolgerungen

Die wässrige Zweiphasen-Flotation ermöglicht es technische Enzyme direkt aus einer Fermentationsbrühe aufzureinigen. Die Grundlage für einen effizienten Prozess sind geeignete phasenbildenden Komponenten die das wässrige Zweiphasen-System ausbilden. Durch einfache Extraktionsversuche können diese und andere Schlüsselparameter wie die Temperatur, der pH-Wert, die Konodenlänge und das Volumenverhältnis, sowie der Einfluss von Medienbestandteilen und des Flotationsgases charakterisiert werden. Dadurch kann mit geringem experimentellem Aufwand ein Zweiphasen-System definiert werden, dass sich für die Abtrennung des Zielenzym aus großen Mengen an Fermentationsbrühe und Aufkonzentrierung in einem geringen Oberphasenvolumen eignet.

Mit Blick auf die großen Mengen an phasenbildenden Komponenten die für die Ausbildung des wässrigen Zweiphasen-Systems notwendig sind, empfiehlt sich das kostengünstige Polymer PEG als Hauptbestandteil der Oberphase. Zusammen mit verschiedenen Salzen kann PEG ein Zweiphasen-System ausbilden und ist zudem in verschiedenen Molekulargewichten erhältlich. Die Wahl eines biologisch abbaubaren Salzes, wie z. B. das kostengünstige Citrat, bedingt kein aufwendiges Recyceln der volumetrisch großen Unterphase.

Die Extraktionsversuche der Phospholipase zeigen, dass mit einem PEG 1000-Citrat-System bei einer Konodenlänge von 45 % und einem Volumenverhältnis von 0,1 hohe Abscheidegrad möglich sind. Sowohl bei der Extraktion als auch bei der Flotation ist der pH-Wert besonders wichtig für den Trennerfolg. Bei einem pH-Wert von 9,5 zeigt die Phospholipase sowohl eine hohe Affinität zur Oberphase, als auch eine hohe Flotationsratenkonstante, was zu einem hohen Abscheidegrad (70,2 (\pm 1,5) %) und einem schnellen Stoffübergang führt.

Die Temperatur zeigt einen geringen Einfluss auf den Abscheidegrad der Phospholipase, sofern diese zwischen 15 °C – 30 °C liegt. Die Anwesenheit additiver Salze beeinflusst die Extraktion stärker als die Flotation, sodass Mediensalze die Aufreinigung der Phospholipase aus Fermentationsbrühen durch die wässrige Zweiphasen-Flotation nicht maßgeblich stören.

Eine hohe Konzentration an langkettigen Kohlenwasserstoffverbindungen wie Peptide und Aminosäuren treten in Konkurrenz mit der Phospholipase bei der Anlagerung an die Blasenoberfläche. Dadurch kann sowohl die Flotationsgeschwindigkeit, als auch der maximale Abscheidegrad bei hohen Konzentrationen reduziert sein. Liegt jedoch nach der Fermentation nur noch eine Restkonzentration (unter 10 %) der Fermentationsmedien vor, ist nur eine geringe Beeinträchtigung zu erwarten. Gleiches gilt für die Anwesenheit von Antischaummittel und Mikroorganismen, sodass eine direkte Abtrennung und Aufkonzentrierung der Phospholipase aus komplexen Biosuspensionen möglich ist.

Eine möglichst geringe Flotationszeit (maximal 45 min) bei der Begasung mit Luft vermeidet eine mit einem Aktivitätsverlust einhergehende Schädigung der Phospholipase. Sind längere Verweilzeiten erforderlich, verhindert der Einsatz von Stickstoff als Flotationsgas eine Aktivitätsabnahme.

Kapitel 5

Implementierung des Gasblaseneintrags²

5.1 Gaseintrag in ein wässriges Zweiphasen-System

Das wässrige Zweiphasen-System stellt besondere Herausforderungen an den Gaseintrag während der Flotation. Viele der bei traditionellen Flotationsprozessen etablierten Techniken zur Erzeugung von Gasblasen in einer Flüssigkeit sind bei der wässrigen Zweiphasen-Flotation nicht möglich. Die Druckentspannungsflotation beispielsweise beruht auf der höheren Löslichkeit von Gasen bei hohem Druck und der Freisetzung dieser nach Dekompression. Jedoch verringern gelöste Salze die Gaslöslichkeit einer Flüssigkeit drastisch. In Meerwasser mit einer totalen Salzkonzentration von 3,5 % (w/w) lässt sich im Vergleich zu Süßwasser bereits ca. 20 % weniger Sauerstoff lösen bei einem Druck von 1 atm [86]. Die Druckentspannungsflotation kommt daher für den Gasblaseneintrag in der Unterphase mit einer Salzkonzentration von über 25 % (w/w) nicht in Frage.

Ein Gaseintrag über Impeller wie bei mechanischen Flotationszellen ist bei der ATPF nicht möglich, da der hohe Turbulenzeintrag die Unter- und Oberphase vollständig verwirbeln würde. In pneumatischen Flotationszellen wird über eine Zweistoff-Düse Gas angesaugt und in einer Flüssigkeit dispergiert. Dies setzt hohe Strömungsgeschwindigkeiten voraus, die sich negativ auf scherempfindliche Mikroorganismen auswirken. Ein daraus resultierender Zellaufschluss setzt die Zellbestandteile in die Unterphase frei, was zu einer erhöhten Konzentration an Aminosäuren und Peptiden führt. Deren nachteiliger Einfluss auf die Abtrennung und Aufkonzentrierung von Enzymen durch die wässrige Zweiphasen-Flotation ist in 4.2.2 beschrieben.

² Teilinhalte dieses Abschnitts wurden in *Chemical Engineering Science* veröffentlicht und angepasst [83]. Jakob, L.; Singer, J.; Nirschl, H. Importance of Gas Input in Aqueous Two-Phase Flotation (ATPF). *Chem. Eng. Sci.* **2021**, *233*, 116391, doi:10.1016/j.ces.2020.116391.

Für den Gaseintrag während der wässrigen Zweiphasen-Flotation ist die Begasung mit Spargern oder Fritten, bei welchen die Gasblasen direkt in der Unterphase an der Oberfläche der porösen Medien entstehen, am geeignetsten [8]. Um einen adäquaten Gasblaseneintrag zu erzielen, können unterschiedliche poröse Medien zum Einsatz kommen. Wie sich diese, sowie die Salzkonzentration in der Unterphase und der Gasvolumenstrom auf die Blasengrößenverteilung auswirken, ist in den folgenden Unterkapiteln beschrieben.

5.1.1 Erzeugen von Gasblasen mit porösen Medien

Poröse Medien weisen je nach Art verschiedene Oberflächeneigenschaften und –Geometrien auf. Diese führen bei gleicher nomineller Porengröße zu unterschiedlichen Blasengrößenverteilungen. Der Gasblaseneintrag in das PEG 1000-Citrat-System ist für drei verschiedene Begasungsmedien mit einer Porengröße von 10 μm untersucht: ein Metallgewebe mit komplexer, dreidimensionaler Körperbindung, ein Lochsieb mit definierten kreisförmigen Löchern, sowie eine gesinterte Glasmembran mit rauer Oberfläche (siehe Abbildung 3-1).

In Abbildung 5-1 sind die anzahlbezogenen Summen- (Q_0) und Dichteverteilungen (q_0) der in der Unterphase entstehenden Gasblasen bei der Begasung mit 10 ccm Luft gezeigt. Die charakteristischen Blasendurchmesser sind in Tabelle 5.1 aufgelistet. Die im Vergleich größten Blasen resultieren bei der Begasung mit dem Metallgewebe. Hier beträgt der Sauterdurchmesser ($d_{3,2}$) 685 μm . Mittlere Blasen werden bei der Begasung mit dem Lochsieb ($d_{3,2} = 381 \mu\text{m}$) und vergleichsweise kleine Blasen bei der Begasung mit der Glasmembran ($d_{3,2} = 309 \mu\text{m}$) in die Unterphase eingebracht. Darüber hinaus ist die Blasengrößenverteilung bei der Begasung mit dem Metallgewebe vergleichsweise breit, 80 % der Blasen weisen einen Durchmesser zwischen 373 μm und 795 μm auf. Bei der Begasung mit dem Lochsieb liegt diese Spanne zwischen 157 μm – 424 μm und für die Glasmembran zwischen 125 μm – 304 μm .

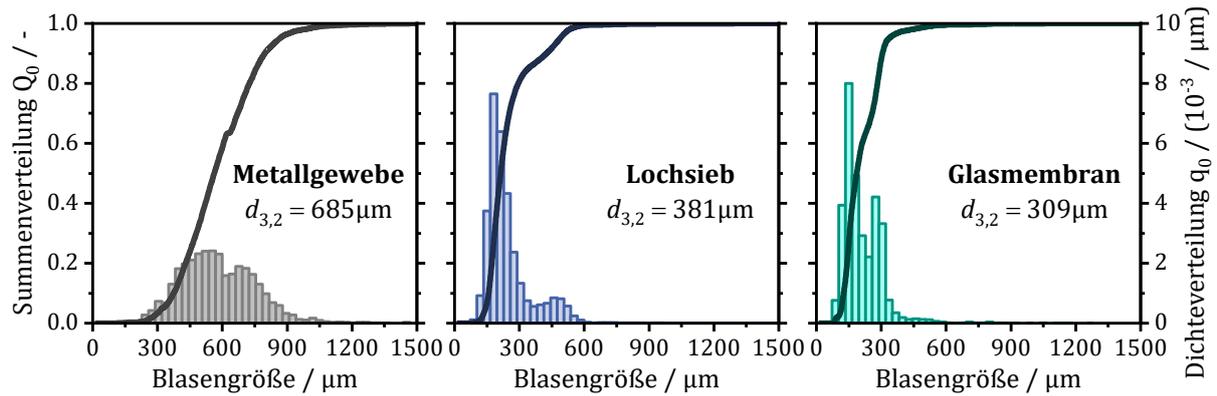


Abbildung 5-1: Blasengrößenverteilungen der Gasblasen erzeugt durch ein Metallgewebe (links), Lochsieb (Mitte) und eine Glasmembran (rechts) bei der Begasung mit 10 ccm Luft in das PEG 1000-Citrat-System.

Tabelle 5.1: Charakteristische Durchmesser der Gasblasen für die Begasung mit verschiedenen porösen Medien mit 10 ccm Luft in der Unterphase des PEG 1000-Citrat-Systems.

Poröses Medium	$d_{10,0}$ in μm	$d_{50,0}$ in μm	$d_{90,0}$ in μm	$d_{3,2}$ in μm
Metallgewebe	373	561	795	685
Lochsieb	157	212	424	381
Glasmembran	125	186	304	309

In Anbetracht der Tatsache, dass alle drei porösen Medien die gleiche nominelle Porengröße von etwa $10 \mu\text{m}$ haben, sind nach Gleichung (2.18) ähnliche Blasengrößenverteilungen zu erwarten, da die stofflichen Einflussfaktoren unverändert bleiben. Betrachtet man jedoch die Blasenbildung an der Oberfläche einer Pore, so ist zu beobachten, dass diese an der äußeren Porengeometrie anwachsen. Diese zeigt nur bei den definierten Löchern des Lochsiebs eine kreisrunde Form, deren Durchmesser der nominellen Porengröße entspricht. Während die Glasmembran aufgrund des Sinterprozesses eine undefinierte Porenstruktur aufweist, erscheint die äußere Oberfläche des Metallgewebes mit kontinuierlicher Porenstruktur, aber größeren Abständen zwischen den einzelnen Drähten als die nominelle Porengröße in der Mitte des Gewebes (siehe Abbildung 3-1), was die größeren Gasblasen erklärt.

Die Blasengrößenanalysen legen nahe, dass die resultierende Blasengröße nicht auf die nominale Porengröße des porösen Mediums zurückgeführt werden kann, wenn diese nicht mit der äußeren Porenstruktur übereinstimmt. Trotzdem ist es möglich durch Testen verschiedener poröser

Medien ein geeignetes Begasungsmedium für Begasung im wässrigen Zweiphasen-System auszuwählen, welches einen hohen Anteil an Gasblasen im bevorzugten Blasengrößenfenster entspricht (siehe Abschnitt 5.2.1).

5.1.2 Einfluss der Salzkonzentration und der Begasungsrate auf die Blasengröße

Neben dem Begasungsmedium beeinflusst die umgebende Flüssigkeit die Bildung von Gasblasen. Da in der Unterphase eine hohe Salzkonzentration herrscht, ist es wichtig den Einfluss der Citratkonzentration auf die Blasengröße zu charakterisieren.

In Abbildung 5-2 sind die resultierenden Sauterdurchmesser bei der Begasung mit 10 ccm Luft in Abhängigkeit der Citratkonzentration für die drei verschiedenen Begasungsmedien aufgetragen. Bei der Begasung mit dem Metallgewebe in reinem Wasser (0 % (w/w) Citrat) entstehen sehr große Gasblasen mit einem Sauterdurchmesser von 1572 μm . Mit steigender Citratkonzentration nehmen die Blasengrößen kontinuierlich ab. Findet die Begasung in der Unterphase statt (rot gefüllter Datenpunkt), beträgt der Sauterdurchmesser ($d_{3,2} = 685 \mu\text{m}$) nur noch 44 % des anfänglichen Werts. Auch bei der Begasung mit dem Lochsieb wird in reinem Wasser der höchste Sauterdurchmesser von 944 μm ermittelt. Gleiches gilt für die Begasung mit der Glasmembran ($d_{3,2} = 722 \mu\text{m}$). Im Unterschied zur Begasung mit dem Metallgewebe führt für die anderen beiden Begasungsmedien schon eine geringe Citratkonzentration von 1 % (w/w) zu einer starken Reduzierung des Sauterdurchmessers auf 398 μm im Falle der Glasmembran und 431 μm bei der Begasung mit dem Lochsieb. Die minimalen Sauterdurchmesser resultieren ebenfalls bei der Begasung in der Unterphase (rote Datenpunkte). Bei der Begasung mit der Glasmembran beträgt der Sauterdurchmesser ($d_{3,2} = 309 \mu\text{m}$) nur noch 43 % und beim Gaseintrag über das Lochsieb ($d_{3,2} = 381 \mu\text{m}$) 40 % im Vergleich zu reinem Wasser.

Mit zunehmender Citratkonzentration erhöht sich die Dichte und die Grenzflächenspannung in der Unterphase eines PEG-Citrat-Systems [78]. Beide Stoffparameter verändern die resultierende Blasengröße [90]. Bezieht man die Werte für Wasser [122] ($\rho_{\text{H}_2\text{O}}^{20^\circ\text{C}} = 1000,8 \text{ kg m}^{-3}$; $\sigma_{\text{H}_2\text{O}}^{20^\circ\text{C}} = 72,74 \text{ mN m}^{-1}$) und die gemessenen Werte für die Unterphase ($\rho_{\text{BOT}}^{20^\circ\text{C}} = 1192 \text{ kg m}^{-3}$; $\sigma_{\text{BOT}}^{20^\circ\text{C}} = 56,64 \text{ mN m}^{-1}$) in Gleichung (2.18) mit ein, so ergibt sich, dass bei sonst unveränderten Parametern, die Blasengröße in der Unterphase 86,8 % der Blasengröße in reinem Wasser entsprechen

müsste. Im Mittel über die drei Begasungsmedien beträgt der Sauterdurchmesser für die Begasung in der Unterphase jedoch lediglich 42 % im Vergleich zu Wasser. Die hauptsächliche Abnahme der Blasengröße ist daher vermutlich auf eine Koaleszenzhemmung in Anwesenheit von Citrat zurückzuführen.

Eine Koaleszenz hemmende Wirkung aufgrund einer Reduktion der Reichweite hydrophober Anziehungskräfte zwischen den Gasblasen ist für zahlreiche Salze wie Natriumchlorid, Ammoniumnitrat und Acetat bekannt [96,97]. Während der Begasung mit dem Lochsieb und der Glasmembran ändert sich ab einer Citratkonzentration von 1 % (w/w) der Sauterdurchmesser nur noch geringfügig. Firouzi, Howes, und Nguyen [94] bezeichnen die Konzentration, ab welcher eine weitere Salzzugabe zu keiner signifikanten Reduktion des Sauterdurchmessers führt, als Übergangs- oder kritische Salzkonzentration. Die kritische Citratkonzentration liegt daher vermutlich im Bereich von 1 % (w/w), was einer molaren Konzentration von 0,05 mol/L entspricht, und nahe an der kritischen Kaliumhydroxidkonzentration von 0,053 mol/L [97] liegt. Die stetige Abnahme des Sauterdurchmessers mit steigender Citratkonzentration während der Begasung mit dem Metallgewebe spricht zunächst gegen die kritische Citratkonzentration von 1 % (w/w). Durch die gewebte Geometrie sind die Poren des Metallgewebes größer als die nominelle Porengröße von 10 µm und größer im Vergleich zu denen der Glasmembran und des Lochsiebs. Dadurch resultiert bei gleichem Luftvolumenstrom (10 ccm) eine geringere Durchströmungsgeschwindigkeit an der Pore. Im Vergleich führen höhere Gasgeschwindigkeiten zu einer Reduktion der kritischen Salzkonzentration [94,95], wodurch eine höhere kritische Citratkonzentration bei der Begasung mit dem Metallgewebe im Vergleich zu den anderen beiden Begasungsmedien zu erwarten ist. Im untersuchten Konzentrationsbereichs des Citrats ist dies jedoch nicht feststellbar.

Die hohe Citratkonzentration in der Unterphase reduziert den Sauterdurchmesser im Schnitt um 58 % bei der Begasung mit den drei verschiedenen porösen Medien. Die Abnahme der Blasengröße ist hauptsächlich auf eine Koaleszenzhemmung des Citrats zurückzuführen. Für die wässrige Zweiphasen-Flotation ist dies von Vorteil, da kleinere Gasblasen einen höheren spezifischen Gasgrenzflächeneintrag (siehe Gleichung (2.32)) gewährleisten. Dadurch sind bei gleicher Begasungsrate mehr Enzyme flotierbar, sofern die Blasengröße über der minimal geforderten Größe für einen Phasendurchtritt in der Oberphase liegt (siehe Abschnitt 5.1.2).

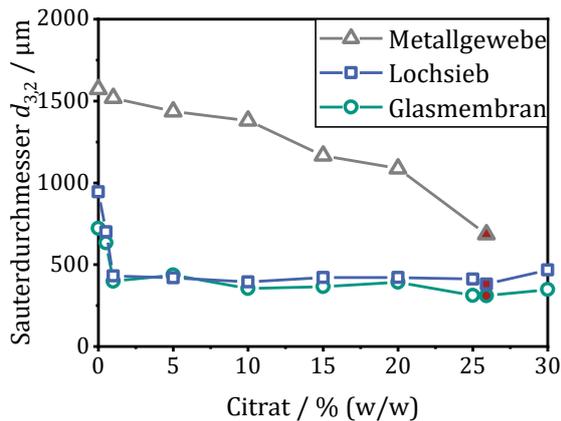


Abbildung 5-2: Sauterdurchmesser der Gasblasen in Abhängigkeit der Citratkonzentration, erzeugt bei der Begasung mit 10 ccm Luft durch verschiedene poröse Medien.

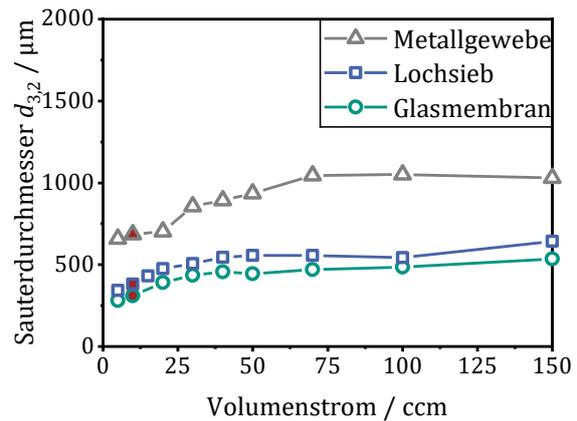


Abbildung 5-3: Sauterdurchmesser der Gasblasen in Abhängigkeit des Luft-Volumenstroms, erzeugt durch verschiedene poröse Medien in der Unterphase.

Neben dem porösen Medium und der Salzkonzentration wird die resultierende Blasengröße auch durch die Begasungsrate beeinflusst. In Abbildung 5-3 sind die Sauterdurchmesser der Gasblasen, die bei der Begasung mit dem Metallgewebe, dem Lochsieb und der Glasmembran in der Unterphase entstehen, in Abhängigkeit des Luftvolumenstroms aufgetragen. Die rot gefüllten Datenpunkte entsprechen denen aus Abbildung 5-1 bei einer Begasung mit 10 ccm Luft in der Unterphase. Die kleinsten Sauterdurchmesser resultieren bei allen drei Begasungsmedien bei dem geringsten eingestellten Volumenstrom von 5 ccm. Dabei beträgt der Sauterdurchmesser für die Glasmembran 281 μm , für das Lochsieb 342 μm und für das Metallgewebe 658 μm . Bei der Begasung mit dem Lochsieb und der Glasmembran ist bis zu einem Luftvolumenstrom von 50 ccm ein stetiger Anstieg des Sauterdurchmessers auf 556 μm bzw. 445 μm zu verzeichnen. Die Höchstwerte resultieren aus einer Begasung mit 150 ccm in den Sauterdurchmessern von 642 μm (Lochsieb) bzw. 536 μm (Glasmembran). Während dem Gaseintrag mit dem Metallgewebe steigt der Sauterdurchmesser ebenfalls mit zunehmenden Volumenstrom stetig an, bis er bei 70 ccm einen Wert von 1045 μm annimmt. Bei 100 ccm erreicht der Sauterdurchmesser hier den geringfügig höheren Maximalwert von 1051 μm .

Eine Erhöhung des Gasvolumenstroms bei der Begasung mit porösen Medien hat zur Folge, dass pro Zeit mehr Gas während des Blasenwachstums in die Gasblase gelangt, bevor diese sich von der Porenoberfläche ablösen können [90,123]. Dieser Zusammenhang scheint jedoch nicht für den gesamten untersuchten Bereich gültig, sodass ab 50 ccm bei der Begasung mit dem Lochsieb

und der Glasmembran bzw. 70 cmm bei der Begasung mit dem Metallgewebe kein signifikantes weiteres Blasenwachstum stattfindet. Bei diesen Volumenströmen sind die Sauterdurchmesser 1,5-mal so groß wie bei einer Begasung mit 10 ccm. Dies kann nicht auf die Unabhängigkeit des Ablösedurchmessers beim Strahlgasen zurückgeführt werden, da für die untersuchten Volumenströme die maximalen Weberzahlen (Gleichung (2.20)) in der Größenordnung 10^{-6} liegen und damit deutlich kleiner als der Grenzwert von 2 sind (siehe Abschnitt 2.3.1).

Die Wahl eines geeigneten Gasvolumenstroms ist entscheidend für die Flotation, da er nicht nur die Blasengröße sondern wie diese ebenfalls den spezifischen Gasgrenzflächeneintrag beeinflusst (siehe Gleichung (2.32)). Eine Steigerung des Volumenstroms von 10 ccm auf 50 ccm bei der Begasung mit dem Lochsieb und der Glasmembran bzw. von 10 ccm auf 70 ccm bei der Begasung mit dem Metallgewebe erhöht den spezifischen Gasgrenzflächeneintrag um den Faktor 5 bzw. 7, während lediglich eine Reduktion um den Faktor 1,5 aufgrund der gesteigerten Sauterdurchmesser resultiert. Damit überwiegt der positive Effekt durch höhere Gasvolumenströme, sofern dadurch das wässrige Zweiphasen-System stabil bleibt (siehe Abschnitt 5.1.2). Durch Erhöhung des Gasvolumenstroms während der wässrigen Zweiphasen-Flotation kann die Flotationsrate und der Abscheidegrad gesteigert werden [7,23,25,26,80], wobei Lee *et al.* [8] den maximal möglichen Volumenstrom für die Begasungen mit Glasfritten von 50 ccm aus den genannten Arbeiten zusammenfasst.

5.2 Auswirkung des Gaseintrags auf die wässrige Zweiphasen-Flotation

Für die Aufkonzentrierung der Enzyme in der Oberphase ist neben der Anlagerung an die Blasenoberfläche der Transport in die Oberphase entscheidend. In diesem Kapitel sind die Auswirkungen des Gaseintrags auf die wässrige Zweiphasen-Flotation beschrieben.

5.2.1 Blasendurchtritt durch die wässrige Zweiphasen-Grenzfläche

Das Durchschreiten sowie die Stabilität der wässrigen Phasengrenzfläche zwischen Unter- und Oberphase ist abhängig von den Stoffeigenschaften des wässrigen Zweiphasen-Systems und der

Blasengröße. In Abbildung 5-4 sind Aufnahmen des Phasendurchtritts der durch die drei verschiedenen Begasungsmedien erzeugten Gasblasen zu unterschiedlichen Zeitpunkten gezeigt. Die roten Linien zeichnen die Phasengrenzflächen zwischen der Unter- und der Oberphase nach. Es ist zu erkennen, dass die großen Blasen, die während der Begasung mit dem Metallgewebe entstehen, die Phasengrenze leicht passieren und als einzelne Blasen in der Oberphase aufsteigen. Nach 5 Sekunden beginnt die Phasengrenze sich zu verformen und nach zehn Sekunden zeigt sich bereits eine deutliche Verschiebung in Richtung der Unterphase. Mit zunehmender Begasungszeit ab 30 Sekunden zeigen sich zusätzlich Schlieren und eine deutliche Trübung der Oberphase. Nach 60 Sekunden ist im abgebildeten Bereich (ca. 2 cm hoch) fast keine Phasengrenze mehr zu erkennen. Die im Vergleich mittelgroßen, durch das Lochsieb eingebrachten Blasen, steigen als Einzelblasen oder zum Teil als Blasenkomplexe in der Oberphase auf. Mit zunehmender Begasungszeit ist ebenfalls eine geringe Verschiebung der Phasengrenzfläche nach unten und nach 60 Sekunden eine geringe Trübung der Oberphase sichtbar. Die mit der Glasmembran erzeugten kleinen Blasen, gelangen hingegen nicht als Einzelblasen, sondern fast ausschließlich als zusammengelagerte Blasenkomplexe durch die Phasengrenzfläche. Es ist außerdem erkennbar, dass sich ein Teil dieser kleinen Blasen unter der Phasengrenze aufstauen. Jedoch ist auch nach 60 Sekunden die Phasengrenze nahezu unverändert und die Oberphase klar.

Kleine Blasen haben aufgrund des geringeren Blasendurchmessers eine geringere Aufstiegs- geschwindigkeit als große Blasen. Bei der Begasung mit der Glasmembran ist die theoretische Auf- stiegsgeschwindigkeit in der Unterphase der Blasen nach Stokes (siehe Gleichung (2.24)) im Mittel kleiner als 4,6 mm/s. Hingegen ist die mittlere Aufstiegs- geschwindigkeit der Blasen er- zeugt durch das Metallgewebe größer als 41,7 mm/s, was zu einem deutlich höheren Impuls der Blasen bei Auftreffen auf die Phasengrenzfläche führt. Dies erklärt die Verformung der Phasen- grenzfläche. Die Trübung der Oberphase lässt außerdem eine Vermischung von Unter- und Ober- phase vermuten. Die Blasen die bei der Begasung mit dem Lochsieb entstehen, steigen mit einer mittleren Geschwindigkeit von 6,0 mm/s auf. Daher ist hier sowohl der bei der Begasung mit dem Metallgewebe beobachtete Stress auf die Phasengrenzfläche, als auch das Ansammeln kleiner Blasen unterhalb der Phasengrenze wie bei der Begasung mit der Glasmembran zu beobachten.

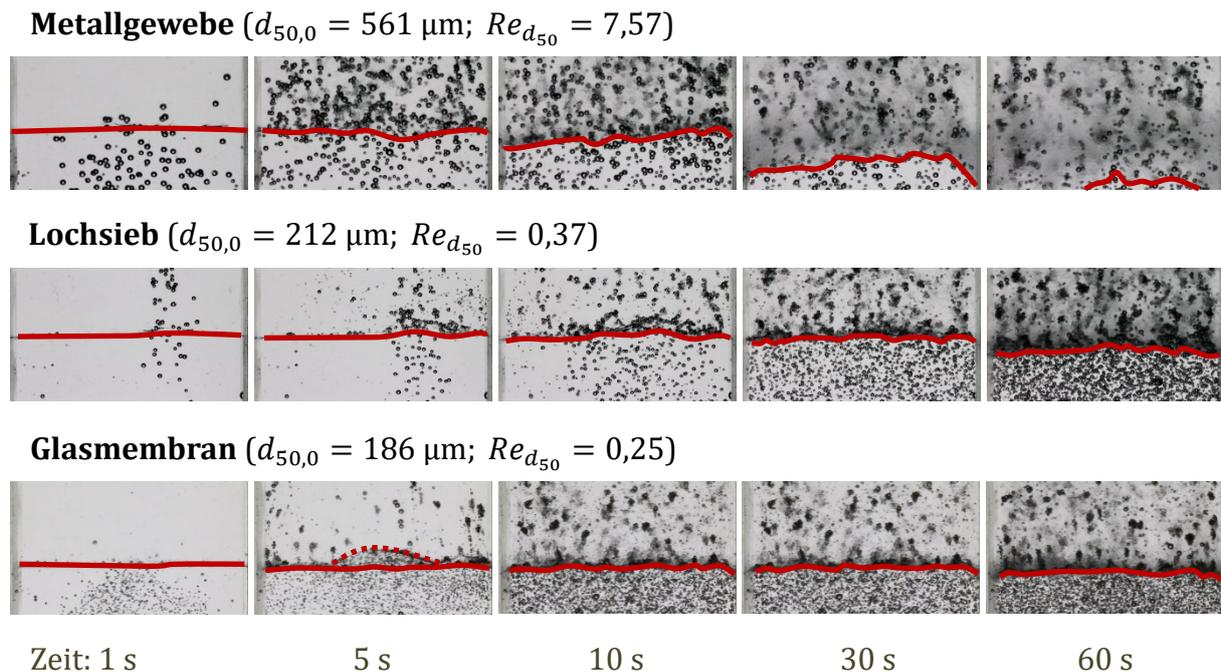


Abbildung 5-4: Bilder der Phasengrenzfläche (hervorgehoben durch rote Linie) zwischen Unter- und Oberphase des PEG 1000-Citrat-Systems bei der Begasung mit verschiedenen porösen Medien und 10 ccm Luft.

Die Blasengrößenverteilung eines durch poröse Medien erzeugten Blasenkollektivs ist entscheidend für den Blasendurchtritt durch die Phasengrenzfläche zwischen Unter- und Oberphase. Die durch zu große Blasen induzierte Phasenvermischung führt zu einer Auflösung der klaren Trennung zwischen Ober- und Unterphase. Im schlimmsten Fall resultiert eine vollständige Vermischung beider Phasen, was eine Aufkonzentrierung von Enzymen in der Oberphase unmöglich macht. Sind die Gasblasen hingegen zu klein, um die Phasengrenzfläche zu passieren, sammeln sie sich in der Unterphase an und tragen nicht zu der Flotation der Enzyme in die Oberphase bei. Eine ideale Blasengrößenverteilung für die wässrige Zweiphasen-Flotation liegt zwischen einem minimalen Blasendurchmesser ($d_{B,\text{min}}$), der für das Durchdringen der Phasengrenze benötigt wird und einem maximalen Blasendurchmesser ($d_{B,\text{max}}$), bei welchem noch keine Phasenverwirbelung stattfindet.

Der folgende Abschnitt diskutiert die Barrierewirkung der wässrigen Phasengrenzfläche für kleinere Blasen. Links in Abbildung 5-5 sind die Kräfte, welche an einer an der Phasengrenzfläche feststeckenden Einzelblase wirken, schematisch dargestellt. Die durch den Dichteunterschied zwischen Gas und Flüssigkeit entstehende Auftriebskraft (F_A) der Blase steht der durch die Grenzflächenspannung zwischen Unter- und Oberphase (σ_{BT}) induzierte Grenzflächenkraft entgegen.

Letztere steigt mit der Länge an der sie wirkt. Da sehr kleine Blasen als nahezu kugelförmig anzunehmen sind [100,124], wirkt die maximale Grenzflächenkraft ($F_{\sigma,\max}$) am längsten Umfang der Blase, also wenn diese jeweils zur Hälfte in der Unter- und Oberphase verweilt. Es folgt Gleichung (5.1) für das Kräftegleichgewicht.

$$F_A = F_{\sigma,\max} \quad (5.1)$$

$$\frac{1}{6} \pi d_{B,\min}^3 \left(\frac{\rho_{\text{TOP}} + \rho_{\text{BOT}}}{2} - \rho_{\text{Gas}} \right) g = \sigma_{\text{BT}} \pi d_{B,\min}$$

Daraus folgt der minimal nötige Blasendurchmesser zur Überwindung der Grenzflächenkraft.

$$d_{B,\min} = \sqrt{\frac{6 \sigma_{\text{BT}}}{\left(\frac{\rho_{\text{TOP}} + \rho_{\text{BOT}}}{2} - \rho_{\text{Gas}} \right) g}} \quad (5.2)$$

Es ist ersichtlich, dass $d_{B,\min}$ proportional zu $\sqrt{\sigma_{\text{BT}}}$ ist. Wu, Zhu und Mei [113] bestimmten für verschiedene PEG 1000-Salz-Systemen Grenzflächenspannungen von 0,018 – 1,2 mN/m. Aus dem logarithmischen Mittel dieses Bereichs ($\sigma_{\text{BT}} = 0,147$ mN/m) und den Dichten der Phasen (siehe Abschnitt 3.3.3) resultiert $d_{B,\min} = 281 \mu\text{m}$.

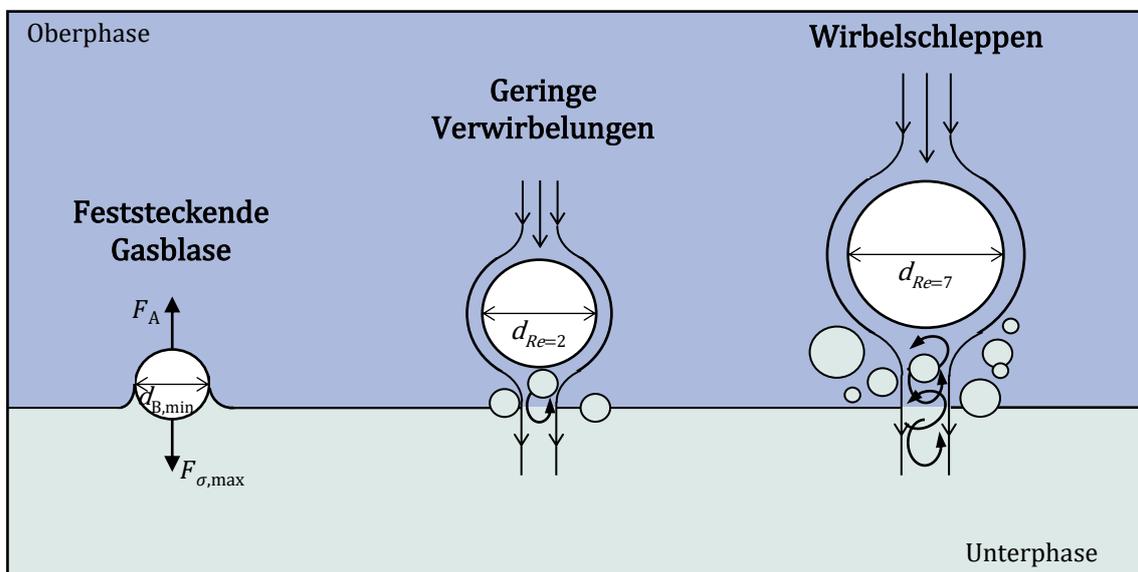


Abbildung 5-5: Schematische Betrachtung des Phasendurchtritts von Gasblasen während der wässrigen Zweiphasen-Flotation: Links eine kleine, feststeckende Gasblase, in der Mitte geringe Verwirbelung durch den Aufstieg mittelgroßer Blasen, rechts starke Verwirbelung aufgrund Wirbelschleppen hinter großen Gasblasen.

Blasen mit einem Durchmesser größer als 281 μm können die durch die Grenzflächenspannung induzierte Barriere zwischen der Ober- und Unterphase des PEG 1000-Citrat-Systems überwinden und in der Oberphase aufsteigen. Kleinere Blasen bleiben in der Phasengrenzfläche stecken, bis sie mit anderen Blasen einen Blasenkomplex bilden, der groß genug ist, um aufzusteigen, oder werden in einer Rückströmung der verdrängten Flüssigkeit in Richtung Boden der Flotationszelle gezogen. Demnach müssen knapp 78 % aller Blasen, die über das Lochsieb und 79 % der Blasen die über die Glasmembran eingetragen werden agglomerieren, um die Phasengrenzfläche zu passieren. Hingegen gelangen 97 % aller Blasen, die bei der Begasung mit dem Metallgewebe entstehen direkt in die Oberphase.

Die durch den Phasendurchtritt großer Blasen beobachtete Trübung der Oberphase (siehe Abbildung 5-4) entsteht, wenn sich Unter- und Oberphase vermischen, ähnlich wie bei der Trübungstitation (beschrieben in Abschnitt 3.3.1). Die Phasenvermischung durch große Blasen begründet sich in der schnellen Umströmung während des Aufstiegs und den dadurch induzierten Verwirbelungen im Nachlauf der Blase. Entscheidend für die Entstehung von Wirbeln hinter den Blasen ist die Aufstiegs geschwindigkeit der Gasblasen. Da größere Blasen zur Verformung neigen, ist die Annahme kugelförmiger Blasen nicht mehr gerechtfertigt. In viskosen Flüssigkeiten kann es bereits ab einer Reynoldszahl von 1 zu Verformungen kommen [101]. Höhere Reynoldszahlen treten bei der Umströmung der Gasblasen in der Unterphase bereits bei einem Blasendurchmesser größer als 296 μm auf. Die Berechnung der Aufstiegs geschwindigkeit nach Stokes (Gleichung (2.24)) wäre für größere Blasen fehlerhaft.

Um die Umströmung größerer Blasen trotzdem zu charakterisieren, lässt sich die Archimedes-Zahl (Ar) heranziehen. Diese bietet den Vorteil, dass keine angenäherte Aufstiegs geschwindigkeit einfließt [98] und lässt sich nach Gleichung (2.25) für den Blasen aufstieg in der Unterphase formulieren.

$$Ar = \frac{d_B^3 g \rho_{BOT} (\rho_{BOT} - \rho_{Gas})}{\eta_{BOT}^2} \quad (5.3)$$

Aus Messungen der realen Aufstiegs geschwindigkeit von Gasblasen in einer Flüssigkeit mit zehnfacher Viskosität von Wasser, konnten Peters und Gaertner [125] die in Gleichung (5.4) gezeigte Korrelation der Archimedeszahl und der Reynoldszahl ableiten.

$$Ar = 12.680 Re + 0.461 Re^2 \quad \text{für } 17 < Ar < 370 \quad (5.4)$$

Aus den Gleichungen (5.3) und (5.4) folgt für die Blasengröße in Abhängigkeit der Reynoldszahl Gleichung (5.5).

$$d_{B,Re} = \sqrt[3]{\frac{(12.680 Re + 0.461 Re^2) \eta_{BOT}^2}{g \rho_{BOT} (\rho_{BOT} - \rho_{Gas})}} \quad (5.5)$$

Die Umströmung von Gasblasen ist nicht nur in der wässrigen Zweiphasen-Flotation, sondern auch in Blasensäulen von Bedeutung und daher gut untersucht. Narayanan *et al.* [102] beobachten das Entstehen kleiner Wirbel hinter aufsteigenden Blasen ab einer Reynoldszahl von 2 und für $Re > 7$ Wirbelschleppen. Ähnliche charakteristische Reynoldszahlen für diese Effekte dokumentieren ebenfalls Haas *et al.* [100]. Für den Aufstieg der Luftblasen in der Unterphase des PEG 1000-Citrat-Systems beträgt demnach die Blasengröße, ab welcher sich Wirbel ausbilden können $d_{B,Re=2} = 340 \mu\text{m}$. Demnach führen 15 % der Blasen des Lochsiebs, und 5 % der Blasen der Glasmembran zu geringen Verwirbelungen (siehe Abbildung 5-5). Analog bestimmt sich die Blasengröße, die zum Auftreten von Wirbelschleppen führt, zu $d_{B,Re=7} = 543 \mu\text{m}$. Bei dem Gaseintrag mit dem Lochsieb und der Glasmembran sind 99 % kleiner als dieser Wert, während sich bei der Begasung mit dem Metallgewebe bei 95 % aller Blasen Wirbel und bei 54 % aller Blasen Wirbelschleppen ausbilden. Insbesondere Wirbelschleppen reisen, wie in Abbildung 5-5 schematisch dargestellt, Unterphase-Tröpfchen bei dem Phasendurchtritt in die Oberphase. Sie sind damit der Grund für die verstärkte Trübung in der Oberphase während des Gaseintrags mit dem Metallgewebe (siehe Abbildung 5-4).

Zusammenfassend lässt sich ein ideales Blasengrößenfenster zwischen $d_{B,\text{min}} = 281 \mu\text{m}$ und $d_{B,\text{max}} = 543 \mu\text{m}$ ermitteln. Bei Betrachtung der Blasengrößenverteilungen die aus der Begasung mit den verschiedenen porösen Medien entstehen, fällt auf, dass lediglich 20 % aller Blasen die von der Glasmembran erzeugt werden in diesem Blasengrößenfenster liegen. Gleiches gilt für 21 % der Blasen bei der Begasung mit dem Lochsieb. Hingegen führt die Begasung mit dem Metallgewebe zu Blasen die zu 43 % in diesem Bereich sind, jedoch ebenfalls zu einer Phasenvermischung aufgrund vieler größerer Blasen.

5.2.2 Einfluss der Blasengrößenverteilung auf die Flotationskinetik

Das Steckenbleiben kleiner Gasblasen in der Phasengrenzfläche, sowie die Phasenvermischung aufgrund des schnellen Aufstiegs großer Blasen wirken sich auf die Flotationskinetik während der wässrigen Zweiphasen-Flotation aus.

In Abbildung 5-6 sind die zeitlichen Verläufe der Abscheidegrade der Phospholipase für die Flotationen mit der Glasmembran, dem Lochsieb und dem Metallgewebe bei einem Gasvolumenstrom von 10 ccm gezeigt. Der Gaseintrag durch die Glasmembran führt im Vergleich zu dem schnellsten Anstieg des Abscheidegrades. Nach 30 min Flotationszeit beträgt dieser 60,8 ($\pm 3,1$) %, flacht im folgenden Verlauf ab und nähert sich dem Endwert von 71,0 ($\pm 0,6$) % nach 120 min an. Die Abscheidegrade, die aus der Begasung mit dem Lochsieb und dem Metallgewebe resultieren, zeigen einen ähnlichen Verlauf, jedoch einen weniger steilen Anstieg zu Beginn. Nach 30 min beträgt der Abscheidegrad bei den Versuchen mit dem Lochsieb 51,6 ($\pm 1,6$) % und bei denen mit dem Metallgewebe 54,5 ($\pm 0,4$) %. Nach 120 min beträgt der Abscheidegrad 69,7 ($\pm 2,5$) % für die Begasung mit dem Lochsieb und 71,1 ($\pm 0,5$) % für den Gaseintrag über das Metallgewebe. Die finalen Abscheidegrade (E_{∞}), welche aus exponentiellen Fits ableitbar sind, betragen im Mittel aller drei Begasungsmedien 70,3 ($\pm 1,7$) %.

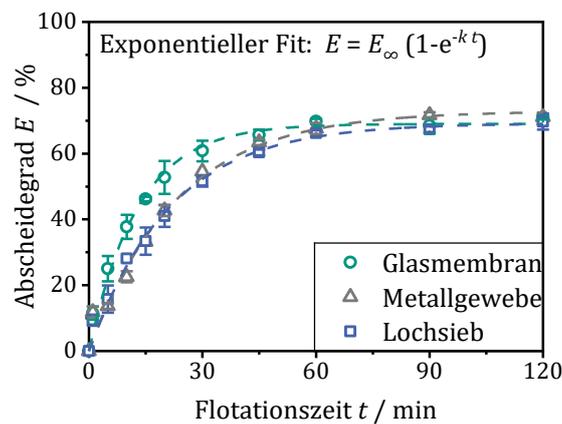


Abbildung 5-6: Verlauf der Abscheidegrade der Phospholipase während der wässrigen Zweiphasen-Flotation für die Begasung mit 10 ccm Luft und verschiedenen porösen Medien.

Die im Vergleich kleineren Blasen erzeugt durch die Glasmembran ($d_{3,2} = 309 \mu\text{m}$) führen bei gleichem Gasvolumenstrom zu einer insgesamt höheren eingetragenen Blasenoberfläche. Als Folge lagern sich mehr Enzymmoleküle an die Blasen an und flotieren in die Oberphase, als bei den mittelgroßen Blasen ($d_{3,2} = 381 \mu\text{m}$) des Lochsiebs. Dies erklärt den im Vergleich steileren Anstieg des Abscheidegrade zu Beginn der Flotation mit der Glasmembran. Während der Flotation mit dem Metallgewebe ist aufgrund der großen Blasen ($d_{3,2} = 685 \mu\text{m}$) ein niedriger Abscheidegrad im Vergleich zur Begasung mit dem Lochsieb zu erwarten. Jedoch sind die beiden Verläufe nahezu deckungsgleich. Die im vorherigen Kapitel beschriebene Phasenvermischung bei der Begasung mit dem Metallgewebe, erhöht die flüssige Phasengrenze zwischen Ober- und Unterphase. Dies steigert den diffusiven Stoffübergang der Enzyme von den mitgerissenen Unterphase-Tröpfchen in die Oberphase. Insbesondere zu Beginn der ATPF, wenn das thermodynamische Konzentrationsgleichgewicht (siehe Abschnitt 2.2.2) noch nicht erreicht ist, beschleunigt dies die Aufkonzentrierung der Phospholipase in der Oberphase. Gegen Ende der Flotationen stellt sich unabhängig vom Gaseintrag ein ähnlicher Abscheidegrad ein.

Die Flotationsversuche zeigen, dass der Gasblaseneintrag die Kinetik während der wässrigen Zweiphasen-Flotation entscheidend beeinflusst. Der spezifische Gasgrenzflächeneintrag stellt ein Maß zur Bewertung des Gaseintrags dar und wird von Finch *et al.* [106] als Schlüsselparameter für Flotationszellen bezeichnet.

In Abbildung 5-7 sind der spezifische Gasgrenzflächeneintrag (S_b), die gemessene und korrigierte Flotationsratenkonstante (k und k') für die Begasung mit 10 ccm bzw. 20 ccm mit der Glasmembran (GM), dem Metallgewebe (MG) und dem Lochsieb (LS) als Balkendiagramm dargestellt. Durch die verdrängte Flüssigkeit beim Blasenauftstieg entsteht eine Rückströmung in Richtung Boden der vertikalen Flotationszelle. Diese verhindert zum Teil, dass kleine Gasblasen die Phasengrenzfläche passieren können. k' berücksichtigt auch die Flotationsrate für diese Blasen. Videoaufnahmen der Ober- und Unterphase und die Auswertung der gesamten darin anwesende Blasenoberfläche, ermöglichen für die jeweiligen Versuche einen Korrekturfaktor und somit k' zu bestimmen.

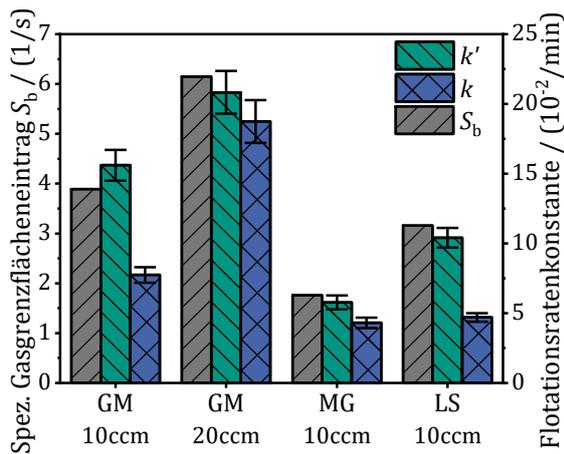


Abbildung 5-7: Spezifischer Gasgrenzflächeneintrag (S_b) und gemessene und korrigierte Flotationsratenkonstante (k und k') für Flotation mit einem Gaseintrag von 10 ccm oder 20 ccm Luft über die Glasmembran (GM), Metallgewebe (MG) und Lochsieb (LS).

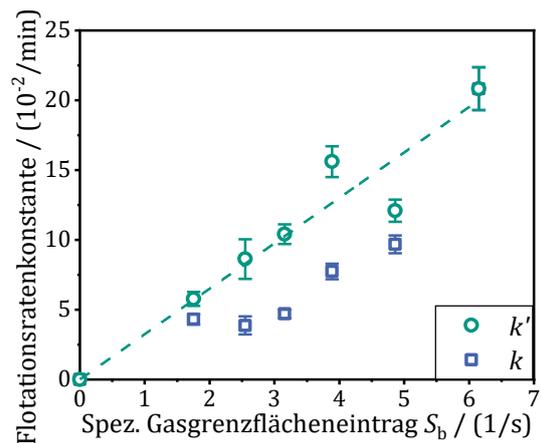


Abbildung 5-8: Korrelation zwischen dem spezifischen Gasgrenzflächeneintrag (S_b) und der gemessenen und korrigierten Flotationsratenkonstante (k und k').

Bei einer Begasungsrate von 10 ccm ergeben sich unterschiedliche Werte für den spezifischen Grenzflächeneintrag für die verschiedenen Begasungsmedien. Für die Begasung mit dem Metallgewebe resultiert der niedrigste Wert mit $S_b = 1,8 \text{ s}^{-1}$, bei der Begasung mit dem Lochsieb bestimmt sich S_b zu $3,2 \text{ s}^{-1}$ und der Gaseintrag mit der Glasmembran führt zu dem im Vergleich höchsten Wert von $3,9 \text{ s}^{-1}$. Hier führt eine Erhöhung des Gasvolumenstroms auf 20 ccm zu einer Steigerung auf $S_b = 6,2 \text{ s}^{-1}$ und den damit höchsten ermittelten spezifischen Gasgrenzflächeneintrag. Gleiches gilt bei dieser Kombination für die Flotationsratenkonstante $k = 20,8 (\pm 1,5) \cdot 10^{-2} \text{ m}^{-1}$. Für einen Volumenstrom von 10 ccm beträgt der Wert für k bei der Begasung mit der Glasmembran $7,7 (\pm 0,5) \cdot 10^{-2} \text{ m}^{-1}$, bei dem Gaseintrag über das Lochsieb $4,7 (\pm 0,3) \cdot 10^{-2} \text{ m}^{-1}$ und $4,3 (\pm 0,3) \cdot 10^{-2} \text{ m}^{-1}$ wenn die Gasblasen durch das Metallgewebe erzeugt werden. Die korrigierten Werte k' sind für alle Begasungen bei 10 ccm höher als die gemessenen Flotationsratenkonstanten. Bei dem Gaseintrag mit dem Metallgewebe um den Faktor 1,3, bei dem Lochsieb um den Faktor 2,2 und bei der Glasmembran um den Faktor 2,0.

Die Auswertungen zeigen, dass die Flotationsratenkonstante mit steigendem spezifischen Gasgrenzflächeneintrag zunimmt. Dieser ist, wie aus Gleichung (2.32) ersichtlich, reziprok von den Sauterdurchmessern der jeweiligen Blasengrößenverteilungen (siehe Abschnitt 5.1.1) abhängig.

Diese erhöhen sich wiederum mit dem Gasvolumenstrom (siehe Abschnitt 5.1.2). Dadurch steigt sich S_b während des Gaseintrags mit der Glasmembran bei der Verdopplung des Volumenstroms von 10 ccm auf 20 ccm nur um den Faktor 1,5.

Die Korrelation zwischen der Flotationsratenkonstante und dem spezifischen Gasgrenzflächeneintrag wird ersichtlich, wenn man alle zuvor ermittelten Paarungen unabhängig von den Begasungsmedien betrachtet. Dazu sind in Abbildung 5-8 k und k' über S_b der zuvor gezeigten Flotationsversuche, sowie weiterer nicht gezeigter Experimente, aufgetragen. Während sich lediglich ein zunehmender Trend der gemessenen Flotationsratenkonstanten mit steigendem S_b zeigt, ist eine lineare Abhängigkeit bei k' zu erkennen (Gleichung (5.6)).

$$k' = 3,25 \cdot 10^{-2} S_b \left(\frac{60 \text{ s}}{\text{min}} \right) \quad (R^2 = 0,978) \quad (5.6)$$

Eine lineare Korrelation zwischen der Flotationsratenkonstante und dem spezifischen Gasgrenzflächeneintrag stellen Gorain, Franzidis und Manlapig [107] ebenfalls für den Gaseintrag mit einem Impeller während der Flotation von Erzen fest. Auch bei großvolumigen Flotationsprozessen bis zu 100 m³ sind lineare Abhängigkeiten beider Größen dokumentiert [108]. Damit zeigt sich der spezifische Gasgrenzflächeneintrag als wichtiger Prozessparameter zur Beurteilung und Auslegung des Gaseintrags während der wässrigen Zweiphasen-Flotation.

5.3 Schlussfolgerungen

Ein geeigneter Gasblaseneintrag während der wässrigen Zweiphasen-Flotation kann durch die Begasung mit verschiedenen porösen Materialien erfolgen. Die dabei resultierende Blasengrößenverteilung hängt sowohl von der Porengröße, als auch der Geometrie und Oberfläche des äußeren Porenbereichs ab. Einen Einfluss auf die Blasengröße zeigt ebenfalls die in der Unterphase herrschende Salzkonzentration. Die Koaleszenz-hemmende Wirkung verhindert, dass kleine Blasen zu großen zusammenwachsen und so die insgesamte Blasenoberfläche reduziert wird.

Der spezifische Gasgrenzflächeneintrag ist ein wichtiger Prozessparameter zur Beurteilung und Auslegung des Gaseintrags während der wässrigen Zweiphasen-Flotation. Generell gilt, dass dieser durch einen geringen Sauterdurchmesser der Gasblasen und einen hohen Gasvolumenstrom

gesteigert werden kann. Bedingt durch die lineare Korrelation zur Flotationsratenkonstante erhöht sich durch einen hohen spezifischen Gasgrenzflächeneintrag auch die Flotationsrate und damit die Aufreinigungsgeschwindigkeit während der wässrigen Zweiphasen-Flotation. Damit kann der spezifische Gasgrenzflächeneintrag als Schlüsselparameter zur Beurteilung des Gaseintrags, als auch zur Maßstabsübertragung des Prozesses herangezogen werden, um beispielsweise die Anzahl und Art der für eine gleichbleibende Aufreinigungsgeschwindigkeit nötigen Begasungseinheiten zu bestimmen. Dabei gilt es jedoch zu beachten, dass höhere Gasvolumenströme auch zu größeren Gasblasen führen, die aufgrund einer schnelleren Aufstiegeschwindigkeit in sich ausbildenden Wirbelschleppen bei dem Durchtritt der Phasengrenzfläche der Unterphase in die Oberphase mit sich reißen können. Zu große Gasblasen führen daher im schlimmsten Fall zu einer vollständigen Phasenvermischung, was eine Aufkonzentrierung der Enzyme in der Oberphase unmöglich macht. Sehr kleine Gasblasen hingegen können zum Teil die Grenzflächenspannung zwischen Unter- und Oberphase nicht überwinden und bleiben in der Phasengrenze stecken oder verweilen in der Unterphase und tragen nicht zu einem Stofftransport bei.

In Abhängigkeit der Stoffeigenschaften (Grenzflächenspannung, Viskosität und Dichten) des wässrigen Zweiphasen-Systems lässt sich ein ideales Blasengrößenfenster bestimmen, in welchem ein Aufstieg der Gasblasen in die Oberphase garantiert und eine Phasenvermischung ausgeschlossen werden kann. Für das für die Aufreinigung der Phospholipase optimierte PEG 1000-Citrat-System beläuft dieses sich auf einen Blasengrößenbereich zwischen 281 μm – 543 μm .

Kapitel 6

Optimierung der Prozessführung und des Anlagendesigns³

6.1 Charakterisierung von Prozessparametern

In Kapitel 4 ist die Charakterisierung stofflicher Schlüsselparameter beschrieben. Neben dem Stoffsystem beeinflussen vor allem prozesstechnische Parameter die Aufreinigung von Enzymen durch die wässrige Zweiphasen-Flotation. Während in Kapitel 5 bereits die Implementierung eines geeigneten Gasblaseneintrags beschrieben ist, liegt der Fokus in diesem Kapitel auf der Charakterisierung weiterer Prozessparameter wie der Enzymkonzentration und die Blasenverweilzeit und dem Vergleich verschiedener Prozessführungen.

6.1.1 Einfluss der anfänglichen Enzymkonzentration

Die Konzentration extrazellulärer Enzyme in Fermentationsbrühen ist vergleichsweise gering, was eine Aufkonzentrierung während des Aufreinigungsprozesses erfordert [35]. Bei der fermentativen Produktion durch Mikroorganismen liegen typische Amylasekonzentrationen zwischen 15 – 30 g/L, Lipasekonzentrationen zwischen 10 g/L bis über 20 g/L [1].

³ Teilinhalte dieses Kapitels wurden in *Separation and Purification Technology* und *Separations(MDPI)* veröffentlicht und angepasst [84,85]. L. Jakob, M. Heinzmann, and H. Nirschl, “Development of a continuous aqueous two-phase flotation process for the downstream processing of biotechnological products,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 278, no. July 2021, p. 119657, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.seppur.2021.119657. und Jakob, L.; Baust, H.K.; Griesinger, L.; Nirschl, H. Optimized Apparatus Design for Continuous Aqueous Two-Phase Flotation (ATPF). *Separations* **2023**, *10*, 511, doi:10.3390/separations10090511.

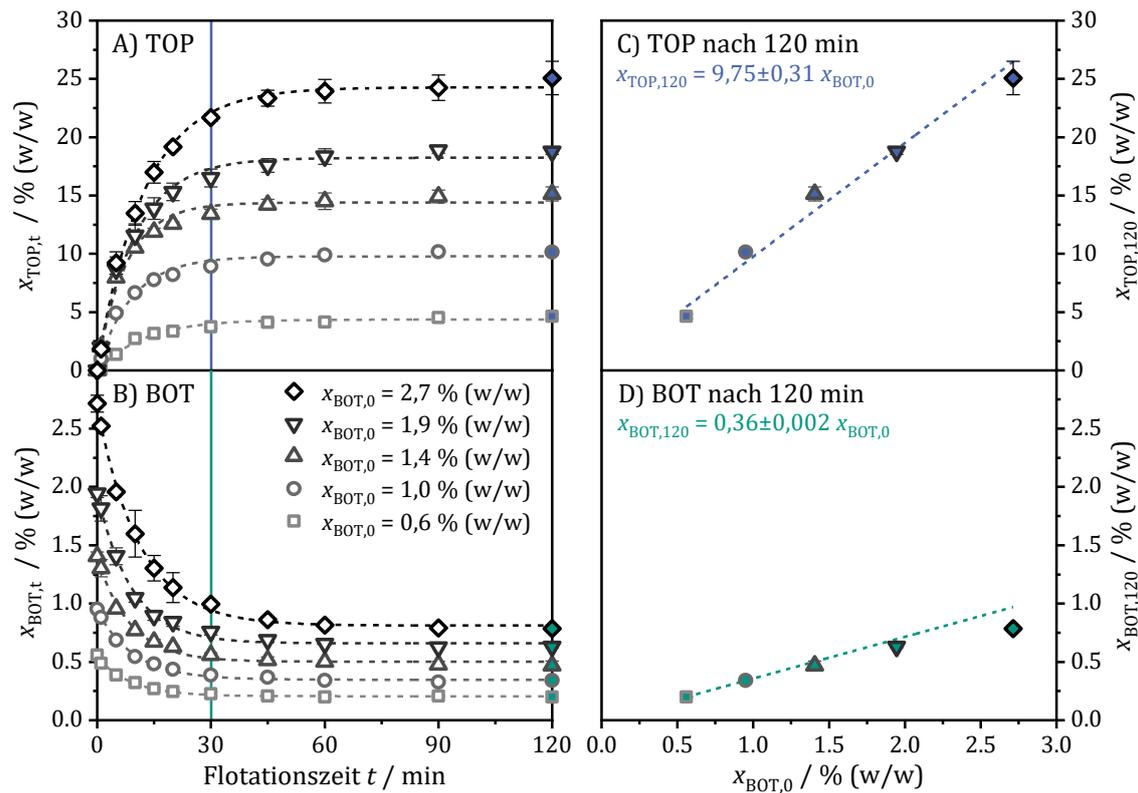


Abbildung 6-1: Zeitliche Konzentrationsverläufe der Phospholipase in der Oberphase (A) und in der Unterphase (B) für verschiedene anfängliche Enzymkonzentrationen in der Unterphase, bei der Floation im PEG 1000-Citrat-System bei einer Begasung mit 10 ccm Luft durch eine Glasmembran. Phospholipasekonzentrationen nach 120 min Flotationszeit in der Oberphase (C) und Unterphase (D) in Abhängigkeit der anfänglichen Enzymkonzentration in der Unterphase.

Der Einfluss der anfänglichen Phospholipasekonzentration in der Unterphase ($x_{BOT,0}$) auf den Massentransfer während der wässrigen Zweiphasen-Flotation, zeigt sich im Vergleich von Flotationsversuchen mit anfänglichen Konzentrationen zwischen 0,6 – 2,7 % (entspricht. 7 – 32 g/L). In Abbildung 6-1 sind die Phospholipasekonzentrationen in der Oberphase (A) und Unterphase (B) über die Flotationszeit für verschiedene, anfängliche Enzymkonzentrationen in der Unterphase aufgetragen.

Die Konzentrationen der Phospholipase in den jeweiligen Phasen ändern sich während den ersten 30 min der Flotation stark. Anschließend ist ein Abflachen in den Konzentrationsverläufen zu beobachten und ab ca. 60 min Flotationszeit bleiben die Enzymkonzentrationen nahezu konstant. Dieser Verlauf ist für alle Versuche unabhängig von der anfänglichen Enzymkonzentrationen in der Unterphase zu beobachten. Es fällt jedoch auf, dass je höher diese ist, die Konzentrationszunahme in der Oberphase bzw. Abnahme in der Unterphase stärker ausfällt. Auch die Niveaus, auf

welchen sich die Konzentrationen mit zunehmender Flotationszeit einpendeln, nehmen mit höherer Anfangskonzentration zu. Dies wird bei der Betrachtung der Endwerte nach 120 min (gefüllte Datenpunkte) in Abhängigkeit der anfänglichen Enzymkonzentration deutlich. In Abbildung 6-1 C) und D) sind diese für die Oberphase und Unterphase aufgetragen. Zwischen der anfänglichen Enzymkonzentration in der Unterphase und den Endkonzentrationen nach 120 min in der Oberphase und Unterphase sind lineare Zusammenhänge erkennbar (Gleichung (6.1) und (6.2)).

$$x_{\text{TOP},120} = 9,75 \pm 0,31 x_{\text{BOT},0} \quad (R^2 = 0,995) \quad (6.1)$$

$$x_{\text{BOT},120} = 0,36 \pm 0,002 x_{\text{BOT},0} \quad (R^2 = 0,999) \quad (6.2)$$

Abbildung 6-2 zeigt den Transfer der Phospholipase innerhalb der ersten 30 min Flotationszeit für die Versuche mit unterschiedlichen initialen Phospholipasekonzentrationen. Es ist ersichtlich, dass eine höhere Konzentration zu Beginn zu einer höheren Konzentrationsänderung sowohl in der Ober- als auch in der Unterphase führt. Diese lassen sich durch Gleichung (6.3) und (6.4) linear mit der anfänglichen Enzymkonzentration korrelieren.

$$\Delta x_{\text{TOP}} = 8,45 \pm 0,46 \cdot x_{\text{BOT},0} \quad (R^2 = 0,985) \quad (6.3)$$

$$\Delta x_{\text{BOT}} = 0,60 \pm 0,01 \cdot x_{\text{BOT},0} \quad (R^2 = 0,999) \quad (6.4)$$

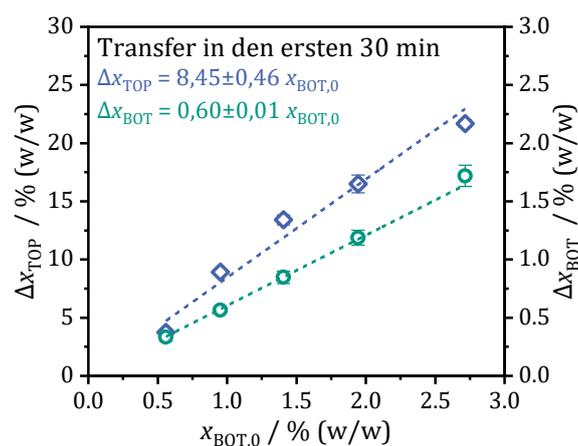


Abbildung 6-2: Lineare Korrelationen des Enzymtransfers innerhalb der ersten 30 min Flotationszeit mit der anfänglichen Enzymkonzentration in der Unterphase.

Eine höhere anfängliche Enzymkonzentration führt zu einer höheren Anzahl an Enzymmolekülen in der Unterphase. Dadurch erhöht sich die Kollisionswahrscheinlichkeit einer Gasblase mit einem Enzymmolekül. Bei konstantem Gaseintrag nimmt mit steigender Kollisionswahrscheinlichkeit auch die Flotationswahrscheinlichkeit zu. Darin findet sich eine mögliche Erklärung für die steilere Zu- bzw. Abnahme der Enzymkonzentrationen bei höheren Anfangskonzentrationen in Abbildung 6-1 sowie den gesteigerten Massentransfer innerhalb der ersten 30 min in Abbildung 6-2. Das Abflachen der Konzentrationsänderungen in Abbildung 6-1 geschieht jedoch bei unterschiedlichen Konzentrationsniveaus. Als Ursache hierfür liegt die Diffusion als zweiter Transportmechanismus der ATPF neben der Flotation nahe. Hohe anfängliche Enzymkonzentrationen in der Unterphase führen zu einem hohen Konzentrationsgradienten zwischen der angereicherten Unterphase und der zu Beginn unbeladenen Oberphase. Dadurch erhöht sich der diffusive Stoffstrom nach Gleichung (2.7) und somit der Massentransfer der Phospholipase in die Oberphase. Mit abnehmender Enzymkonzentration in der Unterphase und gleichzeitig steigender Konzentration in der Oberphase reduziert sich der Konzentrationsgradient und damit der diffusive Transport der Phospholipase in die Oberphase.

Ist das thermodynamische Gleichgewicht der Konzentrationsverteilung zwischen Ober- und Unterphase erreicht, findet kein Massentransfer der Phospholipase in die Oberphase aufgrund von Diffusion statt. Jedoch lagern sich die noch in der Unterphase vorhandenen Enzymmoleküle weiterhin an die Blasenoberflächen an und flotieren in die Oberphase. Dadurch sollte auch mit zunehmender Flotationszeit die Enzymkonzentration in der Unterphase stetig ab- und in der Oberphase stetig zunehmen. Dies ist jedoch während den Versuchen nicht zu beobachten (siehe Abbildung 6-1). Es ist also davon auszugehen, dass die an die Blasen angelagerten Enzyme sich während dem Aufstieg durch die Oberphase nicht von der Blase lösen. Nachdem die Blasen an der Oberfläche der Oberphase platzen, bildet der aus Unterphase bestehende Flüssigkeitsfilm der die Blase umgibt einen Tropfen, welcher aufgrund der höheren Dichte zurück in die Unterphase sedimentiert. Die zuvor an der Blasenoberfläche angelagerten Enzyme werden in diesem Tropfen wieder zurück in die Unterphase transportiert. Ein Gleichgewicht zwischen dieser Rückdiffusion in die Unterphase und der Flotation in die Oberphase erklärt den quasistationären Zustand während den letzten 60 min der Flotationsversuche. Der nahezu identische, mittlere Verteilungskoeffizient von $K_p = 31,3 (\pm 2,7)$ aller Flotationsversuche mit unterschiedlichen anfänglichen

Enzymkonzentration stützt diese Hypothese. Dieser liegt im Bereich des während den Extraktionsversuchen ermittelten Verteilungskoeffizienten von $K_p = 32,6 (\pm 0,6)$ bei gleichem pH-Wert (siehe Abschnitt 4.2.1). Das wässrige Zweiphasen-System definiert demnach die Grenzen der Aufkonzentrierung.

Die anfängliche Enzymkonzentration in der Unterphase beeinflusst die Kinetik des Massentransfers zu Beginn der wässrigen Zweiphasen-Flotation. Herrscht eine hohe Enzymkonzentration in der Unterphase, beschleunigt dies den Massentransfer durch eine gesteigerte Flotation und Diffusion in die Oberphase. Die Enzymkonzentration in der Unterphase zu Beginn der wässrigen Zweiphasen-Flotation ist ein Prozessparameter, der sich aus dem Fermentationsprozess zur Herstellung der Enzyme ableitet. Für eine maximale anfängliche Enzymkonzentration sollte die Fermentationsbrühe nach der Fermentation direkt mit den phasenbildenden Komponenten der Unterphase versetzt, werden. Eine Verdünnung der Fermentationsbrühe vor dem Zugeben der phasenbildenden Komponenten führt zu niedrigeren Enzymkonzentrationen in der Unterphase und damit einem langsameren Massentransfer.

6.1.2 Einfluss der Blasenverweilzeit

Die Anlagerung der Enzyme an die aufsteigenden Gasblasen ist elementar für die wässrige Zweiphasen-Flotation. In Kapitel 4 ist beschrieben, wie das umgebene Medium und insbesondere der pH-Wert hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Enzymmolekülen und der Blasenoberfläche beeinflusst. In Kapitel 5 wird deutlich, dass ein hoher Gasgrenzflächeneintrag die Kinetik der wässrigen Zweiphasen-Flotation beschleunigt. Für eine maximale Flotation der Enzyme ist es zudem entscheidend, dass die eingeleiteten Gasblasen vollständig mit Enzymen auf der Oberfläche beladen sind. Die Anlagerung findet während des Blasenanstiegs in der angereicherten Unterphase statt, sodass ein Einfluss der Blasenverweilzeit in der Unterphase untersucht werden muss.

Die Verweilzeit der Gasblasen in der Unterphase hängt bei einem ungehinderten Aufstieg in die Oberphase und gleichbleibender Blasengröße von der Füllhöhe in der Flotationszelle ab. In Abbildung 6-3 sind die Konzentrationsverläufe der Phospholipase in der Ober- und Unterphase für Flotationen mit unterschiedlichen Füllhöhen der Unterphase zwischen 10 cm – 22,5 cm unter Wahrung des Volumenverhältnisses von 0,1 aufgetragen. Wie bereits zuvor beobachtet, erfolgt

eine schnelle Konzentrationszunahme in der Oberphase während den ersten 30 min der Flotation. Analog dazu nehmen die Konzentrationen in der Unterphase in der Anfangsphase stark ab und zeigen nach 60 min Flotation keine starken Änderungen mehr auf. Die Verläufe bei verschiedenen Füllhöhen unterscheiden sich unter Berücksichtigung der Toleranzbereiche nicht.

Durch eine vereinfachte Annahme eines laminaren Aufstiegs einer einzelnen, kugelförmigen Blase lässt sich die Aufstiegs geschwindigkeit nach Gleichung (2.24) von 90 % des Blasenkollektivs (erzeugt durch die Glasmembran bei der Begasung mit 10 cm Luft) kleiner als 12,3 mm/s abschätzen. Eine Verdopplung der Füllhöhe von 10 cm auf 20 cm führt demnach zu einer Verdopplung der Blasenverweilzeit von 8,1 s auf 16,2 s in der Unterphase. Auch wenn aufgrund der Schwarm sedimentation mehrerer Blasen von kürzeren Aufstiegszeiten auszugehen ist, lassen die fast gleichen Konzentrationsverläufe bei verschiedenen Füllhöhen darauf schließen, dass bereits bei 10 cm Füllhöhe von einer vollständigen Beladung der Gasblasen mit Enzymmolekülen vorliegt. Die Kinetik der Anlagerung der Enzymmoleküle an die Blasenoberfläche scheint deutlich schneller zu erfolgen, als der Blasen aufstieg. Während dem Designen von Flotationszellen für die wässrige Zweiphasen-Flotation kann daher bereits eine Füllhöhe von 10 cm als ausreichend erachtet werden.

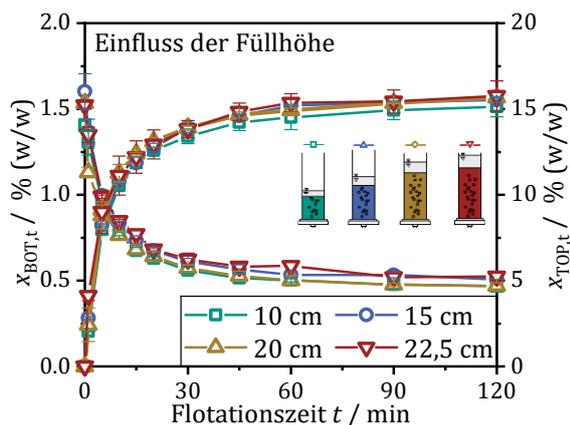


Abbildung 6-3: Enzymkonzentrationen in der Unterphase ($x_{\text{BOT},t}$) und Oberphase ($x_{\text{TOP},t}$) während der wässrigen Zweiphasen-Flotation bei verschiedenen Füllhöhen in der Flotationszelle und der Begasung mit 10 ccm Luft durch eine Glasmembran.

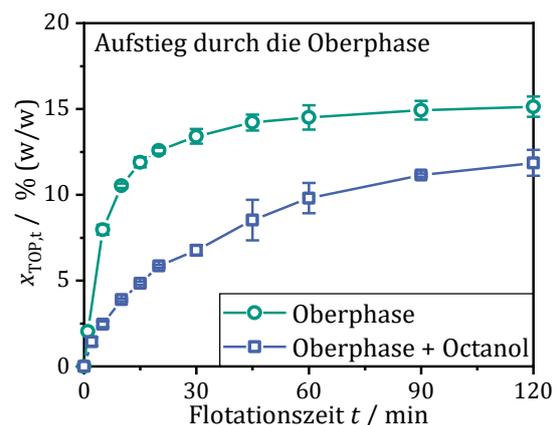


Abbildung 6-4: Enzymkonzentration in den Oberphasen während der wässrigen Zweiphasen-Flotation, für eine unbedeckte Oberphase und einer Oberphase mit zusätzlich aufgebracht Octanolschicht.

Nachdem die mit Enzym beladenen Gasblasen die Phasengrenze durchschreiten, verlangsamt sich ihr Aufstieg in der viskoserer Oberphase. Es ist bisher ungeklärt, wie genau der Übergang der Enzyme von der Blasenoberfläche in die Oberphase abläuft. Lee *et al.* [8] vermuten den Stoffübergang entweder durch Ablösen der Enzymmoleküle von der Blase während deren Aufstieg durch die Oberphase, oder durch Platzen der Blase an der Grenzfläche zwischen Oberphase und Umgebung.

Um den Übergang der Enzyme von der Blase in die Oberphase während der wässrigen Zweiphasen-Flotation zu charakterisieren, bedarf es den Aufstieg durch die Oberphase genauer zu untersuchen. In Abbildung 6-4 sind die Konzentrationsverläufe der Phospholipase in der Oberphase während der Flotation mit einer Oberphase, welche an die Atmosphäre grenzt (Referenz) und einer Oberphase die zusätzlich mit einer Octanolschicht bedeckt ist, aufgetragen. Bei der Flotation im Referenzsystem steigt die Phospholipasekonzentration in der Oberphase wie zuvor beobachtet zu Beginn steil an und beträgt nach 30 min Flotationszeit bereits 13,4 ($\pm 0,4$) % (w/w). Im weiteren Verlauf nimmt die Konzentrationszunahme ab und nach 120 min stellt sich eine Konzentration von 15,1 ($\pm 0,6$) % (w/w) ein. Im Vergleich nimmt die Phospholipasekonzentration in der Oberphase langsamer zu, wenn diese von Octanol bedeckt ist. Nach 30 min beträgt die Konzentration 6,8 ($\pm 0,3$) % (w/w) und steigt kontinuierlich weiter an bis auf einen Wert von 11,8 ($\pm 0,8$) % (w/w) nach 120 min Flotationszeit.

Die Octanol-Schicht verhindert, dass die Gasblasen nachdem sie vollständig durch die Oberphase aufgestiegen sind platzen. Stattdessen erfolgt ein weiterer Aufstieg im Octanol und das Platzen der Blasen geschieht erst nachdem die Octanol-Schicht passiert ist. Dadurch kann hier die Konzentrationszunahme der Phospholipase in der Oberphase ausschließlich auf das Ablösen der Enzyme während dem Aufstieg durch die Oberphase zurückgeführt werden. Betrachtet man die Aufstiegsgeschwindigkeit der Blasen in der Oberphase, so beträgt diese für 90 % der durch die Gasmembran erzeugten Gasblasen 3,5 mm/s. Bei der verwendeten Füllhöhe von 10 cm der Unterphase und einem Volumenverhältnis von 0,1 resultiert in der Flotationszelle eine relativ geringe Blasenverweilzeit in der Oberphase von ca. 2,9 s. Nach 30 min ist deshalb nur etwa die Hälfte an Phospholipase in die Oberphase übergegangen verglichen mit dem Referenzversuch, bei welchem auch das Platzen der Blasen zu einem Übergang führt. Die zu diesem Zeitpunkt deutlich geringere Konzentration in der Oberphase bewirkt, dass sich das Konzentrationsgleich-

gewicht zwischen Unter- und Oberphase noch nicht einstellt und sich auch weiterhin Phospholipasemoleküle in der Oberphase anreichern können. Darin begründet sich der weitere Konzentrationsanstieg mit fortlaufender Flotation. Auch nach 120 min beträgt die Phospholipasekonzentration in der Oberphase erst 88 % des Referenzversuchs.

Die Aufkonzentrierung der Enzyme während der wässrigen Zweiphasen-Flotation findet sowohl durch Ablösen der Enzyme von der Blasenoberfläche während des Aufstiegs durch die Oberphase, als auch durch Platzen der Blasen an der Oberfläche statt. Aus Sicht der Prozesssicherheit wäre es sinnvoll das Platzen noch mit Enzymen beladener Blasen an der Oberfläche zu vermeiden um eine Bildung enzymhaltiger, gegebenenfalls gesundheitsgefährdender Aerosole auszuschließen. Daher ist eine möglichst lange Blasenverweilzeit in der Oberphase durch eine lange Aufstiegsstrecke erstrebenswert. Jedoch ist die Höhe der Oberphase kein frei wählbarer Parameter, da sie bedingt ist durch das Volumenverhältnis zur Unterphase und der Geometrie der Flotationszelle. Es lässt sich aber schlussfolgern, dass ein schmales Design zu bevorzugen ist, da so bei gegebenem Unterphasenvolumen und Volumenverhältnis die Höhe der Oberphase maximal ist.

6.1.3 Vergleich verschiedener Prozessführungen

Die Flotation im wässrigen Zweiphasen-System findet bisher meist im Batch-Betrieb statt. Dabei werden Gasblasen in ein definiertes Volumen an angereicherte Unterphase eingeleitet und die Enzyme in die unbeladene Oberphase flотиert. Während zu Beginn der Batch-Flotationen meist ein schneller Massentransfer zu beobachten ist, nimmt die weitere Aufkonzentrierung der Enzyme in der Oberphase mit fortlaufender Flotationszeit nur noch langsam zu und der Aufreinigungsprozess wird immer ineffizienter. Ein semikontinuierlicher oder kontinuierlicher Phasenaustausch verspricht die wässrige Zweiphasen-Flotation in einem Zustand zu halten, bei welchem die Aufreinigungsgeschwindigkeit deutlich höher ist.

Der Vergleich von Flotationen im Batch-Betrieb mit Flotationen mit semikontinuierlichen und kontinuierlichen Phasenaustausch zeigt den Einfluss der Prozessführung auf die wässrige Zweiphasen-Flotation. In Abbildung 6-5 sind die Versuchsaufbauten für die verschiedenen Prozessführungsstrategien schematisch dargestellt. Im Batch-Betrieb (A) wird die mit der Phospholipase angereicherte Unterphase in der vertikalen Flotationszelle vorgelegt und unbeladene Oberphase aufgegeben. Während dem semikontinuierlichen Betrieb (B) erfolgt nach 30 min ein Austausch

des halben Volumens beider Phasen. Dabei wird die jeweilige Phase durch Zugabe angereicherter Unterphase bzw. unbeladener Oberphase auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Mit Hilfe von vier Pumpen (P1 – P4) ist ein kontinuierlicher Phasenaustausch (C) realisierbar. Dabei gelangt die angereicherte Unterphase über den Boden in die Flotationszelle und aufgereinigte Unterphase wird im oberen Drittel abgeführt. Unbeladene Oberphase wird von oben zudosiert und beladene Oberphase über einen Schlauch aus der Mitte der Oberphase abgepumpt. Dabei sind die Pumpraten so gewählt, dass die jeweiligen Volumina der beiden wässrigen Phasen konstant sind.

In Abbildung 6-6 sind die Abscheidegrade der Phospholipase für zuvor beschriebenen unterschiedlichen Prozessführungen gezeigt. Im Batch-Betrieb (A) zeigt sich der bereits bekannte Verlauf mit einem schnellen Anstieg des Abscheidegrads zu Beginn und einem Abflachen nach ca. 30 min Flotationszeit. Zu diesem Zeitpunkt beträgt der Abscheidegrad $60,8 (\pm 3,1) \%$ und steigt im weiteren Verlauf auf $71,0 (\pm 0,6) \%$ nach 120 min Flotationszeit an.

Aus der Kinetik des Batch-Betriebs lässt sich der Zeitpunkt für den teilweisen Austausch der Phasen für die semi-kontinuierlichen Flotation ableiten. Nach 30 min im Batch-Betrieb sind bereits 87 % des finalen Abscheidegrads erreicht und eine weitere Flotation ist nicht mehr effizient in Hinblick auf die Zeitausbeute. Im semikontinuierlichen Betrieb (B) führt der erste hälftige Austausch der Unterphase zu einem Absinken des Abscheidegrades von $60,0 (\pm 4,0) \%$ auf $11,1 (\pm 4,3) \%$. Anschließend ist erneut eine steile Zunahme des Abscheidegrades zwischen 30 min und 60 min zu beobachten. Der Verlauf wiederholt sich auch bei den beiden nächsten Austauschzyklen nach 60 min bzw. 90 min Flotationszeit. Es ergibt sich ein „Sägezahn-Muster“, das typisch für semikontinuierliche Prozesse ist. Dabei betragen die Abscheidegrade zu den Hochpunkten im Mittel $61,0 (\pm 2,5) \%$ und zu den Tiefpunkten $13,3 (\pm 1,6) \%$. Durch den semikontinuierlichen Phasenaustausch ist es möglich das Niveau des Abscheidegrades, ab welchem die Batch-Flotation ineffizient ist, mehrfach zu erreichen. Insgesamt erhöht sich das aufgereinigte Unterphasenvolumen damit um den Faktor 2,5 im Vergleich zur Batch-Flotation.

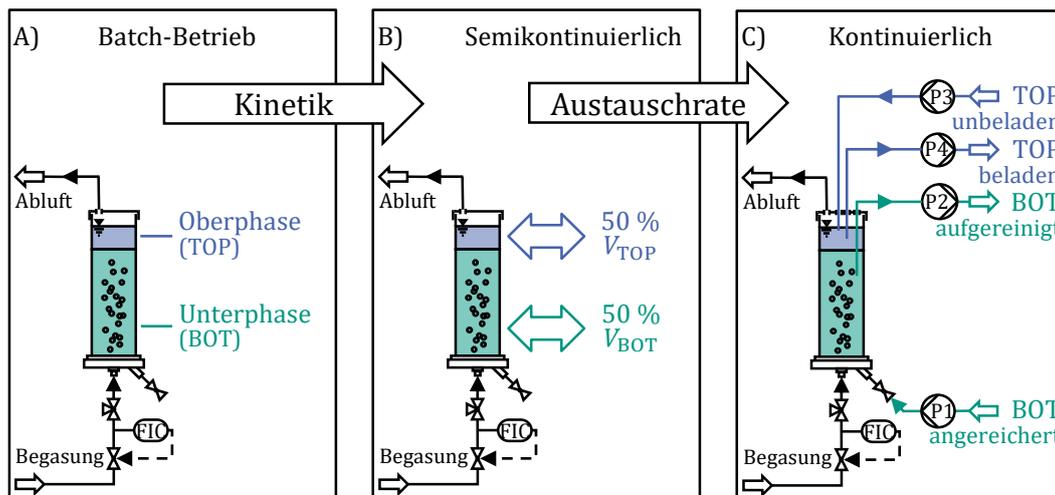


Abbildung 6-5: Schematische Darstellung der Versuchsaufbauten zum Vergleich verschiedener Prozessführungen der Flotation im wässrigen Zweiphasen-System in einer vertikalen Flotationszelle.

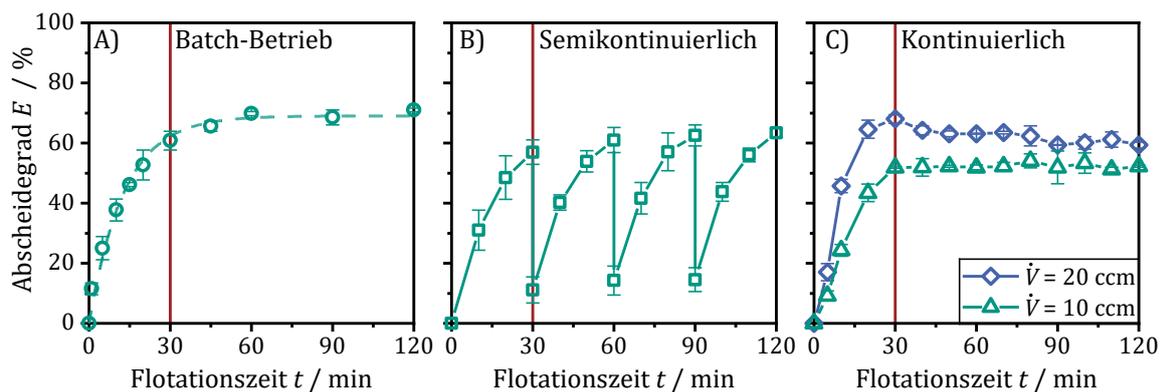


Abbildung 6-6: Abscheidegrade der Phospholipase während der wässrigen Zweiphasen-Flotation im Batch-Betrieb (A), bei semikontinuierlichem (B) und kontinuierlichem Phasenaustausch (C).

Die Austauschrate von 50 % der Phasenvolumina in einem Zeitintervall von 30 min ist die Grundlage bei der Auswahl der Pumpraten während der kontinuierlichen Flotation. In Abbildung 6-6 C) ist der Abscheidegrad der Phospholipase für einen kontinuierlichen Austausch der Ober- und Unterphase mit einer Phasenaustauschrate von 1 / h für die Gasvolumenströme von 10 ccm (grüne Dreiecke) und 20 ccm (blaue Rauten) gezeigt. Während der ersten 30 min findet noch kein Phasenaustausch statt, sodass der Abscheidegrad kontinuierlich ansteigt. Anschließend erfolgt der kontinuierliche Austausch der Phasen zwischen 30 min und 120 min Flotationszeit. Während dieser Zeitspanne beträgt der Abscheidegrad bei der Begasung mit 10 ccm im Mittel 52,3 ($\pm 0,7$) %.

Bei einem Gasvolumenstrom von 20 ccm steigt der Abscheidegrad bis zum Einschalten der Pumpen nach 30 min Flotationszeit auf 68,0 ($\pm 1,4$) % an und beträgt während des anschließenden kontinuierlichen Betriebs im Mittel 61,8 ($\pm 1,8$) %. Für beide Gasvolumenströme ist im kontinuierlichen Betrieb ein nahezu konstanter Abscheidegrad zu beobachten. Dies bedeutet, dass die durch die angereicherte Unterphase in die Flotationszelle zugeführten Phospholipasemoleküle in die Oberphase flотиert werden und eine konstante Aufreinigung stattfindet. Die Überführung des semikontinuierlichen Prozesses in einen kontinuierlichen Aufkonzentrierungsprozess ist daher als erfolgreich anzusehen. Bei einem Gasvolumenstrom von 20 ccm beträgt der Abscheidegrad über 60 % und im Vergleich zum Batch-Betrieb ist das 2,5-fache Volumen an Unterphase in 120 min Flotationszeit aufgereinigt.

Die wässrige Zweiphasen-Flotation im Batch-Betrieb zeigt nur zu Beginn einen hohen Massentransfer der Enzyme in die Oberphase. Nähern sich die Enzymkonzentrationen in der Unter- und Oberphase ihrem Gleichgewichtszustand an, der einem Abscheidegrad von 71,0 ($\pm 0,6$) % entspricht, erfolgt keine weitere Aufreinigung der Enzyme in der Unterphase. Ein semikontinuierlicher Austausch der Ober- und Unterphase beschleunigt den Massentransfer wieder. Ein kontinuierlicher Austausch beider Phasen mittels Pumpen erlaubt einen konstant hohen Abscheidegrad. Die Steigerung des aufgereinigten Unterphasenvolumens um den Faktor 2,5 bei gleicher Flotationsdauer erhöht die Raum-Zeit-Ausbeute. Jedoch erweist sich für den kontinuierlichen Betrieb die vertikale Flotationszelle als ungünstig, da aufgrund des geringen Oberphasenvolumens nahezu keine räumliche Trennung zwischen beladener Oberphase die abgeführt und unbeladener Oberphase die zugeführt wird, vorliegt. Auch der Austausch der Unterphase ist nicht ideal, da hier nicht auszuschließen ist, dass noch angereicherte Unterphase wieder aus der Flotationszelle hinausgefördert wird.

6.2 Kontinuierliche wässrige Zweiphasen-Flotation

6.2.1 Entwicklung eines Flotationsbeckens

Die kontinuierliche wässrige Zweiphasen-Flotation ist eine effizientere Alternative zu dem Batch-Prozess. Jedoch ist eine vertikale Flotationszelle nicht geeignet, um einen definierten Ausstrom aufgereinigter Unterphase und beladener Oberphase zu realisieren. Ein horizontales Flotationsbecken, das häufig bei der kontinuierlichen Druckentspannungsflotation zum Einsatz kommt [86], scheint geeigneter. Unter Einbeziehung der gewonnenen Erkenntnisse zur wässrigen Zweiphasen-Flotation, ist in diesem Kapitel die Entwicklung eines geeigneten Apparatekonzepts für ein horizontales Flotationsbecken beschrieben.

In Abbildung 6-7 ist das horizontale Flotationsbecken schematisch dargestellt. Die mit der Biosuspension angereicherte Unterphase wird durch eine Pumpe (P_3) am Boden in das Becken gefördert. Während der Durchströmung des Beckens können über drei separate Begasungseinheiten Gasblasen in die Unterphase eingeleitet und so die Enzyme in die Oberphase flотиert werden, bevor auf der dem Einlass gegenüberliegenden Seite die aufgereinigte Unterphase durch eine weitere Pumpe (P_4) abgezogen wird. Die Pumpen (P_1 und P_2) fördern die Oberphase wie im dargestellten Beispiel im Gleichstrom parallel zur Unterphase, oder im Gegenstrom entgegen der Unterphasenströmung durch das Becken. Eine Leitfähigkeitssonde, welche in der Unterphase auf der Seite des Auslasses platziert ist, dient der Charakterisierung der Phasenverwirbelung (siehe Abschnitt 6.2.2). Ein kontinuierliches Abführen der ausgetragenen Phasen, sowie eine teilweise oder vollständige Rezirkulation ist möglich.

Durch die horizontale Grundform des Flotationsbeckens ist eine räumliche Trennung zwischen Ein- und Auslass der beiden wässrigen Phasen gewährleistet. Dies bietet mehrere Vorteile: Zum einen ist dadurch sichergestellt, dass angereicherte Unterphase oder unbeladene Oberphase die in das Becken gelangen nicht direkt wieder ausgetragen werden. Zum anderen herrscht im Gleichstrom ein maximaler Konzentrationsgradient zwischen angereicherter Unterphase und unbeladener Oberphase. Dadurch ist der diffusive Stoffübergang am Einlass des Beckens begünstigt, welcher eine schnelle Aufkonzentrierung der Enzymmoleküle in der Oberphase ermöglicht (siehe Abschnitt 6.1.1).

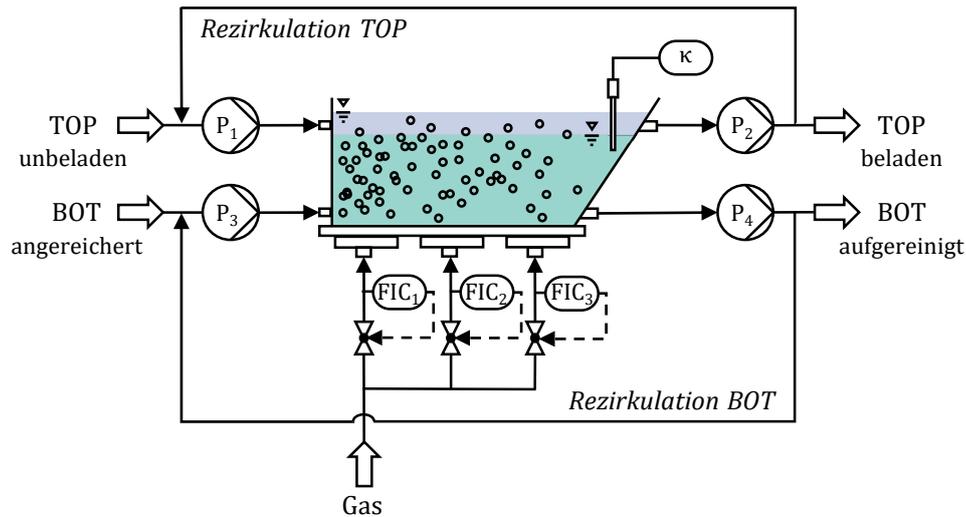


Abbildung 6-7: Schematische Darstellung des horizontalen Flotationsbeckens für die kontinuierliche wässrige Zweiphasen-Flotation mit drei Begasungseinheiten für die Führung der Ober- und Unterphase im Gleichstrom sowie möglicher Rezirkulation beider Phasen.

Durch die horizontale Orientierung ist es außerdem möglich, mehrere Begasungseinheiten in dem Flotationsbecken zu integrieren. Der daraus resultierende höhere Gasgrenzflächenenintrag verspricht eine hohe Flotationsratenkonstante (siehe Abschnitt 5.2.2) und damit ebenfalls eine schnelle Aufreinigung der Unterphase. Die über die drei Massendurchflussregler individuell einstellbaren Gasvolumenströme erlauben über die Längsgeometrie individuell einstellbare Begasungsraten, was wiederum die Phasenverwirbelung lokal beeinflusst. Während am Einlass eine Vermischung von angereicherter Unterphase und unbeladener Oberphase die Diffusion der Enzyme in die Oberphase beschleunigt, gilt es diese am Auslass zu vermeiden, um keine mit Unterphase vermischte beladene Oberphase aus dem Becken abzuführen.

Der mittels 3D-Druck hergestellte Prototyp erlaubt das Apparatekonzept zu testen. Das verwendete *InkJet*-Verfahren erlaubt nicht nur eine schnelle Fertigung des Beckens, sondern ermöglicht das Realisieren komplexer Geometrien. In Abbildung 6-8 ist der 3D-gedruckte Prototyp aus verschiedenen Blickrichtungen gezeigt. Die Grundfläche des Beckens beträgt 14,5 cm x 4 cm x 10 cm ($L \times B \times H$). Insgesamt fasst der Prototyp ein Unterphasenvolumen von 500 mL und ein Oberphasenvolumen von bis zu 100 mL. Eine technische Zeichnung des horizontalen Flotationsbeckens ist in Anhang A7 zu sehen.

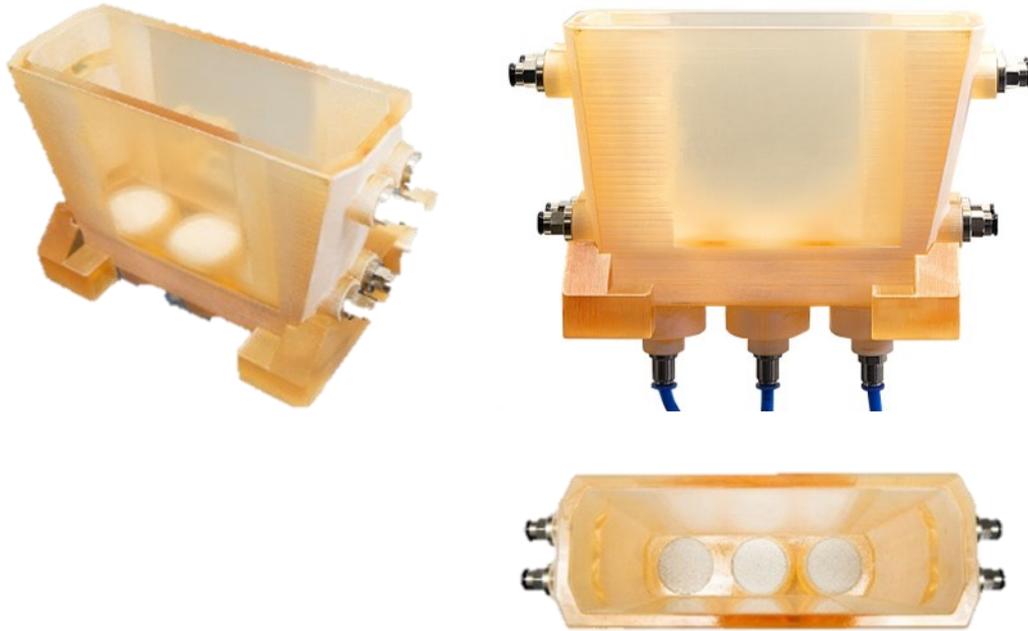


Abbildung 6-8: Verschiedene Ansichten des 3D-gedruckten Prototypen des horizontalen Flotationsbeckens für ein Unterphasenvolumen von 500 mL.

An beiden Stirnseiten des Beckens befinden sich jeweils zwei parallele Ein- bzw. Auslässe für die Ober- und Unterphase, welche sich ausgehend von einem 8 mm breitem kreisförmigen Querschnitt in einem 45°-Winkel zum Beckenrand hin öffnen. Dies verspricht ein gleichmäßiges Strömungsprofil über den Querschnitt des Beckens und dadurch reduzierte Totzonen, in welchen kein Flüssigkeitstransport stattfindet. Auf der Seite des Auslasses ist die Stirnseite in einem 100° Winkel schräg zum Boden angewinkelt. Dadurch bildet sich eine Ruhezone, in welcher sich die Ober- und Unterphase separieren, falls die vorherige Begasungseinheit eine geringe Phasenvermischung induziert. Begasungsmedien mit Durchmessern von bis zu 40 mm lassen sich durch spezielle, 3D-gedruckte Adapter in die drei Begasungseinheiten einsetzen.

Kontinuierliche Flotationen sind effizienter, wenn die flüssige Phase die Flotationszelle in einer Pfropfenströmung durchströmt und keine Rückvermischung, welche zu verkürzten oder zu langen Verweilzeiten führt, stattfindet [9]. Zur Charakterisierung der Durchströmung von Flotationszellen sind *Tracer*-Tests mit Farbstoffen üblich [87]. In Abbildung 6-9 sind Fotos aus der Draufsicht auf das Flotationsbecken während der Durchströmung mit 16,66 mL/min Unterphase (Phasenaustauschrate 2/h) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion eines roten Farbstoffs abgebildet.

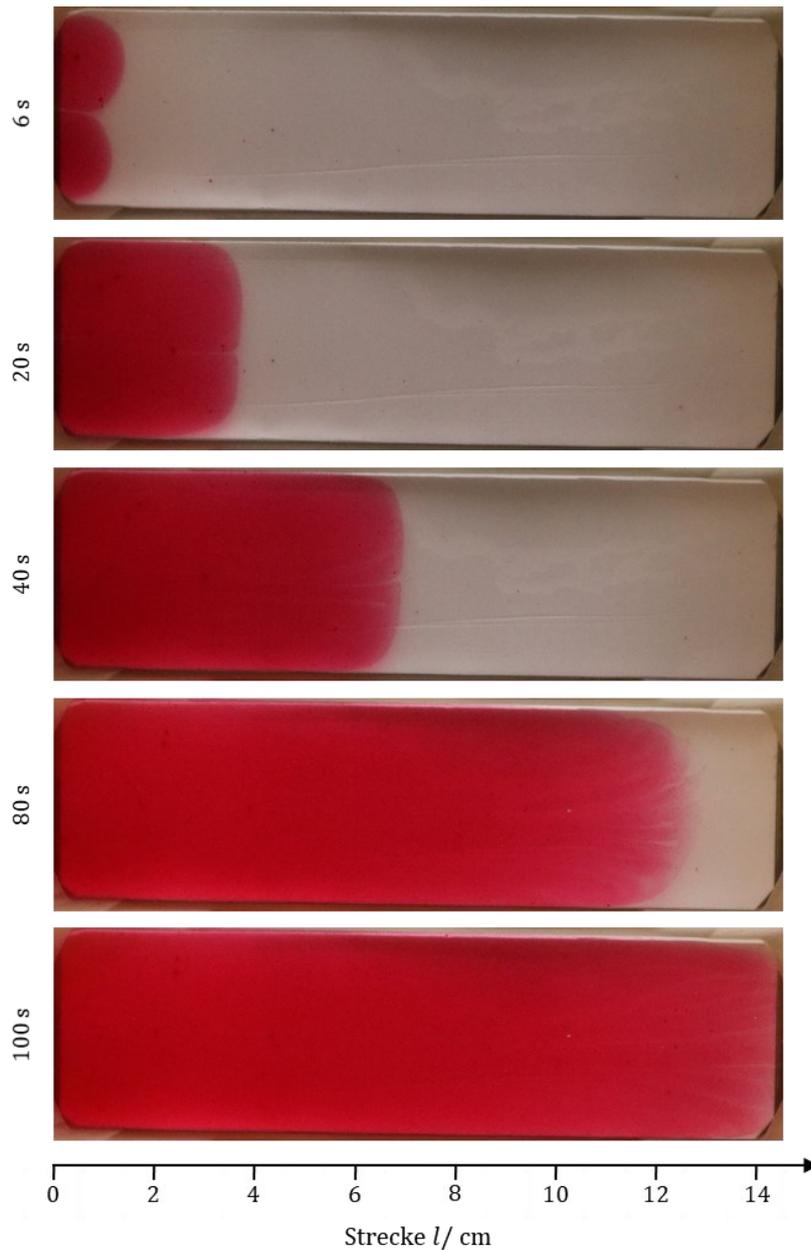


Abbildung 6-9: Charakterisierung der Durchströmung des horizontalen Flotationsbeckens für eine Phasenaustauschrate von 2/h durch Zugabe eines roten Farbstoffs zur Unterphase (Fotos aus der Draufsicht).

Nach 6 s bildet sich die angefärbte Unterphase halbkreisförmig hinter beiden Einlässen aus. Mit fortlaufender Durchströmung wachsen beide Strömungsprofile zusammen und es entsteht nach 20 s eine gemeinsame Front. Im Randbereich des Beckens hinkt die Strömung der Front in der Mitte hinterher. Nach 80 s sind die ersten 11 cm des Beckenbodens vollständig mit gefärbter Unterphase überflutet und die Front befindet sich bei ca. 13 cm. Neben der zum Beckenrand abfallenden Ausbreitung ist nun ebenfalls ein leichtes Ausfransen der Strömungsfront zu erkennen.

Nach 100 s erreicht die gefärbte Unterphase den Auslass des Beckens und färbt die gesamte Bodenfläche rot ein.

Der geringe Volumenstrom bei der Durchströmung des Beckens führt zu einer niedrigen, mittleren Strömungsgeschwindigkeit von 2,8 mm/s in den beiden Zulaufrohren und einer Reynoldszahl von $Re = 5,9$. Die damit laminare Strömung in den Zulaufrohren führt zu einem parabelförmigen Strömungsprofil (*Hagen-Poiseuille-Strömung*), das sich durch die im 45°-Winkel weitende Einlaufgeometrie in die Breite ausweiten kann. Nachdem die gefärbte Unterphase das Becken gelangt, reduziert sich die Strömungsgeschwindigkeit aufgrund der Breite des Beckens. Die beiden Strömungsprofile wachsen, getrieben von der durch die Reibung zum Beckenrand bedingten Verzögerung, zusammen und bilden eine gemeinsame Strömungsfront aus. Die gleichmäßige Geschwindigkeit in der Kernströmung sowie das durch die Haftbedingung am Beckenrand bedingte Nachhinken sind typisch für eine laminare Einlaufströmung [93]. Das beobachtete Ausfransen entlang der Front deutet auf geringe Diffusion hin, die zusätzlich zu einer gleichmäßigen Ausbreitung über die Breite des Beckens beiträgt.

Das gleichmäßige Vorschreiten der Strömungsfront indiziert eine Pfropfenströmung der Unterphase durch das Becken und verspricht einen effizienten Phasenaustausch im kontinuierlichen Betrieb der wässrigen Zweiphasen-Flotation. Die Ausbreitung der Strömung über die komplette Breite des Beckens verhindert Totzonen und gewährleistet, dass die Enzyme der angereicherten Unterphase über die Begasungseinheiten geführt werden und sich an die Gasblasen anlagern können.

6.2.2 Charakterisierung der Phasenverwirbelung

Die in der Unterphase aufsteigenden Gasblasen können während sie die Grenzfläche zur Oberphase passieren zu Verwirbelungen des wässrigen Zweiphasen-Systems führen (siehe Abschnitt 5.2.1). Die Phasenverwirbelung wirkt sich lokal entweder positiv oder negativ auf die Aufkonzentrierung der Enzyme in der Oberphase aus. Am Einlass des Flotationsbeckens unterstützt eine Verwirbelung aufgrund des hohen Konzentrationsgradienten die Diffusion der Enzyme in die Oberphase. Am Auslass hingegen verhindert eine Vermischung die Separation von Ober- und Unterphase.

Die Phasenverwirbelung lässt sich durch Leitfähigkeitsmessungen in der Unterphase charakterisieren. In Abbildung 6-10 ist die in der Unterphase gemessene elektrische Leitfähigkeit (κ) in Abhängigkeit des Massenanteils (ω) der im Becherglas durch Rühren dispergierten Oberphase aufgetragen. Die elektrische Leitfähigkeit κ der reinen Unterphase beträgt 13,16 ($\pm 0,008$) mS/cm. Mit zunehmendem Massenanteil in der Unterphase ω sinkt die Leitfähigkeit stetig und beträgt 12,75 ($\pm 0,000$) mS/cm für $\omega = 22\%$ (w/w). Gelöste Salzionen unterstützen den Elektronentransport in Wasser. Süßwasser weist eine elektrische Leitfähigkeit im $\mu\text{S/cm}$ -Bereich auf, während κ von Meerwasser zwischen 21 – 63 mS/cm beträgt [126].

Die in der Unterphase gemessene hohe elektrische Leitfähigkeit begründet sich demnach durch die hohe Salzkonzentration. Die Dispergierung der Oberphase in der Unterphase erhöht dort die Polymerkonzentration. Die langkettigen PEG 1000 Moleküle hindern die Citrationen an der freien Bewegung und führend mit zunehmender Konzentration zu einer stetigen Abnahme der Leitfähigkeit. Diese lässt sich durch den linearen Fit durch Gleichung (6.5) in Abhängigkeit des Massenanteils der in der Unterphase dispergierten Oberphase beschreiben.

$$\kappa = 13,18 - 0,019 \omega \quad (R^2 = 0,995) \quad (6.5)$$

Massenanteile von 11 % (w/w) und 22 % (w/w) dispergierter Oberphase entsprechen in etwa einer vollständigen Phasenverwirbelung des wässrigen Zweiphasen-Systems bei den Volumenverhältnissen von 0,1 bzw. 0,2. Die deutliche Leitfähigkeitsreduktion bei der Dispergierung dieser Massenanteile im Becherglas lässt eine Quantifizierung der durch den Gaseintrag induzierten Phasenverwirbelung mittels Leitfähigkeitsmessungen im Flotationsbecken realistisch erscheinen.

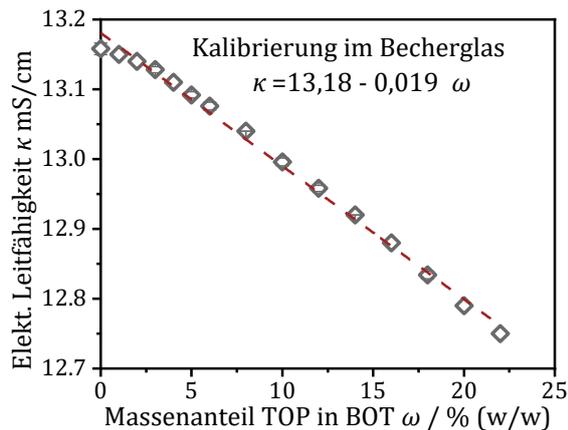


Abbildung 6-10: Kalibrierung der elektrischen Leitfähigkeit (κ) in der Unterphase in Abhängigkeit des dispergierten Massenanteils an Oberphase (ω).

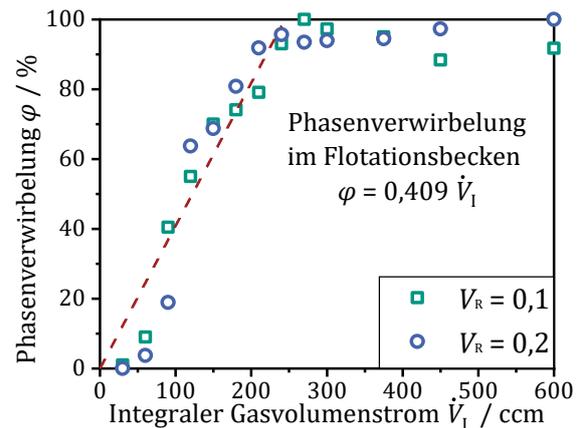


Abbildung 6-11: Phasenverwirbelung (φ) in Abhängigkeit des integralen Gasvolumenstroms (\dot{V}_I) während des Gaseintrags mit Metallgeweben im horizontalen Flotationsbecken.

In Abbildung 6-11 ist die Phasenverwirbelung (φ) in Abhängigkeit des integralen Gasvolumenstroms (\dot{V}_I) für die Volumenverhältnisse $V_R = 0,1$ und $V_R = 0,2$ während des Gaseintrags mit Metallgeweben im Flotationsbecken aufgetragen. Dabei sind bei allen drei Begasungseinheiten die gleichen individuellen Volumenströme (\dot{V}_i) eingestellt und die Leitfähigkeitsmessung erfolgt im Bereich des Auslasses 2 cm unterhalb der wässrigen Phasengrenze. Grundlage für die Bestimmung von φ ist der zuvor ermittelte lineare Zusammenhang zwischen κ und ω . Durch den Gasblaseneintrag erfolgt jedoch eine zusätzliche Reduktion der Leitfähigkeit in der Unterphase aufgrund einer statischen Hinderung der Ionenbewegung, sodass die Kalibrierungsgleichung (Gleichung (6.5)) nicht direkt anwendbar ist. Zur Ermittlung von φ ist deshalb die in den Versuchen minimale Leitfähigkeit mit einer vollständig verwirbelten Oberphase ($\varphi = 100$ %) gleichgesetzt und über eine lineare Regression mit dem Nullpunkt ($\varphi = 0$ %) bei der zu Versuchsbeginn herrschenden Leitfähigkeit ohne Gaseintrag erstellt.

Bis zu einem Gasvolumenstrom von 60 ccm beträgt der Anteil an verwirbelter Oberphase weniger als 10 % für beide Volumenverhältnisse. Bei einer Verdopplung des Gaseintrags auf $\dot{V}_I = 120$ ccm ist bereits über die Hälfte und ab $\dot{V}_I = 240$ ccm mehr als 90 % der Oberphase mit der Unterphase vermischt. Bis zu diesem Punkt ist ein linearer Trend in der Zunahme der Phasenverwirbelung unabhängig vom Volumenverhältnis zwischen Ober- und Unterphase zu erkennen. Eine weitere Steigerung der Begasung führt zu schwankenden Werten von φ zwischen 88 % und 100 %.

Wie bereits in Abschnitt 5.2.1 beschrieben, kann der Phasendurchtritt der Gasblasen in die Oberphase zu einer Verwirbelung des wässrigen Zweiphasen-Systems führen. Mit zunehmende Gasvolumenstrom erhöht sich nicht nur die Anzahl der eingetragenen Gasblasen sondern auch die Blasengröße (siehe Abschnitt 5.1.2) und die Phasenverwirbelung nimmt zu. Bis zu einem integralen Gasvolumenstrom von 240 ccm lässt sich diese durch Gleichung (6.6) abschätzen.

$$\varphi = 0,409 \dot{V}_1 \quad (R^2 = 0,974) \quad (6.6)$$

Die Ergebnisse bestätigen, dass durch Leitfähigkeitsmessungen die Phasenverwirbelung quantifizierbar ist. Durch die Installation einer Leitfähigkeitssonde im Auslassbereich des Beckens, lässt sich der Gaseintrag so anpassen, dass möglichst unvermischte Phasen abgezogen werden. Dies stellt eine erfolgreiche Aufkonzentrierung der Enzyme in der Oberphase sicher.

Der Gasblaseneintrag beeinflusst sowohl die Phasenverwirbelung des wässrigen Zweiphasen-Systems als auch die Aufreinigungsgeschwindigkeit entscheidend. Individuell eingestellte Gasvolumenströme der einzelnen Begasungseinheiten ermöglichen eine erfolgreiche Aufkonzentrierung der Enzyme in der Oberphase. Diese sind so zu wählen, dass sowohl ein hoher spezifischer Gasgrenzflächeneintrag und gleichzeitig eine möglichst geringe Phasenverwirbelung am Auslass des Beckens resultiert.

Die zuvor angestellten Untersuchungen zeigen, dass integrale Gasvolumenströme über 120 ccm zu sehr hohen Phasenverwirbelungen im Flotationsbecken führen. Um diese im Bereich des Auslasses möglichst gering zu halten und die Versuchsmatrix zu verkleinern, erfolgt ein Test ausgewählter Kombinationen der Gasvolumenströmen der Begasungseinheiten 1 – 3 (siehe Abbildung 6-7) unter der Bedingung, dass $\dot{V}_3 \leq \dot{V}_2 \leq \dot{V}_1$ gilt. In Abbildung 6-12 sind die aus verschiedenen Begasungskombinationen (\dot{V}_1 - \dot{V}_2 - \dot{V}_3 ccm) resultierenden spezifischen Gasgrenzflächeneinträge (S_b ; gefüllte Balken) und Phasenverwirbelungen (φ ; schraffierte Balken) aufgetragen und nach den jeweiligen integralen Gasvolumenströmen (\dot{V}_1) gruppiert.

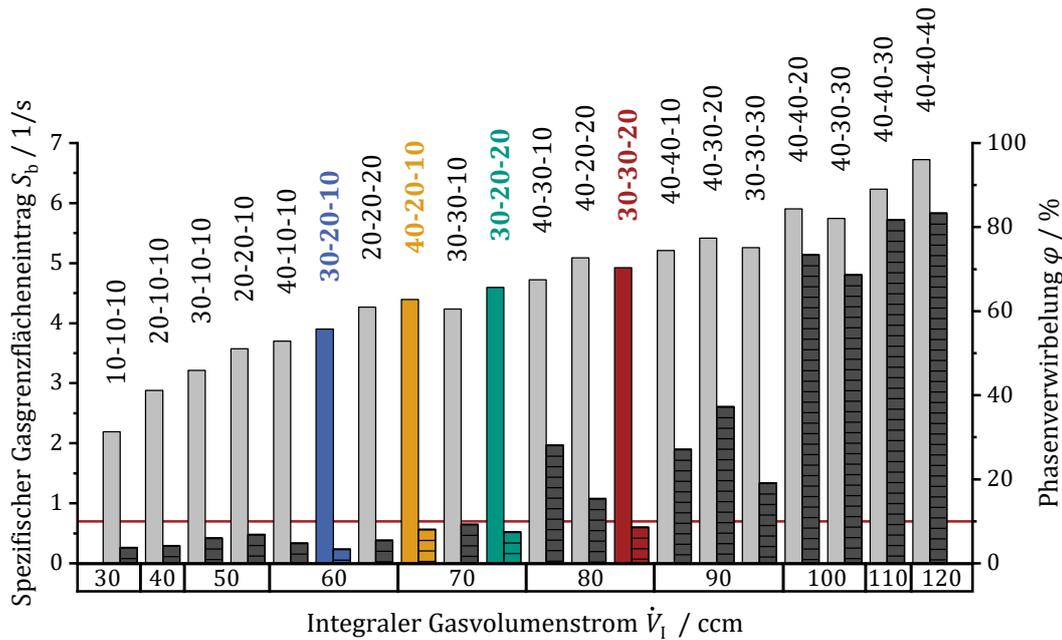


Abbildung 6-12: Spezifischer Gasgrenzflächeneintrag (S_b ; gefüllte Balken, links) und die Phasenverwirbelung (φ ; schraffierte Balken, rechts) für verschiedene integrale Gasvolumenströme (\dot{V}_1), welche sich aus unterschiedlichen Kombinationen individueller Gasvolumenströme (\dot{V}_i) der drei Begasungseinheiten mit Metallgeweben ergeben.

Es ist erkennbar, dass S_b mit zunehmenden integralen Gasvolumenstrom steigt. Während für die Begasungskombination 10-10-10 ccm $S_b = 2,2$ (1/s) gilt, erhöht sich dieser bei einer Verdreifachung von \dot{V}_1 auf 90 ccm auf maximal 5,4 (1/s) sowie bei einer Vervierfachung ($\dot{V}_1 = 120$ ccm) auf $S_b = 6,7$ (1/s). Innerhalb einer Gruppierung von \dot{V}_1 können sich die Werte für S_b jedoch unterscheiden. Beispielsweise resultiert bei der Gruppe $\dot{V}_1 = 70$ ccm der höchste S_b mit 4,6 (1/s) bei der Kombination 30-20-20 ccm während die Kombination 40-20-10 ccm zu $S_b = 4,4$ (1/s) führt. Obwohl nach Gleichung (2.32) der spezifische Gasgrenzflächeneintrag mit dem Begasungsvolumenstrom steigt, ist keine lineare Zunahme von S_b mit \dot{V}_1 zu beobachten. Dies begründet sich in steigenden Sauterdurchmessern bei Erhöhung der individuellen Gasvolumenströme. Auch innerhalb einer Gruppierung treten daher unterschiedliche spezifische Gasgrenzflächeneinträge auf.

Die Phasenverwirbelung folgt bis zu einem integralen Gasvolumenstrom von 70 ccm keinem klaren Trend und liegt für alle Begasungskombination unterhalb 10 % (rote horizontale Linie), wobei für die Kombination 30-20-10 ccm die minimale Phasenverwirbelung von 3,4 % resultiert. Bei der Gruppe $\dot{V}_1 = 80$ ccm, ist die Kombination 30-30-20 ccm die einzige, bei welcher $\varphi < 10$ % ist. Für noch höhere integrale Gasvolumenströme liegt die Phasenverwirbelung stets über der 10 %-

Marke. Ab $\dot{V}_1 = 100$ ccm ist der Anteil der Phasenverwirbelung über 68 % für alle untersuchten Begasungskombinationen. Mit steigenden individuellen Gasvolumenströmen nimmt sowohl die Größe, als auch die Anzahl der in die Unterphase eingetragenen Gasblasen zu. Dadurch erhöht sich die Beanspruchung der wässrigen Phasengrenze beim Aufsteigen der Blasen in die Oberphase, was eine Zunahme der Phasenverwirbelung bewirkt. Für eine engere Auswahl an möglichen Kombinationen, ist fortan das Kriterium $\varphi < 10$ % gewählt. Von den untersuchten Begasungskombinationen sind unter dieser Bedingung vor allem einige Einstellungen aus den Gruppen mit 70 ccm bzw. 80 ccm integralen Gasvolumenstrom interessant, da diese zu hohen spezifischen Gasgrenzflächeneinträgen führen. Bei der Begasung mit 30-20-20 ccm ist φ am geringsten und S_b gleichzeitig am höchsten innerhalb der Gruppe. Ähnliche Werte resultieren bei der Kombination 40-20-10 ccm. Die Kombination 30-30-20 ccm resultiert im höchsten Wert für S_b bei einer Phasenverwirbelung kleiner 10 %. Die Begasung mit 30-20-10 ccm gewährt eine minimalen Phasenverwirbelung bei immer noch hohem S_b .

6.2.3 Steigerung der Aufreinigungsgeschwindigkeit

Eine geeignete Begasungskombination für die Aufkonzentrierung der Enzyme während der kontinuierlichen wässrigen Zweiphasen-Flotation im horizontalen Flotationsbecken sollte sowohl einen hohen Gasgrenzflächeneintrag, als auch eine geringe Phasenverwirbelung am Auslass gewährleisten, um so eine hohe Aufreinigungsgeschwindigkeit und hohe Abscheidegrade zu ermöglichen.

Die im vorherigen Abschnitt diskutierten und in Abbildung 6-11 farbig hinterlegten Begasungskombinationen versprechen einen effizienten Gasblaseneintrag während der kontinuierlichen wässrigen Zweiphasen-Flotation. In Abbildung 6-13 sind die Abscheidegrade der Phospholipase während den Flotationsversuchen im horizontalen Flotationsbecken mit den verschiedenen Begasungskombinationen und einer konstanten Phasenaustauschrate von 1/h bei einem Volumenverhältnis von 0,2 aufgetragen. Die Standardabweichungen sind aus Übersichtsgründen nicht abgebildet.

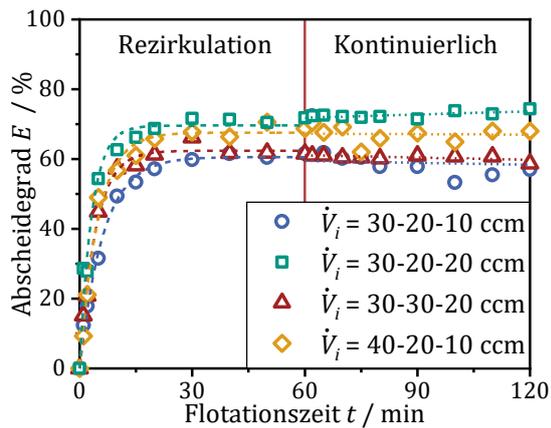


Abbildung 6-13: Abscheidegrade der Phospholipase während der Flotation im horizontalen Flotationsbecken für unterschiedliche Gasvolumenstromkombinationen während dem Gaseintrag über Metallgewebe.

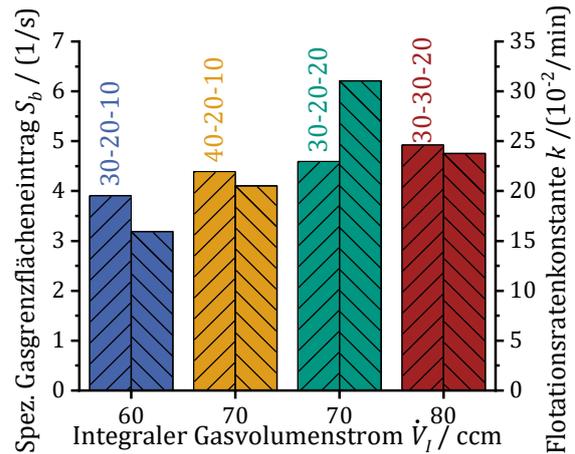


Abbildung 6-14: Spezifischer Gasgrenzflächeneinträge (S_b) und Flotationsratenkonstanten (k), welche aus den Flotationsversuchen im Flotationsbecken mit verschiedenen Begasungskombinationen resultieren.

Während der Rezirkulation, in welcher sowohl die Ober- als auch die Unterphase im Kreislauf durch das Becken gepumpt werden, steigen die Abscheidegrade stark an. Der im Vergleich flachste Anstieg ist bei der Begasungskombination 30-20-10 ccm (blaue Kreise) zu beobachten. Nach 15 min Flotationszeit nimmt die Steigung des Abscheidegradverlaufs ab und nach 30 min bleibt der Abscheidegrad für die restliche Zeit der Rezirkulation bei ca. 60 %. Am steilsten steigt der Abscheidegrad zu Beginn bei Begasung mit 30-20-20 ccm (grüne Vierecke) an und erreicht nach 15 min bereits 66,2 ($\pm 0,4$) %. Anschließend erfolgt auch hier ein Abknicken des Verlaufs des Abscheidegrads der zwischen 30 min und 60 min Flotationszeit im Mittel 71,3 ($\pm 0,5$) % beträgt. Die beiden anderen Begasungskombinationen führen zu einem ähnlich schnellen Anstieg des Abscheidegrads, wobei bei der Begasung mit 30-30-20 ccm (rote Dreiecke) ein früheres Abknicken und ein niedrigerer mittleren Abscheidegrad von 62,8 ($\pm 2,0$) % resultiert. Auch bei der Begasungskombination 40-20-10 ccm (gelbe Rauten) ist der Mittelwert des Abscheidegrades zwischen Minute 30 und 60 mit 68,3 ($\pm 1,5$) % niedriger als bei der 30-20-20 ccm Kombination.

Zu Beginn der Rezirkulationsphase ist die Unterphase mit Phospholipase angereichert und die Oberphase unbeladen. Mit Beginn des Gasblaseneintrags findet der Massentransfer der Enzyme in die Oberphase statt. Die Rezirkulation der beiden Phasen verhindert, dass Totzonen im Flotationsbecken entstehen, in welchem die Enzyme nicht mit den Gasblasen in Kontakt treten. Da während der Rezirkulation kein Phasenaustausch stattfindet, ähneln die Verläufe der Abscheidegrade denen aus der Batch-Flotation und es lässt sich der bekannte, exponentielle Fit (Gleichung

(2.31), gestrichelte Linien) anlegen. Dadurch lässt sich ebenfalls die Flotationsratenkonstante bestimmen, die für die gezeigten Versuche in Abbildung 6-14 zusammen mit dem spezifischen Gasgrenzflächeneintrag der verschiedenen Begasungskombinationen dargestellt ist. Hier zeigt sich, dass die Begasungskombination 30-20-10 ccm mit $k = 15,9 \cdot 10^{-2}/\text{min}$ die niedrigste Flotationsratenkonstante bewirkt. Mit zunehmenden S_b steigt auch der Wert von k bis zum Höchstwert von $31,0 \cdot 10^{-2}/\text{min}$ für die Begasungskombination 30-20-20 ccm. Die Werte der Begasungskombination 30-30-20 ccm weichen von diesem Trend ab, trotz höchstem spezifischen Gasgrenzflächeneintrag resultiert hier ein niedriger Wert von $k = 23,8 \cdot 10^{-2}/\text{min}$. Im Vergleich zur 30-20-20 ccm Kombination ist hier ein höherer Gasvolumenstrom an der zweiten Begasungseinheit. Die Folge ist eine höhere Phasenverwirbelung am Auslass des Beckens und dadurch begünstigte Rückdiffusion der Enzyme in die Unterphase.

Wie bereits in den Batch-Versuchen beobachtet, steigert ein hoher Gasgrenzflächeneintrag die Flotationsrate. Jedoch beeinflusst auch die Phasenverwirbelung den Massentransfer signifikant. Während Verwirbelungen am Einlass des Beckens zur Diffusion der Enzyme in die Oberphase beitragen, führen sie am Auslass des Beckens zu einer unerwünschten Rückdiffusion der Enzyme aus der beladenen Oberphase in die aufgereinigte Unterphase.

Im kontinuierlichen Betrieb (Minute 60 – 120) werden die abgezogenen Phasen nicht rezirkuliert, sondern im gleichen Maße durch angereicherte Unterphase bzw. unbeladene Oberphase am Einlass des Beckens ersetzt. Bei der Begasung mit 40-20-10 ccm stellt sich während des kontinuierlichen Betriebs ein nahezu konstanter Abscheidegrad von $67,2 (\pm 2,3) \%$ ein. Bei der Begasung mit 30-20-10 ccm und 30-30-20 ccm ist der Abscheidegrad abnehmend im zeitlichen Verlauf. Hier betragen die Steigungen der für den kontinuierlichen Betrieb angelegten linearen Fits (gepunktete Linien) $-0,019 \%/ \text{min}$ bzw. $-0,022 \%/ \text{min}$. Hingegen führt die Begasungskombination 30-20-20 ccm zu einer Zunahme des Abscheidegrads im kontinuierlichen Betrieb um $+0,03 \%/ \text{min}$ auf einen Endwert von $74,3 (\pm 2,0) \%$ nach 120 min Flotationszeit.

Ein konstanter Verlauf des Abscheidegrads resultiert bei einem Transport aller Enzymmoleküle, die in der angereicherten Unterphase in das Becken gelangen, in die Oberphase. Gehen hingegen nicht alle zugeführten Enzymmoleküle in die Oberphase über, bevor sie das Flotationsbecken am Auslass wieder verlassen, sinkt der Abscheidegrad im zeitlichen Verlauf. Dies scheint sowohl auf

einen zu niedrigen Gasgrenzflächeneintrag wie bei der Begasungskombination 30-20-10 ccm zutreffen, als auch auf eine zu hohe Phasenverwirbelung durch zu starke Begasung wie bei der Kombination 30-30-20 ccm. Der ansteigende Abscheidegrad bei der Begasung mit 30-20-20 ccm hingegen resultiert, wenn zusätzlich zu den neu zugeführten Enzymen noch vorhandene Enzyme der Unterphase in die Oberphase gelangen und gleichzeitig nur eine geringe Rückdiffusion am Auslass des Beckens erfolgt.

Für eine schnelle und hohe Aufkonzentrierung von Enzymen während der kontinuierlichen wässrigen Zweiphasen-Flotation ist die Wahl geeigneter individueller Gasvolumenströme der einzelnen Begasungseinheiten entscheidend. Der spezifische Gasgrenzflächeneintrag sowie die Phasenverwirbelung sind zwei entscheidende Parameter zur Beurteilung verschiedener Begasungskombinationen. Für den 3D-gedruckten Prototypen des horizontalen Flotationsbeckens ist die Begasung mit Metallgeweben mit den individuellen Gasvolumenströmen von 30-20-20 ccm als besonders vorteilhaft identifizierbar.

Der ansteigende Abscheidegrad während des kontinuierlichen Betriebs des Flotationsbeckens bei der Begasungskombination 30-20-20 ccm verspricht einen höheren Phasendurchsatz zu erlauben. In Abbildung 6-15 ist der Abscheidegradverlauf bei einer Verdopplung der Phasenaustauschrate auf 2/h (gefüllte Vierecke) im Vergleich zum bereits gezeigten Verlauf bei einer Austauschrate von 1/h (ungefüllte Vierecke) während einer Phasenführung im Gleichstrom aufgetragen. Zusätzlich zeigen die gekreuzten Vierecke den Abscheidegrad für einen Versuch, bei dem die Oberphase im Gegenstrom zur Unterphase mit einer Austauschrate von 1/h gepumpt wird.

Der Abscheidegrad während der Rezirkulationsphase bei einer erhöhten Phasenaustauschrate von 2/h ähnelt dem bereits beschriebenen Verlauf des Abscheidegrades bei einer Phasenaustauschrate von 1/h. Nach 15 min beträgt der Abscheidegrad hier 63,4 ($\pm 1,9$) %. Anschließend flacht der Verlauf ab und der Abscheidegrad beträgt zwischen Minute 30 und 60 im Mittel 67,5 ($\pm 2,3$) %. Im kontinuierlichen Betrieb führt die Erhöhung des Phasendurchsatzes zu einem um $-0,048$ %/min abnehmenden Abscheidegrad, sodass dieser nach 120 min Flotationszeit auf 66,0 ($\pm 1,7$) % absinkt.

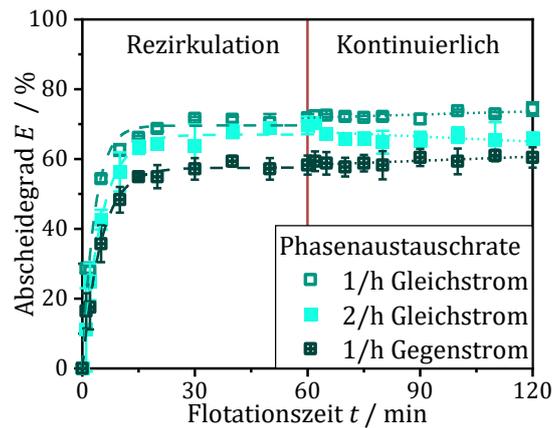


Abbildung 6-15: Abscheidegrade der Phospholipase während der Flotation im horizontalen Flotationsbecken für unterschiedliche Phasenaustauschraten und Strömungsrichtungen bei einer Begasung mit dem Metallgewebe und der Begasungskombination 30-20-20 ccm.

Das Pumpen beider wässrigen Phasen im Gegenstrom führt zu einem langsameren und niedrigeren Anstieg des Abscheidegrads während der Rezirkulation. Nach 15 min beträgt dieser 54,9 ($\pm 0,8$) % und pendelt sich zwischen Minute 30 und 60 auf 58,0 ($\pm 0,9$) % ein. Im kontinuierlichen Betrieb nimmt hier der Abscheidegrad mit einer Steigung von +0,040 %/min zu und beträgt nach 120 min Flotationszeit 60,4 ($\pm 2,9$) %

Im Gleichstrom hat die Erhöhung der Phasenaustauschrate von 1/h auf 2/h während der Rezirkulation einen geringen Einfluss auf den Abscheidegrad, der sich im Vergleich um ca. 3 %-Punkte reduziert. Da hier die beiden wässrigen Phasen im Kreislauf geführt werden, verändert die erhöhte Pumprate lediglich die Strömungsgeschwindigkeit durch das Becken, nicht jedoch die Konzentrationsverläufe. Die geringe Reduktion des Abscheidegrads ist vermutlich auf eine leicht erhöhte Phasenverwirbelung aufgrund der schnelleren Durchströmung des Beckens, und der damit verbundenen Rückdiffusion am Auslass, zurückzuführen. Während des kontinuierlichen Betriebs hingegen, gelangt bei höherer Phasenaustauschrate pro Zeit mehr Enzym in das Becken. Der abnehmende Trend des Abscheidegrads impliziert, dass nicht alle zugeführten Phospholipasemoleküle in die Oberphase transportiert werden.

Die Führung von Ober- und Unterphase im Gegenstrom verändert die Konzentrationsgradienten die im horizontalen Flotationsbecken herrschen. Auf der einen Seite trifft die angereicherte Un-

terphase auf die bereits beladene Oberphase und auf der gegenüberliegenden Seite fließt die unbeladene Oberphase über der aufgereinigten Unterphase. Dadurch reduzieren sich die Konzentrationsgradienten und damit die treibende Kraft der Diffusion. Die Folge ist eine niedrigere Aufreinigungsgeschwindigkeit und ein reduzierter Trenngrad während der Rezirkulation. Im kontinuierlichen Betrieb erhöht sich die Enzymkonzentration in der Unterphase, die der beladenen Oberphase gegenübersteht. Dadurch ist der diffusive Stofftransport wieder verstärkt und der Abscheidegrad steigt mit der Zeit an.

Der Vergleich zwischen Gleich- und Gegenstrom bestätigt die Überlegungen während der Konzeptionierung des horizontalen Flotationsbeckens (siehe Abschnitt 6.2.1), dass ein maximaler Konzentrationsgradient zwischen unbeladener Oberphase und angereicherter Unterphase am Einlass des Beckens die Diffusion der Enzyme in die Oberphase fördert. Die kontinuierliche wässrige Zweiphasen-Flotation ist am effizientesten, wenn sie im Gleichstrom und unter räumlicher Trennung der zu- und abgeführten Phasen betrieben wird. Die Phasenaustauschrate definiert den Durchsatz an angereicherter Unterphase, die pro Zeit aufreinigbar ist. Sie ist so zu wählen, dass ein möglichst konstanter Abscheidegrad während des kontinuierlichen Betriebs gewährleistet ist.

6.3 Schlussfolgerungen

In den vorherigen Kapiteln ist der Einfluss des Stoffsystems und des Gaseintrags auf die wässrige Zweiphasen-Flotation beschrieben. Sowohl der diffusive Stofftransport als auch die Flotation bestimmen den Massentransfer der Enzyme in die Oberphase. Aus den bereits gewonnenen Erkenntnissen und der Charakterisierung von Prozessparametern lässt sich sowohl die Prozessführung, als auch das Anlagendesign optimieren.

Eine hohe anfängliche Enzymkonzentration in der Unterphase führt zu einem hohen Konzentrationsgradienten zu Prozessbeginn und begünstigt dadurch die Diffusion der Enzyme in die Oberphase. Nach Möglichkeit sind aufzureinigende Biosuspensionen daher nicht zu verdünnen, sondern direkt mit den phasenbildenden Komponenten der Unterphase zu versetzen.

Auch die Blasenverweilzeit ist ein wichtiger Prozessparameter, wobei bereits geringe Füllhöhen für eine vollständige Beladung der Blasen während ihrem Aufstieg in der Unterphase ausreichen.

Die Ablösung der Enzyme während des Aufstiegs in der Oberphase hingegen hängt von der Aufstiegszeit innerhalb dieser ab. Um eine möglichst vollständige Ablösung zu erreichen, sollte die Füllhöhe der Oberphase möglichst hoch sein. Jedoch ist diese kein frei wählbarer Parameter, da das gewählte Volumenverhältnis beider Phasen und die Anlagengeometrie das Oberphasenvolumen bestimmen. Der Einsatz möglichst schmaler Flotationszellen bzw. Becken steigert die Blasenverweilzeit.

Die kontinuierliche wässrige Zweiphasen-Flotation weist eine höhere Raum-Zeit-Ausbeute gegenüber der Batch-Flotation auf. Jedoch sind vertikale Flotationszellen für einen kontinuierlichen Betrieb ungeeignet, da keine räumliche Trennung zwischen frischen und bereits prozessierten Phasen möglich ist. Das entwickelte horizontale Flotationsbecken erlaubt eine räumliche Trennung von Ein- und Auslass der Phasen und eine Steigerung des spezifischen Gasgrenzflächeneintrags durch mehrere Begasungseinheiten. Zudem ermöglicht die längliche Geometrie die Ober- und Unterphase im Gleichstrom zu pumpen, wodurch die Diffusion der Enzyme in die Oberphase am Einlass des Beckens begünstigt ist.

Leitfähigkeitsmessungen ermöglichen die Quantifizierung der Phasenverwirbelung im Becken. Durch lokale Anpassung der Gasvolumenströme lässt sich die Flotationsratenkonstante steigern und gleichzeitig eine Phasenvermischung am Auslass des Beckens verhindern. Durch die Wahl einer geeigneten Begasungskombination erhöht sich die Aufreinigungsgeschwindigkeit und ermöglicht eine höhere Phasenaustauschrate. Dadurch lässt sich pro Zeit entweder eine größere Menge Biosuspension aufarbeiten, oder bei gleichbleibendem Durchsatz das Apparatevolumen reduzieren. Damit scheint die kontinuierliche wässrige Zweiphasen-Flotation besonders geeignet als Aufreinigungsverfahren das kontinuierlichen Fermentationsprozessen nachgeschaltet ist.

Kapitel 7

Fazit und Ausblick für zukünftige Arbeiten

7.1 Zusammenfassung

Die erarbeitete Strategie zur Prozessentwicklung der wässrigen Zweiphasen-Flotation gliedert sich in drei Schritte. Diese sind in Abbildung 7-1 skizzierten und nachfolgend diskutiert.

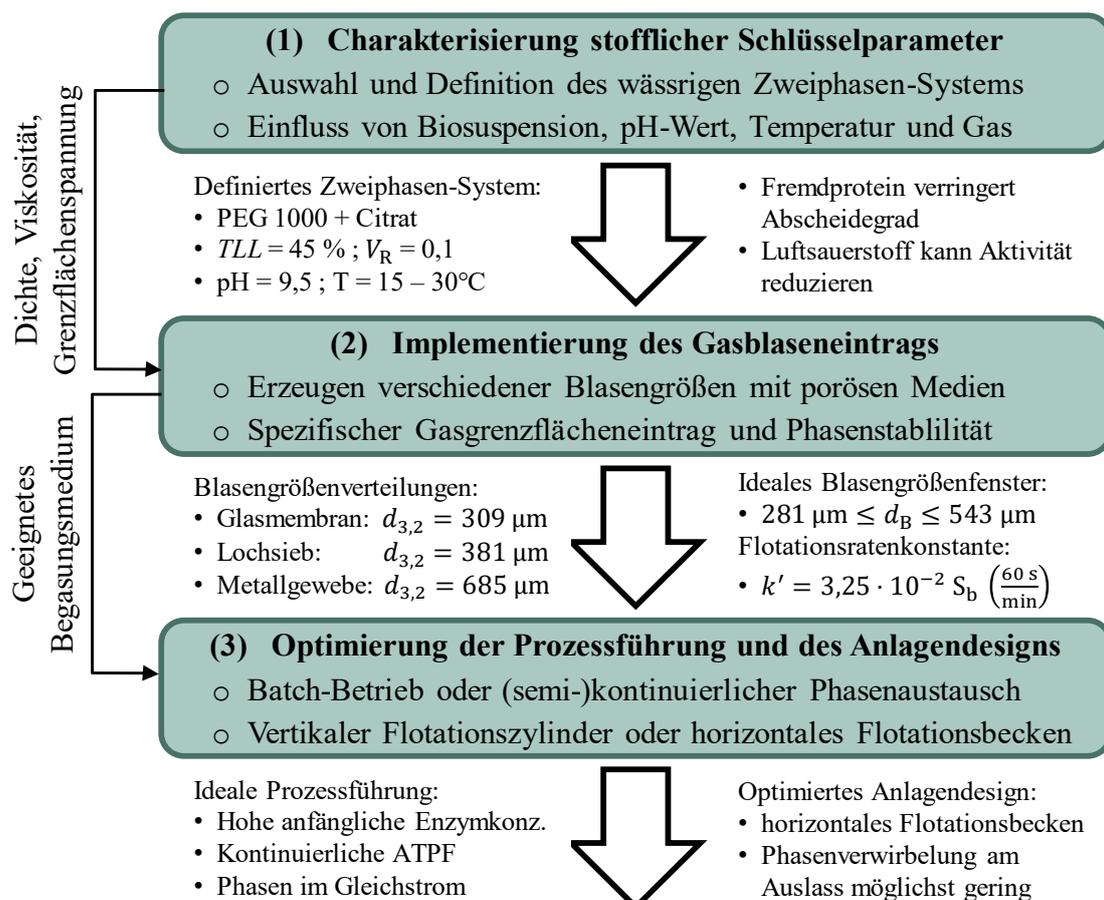


Abbildung 7-1: Strategie zur Prozessentwicklung der wässrigen Zweiphasen-Flotation mit den wesentlichen Ergebnissen und Erkenntnissen für die Aufreinigung des technischen Enzyms Phospholpase A₂.

(1) Charakterisierung stofflicher Schlüsselparameter

Für eine hohe Aufkonzentrierung der Phospholipase in der Oberphase bedarf es eines geeigneten Zweiphasen-Systems. Polymer-Salz-Systeme sind kostengünstig und eignen sich daher besonders zur Prozessierung großer Mengen an Biosuspension. Die Verwendung von biologisch abbaubaren Salzen den Aufwand bei der Abwasserbehandlung der aufgereinigten Unterphase nach der Flotation. Polyethylenglycol ist ein kostengünstiges, in verschiedenen Kettenlängen bzw. Molekulargewichten verfügbares Polymer, das sich als Hauptbestandteil der Oberphase eignet. Durch Trübungstitrationen lässt sich die Mischungslücke der phasenbildenden Komponenten bestimmen und ausgehend davon Ansatzpunkte für Extraktionsversuche ermitteln.

Die Extraktionsversuche erfolgen schnell und im kleinen Maßstab und erlauben es geeignete Phasenzusammensetzungen zu finden. Für einen möglichst hohen Abscheidegrad ist eine hohe Affinität des Produkts zur Oberphase nötig. Diese hängt maßgeblich von der gewählten Konodenlänge und damit von der aussalzenden Wirkung der Unterphase ab. Für eine hohe Aufkonzentrierung sorgt ein möglichst geringes Volumenverhältnis. Die Wahl eines geeigneten pH-Bereichs, sowie ggfs. die Zugabe additiver Salze kann den Verteilungskoeffizienten und somit die Aufkonzentrierung zusätzlich steigern.

Batch-Flotationen ermöglichen das Extraktionssystem in Hinblick auf eine schnelle Aufreinigung zu testen. Dabei erweist sich ein pH-Wert in der Nähe des isoelektrischen Punkts als vorteilhaft. Durch die neutrale Oberflächenladung von Makromolekülen wie Enzymen ist dort die Anlagerung an die hydrophoben Gasblasen begünstigt und somit die Flotationsratenkonstante maximal. Die Batch-Flotationsversuche offenbaren zusätzlich den Einfluss des Gases auf die Produktstabilität. Dabei kann Luftsauerstoff insbesondere bei Enzymen schädigend wirken und somit die biokatalytische Aktivität hemmen. Bei der Begasung mit Luft ist daher entweder auf kurze Prozesszeiten zu achten oder ein Wechsel auf ein inertes Gas wie Stickstoff in Betracht zu ziehen.

Die Selektivität der wässrigen Zweiphasen-Flotation ist bestimmt durch die Affinität von Zielprodukt und Verunreinigung zur Oberphase und von deren Wechselwirkungen mit den Gasblasen. Eine Flotation von in der Biosuspension enthaltenen Proteinen ist daher, je nach pH-Wert, nicht auszuschließen. Mikroorganismen neigen meist nicht zur Flotation und auch die Anwesenheit von

Antischaummitteln stört die wässrige Zweiphasen-Flotation nur geringfügig, sodass eine direkte Abtrennung und Aufkonzentrierung des Produkts aus Fermentationsbrühen möglich ist.

Für die Aufreinigung der Phospholipase erweist sich ein PEG 1000-Citrat-System bei einer Kollodienlänge von 45 % und einem Volumenverhältnis von 0,1 als vorteilhaft. Ein pH-Wert von 9,5 garantiert eine schnelle Flotation und hohe Abscheidegrade in einem Temperaturbereich zwischen 15 – 30 °C. Die Anwesenheit von additiven Salzen und anderen Bestandteilen von Fermentationsmedien zeigen keinen großen Einfluss auf das Trennergebnis. Eine Ausnahme bilden in Komplexmedien enthaltene Peptide und Aminosäuren, die den Trenngrad der Phospholipase reduzieren. Um trotzdem eine erfolgreiche Aufreinigung zu erzielen, sollten die Medienbestandteile während der mikrobiellen Fermentation möglichst aufgebraucht sein. Außerdem ist bei der Begasung mit Luft darauf zu achten, dass die Phospholipase maximal 45 min dem Luftsauerstoff ausgesetzt ist, da es sonst Aktivitätseinbußen kommt.

(2) Implementierung des Gasblaseneintrags in die Flotationszelle

Der Eintrag von Gasblasen in der Unterphase bildet die Grundlage des Massentransfers der Enzyme in die Oberphase. Durch poröse Medien wie gesinterte Glasmembranen, Lochsiebe und Metallgewebe können Gasblasen am Boden der Flotationszelle erzeugt werden. Für die Größe der entstehenden Blasen ist die Porengröße und besonders die äußere Porenstruktur entscheidend. Mit steigendem Gasvolumenstrom kann mehr Gas in die Blase gelangen, bevor sich diese von der Oberfläche ablöst und aufsteigt, was zu einer Zunahme des Blasendurchmessers führt.

Der Sauterdurchmesser charakterisiert die entstehende Blasengrößenverteilung. Mit zunehmender Citratkonzentration reduziert sich dieser aufgrund abnehmender Koaleszenz der Gasblasen. Die hohe Salzkonzentration in der Unterphase begünstigt damit kleine Sauterdurchmesser. Dies wirkt sich positiv auf den spezifischen Gasgrenzflächeneintrag aus, der mit sinkendem Sauterdurchmesser und steigendem Gasvolumenstrom zunimmt. Die Flotationsratenkonstante wiederum steigt linear mit dem Gasgrenzflächeneintrag an. Dieser zeigt sich als Schlüsselparameter zur Beurteilung des Gaseintrags und kann bei einer Maßstabsübertragung zur Gewährleistung hoher Aufreinigungsgeschwindigkeiten herangezogen werden.

Die Blasengröße beeinflusst jedoch nicht nur die Aufreinigungsgeschwindigkeit, sondern auch die Stabilität des wässrigen Zweiphasen-Systems. Sehr kleine Gasblasen können die wässrige Phasengrenzfläche aufgrund der Grenzflächenspannung nicht überwinden und bleiben in der

Grenzfläche stecken, bis sie mit anderen Blasen zu Blasenkomplexen agglomerieren und aufsteigen, oder werden direkt durch eine Rückströmung der verdrängten Flüssigkeit wieder zum Boden der Flotationszelle gezogen. Sehr große Blasen hingegen, ziehen während des Durchtritts durch die Phasengrenzfläche Unterphase mit in die Oberphase und führen so zu Phasenverwirbelungen. Diese können im schlimmsten Fall zu einer vollständigen Vermischung des wässrigen Zweiphasen-Systems führen.

Eine ideale Blasengrößenverteilung gewährleistet den Phasendurchtritt der Blasen und vermeidet die Phasenverwirbelung. Aus den Stoffeigenschaften (Grenzflächenspannung, Viskosität und Dichte) der beiden wässrigen Phasen lässt sich ein ideales Blasengrößenfenster ableiten. Für die Aufreinigung der Phospholipase im definierten PEG 1000-Citrat-System liegt dieses im Bereich zwischen 281 μm und 543 μm . Von den untersuchten Begasungsmedien zeigt das Metallgewebe mit 43 % den größten Anteil an entstehenden Blasen in diesem Bereich.

(3) Optimierung der Prozessführung und des Anlagendesigns

Für eine möglichst schnelle und effiziente Aufreinigung ist eine ideale Prozessführung und ein optimiertes Anlagendesign nötig. Neben der Flotation bestimmt auch der diffusive Stofftransport den Massentransfer des Produkts in die Oberphase. Dieser ist maximal, wenn der Konzentrationsgradient zwischen angereicherter Unterphase und unbeladener Oberphase möglichst hoch ist. Dafür ist eine hohe anfängliche Produktkonzentration in der Unterphase förderlich. Bei der Aufbereitung von Fermentationsbrühen sollten diese daher nicht verdünnt, sondern die phasenbildenden Komponenten zur Ausbildung der Unterphase direkt zugegeben werden.

Durch einen kontinuierlichen Austausch der beiden wässrigen Phasen, lässt sich ein günstiger Konzentrationsgradient erzielen. Besonders geeignet zeigt sich hierfür ein horizontales Flotationsbecken. Durch Pumpen der Ober- und Unterphase im Gleichstrom, fließen am Einlass unbeladene Ober- und angereicherte Unterphase übereinander. Der hohe Konzentrationsgradient bewirkt eine Diffusion des Produkts in die Oberphase. Eine mäßige Phasenverwirbelung in diesem Bereich erhöht die Phasengrenzfläche und damit den diffusiven Stofftransport in die Oberphase. Am Auslass hingegen werden die abgereicherte Unter- und beladene Oberphase abgeführt. Hier ist der diffusive Stofftransport der Flotation entgegengerichtet und eine Phasenverwirbelung wirkt sich negativ aus.

Durch das horizontale Design ist es möglich mehrere Begasungseinheiten am Boden des Flotationsbeckens zu installieren. Mit Leitfähigkeitsmessungen in der Unterphase lassen sich die Phasenverwirbelung quantifizieren und Begasungskombinationen wählen, die eine schnelle Aufkonzentrierung und hohe Abscheidegrade gewährleisten. Für die Auslegung der Apparategeometrie muss der Einfluss der Blasenverweilzeit untersucht werden. Durch geeignete Füllhöhen kann so eine vollständige Beladung der Gasblasen in der Unterphase und nach Möglichkeit eine vollständige Entladung in der Oberphase erzielt werden.

Die kontinuierliche wässrige Zweiphasen-Flotation der Phospholipase steigert die Raum-Zeit-Ausbeute im Vergleich zum Batchbetrieb um das 2,5-fache. Für die Anlagerung an die Gasblasen in der Unterphase zeigt sich eine Füllhöhe von 10 cm als ausreichend. Durch ein möglichst schmales Design des Flotationsbeckens ergibt sich gleichzeitig unter Wahrung des Volumenverhältnisses eine hohe Oberphase. Die Leitfähigkeitsmessungen im Bereich des Auslasses zeigen, dass ein hoher spezifischer Gasgrenzflächeneintrag und gleichzeitig eine geringe Phasenverwirbelung bei unterschiedlichen Gasvolumenströmen der drei integrierten Begasungseinheiten möglich sind. Der zu favorisierende Gaseintrag erfolgte mit dem Metallgewebe und einem Gasvolumenstrom von 30 ccm an der ersten Einheit nach dem Einlass, und jeweils 20 ccm bei den beiden anderen.

7.2 Einordnung der wässrigen Zweiphasen-Flotation

Die wässrige Zweiphasen-Flotation ist ein integratives Aufbereitungsverfahren für biotechnologisch hergestellte Produkte. Insbesondere bei kontinuierlichen Fermentationsprozessen verspricht die kontinuierliche ATPF die Betriebskosten deutlich zu reduzieren. Biomoleküle können direkt aus der Fermentationsbrühe abgetrennt und in der Oberphase aufkonzentriert werden. Die Notwendigkeit einer vorgeschalteten Zellseparation und der damit einhergehende Produktverlust entfallen. Zusätzlich sinken der apparative und energetische Aufwand des Aufbereitungsprozesses und es resultieren ein stark aufkonzentriertes Produktkonzentrat und hohe Ausbeuten. Durch die hohe Selektivität der ATPF kann außerdem eine hohe Produktreinheit erzielt werden. Für die finale Produktformulierung ist eine Verdrängungskristallisation der Biomoleküle in der polymerreichen Oberphase, eine Ultrafiltration oder die Separation in Röhrenzentrifugen denkbar. Diese sind aufgrund des reduzierten Volumens wirtschaftlich zu betreiben. Auch eine direkte

Sprühtrocknung der beladenen Oberphase kommt in Frage. Dabei könnte eine Pegylierung für eine zusätzliche Stabilisierung der Biomoleküle sorgen.

Durch den Massentransfer der Flotation stellt die ATPF einen energetisch effizienten Prozess dar. Gulden zeigte anhand eines Kostenvergleichs die Vorteile der Flotation gegenüber der Zentrifugation oder Querstromfiltration. Bei der Flotation von Biomasse aus einer Fermentationsbrühe entstehen sowohl geringere Energie- als auch Gesamtkosten pro Tonne erzeugten Produkts [127]. Gegenüber der Flotation bietet die ATPF zusätzlich den Vorteil, das Produkt in einer wässrigen Oberphase und nicht in einem schwer prozessierbaren Schaum aufzukonzentrieren. Durch das Ausnutzen des Auftriebs von Gasblasen findet die Flotation vor allem bei Trennaufgaben mit großen Volumenströmen und niedriger Produktkonzentration Anwendung.

Beides ist bei der Fermentation von industriellen Enzymen der Fall. Die großen Fermentationsmengen schränken den Einsatz klassischer Extraktion auf Grund der hohen Materialkosten ein. Deshalb findet die ATPE bisher im industriellen Maßstab nur für Pharmaenzyme Anwendung [6]. Die hohe Aufkonzentrierung, die Reduktion der Oberphase und der energieeffiziente Flotationsmechanismus machen die ATPF für die Produktaufreinigung technischer Enzyme deutlich attraktiver als die ATPE.

In Abbildung 7-2 sind klassische Aufbereitungsstrategien bei der Gewinnung technischer Enzyme der ATPF gegenüber gestellt. Durch die mikrobielle Fermentation in einem Bioreaktor liegen sowohl die extrazellulären Enzyme, als auch die Mikroorganismen und Verunreinigungen wie Medienbestandteile in einer verdünnten, wässrigen Suspension vor. Die direkte Abtrennung und Aufkonzentrierung durch die ATPF ermöglicht die Gewinnung eines Enzymkonzentrats in einem einzelnen Trennschritt. Hingegen müssen bei einer klassischen Aufbereitung zunächst die Mikroorganismen über Mikrofiltration oder Zentrifugation unter hohem Energieaufwand aus der Biosuspension entfernt und diese anschließend durch eine Ultrafiltration von gelösten Verunreinigungen befreit und aufkonzentriert werden.

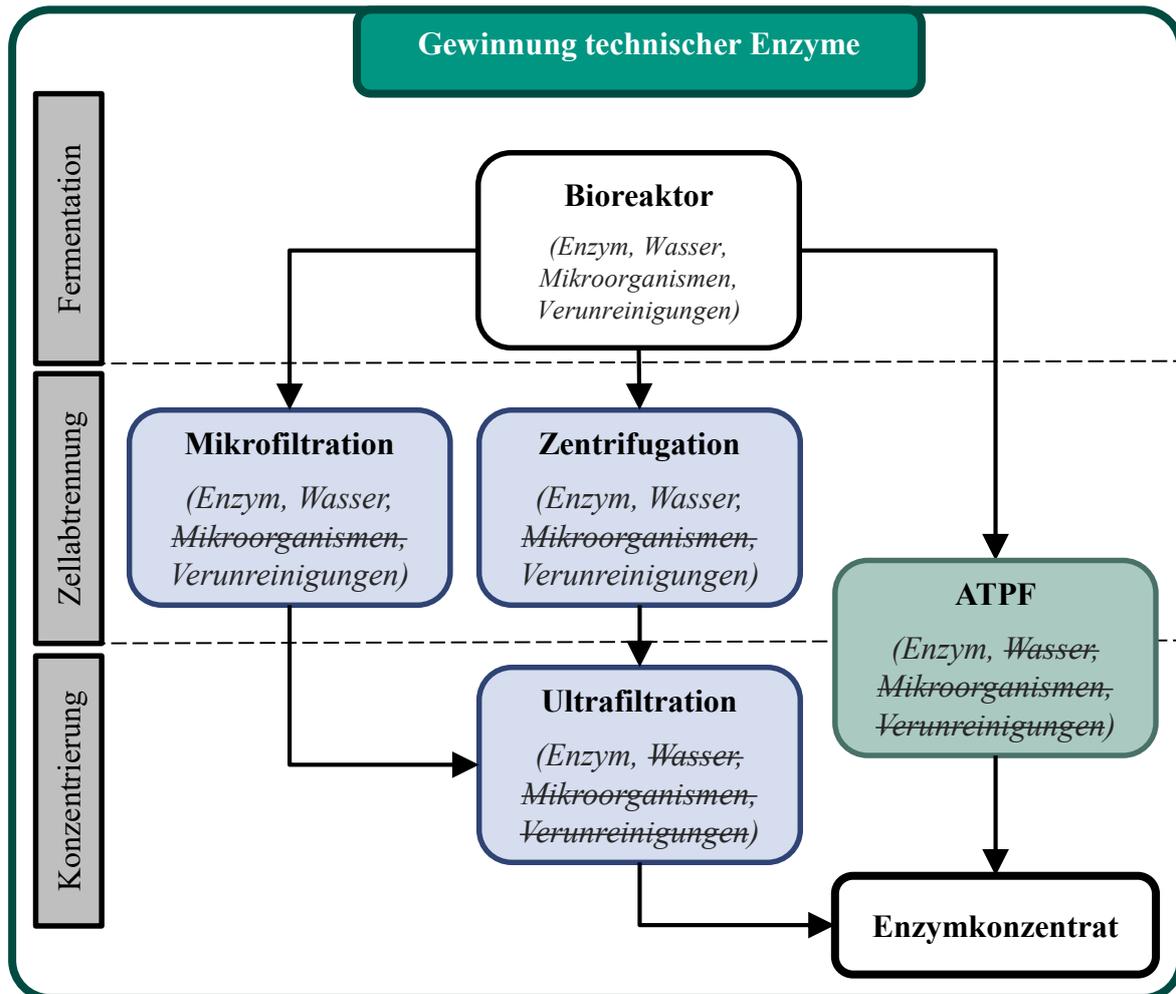


Abbildung 7-2: Vergleich möglicher Aufbereitungsstrategien bei der Gewinnung technischer Enzyme.

Die ATPF ist jedoch nicht auf die Aufreinigung von Enzymen beschränkt. Das Verfahren lässt generell auf die Abtrennung von Polymeren aus komplexen Suspensionen übertragen. Von besonderem Interesse sind beispielsweise Polyhydroxyalkanoate (PHA). Sie können durch mikrobielle Fermentation produziert werden und stellen als Grundstoff für Bioplastik eine umweltfreundliche Alternative zu herkömmlichen Kunststoffen dar. Obwohl Biokunststoffe biologisch abbaubar sind, schränken die hohen Herstellungskosten den Einsatz ein. Der Produktpreis von Biokunststoffen ist mit 3000-4500€/t deutlich höher als der von Massenkunststoffen (PE, PP oder PS) mit 1000-1200€/t [128]. Besonders die Abtrennung der PHA aus der Fermentationsbrühe (nach erfolgtem Zellaufschluss) begründet einen Großteil der Kosten. Die Extraktion stellt das am häufigsten zum Einsatz kommende Verfahren bei der PHA Aufreinigung dar, verursacht aber durch große Lösemittelmengen hohe Materialkosten. Auch die Flotation gilt als erfolgreicher Trennprozess für PHA. [129,130]

Auch für bereits bestehende Extraktionsprozesse ermöglicht die ATPF enorme Kostenersparnisse. Wie aktuelle Publikationen und Forschungsarbeiten zeigen kann durch die ATPF im Vergleich zur ATPE die eingesetzte Polymermenge um das 10-fache reduziert werden [17,25]. Rosa *et al.* betrachten die Kostenverteilung für einen industriellen Extraktionsprozess zur Aufreinigung von Antikörpern (840 m³/a Fermentationsvolumen). Die Materialkosten nehmen dabei 58 % der Betriebskosten ein, wobei wiederum 53 % der Materialkosten durch die Rohstoffkosten des Polymers für die Oberphase (hier: 1324 t/a PEG mit 2.000 US\$/t) verursacht werden. Im konkreten Fall betragen die Kosten für das PEG 2.648.000 US\$/a. [131]. Durch ein Ersetzen der ATPE durch die ATPF wäre also eine Ersparnis von 2.383.200 US\$/a (90% der PEG-Kosten) realistisch und würde den Kostenanteil des PEGs von ca. 30% auf 4% der Betriebskosten senken.

7.3 Ausblick

Die vorliegende Arbeit kann als Leitfaden für die Prozessentwicklung der ATPF von biotechnologisch hergestellten Produkten betrachtet werden. Für eine noch bessere Abstimmung des wässrigen Zweiphasen-Systems auf das Zielmolekül sind *high-throughput-screenings* zielführend. Der Einsatz von Pipettierrobotern ermöglicht hierbei das Testen einer größeren Anzahl verschiedener Zusammensetzungen des ATPS, um so Maxima für die Affinität der Biomoleküle zur Oberphase zu finden [4]. Die Kosten für die phasenbildenden Komponenten lassen sich durch ein Recycling dieser weiter senken. Die erfolgreiche Rückgewinnung von Polymeren und Alkoholen [23,132] aber auch Salzen [133] konnte für die Zweiphasen-Flotation bereits gezeigt werden.

Die Begasung über poröse Medien ermöglicht einen geeigneten Gasblaseneintrag in das Zweiphasen-System sowohl in kleinen Flotationszylindern (Labormaßstab), als auch größeren Flotationsbecken (kleiner Pilotmaßstab). Bei einer Maßstabsvergrößerung hin zu Produktionsanlagen ist der Einsatz vieler kleiner Begasungseinheiten denkbar. Diese bieten den Vorteil einer gleichmäßigen Gasdurchströmung. Bei einzelnen großen Begasungseinheiten besteht die Gefahr, dass das poröse Medium nur mittig durchströmt wird und die Außenbereiche nicht zur Blasenbildung beitragen und im schlimmsten Fall Flüssigkeit eintritt. Bei sehr großen Flotationsbecken ist ein Gaseintrag über Zweistoffdüsen, wie er in pneumatischen Flotationszellen zum Einsatz kommt, denkbar. Allgemein müssen bei der Maßstabsübertragung von Flotationszellen sowohl Prozesspa-

parameter (hier z. B. die Phasenaustauschrate) als auch das Anlagendesign (Geometrie, Strömungsbedingungen) berücksichtigt werden [134]. Insbesondere, um die Durchströmung des Flotationsbeckens abzuschätzen und auf größere Maßstäbe übertragen zu können und verschiedenen Geometrien zu evaluieren, scheinen Strömungssimulationen sinnvoll.

Für einen effizienten Betrieb der kontinuierlichen wässrigen Zweiphasen-Flotation ist eine geeignete Regelungsstrategie unabdingbar. Da die Produktkonzentration bei kontinuierlichen Fermentationsprozessen immer einer gewissen Schwankung ausgesetzt ist, bleibt auch die Zusammensetzung der angereicherten Unterphase bei einer kontinuierlichen Aufbereitung nicht konstant. Der Gaseintrag und der Phasenaustausch im Flotationsbecken muss deshalb regelbar sein, wofür es zunächst geeigneter online-Messtechnik bedarf. Durch UV/Vis-Durchflusszellen, ist es denkbar die Enzymkonzentration sowohl am Einlass, als auch am Auslass des Beckens zu messen. Steigt diese im Zulauf der Unterphase an, ist es nötig den spezifischen Gasgrenzflächen-eintrag zu erhöhen, um die Flotationsrate zu steigern und so bei gleicher Phasenaustauschrate den Abscheidegrad des Produkts konstant zu halten. Die stärkere Begasung kann jedoch zu einer unerwünschten Phasenverwirbelung am Auslass des Beckens führen. Um diese zu quantifizieren ist eine Leitfähigkeitsmessung, am besten an mehreren Stellen im Flotationsbecken, nötig. Können die Gasvolumenströme der einzelnen Begasungseinheiten nicht weiter erhöht werden, um eine zu starke Vermischung des Zweiphasen-Systems zu vermeiden, gewährt eine Reduzierung der Phasenaustauschrate eine gleichbleibende Aufreinigung. Dies führt jedoch zu erhöhten Verweilzeiten, wodurch es zu einer Schädigung der Biomoleküle kommen kann. Bei der Aufreinigung von Enzymen empfiehlt sich daher, die Aktivität am Auslass der Oberphase möglichst kontinuierlich zu messen. Denkbar hierfür sind z. B. kontinuierliche kolorimetrische Assays, bei welchen ein Bypass der beladenen Oberphase mit einer Substrat-Indikator-Lösung gemischt und in einer UV/Vis-Durchflusszelle analysiert wird.

Die erarbeitete Strategie zur Prozessentwicklung der ATPF erlaubt eine zielgerichtete Auslegung der ATPF für eine effiziente Abtrennung und Aufkonzentrierung von biotechnologischen Produkten aus komplexen Biosuspensionen. Zusätzlich ermöglichen die gewonnenen Erkenntnisse zum Gaseintrag, dem Anlagendesign und der Prozessführung eine Maßstabsübertragung und somit einen großtechnischen industriellen Einsatz der ATPF.

Anhang

A1. Chemikalien und technische Geräte

Die folgenden Tabellen listen die verwendeten Chemikalien und technischen Geräte auf.

Tabelle A1.1: Auflistung der verwendeten Chemikalien inklusive des Herstellers.

Chemikalie	Besonderheit	Firma	Sitz
CASO-Bouillon	TSB-Medium für die Mikrobiologie	Carl Roth GmbH.	Karlsruhe, DE
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	177,99 g/mol	Carl Roth GmbH.	Karlsruhe, DE
Lactobacillus Acidophilus	mind. $2 \cdot 10^{10}$ aktive Zellen / g	NPSelection	N/A
Lecithin aus Sojabohnen	mind. 97 %	Carl Roth GmbH.	Karlsruhe, DE
Natronlauge (NaOH)	5M	VWR	Radnor, US
Natriumchlorid	58,44 g/mol	Carl Roth GmbH.	Karlsruhe, DE
Natriumsulfat	142,04 g/mol	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Phenolrot	Ph.Eur.; 0,1 g in 100 mL Ethanol	Carl Roth GmbH.	Karlsruhe, DE
Polyethylenglycol 1000	Ph. Eur.; 950 - 1050 g/mol; Wassergehalt ≤ 1 %	Carl Roth GmbH.	Karlsruhe, DE
Polyethylenglycol 4000	Ph. Eur.; 3500 - 4500 g/mol; Wassergehalt ≤ 1 %	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Polyethylenglycol 8000	Ph. Eur.; 7300 - 9000 g/mol; Wassergehalt ≤ 1 %	Carl Roth GmbH.	Karlsruhe, DE
Salzsäure (HCl)	5M	VWR	Radnor, US
Silicon Antischaumemulsion	Dichte 1,00 g/mL	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Sternzym PLP 21159	Phospholipase A2: siehe Produktdatenblatt	SternEnzym GmbH	Ahrensburg, DE
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Ph.Eur. ; Wassergehalt 11-13 %	Carl Roth GmbH.	Karlsruhe, DE

Tabelle A1.2: Auflistung der verwendeten Geräte inklusive des Herstellers.

Geräte	Besonderheit	Firma	Sitz
3D-Printer AGI-LISTA-3200	Druckmaterial AR-M2 auf Acrylatbasis	KEYENCE	Neu-Isenburg, DE
Digitalkamera Canon EOS 70D	Objektiv von Sigma mit 150 mm Brennweite	Canon Deutschland GmbH	Krefeld, DE
Glasmembran G4	Duranglas; 10 - 16 μm Porengröße	SCHOTT AG	Mainz, DE
Laborzentrifuge 5430 R	bis 7700 rcf und Kühlung	Eppendorf SE	Hamburg
Leitfähigkeitsmessgerät cond 3110	0,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$... 1000 mS	WTW	Weilheim, DE
Lochsieb	Analysesieb, Porengröße 10 μm	N/A	N/A
Magnetrührer C-MAG HS 7	Mit Heizfunktion	IKA	Staufen, DE
Massendurchflussregler SLA5800	für Luft und Stickstoff bis 200 ccm	Brooks Instrument	Dresden, DE
Metallgewebe Top-Mesh TM10	Körpergewebe; 10 μm Partikelrückhalt	Spörl	Sigmaringendorf, DE
Peristaltikpumpe Ismatec REGLO ICC	4 Kanal, 0,22-1110 mL /min	Cole-Parmer	St. Neots, UK
pH-Messgerät pH 3110	pH 0 - 14	WTW	Weilheim, DE
Pipetten	0,1 - 10 mL	Eppendorf SE	Hamburg
Präzisionswaage Entris 4202i-1	0-4200 g ; $\pm 10^{-5}\text{g}$	Sartorius	Göttingen, DE
Refraktometer	N/A	A.KRÜSS Optronic GmbH	Hamburg, DE
Rotationsmischer Stuart STR-4	6-60 rpm	Cole-Parmer	St. Neots, UK
Sonotrode Digital Sonifier 450	Regelbare Amplitude	Branson Ultraschall GmbH	Fürth, DE
UV/ Vis Spektrophotometer UV-1900	Wellenlängenbereich 190 - 1100 nm	Shimadzu	Duisburg, DE

Produktdatenblatt des Phospholipase enthaltenen Pulvers Sternzym PLP 21159

Information



Sternzym PLP 21159

Microbial phospholipase for egg yolk hydrolysis and cake applications

Characteristics	Sternzym PLP 21159 is a phospholipase A ₂ also called lecithinase. It catalyses the partial hydrolysis of phospholipids. It reacts selective at the second position, causing a splitting off of the fatty acid at that position. The result is a polar lysolecithin.
Origin	Non-pathogenic microorganism
Activity	Phospholipase A ₂ : at least 20,000 u/g (pH 8) One unit hydrolyses 1µMol lecithin of a 2 % lecithin solution in one minute at pH 8 and 37 °C.
Applications	Sternzym PLP 21159 is used in the dairy industry as a processing aid during cheese manufacturing. In delicatessen and bakery applications Sternzym PLP 21159 improves emulsifying properties of egg yolk because of the hydrolysis of egg yolk lecithin to lysolecithin, a superior emulsifier.
Properties	<ul style="list-style-type: none"> • pH range: 5 – 10, optimum approx. 8.0 • Temperature range: 30 – 50 °C; the temperature optimum at pH 8.0 is approx. 40 °C, at pH 6 it is approx. 50 °C
Dosage	Add 5 % NaCl to the egg yolk. For better stirring the viscosity of the egg yolk can be reduced with addition of up to 5 % water. Modified egg yolk is prepared by a three hour hydrolysis of egg yolk at 50 °C with 0.05 – 0.15 % Sternzym PLP 21159 . After treatment 10 min at 60 °C inactivates the enzyme. Alternatively Sternzym PLP 21159 can be added to the dough at 10 to 30 ppm, depending on the process for whole egg reduction of 5 percentage points and improved cake softness.
Storage	Store cool and dry; activity loss on storage less than 10 % per year
Packaging	Cardboard box with PE-inliner or paper bag, 25 kg net

Information



Activity data

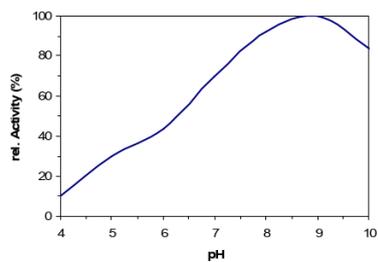


Fig. 1: pH activity (Substrate 1 % soy)

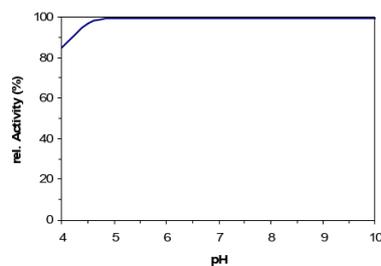


Fig. 2: pH stability (40 °C, 30 min)

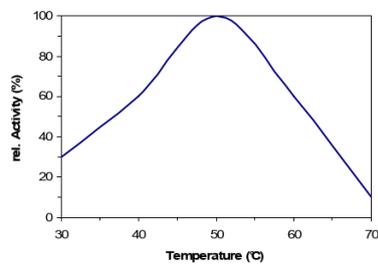


Fig. 3: Temperature activity (pH 8.0, 10 min)

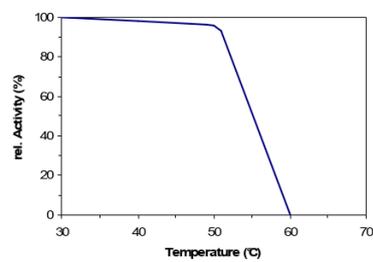


Fig. 4: Temperature stability (pH 8.0, 30 min)

A2. Binodalen und Konodengleichungen

Tabelle A2.1: Die durch den Mistry-Fit (Gleichung (3.5)) bestimmten Parameter, welche die Binodalen der Zweiphasen-Systeme bei 20 °C von Citrat mit PEG verschiedener Molekulargewichte beschreiben

PEG	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>R</i> ²
PEG 1000	4,41	--1,56E-04	-0,426	0,999
PEG 4000	4,44	-4,95E-04	-0,567	0,999
PEG 8000	4,51	-7,45E-04	-0,644	0,999

Tabelle A2.2: Die durch verschiedene Mischungspunkte bei 20 °C bestimmten Parameter der Gerdadengleichung (3.10) zur Darstellung der Konoden.

PEG	$x_{\text{Citrat}}^{\text{MP}}$ in %(w/w)	$x_{\text{PEG}}^{\text{MP}}$ in %(w/w)	<i>n</i> in %(w/w)	<i>m</i>	<i>R</i> ²
PEG 1000	20,0	7,5	44,2	-1,79	0,998
PEG 4000	17,6	5	38,8	-1,92	0,999
PEG 8000	15,0	5	34,3	-1,98	0,999

A3. Optische Blasengrößenanalyse

Bildausschnitt von aufsteigenden Gasblasen

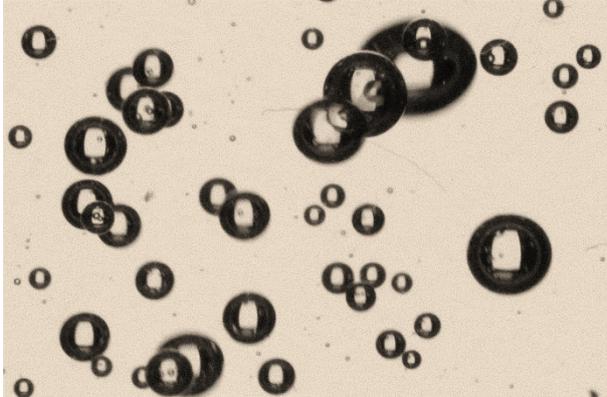


Abbildung A3.1: Bildausschnitt aufsteigender Gasblasen während der optischen Blasengrößenanalyse.

Schwellenwertfindung und Binarisierung

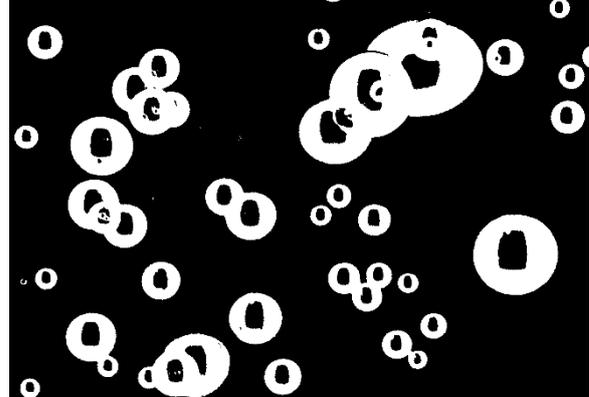


Abbildung A3.2: Binarisierung des Bildes nach vorheriger Schwellenwertfindung nach „Otsu“.

Füllen des Blaseninneren



Abbildung A3.3: Ausfüllen der Reflektionen der Beleuchtung im Blaseninneren mit Hilfe von „Fill Holes“.

Umrissermittlung durch „Ellipse Split“

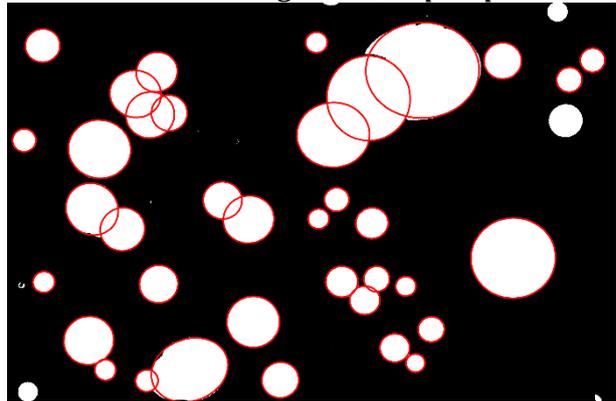


Abbildung A3.4: Ermittlung der Blasenumrisse, zur Bestimmung der Blasengrößen durch „Ellipse Split“.

Projektion der Umriss auf Originalbild

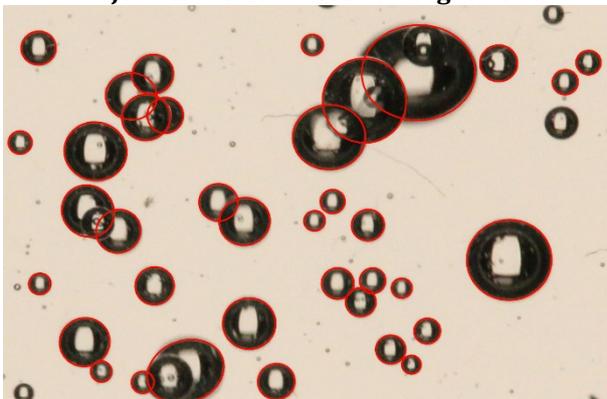


Abbildung A3.5: Projektion der Ermittelten Blasenumrisse auf das Originalbild zur Kontrolle.

Fehlerabschätzung des Systemaufbaus

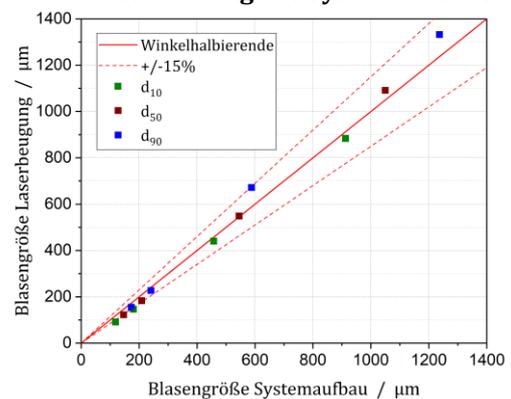


Abbildung A3.6: Fehlerabschätzung des Systemaufbaus zur optischen Blasengrößenanalyse.

A4. Kolorimetrisches Aktivitätsassay

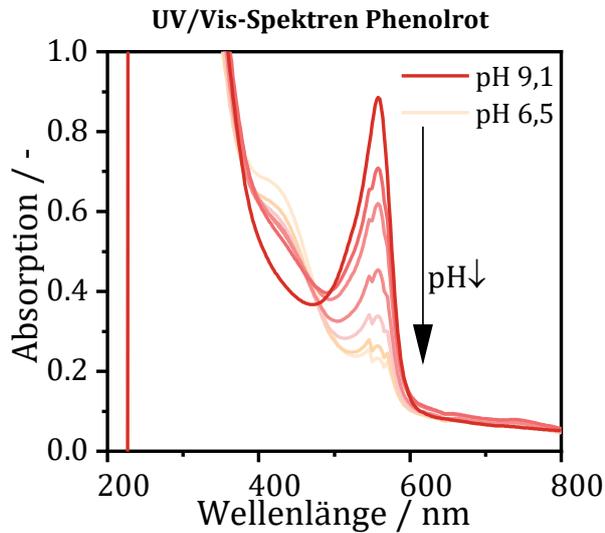


Abbildung A4.1: Absorptionsspektren von Phenolrot für verschiedene H_3O^+ Konzentrationen.

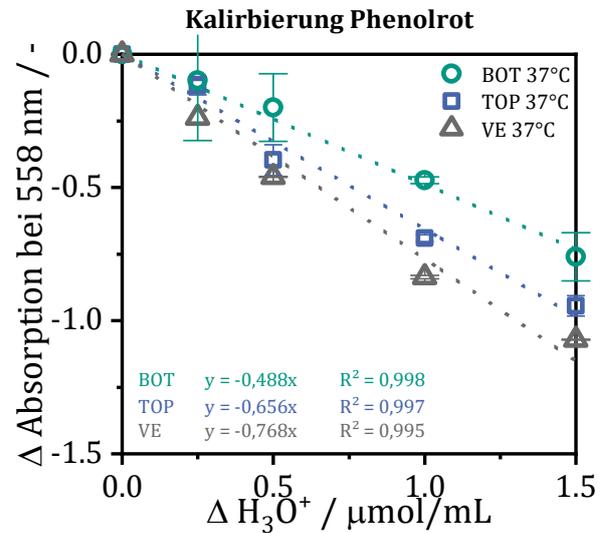


Abbildung A4.2: Absorptionsänderung bei 558 nm von Phenolrot für verschiedene H_3O^+ Konzentrationen.

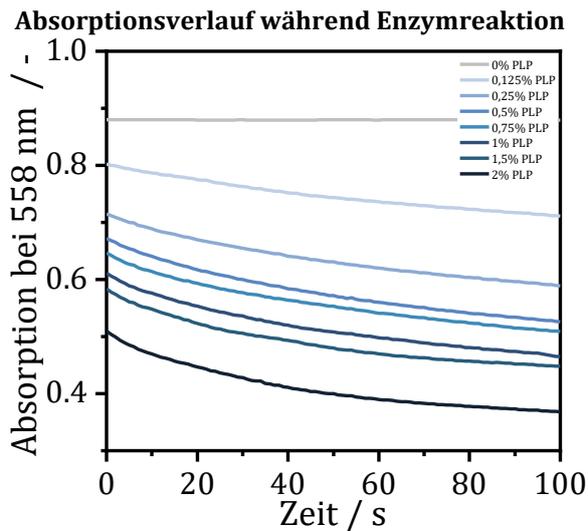


Abbildung A4.3: Absorptionsverläufe bei 558 nm der Enzymreaktion für verschiedene PLP-Konzentrationen.

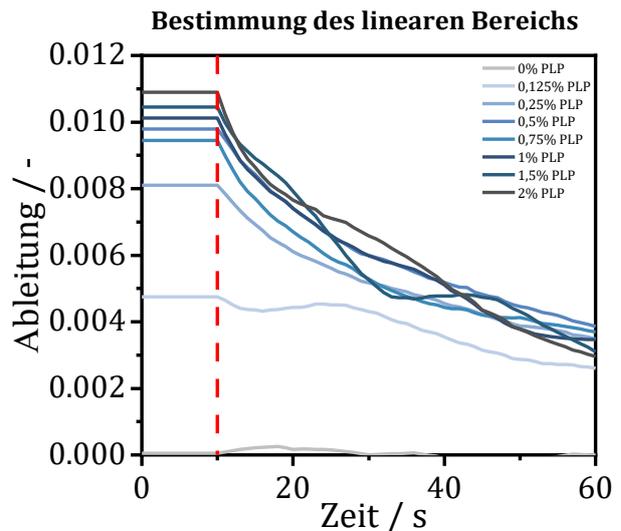


Abbildung A4.4: Erste Ableitungen der Absorptionsverläufe bei 558 nm aus A 4.3.

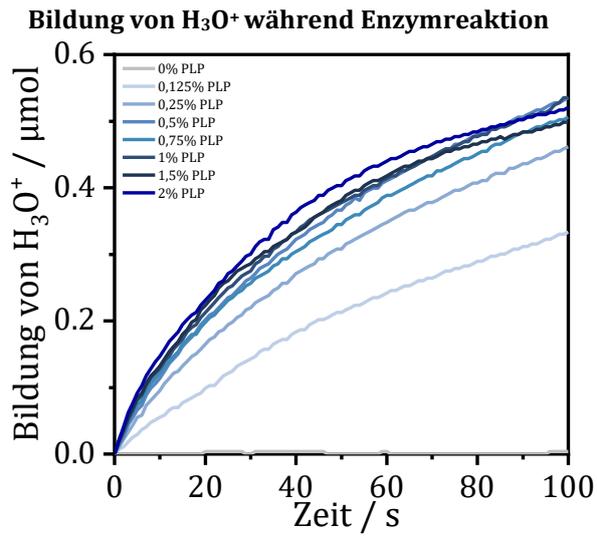


Abbildung A4.5: Bildung von H_3O^+ während der Enzymreaktion für verschiedene PLP-Konzentrationen.

A5. Kalibrierungen für die Konzentrationsbestimmungen

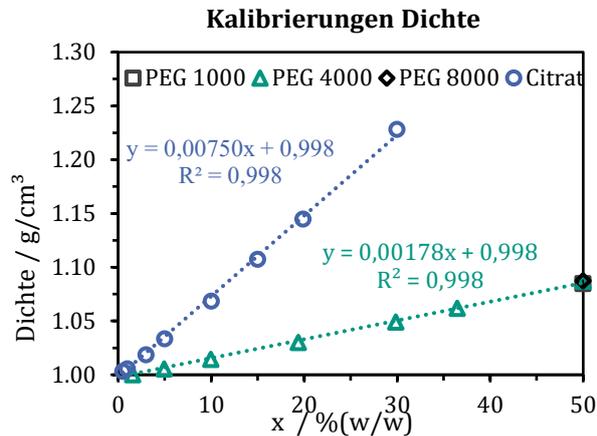


Abbildung A5.1: Dichte einer wässrigen Lösung bei 20 °C in Abhängigkeit der Massenkonzentrationen an gelöstem PEG oder Citrat.

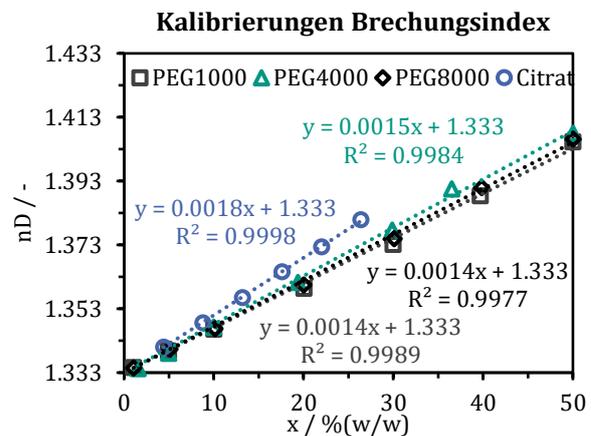


Abbildung A5.2: Brechungsindex einer wässrigen Lösung bei 20 °C in Abhängigkeit der Massenkonzentrationen an gelöstem PEG oder Citrat.

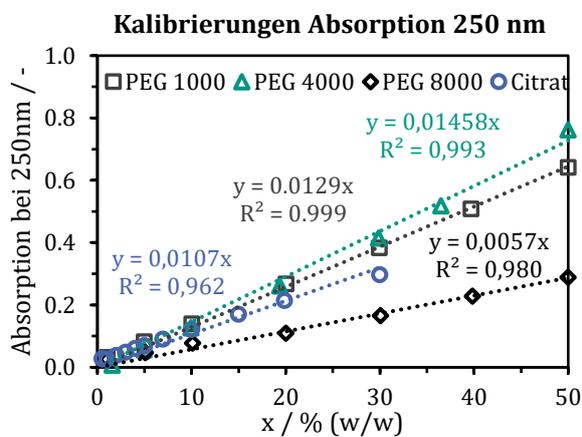


Abbildung A5.3: Absorption bei 250 nm Wellenlänge einer wässrigen Lösung bei 20 °C in Abhängigkeit der Massenkonzentrationen an gelöstem PEG oder Citrat.

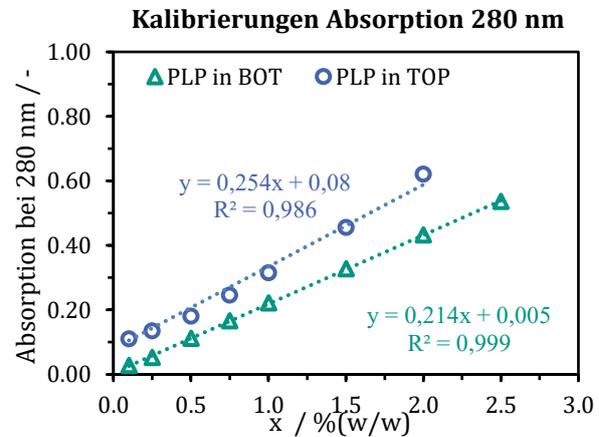


Abbildung A5.4: Absorption bei 280 nm Wellenlänge der Unter- bzw. Oberphase bei 20 °C in Abhängigkeit der Massenkonzentrationen an gelöster Phospholipase

Tabelle A5.1: Kalibrierungsbeiwerte für die Dichte (D), den Brechungsindex (R), sowie die Absorptionen bei 250 nm Wellenlänge (ϵ^{250nm}) für die verschiedenen phasenbildenden Komponenten und die Kalibrierungsbeiwerte (ϵ^{280nm}) der in Unterphase (BOT) und Oberphase (TOP) gelösten Phospholipase (PLP) bei 20 °C.

Phasenbildende Komponente	$D / \frac{g}{cm^3}$	$R / -$	$\epsilon^{250nm} / -$	$\epsilon^{280nm} / -$
Citrat	0,00750	0,0018	0,01083	
PEG 1000	0,00179	0,0014	0,01290	
PEG 4000	0,00178	0,0015	0,01458	
PEG 8000	0,00179	0,0014	0,00578	
PLP in BOT				0,214
PLP in TOP				0,254

A6. Versuchsaufbau Batch-Flotation

Versuchsaufbau für die Batch-Flotationen

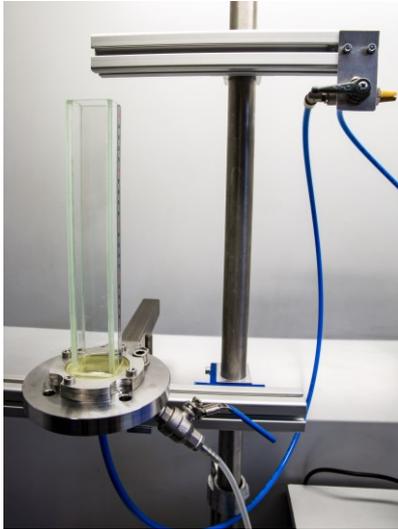


Abbildung A6.1: Vertikale Flotationszelle für die Batch-Flotationen, mit Begasungseinheit und Ablass.

Vertikale Flotationszelle



Abbildung A6.2: Nahaufnahme der breiten Glas-
küvette, welche als vertikale Flotationszelle diente.

Ober- und Unterphase zu Beginn der Flotation

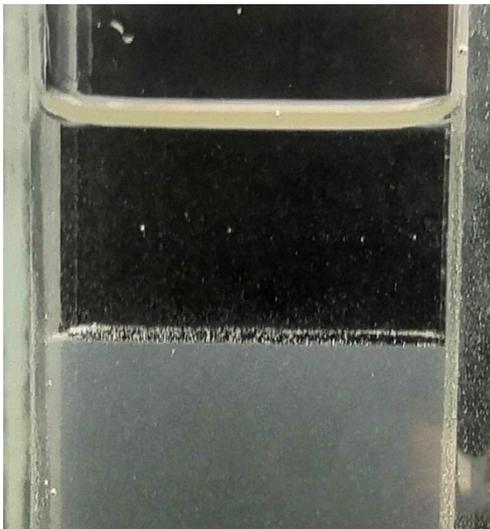


Abbildung A6.3: Foto der klaren Oberphase und Ausschnitt der leicht getrübbten Unterphase zu Beginn eines Flotationsversuches.

Ober- und Unterphase am Ende der Flotation

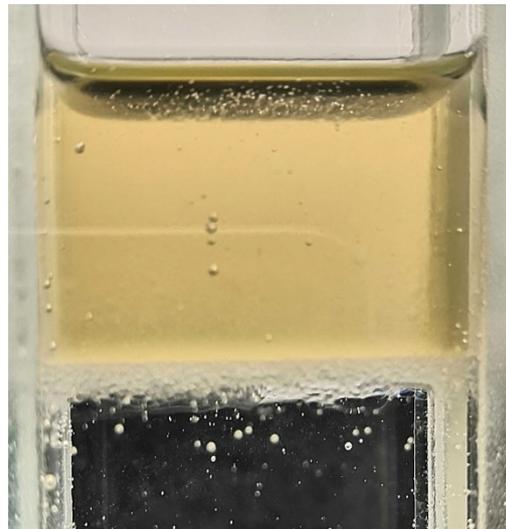


Abbildung A6.4: Foto der durch die Enzymanreicherung gelb gefärbten Oberphase und Ausschnitt der klaren Unterphase am Ende eines Flotationsversuches.

A7. Versuchsaufbau kontinuierliche Flotation

Foto des Versuchsaufbaus für die kontinuierliche Flotation



Abbildung A7.1: Versuchsaufbau für die kontinuierliche Flotation im horizontalen Flotationsbecken (0), mit Schläuchen für die Zu- und Ableitungen (1) der mit der 4-Kanal Schlauchpumpe (2) geförderten Phasen, der Vorlage angereicherter Unterphase (3) und Oberphase (4), sowie der Steuereinheit (5) für die drei Massendurchflussregler (6) für die Begasungseinheiten (7) und der Leitfähigkeitsmessung, bestehend aus Sonde (8) und Messgerät (9).

Technische Zeichnung des horizontalen Flotationsbeckens für die kontinuierliche Flotation

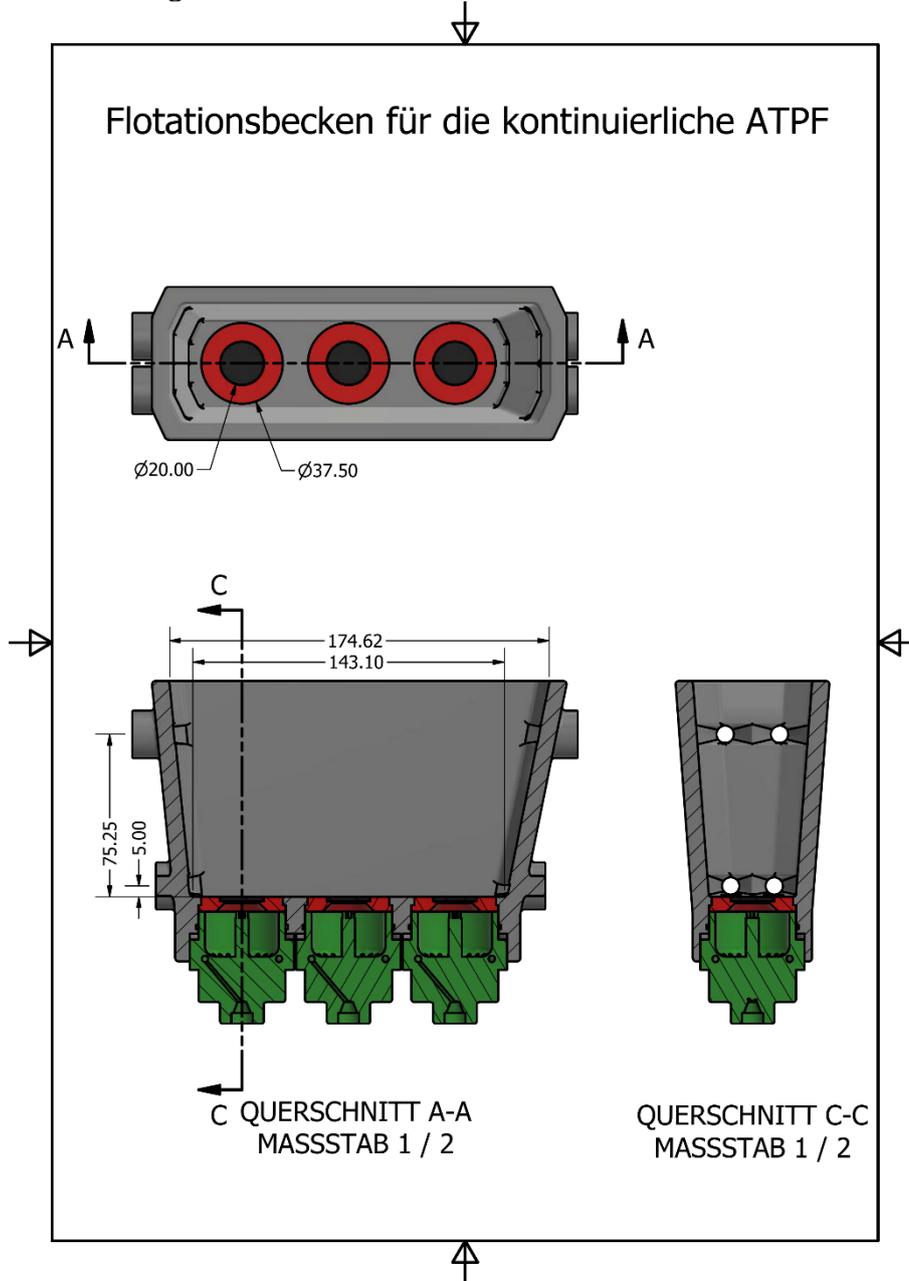


Abbildung A7.2: Technische Zeichnung des horizontalen Flotationsbeckens mit Draufsicht (oben), Seitenansicht (unten links) und Querschnitt (unten rechts). Grau stellt den 3D-gedruckten Grundkörper dar mit je zwei Ein- und Auslässen für die Ober- und Unterphase auf jeder Seite. Die drei Begasungseinheiten bestehen jeweils aus einem ebenfalls 3D-gedruckten Gasverteiler (grün), einer Silikodichtung (rot) sowie dem runden Begasungsmedium (schwarz).

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzung

ATPE	Wässrige Zweiphasen-Extraktion (<i>aqueous two-phase extraction</i>)
ATPF	Wässrige Zweiphasen-Flotation (<i>aqueous two-phase flotation</i>)
ATPS	Wässriges Zweiphasen-System (<i>aqueous two-phase system</i>)
BOT	Unterphase (<i>bottom phase</i>)
Citrat	Tri-Natriumcitrat Dihydrat
GF	Grenzfläche
GM	Glasmembran
LS	Lochsieb
MG	Metallgewebe
MP	Mischungspunkt in einem wässrigen Zweiphasen-System
PEG	Polyethylenglycol
PEG 1000	Polyethylenglycol mit Molekulargewicht von 1000 Da
PEG 4000	Polyethylenglycol mit Molekulargewicht von 4000 Da
PEG 8000	Polyethylenglycol mit Molekulargewicht von 8000 Da
PLP	Phospholipase
<i>rcf</i>	relative Zentrifugalkraft (<i>relative centrifugal force</i>)
<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute (<i>round per minute</i>)
TLL	Konodenlänge (<i>tie-line length</i>)
TOP	Oberphase (<i>top phase</i>)
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser

Lateinische Symbole

a	katalytische Aktivität
A	Fläche
$A_{280\text{nm}}$	Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm
Ar	Archimedeszahl
c	Konzentration
\tilde{c}	Molare Konzentration
c_{∞}	Gleichgewichtskonzentration
c_W	Widerstandsbeiwert
D	Diffusionskoeffizient
$d_{3,2}$	Sauterdurchmesser
d_B	Blasendurchmesser
d_P	Porendurchmesser
E	Abscheidegrad
E_{∞}	finaler Abscheidegrad
f	Aktivitätskoeffizient
F	Faradaykonstante
F_A	Auftriebskraft
F_G	Gewichtskraft
$F_{\sigma GF}$	Grenzflächenkraft
g	Erdbeschleunigung
J	Diffusionsstromdichte
k	Flotationsratenkonstante
k'	korrigierte Flotationsratenkonstante
k_B	Boltzmannkonstante
K_m	Michaelis-Menton-Konstante
K_P	Verteilungskoeffizient eines Stoffes zwischen Ober- und Unterphase
m	Steigung

M	Molekulargewicht
N_A	Avogardokonstante
n_D	Brechungsindex
r	Radius
Re	Reynoldszahl
T	Trenngrad
t	Zeit
T	Temperatur
v	Geschwindigkeit
$v_{B,St}$	Stokes'sche Aufstiegsgewindigkeit einer Blase
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
V_B	Blasenvolumen
V_R	Volumenverhältnis zwischen Ober- und Unterphase
\dot{V}_G	Gasvolumenstrom
\dot{V}_I	Integraler Gasvolumenstrom
We	Weberzahl
x	Massenkonzentration

Griechische Symbole

w	Strömungsgeschwindigkeit
η	dynamische Viskosität
μ	Chemisches Potential
μ^0	Chemisches Standardpotential
ρ	Dichte
σ	Oberflächenspannung
σ_{GF}	Grenzflächenspannung
φ	Phasenaustauschrate

Literaturverzeichnis

1. Sebek, O.K. *Industrielle Mikrobiologie*; Sahm, H., Antranikian, G., Stahmann, K.-P., Takors, R., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; Vol. 95; ISBN 978-3-8274-3039-7.
2. Chmiel, H. *Bioprozesstechnik*; Chmiel, H., Ed.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2011; ISBN 978-3-8274-2476-1.
3. *Einführung in Die Enzymtechnologie*; Jaeger, K.-E., Liese, A., Syltatk, C., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2018; ISBN 978-3-662-57618-2.
4. Rito-palomares, M. *Aqueous Two-Phase Systems for Bioprocess Development for the Recovery of Biological Products*; Rito-Palomares, M., Benavides, J., Eds.; Food Engineering Series; Springer International Publishing: Cham, 2017; ISBN 978-3-319-59308-1.
5. Flickinger, M.C. *Downstream Industrial Biotechnology : Recovery and Purification*; John Wiley & Sons, Incorporated: New York, UNITED STATES, 2013; ISBN 9781118619124.
6. Rito-palomares, M. Practical Application of Aqueous Two-Phase Partition to Process Development for the Recovery of Biological Products. *J. Chromatogr. B* **2004**, *807*, 3–11, doi:10.1016/j.jchromb.2004.01.008.
7. Bi, P.; Li, D.; Dong, H. A Novel Technique for the Separation and Concentration of Penicillin G from Fermentation Broth: Aqueous Two-Phase Flotation. *Sep. Purif. Technol.* **2009**, *69*, 205–209, doi:10.1016/j.seppur.2009.07.019.
8. Lee, S.Y.; Khoiroh, I.; Ling, T.C.; Show, P.L. Aqueous Two-Phase Flotation for the Recovery of Biomolecules. *Sep. Purif. Rev.* **2016**, *45*, 81–92, doi:10.1080/15422119.2015.1007147.
9. Shen, Z. *Principles and Technologies of Flotation Machines*; Springer Tracts in Mechanical Engineering; Springer Singapore: Singapore, 2021; ISBN 978-981-16-0331-0.
10. Gaudin, A.M.; Mular, A.L.; O'Connor, R.F. Separation of Microorganisms by Flotation I. Development and Evaluation of Assay Procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* **1959**, *8*, 84.
11. Gaudin, A.M.; Mular, A.L.; O'Connor, R.F. Separation of Microorganisms by Flotation II. Flotation of Spores of Bacillus Subtilis Var. Niger1. *Appl. Microbiol.* **1960**, *8*, 91–97.
12. Boyles, W.A.; Lincoln, R.E. Separation and Concentration of Bacterial Spores and Vegetative Cells by Foam Flotation. *Appl. Microbiol.* **1958**, *6*, 327–334.
13. Ahmad, S.I. Laws of Foam Formation and Foam Fractionation. II. The Influence of Different Association Conditions on Surfactants, Glycerides, Sugar, and Salts on the Foam Fractionation of Albumin. *Sep. Sci.* **1975**, *10*, 689–700, doi:10.1080/00372367508058050.
14. Schügerl, K. Recovery of Proteins and Microorganisms from Cultivation Media by Foam Flotation. In *New Products and New Areas of Bioprocess Engineering*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2000; Vol. 68, pp. 191–233 ISBN 978-3-540-67362-0.
15. Sebba, F. *Ion Flotation*; Elsevier: New York, 1962; Vol. Chap. 10;

16. Chang, L.; Wei, Y.; Bi, P.; Shao, Q. Recovery of Liquiritin and Glycyrrhizic Acid from *Glycyrrhiza Uralensis* Fisch by Aqueous Two-Phase Flotation and Multi-Stage Preparative High Performance Liquid Chromatography. *Sep. Purif. Technol.* **2014**, *134*, 204–209, doi:10.1016/j.seppur.2014.07.045.
17. Bi, P.Y.; Chang, L.; Mu, Y.L.; Liu, J.Y.; Wu, Y.; Geng, X.; Wei, Y. Separation and Concentration of Baicalin from *Scutellaria Baicalensis* Georgi Extract by Aqueous Two-Phase Flotation. *Sep. Purif. Technol.* **2013**, *116*, 454–457, doi:10.1016/j.seppur.2013.06.024.
18. Kee, P.E.; Cheah, L.S.; Wan, P.K.; Show, P.L.; Lan, J.C.-W.; Chow, Y.H.; Ng, H.S. Primary Capture of *Bacillus Subtilis* Xylanase from Crude Feedstock Using Alcohol/Salt Liquid Biphasic Flotation. *Biochem. Eng. J.* **2021**, *165*, 107835, doi:10.1016/j.bej.2020.107835.
19. Jiang, B.; Wang, L.; Na, J.; Zhang, X.; Yuan, Y.; Liu, C.; Feng, Z. Environmentally-Friendly Strategy for Separation of α -Lactalbumin from Whey by Aqueous Two Phase Flotation. *Arab. J. Chem.* **2020**, *13*, 3391–3402, doi:10.1016/j.arabjc.2018.11.013.
20. Leong, H.Y.; Ooi, C.W.; Law, C.L.; Julkifle, A.L.; Ling, T.C.; Show, P.L. Application of Liquid Biphasic Flotation for Betacyanins Extraction from Peel and Flesh of *Hylocereus Polyrhizus* and Antioxidant Activity Evaluation. *Sep. Purif. Technol.* **2018**, *201*, 156–166, doi:10.1016/j.seppur.2018.03.008.
21. Lin, Y.K.; Show, P.L.; Yap, Y.J.; Tan, C.P.; Ng, E.P.; Ariff, A.B.; Mohamad Annuar, M.S.B.; Ling, T.C. Direct Recovery of Cyclodextringlycosyltransferase from *Bacillus Cereus* Using Aqueous Two-Phase Flotation. *J. Biosci. Bioeng.* **2015**, *120*, 684–689, doi:10.1016/j.jbiosc.2015.04.013.
22. Sankaran, R.; Show, P.L.; Cheng, Y.S.; Tao, Y.; Ao, X.; Nguyen, T.D.P.; Van Quyen, D. Integration Process for Protein Extraction from Microalgae Using Liquid Biphasic Electric Flotation (LBEF) System. *Mol. Biotechnol.* **2018**, *60*, 749–761, doi:10.1007/s12033-018-0111-6.
23. Show, P.L.; Tan, C.P.; Anuar, M.S.; Ariff, A.; Yusof, Y.A.; Chen, S.K.; Ling, T.C. Direct Recovery of Lipase Derived from *Burkholderia Cepacia* in Recycling Aqueous Two-Phase Flotation. *Sep. Purif. Technol.* **2011**, *80*, 577–584, doi:10.1016/j.seppur.2011.06.013.
24. Raja, S.; Murty, V.R.; Thivaharan, V.; Rajasekar, V.; Ramesh, V. Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review. *Sci. Technol.* **2011**, *1*, 7–16.
25. Li, M.; Dong, H. The Investigation on the Aqueous Two-Phase Flootation of Lincomycin. *Sep. Purif. Technol.* **2010**, *73*, 208–212, doi:10.1016/j.seppur.2010.04.002.
26. Show, P.L.; Ooi, C.W.; Anuar, M.S.; Ariff, A.; Yusof, Y.A.; Chen, S.K.; Annuar, M.S.M.; Ling, T.C. Recovery of Lipase Derived from *Burkholderia Cenocepacia* ST8 Using Sustainable Aqueous Two-Phase Flotation Composed of Recycling Hydrophilic Organic Solvent and Inorganic Salt. *Sep. Purif. Technol.* **2013**, *110*, 112–118, doi:10.1016/j.seppur.2013.03.018.
27. Show, P.L.; Tan, C.P.; Anuar, M.S.; Ariff, A.; Yusof, Y.A.; Chen, S.K.; Ling, T.C. Direct Recovery of Lipase Derived from *Burkholderia Cepacia* in Recycling Aqueous Two-Phase Flotation. *Sep. Purif. Technol.* **2011**, *80*, 577–584, doi:10.1016/j.seppur.2011.06.013.
28. Pakhale, S. V.; Vetal, M.D.; Rathod, V.K. Separation of Bromelain by Aqueous Two Phase Flotation. *Sep. Sci. Technol.* **2013**, *48*, 984–989, doi:10.1080/01496395.2012.712596.
29. Tan, J.S.; Abbasiliasi, S.; Lin, Y.K.; Mohamed, M.S.; Kapri, M.R.; Kadkhodaei, S.; Tam, Y.J.; Rahman, R.N.Z.R.A.; Ariff, A.B. Primary Recovery of Thermostable Lipase 42 Derived from Recombinant *Escherichia Coli* BL21 in Aqueous Two-Phase Flotation. *Sep. Purif. Technol.* **2014**, *133*, 328–334, doi:10.1016/j.seppur.2014.06.048.
30. de Araújo Padilha, C.E.; Dantas, P.V.F.; Nogueira, C. da C.; Leitão, A.L. de S.; Almeida, H.N.; de Santana Souza, D.F.; Oliveira, J.A. de; de Macedo, G.R.; dos Santos, E.S. Enhancing the Recovery and Concentration of Polyphenols from Camu-Camu (*Myrciaria Dubia* H.B.K. McVaugh) by

- Aqueous Two-Phase Flotation and Scale-up Process. *Sep. Sci. Technol.* **2018**, *53*, 2126–2135, doi:10.1080/01496395.2018.1442865.
31. Khoo, K.S.; Chew, K.W.; Yew, G.Y.; Manickam, S.; Ooi, C.W.; Show, P.L. Integrated Ultrasound-Assisted Liquid Biphasic Flotation for Efficient Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus Pluvialis*. *Ultrason. Sonochem.* **2020**, *67*, 105052, doi:10.1016/j.ultsonch.2020.105052.
 32. Mathiazakan, P.; Shing, S.Y.; Ying, S.S.; Kek, H.K.; Tang, M.S.Y.; Show, P.L.; Ooi, C.W.; Ling, T.C. Pilot-Scale Aqueous Two-Phase Flotation for Direct Recovery of Lipase Derived from *Burkholderia Cepacia* Strain ST8. *Sep. Purif. Technol.* **2016**, *171*, 206–213, doi:10.1016/j.seppur.2016.07.017.
 33. Bensch, M.; Selbach, B.; Hubbuch, J. High Throughput Screening Techniques in Downstream Processing: Preparation, Characterization and Optimization of Aqueous Two-Phase Systems. *Chem. Eng. Sci.* **2007**, *62*, 2011–2021, doi:10.1016/j.ces.2006.12.053.
 34. Chapman, J.; Ismail, A.; Dinu, C. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts* **2018**, *8*, 238, doi:10.3390/catal8060238.
 35. Abedi, D.; Zhang, L.; Pyne, M.; Perry Chou, C. Enzyme Biocatalysis. In *Comprehensive Biotechnology*; Elsevier, 2011; Vol. 1, pp. 15–24 ISBN 9780080885049.
 36. Fritsche, O. *Mikrobiologie*; 2016; ISBN 9783662497289.
 37. Walsh, G. *Proteins*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2015; ISBN 9781119117599.
 38. Hans Bisswanger *Enzyme: Struktur, Kinetik Und Anwendungen*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2015; ISBN 978-3-527-33675-3.
 39. Erickson, H.P. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biol. Proced. Online* **2009**, *11*, 32–51, doi:10.1007/s12575-009-9008-x.
 40. Skern, T. *Exploring Protein Structure: Principles and Practice*; 2018; ISBN 978-3-319-76857-1.
 41. Schügerl, K. Recovery of Proteins and Microorganisms from Cultivation Media by Foam Flotation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2000**, *68*, 191–233.
 42. Buxbaum, E. *Fundamentals of Protein Structure and Function, Second Edition*; 2015; ISBN 9783319199207.
 43. A.S., M.; J.L., S.; M.D., C. PEGylation of Proteins: A Structural Approach. *BioPharm Int.* **2006**, *19*, 34–49.
 44. Kodera, Y.; Matsushima, A.; Hiroto, M.; Nishimura, H.; Ishii, A.; Ueno, T.; Inada, Y. Pegylation of Proteins and Bioactive Substances for Medical and Technical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **1998**, *23*, 1233–1271, doi:10.1016/S0079-6700(97)00033-6.
 45. Veronese, F.M. Peptide and Protein PEGylation. *Biomaterials* **2001**, *22*, 405–417, doi:10.1016/S0142-9612(00)00193-9.
 46. Bisswanger, H. *Enzyme Kinetics*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2017; ISBN 9783527806461.
 47. Jovel, S.R.; Kumagai, T.; Danshiitsoodol, N.; Matoba, Y.; Nishimura, M.; Sugiyama, M. Purification and Characterization of the Second *Streptomyces* Phospholipase A2 Refolded from an Inclusion Body. *Protein Expr. Purif.* **2006**, *50*, 82–88, doi:10.1016/j.pep.2006.05.009.
 48. Kotsira, V.P.; Clonis, Y.D. Colorimetric Assay for Lecithin Using Two Co-Immobilized Enzymes and an Indicator Dye Conjugate. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3389–3394, doi:10.1021/jf980168s.
 49. Yao, Y.; Wang, M.H.; Zhao, K.Y.; Wang, C.C. Assay for Enzyme Activity by Following the Absorbance Change of PH-Indicators. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1998**, *36*, 119–130,

- doi:10.1016/S0165-022X(98)00005-0.
50. de Araújo, A.L.; Radvanyi, F. Determination of Phospholipase A2 Activity by a Colorimetric Assay Using a PH Indicator. *Toxicon* **1987**, *25*, 1181–1188, doi:10.1016/0041-0101(87)90136-X.
 51. Jeevarajan, A.S.; Vani, S.; Taylor, T.D.; Anderson, M.M. Continuous PH Monitoring in a Perfused Bioreactor System Using an Optical PH Sensor. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *78*, 467–472, doi:10.1002/bit.10212.
 52. Merchuk, J.C.; Andrews, B. a; Asenjo, J. a Aqueous Two-Phase Systems for Protein Separation. Studies on Phase Inversion. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **1998**, *711*, 285–293, doi:10.1016/S0378-4347(97)00594-x.
 53. Elversson, J.; Millqvist-Fureby, A. Aqueous Two-Phase Systems as a Formulation Concept for Spray-Dried Protein. *Int. J. Pharm.* **2005**, *294*, 73–87, doi:10.1016/j.ijpharm.2005.01.015.
 54. Malpiedi, L.P.; Fernández, C.; Picó, G.; Nerli, B. Liquid–Liquid Equilibrium Phase Diagrams of Polyethyleneglycol + Sodium Tartrate + Water Two-Phase Systems. *J. Chem. Eng. Data* **2008**, *53*, 1175–1178, doi:10.1021/jc8000188.
 55. Tan, C.H.; Show, P.L.; Ooi, C.W.; Ng, E.P.; Lan, J.C.W.; Ling, T.C. Novel Lipase Purification Methods - a Review of the Latest Developments. *Biotechnol. J.* **2015**, *10*, 31–44, doi:10.1002/biot.201400301.
 56. Cunha, T.; Aires-Barros, R. Large-Scale Extraction of Proteins. *Mol. Biotechnol.* **2002**, *20*, 29–40, doi:10.1385/MB:20:1:029.
 57. Diederich, P.; Amrhein, S.; Hämmerling, F.; Hubbuch, J. Evaluation of PEG/Phosphate Aqueous Two-Phase Systems for the Purification of the Chicken Egg White Protein Avidin by Using High-Throughput Techniques. *Chem. Eng. Sci.* **2013**, *104*, 945–956, doi:10.1016/j.ces.2013.10.008.
 58. Magalhães, F.F.; Tavares, A.P.M.; Freire, M.G. Advances in Aqueous Biphasic Systems for Biotechnology Applications. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2021**, *27*, 100417, doi:10.1016/j.cogsc.2020.100417.
 59. Glyk, A.; Scheper, T.; Beutel, S. PEG–Salt Aqueous Two-Phase Systems: An Attractive and Versatile Liquid–Liquid Extraction Technology for the Downstream Processing of Proteins and Enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 6599–6616, doi:10.1007/s00253-015-6779-7.
 60. Glyk, A.; Solle, D.; Scheper, T.; Beutel, S. Optimization of PEG-Salt Aqueous Two-Phase Systems by Design of Experiments. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2015**, *149*, 12–21, doi:10.1016/j.chemolab.2015.09.014.
 61. Morgenstern, J.; Baumann, P.; Brunner, C.; Hubbuch, J. Effect of PEG Molecular Weight and PEGylation Degree on the Physical Stability of PEGylated Lysozyme. *Int. J. Pharm.* **2017**, *519*, 408–417, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.01.040.
 62. Benavides, J.; Rito-Palomares, M. Practical Experiences from the Development of Aqueous Two-Phase Processes for the Recovery of High Value Biological Products. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2008**, *83*, 133–142, doi:10.1002/jctb.1844.
 63. Hatti-Kaul, R. *Aqueous Two-Phase Systems : Methods and Protocols*; Humana Press, 2000; ISBN 0896035417.
 64. Walter, H.; Brooks, D.; Fisher, D. *Partitioning in Aqueous Two-Phase System*; Elsevier, 1985; ISBN 9780127338606.
 65. Asenjo, J.A.; Andrews, B.A. Aqueous Two-Phase Systems for Protein Separation: Phase Separation and Applications. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1238*, 1–10, doi:10.1016/j.chroma.2012.03.049.
 66. Hatti-Kaul, R. Aqueous Two-Phase Systems. *Mol Biotechnol* **2001**, *19*, doi:10.1385/MB:19:3:269.
 67. Elstner, M. *Physikalische Chemie I: Thermodynamik Und Kinetik*; Springer Berlin Heidelberg:

- Berlin, Heidelberg, 2017; Vol. 39; ISBN 978-3-662-55363-3.
68. Gerson, D.F. Cell Surface Energy, Contact Angles and Phase Partition. I. Lymphocytic Cell Lines in Biphasic Aqueous Mixtures. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1980**, 602, 269–280, doi:10.1016/0005-2736(80)90310-7.
 69. Zhang, Y.; Hess, H. Enhanced Diffusion of Catalytically Active Enzymes. *ACS Cent. Sci.* **2019**, 5, 939–948, doi:10.1021/acscentsci.9b00228.
 70. Young, M.E.; Carroad, P.A.; Bell, R.L. Estimation of Diffusion Coefficients of Proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **1980**, 22, 947–955, doi:10.1002/bit.260220504.
 71. Kulaguin Chicaroux, A.; Górak, A.; Zeiner, T. Demixing Behavior of Binary Polymer Mixtures. *J. Mol. Liq.* **2015**, 209, 42–49, doi:10.1016/j.molliq.2015.05.012.
 72. Nauman, E.B.; He, D.Q. Nonlinear Diffusion and Phase Separation. *Chem. Eng. Sci.* **2001**, 56, 1999–2018, doi:10.1016/S0009-2509(01)00005-7.
 73. Komalasari, A.M.W. Atkins. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, 53, 1689–1699.
 74. Albertsson, P.-Å. Partition of Cell Particles and Macromolecules in Polymer Two-Phase Systems. In; 1970; pp. 309–341.
 75. M. A. ELBAGERMI*, A. I. ALAJTAL, H. G. M. EDWARDS, G. H. AZIMI, K.D.V.A.I.J.S. *Test No. 112: Dissociation Constants in Water*; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1; OECD, 1981; Vol. 2; ISBN 9789264069725.
 76. Huddleston, J.G.; Ottomar, K.W.; Ngonyani, D.M.; Lyddiatt, A. Influence of System and Molecular Parameters upon Fractionation of Intracellular Proteins from *Saccharomyces* by Aqueous Two-Phase Partition. *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, 13, 24–32, doi:10.1016/0141-0229(91)90184-C.
 77. Hofmeister, F. Zur Lehre von Der Wirkung Der Salze. *Arch. für Exp. Pathol. und Pharmakologie* **1888**, 24, 247–260, doi:10.1007/BF01918191.
 78. Nagaraja, V.H.; Iyyaswami, R. Phase Demixing Studies in Aqueous Two-Phase System with Polyethylene Glycol (PEG) and Sodium Citrate. *Chem. Eng. Commun.* **2013**, 200, 1293–1308, doi:10.1080/00986445.2012.744750.
 79. Forciniti, D.; Hall, C.K.; Kula, M.R. Interfacial Tension of Polyethyleneglycol-Dextran-Water Systems: Influence of Temperature and Polymer Molecular Weight. *J. Biotechnol.* **1990**, 16, 279–296, doi:10.1016/0168-1656(90)90042-A.
 80. Bi, P.Y.; Chang, L.; Dong, H.R. Separation Behavior of Penicillin in Aqueous Two-Phase Flotation. *Fenxi Huaxue/ Chinese J. Anal. Chem.* **2011**, 39, 425–428, doi:10.1016/S1872-2040(10)60428-8.
 81. Padilha, C.E. de A.; Dantas, P.V.F.; Sousa Júnior, F.C.; Oliveira Júnior, S.D.; Nogueira, C. da C.; Souza, D.F. de S.; de Oliveira, J.A.; de Macedo, G.R.; dos Santos, E.S. Recovery and Concentration of Ortho-Phenylphenol from BIODESULFURIZATION OF 4-Methyl DIBENZOTHIOPHENE by Aqueous Two-Phase Flotation. *Sep. Purif. Technol.* **2017**, 176, 306–312, doi:10.1016/j.seppur.2016.12.029.
 82. Phong, W.N.; Show, P.L.; Teh, W.H.; Teh, T.X.; Lim, H.M.Y.; Nazri, N.S. binti; Tan, C.H.; Chang, J.S.; Ling, T.C. Proteins Recovery from Wet Microalgae Using Liquid Biphasic Flotation (LBF). *Bioresour. Technol.* **2017**, 244, 1329–1336, doi:10.1016/j.biortech.2017.05.165.
 83. Jakob, L.; Singer, J.; Nirschl, H. Importance of Gas Input in Aqueous Two-Phase Flotation (ATPF). *Chem. Eng. Sci.* **2021**, 233, 116391, doi:10.1016/j.ces.2020.116391.
 84. Jakob, L.; Heinzmann, M.; Nirschl, H. Development of a Continuous Aqueous Two-Phase Flotation Process for the Downstream Processing of Biotechnological Products. *Sep. Purif. Technol.* **2021**, 278, 119657, doi:10.1016/j.seppur.2021.119657.
 85. Jakob, L.; Baust, H.K.; Griesinger, L.; Nirschl, H. Optimized Apparatus Design for Continuous

- Aqueous Two-Phase Flotation (ATPF). *Separations* **2023**, *10*, 511, doi:10.3390/separations10090511.
86. Wang, L.K.; Nazih, D.; Shammas, K.; Selke, W.A.; Aulenbach, D.B. *Flotation Technology*; Wang, L.K., Shammas, N.K., Selke, W.A., Aulenbach, D.B., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 2010; ISBN 978-1-58829-494-4.
 87. Wills, B.A.; Finch, J.A. Froth Flotation. In *Wills' Mineral Processing Technology*; Elsevier, 2016; pp. 265–380.
 88. Sander, R. Compilation of Henry's Law Constants (Version 4.0) for Water as Solvent. *Atmos. Chem. Phys.* **2015**, *15*, 4399–4981, doi:10.5194/acp-15-4399-2015.
 89. Siemes, W. Gasblasen in Flüssigkeiten. Teil I: Entstehung von Gasblasen an Nach Oben Gerichteten Kreisförmigen Düsen. *Chemie Ing. Tech.* **1954**, *26*, 479–496, doi:10.1002/cite.330260810.
 90. Bals, A. Grundlagen Der Blasenbildung an Einzelporen Und Lochplatten. *Chemie Ing. Tech.* **2002**, *74*, 337–344, doi:10.1002/1522-2640(200203)74:3<337::AID-CITE337>3.0.CO;2-B.
 91. Gulden, S.J.; Riedele, C.; Kopf, M.H.; Nirschl, H. Online Bubble Size Analysis in Micro Flotation. *Chem. Eng. Sci. Submitt.* **2018**.
 92. Mersmann, A. *Druckverlust Und Schaumhöhen von Gasdurchströmten Flüssigkeitsschichten Auf Siebböden*; VDI-Forschungsheft; VDI-Verlag, 1962;
 93. Oertel, H.J. *Prandtl - Führer Durch Die Strömungslehre*; Oertel, H., Ed.; Springer Fachmedien Wiesbaden: Wiesbaden, 2017; ISBN 978-3-658-08626-8.
 94. Nguyen, P.T.; Hampton, M.A.; Nguyen, A. V.; Birkett, G.R. The Influence of Gas Velocity, Salt Type and Concentration on Transition Concentration for Bubble Coalescence Inhibition and Gas Holdup. *Chem. Eng. Res. Des.* **2012**, *90*, 33–39, doi:10.1016/j.cherd.2011.08.015.
 95. Firouzi, M.; Howes, T.; Nguyen, A. V. A Quantitative Review of the Transition Salt Concentration for Inhibiting Bubble Coalescence. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *222*, 305–318, doi:10.1016/j.cis.2014.07.005.
 96. Craig, V.S.J.; Ninham, B.W.; Pashley, R.M. Effect of Electrolytes on Bubble Coalescence. *Nature* **1993**, *364*, 317–319, doi:10.1038/364317a0.
 97. Craig, V.S.J.; Ninham, B.W.; Pashley, R.M. The Effect of Electrolytes on Bubble Coalescence in Water. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10192–10197, doi:10.1021/j100141a047.
 98. Christen, D.S. *Praxiswissen Der Chemischen Verfahrenstechnik*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2010; ISBN 978-3-540-88974-8.
 99. Nirschl, H. *Mikrofluidmechanik: Numerische Und Experimentelle Untersuchungen Zur Umströmung Kleiner Körper*; Fortschritt-Berichte VDI. Reihe 7, Strömungstechnik; VDI-Verlag, 1994; ISBN 9783183248070.
 100. Haas, U.; Schmidt-Traub, H.; Brauer, H. Umströmung Kugelförmiger Blasen Mit Innerer Zirkulation. *Chemie Ing. Tech. - CIT* **1972**, *44*, 1060–1068, doi:10.1002/cite.330441805.
 101. Hua, J.; Lou, J. Numerical Simulation of Bubble Rising in Viscous Liquid. *J. Comput. Phys.* **2007**, *222*, 769–795, doi:10.1016/j.jcp.2006.08.008.
 102. Narayanan, S.; Goossens, L.H.J.; Kossen, N.W.F. Coalescence of Two Bubbles Rising in Line at Low Reynolds Numbers. *Chem. Eng. Sci.* **1974**, *29*, 2071–2082, doi:10.1016/0009-2509(74)80221-6.
 103. Gulden, S.J. *Untersuchung Der Mikroflotation Als Biotechnologisches Trennverfahren*, Karlsruhe, 2019.
 104. Yoon, R.H. Microbubble Flotation. *Miner. Eng.* **1993**, doi:10.1016/0892-6875(93)90116-5.

105. Ralston, J. The Influence of Particle Size and Contact Angle in Flotation. In *Developments in Mineral Processing*; 1992; Vol. 12, pp. 203–224.
106. Finch, J.A.; Xiao, J.; Hardie, C.; Gomez, C.O. Gas Dispersion Properties: Bubble Surface Area Flux and Gas Holdup. *Miner. Eng.* **2000**, *13*, 365–372, doi:10.1016/S0892-6875(00)00019-4.
107. Gorain, B.K.; Franzidis, J.P.; Manlapig, E.V. Studies on Impeller in an Industrial Flotation Cell. Part 4. Effect of Bubble Surface Area. *Miner. Eng.* **1997**, *10*, 367–379.
108. Deglon, D.A.; Sawyerr, F.; O'Connor, C.T. A Model to Relate the Flotation Rate Constant and the Bubble Surface Area Flux in Mechanical Flotation Cells. *Miner. Eng.* **1999**, *12*, 599–608, doi:10.1016/S0892-6875(99)00046-1.
109. Kawatra.Flotation_Fundamentals.
110. Wagner, T.; Eglinger, J. Thorstenwagner/Ij-Ellipsesplit: EllipseSplit 0.6.0 SNAPSHOT Available online: <https://zenodo.org/record/834339> (accessed on 26 July 2019).
111. Mistry, S.L.; Kaul, A.; Merchuk, J.C.; Asenjo, J.A. Mathematical Modelling and Computer Simulation of Aqueous Two-Phase Continuous Protein Extraction. *J. Chromatogr. A* **1996**, *741*, 151–163, doi:10.1016/0021-9673(96)00179-3.
112. Perez, B.; Malpiedi, L.P.; Tubío, G.; Nerli, B.; De Alcântara Pessôa Filho, P. Experimental Determination and Thermodynamic Modeling of Phase Equilibrium and Protein Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems Containing Biodegradable Salts. *J. Chem. Thermodyn.* **2013**, *56*, 136–143, doi:10.1016/j.jct.2012.07.017.
113. Wu, Y.-T.; Zhu, Z.-Q.; Mei, L.-H. Interfacial Tension of Poly(Ethylene Glycol) + Salt + Water Systems. *J. Chem. Eng. Data* **1996**, *41*, 1032–1035, doi:10.1021/je960044g.
114. Walter, H.; Brooks, D.; Fisher, D. *Partitioning in Aqueous Two-Phase System*; Elsevier, 1985; ISBN 9780127338606.
115. Millqvist-Fureby, A.; Malmsten, M.; Bergenståhl, B. An Aqueous Polymer Two-Phase System as Carrier in the Spray-Drying of Biological Material. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *225*, 54–61, doi:10.1006/jcis.2000.6740.
116. Di Nucci, H.; Nerli, B.; Picó, G. Comparison between the Thermodynamic Features of A1-Antitrypsin and Human Albumin Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems of Polyethyleneglycol-Dextran. *Biophys. Chem.* **2001**, *89*, 219–229.
117. Apelblat, A. *Citric Acid*; Springer International Publishing: Cham, 2014; ISBN 978-3-319-11232-9.
118. Alves, L.A.; Almeida e Silva, J.B.; Giulietti, M. Solubility of Glucose in Water and Ethanol/Water Mixtures. *J. Chem. Eng. Data* **2007**, *52*, 2166–2170, doi:10.1021/je700177n.
119. Molteni, C.; Parrinello, M. Glucose in Aqueous Solution by First Principles Molecular Dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2168–2171, doi:10.1021/ja973008q.
120. Suarez Ruiz, C.A.; Baca, S.Z.; van den Broek, L.A.M.; van den Berg, C.; Wijffels, R.H.; Eppink, M.H.M. Selective Fractionation of Free Glucose and Starch from Microalgae Using Aqueous Two-Phase Systems. *Algal Res.* **2020**, *46*, doi:10.1016/j.algal.2020.101801.
121. Xu, Z.; Wu, Z.; Zhao, Y. Foam Fractionation of Protein with the Presence of Antifoam Agent. *Sep. Sci. Technol.* **2010**, *45*, 2481–2488, doi:10.1080/01496391003674258.
122. Kretzschmar, H.; Wagner, W. *VDI-Wärmeatlas*; Stephan, P., Kabelac, S., Kind, M., Mewes, D., Schaber, K., Wetzel, T., Eds.; Springer Reference Technik; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2019; ISBN 978-3-662-52988-1.
123. Brauer, H. *Grundlagen Der Einphasen- Und Mehrphasenströmungen*; Grundlagen der chemischen Technik; Sauerländer: Aarau, 1971;

124. Gulden, S.J.; Riedele, C.; Rollié, S.; Kopf, M.-H.; Nirschl, H. Online Bubble Size Analysis in Micro Flotation. *Chem. Eng. Sci.* **2018**, *185*, 168–181, doi:10.1016/j.ces.2018.04.009.
125. Peters, F.; Gaertner, B. Warum Hat Die Aufsteigende Blase Einen Widerstand? *Forsch. im Ingenieurwes.* **2010**, *74*, 167–174, doi:10.1007/s10010-010-0123-2.
126. Tyler, R.H.; Boyer, T.P.; Minami, T.; Zweng, M.M.; Reagan, J.R. Electrical Conductivity of the Global Ocean. *Earth, Planets Sp.* **2017**, *69*, 156, doi:10.1186/s40623-017-0739-7.
127. Gulden, S.J. Untersuchung Der Mikroflotation Als Biotechnologisches Trennverfahren, 2018.
128. Schmidt, B.; Zerhoch, M. *Gutachten Im Auftrag Des Deutschen Bundestags Vorgelegt Dem Büro Für Technikfolgen-Abschätzung Beim Deutschen Bundestag (TAB) „ Industrielle Stoffliche Nutzung Nachwachsender Rohstoffe “*; 2006;
129. Kunasundari, B.; Sudesh, K. Isolation and Recovery of Microbial Polyhydroxyalkanoates. *Express Polym. Lett.* **2011**, *5*, 620–634, doi:10.3144/expresspolymlett.2011.60.
130. van Hee, P.; Elumbaring, A.C.M.R.; van der Lans, R.G.J.M.; Van der Wielen, L.A.M. Selective Recovery of Polyhydroxyalkanoate Inclusion Bodies from Fermentation Broth by Dissolved-Air Flotation. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *297*, 595–606, doi:10.1016/j.jcis.2005.11.019.
131. Rosa, P.A.J.; Azevedo, A.M.; Sommerfeld, S.; Bäcker, W.; Aires-Barros, M.R. Aqueous Two-Phase Extraction as a Platform in the Biomanufacturing Industry: Economical and Environmental Sustainability. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 559–567, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.03.006.
132. Sankaran, R.; Show, P.L.; Yap, Y.J.; Tao, Y.; Ling, T.C.; Tomohisa, K. Green Technology of Liquid Biphasic Flotation for Enzyme Recovery Utilizing Recycling Surfactant and Sorbitol. *Clean Technol. Environ. Policy* **2018**, *20*, 2001–2012, doi:10.1007/s10098-018-1523-5.
133. Sankaran, R.; Show, P.L.; Yap, Y.J.; Lam, H.L.; Ling, T.C.; Pan, G.T.; Yang, T.C.K. Sustainable Approach in Recycling of Phase Components of Large Scale Aqueous Two-Phase Flotation for Lipase Recovery. *J. Clean. Prod.* **2018**, *184*, 938–948, doi:10.1016/j.jclepro.2018.02.301.
134. Mesa, D.; Brito-Parada, P.R. Scale-up in Froth Flotation: A State-of-the-Art Review. *Sep. Purif. Technol.* **2019**, *210*, 950–962, doi:10.1016/j.seppur.2018.08.076.