

Technische Universität München

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

Integrierte Reaktivextraktion zur Gewinnung von biotechnologisch hergestellter Bernsteinsäure

Tanja M. Kurzrock

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Sonja Berensmeier
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Kai-Olaf Hinrichsen

Die Dissertation wurde am 14.10.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 14.12.2010
angenommen.

Vorwort

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz.

Zu dieser Dissertation haben viele Personen auf unterschiedliche Weise beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlichst bedanken möchte:

Bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für das Vertrauen und die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl promovieren zu dürfen. Seine Ratschläge, Informationen und Diskussionen waren für meine Arbeit sehr hilfreich.

Beim Coreferenten Herrn Prof. Dr.-Ing. Kai-Olaf Hinrichsen (Lehrstuhl für Technische Chemie, Technische Universität München) und bei der Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr. rer. nat. Sonja Berensmeier (Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Fachgebiet Selektive Trenntechnik, Technische Universität München) für die sehr zügige Übernahme der jeweiligen Aufgabe.

Bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt für die Unterstützung meines Projekts durch ein persönliches Stipendium im Rahmen des ChemBioTec Schwerpunkts „Nachhaltige Bioprozesse“.

Bei Herrn Prof. Dr. Andreas Liese (Institut für Technische Biokatalyse, TU Hamburg-Harburg) und Frau Dr. Hedda Schlegel-Starmann (DBU) für die gute Betreuung und die hervorragende Koordination des Stipendenschwerpunkts.

Bei meinem ChemBioTec Co-Mentor Herrn Prof. Dr. Andreas Schmid (Lehrstuhl für Biotechnik, Fachbereich Bio- und Chemieingenieurwesen, Universität Dortmund) für die hilfreichen Anregungen zu meinem Projekt.

Bei allen (ehemaligen) Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik – Irma Einsle, Markus Amann, Norbert Werth, Georg Kojro, Dominik Maslak, Michael Hofinger, Andrea Vester, Gabi Gebhardt, Michael Braun, Michael Finke, Stefanie Brüning, Michael Weiner, Ralf Hortsch, Clara Delhomme, Danielle Dennewald, Hannes Link, Christoph Bendig, Torben Höfel, Martin Demler, Peter Riedlberger, Bernd Anselment, Nils Janzen, Kathrin Hölsch, Stefanie Brüning, Michael Schmidt, Eva-Maria Gross, Dirk Hebel, Benjamin Smejkal, Boqiao Sun, Yilei Fu – für die wunderbare Zusammenarbeit.

Bei Clara Delhomme und Michael Weiner für das gründliche und kritische Korrekturlesen meiner Dissertation.

Bei meinen Studenten Korbinian Binder, Markus Jeschek, Sabine Anton und Stefan Schallinger für die fleißige Mitarbeit.

Bei meiner Familie für ihren Rückhalt und ihre vollste Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	3
3	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	6
3.1	Biologische Grundlagen.....	6
3.1.1	Mikroorganismen	6
3.1.1.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
3.1.1.2	<i>Escherichia coli</i>	7
3.1.1.3	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	8
3.2	Bioprozessentwicklung	9
3.2.1	Bioreaktoren	9
3.2.2	Mikrobielles Wachstum.....	9
3.2.3	Prozessführung in Bioreaktoren.....	11
3.3	Bernsteinsäure	15
3.3.1	Marktpotential von Bernsteinsäure	16
3.3.2	Petrochemische Produktion von Bernsteinsäure	18
3.3.3	Biotechnologische Produktion von Bernsteinsäure.....	19
3.4	Aufarbeitsverfahren für biotechnologisch produzierte Bernsteinsäure	22
3.5	Reaktivextraktion von organischen Säuren aus einer wässrigen Phase.....	32
3.5.1	Grundlagen der Reaktivextraktion	32
3.5.2	Amine bei der Reaktivextraktion	36
3.5.3	Lösungsmittel bei der Reaktivextraktion	39
3.5.4	Reaktivextraktion von Bernsteinsäure	42
3.5.5	Flüssig-Flüssig-Zentrifugalextraktion	49
3.5.6	Rückextraktion.....	56
3.6	Grundlagen der Verdampfungskristallisation	59
4	MATERIAL UND METHODEN	61
4.1	Kultivierung der potentiellen Mikroorganismen für Bernsteinsäure	61
4.1.1	Eingesetzte Mikroorganismen.....	61
4.1.2	Eingesetzte Medien	61

4.1.3	Kultivierung im Schüttelkolben.....	67
4.1.4	Durchführung der Biokompatibilitätsuntersuchungen	67
4.1.5	Gewinnung von Fermentationsüberstand durch Fermentation im 42L-Bioreaktor	68
4.2	Analytische Methoden	70
4.2.1	Flüssigkeitschromatographische Analytik.....	70
4.2.2	Gaschromatographische Analytik	71
4.2.3	OD-Messung	71
4.2.4	Biotrockenmasse	72
4.3	Versuchsplanung mit stochastischer Suche (GAME.opt)	73
4.4	Reaktivextraktion und Rückextraktion im Millilitermaßstab	76
4.5	Reaktivextraktion und Rückextraktion im Zentrifugalextraktor	78
4.6	Verdampfungskristallisation.....	80
5	REAKTIVEXTRAKTION VON BERNSTEINSÄURE	81
5.1	Vorversuche zu den Extraktionsbedingungen	81
5.2	Biokompatibilität der eingesetzten Amine und Lösungsmittel	93
5.3	Identifikation geeigneter Reaktivextraktionssysteme	96
5.3.1	Einfache Reaktivextraktionssysteme	96
5.3.2	Komplexe Reaktivextraktionssysteme	117
5.3.3	Biokompatible Reaktivextraktionssysteme.....	120
5.3.4	Zusammenfassung und Diskussion	123
5.4	Reaktionstechnische Untersuchungen ausgewählter Reaktivextraktionssysteme.....	125
5.5	Reaktionstechnische Untersuchungen im Zentrifugalextraktor	139
5.6	Zusammenfassung und Diskussion	150
6	RÜCKEXTRAKTION VON BERNSTEINSÄURE.....	153
6.1	Reaktionstechnische Untersuchungen ausgewählter Reaktivextraktionssysteme.....	153
6.2	Reaktionstechnische Untersuchungen im Zentrifugalextraktor	156
6.3	Zusammenfassung und Diskussion	160
7	VERDAMPFUNGSKRISTALLISATION VON BERNSTEINSÄURE.....	162
8	PROZESSINTEGRATION	166
9	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	181

10	LITERATURVERZEICHNIS	188
11	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	197
12	ANHANG	198
12.1	Allgemeines Material	198
12.1.1	Geräte	198
12.1.2	Chemikalien.....	201
12.2	Reaktivextraktionssysteme	204
12.2.1	Physikalische und chemische Eigenschaften Amine und Lösungsmittel.....	204
12.2.2	Einfache Reaktivextraktionssysteme des 1. Auswahlprüfverfahrens.....	208
12.2.3	Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahren	210
12.2.4	Biokompatible Reaktivextraktionssysteme des 3. Auswahlprüfverfahrens	226
12.2.5	Umrechnungstabelle der Konzentrationen der Reaktivextraktionssysteme.....	232
12.2.6	Verdampfung Trimethylamin aus der organischen Phase	232
12.3	Zentrifugalextraktor.....	233
12.3.1	Dichteberechnung der eingesetzten Phasen.....	233
12.3.2	Umrechnung der Rotationsgeschwindigkeit	234
12.3.3	Produktdaten Zentrifugalextraktoren	234

1 Einleitung

Die moderne Biotechnologie ist aus der heutigen Industrielandschaft nicht mehr wegzudenken. Ob bei der Herstellung neuer genetisch veränderter Pflanzen (grüne Biotechnologie) für die Lebensmittel- und Futterindustrie oder der Erzeugung neuer Medikamente in der Pharmaindustrie (rote Biotechnologie) - biotechnologische Verfahren ersetzen immer mehr die alten klassischen Prozesse oder schaffen neue Produktionswege für bisher industriell schwer zugängliche Substanzen. Auch in anderen klassischen Industriezweigen, wie der Herstellung von Waschmitteln, Kosmetika und Reinigungsmitteln (weiße Biotechnologie), sind biotechnologische Produktionsverfahren bereits fester Bestandteil der Industrie geworden, da sie umweltfreundlicher und ressourcenschonender als viele chemische Verfahren sind. In vielen Bereichen der weißen Biotechnologie steht die Forschung jedoch noch am Anfang und die Produktion basiert weiterhin auf den klassischen Verfahren mit nicht regenerierbaren fossilen Rohstoffen. Da viele Prognosen jedoch schon in den nächsten Jahrzehnten von einem allmählichen Versiegen von Erdöl und Erdgas und damit entsprechenden Preisanstieg ausgehen, ist deutlicher Handlungsbedarf gegeben (Hiller und Kehrer 2000). Vor allem bei der Herstellung von Biokunststoffen oder der Gewinnung von Energie aus nachwachsenden Rohstoffen ist noch erheblicher Forschungsbedarf nötig, bevor effiziente biotechnologische Produktionsprozesse industriell genutzt werden können. Dabei sollen nachwachsende kostengünstige Rohstoffe, wie Getreide oder Holz, Ausgangsstoff der biotechnologischen Produktion sein. Diese können in ihre Monomere (Zucker) gespalten und von Mikroorganismen als Substrat verstoffwechselt werden, wie in Abbildung 1-1 dargestellt.

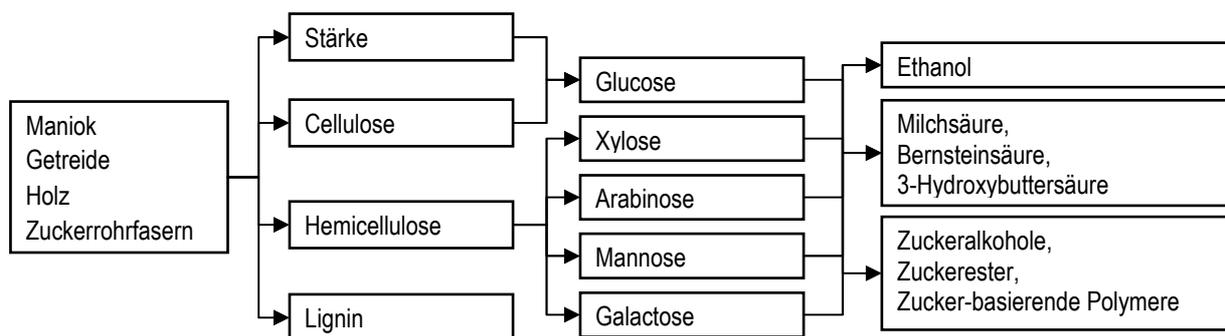


Abbildung 1-1: Schema zur Gewinnung von Bioprodukten aus nachwachsenden Rohstoffen nach Tokiwa und Calabia 2008

Ziel ist es so Plattformchemikalien (Ethanol, organische Säuren, Ester) herzustellen, die Ausgangsstoff für die Synthese vieler weiterer Produkte, wie Biokraftstoffe, Biomaterialien oder Biokunststoffe, sein

können. Gemeinsam mit weiteren C₄-Dicarbonsäuren, wie Fumar- und Äpfelsäure, wurde dabei Bernsteinsäure 2004 durch das Department of Energy der USA als eine von zwölf Plattformchemikalien mit besonderem biotechnologischen Herstellungspotenzial identifiziert (Werpy *et al.* 2004).

Um eine konkurrenzfähige biotechnologische Produktion zu erreichen, sind neben möglichst kostengünstigen Ausgangsstoffen effiziente Produktionsstämme nötig, die eine große Vielzahl verschiedener Zucker mit hoher Ausbeute verstoffwechseln können. Da bis zu 50 - 80 % der Kosten biotechnologischer Prozesse bei der Aufarbeitung entstehen (Baniel und Eyal 1995) sind zudem geeignete Aufbereitungsverfahren notwendig, um einen ökonomischen biotechnologischen Produktionsprozess zu gewährleisten (Tokiwa und Calabia 2008).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Bernsteinsäure hat das Potential eine wichtige Plattformchemikalie in der chemischen Industrie zu werden. Viele Arbeitsgruppen forschen deshalb weltweit an der optimalen Produktion und Aufarbeitung dieser organischen Säure. Während mit optimierten Mikroorganismen schon hohe Produktkonzentrationen von bis zu 146 g L^{-1} erzielt werden können (Okino *et al.* 2008), stellt die kostengünstige und selektive Entfernung von Bernsteinsäure aus der wässrigen Fermentationslösung noch ein Problem dar.

Bei der Untersuchung und dem Vergleich verschiedener in der Literatur beschriebener Isolierungs- und Reinigungsmethoden für Bernsteinsäure aus wässrigen Lösungen im Labormaßstab scheint vor allem die Reaktivextraktion eine geeignete und erfolgversprechende Methode zu sein (Cascaval und Balaction 2004). Dabei handelt es sich um eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit zusätzlicher Reaktivkomponente („Carrier“). Für die selektive Abtrennung von Bernsteinsäure eignen sich vor allem hochmolekulare aliphatische Amine in organischen nicht-wasserlöslichen Lösungsmitteln als Reaktivkomponenten (Tung und King 1994a, Hong und Hong 2000a-c, Hong *et al.* 2002, Hong und Hong 2004, Song *et al.* 2007). Amine können dabei mit den Säuremolekülen an der Phasengrenze wechselwirken und einen reversiblen Komplex bilden. Dieser geht in die organische Phase über und wird dort von den Lösungsmittelmolekülen solvatisiert (Rydberg *et al.* 1992).

Da Bernsteinsäure nach der Reaktivextraktion als Säure-Amin-Komplex in einer organischen Phase vorliegt, ist eine weitere Aufarbeitung notwendig. In der Literatur werden hierfür vor allem Rückextraktionsverfahren mit einer wässrigen Trimethylaminlösung vorgeschlagen (Tung und King 1994b; Poole und King 1991). Trimethylamin kann dabei mit dem Amin-Säure-Komplex wechselwirken und die Bernsteinsäure auf Grund seiner hohen Basizität ($\text{pK}_B = 4,1$) in die wässrige Phase (als Ammoniumsalz) überführen. Im Vergleich zu primären und sekundären Aminen tritt bei Trimethylamin in Gegenwart von Carbonsäuren bei höheren Temperaturen keine Amidbildung auf (Mitchell und Reid 1931; Poole und King 1991; Streitwieser und Heathcock 1976), wodurch eine einfache thermische Spaltung des Trimethylammoniumsalzes der Bernsteinsäure durch eine Verdampfungskristallisation möglich ist (Tung und King 1994b). Bernsteinsäure liegt nach diesem Schritt in reiner kristalliner Form vor.

Das Konzept des Aufarbeitungsprozesses zur selektiven Gewinnung von Bernsteinsäure aus einer wässrigen Fermentationslösung besteht, basierend auf den Literaturdaten, aus einer integrierten Reaktivextraktion mit Aminen, einer Rückextraktion mit Trimethylamin und einer Verdampfungskristallisation (siehe Abbildung 2-1).

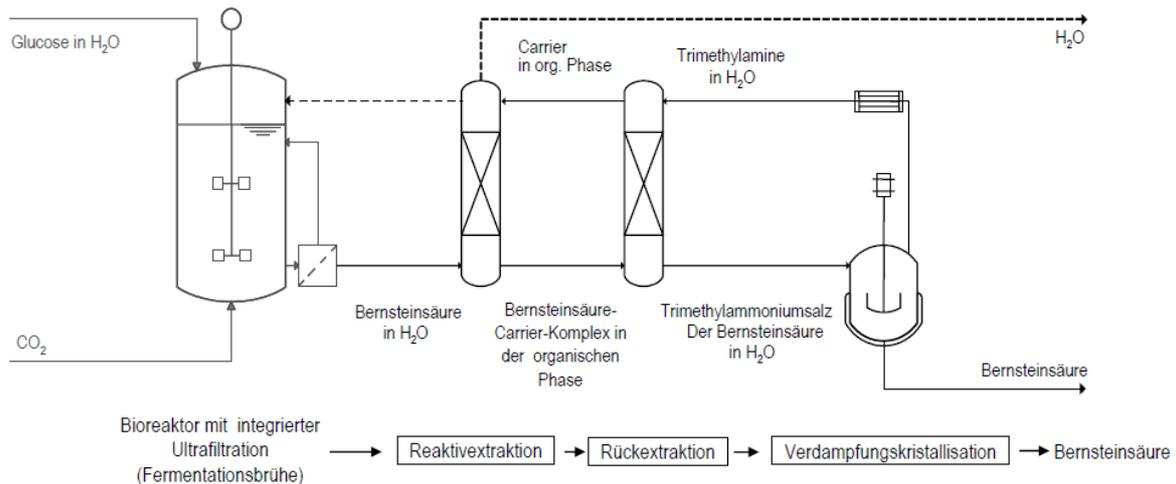


Abbildung 2-1: Prozessschema integrierte Reaktivextraktion von Bernsteinsäure

Sowohl bei der Reaktivextraktion als auch bei der Rückextraktion sind hohe Mengen an Lösungsmitteln und Aminen notwendig. Für einen ökonomischen und ökologischen Gesamtprozess ist aus diesem Grund eine Minimierung des Hilfsmittelverbrauchs notwendig. Dies soll durch eine Kreislaufführung aller eingesetzten Hilfsmittel realisiert werden. Des Weiteren soll gezeigt werden, dass eine Prozessintegration der einzelnen Aufarbeitungsschritte möglich ist.

Um dieses Konzept zur selektiven Abtrennung von Bernsteinsäure aus einer wässrigen Fermentationslösung realisieren zu können, sind folgende Arbeitsschritte gegeben. Ausgehend von einer wässrigen Modelllösung und Fermentationsüberstand soll die Reaktivextraktion von Bernsteinsäure mit Aminen charakterisiert werden. Dabei sollen unterschiedliche Amingruppen (primär, sekundär, tertiär und Arylamin vs. Alkylamin) und unterschiedliche Lösungsmittel (Alkohole, Ketone, Alkane...) sowie deren Kombinationen untersucht und im Hinblick auf eine möglichst hohe Extraktionsausbeute optimiert werden. Des Weiteren sollen sowohl einfache Reaktivextraktionssysteme (ein Amin + ein Lösungsmittel) als auch komplexe Reaktivextraktionssysteme (zwei Amine + zwei Lösungsmitteln) berücksichtigt werden. Für eine Prozessintegration soll außerdem die Biokompatibilität der Reaktivextraktionssysteme untersucht werden. Die am besten für Bernsteinsäure geeigneten Reaktivextraktionssysteme sollen anschließend näher charakterisiert und im Litermaßstab in einem Zentrifugalextraktor eingesetzt werden. Die wichtigsten Arbeitspakete im Rahmen der Reaktivextraktion gliedern sich somit in:

- Identifikation einfacher, komplexer und biokompatibler Reaktivextraktionssysteme
- Charakterisierung der besten Reaktivextraktionssysteme im mL-Maßstab
- Optimierung der Reaktivextraktion im L-Maßstab (Zentrifugalextraktor)

Nach der Extraktion soll die Rückextraktion der Bernsteinsäure in eine zweite wässrige Phase mit Trimethylamin erfolgen. Besonderes Augenmerk soll dabei auf die benötigte Menge an Trimethylamin und die Optimierung der Rückextraktion im L-Maßstab mit Zentrifugalextraktoren gelegt werden. Folgende Punkte sollen dementsprechend bearbeitet werden:

- Charakterisierung der Rückextraktion im mL-Maßstab
- Optimierung der Rückextraktion im L-Maßstab (Zentrifugalextraktor)

Nach der Rückextraktion sollen die thermische Spaltung des Trimethylammoniumsalzes und die Kristallisation der freigesetzten Säure erfolgen. Folgende Aspekte sollen dabei besonders beachtet werden:

- Maximale Bernsteinsäureausbeute
- Reinheit der erzielten Bernsteinsäure-Kristalle

Nach der Optimierung der einzelnen Prozessschritte soll des Weiteren eine Optimierung und Bewertung des Gesamtprozesses erfolgen. Hierbei soll vor allem auf die Rezyklierbarkeit der eingesetzten Reaktivextraktionssysteme und die Gesamtausbeuten sowie Reinheit der isolierten Bernsteinsäure eingegangen werden. Die Optimierung der Reaktiv- und Rückextraktion im Zentrifugalextraktor soll dabei alle nötigen Daten für eine direkte Maßstabsvergrößerung und geeignete Prozessführung liefern. Besonderes Augenmerk soll bei den Arbeiten im Zentrifugalextraktor auf die Phasentrennung gelegt werden. Bei der Betrachtung des Gesamtprozesses soll dementsprechend auf die im Folgenden zusammengefassten Punkte eingegangen werden:

- Minimierung der Abfallmengen durch Rezyklierung der eingesetzten Hilfsstoffe
- Daten zur Maßstabsvergrößerung
- Prozessintegration und Prozessführung

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Biologische Grundlagen

3.1.1 Mikroorganismen

Im folgenden Kapitel werden einige klassische Bernsteinsäureproduzenten, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum* näher vorgestellt.

3.1.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae (oder Bäckerhefe) sind schlauchförmige Pilze (Protoascomyceten) und werden zu den Eukaryoten gezählt. Die Form der *Saccharomyces cerevisiae* Zellen ist rund bis oval mit einem Durchmesser von 8 µm (Madigan und Martinko 2006), was in Abbildung 3-1 zu sehen ist.

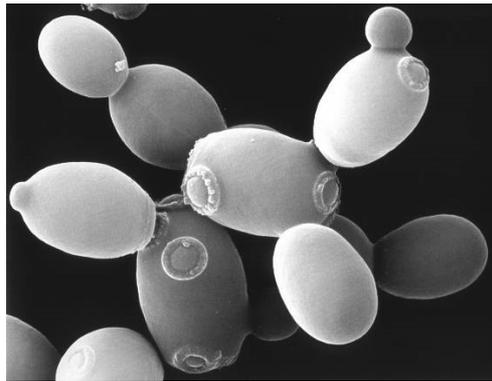


Abbildung 3-1: Mikroskopaufnahme von *Saccharomyces cerevisiae* ¹

Die Vermehrung findet hauptsächlich über Sprossung statt. Dabei bildet sich an der Mutterzelle ein Auswuchs aus, in den der Kern einwandert. Diese Ausstülpung wird dann als Knospe abgeschnürt. Die Sprosszellen können sich komplett voneinander lösen oder als Pseudo- oder Sprossmycel miteinander verbunden bleiben, sie bilden jedoch kein echtes Mycel aus. Nur in seltenen Fällen kommt es zu einer Querteilung oder Spaltung der Zellen (Schlegel 1992).

Bereits seit Jahrhunderten werden Hefen in der Lebensmittelindustrie für die Erzeugung von Bier oder Backerzeugnissen eingesetzt. *S. cerevisiae* ist dabei sowohl zur Atmung mit den Endprodukten CO₂ und Wasser als auch zur Gärung mit den Endprodukten CO₂, Ethanol, Succinat, Glycerin und anderen

¹ <http://www.braukultur-franken.de>

Stoffen fähig. Auf Grund des kleinen (~6000 Gene) und vollständig sequenzierten Genoms sowie der geringen Verdopplungszeit ist *Saccharomyces cerevisiae* inzwischen jedoch auch ein Modellorganismus für die molekularbiologische Forschung an Eukaryoten geworden (Schlegel 1992, Madigan und Martinko 2006).

3.1.1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) wurde 1885 nach seinem Entdecker Theodor Escherich benannt. Es ist ein gram-negatives, peritrich begeißeltes, säurebildendes Bakterium (Abbildung 3-2), das im menschlichen und tierischem Darm (griech. „enteron“ = Darm) vorkommt und deshalb zu den Enterobacteriaceae gezählt wird (Schlegel 1992; Neidhardt 1996). Die Form der Zellen ist länglich mit einem Durchmesser von 1 µm und einer Länge von 2 - 4 µm (Knippers 2006).

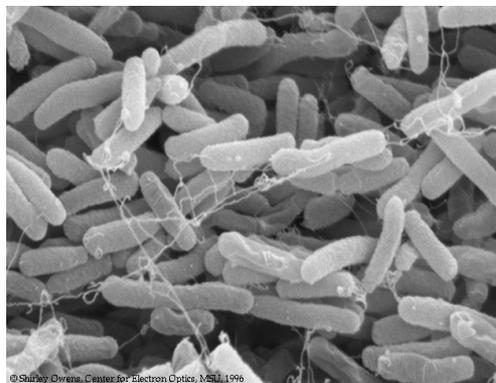


Abbildung 3-2: Mikroskopaufnahme von *Escherichia coli* ²

Auf Grund des einfachen Aufbaus und des kleinen (~4300 Gene) bereits vollständig sequenzierten Genoms ist *E. coli* der am besten charakterisierte und am häufigsten in der Molekularbiologie eingesetzte prokaryotische Modellorganismus (Blattner *et al.* 1993; Römpf 1999). Das Bakterium ist fakultativ anaerob und kann dementsprechend sowohl durch Atmung, als auch durch gemischte Säuregärung Energie gewinnen. *E. coli* ist in der Lage ein breites Spektrum an Mineralsalzen, Kohlenhydraten und Ammoniumsalzen zu verstoffwechseln. Das Wachstum erfolgt dabei über eine Querteilung der Zellen. Die optimalen Wachstumsbedingungen liegen bei 37°C (mesophil) und einem pH von 6,5 - 7,3 (neutrophil). Auf Grund der vergleichsweise einfachen Handhabung findet *E. coli* eine breite Verwendung in der Biotechnologie (Neidhardt 1996).

² Quelle: <http://www.waterscan.rs/images/virusi-bakterije//bact-escherichia-coli.jpg>

3.1.1.3 *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum ist ein gram-positives, nicht-pathogenes Bodenbakterium, das zur Ordnung der Actinomycetales und zur Familie der Corynebacteriaceae gezählt wird. Der Familienname kommt durch die keulenartige Form (griech. „coryne“ = Keule) zustande, die in Abbildung 3-3 zu sehen ist. Die Größe des Bakteriums ist 0,7 - 1,0 μm x 1,0 - 3,0 μm (Kinoshita *et al.* 1957). Die Vermehrung geschieht durch das sogenannten „Schnappen“, bei dem die Zelle in Nähe der neuen Zellwand an verschiedenen Stellen unterschiedlich schnell aufreißt. Neben dieser Art der Teilung kann es auch zu einer simultanen Vielfachteilung kommen, bei der aus einer großen Zelle viele kurze Stäbchen entstehen.

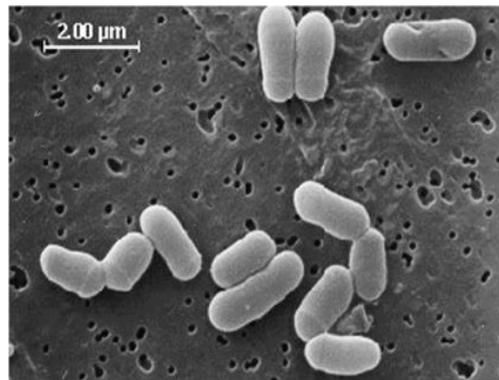


Abbildung 3-3: Mikroskopaufnahme von *Corynebacterium glutamicum* ³

Entdeckt wurde das Bakterium 1957 bei einer großangelegten Suche nach natürlichen Glutaminsäureproduzenten aus Bodenproben (Kinoshita *et al.* 1957). Das Genom (~3000 Gene) ist mittlerweile vollständig sequenziert und andere neue biotechnologische Produktionsprozesse für Nukleotide, Vitamine oder Aminosäuren wurden neben der Glutamaterzeugung entwickelt (Schlegel 1992).

³ Quelle: http://wwwuser.gwdg.de/~appmibio/Abbildungen/Coryne_SEM.jpg

3.2 Bioprozessentwicklung

3.2.1 Bioreaktoren

Die Kultivierung von Mikroorganismen erfolgt in der Regel in Bioreaktoren. Die Aufgabe eines Bioreaktors umfasst dabei die Versorgung der Zellen mit ausreichend Nährstoffen und gegebenenfalls Sauerstoff. Bioreaktoren lassen sich in Oberflächenreaktoren, bei denen die Zellen an einen festen Träger gebunden sind oder an der Oberfläche schwimmen, und Submersreaktoren, bei denen die Zellen suspendiert in flüssigem Nährmedium vorliegen, unterscheiden. Je nachdem, ob es sich um einen anaeroben oder aeroben Prozess handelt, liegt in einer Submerskultur ein Zweiphasensystem (Zellen, Medium) oder Dreiphasensystem (Zellen, Medium, Gas) vor (Schügerl *et al.* 1987). Submerskulturen können mit verschiedensten Reaktortypen erzielt werden. Je nach Strömungsverhalten und Energieeintrag werden Rührkesselreaktoren, Schlaufenreaktoren und Blasensäulenreaktoren unterschieden (Schügerl und Bellgardt 2000; Chmiel 1991). Am häufigsten wird dabei der Rührkessel auf Grund seiner universellen und flexiblen Einsetzbarkeit für die Kultivierung von Mikroorganismen verwendet. Die allgemeine Bilanzgleichung zur Beschreibung eines idealen Rührkesselreaktors (alle Reaktionsgeschwindigkeiten, Konzentration und physikalischen Eigenschaften des Reaktionsmediums sind räumlich konstant) lautet:

$$V \cdot \frac{dc_i}{dt} = \dot{V}_{ein} \cdot c_{i,ein} - \dot{V}_{aus} \cdot c_{i,aus} + c_x \cdot r_i \cdot V \quad (3-1)$$

V = Reaktorvolumen, L

\dot{V}_{ein} = Volumenstrom des Zulaufs, L h⁻¹

\dot{V}_{aus} = Volumenstrom des Ablauf, L h⁻¹

$c_{i,ein}$ = Konzentration der Komponente i im Zulaufvolumenstrom, g L⁻¹

$c_{i,aus}$ = Konzentration der Komponente i im Ablaufvolumenstrom, g L⁻¹

r_i = spezifische Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i

Für grundlegende Charakterisierungsversuche und Vorversuche werden häufig Mikroreaktoren oder Schüttelkolben gewählt, da diese leicht handhabbar sind. Die weiteren genaueren Untersuchungen und die Prozessentwicklung finden anschließend in Labor- oder Pilotfermentern statt. Der industrielle Prozess wird mit Produktionsbioreaktoren mit deutlich größerem Volumen durchgeführt.

3.2.2 Mikrobielles Wachstum

Das Wachstum von Mikroorganismen im Satzverfahren folgt in der Regel der in Abbildung 3-4 dargestellten allgemeinen Wachstumskurve.

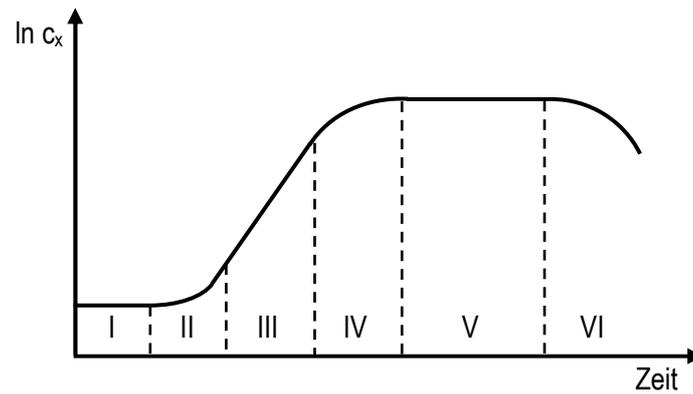


Abbildung 3-4: Schematische Wachstumskurve von Mikroorganismen. In c_x : Logarithmus der Biomassekonzentration, I: Anpassungsphase (lag-Phase), II: Übergangsphase 1, III exponentielle Phase (lg-Phase), IV: Übergangsphase 2, V: stationäre Phase, VI: Absterbephase

In der Anpassungsphase adaptieren sich die Zellen an die neuen Umgebungsbedingungen. Je nach Alter und Qualität der Vorkultur sowie der Eignung des eingesetzten Mediums ist die Dauer der Phase unterschiedlich lang. Nach einer kurzen Übergangsphase, in der die ersten Zellteilungen stattfinden, folgt die exponentielle Wachstumsphase. Die Zellen wachsen hier konstant mit ihrer maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{max} . Die maximale Wachstumsrate ist für jeden Mikroorganismus eine spezifische Größe und ist definiert als:

$$\mu \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt} \quad (3-2)$$

μ = spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
 c_x = Konzentration der Biotrockenmasse, $g L^{-1}$
 t = Zeit, h

Nach der exponentiellen Wachstumsphase folgt eine zweite Übergangsphase. Hier kann es zu ersten Limitierungen durch mangelndes Substrat kommen. Tritt eine Substratlimitierung auf, kann die Wachstumsrate über eine einfache Sättigungskinetik (Monod 1942) in Abhängigkeit der limitierenden Substratkonzentration empirisch beschrieben werden (siehe Gleichung 3-3). Alle anderen Prozessvariablen, wie Temperatur, Druck und pH werden dabei als konstant betrachtet.

$$\mu = \mu_{max} \frac{c_s}{K_s + c_s} \quad (3-3)$$

μ_{max} = Wachstumsrate unter nicht limitierenden Bedingungen, h^{-1}
 c_s = Konzentration des limitierenden Substrates, $g L^{-1}$
 K_s = Sättigungskonstante, $g L^{-1}$

Nach der zweiten Übergangsphase stellt sich stationäres Wachstum ein. Es herrscht ein Gleichgewicht zwischen der Geschwindigkeit der Vermehrung und des Absterbens der Zellen. An diesem Punkt ist die maximale Zellzahl und die maximale Biomassekonzentration erreicht. Es folgt die letzte Phase, die Absterbephase der Zellen. Dabei ist ein stetiger Anstieg der Absterberate zu beobachten (Schlegel 1992).

Analog zu Gleichung 3-2 kann die spezifische Aufnahme- oder Bildungsrate einer Komponente i über die Änderung ihrer Konzentration und der Biomassekonzentration mit der Prozesszeit beschrieben werden. Die zellspezifischen Reaktionsgeschwindigkeiten sind dementsprechend wie folgt definiert:

$$q_i \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_i}{dt} \quad (3-4)$$

q_i = Biomasse-spezifische Aufnahme- oder Bildungsrate für Komponente i , $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
 i = Biomasse (X), Produkt (P), Substrat (S)

Der Zusammenhang zwischen der Wachstumsrate und der Substrataufnahmerate kann über Gleichung 3-5, der Biomasse-Substrat-Selektivität, berechnet werden. Diese beschreibt die Biomassebildung in Abhängigkeit des Substratverbrauchs.

$$Y_{X,S} = \frac{\mu}{q_s} = \frac{dc_x}{dc_s} \quad (3-5)$$

$Y_{X,S}$ = Substrat-bezogene Biomasse-Ausbeute, g g^{-1} Substrat
 q_s = Substrataufnahmerate, h^{-1}
 c_s = Substratkonzentration, g L^{-1}

3.2.3 Prozessführung in Bioreaktoren

Im Rührkesselreaktor ist die Reaktionsführung von entscheidender Rolle für die gewünschte Kultivierung und Produktbildung. Man unterscheidet dabei Satzverfahren (geschlossen), Zulaufverfahren (teiloffen) und kontinuierliche Verfahren (offen). Während beim Satzverfahren alle nötigen Stoffe im Fermenter vorgelegt werden und der Prozess nach Verbrauch der Nährstoffe beendet ist, wird bei einem Zulaufverfahren kontinuierlich Nährstofflösung in den Reaktor geführt.

Neben den klassischen Satz- und Zulaufverfahren ist die modifizierte Variante, die repetitive Prozessführung, zu nennen. Hierbei wird ein Teil der Zellmasse im Reaktor zurückgehalten oder aus der Fermentationsbrühe nach der Kultivierung gewonnen und für eine neue Kultivierung mit frischem Medium eingesetzt.

Bei der letzten Variante der Prozessführung, der kontinuierlichen Kultivierung, wird zusätzlich zu den zugeführten Nährstoffen mit gleichem Volumenstrom Medium aus dem Reaktor abgeführt.

In der Industrie werden jedoch vor allem Satz- und Zulaufverfahren für die Produktion eingesetzt, da hier bei kürzeren Prozesszeiten Probleme mit der Sterilität und der Stabilität des Produktionsorganismus vermieden werden können (Schügerl und Bellgardt 2000).

Satzverfahren

Bei einem Satzverfahren werden alle nötigen Nährstoffe für den jeweiligen Mikroorganismus, sowie Puffer und falls benötigt Antibiotika im Reaktionsgefäß vorgelegt. Wachstum und Produktion erfolgen bis das Substrat verbraucht ist oder eine Hemmung durch das gebildete Produkt auftritt. Vorteil des Satzverfahrens ist der relativ einfache apparative Aufwand. Nachteilig ist die geringe Produktivität, da der Reaktor vor jeder Fermentation gereinigt und sterilisiert werden muss und mit niedrigen Zelldichten neu gestartet wird. Die Konzentrationen aller vorhandenen Komponenten (Substrat, Biomasse, Produkt) sind bei einem Satzverfahren im idealen Rührkesselreaktor lediglich von der Prozessdauer abhängig. Aus diesen Bedingungen lässt sich die in Gleichung 3-6 gezeigte Massenbilanz ableiten:

$$\frac{dc_i}{dt} = c_x \cdot r_i \quad (3-6)$$

Zulaufverfahren

Beim Zulaufverfahren werden zusätzlich zu bereits vorgelegten Medienbestandteilen limitierende Substrate und Medienbestandteile nachdosiert. Dadurch kann sowohl die Wachstumsphase als auch die Produktbildungsphase verlängert werden. Vorteil des Zulaufverfahrens ist, dass eine Inhibierung durch hohe Substratkonzentrationen vermieden werden kann. Insgesamt werden im Zulaufverfahren höhere Zelldichten, höhere Produktausbeuten und längere Prozesszeiten als im Satzverfahren erzielt. Nachteilig ist jedoch auch hier die geringe Produktivität auf Grund der Standzeiten für Reinigung und Sterilisierung, sowie die niedrige Zelldichte bei Prozessbeginn.

Da nur ein Zulauf von Medienbestandteilen jedoch kein Ablauf stattfindet, steigt das Volumen mit der Prozesszeit im Reaktor an. Die Massenbilanz für eine Komponente i in einem idealen Rührkesselreaktor im Zulaufverfahren lautet dementsprechend:

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{\dot{V}_{ein}}{V} \cdot (c_{i,ein} - c_i) + c_x \cdot q_i \quad (3-7)$$

Normalerweise liegt im Zulaufstrom keine Biomasse vor, weshalb die Gleichung für die Massenbilanz der Biomasse vereinfacht werden kann in:

$$\frac{dc_x}{dt} = -\frac{\dot{V}_{ein}}{V} \cdot c_x + c_x \cdot \mu \quad (3-8)$$

Ein Hauptziel des Zulaufverfahrens und der kontinuierlichen Kultur ist es, die Wachstumsrate über die Dosierung des Substrats zu steuern. Substratlimitierende Bedingungen können durch ein angepasstes und optimiertes Zulaufprofil erzielt werden. Soll eine konstante Substratkonzentration ($dc_s / dt = 0$) im Reaktor eingestellt werden, berechnet sich die benötigte Zulaufrate für die gewünschte Substrataufnahmerate q_s^{set} über Gleichung 3-9.

$$\dot{V}_{S,ein} = \frac{V \cdot c_x}{c_{S,ein} - c_S^{set}} \cdot q_s^{set} \quad (3-9)$$

Bei einer konstanten Biomasseausbeute kann Gleichung 3-9 auch über eine vordefinierte Wachstumsrate μ^{set} beschrieben werden.

$$\dot{V}_{S,ein} = \frac{V \cdot c_x}{Y_{X,S} \cdot (c_{S,ein} - c_S^{set})} \cdot \mu^{set} \quad (3-10)$$

Die Biomassekonzentration und das Reaktorvolumen sind in Gleichung 3-9 und 3-10 nicht konstant, sondern abhängig von der Prozesszeit. Da jedoch q_s^{set} konstant ist, kann aus Gleichung 3-5 eine konstante exponentielle Wachstumsrate μ^{set} abgeleitet werden. Die Dosierung des Substrats erfolgt deshalb ebenfalls über ein zeitabhängiges exponentielles Profil, das über Gleichung 3-11 eingestellt werden kann.

$$\dot{V}_{S,ein}(t) = \frac{V^0 \cdot c_x^0}{Y_{X,S} \cdot (c_{S,ein} - c_S^{set})} \cdot \mu^{set} \cdot e^{(\mu^{set} \cdot t)} \quad (3-11)$$

Eine "Open-Loop" Zulaufstrategie, entsprechend Gleichung 3-11, erlaubt eine Kontrolle der spezifischen Raten über die Substratdosierung, solange keine anderen Komponenten limitierend oder inhibierend auf das Wachstum wirken (Jenzsch *et al.* 2006).

Bestimmung spezifischer Raten

Spezifische Raten können während einer Kultivierung im Satzverfahren über die Änderung der Biomasse und der Konzentration verschiedener Komponenten bestimmt werden. Geht man von einer konstanten Wachstumsrate (μ_{max}) des Mikroorganismus aus, lässt sich die Zunahme der Biomasse über die Integration von Gleichung 3-2 in Abhängigkeit der Prozesszeit und der Biomassekonzentration zum Startzeitpunkt nach Gleichung 3-12 berechnen.

$$c_x(t) = c_x^0 \cdot e^{(\mu_{max} \cdot t)} \quad (3-12)$$

Während eines Bioprozesses findet kontinuierlich eine Aufnahme und Abgabe von Sauerstoff und Kohlendioxid statt. Dies kann über eine Abgasmessung bestimmt werden. In aeroben Prozesses kann Sauerstoff ein limitierendes Substrat darstellen. Sauerstofflimitierung führt bei *Escherichia coli* zur Bildung von Nebenprodukten, wie Acetat, Formiat und Ethanol, die wachstumsassoziiert gebildet werden (Varma und Palsson 1994). Ist die Sauerstoffkonzentration im Medium konstant, lässt sich die Sauerstofftransferrate (OTR) über die Massenbilanzen in der Gasphase nach Gleichung 3-13 ermitteln.

$$OTR = \frac{\dot{V}_{Gas, ein} \cdot x_{O_2}^{ein} - \dot{V}_{Gas, aus} \cdot x_{O_2}^{aus}}{V \cdot V_{mol}} \quad (3-13)$$

V = Reaktorvolumen, L

$\dot{V}_{Gas, ein}$ = Volumenstrom Gas in den Reaktor, L h⁻¹

$\dot{V}_{Gas, aus}$ = Volumenstrom Gas aus dem Reaktor, L h⁻¹

V_{mol} = molare Volumen eines idealen Gases: 22,414 mol L⁻¹

$x_{O_2}^{ein}$ = Molfraktion von Sauerstoff im Volumenstrom in den Reaktor, -

$x_{O_2}^{aus}$ = Molfraktion von Sauerstoff im Volumenstrom aus dem Reaktor, -

Unter der Annahme, dass der Sauerstoffverbrauch nur durch den Zellstoffwechsel verursacht wird, gilt bei konstanter Sauerstoffkonzentration im Medium und konstanter Kohlendioxidkonzentration in der Abluft, dass die Sauerstoffaufnahme (OUR) der Sauerstofftransferrate (OTR) entspricht. Diese kann über Gleichung 3-14 berechnet werden.

$$OUR = \frac{\dot{V}_{Gas, ein}}{V \cdot V_{mol}} \cdot (x_{O_2}^{ein} - K \cdot x_{O_2}^{aus}) \quad (3-14)$$

$x_{CO_2}^{ein}$ = Molfraktion von Kohlendioxid im Volumenstrom in den Reaktor

$x_{CO_2}^{aus}$ = Molfraktion von Kohlendioxid im Volumenstrom aus dem Reaktor

$K = 1 - x_{CO_2}^{ein} - x_{O_2}^{ein} / 1 - x_{CO_2}^{aus} - x_{O_2}^{aus}$

Analog lässt sich die Kohlendioxidbildungsrate (CER) berechnen:

$$CER = \frac{\dot{V}_{Gas, ein}}{V \cdot V_{mol}} \cdot (K \cdot x_{CO_2}^{aus} - x_{CO_2}^{ein}) \quad (3-15)$$

3.3 Bernsteinsäure

Bernsteinsäure (Abbildung 3-5 a), nach IUPAC-Nomenklatur Ethan-1,2-dicarbonsäure, ist eine aliphatische Säure, bestehend aus vier Kohlenstoffen (C_4) und zwei Carboxylgruppen. Andere Namen sind Succinylsäure oder Butandisäure. Bernsteinsäure wurde erstmals 1546 von Georgius Agricola bei der trockenen Destillation durch Erhitzen von Bernstein entdeckt. Sie ist außerdem in Harzen sowie in vielen Pflanzen wie Algen, Tomaten und unreifen Früchten enthalten (Schröter *et al.* 2002). Die Salze der Säure werden Succinate (Abbildung 3-5 b) genannt.

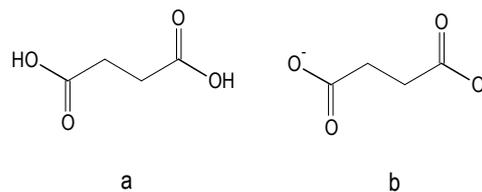


Abbildung 3-5: Strukturformel von Bernsteinsäure (a) und Succinat (b)

Bernsteinsäure kann auf Grund ihrer beiden Carboxylgruppen zweifach dissoziieren, wobei der pK_{S1} bei 4,17 und der pK_{S2} bei 5,64 liegt. Die Molfraktionen der verschiedenen Ionenspezies bei unterschiedlichem pH sind in Abbildung 3-6 dargestellt.

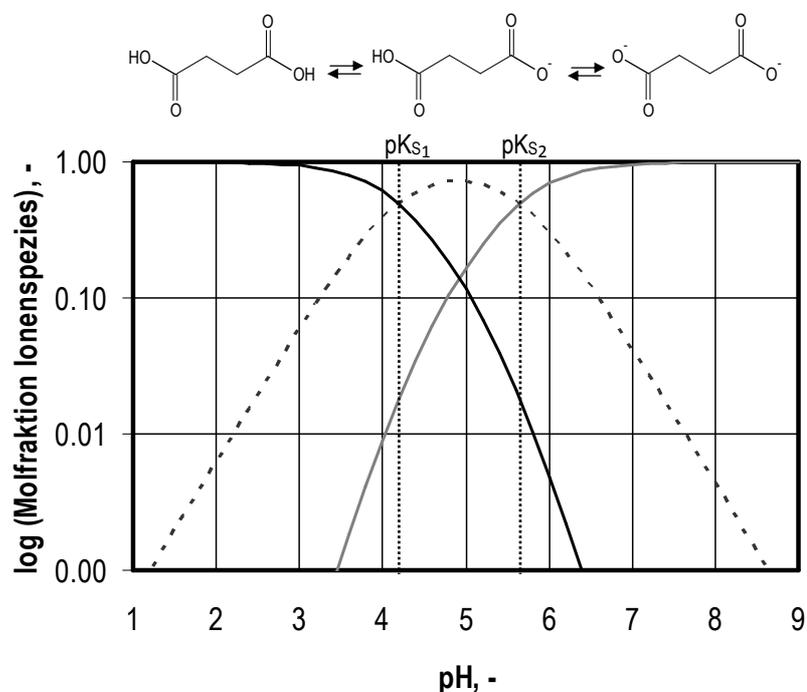


Abbildung 3-6: Molfraktionen der verschiedenen Ionenspezies von Bernsteinsäure bei unterschiedlichem pH: undissoziierte Säure — , einfach dissoziierte Säure - - , zweifach dissoziierte Säure — .

Insgesamt ist zu beobachten, dass die Menge an undissoziierter Säure mit sinkendem pH zunimmt. Unter einem pH von 2,0 liegt nahezu die gesamte Säure in protonierter Form vor. Im pH-Bereich zwischen etwa 3,0 - 6,5 sind alle drei möglichen Dissoziationsstufen in unterschiedlichen Mengenverhältnissen vorhanden. Bei noch höheren pH liegt Bernsteinsäure nur noch einfach oder zweifach dissoziiert vor und keine undissoziierten Moleküle sind mehr vorhanden.

Die Löslichkeit der Säure in Wasser beträgt $58,0 \text{ g L}^{-1}$ (20°C). Wird Bernsteinsäure erhitzt ($> 235^\circ\text{C}$), spaltet sie Wasser ab und bildet unter Ringschluss das Bernsteinsäureanhydrid (siehe Abbildung 3-7), das nur in Gegenwart von starken Basen (NaOH) wieder zu Bernsteinsäure hydrolysiert werden kann (Brockhaus 2005 - 2009).

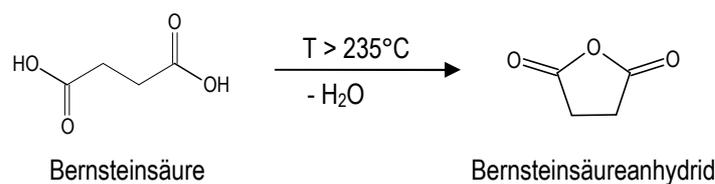


Abbildung 3-7: Reaktion von Bernsteinsäure zu Bernsteinsäureanhydrid

Die molare Masse der Säure beträgt $118,09 \text{ g mol}^{-1}$. Die hohen Schmelz- und Siedepunkte resultieren aus dem festen Zusammenhalt durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Molekülen. Alle wichtigen physikalischen und chemischen Daten sind in Tabelle 3-1 nochmals zusammengefasst.

Tabelle 3-1: Chemische und physikalische Daten von Bernsteinsäure aus (Römpp online, 08/2010)

Summenformel	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$
Molare Masse	$118,09 \text{ g mol}^{-1}$
Löslichkeit in Wasser (20°C)	58 g L^{-1}
pKs	1) 4,17 2) 5,64
Schmelzpunkt	184°C
Siedepunkt (1013 hPa)	235°C
Thermische Zersetzung	$> 235^\circ\text{C}$

3.3.1 Marktpotential von Bernsteinsäure

Bernsteinsäure ist als Grundchemikalie von großem Interesse für die chemische Industrie. Vor allem bei der Herstellung von biologisch abbaubaren Kunststoffen (Polyamide und Polyester) sind Dicarbonsäuren, wie Bernsteinsäure, wichtige Ausgangsstoffe (Cornils und Lappe 2005).

Bernsteinsäure wird jedoch auch in der Lebensmittelindustrie, der pharmazeutischen Industrie und anderen chemischen Industriezweigen eingesetzt. Derzeit werden in etwa 20.000 - 30.000 Tonnen pro Jahr petrochemisch produziert. Lediglich für den Lebensmittelmarkt wird die Säure aus natürlichen Rohstoffen mittels Fermentation erzeugt. Die aktuelle Marktgröße für den Einsatz von Bernsteinsäure in den Hauptbereichen (Lebensmittel, Arzneimittel, Kunststoffe, Tenside und Detergenzien) liegt bei etwa 400 Millionen US-\$ pro Jahr (Kidwell 2008; Zeikus *et al.* 1999).

Da die petrochemische Produktion auf Grund der steigenden Preise, der knapper werdenden Menge an Öl und dem negativen Umwelteinfluss vieler Produktionsverfahren immer unattraktiver wird, ist seit einigen Jahren eine Bewegung weg von der Erdöl-basierenden Industrie hin zu einer biotechnologischen Herstellung von chemischen Grundchemikalien feststellbar (Wilke 1995; Wilke 1999). Bernsteinsäure hat dabei das Potential petrochemisch erzeugtes Maleinsäureanhydrid als C₄-Plattformchemikalie abzulösen. Daraus ergeben sich eine Vielzahl neuer Märkte und Einsatzmöglichkeiten. Das Marktpotential biotechnologisch produzierter Bernsteinsäure wird deshalb auf rund 270.000 Tonnen pro Jahr und 15 Milliarden US-\$ geschätzt (Wilke und Vorlop 2004; Zeikus *et al.* 1999). In Abbildung 3-8 sind die wichtigsten potentiellen aus Bio-Bernsteinsäure synthetisierbaren Stoffe (1,4-Butandiol (BDO), Tetrahydrofuran (THF), γ -Butyrolacton (GBL), Pyrrolidone, Adipinsäure und die Ester und Salze der Säure) aufgeführt.

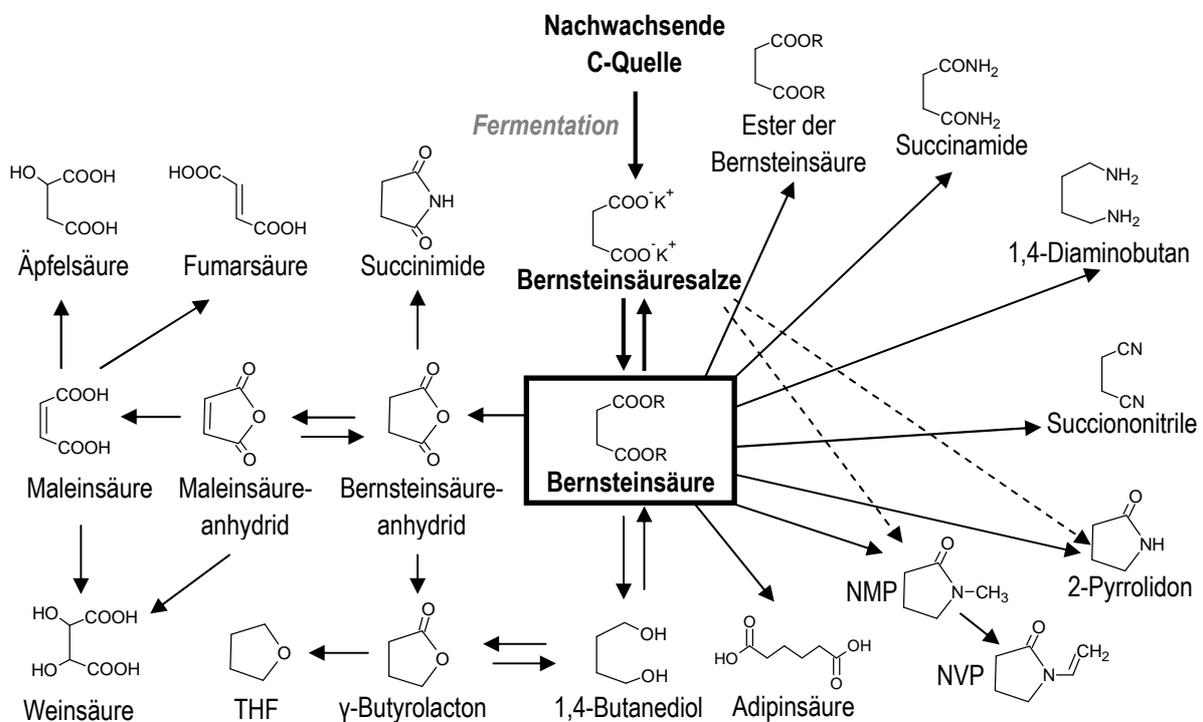


Abbildung 3-8: Potentielle Produkte aus Bio-Bernsteinsäure (nach McKinlay *et al.* 2007; Paster *et al.* 2003; Werpy und Petersen 2004; Zeikus *et al.* 1999; Beauprez *et al.* 2010; Delhomme *et al.* 2009)

1,4-Butandiol, Tetrahydrofuran, γ -Butyrolacton und Pyrrolidone sind wichtige Lösungsmittel. 1,4-Butandiol ist des Weiteren ein wichtiger Ausgangsstoff für Polybutylenterephthalat und dessen Harze, sowie Tetrahydrofuran und γ -Butyrolacton. Die aktuelle Marktgröße liegt derzeit bei etwa 479.000 Tonnen pro Jahr. Tetrahydrofuran findet zusätzlich Anwendung als Grundstoff bei der Herstellung von Elastan (dehnbare Kunstfasern). Es ist außerdem Hauptbestandteil von Druckertinten und magnetischen Filmen. Die Marktgröße liegt bei ca. 166.000 Tonnen pro Jahr. γ -Butyrolacton ist mit einer Marktgröße von etwa 48.000 Tonnen pro Jahr Ausgangsstoff bei der chemischen Synthese von Pyrrolidonen, Pharmazeutika, Farben und Klebstoffen. Bernsteinsäuresalze finden ihr Haupteinsatzgebiet als Enteisungsmittel und Herbizidzusatzstoffe. Die Marktgröße liegt hier bei etwa 92.000 Tonnen pro Jahr. Auch die Ester der Bernsteinsäure finden Verwendung als Lösungsmittel (z.B. Diethylester) oder Polymere (z.B. 4,4-Polyester) bei der Kunststoffherzeugung. Der Marktanteil liegt hier bei mehr als 40.000 Tonnen pro Jahr und nimmt stetig zu. Als Ausgangsstoff bei der Synthese von Nylon 6,6 wird Adipinsäure eingesetzt, die ebenfalls aus Bernsteinsäure synthetisiert werden kann. Der Marktanteil ist im Vergleich zu allen anderen auf Bio-Bernsteinsäure basierenden Produkten mit 900.000 Tonnen pro Jahr sehr hoch (McKinlay *et al.* 2007; Paster *et al.* 2003; Werpy und Petersen 2004; Zeikus *et al.* 1999; Beauprez *et al.* 2010).

3.3.2 Petrochemische Produktion von Bernsteinsäure

Wie bereits in Punkt 3.3.1 erwähnt, wird Bernsteinsäure derzeit nahezu vollständig petrochemisch erzeugt. Hierfür steht eine große Anzahl an verschiedenen industriellen Synthesewegen zur Verfügung. Bernsteinsäure kann mit hoher Ausbeute entweder durch katalytische Hydrierung von Maleinsäureanhydrid und anschließender Wasseranlagerung (Abbildung 3-9) oder durch direkte Hydrierung von Maleinsäure (Abbildung 3-10) oder Fumarsäure erzeugt werden (Cornils und Lappe 2005, Kidwall 2008).

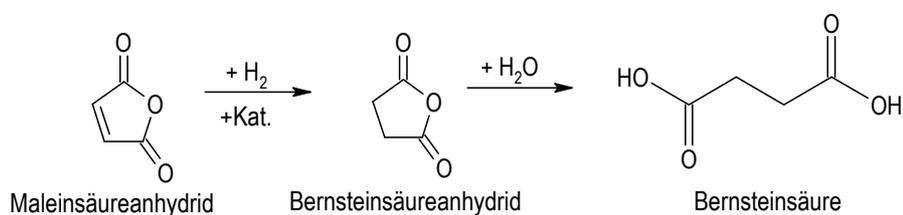


Abbildung 3-9: Petrochemische Produktion von Bernsteinsäure. Weg 1: Katalytische Hydrierung von Maleinsäureanhydrid und anschließende Wasseranlagerung

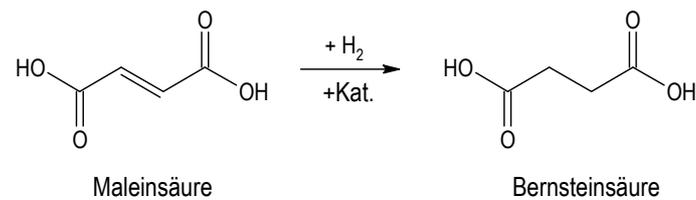


Abbildung 3-10: Petrochemische Produktion von Bernsteinsäure. Weg 2: Direkte Katalytische Hydrierung von Maleinsäure

Der Standardkatalysator bei der Hydrierung ist ein Raney-Nickel-Katalysator. Aber auch andere Katalysatoren, wie Cu, NiO, CuZnCr, Pd-Al₂O₃, Pd-CaCO₃ oder Ni-diatomit, können zur Bernsteinsäuresynthese eingesetzt werden. Auch von 1,4-Butandiol ausgehend ist eine Synthese von Bernsteinsäure möglich. Außerdem kann Bernsteinsäure als Nebenprodukt bei Oxidationsprozessen, wie z.B. bei der Adipinsäureproduktion, gewonnen werden (Cornils und Lappe 2005).

Nachteile der petrochemischen Produktionsprozesse von Bernsteinsäure sind der Einsatz von Schwermetallkatalysatoren in organischen Lösungsmitteln und die energieintensiven Reaktionsbedingungen (hohe Temperaturen, hohe Drücke). Des Weiteren werden die Ausgangsstoffe der Synthese (Maleinsäure und Maleinsäuranhydrid) aus Erdöl, einem nicht nachwachsenden und zur Neige gehenden Rohstoff, gewonnen. Der Preis für Maleinsäureanhydrid stieg bereits im Zeitraum von 2003 bis 2005 von 0,93 US-\$ kg⁻¹ auf 1,21 US-\$ kg⁻¹ (Tilton 2003; Anonymous 2005).

3.3.3 Biotechnologische Produktion von Bernsteinsäure

Neben der petrochemischen Produktion ist es auch möglich Bernsteinsäure (Succinat) biotechnologisch mit verschiedenen Mikroorganismen zu produzieren. Succinat wird dabei entweder als Intermediat im Zitratzyklus bei aerobem Stoffwechsel oder als Endprodukt bei anaerobem Stoffwechsel gebildet. Die maximale theoretische Ausbeute im Hinblick auf die Elektronenbilanz sind 1,71 mol Succinat pro eingesetztem mol Glucose. In Gegenwart von Kohlendioxid und zusätzlichen Reduktionsmitteln, wie Wasserstoff, sind bis zu 2,0 mol Succinat pro mol Glucose möglich (McKinlay *et al.* 2007).

Derzeit werden zwei unterschiedliche Ansätze in der Molekularbiologie zur biotechnologischen Bernsteinsäureproduktion verfolgt. Auf der einen Seite werden natürliche Bernsteinsäureproduzenten untersucht. Auf der anderen Seite versucht man rekombinante Bernsteinsäureproduzenten auf Grundlage von bereits bekannten, gut charakterisierten Mikroorganismen molekularbiologisch („Metabolic Engineering“) zu erzeugen (McKinlay *et al.* 2007).

Natürliche Bernsteinsäureproduzenten, die bisher identifiziert und isoliert werden konnten, stammen nahezu ausschließlich aus den Rumen von Wiederkäuern. Einige Beispiele sind *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniciproducens* und *Basfia succiniciproducens* (Guettler *et al.* 1999,

Lee *et al.* 2002, Scholten und Dägele 2008). Ebenfalls aus dem Verdauungstrakt von Tieren konnte *Anaerobiospirillum succiniciproducens* isoliert werden (Davis *et al.* 1976; Nghiem *et al.* 1997). Auch viele andere Mikroorganismen wie Pilze (*Aspergillus stc.*, *Byssochlamys nivea*, *Lentinus degener*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium viniferum*) und Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) werden für die Bernsteinsäureproduktion in Betracht gezogen (Rossi *et al.* 1964; Ling *et al.* 1978). Die wichtigsten natürlichen Bernsteinsäureproduzenten sind in Tabelle 3-2 mit der eingesetzten Prozessführung und den dabei erzielten Konzentrationen und Ausbeuten zusammengefasst.

Tabelle 3-2: Bernsteinsäureproduktion aus Glucose mit natürliche Bernsteinsäureproduzenten

Mikroorganismus	Endkonzentration Succinat, g L ⁻¹	Ausbeute, mol mol ⁻¹	Kultivierungsbedingungen	Quelle
<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i> ATCC 53488 (Wildtyp)	50,3	1,37	anaerobes Satzverfahren (Komplexmedium)	Glassner und Datta 1992
<i>Actinobacillus succinogenes</i> FZ53 (natürliche Mutante)	106	1,27	anaerobes Satzverfahren (Komplexmedium)	Guettler <i>et al.</i> 1996
<i>Basfia succiniciproducens</i> DD1 (Wildtyp)	6	0,92	anaerobes Satzverfahren (Komplexmedium)	Scholten und Dägele 2008
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ΔldhA-pCRA717 (rekombinant)	146	1,4*	aerobe Anzucht im Satzverfahren (Komplexmedium) anaerobe Produktion im Zulaufverfahren (definiertes Medium)	Okino <i>et al.</i> 2008
<i>Escherichia coli</i> AFP111/pTrc99A- <i>pyc</i> ;Δ <i>pflAB</i> ::CmR <i>ldhA</i> ::KmR <i>ptsG</i> - <i>pyc</i> + (rekombinat)	99	1,78*	aerobe Anzucht im Zulaufverfahren (Komplexmedium) anaerobe Produktion im Zulaufverfahren (Komplexmedium)	Vemuri <i>et al.</i> 2002
<i>Mannheimia succiniciproducens</i> LPK7; <i>ldhA</i> ::KmR <i>f1B</i> ::CmR <i>ptaackA</i> ::SpR (rekombinant)	52	1,16	anaerobes Zulaufverfahren (Komplexmedium)	Lee <i>et al.</i> 2006

* in der Produktionsphase

Für den zweiten Zweig, dem „Metabolic Engineering“ von bereits etablierten und industriell genutzten Mikroorganismen zur Bernsteinsäureproduktion werden bisher vor allem *Corynebacterium glutamicum* und *Escherichia coli* eingesetzt. In geringerem Umfang wird auch *Saccharomyces cerevisiae* als rekombinanter Produktionsorganismus untersucht (Magarifuchi *et al.* 1995; Arikawa *et al.* 1999). Bei allen rekombinant erstellten Mikroorganismen wurde dabei der Stoffwechsel in Richtung Succinatproduktion durch gezielte Deletionen und Überexpressionen umgelenkt. Die höchsten Bernsteinsäurekonzentrationen lassen sich bislang mit rekombinanten Stämmen von *Corynebacterium glutamicum* und *Escherichia coli* mit einem zweistufigen Prozess (Wachstumsphase, Produktbildungsphase) erzielen (Okino *et al.* 2008; Vermuri *et al.* 2002), was ebenfalls Tabelle 3-2 zu entnehmen ist. In allen Fermentationen werden derzeit jedoch noch Nebenprodukte wie Ethanol, Formiat, Acetat oder Lactat gebildet (Beauprez *et al.* 2010).

Vorteile der biotechnologischen Produktion sind der Einsatz nachwachsender Rohstoffe (z.B. Glucose) und die umweltschonenden physiologischen Reaktionsbedingungen (Umgebungsdruck, 30 - 37°C), durch die die Energiekosten um 30 - 40 % gegenüber dem petrochemischen Prozess gesenkt werden können (Kidwell 2008).

Der Marktpreis für Bernsteinsäure liegt je nach Reinheitsgrad derzeit bei 5,9 - 8,8 US-\$ pro Kilogramm. Die Herstellungskosten des petrochemischen Prozesses machen davon in etwa 1 US-\$ aus. Die geschätzten Produktionskosten für biotechnologisch produzierte Bernsteinsäure liegen bei 0,55 - 1,10 US-\$ pro Kilogramm, abhängig vom Prozess. Insgesamt sind die in Abbildung 3-8 gezeigten Chemikalien aus Bio-Bernsteinsäure somit heute schon für einen annähernd gleich hohen Preis wie durch die petrochemische Produktion herstellbar (Paster *et al.* 2003). Im Fall eines biotechnologische Produktionsprozesses mit Glucose als Kohlenstoffquelle sind die Rohstoffkosten mit 0,43 US-\$ pro erzeugtem Kilogramm Bernsteinsäure jedoch relativ hoch. Um auch bei niedrigeren Erdöl- und steigenden Rohstoffpreisen konkurrenzfähig zur petrochemischen Herstellung von Bernsteinsäure zu sein, muss ein biotechnologischer Prozess möglichst kostengünstig sein. Idealerweise sollen deshalb statt Glucose kostengünstigere Stärke- oder Cellulosehaltige Pflanzenmaterialien eingesetzt werden. Des Weiteren muss die Produktivität mindestens 2,5 - 5,0 g L⁻¹ h⁻¹ betragen, möglichst keine Nebenprodukte (vor allem keine anderen organischen Säuren) gebildet und eine Produktkonzentration von über 100 g L⁻¹ erreicht werden, um einen rentablen Produktionsprozess gewährleisten zu können (Patel 2006; Werpy und Petersen 2004; McKinay *et al.* 2007).

3.4 Aufbereitungsverfahren für biotechnologisch produzierte Bernsteinsäure

Jeder verfahrenstechnische Prozess lässt sich in einzelne Verfahrensschritte, sogenannte Grundoperationen („Unit operations“), zerlegen. In Abbildung 3-11 sind die wichtigsten Grundoperationen der Aufarbeitung („Downstream Processing“) eines biotechnologischen Produktionsprozesses schematisch dargestellt.

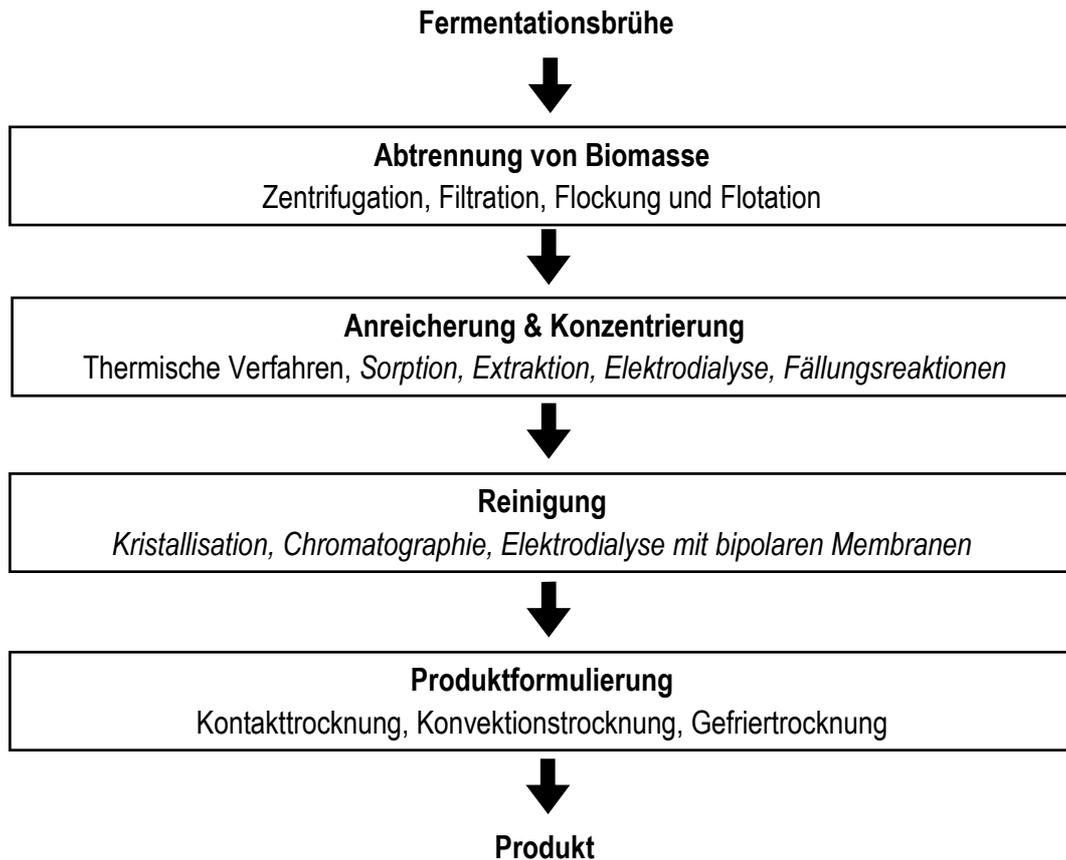


Abbildung 3-11: Grundoperationen bei der Aufarbeitung von Bioprodukten (nach Präve *et al.* 1994). In Kursiv: Vorgeschlagene Grundoperationen für die Aufarbeitung von Bernsteinsäure aus einer wässrigen Phase

In einem ersten Schritt muss die Biomasse vom wässrigen Fermentationsüberstand abgetrennt werden. Hierfür eignen sich Zentrifugation oder Filtrationsverfahren.

Gerade bei biologischen Produkten ist die Konzentration in der wässrigen Fermentationslösung häufig gering, weshalb in einem weiteren Schritt eine Anreicherung und Konzentrierung notwendig ist. Nach der Abtrennung der Biomasse, werden hierfür verschiedene thermische Verfahren, Extraktion, Adsorption, Membranverfahren und Fällungsreaktionen eingesetzt. In diesem Schritt findet neben der Aufkonzentrierung bereits eine erste Aufreinigung statt.

Für die Feinreinigung werden anschließend weitere Verfahrensschritte wie Kristallisation, Chromatographie und/oder Elektrodialyse notwendig. Ist das Produkt aufkonzentriert und von Nebenprodukten gereinigt folgt der letzte Schritt vor der Vermarktung – die Formulierung. Hier erhält das Produkt seine Verkaufsform, wie zum Beispiel Tabletten oder Pulver.

Da die Kosten für die Aufarbeitung von Bioprodukten 50 - 80 % der gesamten Produktionskosten ausmachen, ist es wichtig ein geeignetes Aufarbeitungsverfahren für Bernsteinsäure zu entwickeln (Baniel und Eyal 1995). Hierfür sind eine möglichst geringe Anzahl an Stufen und hohe Ausbeuten in jeder Stufe notwendig. In Abbildung 3-11 in Kursiv markiert sind die für die Aufarbeitung von Bernsteinsäure vorgeschlagenen Verfahren verschiedener Arbeitsgruppen. Diese werden im Folgenden näher beschrieben und bewertet.

Abtrennung der Biomasse

Die Abtrennung der Biomasse (Zellen und Zelltrümmer) und der Proteine in der Fermentationsbrühe erfolgt in der Regel durch Zentrifugation und/oder Filtration. Auf Grund der geringen Masse der Zellen sind in der Regel hohe Zentrifugalkräfte notwendig, was heutzutage durch leistungsfähige Separatoren problemlos bewerkstelligt werden kann. Der Fermentationsüberstand ist jedoch nach der Zentrifugation nie komplett zellfrei - es sind noch 10^3 - 10^5 Zellen pro Milliliter vorhanden (Hatti-Kaul und Mattiasson 2006). Um auch Proteine und Zelltrümmer abzutrennen, wird daher häufig eine Mikro- oder Ultrafiltration eingesetzt. Mit einer Mikrofiltration (Porengröße 0,02 - 10 μm) lassen sich Partikel und Mikroorganismen abtrennen – eine Ultrafiltration hält auf Grund der noch kleineren Porengröße (0,001 - 0,02 μm) auch Makromoleküle und Enzyme zurück. Ionen und andere niedermolekulare Substanzen passieren die Membran, wodurch der pH und die Ionenstärke im Überstand konstant bleiben (Weatherley 1994). Um eine Deckschichtbildung auf der Membran zu verhindern, wird häufig ein Teil des Retentats rezykliert, was als Querstrom- oder Cross-Flow-Filtration bezeichnet wird (Lohrengel 2007).

Abhängig von der nachfolgenden weiteren Aufarbeitung kann eine Filtration unerlässlich sein. Für Extraktionen müssen Zellen und andere Partikel (Zelltrümmer, Proteine) entfernt werden, um eine Emulsionsbildung zu verhindern (Hatti-Kaul und Mattiasson 2006). Auch für Elektrodialyseverfahren ist eine Abtrennung von Partikeln und Kolloiden notwendig um eine Ablagerung von Zellen und „Fouling“ der Membranen zu verhindern (Huang *et al.* 2007).

Fällung

Fällungen sind hauptsächlich aus der industriellen Aufreinigung von Proteinen und Polysacchariden bekannt. Es lassen sich jedoch damit auch organische Säuren aufkonzentrieren. Milchsäure und

Essigsäure werden zum Beispiel industriell durch Calciumhydroxidfällung gewonnen (Vickroy 1985; Kirk-Othmer 1979). Auch für Bernsteinsäure wurde dieser Ansatz im Labormaßstab untersucht (Datta 1992; Datta *et al.* 1992, Berglund *et al.* 1991). Ein klassischer Prozess bestehend aus Calciumhydroxidfällung, Ionenaustauschchromatographie und Kristallisation ist in Abbildung 3-12 schematisch dargestellt. Hierbei wird Calciumhydroxid oder Calciumoxid zur wässrigen Fermentationslösung gegeben. Es entsteht das Calciumsalz der Säure, das als Präzipitat ausfällt und durch Filtration abgetrennt werden kann. In einem nächsten Schritt wird das Calciumsuccinatsalz mit Schwefelsäure versetzt. Dabei entsteht freie Bernsteinsäure und äquimolar Calciumsulfat (Gips). Die freie Säure kann in weiteren klassischen Reinigungsschritten, wie Behandlung mit Aktivkohle oder Ionenaustauschchromatographie, aufgereinigt werden.

Datta *et al.* konnten dieses Prozessschema auf eine Bernsteinsäure-Fermentation mit *Anaerobiospirillum succiniciproducens* übertragen. Mit der Calciumhydroxidfällung konnten hier 85 % der Bernsteinsäure gewonnen werden (Datta 1992; Datta *et al.* 1992). Problematisch ist jedoch die weitere Aufarbeitung. Eine Kristallisation der Säure nach der Fällung ist schwierig und die erzielbaren Ausbeuten sind nur gering (Kertes und King 1985). Hinzu kommt, dass das äquimolar produzierte Nebenprodukt Gips nicht anderweitig genutzt werden kann und somit hohe Entsorgungskosten entstehen. Ebenfalls ungünstig ist die große Menge der benötigten Chemikalien, die nur einmal verwendet werden können. Insgesamt sind die Prozesskosten bei der Calciumhydroxidfällung deshalb hoch. Aus den eben genannten Gründen ist deshalb eine Fällung mit Calciumhydroxid im industriellen Maßstab nicht die Methode der Wahl für die Aufarbeitung von Bio-Bernsteinsäure (Hermann und Patel 2007).

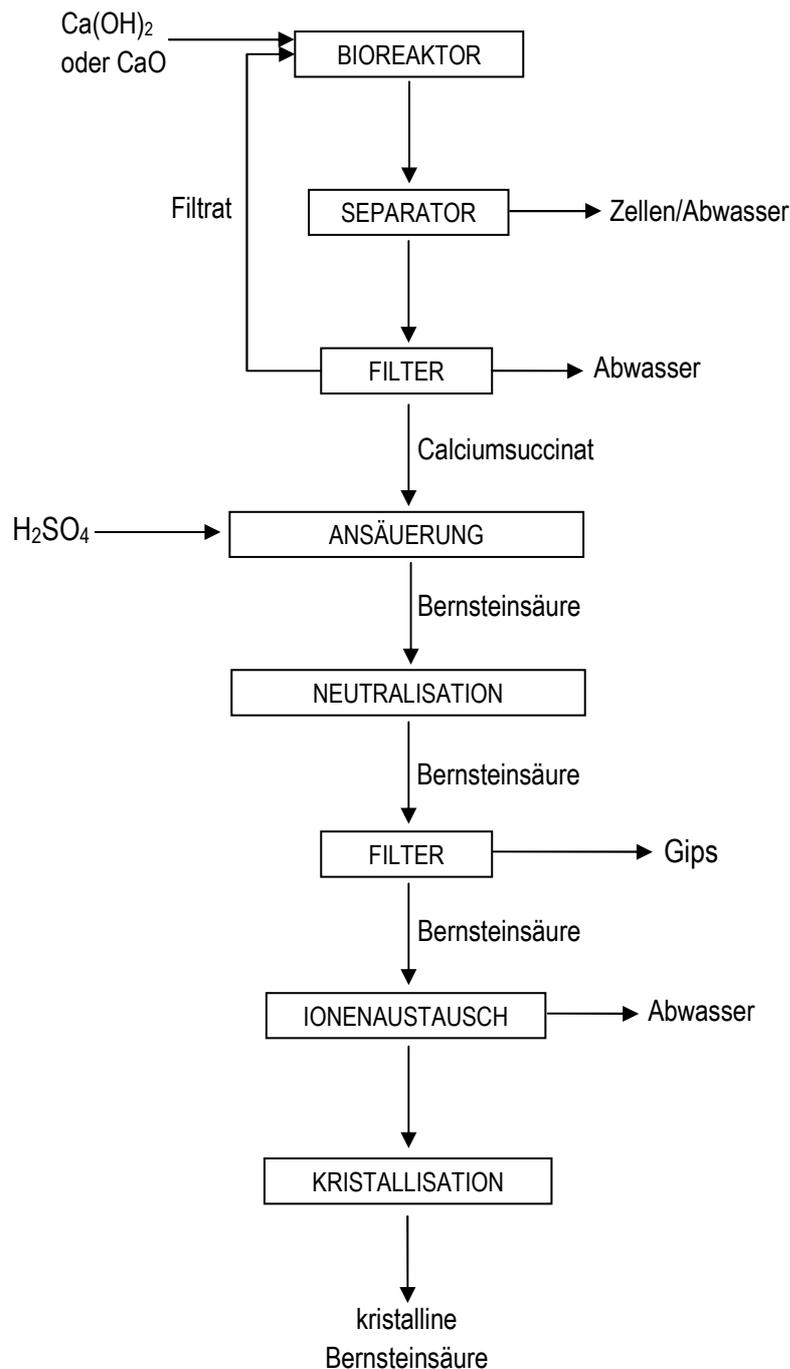


Abbildung 3-12: Prozess mit Calciumhydroxidfällung von Bernsteinsäure nach Kertes und King 1985

Auch Fällungsreaktionen mit Ammoniumverbindungen wurden für Bernsteinsäure im Labormaßstab untersucht (Berglund *et al.* 1999; Yedur *et al.* 2001). Hierfür wird Diammoniumsuccinat durch pH-Kontrolle während oder durch Ersatz der Kationen nach der Fermentation erzeugt. Anschließend wird durch Zugabe von Sulfat oder einer Kombination aus Ammoniumbisulfat und Schwefelsäure präzipitierendes Succinat und Ammoniumsulfat generiert. Die präzipitierte Bernsteinsäure wird durch Filtration abgetrennt, mit Methanol gewaschen und kristallisiert. Das Nebenprodukt Ammoniumsulfat

kann thermisch in Ammoniak und Ammoniumbisulfat gespalten werden. Ammoniumbisulfat steht so für neue Fällungen zur Verfügung. Mit diesem Ansatz kann Bernsteinsäure im ersten Aufarbeitungsschritt mit einer Ausbeute von 93,3 % gewonnen werden (Yedur *et al.* 2001).

Die Fällung mit Ammoniumverbindungen liefert dementsprechend höhere Ausbeuten als die Fällung mit Calciumhydroxid oder Calciumoxid. Nachteil beider Fällungsmethoden ist jedoch, dass auf Grund der hohen Salzfracht keine Prozessintegration möglich ist.

Elektrodialyse

Die Elektrodialyse ist eine gut untersuchte und viel eingesetzte Methode in der Lebensmittelindustrie. Sie wird unter anderem industriell für die Separation von Zitronensäure aus Citrussäften eingesetzt (Zang *et al.* 1966). Auch für Bernsteinsäure und andere organische Säuren wurde die Elektrodialyse in den letzten Jahrzehnten im Labormaßstab untersucht und charakterisiert (Thang *et al.* 2005; Shen *et al.* 2005; Shen *et al.* 2006; Luo *et al.* 2002). Häufig werden hierbei zwei Dialyseschritte hintereinander angewendet (Glassner *et al.* 1992). Dabei handelt es sich um eine klassische Elektrodialyse zur Trennung und Aufkonzentrierung geladener und ungeladener Moleküle und einer Elektrodialyse mit bipolaren Membranen zur Umwandlung des Succinatsalzes in die freie Säure. In Abbildung 3-13 ist ein von Glassner *et al.* 1992 entworfene Prozess zur Aufarbeitung von Bernsteinsäure schematisch dargestellt.

Im ersten Schritt, der klassischen Elektrodialyse, sind Anionen- und Kationenaustauschermembranen zwischen zwei Elektroden (Kathode und Anode) abwechselnd angebracht. Wird Strom angelegt wandern die Kationen zur nächsten Kationenaustauschermembran und Anionen zur nächsten Anionenaustauschermembran. Membranen mit identischer Ladung können hierbei durchwandert werden. In den Kammern zwischen den Membranen sammeln sich abwechselnd ungeladene Moleküle und aufkonzentrierte geladene Moleküle, die aus der Apparatur hinausgespült werden können. Somit ist eine Demineralisierung und Konzentration des Zielprodukts möglich. Mit einer klassischen Elektrodialyse lassen sich 77 % der produzierten Bernsteinsäure aus dem Fermentationsüberstand entfernen (Glassner *et al.* 1992). Die Säure liegt hier jedoch nicht in ihrer freien Form sondern als Salz vor. Bevor die weitere Aufarbeitung durch eine Elektrodialyse mit bipolaren Membranen durchgeführt werden kann müssen divalenten Kationen (Calcium, Magnesium) durch einwertige Natriumionen ersetzt werden. Dies geschieht durch eine Ionenaustauschchromatographie.

Die konzentrierte Natriumsuccinatlösung wird anschließend durch eine zweite Elektrodialyseanlage geleitet. Die bipolaren Membranen sind dabei in der Lage Wasser in Protonen und Hydroxylionen zu spalten.

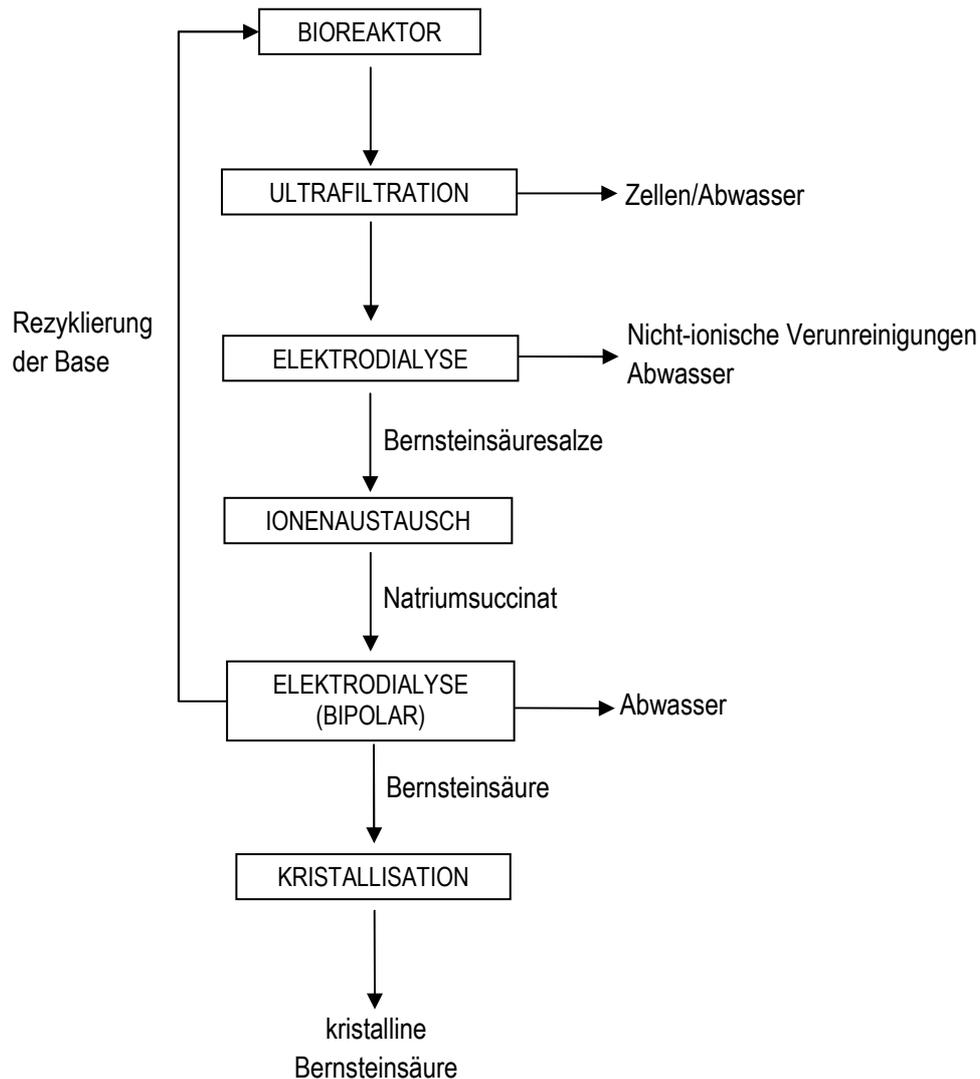


Abbildung 3-13: Aufarbeitungsprozess mit Elektrodialyse von Bernsteinsäure nach Glassner *et al.* 1992

Wird Strom angelegt wandern die Bernsteinsäureanionen zur Anode und die Natriumkationen zur Kathode. Dort reagieren sie mit den Protonen und Hydroxylionen zu freier Bernsteinsäure und Natriumhydroxid. Eine Feinreinigung (> 99 %) ist auch hier durch klassische Methoden wie Anionen- oder Kationenaustauschchromatographie und anschließender Kristallisation zu erzielen (Glassner *et al.* 1992; Zeikus *et al.* 1999; Berglund *et al.* 1991). Die Ausbeute nach der zweiten Elektrodialyse mit bipolaren Membranen liegt laut Glassner *et al.* 1992 jedoch bei nur noch 60 %.

Nachteile neben der geringen Ausbeute sind die hohen Membrankosten und der hohe Energieverbrauch von Elektrodialyseverfahren (Huang *et al.* 2007). Ebenfalls problematisch ist die geringe Selektivität – andere organische Säuren (möglich Nebenprodukte bei der Fermentation) werden ebenfalls mit abgetrennt (McKinlay *et al.* 2007). Ein weiterer Schwachpunkt der Elektrodialyse ist das Vorhandensein von mehrfach geladenen Kationen, die nicht mit abgetrennt werden können (Zeikus *et*

al. 1999). Häufig wird deshalb eine Vorbehandlung mit Chelatharzen durchgeführt um diese Ionen vor der Dialyse zu entfernen (Fargues *et al.* 2006; Bailly *et al.* 2001). Auch eine *in situ* Aufbereitung mittels Elektrodialyse ist bisher nur für Pyruvat und Lactat untersucht worden (Zelic *et al.* 2004; Min-tian *et al.* 2004).

Auf Grund der vielen Nachteile, der hohen Kosten und der geringen Ausbeute ist die Elektrodialyse nicht die geeignete Methode zur Aufarbeitung von Bernsteinsäure zu sein.

Extraktion

Bei der Extraktion wird die Zielkomponente aus einem Flüssigkeits- bzw. Feststoffgemisch mit Hilfe eines Lösungsmittels abgetrennt. Voraussetzung ist stets, dass das flüssige Lösungsmittel nicht oder nur teilweise mit dem Trägerstoff mischbar ist. Es muss eine ausgeprägte Mischungslücke zwischen den beiden Phasen vorliegen. Erstere Variante bezeichnet man als Flüssig-Flüssig-Extraktion oder Solventextraktion. Flüssig-Flüssig-Extraktionen sind eine gut untersuchte und weit verbreitete Methode in der chemischen Industrie. Auch in der Biotechnologie werden sie als Standardverfahren, z.B. zur Abtrennung von Antibiotika (Penicillin, Erythromycin) aus Fermentationsbrühen, eingesetzt (Präve *et al.* 1994). Bei der klassischen Flüssig-Flüssig-Extraktion wird lediglich die natürliche Verteilung einer Substanz zwischen zwei unterschiedlichen Phasen ausgenutzt. Wichtig ist es hier das optimale Extraktionsmittel (Lösungsmittel) zu identifizieren, mit dem die höchsten Ausbeuten möglich sind. Diese Art der Extraktion wurde für Bernsteinsäure intensiv untersucht (King und Dtarr 1990; King und Sanchez 1985; King und Poole 1993). Insgesamt ließen sich jedoch mit den gängigen industriell eingesetzten Lösungsmitteln nur sehr unzureichende Verteilungskoeffizienten erzielen (Juang und Huang 1996).

Um höhere Ausbeuten zu erreichen, wurden andere erweiterte Extraktionsverfahren, wie Hochdruckextraktion, Flüssigmembran-Permeation und Reaktivextraktion, für Carbonsäuren untersucht. Bei der Hochdruckextraktion wird mit überkritischen Fluiden als zusätzlichem Extraktionsmittel gearbeitet. Vorteil ist hier, dass keine Kontamination des Wertstoffes mit Kohlendioxid erfolgt. Insgesamt ist dieses Verfahren jedoch sehr kostenintensiv (Hauer und Marr 1991). Die Flüssigmembran-Permeation, eine Sonderform der Reaktivextraktion, wird in der Metallsalz-Abtrennung eingesetzt. In einigen Ansätzen wurde versucht, dieses Verfahren auch auf die Extraktion von Bioprodukten umzusetzen. Erhebliche Schwierigkeiten macht hier noch der Umgang mit Fermentationslösungen und den daraus resultierenden Einflüssen auf den Prozess (Siebenhofer 1985). Als drittes Verfahren wird die Reaktivextraktion, eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit zusätzlicher Reaktivkomponente („Carrier“), intensiv für die Extraktion von Carbonsäuren untersucht. Die Reaktivkomponente befindet sich hierbei in einer Lösungsmittelphase und geht eine reversible Bindung mit dem zu extrahierenden Stoff ein (Rydberg *et al.* 1992). Als Reaktivkomponenten werden vor allem

hochmolekulare aliphatische Amine, Phosphor-Sauerstoff-Verbindungen und Schwefel-Sauerstoff-Verbindungen eingesetzt (Weatherley 1994, Kertes und King 1985). Für die Reaktivextraktion von organischen Säuren, wie Bernsteinsäure, eignen sich besonders gut langkettige aliphatische Amine in organischen nicht-wasserlöslichen Lösungsmitteln (Tung und King 1994a, Hong und Hong 2000a-c, Hong *et al.* 2002, Hong und Hong 2004, Song *et al.* 2007).

Nach der Reaktivextraktion sind weitere Aufarbeitungsschritte, wie eine Rückextraktion der Säure in eine neue wässrige Phase, Chromatographieverfahren und Kristallisation, nötig (Tung und King 1994b; Poole und King 1991; Hong *et al.* 2001). Ein von Tung und King vorgeschlagener Aufarbeitungsprozess ist schematisch in Abbildung 3-14 dargestellt.

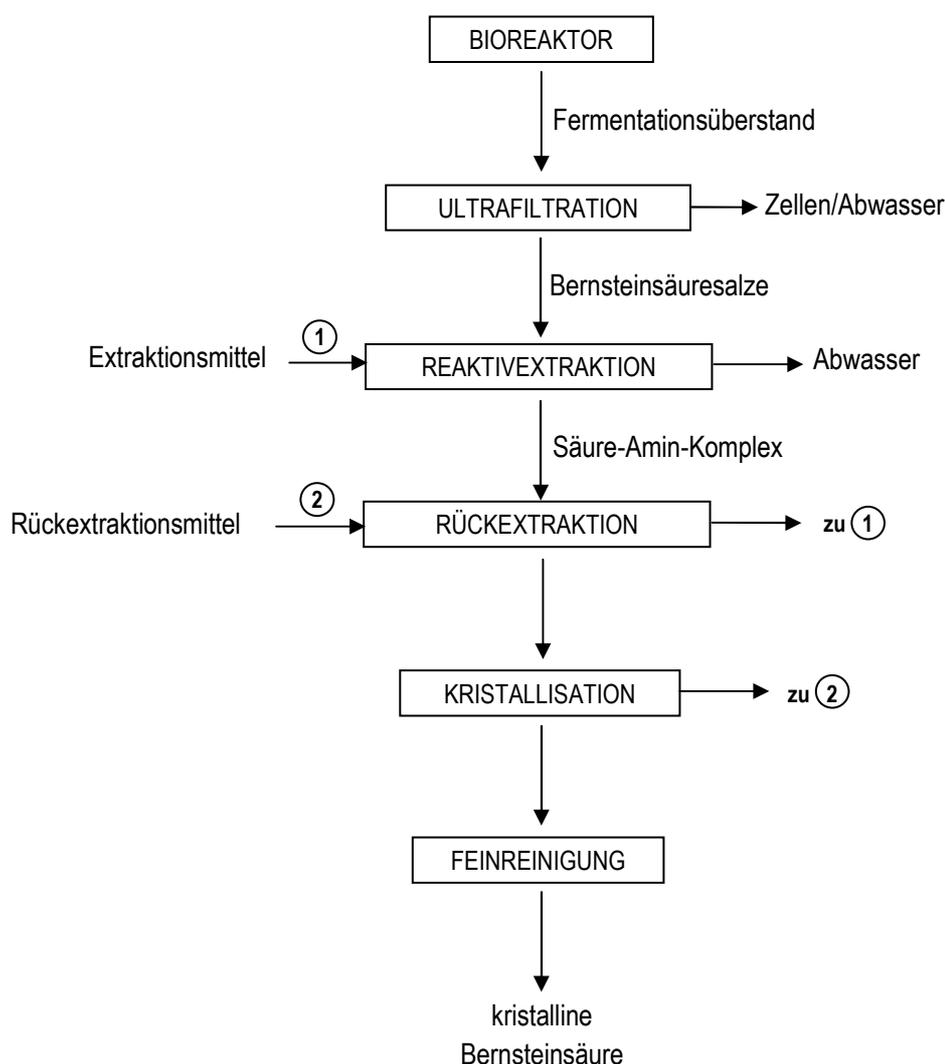


Abbildung 3-14: Aufarbeitungsprozess mit Reaktivextraktion von Bernsteinsäure nach Tung und King 1994b

Bis auf ganz wenige Ausnahmen wurden bisher alle Untersuchungen zur Reaktivextraktion von Bernsteinsäure mit synthetischen („sauberen“) wässrigen Lösungen durchgeführt. Eine Integration in den Fermentationsprozess scheint jedoch, wie bereits von einigen wenigen Arbeitsgruppen gezeigt

werden konnte, prinzipiell möglich (Huh *et al.* 2006; Song *et al.* 2007, Jun *et al.* 2007a). Es ist jedoch durch die Toxizität der eingesetzten organischen Lösungsmittel und Amine mit einer Limitierung des Zellwachstums und der Produktbildung zu rechnen (Hatti-Kaul und Mattiasson 2006). Insgesamt scheint eine Aufarbeitung von Bernsteinsäure mittels Reaktivextraktion jedoch ein kostengünstiger und umweltschonender erster Schritt zu sein (Cascaval und Balaction 2004).

Sorption und Ionenaustauschchromatographie

Chromatographieverfahren werden in nahezu allen chemischen und biotechnologischen Prozessen zur Feinreinigung von Produkten eingesetzt. Für biologische Produkte haben sie sich als die wirksamste Form der Aufarbeitung erwiesen (Präve *et al.* 1994). Vorteile von Chromatographieverfahren sind die in der Regel milden Reaktionsbedingungen (Raumtemperatur, kaum Scherkräfte, pH konstant). Bei der Ionenaustauschchromatographie erfolgt die Stofftrennung durch reversible Bindungen an eine geladene Matrix. Man unterscheidet Anionenaustauscher (basische Gruppen) und Kationenaustauscher (säure Gruppen). Kushiku schlägt ein stark geladenes Anionenaustauscherharz für die Umwandlung von bereits isolierten Succinatsalzen zu freier Bernsteinsäure vor. Als letzter Schritt nach der Chromatographie erfolgt eine Kristallisation (Kushiku *et al.* 2006).

Neuere Ansätze propagieren jedoch auch die Chromatographie als einen ersten Aufarbeitungsschritt. Die Arbeitsgruppe von Li schlägt ein alkalisches Anionenaustauscherharz (NERCB 04) für die Isolierung von Bernsteinsäure aus der Fermentationslösung vor. Bernsteinsäure kann über seine Hydroxylgruppen mit dem Harz wechselwirken, während das Harz gleichzeitig auf Grund der Bindung der Säure als pH-Regelung fungiert. Dadurch muss weniger Base (NaOH) zur pH-Regelung von Extern in den Bioreaktor gegeben werden. Die abgereicherte und neutralisierte Fermentationslösung kann anschließend über einen Kreislauf wieder in den Bioreaktor rückgeführt werden. Die Elution der Säure und die Regeneration des Anionenaustauschers erfolgen nach mehrfacher Beladung mit 0,5 molarer Natronlauge (Li *et al.* 2008).

Grundsätzlich sind Ionenaustauschverfahren jedoch nicht als Hauptaufarbeitungsschritt zur Gewinnung von Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand geeignet, da die Selektivitäten und Ausbeuten zu gering sind (Pai *et al.* 2002).

Auch Sorptionsverfahren werden für Bernsteinsäure untersucht. Ein neuer Ansatz von Jun *et al.* (2007b) ist der Einsatz von mesoporösen Silica (SBA-15) zur Isolierung von Bernsteinsäure und Pyruvat. Diese Silica sind mit funktionellen Gruppen, hier funktionalisierte Silane mit primären, sekundären und tertiären Aminen, versehen. Die funktionalisierten Silane sind wiederum kovalent an die poröse Matrix gebunden. Bernsteinsäure bindet, ähnlich wie bei der Reaktivextraktion, über Wasserstoffbrücken an

die Aminreste der mesoporösen Silica. Die Ausbeute für Bernsteinsäure ist jedoch mit nur rund 30 % deutlich geringer als für das ebenfalls untersuchte Pyruvat (Jun *et al.* 2007b).

Verdampfung und Kristallisation

Die Kristallisation wird vor allem in der bio-pharmazeutischen Industrie zur Reinigung von Antibiotika eingesetzt. Als großtechnisches Verfahren findet sie auch bei der Zitronensäureherstellung Anwendung (Schmitz 1977). Für Bernsteinsäure wird die Kristallisation für viele der oben beschriebenen Aufarbeitungsprozesse als Endreinigungs- oder Feinreinigungsschritt betrachtet (Tung und King 1994b; Glassner *et al.* 1992; Kertes und King 1985).

Ein aktueller Ansatz zeigt jedoch, dass die Kristallisation ebenfalls als erster Schritt der Aufarbeitung für Bernsteinsäure möglich ist. Nach der Abtrennung der Zellen (hier: *Actinobacillus succinogenes* BE-1) und einer Aktivkohlebehandlung wird der Überstand mit Salzsäure versetzt. Durch Regelung des pH auf 2,0 liegen somit 99,4 % der Säure in ihrer freien Form vor. Eine genaue Kontrolle des pH unter 2,0 und eine Absenkung der Temperatur auf 4°C (Löslichkeit von Bernsteinsäure 30 g L⁻¹) ermöglichen eine selektive Kristallisation der freien Bernsteinsäure, während andere organische Säuren und Succinatsalze (Nebenprodukte) komplett löslich bleiben. Mit diesem Verfahren können bis zu 70 % der Bernsteinsäure mit einer Reinheit von 90 % kristallisiert werden. Eine Kombination mit weiteren klassischen Aufarbeitungs- und Reinigungsschritten ist möglich (Li *et al.* 2010).

3.5 Reaktivextraktion von organischen Säuren aus einer wässrigen Phase

Wie bereits in Punkt 3.4 erwähnt, zeigen Extraktionen von niedermolekularen Carbon- oder Hydroxycarbonsäuren mit konventionellen Lösungsmitteln nur sehr ungünstige Verteilungskoeffizienten (Kertes und King 1986; King 1983; Schügerl 1989). Durch den Einsatz von zusätzlichen Reaktivkomponenten (Aminen) lassen sich die Verteilungskoeffizienten und Ausbeuten jedoch deutlich erhöhen (Schlichting *et al.* 1987). Vor allem Amine als Reaktivkomponenten besitzen auf Grund ihrer Basizität die Fähigkeit eine reversible Bindung mit den Zielmolekülen einzugehen. Dadurch können auch polare Stoffe mit hydrophilen Eigenschaften, wie organische Säuren, effektiv abgetrennt werden.

3.5.1 Grundlagen der Reaktivextraktion

Bei einer klassischen Extraktion wird das Zielmolekül (Extraktstoff) mittels eines Lösungsmittels (Extraktionsmittel) aus einem Stoffgemisch abgetrennt. Das Zielmolekül verteilt sich dabei zwischen den beiden nicht miteinander mischbaren Phasen. Nach der Extraktion liegt im Optimalfall der Großteil des Extraktstoffes in der Extraktphase vor. Zurück bleibt die abgereicherte, meist wässrige Raffinatphase (Vauck und Müller 1994). Die Verteilung des Extraktstoffes zwischen den beiden Phasen, lässt sich mit dem Nernst'schen Verteilungsgesetz beschreiben:

$$K = \frac{c_{org}}{c_w} \quad (3-16)$$

K	= Verteilungskoeffizient
c_{org}	= Konzentration des Zielmoleküls in der organischen Phase, g L ⁻¹
c_w	= Konzentration des Zielmoleküls in der wässrigen Phase, g L ⁻¹

Das Verteilungsgleichgewicht wird dabei durch die Temperatur, den pH und die Ionenstärke der wässrigen Lösung beeinflusst.

Eine Veränderung des Verteilungsverhaltens kann jedoch ebenfalls durch eine zusätzlich Reaktivkomponente (im Fall von Carbonsäuren: Amine) erfolgen. Die Reaktion von Amin und Säure findet dabei, wie in Abbildung 3-15 dargestellt, an der Phasengrenzfläche statt, wobei Komplexe aus Amin und Säure entstehen. Dabei müssen neben den verschiedenen Komplexreaktionen, die Dissoziation der Bernsteinsäure in Wasser, die Protonierung desamins und die Autoprotolyse von Wasser berücksichtigt werden (Kirsch und Maurer 1997). Das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktivextraktion ist erreicht, wenn sich in beiden eingesetzten Phasen die Drücke, Temperaturen und chemischen Potentiale aller Komponenten angeglichen haben.

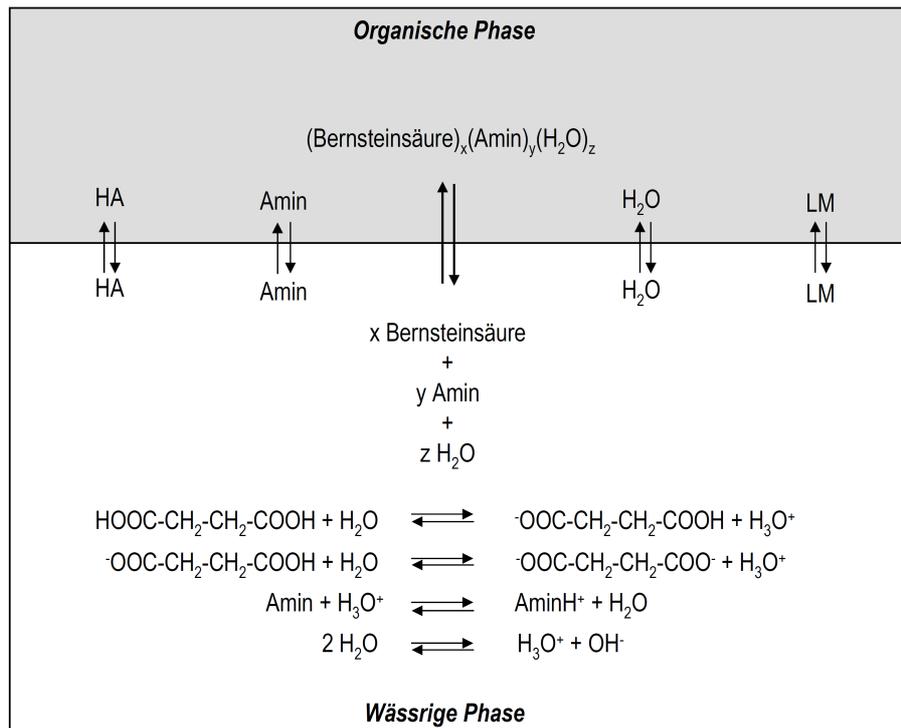


Abbildung 3-15: Schematische Darstellung der Reaktivextraktion von Bernsteinsäure mit Aminen in einer Lösungsmittelphase. LM ist das jeweilige Lösungsmittel, x, y und z ist die Anzahl der am Komplex beteiligten Säure-, Amin- und Wassermoleküle. $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ ist die undissoziierte, $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$ die einfach dissoziierte und $\text{-OOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$ die zweifach dissoziierte Bernsteinsäure.

Amine und Lösungsmittel sind bei der Reaktivextraktion nahezu wasserunlöslich. Nur sehr wenige Moleküle können deshalb in die Wasserphase übergehen. Die Protonierung desamins erfolgt an der Phasengrenzfläche. Anschließend kann Bernsteinsäure über Ionenpaarbildung an das entstandene Alkylammoniumkation (ebenfalls an der Phasengrenze) gebunden und der Komplex von den Lösungsmittelmolekülen in der organischen Phase solvatisiert werden. Wie in Abbildung 3-15 angedeutet, kann auch Wasser direkter Bestandteil solcher Amin-Säure-Komplexe sein (Kirsch und Maurer 1997). Dabei ist vor allem der pH der wässrigen Säurelösung ausschlaggebend für die Menge an koextrahiertem Wasser.

Auf Grund der ionischen Wechselwirkungen zwischen Alkylammoniumkation und Säureanion, wird der entstehende Komplex als Ammoniumsalz betrachtet. Die Stärke der ionischen Wechselwirkung sowie das eingesetzte Lösungsmittel sind dabei bestimmend für die Extrahierbarkeit der Säure und die Stabilität der Komplexe in der organischen Phase (Schügerl 1994). Eine wichtige Größe zur Beschreibung des Extraktionsverhaltens ist dabei die Extraktionsausbeute $E(\%)$. Diese berechnet sich wie in Gleichung 3-17 dargestellt:

$$E(\%) = \frac{c_{org} \cdot V_{org}}{c_{w,0} \cdot V_{w,0}} \cdot 100 \quad (3-17)$$

$E(\%)$ = Extraktionsausbeute, %

c_{org} = Konzentration der Säure in der organischen Phase (Extrakt) nach der Extraktion, g L⁻¹

V_{org} = Volumen der organischen Phase nach der Extraktion, L

$c_{w,0}$ = Konzentration der Säure in der wässrigen Phase vor der Extraktion, g L⁻¹

$V_{w,0}$ = Volumen der wässrigen Phase vor der Extraktion, L

Entscheidende Parameter bei der Reaktivextraktion sind die Zeit und der Ort des Stoffübergangs sowie die Geschwindigkeit der chemischen Reaktion. Prinzipiell kann eine Einteilung in transportlimitiert oder reaktionslimitiert gemacht werden (Schügerl *et al.* 1986). Bei Prozessen mit langsamer chemischer Reaktion ist der An- und Abtransport (diffuser Stofftransfer) der Komponenten deutlich schneller als die chemische Reaktion und spielt deshalb keine Rolle. Ist die chemische Reaktion jedoch sehr schnell, ist die Stofftransportrate ausschlaggebend für die Gesamtgeschwindigkeit des Prozesses (Hafez 1983). Dementsprechend kann eine Transportlimitierung durch hydrodynamische Veränderungen aufgehoben werden, während dies bei einer Reaktionslimitierung nicht möglich ist.

Für den Stoffübergang bei der Reaktivextraktion bestehen verschiedene Modelle: die Zweifilm-Theorie von Lewis und Whitman 1924, die Penetrationstheorie von Higbie 1935 und die Oberflächen-erneuerungstheorie von Danckwerts 1951.

Die Zweifilm-Theorie (Abbildung 3-16) ist dabei das einfachste Modell zur Beschreibung von Stofftransferprozessen an einer Phasengrenze.

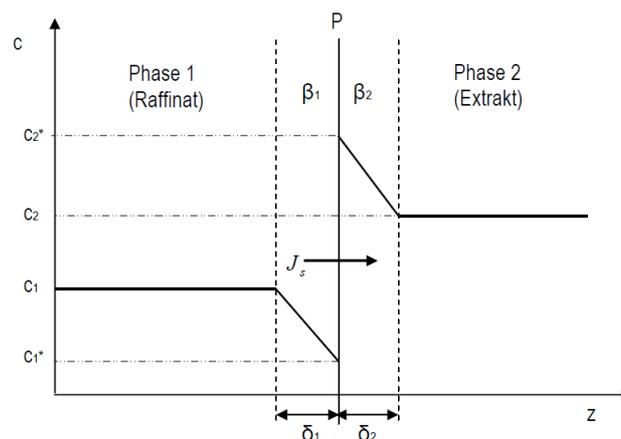


Abbildung 3-16: Stofftransports nach der Zweifilm-Theorie von Lewis und Whitman 1924. c ist die Konzentration der Komponente 1 oder 2, β der Stoffübergangskoeffizient, δ die Dicke der Grenzfilme, J_s der flächenbezogene Stofffluss, z die Ortskoordinate und c^* die Konzentration an der Phasengrenze P.

Hier wird von ruhenden, stationären, laminaren Grenzflächenfilmen der Dicke δ_1 und δ_2 an beiden Seiten der Phasengrenzfläche zwischen den beiden nicht mischbaren Phasen ausgegangen, über die Transfer durch molekulare Diffusion erfolgt. Je größer die Turbulenz in den Kernzonen der Flüssigkeiten, desto dünner sind die laminaren Grenzfilme (Javed 1992). Da an der Phasengrenze ein Löslichkeitsgleichgewicht angenommen wird, spielt es keine Rolle, ob die höhere Konzentration des Extraktstoffs in der wässrigen oder organischen Phase vorliegt.

Die Diffusionsgeschwindigkeiten durch beide Filme im stationären Zustand lassen sich durch Gleichung 3-18 berechnen:

$$-J_s = \beta_w \cdot (c_w - c_{w,\text{lim}}) = \beta_{\text{org}} \cdot (c_{\text{org},\text{lim}} - c_{\text{org}}) \quad (3-18)$$

- J_s = flächenbezogener Stofffluss, mol (m² s)⁻¹
 β = Stoffübergangskoeffizient ($\beta = D/\delta$), m s⁻¹
 D = binärer Diffusionskoeffizient, m² s⁻¹
 δ = Dicke der Grenzschicht, m
 c = Konzentration einer Komponente in der Flüssigkeit, mol m⁻³
 c_{lim} = Konzentration einer Komponente an der Phasengrenzfläche, mol m⁻³

Obwohl die Zweifilm-Theorie von vielen Vereinfachungen ausgeht und die Penetrations- und Oberflächenerneuerungstheorie den Stofftransport genauer beschreiben, wird sie auch heute noch in vielen Fällen bei der Berechnung von Extraktionsprozessen herangezogen (Christen 2010).

Die von Higbie 1934 entwickelte Penetrationstheorie und die Oberflächenerneuerungstheorie von Danckwerts 1951 beschreiben den Stofftransport als instationären Vorgang. Beide Modelle sind in Abbildung 3-17 schematisch dargestellt.

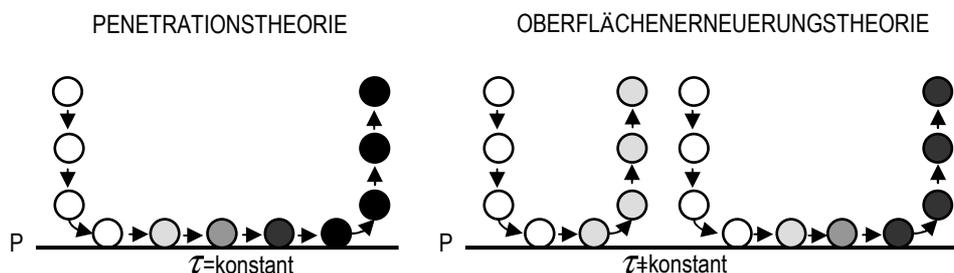


Abbildung 3-17: Stoffübergang nach der Penetrationstheorie (Higbie 1935) und der Oberflächenenerneuerungstheorie (Danckwerts 1951). Die Kreise entsprechen Fluidelementen. Je dunkler, desto mehr der Zielkomponente wurde aufgenommen. Die Verweilzeit τ der Fluidelemente ist bei der Penetrationstheorie konstant, während sich die Verweilzeiten im Fall der Oberflächenenerneuerungstheorie von Fluidelement zu Fluidelement unterscheiden.

Idee ist hier, dass turbulent durchmischte Fluidelemente aus der jeweiligen Phase an die Phasengrenze transportiert werden und dort identische Zeit im Fall der Penetrationstheorie oder unterschiedliche Zeit im Fall der Oberflächenerneuerungstheorie verweilen. Während dieser Zeit tauschen die Fluidelemente den Extraktstoff durch instationäre Diffusion aus, werden anschließend von nachrückenden Fluiden verdrängt und wandern wieder in den Kern der Phase. Der Stoffübergangskoeffizient nach der Penetrationstheorie ist dementsprechend, wie in Gleichung 3-19 zu sehen ist, zeitabhängig.

$$\beta = 2\sqrt{\frac{D}{\pi \cdot \tau}} \quad (3-19)$$

τ = Verweilzeit an der Phasengrenze, s

Der Stoffübergangskoeffizient der Oberflächenerneuerungstheorie berechnet sich nach Gleichung 3-20:

$$\beta = s \cdot D \quad (3-20)$$

s = Oberflächenerneuerungsfaktor, s⁻¹

3.5.2 Amine bei der Reaktivextraktion

Amine sind stickstoffhaltige organische Verbindungen, die man vom Ammoniak ableiten kann. Im Fall von primären Aminen ist ein Wasserstoffatom des Ammoniaks durch einen Alkyl- oder Arylrest ersetzt, bei sekundären zwei, bei tertiären drei und bei quaternären Aminen alle vier Wasserstoffe. Wie auch Ammoniak reagieren Amine basisch, indem ein Proton an das freie Elektronenpaar des Stickstoffs angelagert wird. Natürlich vorkommende Amine (biogen) besitzen eine große Bedeutung als Gewebshormone, Aminosäuren und Transmitter-Substanzen (Gossauer 2006).

Aliphatische, wasserunlösliche Amine finden jedoch auch bereits seit vielen Jahrzehnten Anwendung in der Hydrometallurgie zur Metallsalzextraktion oder bei der Aufarbeitung und Trennung von Kernbrennstoffen (Marr und Bart 1982; Büchner *et al.* 1986). Auf Grund ihrer hohen Affinität zu anionischen Verbindungen sind sie auch gut für die Extraktion von organischen Säuren aus wässrigen verdünnten Lösungen geeignet (Pazouki und Panda 1998). Prinzipiell werden folgende Anforderungen an die im Extraktionsprozess eingesetzten Amine gestellt (Bart 2001; Weatherley 1994, Huh *et al.* 2004; Huh *et al.* 2006):

- hohe Selektivität, Kapazität und Regenerierbarkeit
- geringe Löslichkeit im Raffinat
- gute Löslichkeit in der organischen Phase
- hohe thermische und chemische Stabilität

- geringer Dampfdruck
- kein zu niedriger Flammpunkt
- geringe Viskosität
- geringe Giftigkeit
- geringe Korrosivität
- geringer Preis

Zur Reaktivextraktion von Bernsteinsäure aus Wasser eignen sich besonders langkettige aliphatische sekundäre oder tertiäre Amine (Tung und King 1994a, Hong und Hong 2000a-c, Hong *et al.* 2002, Hong und Hong 2004, Song *et al.* 2007). Dabei zeigen tertiäre Amine bei gleicher Kettenlänge eine höhere Basizität als sekundäre Amine und somit eine stärkere Bindung an anionische Moleküle, wie organische Säuren. Dies lässt sich durch den höheren Alkylierungsgrad tertiärer Amine erklären. Der induktive Effekt der Alkylreste führt dabei zu einer höheren Mobilität des freien Elektronenpaares am Stickstoff und somit zu einer höheren Basizität. Die Basizität und Extraktionseffizienz reiner Amine folgt dementsprechend der Reihenfolge (Gossauer 2006):



Der basische Charakter der Amine wird jedoch auch durch das organische Lösungsmittel beeinflusst (Hong und Hong 2000a). Durch die höhere Anzahl an Ketten tertiärer Amine kann es in polaren Lösungsmitteln, wie Alkoholen, Ketonen oder Wasser, zu sterisch hervorgerufen negativen Effekten bei der Solvatisierung kommen. Die Reihenfolge der Basizität und Extraktionseffizienz ändert sich dementsprechend in (Sykes 1988; Reichhardt 1988):



Ein Maß für die Basizität von Aminen ist die Basenkonstante pK_B . Je niedriger der pK_B , desto höher ist die Basizität. Wie in Abbildung 3-18 zu sehen ist, spiegeln die pK_B dabei die Reihenfolge der Extraktionseffizienzen der Amine in polaren Lösungsmitteln wieder.

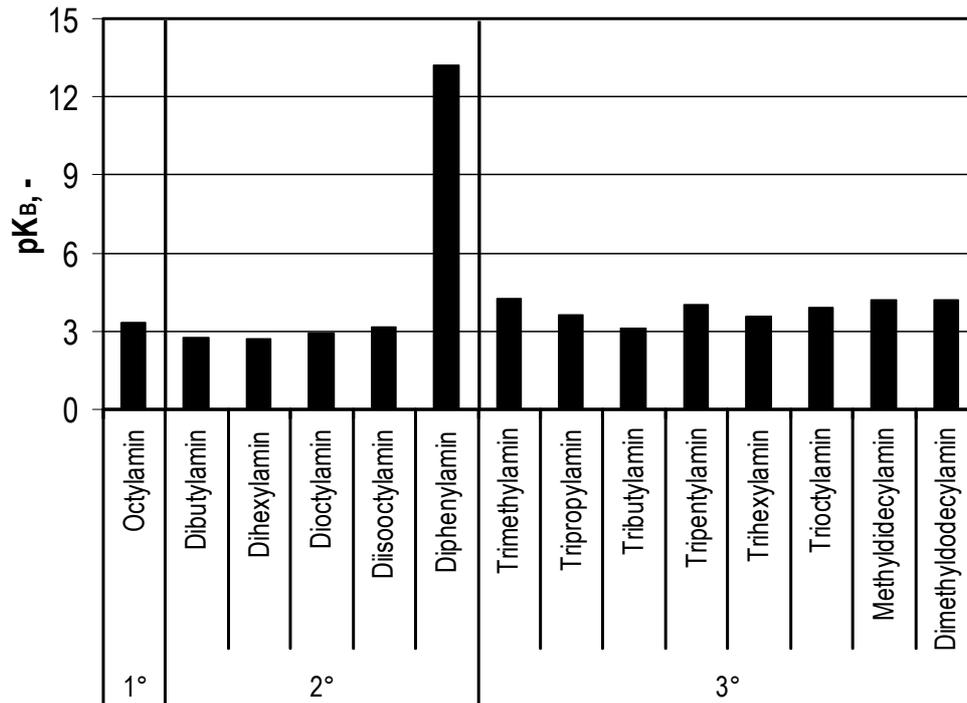


Abbildung 3-18: Basenkonstanten (pK_B) einiger wichtiger Alkyl- und Arylamine

Aromatische Amine sind insgesamt deutlich schlechter für die Reaktivextraktion geeignet als aliphatische Amine. Grund hierfür ist die deutlich geringere Basizität (vgl. Diphenylamin in Abbildung 3-18), da der Stickstoff an der Mesomerie (-M-Effekt) des Rings beteiligt ist. Das freie Ionenpaar liegt hier delocalisiert vor (Hart 1989).

Auf Grund der hohen Wasserlöslichkeit und Toxizität sind primäre Amine ungeeignet für die Extraktion organischer Säuren. Sekundäre Amine sind wegen ihrer höheren Basizität weitaus bessere Extraktionsmittel, neigen jedoch bei höheren Temperaturen genauso wie primäre Amine zur Amidbildung, was problematisch für die weitere Aufarbeitung sein kann. Primäre, sekundäre und tertiäre Amine können nur die undissoziierte Form der Säure binden, weshalb häufig bei niedrigem pH extrahiert werden muss. Quaternäre Amine zeigen demgegenüber einen allgemein schlechteren Verteilungskoeffizienten als primäre, sekundäre und tertiäre Amine (Hauer und Marr 1991) können aber im Gegensatz zu den anderen Aminen sowohl die undissoziierte als auch die dissoziierte Form der Säure binden (Lee *et al.* 2008). Tertiäre Amine sind dementsprechend am besten für die Reaktivextraktion von Bernsteinsäure geeignet. Auf Grund des hohen Alkylierungsgrades und der damit hohen Basizität können hier hohe Extraktionsausbeuten erzielt werden. Langkettige tertiäre Amine sind außerdem praktisch unlöslich in Wasser, solange die Säurekonzentration 10 % w/w nicht überschreitet (Schügerl 1994). Auf Grund der drei Seitenketten haben sie jedoch häufig eine hohe Viskosität und ein schlechtes Lösungsvermögen für die entstehenden Amin-Säure-Komplexe, weshalb der Einsatz eines

zusätzliches Lösungsmittel erforderlich wird. Um die Viskosität des Extraktionsmittels, bestehend aus Amin und Lösungsmittel niedrig zu halten, werden aus diesem Grund in der Industrie auch selten höhere Aminkonzentrationen als $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel eingesetzt (Bart 2001).

Für einen integrierten Aufarbeitungsprozess spielt auch die Biokompatibilität der Amine eine große Rolle. Amine sind in der Regel bereits in geringen Konzentrationen toxisch für Zellen (von Frieling und Schügerl 1999). Wie bereits erwähnt, ist deshalb auf Grund der geringen Biokompatibilität mit einer Limitierung des Zellwachstums und der Produktbildung zu rechnen (Hatti-Kaul und Mattiasson 2006).

3.5.3 Lösungsmittel bei der Reaktivextraktion

Auf Grund der hohen Viskosität vieler Amine sind geeignete Lösungsmittel zur Verdünnung sowie zur Optimierung des Fließverhaltens (Dispergierung und Phasentrennung) und der Dichte der organischen Phase notwendig (Tamada *et al.* 1990a; Hauer und Marr 1993). Die Wahl des richtigen Lösungsmittels hat dabei großen Einfluss auf den Verteilungskoeffizienten. Höhere Ausbeuten sind erzielbar, wenn das eingesetzte Lösungsmittel in der Lage ist den Amin-Säure-Komplex zu stabilisieren (Tung und King 1994a). Bei Zweiphasensystemen, wie in der Reaktivextraktion, werden deshalb viele Ansprüche an das Lösungsmittel gestellt:

- physikalische und chemische Stabilität
- keine Neigung zur Emulsionsbildung
- geringe Verdunstungsverluste
- hohes Lösungsvermögen für die Reaktivkomponente (Amin)
- geringe Löslichkeit in Wasser
- geringe Aufnahmekapazität der wässrigen Phase
- Biokompatibilität
- hohe Selektivität
- ungiftig
- preiswert und in großer Menge verfügbar

Lösungsmittel lassen sich nach ihrem Verhalten bei der Reaktivextraktion in „inert“ oder „aktiv“ einteilen. Inerte Lösungsmittel, wie Alkane, sind nahezu unpolar (kein Dipolmoment) und können die bei der Extraktion entstandenen Komplexe nur in geringem Maße solvatisieren (Tamada und King 1990b; Barrow und Yerger 1954; Yerger and Barrow 1955a+b). Aromatische Lösungsmittel (z.B. Toluol, Benzol) zeigen ebenfalls niedrige aber etwas höhere Verteilungskoeffizienten als Alkane, da die π -Elektronen des Aromaten mit den Komplexen interagieren können (Vieux *et al.* 1974).

Für die Extraktion von polaren Molekülen, wie Carbonsäuren, eignen sich jedoch vor allem polare oder „aktive“ Lösungsmittel (Stuckey 1996). Die Polarität von Lösungsmitteln nimmt dabei in folgender Reihenfolge zu:

Alkane < Aromaten < Ester < Aldehyde/Ketone < Amine < Alkohole < Carbonsäuren < Wasser

Ein Maß für die Polarität eines Lösungsmittels ist das Dipolmoment, das die räumliche Ladungstrennung innerhalb eines Moleküls beschreibt. Je größer das Dipolmoment, desto höher ist auch die Polarität eines Lösungsmittels. Die Dipolmomente einiger wichtiger Alkohole, Ketone und Alkane sind in Abbildung 3-19 zusammengefasst.

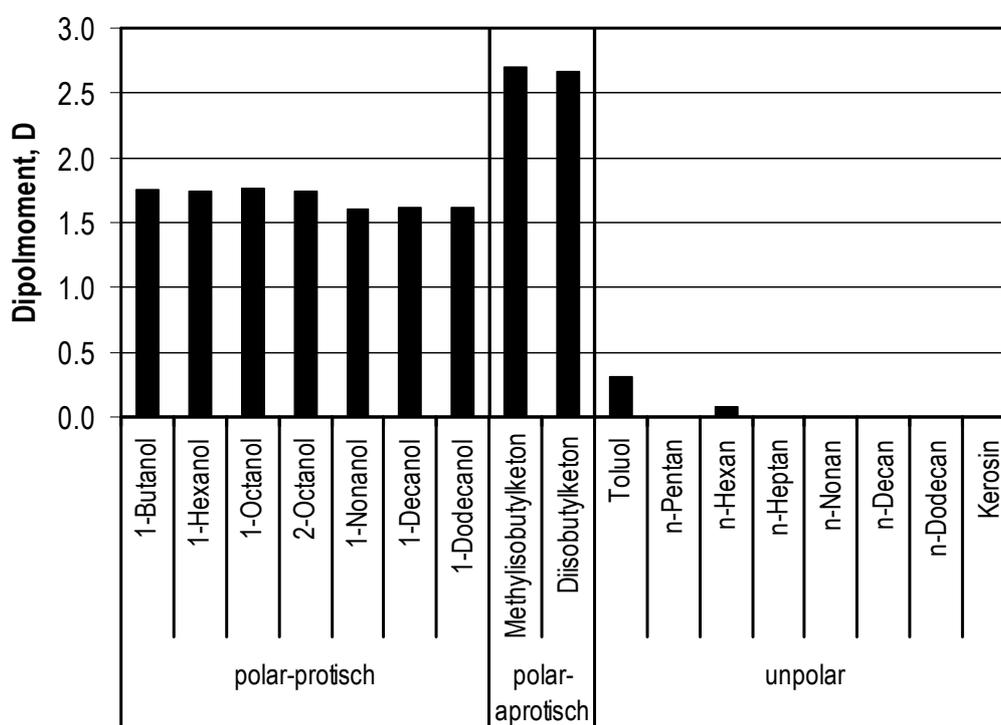


Abbildung 3-19: Dipolmomente einiger wichtiger Alkohole (polar-protisch), Ketone (polar-aprotisch) und Alkane (unpolar)

Aktive Lösungsmittel, wie Alkohole und Ketone oder Aromaten mit funktionellen Gruppen, sind polar und deshalb gute Solvatisierungsmedien für Amin-Bernsteinsäure-Komplexe. Sie sind in der Lage die Komplexe schnell zu solvatisieren und so eine Reaktion zwischen den Komplexen zu verhindern. Obwohl polar-protische Lösungsmittel, wie Alkohole, niedrigere Dipolmomente als Ketone besitzen zeigen Alkohole bessere Extraktionseigenschaften. Grund hierfür ist die Fähigkeit von Alkoholen ein Proton abzuspalten (protisch) und so die Amin-Bernsteinsäure-Komplexe über Wasserstoffbrückenbindungen zu stabilisieren. Ketone erzielen zehnfach höhere Ausbeuten als Benzol - Alkohole sogar bis zu hundertfach höhere (Tamada und King 1990b, Manenok *et al.* 1978). Bei der Untersuchung

verschiedener Alkohole konnte außerdem beobachtet werden, dass die Verteilungskoeffizienten der Reaktivextraktion von Milchsäure und Essigsäure mit sinkender Kettenlänge des Alkohols steigen (Jung 2000). Weiterhin zeigen geradkettige Alkohole bessere Verteilungskoeffizienten als verzweigte Alkohole (Wojtech und Mayer 1985). Insgesamt lässt sich für die Solvatisierungsfähigkeit von Amin-Säure-Komplexen mit Lösungsmitteln folgende Reihenfolge aufstellen (Tamada *et al.* 1990a):

Alkohole ≥ Nitrobenzol ≥ halogenierte Kohlenwasserstoffe > Ketone >
halogenierte Aromaten > Benzol > alkylierte Aromaten > Alkane

Neben den chemischen Eigenschaften spielt die Toxizität von Lösungsmitteln vor allem für einen integrierten Aufarbeitungsprozess eine große Rolle. Manche Lösungsmittel reduzieren das Wachstum und die metabolische Aktivität von Mikroorganismen oder wirken toxisch auf Zellen. Dies geschieht durch Einlagerung der Lösungsmittelmoleküle in oder an die Lipidschicht der Zellwände. Die Toxizität oder Biokompatibilität kann anhand der Polarität des jeweiligen Lösungsmittels abgeschätzt werden (Franke 2002). Als Richtwert wird hier in der Regel der logP verwendet. Dieser gibt den Logarithmus der Verteilung eines Stoffes in einem Zweiphasengemisch aus Wasser und 1-Octanol an, wie in Gleichung 3-21 dargestellt.

$$\log P = \log \frac{C_{\text{Lösungsmittel}}^{1-OCTANOL}}{C_{\text{Lösungsmittel}}^{\text{WASSER}}} \quad (3-21)$$

Mit steigendem logP nimmt dabei die Biokompatibilität des Lösungsmittels zu. Lösungsmittel, die einen logP von über 4,0 aufweisen, zeigen eine gute Biokompatibilität (Vermue *et al.* 1993; Bruce und Daugulis 1991). Für *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben ist des Weiteren ein logP von mindestens 6,0, um in Gegenwart von Lösungsmittel wachsen zu können (Kawamoto *et al.* 2001). Insgesamt ist der Toleranzbereich bei gramnegativen Bakterien größer als bei grampositiven (Laane *et al.* 1978). Alkohole (C₅ - C₁₂) und Ketone (C₅ - C₈) wirkten toxisch auf anaerob wachsenden Mikroorganismen, während Alkane (C₆ - C₁₂) keine zellschädigende Wirkung zeigen (Playne und Smith 1983).

Der logP ist jedoch nicht alleiniges Maß für die Biokompatibilität. Die Zellschädigung hängt auch von der Löslichkeit des Lösungsmittelmoleküls in der Zellmembran oder Zellwand des jeweiligen Organismus ab (Bruce und Daugulis 1991).

3.5.4 Reaktivextraktion von Bernsteinsäure

Für die Reaktivextraktion von Bernsteinsäure aus einer wässrigen Phase werden vor allem Reaktivextraktionssysteme, bestehend aus tertiären Aminen in Alkoholen, Methylenchlorid oder Nitrobenzol beschrieben (Hong und Hong 2000a-c; Juang und Huang 1996, Tung und King 1994a, Yang *et al.* 1991, Song *et al.* 2007). Auch sekundäre Amine, wie Amberlite LA-2, Dowex MWA-1, und Duolite A7, werden für Bernsteinsäure vorgeschlagen (Tung und King 1994a). In einigen wenigen Ansätzen kommen des Weiteren komplexere Systeme für die Bernsteinsäure-Extraktion zu Einsatz, z.B. eine Kombination aus Tripropylamin und Trioctylamin in einem Lösungsmittelgemisch aus 1-Octanol oder Chloroform und *n*-Heptan (Hong und Hong 2000c; Heyberger *et al.* 1997). Die meisten dieser Ansätze erfolgten jedoch für die Extraktion von Bernsteinsäure aus wässrigen Lösungen (siehe Zusammenfassung in Tabelle 3-3) und nicht aus Fermentationsüberstand (siehe Tabelle 3-4).

Tabelle 3-3: Vorgeschlagene Reaktivextraktionssysteme für Bernsteinsäure aus Wasser

Quelle	Amin	Lösungsmittel	Maximale Ausbeuten	Bedingungen
Hong und Hong 2000a	Tripropylamin	1-Butanol 1-Hexanol 1-Octanol	~80 % (1-Butanol) ~72 % (1-Hexanol) ~70 % (1-Octanol)	0,5 mol L ⁻¹ Bernsteinsäure, 1,0 mol kg ⁻¹ Amin
Hong und Hong 2000b	Tripropylamin Tributylamin Tripentylamin Trioctylamin	1-Octanol <i>n</i> -Heptan	~42 - 80 % (TPA) ~52 - 90 % (TBA) ~66 - 85 % (TPeA) ~70 - 95 % (TOA)	0,5-0,14 mol L ⁻¹ Bernsteinsäure, 0,5 mol kg ⁻¹ Amin in 1-Octanol
Hong und Hong 2000c	Tripropylamin + Trioctylamin (8:2)	1-Octanol + <i>n</i> -Heptan (3:7)	~53 - 97 %	0,64-0,24 mol L ⁻¹ Bernsteinsäure, 1,0 mol kg ⁻¹ Amin
Hong <i>et al.</i> 2002	Tripropylamin Tributylamin Tripentylamin Trioctylamin	1-Butanol 1-Hexanol 1-Octanol 1-Decanol	~41 - 62 % (TPA) ~51 - 71 % (TBA) ~58 - 75 % (TPeA) ~69 - 88 % (TOA)	0,29-0,5 mol L ⁻¹ Bernsteinsäure, 0,5 mol kg ⁻¹ Amin in 1-Octanol
Inci <i>et al.</i> 2007	Tridodecylamin	MIBK	~92 %	0,6 mol L ⁻¹ Bernsteinsäure, 0,92 mol kg ⁻¹ Amin
Tamada <i>et al.</i> 1990a Tamada und King 1990b	Alamine 336	MIBK <i>n</i> -Heptan Methylenchlorid Nitrobenzol Chloroform 1-Octanol	*	*

* keine genauen Werte genannt, nur Prinzipien und Tendenzen dargestellt

Tabelle 3-3: Vorgeschlagene Reaktivextraktionssysteme für Bernsteinsäure aus Wasser (Fortsetzung)

Quelle	Amin	Lösungsmittel	Maximale Ausbeuten	Bedingungen
Kertes und King 1985	Trioctylamin Tridodecylamin	Chloroform MIBK Benzol <i>n</i> -Heptan 1-Butanol Isobutanol, 1-Pentanol 1-Octanol Diethylether	*	*
Tung und King 1994a	Alamine 336 Amberlite LA-2 Dowex MWA-1 Bio-Rad AG3-X4 Duolite A7 Amberlite IRA-910 Amberlite IRA-35	MIBK Chloroform 1-Octanol	*	*

* keine genauen Werte genannt, nur Prinzipien und Tendenzen dargestellt

Lediglich Song beschreibt einen einfachen Prozess ausgehend vom Fermentationsüberstand einer *Mannheimia succiniciproducens* Kultivierung bestehend aus einer Reaktivextraktion mit Trioctylamin in 1-Octanol, anschließender Vakuumdestillation und einer Kristallisation. Bernsteinsäure kann dabei mit einer Ausbeute von 67,05 % und einer Reinheit von mehr als 99,5 % gewonnen werden (Song *et al.* 2007). Auch die Arbeitsgruppe von Jun befasst sich mit der Extraktion von Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand. Es wird postuliert, dass für eine effektive Reaktivextraktion mit tertiären Aminen der pH der Fermentationslösung deutlich unter dem pK_{S1} der Säure von 4,17 liegen muss, damit die Säure nahezu vollständig in ihrer undissoziierten Form vorliegt. Ebenfalls konnte festgestellt werden, dass Verunreinigungen, wie andere organische Säuren und Salze, zu einer starken Beeinträchtigung der Extraktionsausbeute führen. Mehrwertige Salzanionen, wie HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} und SO_4^{2-} stehen in Konkurrenz zu den Bernsteinsäureanionen und werden mitextrahiert. Die maximale erzielbare Extraktionsausbeute ist deshalb niedriger. Dementsprechend müssen Nebenprodukt- und Salzkonzentration bereits in der Fermentation minimiert werden (Jun *et al.* 2007a). Ein gegenteiliger Ansatz wurde von Huh *et al.* 2006 entwickelt. Hier wird eine Reaktivextraktion mit Trioctylamin zur Entfernung unerwünschter Nebenprodukte, wie anderer organischer Säuren, aus der Fermentationslösung von *Mannheimia succiniciproducens* eingesetzt. Noch vorhandene Glucose wird anschließend durch Kristallisation entfernt. Bernsteinsäure wird in einem letzten Schritt durch eine

Verdampfungskristallisation gewonnen. Mit diesem Verfahren kann Bernsteinsäure mit 71,3 % Ausbeute und einer Reinheit von 99,8 % isoliert werden (Huh *et al.* 2006).

Tabelle 3-4: Vorgeschlagene Reaktivextraktionssysteme für Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand

Quelle	Amin	Lösungsmittel	Ausbeute	Reinheit	Bedingungen
Song <i>et al.</i> 2007	Trioctylamin	1-Octanol	67,0 %	99,6 %	Fermentationslösung von <i>Mannheimia succiniciproducens</i> MBEL55E und LPK7
Huh <i>et al.</i> 2006	Trioctylamin	1-Octanol	71,3 %	99,8 %	Fermentationslösung von <i>Mannheimia succiniciproducens</i>
Jun <i>et al.</i> 2007a	Trioctylamin	1-Octanol	*	*	"Künstliche" Bernsteinsäurelösung mit Bernsteinsäure, Pyruvat und Salzen

* keine genauen Werte genannt, nur Prinzipien und Tendenzen dargestellt

In nahezu allen Untersuchungen wurde dabei Trioctylamin in Kombination mit 1-Octanol als am besten geeignetes Reaktivextraktionssystem für die Extraktion von Bernsteinsäure aus einer wässrigen Lösung oder Fermentationsüberstand erachtet. Neben der Wahl des passenden Reaktivextraktionssystems für die Extraktion von Bernsteinsäure spielen jedoch viele weitere Faktoren eine große Rolle. Dazu gehören:

- Stöchiometrie, Stabilität und Bindungscharakter der gebildeten Komplexe
- Koextraktion von Wasser
- Temperatur
- pH

Diese Einflussfaktoren sollen im Folgenden beschrieben und die Auswirkungen dargestellt werden.

Komplexbildung

Um die reaktiven Stoffübergangsphänomene besser zu verstehen, ist es notwendig die Komplexierung zwischen Säure und Amin genau zu betrachten. Besonderes Augenmerk wird in der Forschung dabei auf die Stöchiometrie, Stabilität und den Bindungscharakter gelegt. Einfluss auf die Art der gebildeten Komplexe hat dabei die Art desamins, die Art des Lösungsmittels und die Art und Säurestärke der Säure (Tamada *et al.* 1990a; Tamada und King 1990b+c; Hong und Hong 2005). Die bis heute gewonnenen Erkenntnisse basieren in erster Linie auf infrarotspektroskopischen Untersuchungen und der Interpretationen von Massenwirkungsbeziehungen. Dabei konnte festgestellt werden, dass eine Komplexbildung zwischen Amin und Bernsteinsäure sowohl über Ionenpaarbindung als auch über Wasserstoffbrücken möglich ist (siehe Abbildung 3-20).

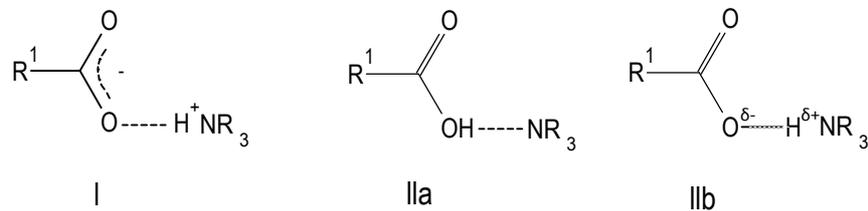


Abbildung 3-20: Bindungscharakter von Säure-Amin-Komplexen von Carbonsäuren und einem tertiären Amin (NR_3). R^1 ist im Fall von Bernsteinsäure $-(\text{CH}_2)_2\text{-COOH}$. I: Carboxylbindungsform, IIa-IIb: Gleichgewichtsformen der Carbonylbindung

Bei der Ionenpaarbindung entsteht eine delokalisierte Doppelbindung in der Carboxylregion (I) der Säure. Diese Art der Bindung wird für starke Säuren bevorzugt. Eine weitere Möglichkeit stellt die Entstehung einer Doppelbindung in der Carbonylregion an einem der beiden Sauerstoffe dar. Bei der Carbonylform der Bindung lassen sich wiederum zwei Gleichgewichtsformen unterscheiden: ein über Wasserstoffbrücken (IIa) und ein über Ionenpaarbindung (IIb) gebildeter Komplex. Die Carbonylformen sind bei schwachen Säuren bevorzugt (Barrow 1956; Gusakova *et al.* 1970; Tamada und King 1990b). Da Bernsteinsäure eine relativ schwache Säure ist, kann dementsprechend von einer der beiden Carbonylbindungsformen ausgegangen werden.

Auch für die Stöchiometrie der gebildeten Bernsteinsäure-Amin-Komplexe sind verschiedene Konfigurationen möglich. Diese werden im Folgenden näher erläutert. Die Schreibweise folgt dabei der (p,q) -Notation. Dabei gibt p die Anzahl der Säuremoleküle und q die Anzahl der Aminmoleküle an.

1,1- und 2,2-Komplexe

1,1-Komplexe werden bevorzugt bei niedrigen Säurekonzentrationen gebildet. In Abbildung 3-21 ist der Säure-Amin-Komplex (III) von Bernsteinsäure und einem tertiären Amin dargestellt. Dicarbonsäuren,

wie Bernsteinsäure, können jedoch auch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Statt der offenen Form ist somit auch eine stabilisierte Form (IV) des 1,1-Komplexes möglich.

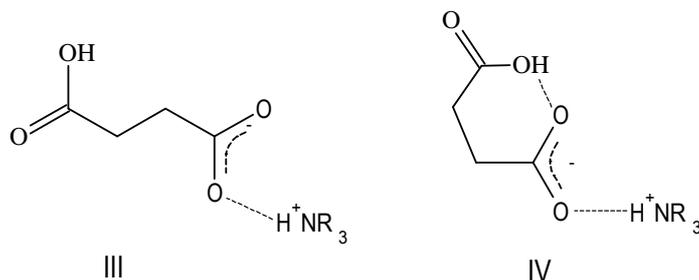


Abbildung 3-21: 1,1-Komplex aus Bernsteinsäure mit einem tertiären aliphatischen Amin (NR_3). III ist die offene Form, IV die durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierte Form des 1,1-Komplexes.

Des Weiteren können 1,1-Komplexe durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit protischen Lösungsmitteln (Protonendonatoren), wie Chloroform oder Alkoholen stabilisiert werden, wie in Abbildung 3-22 zu sehen ist.

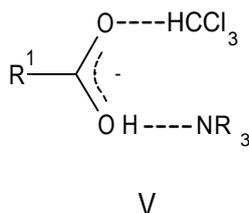


Abbildung 3-22: Stabilisierung der 1,1-Komplex aus Carbonsäuren mit einem tertiären aliphatischen Amin (NR_3) durch protische Lösungsmittel (hier gezeigt für Chloroform HCCl_3). R^1 ist im Fall von Bernsteinsäure $-(\text{CH}_2)_2\text{-COOH}$.

Bernsteinsäure bildet häufig 1,1-Komplexe bei der Extraktion mit Reaktivextraktionssystemen, die Lösungsmittel wie Methylisobutylketon (MIBK) oder Chloroform enthalten. 2,2-Komplexe (siehe Abbildung 3-23), bei denen zwei 1,1-Komplexe über Wasserstoffbrücken assoziieren, werden von Bernsteinsäuremolekülen nur sehr selten gebildet (Hong und Hong 2005).

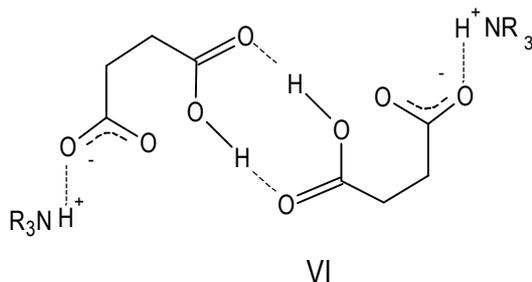


Abbildung 3-23: 2,2-Komplex aus Bernsteinsäure mit einem tertiären aliphatischen Amin (NR_3)

2,1- und 3,1-Komplexe

Bindet mehr als ein Bernsteinsäuremolekül pro Amin so spricht man von Überladung („Overloading“). 2,1-Komplexe (VII) entstehen indem zuerst ein Säuremolekül und ein Aminmolekül über Ionenpaarbindung einen Komplex eingehen. Die Anlagerung der zweiten Säure erfolgt über eine Wasserstoffbrückenbindung des Carboxylatprotons des zweiten Säuremoleküls mit der Carboxylgruppe des ersten Säuremoleküls im Komplex. Bei 3,1-Komplexen (VIII) lagern sich zwei weitere Säuremoleküle nach diesem Prinzip an, wie in Abbildung 3-24 dargestellt ist.

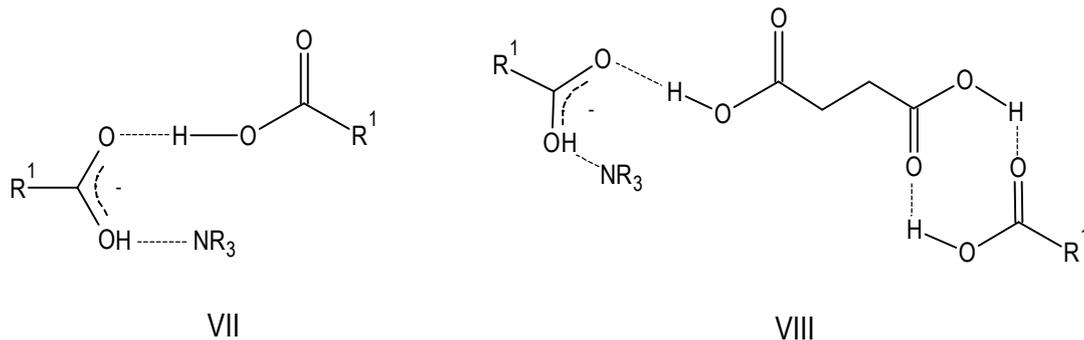


Abbildung 3-24: 2,1- (VII) und 3,1- (VIII) Komplexe aus Bernsteinsäure mit einem tertiären aliphatischen Amin. R¹ ist im Fall von Bernsteinsäure -(CH₂)₂-COOH.

In protischen Lösungsmitteln konkurrieren die Lösungsmittelmoleküle mit dem zweiten bzw. den weiteren Säuremolekülen um die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke. Lösungsmittel, die zu einer guten Solvatisierung des Säure-Amin-Komplexes führen, verhindern somit die Ausbildung größerer Komplexe. Die Bildung von 2,1- und 3,1-Komplexen findet deshalb bevorzugt in aprotischen Lösungsmitteln statt, die eine geringere Solvatisierungsfähigkeit besitzen (Tamada und King 1990b).

Aggregate

Der Einsatz von unpolaren Lösungsmitteln, die Bernsteinsäure-Amin-Komplexe nicht optimal solvatisieren, kann dazu führen, dass Komplexe über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander wechselwirken und so immer größere Komplexe bilden. Diese Komplexe haben auf Grund ihrer Polarität jedoch das Bestreben sich vom wenig polaren oder unpolaren Lösungsmittel abzuschirmen. In extremen Fällen kommt es zur Ausbildung einer dritten Phase, Koazervaten oder Präzipitaten. Untersuchungen der organischen Phase ergaben, dass die extrahierte Säure in großer Menge in dieser dritten Phase und nicht in der eigentlichen Extraktphase vorliegt. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass Komplexe aus Aminen und Dicarbonsäuren stärker zur Aggregatbildung neigen als Komplexe mit Monocarbonsäuren. Grund hierfür sind die Carboxylgruppen von Dicarbonsäuren, die als Verbindung zwischen Aminen und anderen Säuremolekülen wirken.

Die Tendenz zur Aggregatbildung nimmt jedoch auch in polaren Lösungsmitteln mit zunehmender Aminmenge zu, da Amine selbst nur schlechte Solvatisierungsmedien für die entstehenden Komplexe sind (Tamada *et al.* 1990a; Tamada und King 1990b).

1,2-Komplexe

Prinzipiell neigen primäre und sekundäre Amine stärker zur Ausbildung von 1,2-Komplexen als tertiäre Amine (Gusakova *et al.* 1986). Dabei sind an einem Dicarbonsäuremolekül zwei Amine gebunden. Bernsteinsäure bildet keine 1,2-Komplexe, da es, wie bereits in Abbildung 3-21 (IV) gezeigt, durch die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen im Molekül nicht zu einer Anlagerung von weiteren Aminen kommen kann (Hong und Hong 2004).

Koextraktion von Wasser

Die Koextraktion von Wasser ist abhängig vom eingesetzten Lösungsmittel und nimmt mit steigender Polarität des Lösungsmittels in folgender Reihenfolge zu (Tamada und King 1990c):



Versuche mit Tripropylamin in 1-Octanol oder 1-Hexanol (Aminkonzentration $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$) zeigten, dass zwischen $1,5 - 3,0 \text{ mol kg}^{-1}$ Wasser pro $0,1 \text{ mol kg}^{-1}$ extrahierter Bernsteinsäure koextrahiert werden (Hong *et al.* 2002). Aber auch die Art der extrahierten Säure hat einen Einfluss auf die Menge an mitextrahiertem Wasser. Monocarbonsäuren nehmen weniger Wasser mit in die organische Phase als Dicarbonsäuren. Grund hierfür ist die Assoziation von Wasser mit den Carboxylgruppen der Säuren. Je mehr Carboxylgruppen in einem Säuremolekül vorhanden sind, desto mehr Wasser wird dementsprechend mitextrahiert. Zudem sinkt die Extraktion von Wasser bei niedrigeren Temperaturen. Auch der pH der wässrigen Lösung spielt eine Rolle bei der Menge an mitextrahiertem Wasser. Insgesamt hat die Menge an koextrahiertem Wasser jedoch keinen großen Einfluss auf den Gesamtprozess, da sie im Vergleich zum Volumen der zur Rückextraktion benötigten wässrigen Lösung relativ gering ist (Tamada und King 1990c).

Temperatur

Die Komplexbildungsreaktionen von Aminen und Carbonsäuren sind in der Regel exotherm. Wird die Temperatur bei der Extraktion erhöht steigt die Entropie, d.h. die Unordnung im System an. Dies führt dazu, dass weniger Säure extrahiert werden kann (Baniel *et al.* 1981; Wennersten 1983).

pH

Auch der pH hat einen Einfluss auf die Reaktivextraktion von organischen Säuren. Über den pH in der wässrigen Phase kann die Selektivität der Extraktion beeinflusst werden. Nebenprodukte, wie andere Säuren, können zum Beispiel bei einem bestimmten pH auf Grund ihrer unterschiedlichen Dissoziationskonstanten (pK_s) in Lösung gehalten werden, während das Zielmolekül extrahiert wird (Song *et al.* 2005; Huh *et al.* 2006). Wie soeben erwähnt, beeinflusst der pH zudem die Menge an koextrahiertem Wasser.

3.5.5 Flüssig-Flüssig-Zentrifugalextraktion

Für den Stoffaustausch zwischen zwei flüssigen Phasen gibt es verschiedene apparative Möglichkeiten. Man unterscheidet sie nach einstufiger oder mehrstufiger Betriebsweise in Mischer-Abscheider, Zentrifugalextraktoren und Kolonnen, die mit oder ohne Energieeintrag betrieben werden können. Der Energieeintrag kann durch Schwerkraft (Kolonnen ohne Energiezufuhr), Zentrifugalkraft (Zentrifugalextraktoren), Pulsation (pulsierende Kolonnen) und Rühren (Mischer-Abscheider, gerührte Kolonnen) erfolgen. Unabhängig vom jeweiligen Apparat ist jedoch die Mischung der Phasen. In allen Fällen muss eine der Phasen zu Tropfen dispergiert werden, während die zweite Phase kontinuierlich bleibt (Lohrengel 2007). Flüssig-Flüssig-Stoffaustauschapparate müssen viele Anforderungen erfüllen. Hierzu gehören eine schnelle Tropfenbildung mit einer einheitlichen Tropfengröße und Verteilung in der kontinuierlichen Phase. Tropfenkoaleszenz sowie Rückvermischung müssen vermieden werden. Des Weiteren muss ausreichend Zeit für den Phasenkontakt bestehen, ein guter Stoffaustausch durch eine große volumenbezogene Phasengrenzfläche erzielt werden und die Phasentrennung optimal funktionieren (Brandt *et al.* 1978).

Gerade bei der Trennung von Flüssigkeiten mit nur geringen Dichteunterschieden oder dem Einsatz von Kulturbrühen, die zur Ausbildung stabiler Emulsionen neigen, kommen häufig Zentrifugalextraktoren zum Einsatz. Weitere Vorteile von Zentrifugalextraktoren gegenüber anderen Stoffaustauschapparaten sind (Gebauer *et al.* 1982; Rüffer 2004a):

- große Phasenkontaktfläche und gute Stoffübertragung durch starke Durchmischung der Phasen
- kurze Kontakt- und Verweilzeit (wichtig für empfindliche Stoffe)
- Trennung der Phasen durch Zentrifugalkraft → auch Phasen mit geringen Dichteunterschieden gut trennbar → höhere Anzahl an einsetzbaren Lösungsmitteln
- flexible Phasenverhältnisse (Baier 1999)
- hoher Durchsatz (Schügerl 1994)
- geringer Raumbedarf

Nachteile von Zentrifugalextraktoren sind (Schügerl 1994):

- hohe Investitionskosten und hohe variable Kosten
- hohe Drücke, die die Extraktion beeinflussen können
- Emulsionsbildung durch Kontakt von Lösungsmittel mit eventuell vorhandene Proteinen (Yang und Cussler 2000)
- Flutung und unzureichende Phasentrennung bei extrem unterschiedlichen Volumenströmen der Phasen (Lo *et al.* 1983)

Auf Grund der vielen Vorteile werden Zentrifugalextraktoren immer mehr in der pharmazeutischen Industrie, bei der Farbstoffherstellung, in der Lebensmitteltechnik und in der Kerntechnik eingesetzt (Gebauer *et al.* 1982).

Zentrifugalextraktoren können weiter unterteilt werden (Abbildung 3-25) in Mischer-Abscheider-Systeme und Differentialkontakoren.

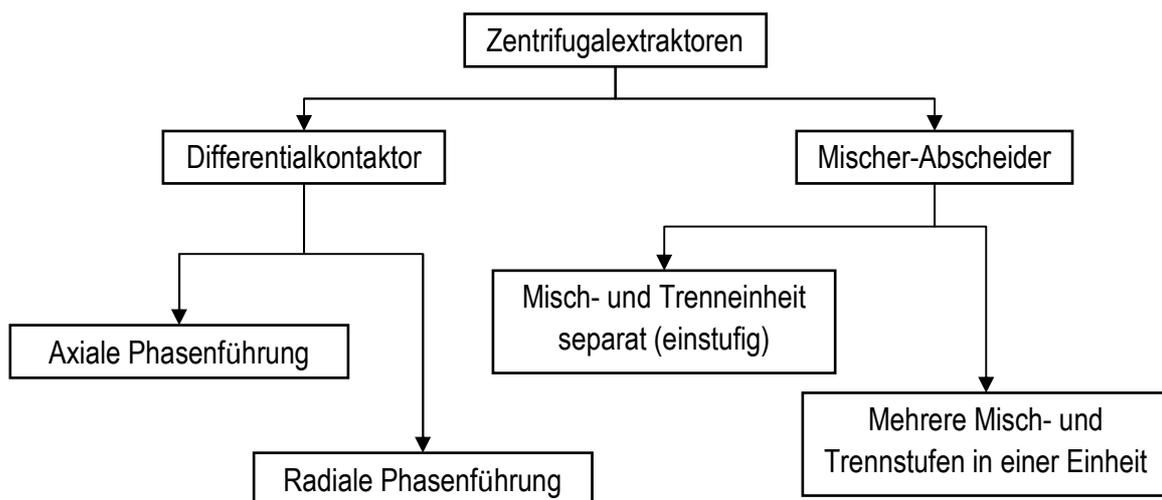


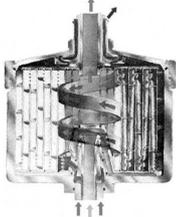
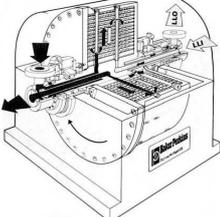
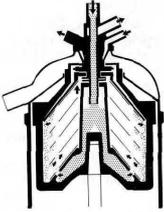
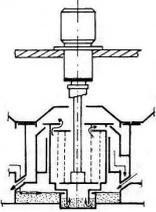
Abbildung 3-25: Einteilung von Zentrifugalextraktoren nach Gebauer *et al.* 1982

Mischer-Abscheider-Systeme besitzen getrennte Einheiten für die Durchmischung und Trennung der Phasen. Die Einheiten für Misch- und Trennstufe liegen entweder in einem Apparat zusammen oder sind auf zwei Einheiten aufgeteilt. Häufig werden solche Mischer-Abscheider-Systeme als Kaskaden für mehrstufige Extraktionen eingesetzt. Die Phasen werden hier nach jeder Stufe vollständig voneinander getrennt.

Daneben gibt es Differentialkontaktoren (Phasenführung axial oder radial zur Rotationsachse) die keine diskreten Stufen aufweisen, sondern mehrere Stufen in einer Einheit vereinen. Die Stärke der Durchmischung und die Trennung der Phasen wird hier durch Einbauten und die Hydrodynamik

bestimmt (Gebauer *et al.* 1982). Zu den Differentialkontakoren gehören der Alfa-Laval-Extraktor, der axial und radial durchströmt wird, sowie der Podbielniak-Extraktor bei dem die Flüssigkeit kontinuierlich durch eine horizontal gelagerte, rotierende Trommel strömt. Der Westfalia-Extraktor, der Robatel-Extraktor und der ANL-Extraktor sowie dessen Weiterentwicklung, der CINC-Extraktor, sind Mischer-Abscheider im Gleichstrom die Misch- und Trennstufe in einer Einheit vereinen. Ein mehrstufiger Betrieb im Gleich- oder Gegenstrom ist durch mehrere hintereinandergeschaltete Einheiten realisierbar (Schügerl 1994). Die Auswahl des richtigen Zentrifugalextraktors ist abhängig von den verwendeten Flüssigkeiten, der Extraktionsrate und dem gewünschten Durchsatz (Verrall 1992). Die Bestimmung von Rückvermischungsphänomenen und Stoffaustauschvorgängen in Zentrifugalextraktoren ist schwierig, weshalb ein quantitativer Vergleich der Wirkungsgrade oder Trennleistungen verschiedener Apparate nicht möglich ist (Gebauer *et al.* 1982). In Tabelle 3-5 sind die wichtigsten Zentrifugalextraktoren mit ihren Eigenschaften nochmals zusammengefasst.

Tabelle 3-5: Eigenschaften von Zentrifugalextraktoren (Hafez 1983; Schügerl 1994; Vauck und Müller 1994; Gebauer *et al.* 1982; Ruffer 2004a+b)

Extraktor	Volumen, m ³	Durchsatz, m ³ h ⁻¹	Eigenschaften
Alfa-Laval  aus (Hafez 1983)	0,02 - 0,07	5 - 20	<ul style="list-style-type: none"> - hoher Durchsatz - kurze Verweilzeit - geeignet zur Trennung von Flüssigkeiten mit Neigung zur Emulsionsbildung
Podbielniak  aus (Hafez 1983)	0,8 - 1,0	4 - 200	<ul style="list-style-type: none"> - hoher Durchsatz - kurze Verweilzeit - komplizierter Aufbau
Westfalia  aus (Verall 1992)	0,003 - 0,12	1,25 - 120	<ul style="list-style-type: none"> - hoher Durchsatz - kurze Verweilzeit - geeignet zur Trennung von Flüssigkeiten mit geringen Dichtedifferenzen
Robatel  aus (Gebauer <i>et al.</i> 1982)	0,22	50	<ul style="list-style-type: none"> - einfacher Aufbau
ANL/CINC  aus (www.cinc.de)	0,00014 - 0,2	0,003 - 0,76	<ul style="list-style-type: none"> - geringes Volumen - einfacher Aufbau - hohe Stufeneffizienz - geeignet zur Trennung von Flüssigkeiten mit leicht auflösbaren Emulsionen

In der Biotechnologie finden vor allem der Podbielniak-Extraktor, der Alfa-Laval-Extraktor, der Westfalia-Extraktor und der CINC-Zentrifugalextraktor Anwendung. Für die Reaktivextraktion von Penicillin ist von Likidis und Schügerl ein Verfahren mit einem Westfalia-Extraktor beschrieben (Likidis und Schügerl

1987). In einer Dissertation von Ruffer wurde die Extraktion von L-Phenylalanin mit D₂EHPA in Kerosin in einem CINC-Zentrifugalextraktor gezeigt (Ruffer 2004a).

Für die Prozessentwicklung im Labor wird in der Regel aus praktischen Gründen bei ausreichend hohen Verteilungskoeffizienten nur eine theoretische Stufe verwendet. Die Effizienz einer Stufe ist dabei in einstufigen Extraktoren, wie dem CINC-Zentrifugalextraktor, höher als in Extraktoren mit mehreren theoretischen Stufen (Hafez 1983). Die Funktionsweise des in dieser Arbeit verwendeten Zentrifugalextraktor der Firma CINC (Coster Industries Nevada Corp.) ist in Abbildung 3-26 dargestellt. Das Gerät besteht aus einem beweglichen Rotor, der in einem feststehenden Gehäuse gelagert ist. Organische Phase (leichte Phase), bestehend aus einem Gemisch aus Lösungsmittel und Amin, und wässrigen Bernsteinsäurelösung (schwere Phase) werden kontinuierlich tangential über die dafür vorgesehenen Einlässe zusammengeführt.

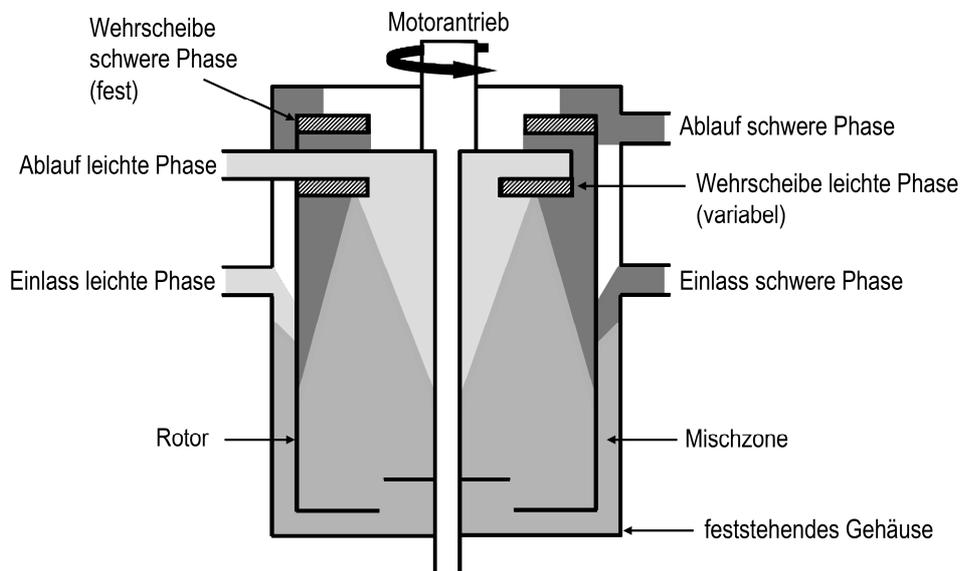


Abbildung 3-26: Schematischer Aufbau und Funktion eines CINC-Zentrifugalextraktors

Die beiden Phasen werden im schmalen Spalt zwischen der feststehenden Wand des Gehäuses und dem sich drehenden Rotor dispergiert. Durch die kontinuierliche Zufuhr der Phasen bewegt sich das Gemisch weiter Richtung Gehäuseboden. Auf dem Gehäuseboden sind radiale Stege befestigt, die die Rotation der Flüssigkeit vermindern und die Flüssigkeit in die Mitte zur Rotationsachse leiten. Dort werden die Flüssigkeiten durch eine Öffnung in den Rotorinnenraum geleitet. Der Rotor ist in vier gleiche Kammern vertikal unterteilt und versetzt dadurch die Flüssigkeiten mit gleicher Drehgeschwindigkeit in Rotation. Durch nachlaufende Flüssigkeit wandern die Flüssigkeiten im Rotorinneren nach oben Richtung Wehrscheibe. Die Rotation des Rotors erzeugt dabei eine Zentripetalkraft, die zur Trennung der Phasen auf Grund der Dichteunterschiede im Rotorinneren führt.

Die schwere Phase (hier: wässrige Phase) wird an der Innenseite der Rotorwand über ein feststehendes Wehr ausgetragen. Die leichte Phase (hier: organische Phase) baut sich auf der schweren Phase auf und wird über eine variable Wehrscheibe (Lochscheiben mit unterschiedlichem Lochdurchmesser) in Nähe der Rotationsachse ausgeleitet. Die Größe der Wehrscheibe zum Auslass der leichten Phase wird dabei so an die Dichten der eingesetzten Flüssigkeiten angepasst, dass die Dispersionszone (Mischphase) zwischen den Abflusswehren liegt. Setzt die Verunreinigung der Phasen ein, ist der maximale Durchsatz des Extraktors erreicht (Leonard *et al.* 1980).

Entscheidend für eine vollständige Phasentrennung und einen optimalen Stoffübergang sind die Rotationsgeschwindigkeit, die Scherkräfte und die Durchsatzmenge. Die Wirkung des Zentrifugalextraktors wird dabei über die Zentrifugalkennzahl Z beschrieben (siehe Gleichung 3-22).

$$Z = \frac{r \cdot \omega^2}{g} \quad (3-22)$$

- r = Abstand zum Mittelpunkt des Rotors (Radius), m
- ω = Winkelgeschwindigkeit, m s⁻¹
- g = Erdbeschleunigung, m s⁻²

Mit dem hier eingesetzte CINC-Zentrifugalextraktor sind über die Rotationsgeschwindigkeit Zentrifugalbeschleunigungen bis etwa 1000 g zu erreichen (Meikrantz *et al.* 2001).

Die Strömungsverhältnisse im CINC-Zentrifugalextraktor lassen sich grob in drei unterschiedliche Bereiche einteilen: dem ringförmigen Spalt zwischen Gehäuse und Rotorwand, die Zone außerhalb des Rotors und die Zone im Rotor (Rüffer 2004a).

Im ringförmigen Spalt herrscht eine Taylor-Couette-Strömung. Diese ist durch konzentrische Stromlinien charakterisiert (Newton 1687) und wird zur Charakterisierung der Viskosität verwendet. Die Phasen werden durch die Rotation des inneren Rotors und den feststehenden äußeren Zylinder emulgiert, was in einer großen Stofftransferfläche resultiert. Da sich die Flüssigkeiten durch die ständige Zufuhr axial bewegen ist ein kontinuierlicher Kontakt zwischen den Flüssigkeiten gewährleistet. Werden die Flüssigkeiten über peristaltische Pumpen in den Reaktor geführt, kommt es zu leichten Druckschwankungen im System, die zu Rückvermischungen führen können.

Im Bereich unter dem Rotor ist auf Grund der Stege auf der Bodenplatte und der Rotation von einer turbulenten Strömung auszugehen (Rüffer 2004a).

Im Rotorinneren ist weiterhin Phasenkontakt vorhanden. Gleichzeitig setzt die Auftrennung der Phasen im Zentrifugalfeld ein. Die Abtrenngeschwindigkeit der Flüssigkeiten im Zentrifugalfeld kann in erster Näherung durch das Stokes'sche Gesetz berechnet werden, wenn von einer kugelförmigen dispersen

Phase, einer Newtonschen kontinuierlichen Phase, einer laminaren Strömung und einem ungehinderten Absetzen der dispersen Phase ausgegangen wird (siehe Gleichung 3-23).

$$V_a = \frac{d^2(\rho_s - \rho_l)}{18\eta} \cdot r\omega^2 \quad (3-23)$$

V_a	= Absetzgeschwindigkeit, m s ⁻¹
d	= Tropfendurchmesser, m
ρ_s	= Dichte der schweren Phase, kg m ⁻³
ρ_l	= Dichte der leichten Phase, kg m ⁻³
η	= Dynamische Viskosität der kontinuierlichen Phase, kg m ⁻¹ s ⁻¹

Die Trennung der Phasen ist somit schneller je größer die Tropfen, die Drehgeschwindigkeit des Rotors, die Dichteunterschiede und je kleiner die Viskosität der kontinuierlichen Phase ist. Im Zentrifugalextraktor sind diese Voraussetzungen jedoch nicht eindeutig gegeben. Es treten Tropfenschwärme auf und die Reaktion beeinflusst die Hydrodynamik (Rüffer 2004a). Dennoch dient die Gleichung zur Veranschaulichung der Einflussfaktoren auf die Koaleszenz und den Stofftransfer (Weatherley 1994). Die Phasentrennung kann durch eine Erhöhung der Verweilzeit oder eine Drehzahlerhöhung verbessert werden. Für eine längere Verweilzeit können entweder geringere Volumenströme oder eine größere Zentrifuge eingesetzt werden. Eine Drehzahlerhöhung führt zu einer Erhöhung der Zentrifugalbeschleunigung, wodurch kleinere Tropfen abgetrennt werden können (Meikrantz *et al.* 2001).

Zu einer Emulsionsbildung kann es bei zu geringen Dichtedifferenzen oder zu hohen Unterscheiden in der Viskosität der eingesetzten Flüssigkeiten kommen. Proteine, Fette und Polysaccharide beeinflussen zudem die Grenzfläche und setzen die Oberflächenspannung herab (Weatherley 1994). Je stabiler die entstehende Emulsion, desto größer ist dabei die Mischphase im Zentrifugalextraktor (Rüffer 2004a).

Im CINC-Zentrifugalextraktor ist bei gleichen Volumenströmen die organische Phase dispers und die wässrige Phase kontinuierlich. Insgesamt ist die Beschreibung des Stofftransfers in Zentrifugalextraktoren jedoch schwierig, da hierfür die Größe und Verteilung der Tropfen betrachtet werden muss. Das Verhalten und die Mobilität der Tropfen im Extraktor ist jedoch bisher noch nicht eindeutig beschrieben. Hinzu kommt, dass sich die Konzentrationsunterschiede zwischen den Phasen innerhalb des Zentrifugalextraktors über die Länge der Mischungsstrecke ändern. Auch ist das Flüssigkeitsvolumen in den einzelnen Bereichen des Extraktors nicht genau bestimmbar. Der Füllstand im Spalt und das Luftpolster an der Rotorachse sind vom Volumenstrom abhängig. Das Phasenverhältnis im Extraktor ist wiederum abhängig von der eingesetzten variablen Wehrscheibe. Eine Berechnung der tatsächlichen Stoffaustauschvorgänge im Zentrifugalextraktor ist auf Grund der komplexen Zusammenhänge bislang nicht möglich (Otillinger und Blass 1985; Boychyn *et al.* 2001).

3.5.6 Rückextraktion

Für einen kompletten Aufarbeitungsprozess muss Bernsteinsäure nach der Extraktion von der organischen Phase in eine neue wässrige Phase überführt werden. Um eine Kreislaufführung der eingesetzten Hilfsstoffe zu realisieren muss dabei gleichzeitig eine Regeneration der organischen Extraktphase (Lösungsmittel und Amin) erfolgen. Dies ist für die Umweltfreundlichkeit und die Rentabilität des Gesamtprozesses von entscheidender Bedeutung. Verfahren, die hierfür zur Verfügung stehen sind Rektifikation, Kristallisation, Membrantrennverfahren und Rückextraktion (Lohrengel 2007). Vor allem Rückextraktionsverfahren werden häufig für die Aufarbeitung von organischen Säuren vorgeschlagen (Tung und King 1994b, Hong *et al.* 2001). Die Übertragung der Säure aus der organischen in eine wässrige Phase kann dabei über verschiedene Methoden erzielt werden (Keshav und Wasewar 2010):

- Änderung der Temperatur
- Änderung des pH
- Lösungsmittelwechsel
- Einsatz von Trimethylamin

Alle Methoden benötigen im Anschluss einen Verdampfungsschritt zur Entfernung des Wassers, um kristalline Bernsteinsäure zu gewinnen (Poole und King 1991).

Temperaturänderung

Bei Prozessen, die eine Temperaturänderung für die Rückextraktion der Säure und die Regeneration der Extraktphase einsetzen, findet die zuvor durchgeführte Reaktivextraktion bei niedrigen Temperaturen statt. Die Rückextraktion erfolgt anschließend mit einer frischen wässrigen Phase mit deutlich höheren Temperaturen. Die Regenerierung hängt dabei direkt vom Temperaturunterschied ab. Baniel gibt zum Beispiel eine Temperaturdifferenz von mindestens 20°C zwischen dem ersten Extraktionsschritt und der anschließenden Rückextraktion für die Aufarbeitung von Zitronensäure an (Baniel 1981). Die Temperaturerhöhung führt dabei zu einer Erhöhung der Entropie in der organischen Phase. Dadurch sinkt die Extraktionsleistung des Reaktivextraktionssystems und Säuremoleküle gehen in die neue wässrige Phase über (Hong *et al.* 2001). Die Konzentration der Säure in der zweiten wässrigen Phase kann dabei höher sein als in der wässrigen Lösung vor der Reaktivextraktion, was einer Aufkonzentrierung gleichkommt

Änderung des pH

Durch eine Änderung des pH kann ebenfalls eine Regeneration des organischen Extraktionsmittels erzielt werden. Es ist sowohl der Einsatz von starken Basen (NaOH) als auch starken Säuren (HCl) möglich. Bei der Rückextraktion mit NaOH wird die mit Säure beladene organische Phase mit einer wässrigen stark basischen NaOH-Lösung in Kontakt gebracht (Yabannawar und Wang 1991a). Säureanionen gehen auf Grund des hohen pH in die wässrige Phase über. Zurück bleibt die abgereicherte organische Phase, die für neue Reaktivextraktionen zur Verfügung steht. Für Propionsäure lassen sich mit dieser Methode bis zu 100 % der Säure rückextrahieren (Keshav und Wasewar 2010). Auch die Rückextraktion mit HCl wurde bereits von Yabannawar und Wang untersucht. Da HCl eine stärkere Säure ist als die zu gewinnenden organischen Säuren, kann es die Säuren im Amin-Säure-Komplex ersetzen. Organische Säure wird frei und löst sich in der wässrigen Phase. HCl kann anschließend durch Destillation wieder aus der organischen Phase entfernt werden, sodass diese für eine neue Extraktion eingesetzt werden kann (Yabannawar und Wang 1991b).

Lösungsmittelwechsel

Die Reaktivextraktion und die Rückextraktion der organischen Säure basiert bei dieser Methode auf einem Wechsel der Verteilungsgleichgewichte zwischen den eingesetzten wässrigen und organischen Phasen. Die Zusammensetzung der organischen Phase wird nach der Reaktivextraktion durch Zugabe eines zusätzlichen Lösungsmittels so verändert, dass das Gleichgewicht mehr auf die Seite einer zweiten rein wässrigen Phase verschoben wird. Die Säure verteilt sich dabei zwischen beiden Phasen, sodass der Großteil in der wässrigen Phase vorliegt und die organische Phase nahezu frei von Säure ist (Tamada 1989). Diese Methode kann auch in Kombination mit einer Temperaturänderung eingesetzt werden, wodurch deutlich mehr Säure extrahiert werden kann als dies durch eine Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung allein möglich wäre (King 1992). Han und Hong zeigten diese Synergie bereits für die Aufarbeitung von Milchsäure und konnten dabei nahezu pure Säure gewinnen (Han und Hong 1998; Han und Hong 2000). Die unterschiedlichen Lösungsmittel können anschließend durch Destillation voneinander getrennt und für mehrfache Extraktionen eingesetzt werden, während Bernsteinsäure kristallisiert.

Einsatz von Trimethylamin

Ein besonders elegantes Verfahren zur Rückextraktion der organischen Säure ist die Verwendung einer wässrigen Lösung von Trimethylamin. Trimethylamin kann dabei mit dem Amin-Säure-Komplex wechselwirken und die Bernsteinsäure als Ammoniumsalz in die wässrige Phase überführen. Ein

Prozess bestehend aus Reaktiv- und Rückextraktion mit Trimethylamin ist in Abbildung 3-27 schematisch dargestellt.

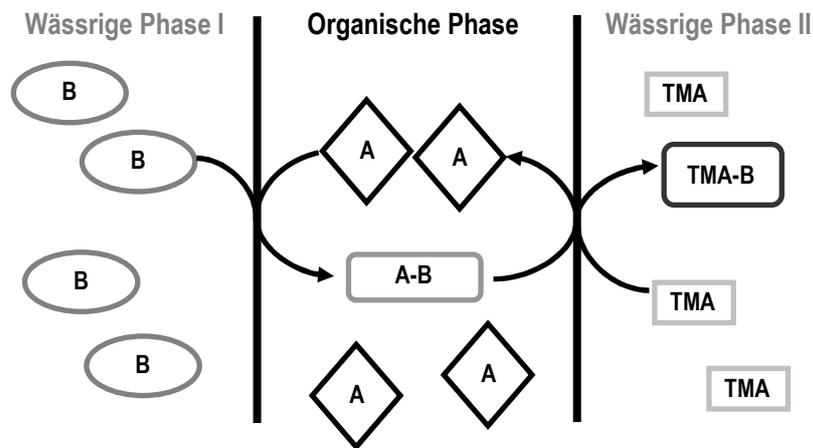


Abbildung 3-27: Schematische Darstellung eines Prozesses bestehend aus Reaktivextraktion von Bernsteinsäure (B) mit Aminen (A) und Rückextraktion mit Trimethylamin (TMA). Bei der Reaktivextraktion entsteht ein Amin-Bernsteinsäure-Komplex (A-B) - bei der Rückextraktion das Trimethylammoniumsalz der Bernsteinsäure (TMA-B).

Im Vergleich zu primären und sekundären Aminen tritt bei Trimethylamin in Gegenwart von Carbonsäuren bei höheren Temperaturen keine Amidbildung auf (Mitchell und Reid 1931; Poole und King 1991; Streitwieser und Heathcock 1976), wodurch eine einfache thermische Spaltung des Trimethylammoniumsalzes der Bernsteinsäure durch eine Verdampfungskristallisation nach der Rückextraktion möglich ist (Tung und King 1994b). Man erhält dabei kristalline Bernsteinsäure und eine kondensierte Trimethylaminlösung. Diese kann im Kreislauf geführt und damit mehrfach für Rückextraktionen genutzt werden. Für Propionsäure, Milchsäure, Fumarsäure und Bernsteinsäure können mit dieser Methode 100 % Rückextraktionsausbeute erzielt werden (Poole und King 1991; Keshav und Wasewar 2010). Die Menge an benötigtem Trimethylamin ist dabei direkt abhängig von der Anzahl der Carboxylgruppen der jeweiligen organischen Säure. Für Milchsäure wird 1,0 mol pro mol Säure benötigt, während es bei den Dicarbonsäuren Fumarsäure und Bernsteinsäure 2,0 mol pro mol Säure sind. Des Weiteren konnte bei der Rückextraktion beobachtet werden, dass überschüssiges Trimethylamin in die organische Phase übergeht. Bei einer Rückextraktion im Gegenstrom würde eine große Menge des Trimethylamins in die wässrige Phase verloren gehen und ein zusätzlicher Schritt zur Entfernung wäre notwendig. Deshalb eignen sich für die Rückextraktion mit Trimethylamin nur Verfahren im Gleichstrom (Poole und King 1991).

3.6 Grundlagen der Verdampfungskristallisation

Die Kristallisation wird in vielen Bereichen der Verfahrenstechnik genutzt, entweder zur Reinigung von Produkten (Umkristallisieren) oder zur Gewinnung von Salzen und anderer kristallinen Endprodukte. Auch in nahezu allen für Bernsteinsäure vorgeschlagenen Aufarbeitungsverfahren wird für die Feinreinigung der Säure eine Kristallisation oder Verdampfungskristallisation eingesetzt (Kertes und King 1985; Glassner *et al.* 1992; Tung und King 1994b).

Unter einer klassischen Kristallisation versteht man dabei die Überführung eines nicht-kristallinen Stoffes in seinen kristallinen Zustand. Dies kann durch ein Überschreiten der Löslichkeitskurve (Abbildung 3-28) durch Abkühlen oder Eindampfen erreicht werden.

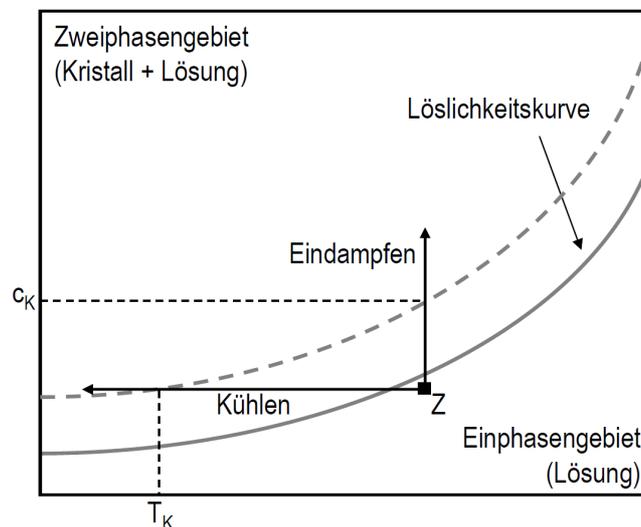


Abbildung 3-28: Schematisches Temperatur-Löslichkeitsdiagramm (nach Lohrengel 2007). Mit T_K kritische Temperatur und c_K kritische Konzentration bei der die Löslichkeitskurve überschritten und Kristalle gebildet werden. Bereich zwischen Löslichkeitskurve und gestrichelter Kurve ist der Übersättigungsbereich. Z ist beliebiger Zustandspunkt.

Wird eine Lösung ausgehend von einem Zustandspunkt Z abgekühlt (Kühlungskristallisation), wird bei einer bestimmten vom jeweiligen Stoff abhängigen Temperatur T_K die Löslichkeitskurve der Zielkomponente und der Übersättigungsbereich überschritten und eine Kristallbildung findet statt. Wie bereits in Punkt 3.4 beschrieben, wird bereits seit kurzem ein solches Verfahren zur selektiven Kühlungskristallisation als erster Aufarbeitungsschritt für Bernsteinsäure untersucht (Li *et al.* 2010).

Bei der Verdampfungskristallisation findet hingegen eine Wärmezufuhr statt die zum Verdampfen eines Teils der Lösung führt. Dadurch wird die Konzentration des Zielprodukts mit der Zeit immer höher, bis eine Sättigungskonzentration c_K erreicht ist und die Säure kristallisiert (Lohrengel 2007). Häufig wird die Verdampfungskristallisation in Kombination mit Vakuum genutzt. Vorteil ist hier, dass der Siedepunkt

durch das Vakuum reduziert und so leichter eine Verdampfung hochsiedender Stoffe erreicht werden kann.

Auch für Bernsteinsäure wurde die Verdampfungskristallisation nach der Rückextraktion mit Trimethylamin bereits untersucht. Dabei wird zuerst ein Großteil des Wassers verdampft. Obwohl Trimethylamin seinen Siedepunkt bereits bei 2,9°C erreicht, bleibt es auf Grund der Neutralisation durch die Säure in der wässrigen Lösung. Erst bei hohen Temperaturen oder einsetzender Kristallbildung der Säure erfolgen die Spaltung des Salzes und die Verdampfung des Trimethylamins (Poole und King 1991; Tung und King 1994 b). Poole und King konnten diese Art der Verdampfungskristallisation für Bernsteinsäure mit einer 6-stündigen Methode und einer Temperaturerhöhung von 60 auf 112°C zeigen.

4 Material und Methoden

In diesem Teil der Arbeit werden alle eingesetzten Methoden und Verfahren erläutert. Die Bestellnummern und Hersteller der einzelnen verwendeten Chemikalien und Geräte sind im Anhang in den Tabellen 12-1 bis 12-9 aufgelistet.

4.1 Kultivierung der potentiellen Mikroorganismen für Bernsteinsäure

4.1.1 Eingesetzte Mikroorganismen

Für die Untersuchungen zur Biokompatibilität der Amine und Lösungsmittel wurden Wildtypstämme der Mikroorganismen *Escherichia coli* K12 DSM 428 (DSMZ Deutsche Stammhaltung), *Saccharomyces cerevisiae* AH22ura3 pFlat1 pFlat2 pFlat3 (Wildtyp mit Histidin-Auxotrophie und Genitocin-Resistenz) und *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 eingesetzt. Die Bereitstellung von Fermentationsüberstand für Extraktionsversuche erfolgte lediglich durch Kultivierung von *Escherichia coli* K12.

Zur Stammhaltung wurden die Mikroorganismen in 100 mL des jeweiligen Mediums mit einer Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und bei 30°C (*Saccharomyces cerevisiae*, *Corynebacterium glutamicum*) oder 37°C (*Escherichia coli*) im Schüttelinkubator (200 min⁻¹) bis zu einer OD₆₆₀ von 1,0 inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen mit sterilem Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 33 % v/v vermischt, in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert (je 1 mL) und sofort bei -80°C eingefroren.

4.1.2 Eingesetzte Medien

Für die Kultivierung im Schüttelkolben und der Herstellung von Vorkulturen wurden die in Tabelle 4-1 aufgelisteten Medien eingesetzt. Für *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* wurde ein Minimalmedium für die Kultivierung gewählt. Im Fall von *Corynebacterium glutamicum* ließ sich mit dem von Kuruso 1990 beschriebenen Minimalmedium kein Wachstum erzielen. Hier wurde deshalb das AR-Medium mit einem geringen Anteil an Hefeextrakt und Casaminosäuren für die Kultivierungen im Schüttelkolben gewählt.

Tabelle 4-1: Medien für die Kultivierung von *S. cerevisiae*, *E. coli* und *C. glutamicum*

Mikroorganismus	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>
Medium	WM8A-Medium (Lang and Looman 1995) modifiziert von Gebhardt, 2010	synthetisches Mineralsalzmedium (Schäfer <i>et al.</i> 1999)	AR-Medium (Kurusu 1990)

WM8A-Medium für *Saccharomyces cerevisiae*

Für das WM8A-Medium zur Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* wurden zuerst die Komponenten der Salzlösung (Tabelle 4-2) in VE-Wasser gelöst, auf ein Endvolumen von 588 mL und einen pH von 6,0 mit 6 molarer NaOH eingestellt und bei 121°C für 20 min autoklaviert. Anschließend wurden je 4 mL der sterilfiltrierten Stammlösungen der Spurenelemente (Tabelle 4-3) und Vitamine (Tabelle 4-4) zugegeben. Um geringe pH-Schwankungen auszugleichen wurden zusätzlich 200 mL einer fünffach konzentrierten und zuvor bei 121°C für 20 min autoklavierten Phosphatlösung (Tabelle 4-5) zum Medium gegeben. Als letztes erfolgte die Zugabe von 200 mL der fünffach konzentrierten und separat autoklavierten Glucoselösung (Tabelle 4-6), sodass eine Substratkonzentration von 50 g L⁻¹ im Medium erreicht wurde. Da es sich bei dem hier eingesetzten Wildtypstamm der Hefe um einen Stamm mit Auxotrophie handelt, mussten zusätzlich 4 mL einer Histidin-Stammlösung (Tabelle 4-7) zum Medium gegeben werden. Das Antibiotikum Genitacin (Tabelle 4-8) wurde erst später direkt zum Medium in den jeweiligen Schüttelkolben mit einer Endkonzentration von 100 µg mL⁻¹ pipettiert.

Tabelle 4-2: Zusammensetzung Salzlösung

Komponente	Konzentration im Medium, g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,53
NH ₄ Cl	2,8
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,25
KH ₂ PO ₄	2,0
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,25
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,1
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,55
Myo-Inositol	0,075

Tabelle 4-3: Zusammensetzung Stammlösung (250x) der Spurenelemente

Komponente	Konzentration im Medium, mg L⁻¹	Konzentration in der Stammlösung, g L⁻¹
Na ₂ -EDTA	14,89	3,722
ZnSO ₄ *7H ₂ O	1,75	0,437
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,5	0,125
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,1	0,025
MnCl ₂ *4H ₂ O	0,1	0,025
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,1	0,025

Um die Spurenelemente zu lösen wurde 8 % Salzsäure zugegeben. Die Stammlösung der Spurenelemente wurde anschließend sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Tabelle 4-4: Zusammensetzung der Stammlösung (250x) der Vitamine

Komponente	Konzentration im Medium, g L⁻¹	Konzentration in der Stammlösung, g L⁻¹
Nicotinsäure	0,001	2,5
Pyridoxin	0,025	6,25
Thiaminchlorid	0,001	2,5
Biotin	0,0025	0,625
Calcium- panthothenat	0,05	12,5

Der pH der Stammlösung der Vitamine wurde auf etwa 6,0 mit NaOH eingestellt, damit sich alle Bestandteile lösten. Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert.

Tabelle 4-5: Zusammensetzung des Phosphatpuffers (5x)

Komponente	Konzentration im Medium, g L⁻¹	Konzentration in der Stammlösung, g L⁻¹
KH ₂ PO ₄	33,11	165,55
K ₂ HPO ₄	27,30	136,50

Tabelle 4-6: Zusammensetzung der Glucoselösung (5x)

Komponente	Konzentration im Medium, g L⁻¹	Konzentration in der Stammlösung, g L⁻¹
C ₆ H ₁₂ O ₆	50	250

Tabelle 4-7: Zusammensetzung der essentiellen Medienzusätze

Komponente	Konzentration im Medium, g L⁻¹	Konzentration in der Stammlösung, g L⁻¹
Histidin	0,04	10

Histidin wurde in VE-Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Tabelle 4-8: Zusammensetzung der Antibiotika (500x)

Komponente	Konzentration im Medium, mg L⁻¹	Konzentration in der Stammlösung, mg L⁻¹
Geniticin	0,1	50

Geniticin wurde in VE-Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. Die Zugabe erfolgt direkt in den Schüttelkolben.

Mineralsalzmedium für *Escherichia coli*

Für das Mineralsalzmedium zur Kultivierung von *Escherichia coli* wurden zuerst die Salze (Tabelle 4-9) in VE-Wasser gelöst, auf ein Endvolumen von 876 mL und einen pH von 7,0 mit NaOH eingestellt und anschließend bei 121°C für 20 min autoklaviert. Anschließend wurden je 2 mL der sterilfiltrierten Stammlösungen der Spurenelemente (Tabelle 4-11) und Magnesiumsulfat (Tabelle 4-10) hinzu pipettiert. Als Kohlenstoffquelle diente zuvor autoklavierte Glucoselösung. Je nach Art der Kultivierung (Vorkultur, Schüttelkolbenversuch, Satzphase oder Zulaufphase im Bioreaktor) wurden unterschiedliche Glucosekonzentrationen im Medium eingestellt (siehe Tabelle 4-12).

Tabelle 4-9: Zusammensetzung Salzlösung

Komponente	Konzentration im Medium, g L⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
NH ₄ Cl	0,2
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1,5
KH ₂ PO ₄	3,25
K ₂ HPO ₄	1,5

Tabelle 4-10: Zusammensetzung Magnesiumsulfatlösung

Komponente	Konzentration im Medium, g L ⁻¹	Konzentration in der Stammlösung, g L ⁻¹
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,5	250

Die Magnesiumsulfatlösung wurde vor Zugabe zum Medium sterilfiltriert.

Tabelle 4-11: Zusammensetzung Stammlösung (500x) der Spurenelemente

Komponente	Konzentration im Medium, mg L ⁻¹	Konzentration in der Stammlösung, g L ⁻¹
CaCl ₂ *2H ₂ O	10	5,0
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,5	0,25
FeSO ₄ *7H ₂ O	1,83	9,15
CuCl ₂ *2H ₂ O	0,25	0,125
MnSO ₄ *H ₂ O	2,5	1,25
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,5	0,25
CoCl ₂ *6H ₂ O	1,75	0,875
H ₃ BO ₃	0,125	0,0625
AlCl ₃ *6H ₂ O	2,5	1,25

Um die Spurenelemente zu lösen wurde 8 % Salzsäure zugegeben. Die Stammlösung der Spurenelemente wurde anschließend sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Tabelle 4-12: Glucosekonzentration im jeweiligen Medium für die Kultivierung von *Escherichia coli*

Kultivierungsgefäß	Art der Kultivierung	Konzentration im Medium, g L ⁻¹
Schüttelkolben	Vorkultur	6
	Biokompatibilitätstest	30
42L-Bioreaktor (Techfors)	Satzphase	2
	1.Zulaufmedium	100
	2.Zulaufmedium	300

AR-Medium für *Corynebacterium glutamicum*

Für das AR-Medium zur Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* wurden ebenfalls zuerst Salze und Hefeextrakt (Tabelle 4-13) in VE-Wasser gelöst, auf ein Endvolumen von 916 mL und einen pH von 7,5 mit NaOH eingestellt und bei 121°C für 20 min autoklaviert. Anschließend wurden 4 mL einer sterilfiltrierten Stammlösung von Casaminosäuren (Tabelle 4-15) und 4 mL der Vitaminlösung (Tabelle 4-14) zum Medium gegeben. Als Substrat diente auch hier eine fünffach konzentrierte und ebenfalls zuvor autoklavierte Glucoselösung (Tabelle 4-16). Es wurden 80 mL zum Medium gegeben, sodass die Endkonzentration 20 g L⁻¹ betrug.

Tabelle 4-13: Zusammensetzung Salzlösung mit Hefeextrakt

Komponente	Konzentration im Medium, g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,0
Harnstoff	2,0
MnSO ₄ ·6H ₂ O	0,006
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,006
Hefeextrakt	1,0

Tabelle 4-14: Zusammensetzung der Stammlösung (250x) der Vitamine

Komponente	Konzentration im Medium, mg L ⁻¹	Konzentration in der Stammlösung, g L ⁻¹
Biotin	0,2	0,05
Thiaminchlorid	0,2	0,05

Der pH der Stammlösung der Vitamine wurde auf etwa 6,0 mit NaOH eingestellt, damit sich alle Bestandteile lösen. Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert.

Tabelle 4-15: Zusammensetzung Stammlösung Casaminosäuren

Komponente	Konzentration im Medium, g L ⁻¹	Konzentration in der Stammlösung, g L ⁻¹
Casaminosäuren	1,0	250

Die Casaminosäurelösung wurde vor Zugabe zum Medium sterilfiltriert.

Tabelle 4-16: Zusammensetzung der 5fach konzentrierten Glucoselösung (Kohlenstoffquelle)

Komponente	Konzentration im Medium, g L ⁻¹	Konzentration in der Stammlösung, g L ⁻¹
C ₆ H ₁₂ O ₆ *H ₂ O	20	250

4.1.3 Kultivierung im Schüttelkolben

Die Anzucht der Vorkulturen erfolgte in 1000 mL, 500 mL oder 250 mL Schüttelkolben ohne Schikanen mit einer Füllmenge von je 10 % des Kolbenvolumens. Die Inokulation erfolgte durch Zugabe von 1 mL der Glycerinkultur. Die Schüttelfrequenz des Schüttelinkubators betrug für alle Kultivierungen unabhängig vom Stamm 200 min⁻¹. Für *Saccharomyces cerevisiae* und *Corynebacterium glutamicum* wurde die Temperatur auf 30°C und für *Escherichia coli* auf 37°C eingestellt. Die Zellen wurden in etwa bis zu einer OD₆₆₀ von 3,0 inkubiert.

4.1.4 Durchführung der Biokompatibilitätsuntersuchungen

Für die Untersuchungen zur Biokompatibilität der eingesetzten Amine und Lösungsmittel wurde zuerst, wie in Punkt 4.1.3 beschrieben, eine Vorkultur angesetzt. Die Schüttelkolben für die Biokompatibilitätstests hatten ein Kolbenvolumen von 100 mL und wurden mit je 20 mL des jeweiligen Mediums befüllt. Vor der Inokulierung mit Vorkulturen der verschiedenen Stämme, wurden die Amine und Lösungsmittel bis zu ihrer Löslichkeitsgrenze + 10 % im Überschuss ins Medium pipettiert und der pH falls nötig nochmals im Medium steril korrigiert. Die Löslichkeiten der untersuchten Amine und Lösungsmittel sind in Tabelle 12-10 im Anhang aufgeführt. Die Inokulierung erfolgte mit je 1,0 mL der Vorkultur auf eine OD₆₆₀ von etwa 0,1. Die Schüttelfrequenz des Schüttelinkubators betrug auch hier für alle Kultivierungen unabhängig vom Stamm 200 min⁻¹. Für *Saccharomyces cerevisiae* und *Corynebacterium glutamicum* wurde die Temperatur auf 30°C und für *Escherichia coli* auf 37°C eingestellt. Es wurde über 10-12 Stunden im Abstand von je einer Stunde steril Proben entnommen und die OD₆₆₀ im Photometer gemessen. Die Wachstumsraten der drei untersuchten Mikroorganismen wurden anschließend bei Vorhandensein von Amin oder Lösungsmittel nach Gleichung 3-2 berechnet. Zum Vergleich wurden die Wachstumsraten der Stämme ohne Zugabe von Amin oder Lösungsmittel bestimmt.

4.1.5 Gewinnung von Fermentationsüberstand durch Fermentation im 42L-Bioreaktor

Um Fermentationsüberstand für die Extraktionsversuche im mL-Maßstab (Schwingmühle) und L-Maßstab (Zentrifugalextraktor) bereitzustellen, wurde eine Fermentation mit dem Stamm *Escherichia coli* K12 DSM 428 im 42L-Bioreaktor (Techfors, siehe Tabelle 12-4) durchgeführt. Hierfür wurden zunächst fünf Schüttelkolben mit einem Kolbenvolumen von 1000 mL, wie unter 4.1.3 beschrieben, über Nacht für eine Vorkultur kultiviert.

Zur Vorbereitung des Bioreaktors und seiner Peripherie wurde zunächst die pH-Elektrode mit zwei Pufferlösungen (pH 7 und pH 4) kalibriert und die Elektrolytlösung der Gelöst-Sauerstoff-(pO₂)-Sonde getauscht. Der Reaktor wurde mit allen Sonden und Anschlüssen versehen, mit Salzlösung (Tabelle 4-9) befüllt und für 20 min bei 121°C autoklaviert. Anschließend wurden die restlichen Medienbestandteile, wie Glucoselösung, Spurenelemente und Magnesiumsulfat, über Sterilfilter oder über sterile Verbindungen zugeführt und der pH auf 7,0 mit 25 % v/v Ammoniaklösung eingestellt. Das Startvolumen im Bioreaktor betrug 21,5 L. Die Substratkonzentration im Satzmedium lag anfangs bei 2,0 g L⁻¹. Nachdem die pO₂-Sonde für mindestens sechs Stunden polarisiert worden war, wurde bei einer Temperatur von 37°C und einer Rührerdrehzahl von 400 min⁻¹ mit der Kultivierung des *E. coli* Wildtyps begonnen. Hierfür wurden 500 mL der Vorkultur über sterile Verbindungen in den Reaktor überführt, was einer Start-OD₆₆₀ von etwa 0,1 entspricht. Der pH wurde während der gesamten Kultivierung mit 25 % v/v Ammoniaklösung auf 7,0 geregelt. Die Sauerstoffkonzentration wurde mittels Rührerdrehzahl und Begasungsrate über 40 % gehalten.

Nach Verbrauch des Satzsubstrats Glucose (Identifizierung durch Anstieg des Gelöst-Sauerstoffes) erfolgte der Beginn des geregelten exponentiellen Zulaufverfahrens (nach Jentsch *et al.* 2006), welches sich in drei Phasen gliederte (siehe Abbildung 4-1).

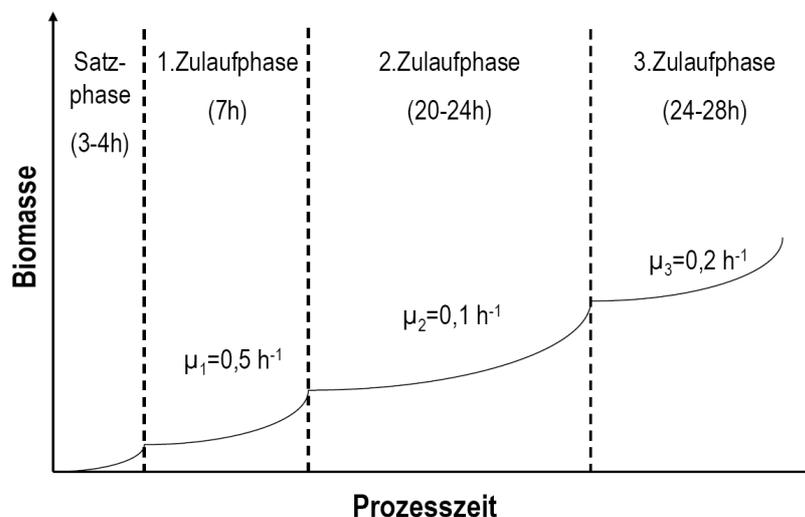


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Phasen der Kultivierung von *E. coli* im 42L-Bioreaktor

Stellgröße war während der drei Phasen die zugeführten Substratmenge, welche nach Gleichung 3-11 berechnet wurde. Somit konnten in den drei Phasen Wachstumsraten von $0,5 \text{ h}^{-1}$, $0,1 \text{ h}^{-1}$ und $0,2 \text{ h}^{-1}$ realisiert werden. Die Abgabe des Zulaufmediums erfolgt dabei konstant über eine sterile Verbindung mit einer zuvor ausgeliterten Pumpe. Die Wachstumsrate der Zellen betrug in der 1. Zulaufphase mit 100 g L^{-1} Glucose als Zulaufmedium $0,5 \text{ h}^{-1}$. Ab einer Biotrockenmasse von etwa 3 g L^{-1} ($\text{OD}_{660} 5$) wurde das 2. Zulaufmedium (300 g L^{-1} Glucose) eingesetzt. Die Dosierung erfolgte so, dass eine Wachstumsrate von $0,1 \text{ h}^{-1}$ erreicht wurde. Ab einer Biotrockenmasse von 11 g L^{-1} ($\text{OD}_{660} 18$) wurde die Dosierung des 2. Zulaufmediums erhöht, sodass die Wachstumsrate auf $0,2 \text{ h}^{-1}$ anstieg (3. Zulaufphase). Mit dieser Zulaufphase wurde bis zu einer OD_{660} von etwa 40 bzw. einer Biotrockenmasse von 23 g L^{-1} kultiviert. In Tabelle 4-17 sind alle Parameter der drei Zulaufphasen nochmals zusammengefasst.

Tabelle 4-17: Parameter der drei Zulaufphasen im 42L-Bioreaktor

Parameter	1.Zulaufphase	2.Zulaufphase	3.Zulaufphase
c_x^0	$0,07 \text{ g L}^{-1}$	$3,6 \text{ g L}^{-1}$	11 g L^{-1}
$Y_{X,S}$	$0,45 \text{ g g}^{-1}$	$0,45 \text{ g g}^{-1}$	$0,45 \text{ g g}^{-1}$
V_0	22 L	23,5 L	25,5 L
c_s^0	100 g L^{-1}	300 g L^{-1}	300 g L^{-1}
c_s	0 g L^{-1}	0 g L^{-1}	0 g L^{-1}
μ^{set}	$0,5 \text{ h}^{-1}$	$0,1 \text{ h}^{-1}$	$0,2 \text{ h}^{-1}$

Nach der Kultivierung erfolgte die Abtrennung der Zellen durch Zentrifugation in einer Standzentrifuge bei 4500 min^{-1} (3170 g) für 30 min. Der Überstand wurde in einem großen Plastikbehälter vereint, mit $1,0 \text{ mL L}^{-1}$ Kanamycinsulfat und $0,1 \text{ mL L}^{-1}$ Antimykotikum versetzt und bei 4°C gelagert, um ein sofortiges neues Bewachsen zu verhindern. Für die Extraktionsversuche wurde Bernsteinsäure jeweils zeitnah in gewünschter Konzentration in den Überstand eingewogen und gelöst. Hierbei kam es zu einer Fällung der Proteine. Die aggregierten Proteine wurden ebenfalls durch Zentrifugation bei 4500 min^{-1} (3170 g) für 30 min abgetrennt. Die Bernsteinsäurekonzentration im Überstand wurde nochmals mit einer HPLC-Messung (Flüssigkeitschromatographie) überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Anschließend wurde der pH mit NaOH oder HCl auf den gewünschten Wert eingestellt. Ebenfalls mit HPLC-Messungen wurden die anderen Bestandteile des Überstands gemessen. Diese waren $0,33 \text{ g L}^{-1}$ Bernsteinsäure (bei der Gesamtkonzentration berücksichtigt), $0,114 \text{ g L}^{-1}$ Essigsäure, $0,5 \text{ g L}^{-1}$ Formiat und $0,3 \text{ g L}^{-1}$ Pyruvat. Nicht detektiert werden konnten Glycerin, Glucose und Ethanol.

4.2 Analytische Methoden

Für die Messung der Bernsteinsäurekonzentration in Wasser wurde eine Flüssigkeitschromatographie (HPLC = High Performance Liquid Chromatography) verwendet. Die Detektion der Amine und Lösungsmittel in der organischen Phase erfolgte mittels Gaschromatographie (GC). Für die Bestimmung der Wachstumsraten wurden die optische Dichte (OD_{660}) und Biotrockenmasse der Stämme bestimmt.

4.2.1 Flüssigkeitschromatographische Analytik

Die Konzentrationsbestimmung von Bernsteinsäure und anderer organischer Säuren erfolgte in einer HPLC der Firma Agilent unter Verwendung der Trennsäule Aminex HPX-87H (siehe Tabelle 12-2 im Anhang). Die Quantifizierung in der wässrigen Phase erfolgte durch vorherige Kalibrierung mit Standards. Da nur die Messung von Bernsteinsäure in der wässrigen Phase möglich war, wurde die Menge an extrahierter Bernsteinsäure über die verbleibende Menge im Raffinat und die Ausgangsmenge in der wässrigen Phase wie folgt berechnet.

$$c_{org} = \frac{(c_{w,0} \cdot V_{w,0}) - (c_w \cdot V_w)}{V_{org}} \quad (4-1)$$

- c_{org} = Konzentration der Säure in der organischen Phase (Extrakt) nach der Extraktion, g L⁻¹
 $c_{w,0}$ = Konzentration der Säure in der wässrigen Phase vor der Extraktion, g L⁻¹
 $V_{w,0}$ = Volumen der wässrigen Phase vor der Extraktion, L
 c_w = Konzentration der Säure in der wässrigen Phase (Raffinat) nach der Extraktion, g L⁻¹
 V_w = Volumen der wässrigen Phase vor der Extraktion, L
 V_{org} = Volumen der organischen Phase nach der Extraktion, L
 V_w = Volumen der wässrigen Phase vor der Extraktion, L

Die eingestellten Parameter für die Messungen sind im Folgenden aufgelistet:

Trennsäule:	Aminex HPX-87H
Laufmittel:	5 mmol L ⁻¹ Schwefelsäure in VE-Wasser
Flussrate:	0,6 mL min ⁻¹
Ofentemperatur:	55°C
Temperatur RI-Detektor:	55°C
Retentionszeiten im RI:	Zitronensäure 7,2 min, α-Ketoglutarensäure 7,5 min, Maleinsäure 7,6 min, Bernsteinsäure 10,5 min, Milchsäure 11,4 min, Essigsäure 13,3 min

4.2.2 Gaschromatographische Analytik

Zur Konzentrationsbestimmung von Aminen und Lösungsmitteln in der organischen Phase wurde der Gaschromatograph CP-3800 mit der Trennsäule CP8940 eingesetzt (siehe Tabelle 12-3 im Anhang). Die Temperatur des Injektors und des Detektors wurde konstant auf 250°C gehalten. Die Quantifizierung erfolgte durch eine vorherige Kalibrierung mit Standards und einem weiteren internen Standard (1-Dodecanol für Reaktivextraktionssystem 29/6 und 1-Hexanol für Reaktivextraktionssystem T1). Die eingesetzte Methode für die Messung ist im Folgenden aufgelistet:

Trennsäule:	CP8940
Probeninjektion:	5 µL, Split 40
Säulenströmung:	7,4 mL min ⁻¹ Helium 5.0
Ofentemperatur:	50°C, Haltezeit 5 min, mit 5°C min ⁻¹ auf 200°C, Haltezeit 4 min
Retentionszeiten:	Trimethylamin 1,4 min, 1-Hexanol 12,2 min, 1-Octanol 19,4 min, Dihexylamin 26,2 min, 1-Dodecanol 29,6 min, Diisooctylamin 31,8 min, Trihexylamin 35,9 min

4.2.3 OD-Messung

Die optische Dichte (OD) der Zellsuspensionen wurde für alle in dieser Arbeit untersuchten Mikroorganismen mit einem Einstrahlphotometer in Küvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm bestimmt. In einem begrenzten Wellenlängenbereich korreliert dabei die gemessene Extinktion mit der Konzentration der Zellsuspension. Dieser Zusammenhang wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben.

$$E_{\lambda} = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (4-2)$$

E	= Extinktion
λ	= Wellenlänge des eingestrahnten Lichts, nm
I	= Intensität des austretenden Lichts, cd
I_0	= Intensität des eingestrahnten Lichts, cd
ε	= molarer Extinktionskoeffizient, L mol ⁻¹ cm ⁻¹
c	= Konzentration der Lösung
d	= Schichtdicke der Küvette

Die eingestellte Wellenlänge betrug für alle Stämme 660 nm. Um die Eigenabsorption der unterschiedlichen Medien bei der Messung zu berücksichtigen, wurde diese bestimmt und von der OD des jeweiligen Mikroorganismus subtrahiert. Für hohe Zelldichten war eine Verdünnung mit PBS-Puffer

(vom Englischen: phosphate buffered saline = Phosphatgepufferte Salzlösung) notwendig. Die Zusammensetzung des Puffers ist in Tabelle 4-18 aufgelistet.

Tabelle 4-18: Zusammensetzung des PBS-Puffers (1x), pH 7,4

Komponente	Konzentration im Puffer, g L ⁻¹
NaCl	8,0
KCl	0,20
Na ₂ HPO ₄	1,44
KH ₂ PO ₄	0,24

Die Umrechnung der gemessenen OD in Biotrockenmasse erfolgte über folgende Gleichung 4-3.

$$c_x = OD \cdot f_x \quad (4-3)$$

$$\begin{aligned}
 c_x &= \text{Konzentration der Biotrockenmasse, g L}^{-1} \\
 OD &= \text{Optische Dichte bei Wellenlänge 660 nm} \\
 f_x &= \text{Korrelationsfaktor, g L}^{-1}
 \end{aligned}$$

Die Korrelationsfaktoren f_x für die in dieser Arbeit untersuchten Mikroorganismen wurden bestimmt und sind für *Saccharomyces cerevisiae* 1,05 g L⁻¹, für *Escherichia coli* 0,59 L⁻¹ und für *Corynebacterium glutamicum* 0,39 g L⁻¹.

4.2.4 Biotrockenmasse

Die Biotrockenmasse wurde entweder mit Gleichung 4-3 berechnet oder direkt gravimetrisch bestimmt. Für die gravimetrische Bestimmung wurden zuvor bei 80°C getrocknete und gewogene 2,0 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Zellsuspension befüllt und bei 13.000 min⁻¹ für 10 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet bei 80°C bis zu einem konstanten Gewicht getrocknet und nochmals gewogen. Die Biotrockenmassekonzentration wurde anschließend über Gleichung 4-4 berechnet.

$$c_x = \frac{m_{\text{voll}} - m_{\text{leer}}}{V} \quad (4-4)$$

$$\begin{aligned}
 c_x &= \text{Konzentration der Biotrockenmasse, g L}^{-1} \\
 m_{\text{voll}} &= \text{Masse des Probengefäßes mit Zellen nach der Trocknung, g} \\
 m_{\text{leer}} &= \text{Masse des leeren Probengefäßes, g} \\
 V &= \text{Volumen der Zellsuspension vor der Sedimentation, L}
 \end{aligned}$$

4.3 Versuchsplanung mit stochastischer Suche (GAME.opt)

Auf Grund der hohen Variablenanzahl bei den Auswahlprüfverfahren nach komplexen und biokompatiblen Reaktivextraktionssystemen wurde die Versuchsplanung mit der Software GAME.opt durchgeführt. Die Software GAME.opt (Genetic Algorithm for Multi-objective Experimental optimization, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Technische Universität München) kann zur experimentellen Versuchsplanung bei Vorhandensein vieler Variablen, mehrerer Optima und mehrerer Zielgrößen eingesetzt werden (Link *et al.*, 2006). GAME.opt generiert dabei aus den skalaren Größen der gewählten Variablen (z.B. Art des Amins, Art des Lösungsmittels, Konzentrationen) binäre „Bitstrings“. Diese „Bitstrings“ codieren die genauen Zusammensetzungen der jeweiligen Reaktivextraktionssysteme und stellen die Individuen eines Parallelansatzes (Generation) dar. Diese Reaktivextraktionssysteme werden experimentell unter Standardbedingungen im Parallelansatz evaluiert und die Ergebnisse anschließend anhand der Zielfunktionen (z.B. Maximierung der Extraktionsausbeute und Minimierung der Aminkonzentration) bewertet. Die besten Reaktivextraktionssysteme werden von GAME.opt mit der höchsten Wahrscheinlichkeit selektiert, jeweils zwei selektierte Bitstrings werden zufällig gepaart und durch binäres „Crossover“ rekombiniert. Frühzeitige Konvergenz wird durch vereinzelte zufällige Punktmutationen der erzeugten neuen Bitstrings unterbunden. Damit ist ein neuer Satz von Versuchsvorschriften (Generation) erzeugt worden, die erneut experimentell validiert werden müssen. Dieser Prozess kann beliebig oft wiederholt werden, bis der experimentelle Aufwand zu hoch wird. Zur gleichzeitigen Verfolgung mehrerer Zielgrößen mit einem experimentellen Ansatz wird bei GAME.opt ein strenger Pareto-Ansatz verfolgt. Mit Hilfe eines speziellen Clusterverfahrens werden die Individuen mit den besten Ergebnissen jeder Generation ermittelt und in eine sogenannte externe Population kopiert, wenn diese bessere Ergebnisse liefern, als die besten der vorherigen Generation. Die Variablen, Zielgrößen und sonstigen Parameter für das Auswahlprüfverfahren nach komplexen und das Auswahlprüfverfahren nach biokompatiblen Reaktivextraktionssystemen für die Extraktion von Bernsteinsäure mittels dieser Software sind in Tabelle 4-19 und Tabelle 4-20 aufgelistet.

Tabelle 4-19: Parameter des 2. Auswahlprüfverfahrens nach komplexen Reaktivextraktionssystemen

Variablen	Art Amin 1 (16 mögliche Amine) Konzentration Amin 1 (0 - 500 mM) Art Amin 2 (16 mögliche Amine) Konzentration Amin 2 (0 - 500 mM) Lösungsmittel 1 (16 mögliche Lösungsmittel) Anteil Lösungsmittel 1 (0 - 100 %) Lösungsmittel 2 (16 mögliche Lösungsmittel) Anteil an Lösungsmittel 2 wird berechnet unter der Annahme das Lösungsmittel 1 und 2 zusammen 100 % ergeben
Mögliche Kombinationen:	3.317.760.000
Zielgrößen GAME.opt:	Maximierung der Extraktionsausbeute Minimierung der Aminkonzentration
Probenanzahl:	30 Individuen pro Generation (3 Parallelansätze pro Individuum)
Crossover Points:	2
Mutationsrate:	1
N extern:	15
N cluster:	15
Untersuchte Amine:	Octylamin, Dibutylamin, Dihexylamin, Dioctylamin, Diisooctylamin, Tripropylamin, Tributylamin, Tripentylamin, Trihexylamin, Trioctylamin, Triisooctylamin, Tridodecylamin, Methyldioctylamin, Dimethyldodecylamin, Methyldidecylamin, Diphenylamin
Untersuchte Lösungsmittel:	1-Octanol, 2-Octanol, 1-Hexanol, 1-Nonanol, 1-Decanol, 1-Dodecanol, Kerosin, Toluol, <i>n</i> -Pentan, <i>n</i> -Hexan, <i>n</i> -Heptan, <i>n</i> -Nonan, <i>n</i> -Decan, <i>n</i> -Dodecan, Methylisobutylketon (MIBK), Diisobutylketon (DIBK))
Extraktionsbedingungen:	0,847 mol L ⁻¹ Bernsteinsäure in Wasser, pH 4,0

Reaktivextraktionssysteme bei denen Aggregate auftraten, wurden mit dem Wert Null in die Software eingegeben.

Tabelle 4-20: Parameter des 3. Auswahlprüfverfahrens nach biokompatiblen Reaktivextraktionssystemen

Variablen	Art Amin 1 (16 mögliche Amine) Konzentration Amin 1 (0 - 500 mM) Art Amin 2 (16 mögliche Amine) Konzentration Amin 2 (0 - 500 mM) Lösungsmittel 1 (16 mögliche Lösungsmittel) Anteil Lösungsmittel 1 (0 - 100 %) Lösungsmittel 2 (16 mögliche Lösungsmittel) Anteil an Lösungsmittel 2 wird berechnet unter der Annahme das Lösungsmittel 1 und 2 zusammen 100 % ergeben
Mögliche Kombinationen:	16.777.216
Zielgrößen GAME.opt:	Maximierung der Extraktionsausbeute (mit E(%) als Funktion der Wachstumsrate) Minimierung der Aminkonzentration
Probenanzahl:	14 Individuen pro Generation
Crossover Points:	2
Mutationsrate:	1
N extern:	7
N cluster:	7
Untersuchte Amine:	Tripropylamin, Tributylamin, Triisooctylamin, Tridodecylamin
Untersuchte Lösungsmittel:	Kerosin, Toluol, <i>n</i> -Pentan, <i>n</i> -Hexan, <i>n</i> -Heptan, <i>n</i> -Octan, <i>n</i> -Decan, <i>n</i> -Dodecan
Extraktionsbedingungen:	0,423 mol L ⁻¹ Bernsteinsäure in Wasser, pH 2,3

Die Biokompatibilität wurde hier über einen Faktor mit in die Ergebnisse einbezogen. War keine Wachstumshemmung festzustellen, wurde der Extraktionswert mit dem Faktor 1 multipliziert. Bei reduzierten Wachstumsraten wurde mit entsprechend niedrigeren Faktoren von 0,1 - 0,9 multipliziert. War das Wachstum des Hefestamms durch das Reaktivextraktionssystem komplett gehemmt oder trat Aggregatbildung auf, wurde für die Extraktionssausbeute der Wert Null eingegeben.

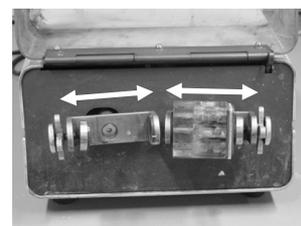
4.4 Reaktivextraktion und Rückextraktion im Millilitermaßstab

Die wässrigen Bernsteinsäurelösungen für die Reaktivextraktion wurden für die entsprechenden Extraktionen mit VE-Wasser angesetzt und mit NaOH und HCl auf den gewünschten pH eingestellt. Die 25 % Trimethylaminlösung wurden ebenfalls mit VE-Wasser auf die jeweils gewünschte Konzentration verdünnt.

Die Extraktionen mit den Reaktivextraktionssystemen und die Rückextraktion mit Trimethylamin erfolgten je nach Art der durchgeführten Versuche in verschiedenen Reaktionsgefäßen. Der Großteil der Extraktionen und Rückextraktionen erfolgte in 1,5 mL-Glasfläschchen in der Schwingmühle (Retsch). Lediglich die Versuche zum Einfluss der Schüttelfrequenz und zur Bestimmung der Kinetik fanden in 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäßen in der Schwingmühle statt. Der Einfluss der Temperatur auf die Extraktion wurde in 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäßen im Thermomixer (Eppendorf) untersucht. Mehrstufige Extraktionen und Rückextraktionen wurden in Glasgefäßen (Schott) mit einem Volumen von 100 - 500 mL und einem Füllvolumen von maximal 60 % durchgeführt. Auch die Verdampfung des Trimethylamins aus der organischen Phase erfolgte in 500 - 1000 mL Glasgefäßen (Schott). Im Folgenden sind die verschiedenen Versuche nochmals mit den dazugehörigen Reaktionsgefäßen, dem Extraktionsgerät und der jeweiligen Phasentrennung beschrieben.

Extraktionsversuche und Rückextraktionsversuche einstufig

Reaktionsgefäß:	1,5 mL-Glasfläschchen
Füllvolumen:	1,0 mL
Extraktionsgerät:	Schwingmühle (Retsch)
Durchführung:	30 Hz, 10 min
Phasentrennung:	Standzentrifuge 4.500 min ⁻¹ (3170 g), 10 min



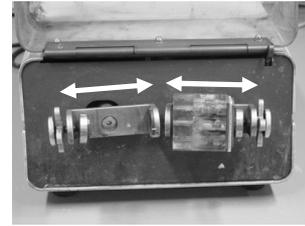
Versuche zum Einfluss der Temperatur

Reaktionsgefäß:	1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäße
Füllvolumen:	1,0 mL
Extraktionsgerät:	Thermomixer (Eppendorf)
Durchführung:	1400 min ⁻¹ , 1 h
Phasentrennung:	Tischzentrifuge 13.000 min ⁻¹ , 1 min



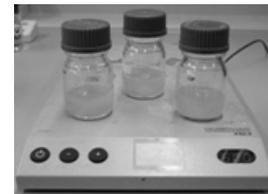
Versuche zur Kinetik/Schüttelfrequenz

Reaktionsgefäß:	1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäße
Füllvolumen:	1,0 mL
Extraktionsgerät:	Schwingmühle (Retsch)
Durchführung:	3 - 30 Hz, 10 - 60 s
Phasentrennung:	Tischzentrifuge 13.000 min ⁻¹ , 1 min



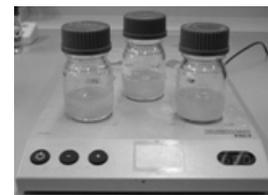
Extraktions- und Rückextraktionsversuche mehrstufig

Reaktionsgefäß:	100 - 500 mL-Glasgefäße
Füllvolumen:	maximal 60 % des Gesamtvolumens
Extraktionsgerät:	Mehrfachrührplatte (H+P Labortechnik)
Durchführung:	600 - 800 min ⁻¹ , 1,5 h
Phasentrennung:	Standzentrifuge 4.500 min ⁻¹ (3170 g), 10 min



Verdampfung des Trimethylamins aus der organisch

Reaktionsgefäß:	500 - 1000 mL-Glasgefäße
Füllvolumen:	maximal 80 % des Gesamtvolumens
Extraktionsgerät:	Mehrfachrührplatte (H+P Labortechnik)
Durchführung:	600 - 800 min ⁻¹ , 4 h - 2 d



In nahezu allen Versuchen wurde ein Phasenverhältnis der wässrigen zur organischen Phase von 1:1 gewählt. Wurden andere Phasenverhältnisse in einem Versuch gewählt ist dies direkt im Ergebnisteil vermerkt. Die Änderungen der Phasenvolumina während der Extraktion oder Rückextraktion wurden stets für die Berechnung der Extraktionsausbeuten nach Gleichung 3-17 berücksichtigt.

4.5 Reaktivextraktion und Rückextraktion im Zentrifugalextraktor

Der Zusammenbau des CINC-Zentrifugalextraktors wurde wie folgt durchgeführt. Auf den Rotor wurden die passende Wehrscheibe (Lochscheibe) und die Rotorabdeckplatte gelegt. Anschließend wurde die Motorkupplung über eine Zentralschraube und eine Madenschraube angebracht. Das gesamte Konstrukt konnte dann in das Gehäuse gesetzt und über Schrauben befestigt werden. Nach Anbringen der Rotorwelle konnte der Motor auf das Gehäuse aufgesetzt und verschraubt werden. Der gesamte Aufbau des Zentrifugalextraktor mit Peripherie ist in Abbildung 4-2 nochmals dargestellt.

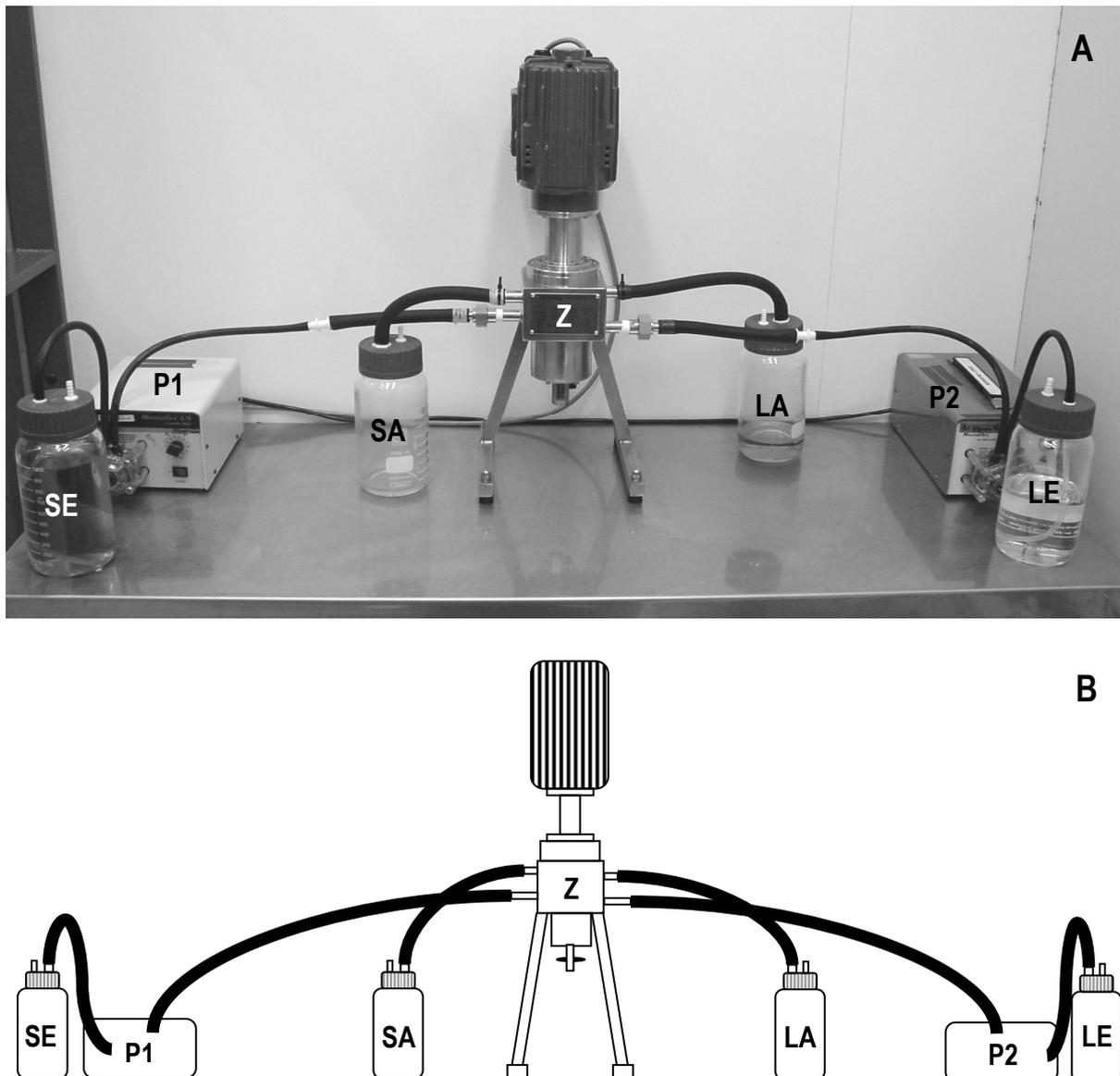


Abbildung 4-2: Aufbau im Labor (A) und schematischer Versuchsaufbau (B) des Zentrifugalextraktors CS50 (Z) mit Peripherie. P1 und P2 sind peristaltische Pumpen zur Förderung der schweren SE und leichten Phase LE in den Zentrifugalextraktor. Über zwei Auslässe können die schwere Phase SA und die leichte Phase LA nach der Extraktion bzw. Rückextraktion den Extraktor verlassen und in Glasgefäßen gesammelt werden.

Die Beförderung der wässrigen schweren Phase SE (Bernsteinsäurelösung oder Trimethylaminlösung) und der organischen leichten Phase LE (Reaktivextraktionssystem unbeladen und beladen mit Bernsteinsäure) erfolgte über peristaltische Pumpen (P1 und P2) mit Norprene-Pumpenschläuchen, die vor jedem Versuch neu ausgelitert wurden. Die Gesamtfördermengen liegen zwischen 0,1 - 2,0 L min⁻¹ für das hier eingesetzten Zentrifugalextraktormodell CS50 (Z). Dies entspricht einer Verweilzeit der Flüssigkeiten im Zentrifugalextraktor von 19 s bis zu 13,3 min bezogen auf das maximale Flüssigkeitsvolumen von 150 - 160 mL. Der Ablauf der leichten und schweren Phase erfolgte frei und unter Gasaustausch ebenfalls über Norprene-Schläuche. Als Vorlage- und Sammelgefäße für die verschiedenen Phasen dienten 1,0 L-Glasflaschen mit speziellen Öffnungen im Deckel zum Ein- und Auslass der Flüssigkeiten und zum Gasaustausch. Genauere Angaben zum eingesetzten Modell sowie zu größeren Modellen im Industriemaßstab und den Versuchsmaterialien sind im Anhang in Tabelle 12-5 und Tabelle 12-18 zu finden.

Um, wie vom Hersteller beschrieben, eine anfängliche Verunreinigung der wässrigen Phase mit organischer Phase zu vermeiden, wurde die Zentrifuge vor jedem Versuch mit etwa 200 mL der schweren wässrigen Phase befüllt. Erst dann wurde der Motor gestartet und beide Phasen zugeführt. Das Phasenverhältnis innerhalb des hier eingesetzten Zentrifugalextraktor liegt laut Hersteller bei 2:1 bis 3:1 von schwerer (wässriger) zu leichter (organischer) Phase bei gleichem Volumenstrom der Phasen.

Die Probenahme erfolgte stets aus der Raffinat- und der Extraktphase. Der Zeitpunkt der Beprobung wurde dabei so gewählt, dass zuvor unter den zu untersuchenden Bedingungen ein kompletter Austausch des gesamten Flüssigkeitsvolumens (150-160 mL) stattfand.

4.6 Verdampfungskristallisation

Für die Verdampfung des Wassers und die thermische Spaltung des Trimethylammoniumsalzes der Bernsteinsäure wurde ein Rotationsverdampfer (Heidolph) eingesetzt (siehe Abbildung 4-3). Es wurden 40 - 200 mL der wässrigen mit Bernsteinsäure beladenen Trimethylaminlösung in einem Rundkolben auf 130°C für 1 - 2 h bis zur Volumenkonstanz im Heizbad erhitzt. In einem weiteren Schritt wurde die Temperatur auf 160°C erhöht und gleichzeitig der Druck auf 4 mbar reduziert. Diese Bedingungen wurden bis zur Kristallisation der Bernsteinsäure beibehalten. In der Regel waren hierfür 2 h nötig. Nach Ende der Kristallisation wurde der Druck wieder der Umgebung angepasst und der Kolben aus dem Heizbad entfernt. Die abgekühlte kristalline Bernsteinsäure wurde anschließend möglichst vollständig aus dem Kolben gewonnen und so der Verlust bestimmt. Ein geringer Teil der kristallinen Bernsteinsäure wurde definiert in VE-Wasser und 1-Hexanol (im Fall von Reaktivextraktionssystem T1) oder 1-Dodecanol (im Fall von Reaktivextraktionssystem 29/6) eingewogen und die Massenanteile der Säure sowie der Verunreinigungen in der HPLC und GC bestimmt.



Abbildung 4-3: Aufbau des Rotationsverdampfers zur Kristallisation von Bernsteinsäure.
1: Heizbad 2: Vorlagegefäß 3: Kühler 4: Auffangkolben für Kondensat 5: Vakuumpumpe

5 Reaktivextraktion von Bernsteinsäure

Das folgende Kapitel widmet sich dem ersten Aufarbeitungsschritt, der Reaktivextraktion von Bernsteinsäure (siehe Abbildung 5-1).

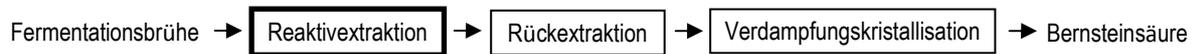


Abbildung 5-1: Prozessschema integrierte Reaktivextraktion von Bernsteinsäure - 1. Reaktivextraktion

Hierfür wurden die optimalen Extraktionsbedingungen in Vorversuchen mit Literatursystemen bestimmt und neue geeignete Reaktivextraktionssysteme identifiziert. In einem weiteren Schritt erfolgte die Optimierung und Charakterisierung der effizientesten Reaktivextraktionssysteme im Milliliter- und Liter-Maßstab.

5.1 Vorversuche zu den Extraktionsbedingungen

Vor der Suche nach neuen Reaktivextraktionssystemen wurden Versuche mit bereits in der Literatur beschriebenen Reaktivextraktionssystemen durchgeführt (Hong und Hong 2000a-c; Hong *et al.* 2002; Hong und Hong 2004; Tamada *et al.* 1990a, Tamada und King 1990b+c; Song *et al.* 2007). Ziel war es die Literaturdaten zu reproduzieren und die wichtigsten Einflussfaktoren auf die Reaktivextraktion zu charakterisieren. Hierfür wurden die im Folgenden aufgelisteten Faktoren berücksichtigt:

- Extraktionsausbeute mit reinem Lösungsmittel (ohne Amin)
- Schüttelfrequenz und Extraktionszeit in der Schwingmühle
- Einfluss der Temperatur
- Einfluss des pH
- Benötigte Aminkonzentration
- Einfluss des Phasenverhältnisses

Reines Lösungsmittel

Vor der Untersuchung der Literatursysteme (Amin + Lösungsmittel) in der Schwingmühle wurde zunächst die Extraktionsausbeute von Bernsteinsäure mit reinen Lösungsmitteln bestimmt. Hierfür wurden Bernsteinsäurelösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen und unterschiedlichem pH im Phasenverhältnis 1:1 mit dem jeweiligen Lösungsmittel für 10 min bei 30 Hz in der Schwingmühle extrahiert. Die Extraktionsausbeuten sind in Abbildung 5-2 dargestellt.

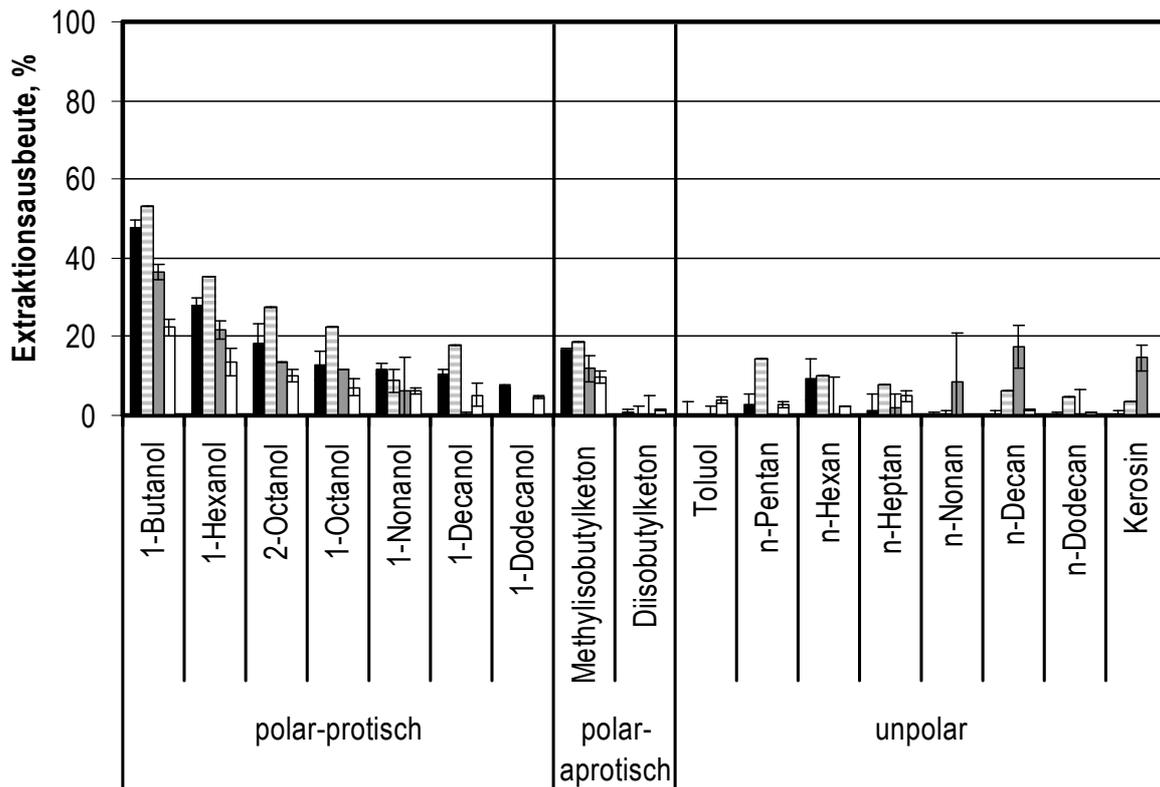


Abbildung 5-2: Extraktionsausbeuten reiner Lösungsmittel (ohne Aminzusatz) in der Schwingmühle. Die Extraktion erfolgte in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min. Extrahiert wurden 0,423 molare Bernsteinsäure mit pH 2,0 ■, 0,5 molare Bernsteinsäure mit pH 2,3 ▤, 0,847 molare Bernsteinsäure mit pH 4,0 ■ und 0,423 molare Bernsteinsäure mit pH 4,0 □.

Unabhängig vom pH oder der Konzentration der eingesetzten Bernsteinsäurelösung zeigen polar-protische Lösungsmittel, wie Alkohole, im Vergleich zu allen anderen untersuchten Lösungsmitteln die höchsten Extraktionsausbeuten für Bernsteinsäure. Grund hierfür ist die Fähigkeit von Alkoholen Wasserstoffbrückenbindungen mit den Säuremolekülen auszubilden. Innerhalb der Alkohole nimmt die Extraktionsausbeute mit steigender Kettenlänge ab. Während mit 1-Butanol Ausbeuten von bis zu 53 % möglich sind, sinken diese mit 1-Dodecanol deutlich unter 10 %. Grund hierfür ist die mit zunehmender Kettenlänge sinkende Polarität der Alkohole.

Für das polar-aprotische Lösungsmittel Methylisobutylketon (MIBK) liegen die Extraktionsausbeuten für Bernsteinsäure je nach Konzentration und pH der eingesetzten Bernsteinsäurelösung bei 10 - 18 %. Diisobutylketon (DIBK) ist ebenfalls polar-aprotisch, zeigt jedoch nur sehr geringe Ausbeuten, die Nahe Null liegen.

Unpolare Lösungsmittel, wie Alkane oder Toluol, erzielen unabhängig von ihrer Kettenlänge, der Konzentration der Bernsteinsäurelösung oder des pH nur sehr geringe Ausbeuten. Sie können Bernsteinsäure nur sehr schlecht solvatisieren, weshalb nur wenige Säuremoleküle in die organische Phase übergehen.

Betrachtet man die Konzentration und den pH der jeweiligen Bernsteinsäurelösung, so ist zu erkennen, dass niedrigere pH zu höheren Extraktionsausbeuten führen, genauso wie hohe Bernsteinsäurekonzentrationen.

Insgesamt ist eine Korrelation der Extraktionsausbeute mit der Polarität und der Solvatisierungsfähigkeit der Lösungsmittel feststellbar. Polare Lösungsmittel, wie Alkohole und Ketone, können die Bernsteinsäuremoleküle besser solvatisieren als unpolare Lösungsmittel, wie Alkane (vgl. Kapitel 3.5.3). Für eine Extraktion von Bernsteinsäure liegen die maximalen Ausbeuten in reinem Lösungsmittel dennoch mit maximal 53 % zu niedrig für einen Aufarbeitungsprozess. Der Einsatz von Aminen als Reaktivkomponenten in der organischen Phase ist deshalb notwendig.

Schüttelfrequenz und Extraktionszeit in der Schwingmühle

Nach der Bestimmung der Extraktionsausbeuten mit reinem Lösungsmittel wurde die Reaktivextraktion anhand der beschriebenen Literatursysteme (Hong und Hong 2000b; Hong *et al.* 2002) bestehend aus Tripropylamin (TPA), Tributylamin (TBA), Tripentylamin (TPeA) oder Trioctylamin (TOA) mit einer Konzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ 1-Octanol untersucht. Diese Reaktivextraktionssysteme wurden für die Extraktion von wässriger Bernsteinsäurelösung mit einer Konzentration von $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ und einem pH von 2,3 eingesetzt. Die Extraktion erfolgte für 10 s und unterschiedlichen Frequenzen in der Schwingmühle.

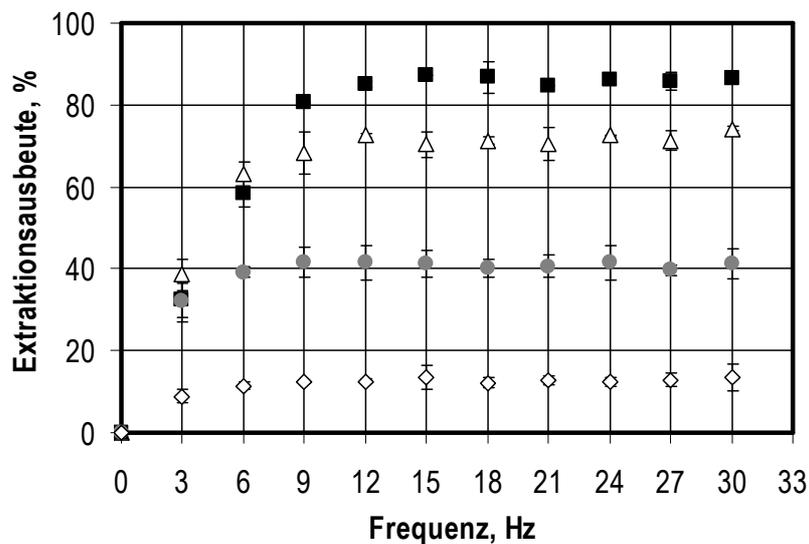


Abbildung 5-3: Abhängigkeit der Extraktionsausbeuten von der Schüttelfrequenz der Schwingmühle. Extraktion mit den Literatursysteme Tripropylamin ◇, Tributylamin ●, Tripentylamin △ und Trioctylamin ■ mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ 1-Octanol für bei einer Extraktionszeit von 10 s. Die Bernsteinsäurekonzentration in der wässrigen Phase betrug $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ bei einem pH von 2,3.

Wie in Abbildung 5-3 dargestellt, ist eine Zunahme der Extraktionsausbeuten unabhängig vom eingesetzten Literatursystem mit steigender Schüttelfrequenz in der Schwingmühle beobachtbar. Dies ist durch die mit steigender Frequenz zunehmend feinere Dispergierung der Phasen und der damit verbundenen größeren Phasengrenzfläche zu erklären, die einen besseren Stoffübergang ermöglicht. Ab etwa 12 Hz ist für alle untersuchten Reaktivextraktionssysteme ein Maximum erreicht, das auch durch höhere Schüttelfrequenzen nicht gesteigert werden kann. Hier ist bereits das thermodynamische Gleichgewicht der Komplexbildung von Amin und Säure erreicht. Obwohl Amin im Überschuss vorhanden ist, können keine vollständigen Ausbeuten erzielt werden. Die Maxima liegen für das Reaktivextraktionssystem mit Tripropylamin bei 12,8 %, für Tributylamin bei 40,9 %, für Tripentylamin bei 71,8 % und für Trioctylamin bei 86,0 % im einstufigen Verfahren. Ebenfalls beobachtbar ist die

Zunahme der Extraktionsausbeute mit zunehmender Kettenlänge der Amine und damit zunehmender Basizität, wie bereits in der Literatur beschrieben (Hong und Hong 2000a).

Zusätzlich zu den verschiedenen Schüttelfrequenzen in der Schwingmühle wurden unterschiedlich lange Extraktionszeiten bei der maximalen Frequenz von 30 Hz untersucht.

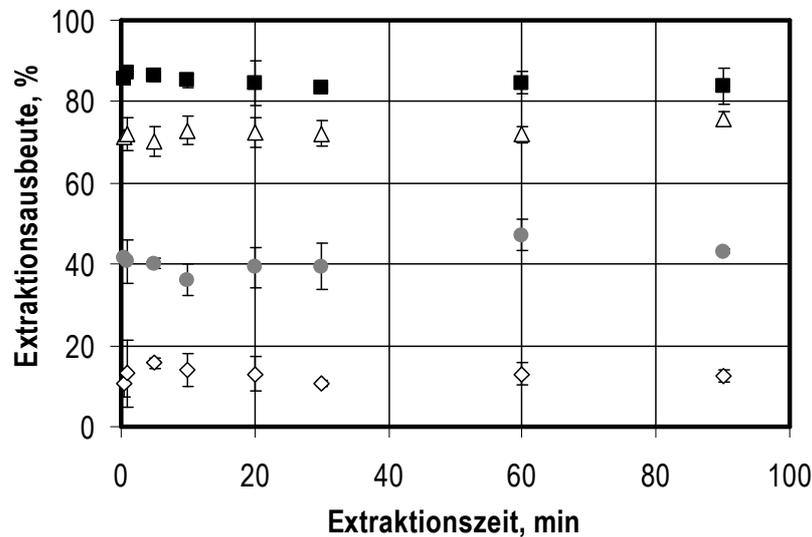


Abbildung 5-4: Einfluss der Extraktionszeit bei der Extraktion mit Tripropylamin ◇, Tributylamin ●, Tripropylamin △ und Trioctylamin ■ mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ 1-Octanol. Die Extraktion erfolgte in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz und unterschiedlichen Extraktionszeiten. Die Bernsteinsäurekonzentration in der wässrigen Phase betrug $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ bei einem pH von 2,3.

Auch bei längeren Extraktionszeiten von 30 s bis 90 min lassen sich keine höheren Extraktionsausbeuten mehr erzielen, was in Abbildung 5-4 dargestellt ist. Wie bereits im ersten Vorversuch sind auch hier bereits bis 30 s die maximalen Ausbeuten erreicht und das System befindet sich im Gleichgewicht. Um sicherzustellen, dass dennoch für alle Extraktionen unabhängig vom eingesetzten Reaktivextraktionssystem das Gleichgewicht erreicht werden kann, wurde für alle weiteren Versuche eine Extraktionsdauer von 10 min bei 30 Hz gewählt.

Temperatur

Eine weitere Einflussgröße auf die maximalen Extraktionsausbeuten ist die bei der Extraktion vorliegende Temperatur. Da die Extraktionen in der Schwingmühle nicht temperiert werden können und sich die Temperatur während der Extraktion in der Schwingmühle erhöht, wurde der Einfluss der Temperatur auf die Reaktivextraktion mit den Literatursystemen Tripropylamin, Tributylamin, Tripentylamin und Trioctylamin mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ 1-Octanol untersucht. Die Reaktivextraktionssysteme wurden hierfür im Verhältnis 1:1 in einem Thermomixer bei $15 - 40^\circ\text{C}$ für 1 h bei 1400 min^{-1} für die Extraktion von wässriger Bernsteinsäurelösung mit einem pH von 2,3 und einer Konzentration von $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ eingesetzt.

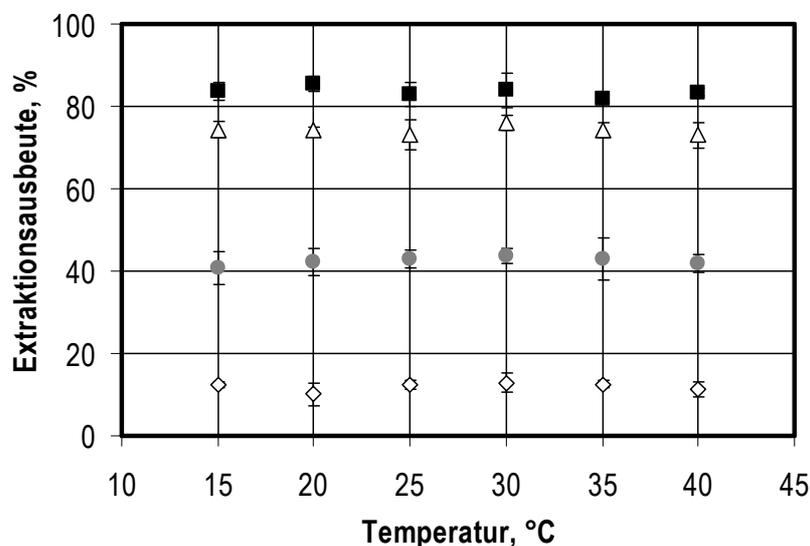


Abbildung 5-5: Einfluss der Temperatur bei der Extraktion mit Tripropylamin ◇, Tributylamin ●, Tripentylamin △ und Trioctylamin ■ mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ 1-Octanol. Die Extraktion erfolgte im Thermomixer in 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 1400 min^{-1} für 1 h bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Bernsteinsäurekonzentration in der wässrigen Phase betrug $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ bei einem pH von 2,3.

Wie in Abbildung 5-5 dargestellt, ist im Bereich von $15 - 40^\circ\text{C}$ kein Einfluss der Temperatur auf die Extraktion von Bernsteinsäure mit den Literatursystemen erkennbar. Es kann für alle vier eingesetzten Amine in 1-Octanol bei allen untersuchten Temperaturen das Extraktionsmaximum erreicht werden. Alle weiteren Versuche fanden deshalb untemperiert bei $25 - 28^\circ\text{C}$ Umgebungstemperatur statt. Dies entspricht zu Anfang der Extraktion in etwa der in der Literatur eingestellten Temperatur von 25°C (Hong und Hong 2000a-c; Hong *et al.* 2002, Hong und Hong 2004, Tamada *et al.* 1990a; Tamada und King 1990b+c, Song *et al.* 2007).

pH

Neben den Einflussgrößen Extraktionszeit und Temperatur wurde in einem weiteren Experiment der Einfluss des pH (zum Zeitpunkt $t=0$) in der wässrigen Bernsteinsäurelösung auf die Extraktionsausbeute untersucht. Hierfür wurden 0,5 molare Bernsteinsäurelösungen mit einem pH von 2 bis 9 mit den Literatursystemen Tripropylamin, Tributylamin, Tripentylamin und Trioctylamin mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ 1-Octanol und einem Phasenverhältnis von 1:1 in der Schwingmühle extrahiert. Nach der Reaktivextraktion war der pH der wässrigen Phase abhängig von der Extraktionsausbeute um 0 - 2 höher als bei Beginn (hier nicht abgebildet). Grund hierfür sind die protonierten Bernsteinsäuremoleküle, die während der Extraktion in die organische Phase übergehen.

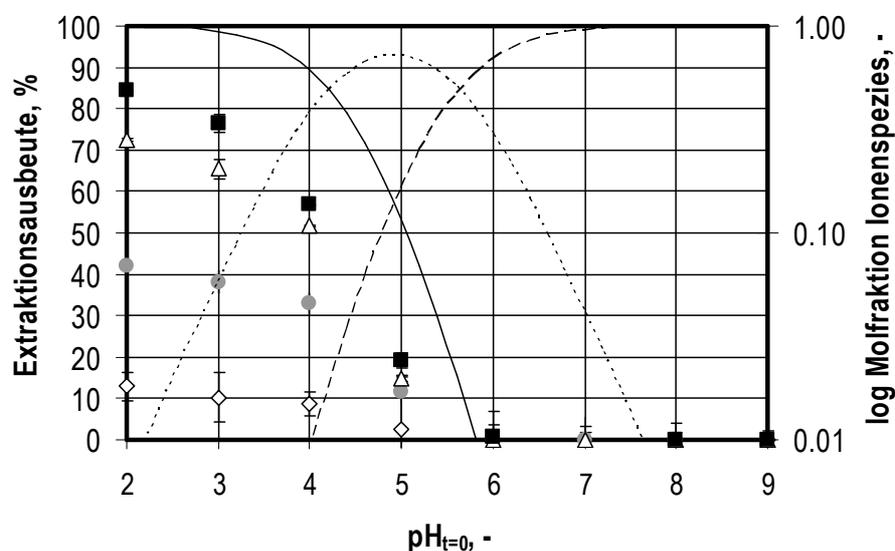


Abbildung 5-6: Einfluss des pH (zum Zeitpunkt $t=0$) der wässrigen Bernsteinsäurelösung bei der Extraktion mit Tripropylamin \diamond , Tributylamin \bullet , Tripentylamin \triangle und Trioctylamin \blacksquare mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ 1-Octanol. Die Extraktion erfolgte in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min und unterschiedlichem pH der 0,5 molaren Bernsteinsäurelösung. Im Hintergrund angedeutet sind die Molfraktionen der verschiedenen Ionenspezies von Bernsteinsäure: undissoziierte Säure —, einfach dissoziierte Säure , zweifach dissoziierte Säure --- .

Wie in Abbildung 5-6 deutlich zu sehen, zeigt der AusgangspH der wässrigen Bernsteinsäurelösung den erwarteten Einfluss auf die Extraktionsausbeute. Je niedriger der pH, desto höher sind die erzielbaren Ausbeuten mit den Literatursystemen. Ab einem pH von 6,0 ist nahezu keine Extraktion mehr möglich. Grund hierfür ist, dass nur die undissoziierte Form der Bernsteinsäure mit primärem, sekundären und, wie in diesem Versuch, tertiären Aminen extrahiert werden kann und diese nur bei einem pH unter 6,0 vorliegt. Lediglich bei einem pH von 2,0 lassen sich die maximalen Ausbeuten bei der einstufigen Extraktion von etwa 13 % für Tripropylamin, 41 % für Tributylamin, 72 % für

Tripentylamin und 86 % für Trioctylamin erzielen. Bei pH 3,0 ist die Ausbeute bereits um 10 - 12 % reduziert, bei pH 4,0 um 22 - 33 % und bei pH 5,0 um 72 - 80 %. Um hohe Ausbeuten im einstufigen Verfahren zu erzielen ist dementsprechend ein niedriger pH ($\ll pK_{S1}$) nötig.

Aminkonzentration

Ebenfalls untersucht wurde der Einfluss der Konzentration der eingesetzten Amine. Die Konzentrationen wurden hierfür zwischen 0,1 und 3,0 mol kg⁻¹ 1-Octanol variiert und für die Extraktion von 0,5 molarer Bernsteinsäure mit einem pH von 2,3 eingesetzt. Das Phasenverhältnis wurde, wie auch in den Versuchen zuvor, 1:1 gewählt. In Abbildung 5-7 dargestellt sind die dabei erzielten Extraktionsausbeuten mit den verschiedenen Aminkonzentrationen bezogen auf die in der wässrigen Phase vorhandene Menge an Bernsteinsäure.

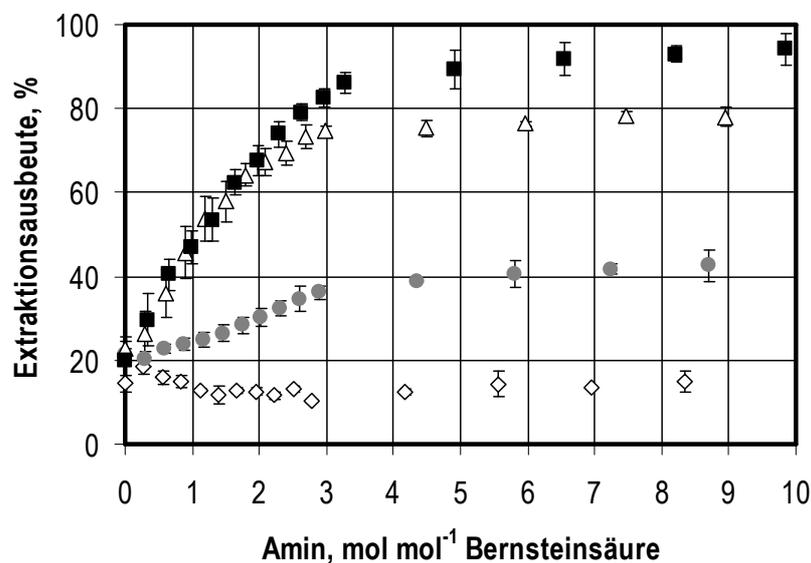


Abbildung 5-7: Einfluss der Aminkonzentration bei der Extraktion von 0,5 molarer wässriger Bernsteinsäurelösung (pH 2,3) mit Tripropylamin ◇, Tributylamin ●, Tripentylamin △ und Trioctylamin ■. Die Extraktion erfolgte in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen für 10 min bei 30 Hz. Die Bernsteinsäurekonzentration in der wässrigen Phase betrug 0,5 mol L⁻¹ bei einem pH von 2,3 und die Aminkonzentrationen zwischen 0 - 3,0 mol kg⁻¹ 1-Octanol.

Für die Literatursysteme mit Tributylamin, Tripentylamin und Trioctylamin ist eine Steigerung der Extraktionsausbeute mit zunehmender Aminkonzentration bis etwa 3,0 mol pro mol Bernsteinsäure zu beobachten. Der Anstieg ist jedoch lediglich bei Tributylamin linear. Bei Trioctylamin und Tripentylamin zeigt sich eine Sättigungskurve und bei Tripropylamin sind die Ausbeuten konstant. Ab Aminkonzentrationen von mehr als 3,0 mol mol⁻¹ Bernsteinsäure flacht die Steigung bei allen Reaktivextraktionssystemen stark ab. Für das Reaktivextraktionssystem mit Trioctylamin ist hier eine

Steigerung der Extraktionsausbeute von nur noch 8 % bei einer Erhöhung der Aminkonzentration von 3,0 auf 9,8 mol mol⁻¹ Bernsteinsäure möglich. Für die kurzkettigeren Amine Tripentylamin und Tributylamin liegt die Steigerung zwischen 3,3 % und 6,5 % bei einer Erhöhung der Aminkonzentration von 3,0 auf 8,7 bzw. 9,0 mol mol⁻¹ vorhandener Bernsteinsäure. Für das Literatursystem mit Tripropylamin ist keine signifikante Änderung der Extraktionsausbeute mit steigender Aminkonzentration zu sehen. Die maximale Ausbeute schwankt hier um den Wert von etwa 15 %, was der Extraktionsausbeute von reinem 1-Octanol entspricht. Dementsprechend zeigt Tripropylamin keinen positiven Einfluss als Reaktivkomponente bei der Extraktion von Bernsteinsäure. Obwohl bei allen Extraktionen das Reaktionsgleichgewicht erreicht wird und Amin bei den hohen Konzentrationen deutlich im Überschuss vorliegt, lassen sich auch hier keine vollständigen Ausbeuten erzielen. Ebenfalls zu sehen ist, dass eine äquimolare Aminkonzentration von 1,0 mol pro mol Bernsteinsäure nicht ausreichend für eine effiziente Bernsteinsäureextraktion ist. Eine deutliche Steigerung ist bis etwa 3,0 mol Amin pro mol Bernsteinsäure zu sehen. Die maximalen Ausbeuten liegen bei einer Aminkonzentration von 8,3 - 9,8 mol mol⁻¹ Bernsteinsäure für das Reaktivextraktionssystem mit Tripropylamin bei 15,0 %, für das Reaktivextraktionssystem mit Tributylamin bei 42,6 %, für das Reaktivextraktionssystem mit Tripentylamin bei 78,0 % und für das Reaktivextraktionssystem mit Trioctylamin bei 94,2 %. Da durch eine Erhöhung der Aminkonzentration über 3,0 mol mol⁻¹ Bernsteinsäure (entspricht 1,0 mol kg⁻¹ Lösungsmittel) jedoch kaum höhere Ausbeuten erzielt werden können und die Kosten für Amine hoch sind, ist eine Erhöhung der Aminkonzentration über dieses Verhältnis unwirtschaftlich. Des Weiteren ist bereits in der Literatur beschrieben, dass höhere Aminkonzentrationen auf Grund der hohen Viskosität und der schlechten Solvatisierungsfähigkeit von Aminen nicht sinnvoll ist (Bart 2001). Um im Labormaßstab im einstufigen Ansatz dennoch möglichst hohe Ausbeuten zu erzielen, wurden im Folgenden häufig Aminkonzentrationen von bis zu 1,5 mol kg⁻¹ Lösungsmittel eingesetzt.

Phasenverhältnis

In einem letzten Vorversuch wurde der Einfluss verschiedener Phasenverhältnisse von wässriger zu organischer Phase auf die Reaktivextraktion von Bernsteinsäure untersucht. Die hierfür eingesetzten Volumina und Konzentrationen sind Tabelle 5-1 zu entnehmen.

Tabelle 5-1: Volumina und Konzentrationen bei der Untersuchung des Phasenverhältnisses

Phasenverhältnis wässrige zu organische Phase	Volumen wässrige Phase, μL	Volumen organische Phase, μL	Konzentration Amin, mol kg^{-1}	Konzentration Bernsteinsäure, mol L^{-1}
1:0,2	500	100	5,00	0,423
1:0,4	500	200	2,50	0,423
1:0,6	500	300	1,67	0,423
1:0,8	500	400	1,25	0,423
1:1,0	500	500	1,00	0,423
1:1,5	500	750	0,67	0,423

Es wurden je 500 μL einer 0,423 molaren Bernsteinsäurelösung mit einem pH von 2,0 mit 100 - 750 μL des jeweiligen Reaktivextraktionssystems extrahiert. Die Phasenverhältnisse variierten somit zwischen 1:0,2 bis 1:1,5 von wässriger zu organischer Phase. Die Aminkonzentration in den organischen Phasen wurde hier so gewählt, dass im Fall von Tripentylamin konstant 1,58 mol pro mol Bernsteinsäure und im Fall von Trioctylamin konstant 1,44 mol pro mol Bernsteinsäure vorhanden waren. Um dies zu erreichen wurde die Aminkonzentration von 0,67 - 5,0 mol kg^{-1} Lösungsmittel variiert.

Untersucht werden konnte somit der Einfluss des Volumens der Extraktphase unabhängig von der vorliegenden Aminkonzentration.

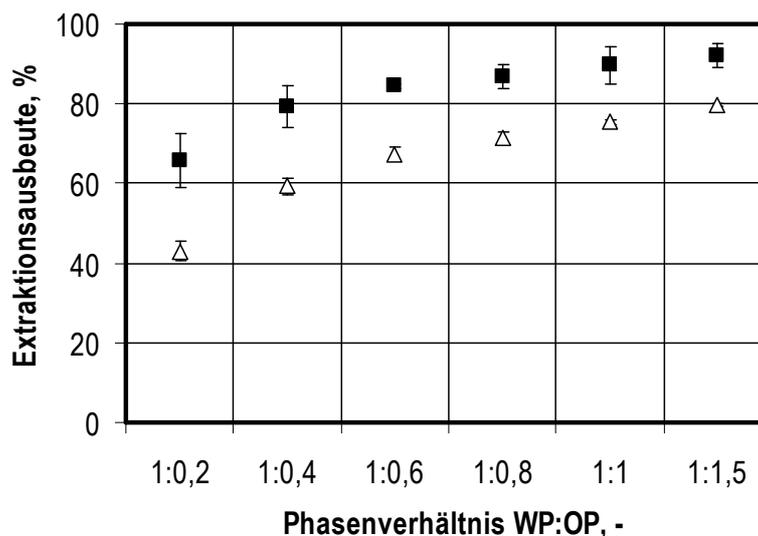


Abbildung 5-8: Einfluss des Phasenverhältnisses zwischen wässriger und organischer Phase bei der Extraktion mit Triäthylamin \triangle und Trioctylamin \blacksquare in 1-Octanol. Die Aminkonzentration wurde für alle Phasenverhältnisse so gewählt, dass auf 1,0 mol Bernsteinsäure konstant 1,58 mol (TPeA) und 1,44 mol (TOA) Amin kamen. Die Extraktion erfolgte in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min und einer Bernsteinsäurekonzentration von $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ bei einem pH von 2,0. Das Phasenverhältnis der wässrigen Phase (WP) zur organischen Phase (OP) variierte von 1:0,2 bis 1:1,5.

Obwohl in allen Experimenten das Gleichgewicht auf Grund der zuvor bestimmten Extraktionsbedingungen (10 min bei 30 Hz) erreicht wurde, zeigt Abbildung 5-8 einen Anstieg der Extraktionsausbeute mit zunehmendem Volumen der organischen Phase für die Reaktivextraktionssysteme mit Triäthylamin und Trioctylamin. Dieser Effekt beruht auf einer besseren Solvatisierung der Amin-Bernsteinsäure-Komplexe mit Lösungsmittelmolekülen bei einem höheren Volumen der organischen Phase und gleichbleibender Aminmenge. Eine bessere Solvatisierung führt hier zu einem schnelleren Übergang der Komplexe von der Phasengrenze in die organische Phase, wodurch sich unbeladenes Amin schneller wieder an der Extraktions-Phasengrenze anlagern kann. Ein Aufkonzentrieren der Bernsteinsäure bei der Extraktion ist nicht möglich, da die Phasenverhältnisse mit einem geringen Volumen der wässrigen Phase deutlich niedrigere Ausbeuten liefern. Als ideales Phasenverhältnis bietet sich ein Verhältnis von 1:1 an, da hier hohe Ausbeuten von 89,7 % (TOA) und 75,4 % (TPeA) erzielt werden können und dennoch nicht wie bei einem Phasenverhältnis von 1:1,5 eine Volumenvergrößerung stattfindet.

Die Vorversuche haben gezeigt, dass eine Übertragung der Extraktion mit den in der Literatur beschriebenen temperierten Gefäßen auf eine untemperierte Extraktion in der Schwingmühle möglich ist. Um das Phasengleichgewicht zu erreichen sind bereits wenige Sekunden bei einer Schüttelfrequenz von 30 Hz ausreichend. Zur Sicherheit ist dennoch eine Reaktivextraktion mit einer Extraktionszeit von

10 Minuten sinnvoller, um bei späteren Experimenten die Einstellung des Gleichgewichts zu gewährleisten.

Ein Vergleich mit den Literaturdaten (Hong und Hong 2000b; Hong *et al.* 2002) zeigt, dass das bereits beschriebene Reaktivextraktionssystem mit Trioctylamin bei gleichen Mengenverhältnissen von Amin zu Bernsteinsäure und einer Konzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ 1-Octanol im Labor bei der Extraktion in der Schwingmühle mit 86,5 % annähernd gleiche Ausbeuten wie in der Literatur mit etwa 90 % liefert. Auch für Tripropylamin in 1-Octanol stimmen die beschriebenen Extraktionsausbeuten (67 - 80 %) und die experimentell in dieser Arbeit ermittelten Ausbeuten (72 %) gut überein. Für Tributylamin und Tripropylamin weichen die experimentellen Ausbeuten jedoch deutlich von der Literatur ab. Während für Tributylamin experimentell 41 % Ausbeute erzielbar war sind die Werte der Literatur um etwa 10 - 40 % höher. Bei Tripropylamin waren statt 46 - 80 % (Literatur) nur 13 % (Experiment) Ausbeute möglich. Grund hierfür können unterschiedliche Reinheitsgrade oder Hersteller der Amine sein.

Des Weiteren konnte bei der Reaktivextraktion in der Schwingmühle wie erwartet ein starker Einfluss des pH der wässrigen Bernsteinsäurelösung auf die Extraktionsausbeute festgestellt werden. Nur die undissoziierte Form der Säure kann extrahiert werden und diese liegt lediglich bei einem $\text{pH} \ll \text{pK}_{\text{S}_1}$ der Säure vor. Dementsprechend ließen sich nur bei einem niedrigen pH hohe Ausbeuten erzielen. Bereits ab einem pH von 6,0 war keine Reaktivextraktion mehr möglich. Deutlichen Einfluss auf die Extraktion zeigte auch die eingesetzte Aminkonzentration in der organischen Phase. Dabei konnte beobachtet werden, dass Aminkonzentrationen über $1,0 - 1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel kaum höhere Ausbeuten liefern, weshalb eine Überschreitung dieser Konzentration unwirtschaftlich ist. Ebenfalls gezeigt werden konnte, dass das optimale Phasenverhältnis von organischer Phase zu wässriger Phase bei 1:1 liegt.

Des Weiteren wurde bei allen Experimenten der pH in der wässrigen Phase nach der Extraktion bestimmt. Vor der Extraktion lag der pH in der Regel bei den fest eingestellten Werten 2,0, 2,3 oder 4,0. Nach der Extraktion war ein Anstieg in der Raffinatphase bis auf 4,0 - 5,0 bzw. 6,0 feststellbar. Dies ist durch den Übergang der Säure und ihrer Protonen in die organische Phase zu erklären. Je mehr Säure extrahiert wird, desto mehr Protonen gehen von der wässrigen Phase in die organische Phase über, was in einem pH-Anstieg der Raffinatphase resultiert. Damit steigt während der Extraktion ebenfalls die Menge an dissoziierter Bernsteinsäure an, die nicht mehr extrahiert werden kann. Dies erklärt warum auch unter optimalen Bedingungen mit sehr effizienten Reaktivextraktionssystemen keine vollständige Extraktion der Säure möglich ist.

5.2 Biokompatibilität der eingesetzten Amine und Lösungsmittel

Für einen späteren Aufarbeitungsprozess ist eine Kreislaufführung des abgereicherten Fermentationsüberstands nach der Reaktivextraktion sinnvoll. Zum einen geht so im Überstand zurück bleibende Bernsteinsäure nicht verloren. Zum anderen können alle Mediumsbestandteile und Wasser optimal genutzt werden. Da die für die Suche nach geeigneten Reaktivextraktionssystemen für Bernsteinsäure eingesetzten Amine und Lösungsmittel eine geringe Restlöslichkeit in Wasser im millimolaren Bereich aufweisen, werden diese bei einer eventuellen Rückführung über den abgereicherten Überstand in den Bioreaktor eingebracht. Untersucht wurde deshalb, wie sich die Wachstumsraten von drei potentiellen Mikroorganismen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum*) für die Bernsteinsäureproduktion, bei Anwesenheit von Amin und Lösungsmittel ändern. Der Einfluss auf die Produktbildung (häufig in Prozessen wachstumsentkoppelt) wurde im Rahmen dieser Versuche nicht betrachtet.

Das Wachstum betrug für *Saccharomyces cerevisiae* im Durchschnitt $0,29 \text{ h}^{-1}$, für *E. coli* $0,56 \text{ h}^{-1}$ und für *C. glutamicum* $0,46 \text{ h}^{-1}$. Die Wachstumsraten bei Vorlage von Amin oder Lösungsmittel sind in Prozent dieser Wachstumsraten in Abbildung 5-9 dargestellt.

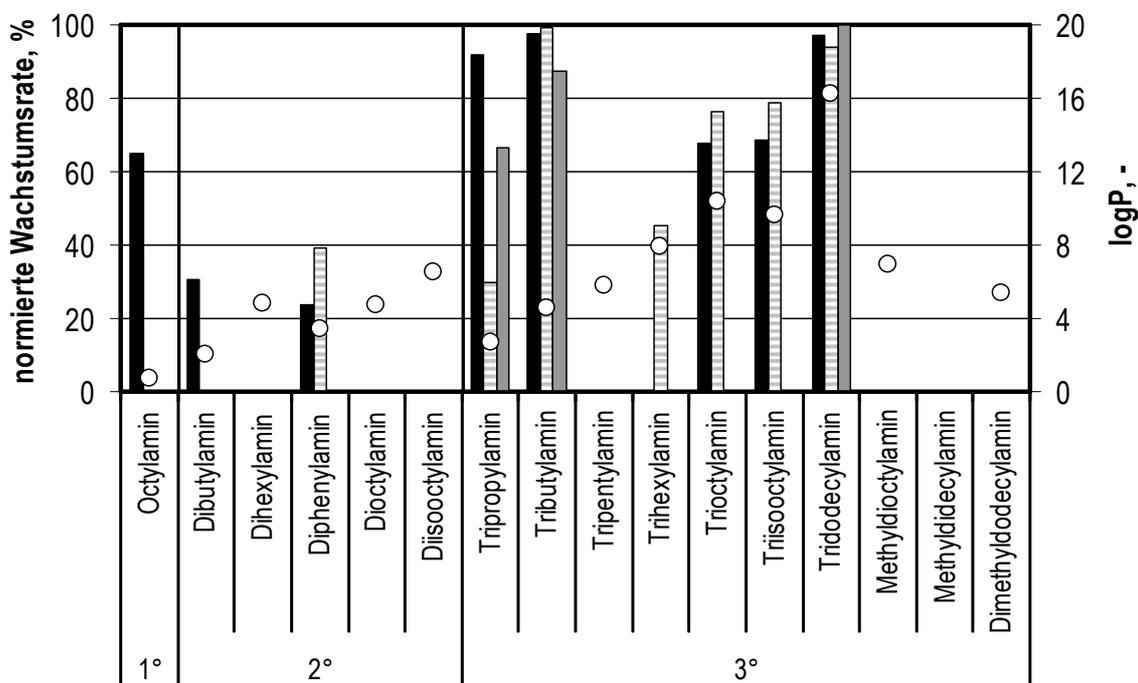


Abbildung 5-9: Wachstumsraten in % des normalen Wachstums von *Saccharomyces cerevisiae* ■, *Escherichia coli* ▨ und *Corynebacterium glutamicum* ■ bei Vorlage von Amin (1° primär, 2° sekundär, 3° tertiär) bis zur Löslichkeitsgrenze + 10 % im Überschuss zum Kulturmedium im Schüttelkolben. Zusätzlich dargestellt ist der logP ○ (falls Daten vorhanden waren).

Nahezu alle Amine senken die Wachstumsraten der untersuchten Stämme stark oder hemmen vollständig das Wachstum. Das primäre Amin Octylamin lässt lediglich bei *Saccharomyces cerevisiae* noch ein um 35 % vermindertes Wachstum zu. *E. coli* und *C. glutamicum* werden vollständig gehemmt. Auch die sekundären Amine Dibutylamin, Dihexylamin, Dioctylamin und Diisooctylamin hemmen das Wachstum von *E. coli* und *C. glutamicum* komplett. Lediglich Dibutylamin zeigt eine um 70 % verminderte Wachstumsrate für *Saccharomyces cerevisiae* und Diphenylamin ein um 62 - 77 % vermindertes Wachstum für *Saccharomyces cerevisiae* und *E. coli*. Bei den tertiären Aminen zeigen die Amine Tributylamin und Tridodecylamin, deren logP bei 4,6 und 16,24 liegen, keinen Einfluss auf die Wachstumsraten der drei untersuchten Stämme. Tripropylamin, hemmt ebenfalls bei keinem der untersuchten Stämme vollständig das Wachstum. Die Raten sind allerdings mit 10 - 70 % unterschiedlich stark reduziert. Trioctylamin und die Isoform Triisooctylamin zeigen für *S. cerevisiae* und *E. coli* hohe, lediglich um etwa 25 % verminderte Wachstumsraten. Trihexylamin ermöglicht nur im Fall von *E. coli* ein um 55 % vermindertes Wachstum und hemmt die beiden anderen Stämme vollständig. Auch die anderen tertiären Amine Tripentylamin, Methyldioctylamin, Methyldidecylamin und Dimethyldodecylamin hemmen komplett das Wachstum aller drei Stämme.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass lediglich Tributylamin und Tridodecylamin für *S. cerevisiae*, *E. coli* und *C. glutamicum* vollständig biokompatibel sind. Insgesamt zeigen tertiäre Amine die meisten teilweise oder komplett biokompatiblen Amine. Primäre und sekundäre Amine verhindern in nahezu allen Fällen das Wachstum vollständig oder hemmen es stark. Dies korreliert mit den Literaturdaten zur Biokompatibilität von Aminen, die besagen, dass bereits sehr geringe Konzentrationen toxisch für Zellen sind (Frieling und Schügerl 1999).

Der Verteilungskoeffizient logP der Amine (vgl. Tabelle 12-10 im Anhang) und die gemessene Biokompatibilität zeigen keinen eindeutigen Zusammenhang. Alle Amine, die nur zu einer geringen oder keiner Wachstumshemmung führen, zeichnen sich zwar durch einen hohen logP aus. Allerdings sind nicht alle Amine mit einem hohen logP auch biokompatibel, wie die Amine Dihexylamin, Diisooctylamin, Trihexylamin und Methyldioctylamin zeigen.

Da die eingesetzten Reaktivextraktionssysteme neben Aminen auch aus Lösungsmitteln bestehen, wurden ebenfalls die Wachstumsraten bei Zugabe des jeweiligen Lösungsmittels bestimmt. Auch bei den eingesetzten Lösungsmitteln kam es dabei je nach Art zu starken Einflüssen auf das Wachstum der Stämme.

In Abbildung 5-10 ist deutlich zu sehen, dass Alkohole in nahezu allen Fällen das Wachstum von *S. cerevisiae*, *E. coli* und *C. glutamicum* vollständig hemmen. Nur die langkettigeren Alkohole 1-Decanol und 1-Dodecanol, deren logP über 4,0 liegt, zeigen für Hefe und *E. coli* verminderte Wachstumsraten.

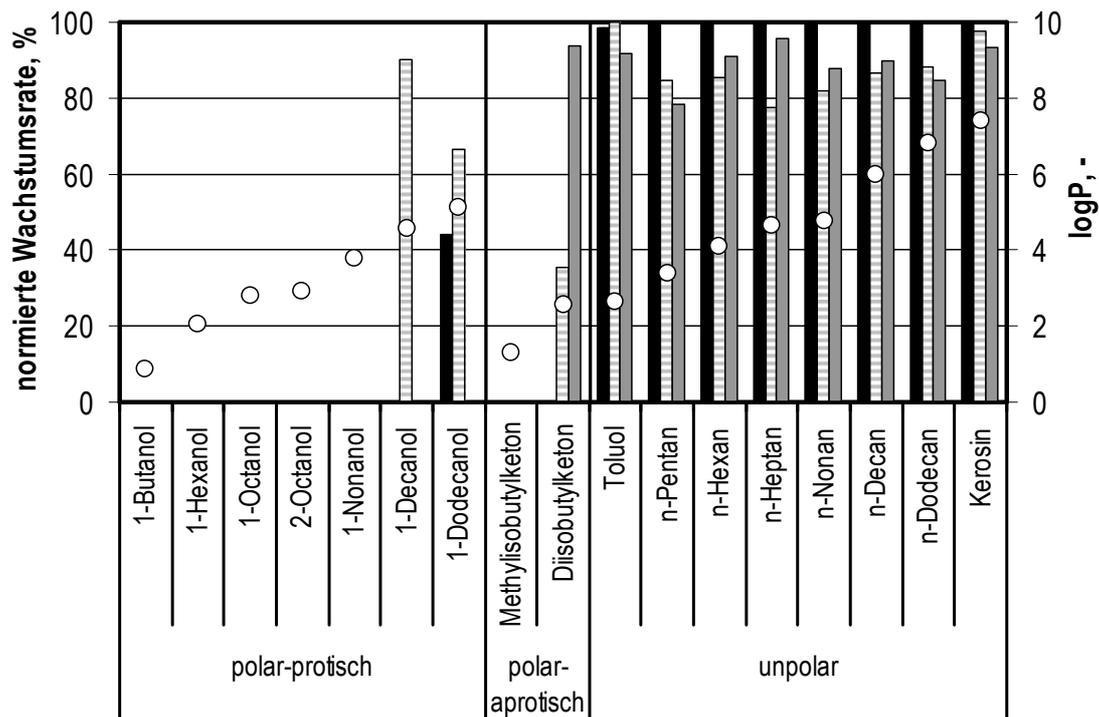


Abbildung 5-10: Wachstumsraten in % des normalen Wachstums von *Saccharomyces cerevisiae* ■, *Escherichia coli* ▨ und *Corynebacterium glutamicum* ■ bei Vorlage von Lösungsmittel (polar-protisch, polar-aprotisch, unpolar) bis zur Löslichkeitsgrenze + 10 % im Überschuss zum Kulturmedium im Schüttelkolben. Zusätzlich dargestellt ist der logP ○.

Auch andere polare Lösungsmittel, wie Methylisobutylketon (MIBK), hemmen das Wachstum aller drei Stämme vollständig, was mit dem niedrigen logP von 1,31 korreliert. Diisobutylketon (DIBK) mit einem logP von 2,56 senkt die Wachstumsrate im Fall von *E. coli* um 65 % und im Fall von *C. glutamicum* um 10 %. Genau gegenteilig verhalten sich die Alkane. Hier ist für alle drei untersuchten Stämme Wachstum mit hohen Raten beobachtbar. *Saccharomyces cerevisiae* zeigt bei Vorhandensein von Alkanen in allen Fällen unverändertes Wachstum, *E. coli* zwischen 78 - 85 % und *C. glutamicum* zwischen 79 - 95 %. Für alle drei Stämme lassen sich hier die höchsten Wachstumsraten mit Kerosin (Stoffgemisch aus *n*-Decan bis *n*-Hexadecan) erzielen. Das Lösungsmittel Toluol zeigt vergleichbar zu den anderen unpolaren Lösungsmitteln ebenfalls keinen negativen Einfluss auf das Wachstum der Stämme. Auch für unpolare Lösungsmittel korrelieren die Ergebnisse mit dem logP. Außer für *n*-Pentan mit 3,39 und Toluol mit 2,65 liegen die Verteilungskoeffizienten über 4,0.

Auch hier lassen sich die Literaturdaten zur Biokompatibilität von Lösungsmitteln bestätigen. Mit abnehmender Polarität des Lösungsmittels steigt die Biokompatibilität und Lösungsmittel mit einem logP über 4,0 (vgl. Tabelle 12-10 im Anhang) zeigen eine gute Biokompatibilität (Vermue *et al.* 1993). Dementsprechend eignen sich die unpolaren Alkane am besten für einen späteren Aufarbeitungsprozess mit Rückführung des abgereicherten Fermentationsüberstands.

5.3 Identifikation geeigneter Reaktivextraktionssysteme

Nach der Charakterisierung der Extraktionsbedingungen und der Identifikation geeigneter wasserunlöslicher Amine und Lösungsmittel, war die Evaluierung von Reaktivextraktionssystemen notwendig, die hohe Extraktionsausbeuten für Bernsteinsäure liefern. Hierfür wurden primäre, sekundäre und tertiäre, sowie Alkylamine (aliphatischer Rest) und Arylamine (aromatischer Rest) miteinander verglichen. Bei den Lösungsmitteln wurden sowohl polare (protische und aprotische) als auch unpolare Lösungsmittel untersucht. Unter protischen Lösungsmitteln sind dabei Stoffe zu verstehen, die ein Proton abspalten können. Aprotische sind dementsprechend keine Protonendonatoren. Insgesamt wurden drei Auswahlprüfverfahren mit unterschiedlicher Zielsetzung durchgeführt:

- Einfache Reaktivextraktionssysteme (ein Amin + ein Lösungsmittel)
- Komplexe Reaktivextraktionssysteme (zwei Amine + zwei Lösungsmittel)
- Biokompatible Reaktivextraktionssysteme (biokompatible Amine + biokompatible Lösungsmittel)

5.3.1 Einfache Reaktivextraktionssysteme

In einem ersten Auswahlprüfverfahren wurden einfache Reaktivextraktionssysteme, bestehend aus einem Amin und einem Lösungsmittel, gesucht. Hierfür wurden die Amine mit einer Konzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel für die Extraktion von $0,5$ molarer Bernsteinsäure mit einem pH von $2,3$ eingesetzt. Die Extraktion erfolgte in den meisten Fällen im Dreifachansatz für 10 min bei 30 Hz in der Schwingmühle. Die Ergebnisse sind im Folgenden nach der Art der eingesetzten Lösungsmittel (siehe Tabelle 12-10 im Anhang) wie folgt gegliedert:

- polar-protisch (Protonenabgabe möglich)
- polar-aprotisch (keine Protonenabgabe möglich)
- unpolar

Polar-protische Lösungsmittel

Zu den polar-protischen Lösungsmitteln gehören Alkohole, wie 1-Butanol, 1-Hexanol, 1-Octanol, 2-Octanol, 1-Decanol und 1-Dodecanol. Diese Lösungsmittel sind in der Lage ein Proton abzuspalten. Die Extraktionsausbeuten solcher protischen Lösungsmittel in Kombination mit tertiären aliphatischen Aminen sind in Abbildung 5-11 dargestellt.

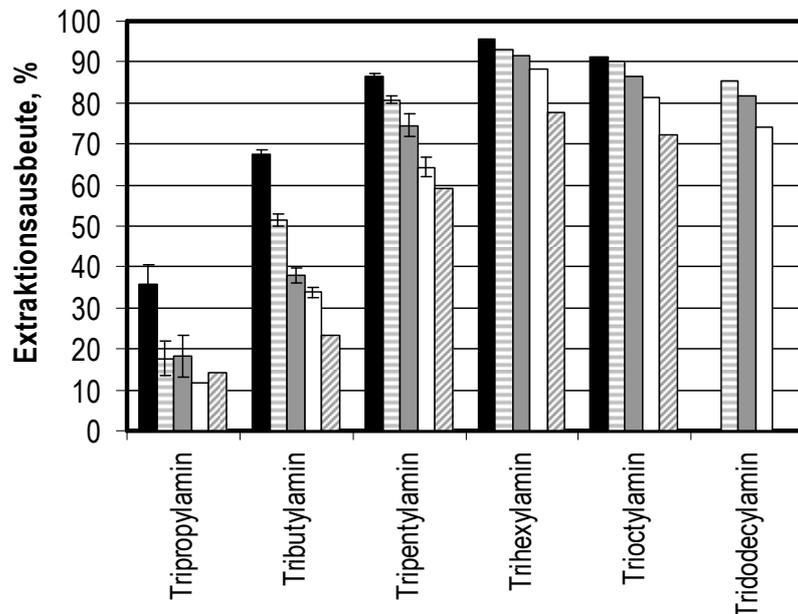


Abbildung 5-11: Extraktionsausbeuten tertiärer Amine in den polar-protischen Lösungsmitteln 1-Butanol ■, 1-Hexanol ▨, 1-Octanol ▩, 1-Decanol □ und 1-Dodecanol ▤. Extraktion von 0,5 molarer Bernsteinsäurelösung (pH 2,3) in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min. Eingesetzte Aminkonzentration 1,0 mol kg⁻¹ Lösungsmittel.

Mit zunehmender Kettenlänge der eingesetzten Alkohole sinkt die Extraktionsausbeute der Reaktivextraktionssysteme. Grund hierfür ist die mit zunehmender Kettenlänge schlechter werdende Solvatisierungsfähigkeit und die geringere Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Bernsteinsäure-Amin-Komplexen. Ebenfalls beobachtbar ist eine Erhöhung der Extraktionsausbeute mit zunehmender Kohlenstoffanzahl der aliphatischen Reste der Amine. Während bei Tripropylamin (drei Kohlenstoffe) maximale Ausbeuten von 11,7 - 35,6 % möglich sind, erreichen Reaktivextraktionssysteme mit Aminen wie Trihexylamin (sechs Kohlenstoffe) oder Trioctylamin (acht Kohlenstoffe) Ausbeuten von über 90 %. Grund hierfür ist die zunehmende Basizität tertiärer Amine mit zunehmender Kettenlänge. Die höchsten Ausbeuten lassen sich hier jedoch mit 77,7 - 95,5 % mit Trihexylamin und nicht mit den länger-kettigen Aminen Trioctylamin oder Tridodecylamin erreichen. Diese Amine können Bernsteinsäure zwar ebenfalls sehr gut an der Phasengrenzfläche binden, sind aber auf Grund ihrer Kettenlänge schlechter zu solvatisieren als Amin-Säure-Komplexe mit Trihexylamin. Dies zeigt sich zum

Einen an niedrigeren Ausbeuten und zum Anderen am Auftreten von starker Aggregatbildung (keine Ausbeuten ermittelbar), wie im Fall von Tridodecylamin in Kombination mit 1-Butanol oder 1-Dodecanol.

Ähnlich verhalten sich sekundäre Amine wie Dibutylamin, Dihexylamin oder Dioctylamin in protischen Lösungsmitteln, wie in Abbildung 5-12 dargestellt.

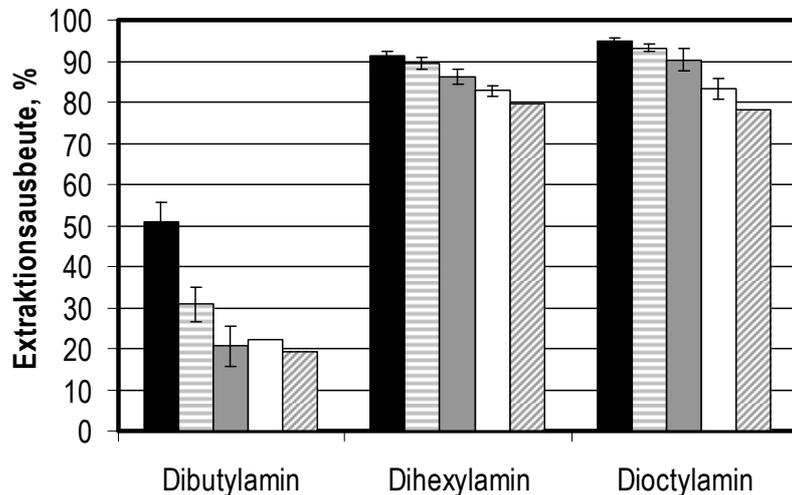


Abbildung 5-12: Extraktionsausbeuten sekundärer Amine in den polar-protischen Lösungsmitteln 1-Butanol ■, 1-Hexanol ▨, 1-Octanol ■, 1-Decanol □ und 1-Dodecanol ▩. Extraktion von 0,5 molarer Bernsteinsäurelösung (pH 2,3) in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min. Eingesetzte Aminkonzentration $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel.

Auch hier sinkt die Extraktionsausbeute mit zunehmender Kettenlänge des Alkohols und steigt mit zunehmender Kettenlänge der aliphatischen Reste der Amine. Da sekundäre Amine nur zwei lange Seitenketten besitzen und nicht wie tertiäre Amine drei, spielen hier sterische Effekte bei der Solvatisierung der Säure-Amin-Komplexe eine deutlich geringere Rolle. Die höchsten Ausbeuten von bis zu 95,0 % lassen sich deshalb mit dem Amin mit den längsten Seitenketten (hier: Dioctylamin) erzielen.

Vergleicht man die Extraktionsausbeute für Bernsteinsäure mit primären, sekundären und tertiären Aminen mit gleicher Kettenlänge in Alkoholen, ist wie in Abbildung 5-13 dargestellt, die höchste Ausbeute mit sekundären oder tertiären Aminen zu erzielen.

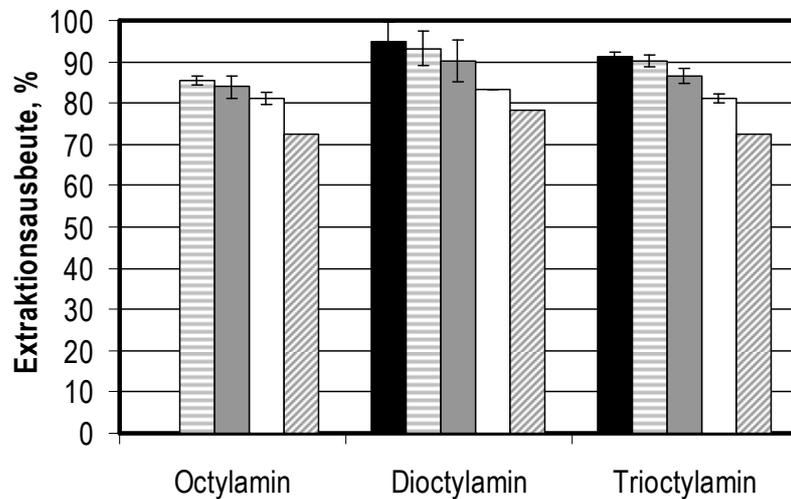


Abbildung 5-13: Vergleich der Extraktionsausbeuten primärer, sekundärer und tertiärer Amine in den polarprotischen Lösungsmitteln 1-Butanol ■, 1-Hexanol ▨, 1-Octanol ■, 1-Decanol □ und 1-Dodecanol ▩. Extraktion von 0,5 molarer Bernsteinsäurelösung (pH 2,3) in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min. Eingesetzte Aminkonzentration $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel.

Primäre Amine wie Octylamin haben eine deutlich niedrigere Basizität als sekundäre und tertiäre Amine und führen deshalb zu niedrigeren Ausbeuten. Wie bereits beschrieben ist Trioctylamin mit Ausbeuten von 72,4 - 91,1 % auf Grund sterischer Effekte bei der Solvatisierung schlechter für die Säureextraktion geeignet als Dioctylamin mit 78,1 - 95,0 %. Auch hier ist wieder zu erkennen, dass die Ausbeute mit steigender Kettenlänge des Alkohols sinkt. Einzige Ausnahme ist Octylamin in 1-Butanol. Hier waren die wässrige und die organische Phase komplett ineinander mischbar, weshalb kein Wert für die Ausbeute angegeben werden konnte.

In einem weiteren Teilexperiment wurde untersucht, ob ein Unterschied in der Höhe der Ausbeute zwischen Dioctylamin und Trioctylamin und deren Isoformen Diisooctylamin und Triisooctylamin besteht. Gezeigt werden sollte, ob es auf Grund der unterschiedlichen Struktur der Amine zu sterischen Effekten kommt, die die Höhe der Extraktionsausbeute beeinflussen. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abbildung 5-14 dargestellt.

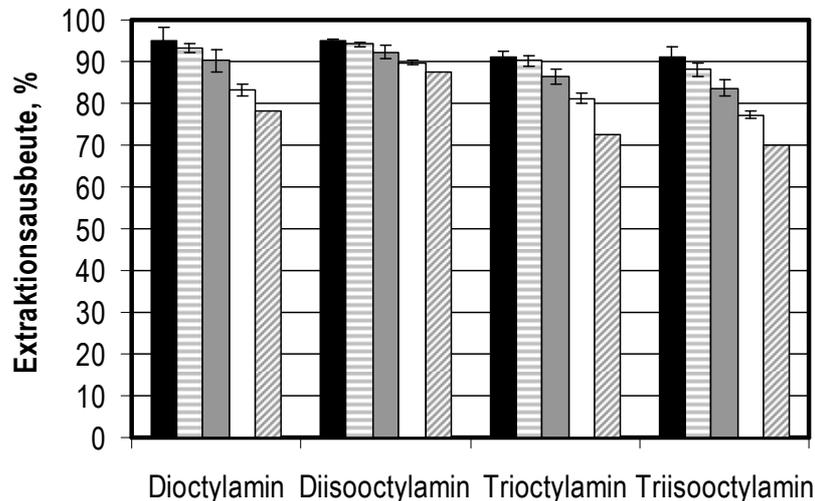


Abbildung 5-14: Einfluss sterischer Effekte bei der Extraktion mit Dioctylamin und Trioctylamin im Vergleich zu den Isoformen Diisooctylamin und Triisooctylamin in den polar-protischen Lösungsmitteln 1-Butanol ■, 1-Hexanol ▤, 1-Octanol ■, 1-Decanol □ und 1-Dodecanol ▨. Extraktion von 0,5 molarer Bernsteinsäurelösung (pH 2,3) in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min. Eingesetzte Aminkonzentration 1,0 mol kg⁻¹ Lösungsmittel.

Bei den sekundären Aminen zeigt die Isoform (Diisooctylamin) in allen Alkoholen mit 87,4 - 95,2 % höhere Ausbeuten als das unverzweigte Amin (Dioctylamin) mit 78,1 - 95,0 %. Die Solvatisierung erfolgt hier auf Grund der Verzweigung einfacher als im unverzweigten langgestreckten Molekül. Diisooctylamin erzielt auch mit langkettigen Alkoholen deutlich höhere Ausbeuten als die anderen hier gezeigten Amine. Bei den tertiären Aminen Triisooctylamin und Trioctylamin in den Alkoholen 1-Butanol bis 1-Dodecanol lässt sich kein signifikanter Unterschied in der Ausbeute erkennen. Die Ausbeuten liegen je nach eingesetztem Lösungsmittel für beide Amine zwischen 70,0 - 91,2 %. Insgesamt zeigen tertiäre Amine auch hier niedrigere Ausbeuten als sekundäre Amine, da die Solvatisierung der entstehenden Komplexe durch den hohen Alkylierungsgrad der tertiären Amine erschwert wird. Dies ist auch der Grund warum die Kettenlänge der eingesetzten Alkohole mehr Einfluss bei Reaktivextraktionssystemen mit tertiären Aminen als bei sekundären zeigt.

Zusätzlich zu den Isoformen einiger Amine wurden sterische Effekte bei der Extraktion von Bernsteinsäure mit tertiären Aminen mit unterschiedlich langen Seitenketten untersucht.

Wie in Abbildung 5-15 dargestellt, zeigen tertiäre Amine, wie Methyldioctylamin und Methyldidecylamin, mit einer Methylgruppe und zwei Seitenketten mit acht oder zehn Kohlenstoffatomen höhere Ausbeuten als die korrespondierenden Amine mit drei langen Seitenketten.

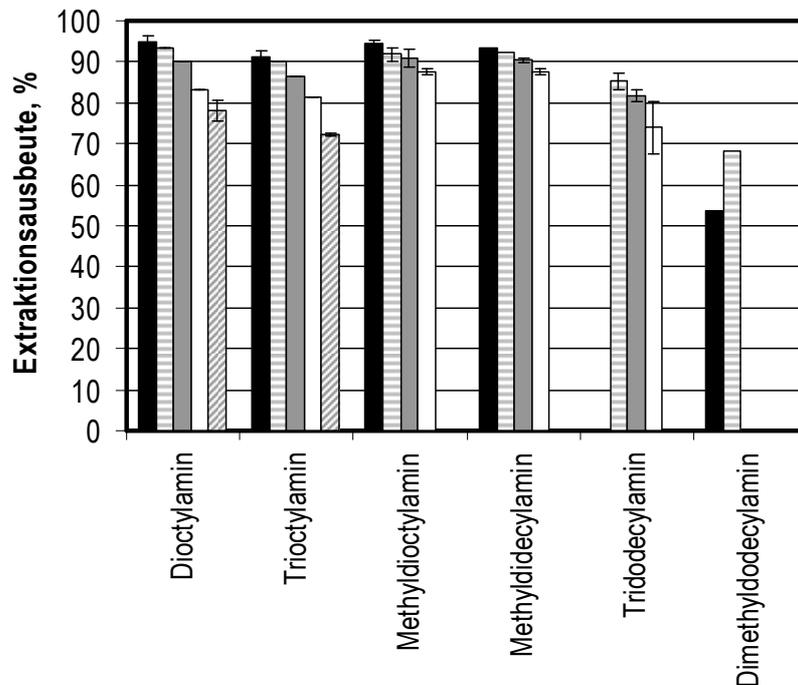


Abbildung 5-15: Sterische Effekte bei der Extraktion mit tertiärer Amine mit unterschiedlich langen Seitenketten in den polar-protischen Lösungsmitteln 1-Butanol ■, 1-Hexanol ▨, 1-Octanol ▩, 1-Decanol □ und 1-Dodecanol ▤. Extraktion von 0,5 molarer Bernsteinsäurelösung (pH 2,3) in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min. Eingesetzte Aminkonzentration $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel.

Der Grund hierfür ist ebenfalls die bessere Solvatisierung der Komplexe durch geringere sterische Effekte. Bei langkettigen Alkoholen als Lösungsmittel führten diese Amine jedoch zu einer starken Aggregatbildung. Dimethyldodecylamin, ein Amin mit zwei Methylgruppen, zeigt deutlich niedrigere Ausbeuten, da die Basizität im Vergleich zu Aminen mit mehreren langen Seitenketten stark vermindert ist. Auch hier kam es häufig zu einer Aggregatbildung der Dimethyldodecylamin-Bernsteinsäure-Komplexe, weshalb keine Ausbeuten bestimmt werden konnten.

In einem weiteren Telexperiment wurde der Unterschied zwischen Dihexylamin, einem Alkylamin, und Diphenylamin, einem Arylamin, untersucht. Beide Amine gehören zu den sekundären Aminen, bestehen aus zwölf Kohlenstoffatomen, mit je sechs Atomen pro Seitenkette oder Ring.

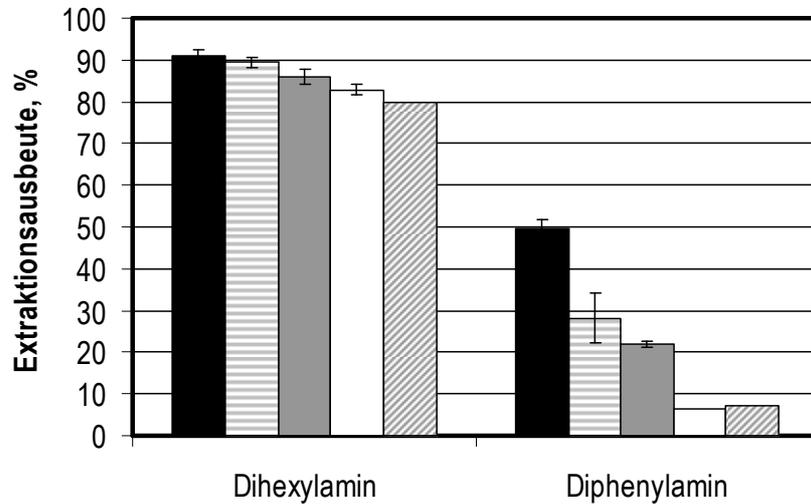


Abbildung 5-16: Vergleich der Extraktionsausbeuten eines sekundären Alkylamins (Dihexylamin) und eines sekundären Arylamins (Diphenylamin) in den polar-protischen Lösungsmitteln 1-Butanol ■, 1-Hexanol ▤, 1-Octanol ■, 1-Decanol □ und 1-Dodecanol ▨. Extraktion von 0,5 molarer Bernsteinsäurelösung (pH 2,3) in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min. Eingesetzte Aminkonzentration $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel.

Obwohl sich die Amine in ihrer Atomanzahl und ihrem Alkylierungsgrad nicht unterscheiden, ist wie in Abbildung 5-16 zu sehen, die Extraktionsausbeute mit Reaktivextraktionssystemen bestehend aus einem Alkohol und Diphenylamin signifikant schlechter als mit Dihexylamin.

Es lassen sich maximal Ausbeuten zwischen 8 - 50 % je nach Alkohol erzielen. Grund hierfür ist die geringere Basizität des Arylamins (siehe Punkt 3.5.2), auf Grund von Resonanzeffekten im Molekül. Dementsprechend eignen sich Alkylamine deutlich besser für eine Extraktion von Bernsteinsäure als Arylamine.

Wurden bisher die Extraktionsausbeuten der verschiedenen Amingruppen in Alkoholen gezeigt, soll nun Augenmerk auf unterschiedlich verzweigte Alkohole gelegt werden. Hierfür sind in Abbildung 5-17 die Ausbeuten für primäre, sekundäre und tertiäre Amine in 1-Octanol und 2-Octanol dargestellt.

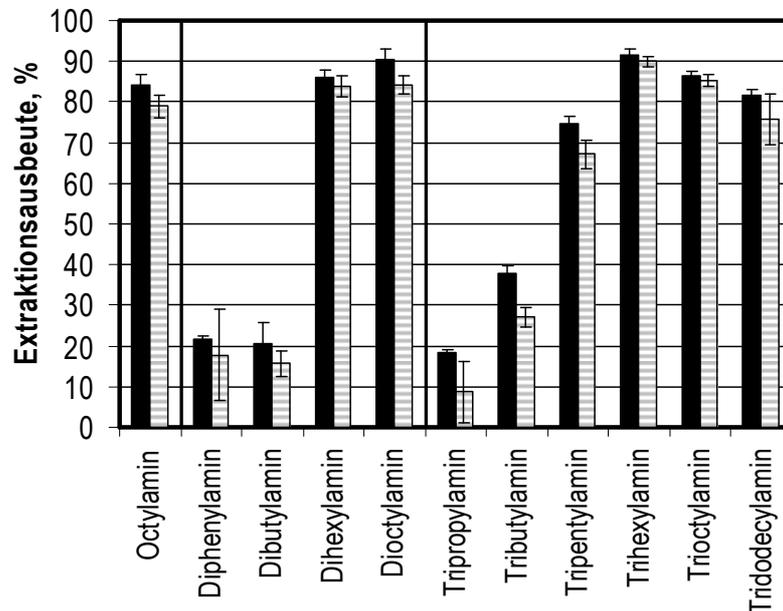


Abbildung 5-17: Einfluss sterischer Effekte von Lösungsmittel-Isoformen bei der Extraktion mit primären, sekundären und tertiären Aminen in den polar-protischen Lösungsmitteln 1-Octanol ■ oder 2-Octanol ▨. Extraktion von 0,5 molarer Bernsteinsäurelösung (pH 2,3) in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min. Eingesetzte Aminkonzentration 1,0 mol kg⁻¹ Lösungsmittel.

1-Octanol und 2-Octanol zeigen in allen Reaktivextraktionssystemen sehr ähnliche Ausbeuten. 2-Octanol liegt dabei im Durchschnitt um 5,4 % niedriger als Reaktivextraktionssysteme mit 1-Octanol. Grund hierfür ist die etwas geringere Polarität des verzweigten Alkohols. Die Ergebnisse korrelieren mit den von Wojtech und Mayer 1985 gemachten Beobachtungen.

Polar-aprotische Lösungsmittel

Nach der Untersuchung von Alkoholen wurde Methylisobutylketon in Kombination mit primären, sekundären und tertiären Aminen untersucht. Dieses Lösungsmittel ist ebenfalls polar, kann jedoch keine Protonen abspalten.

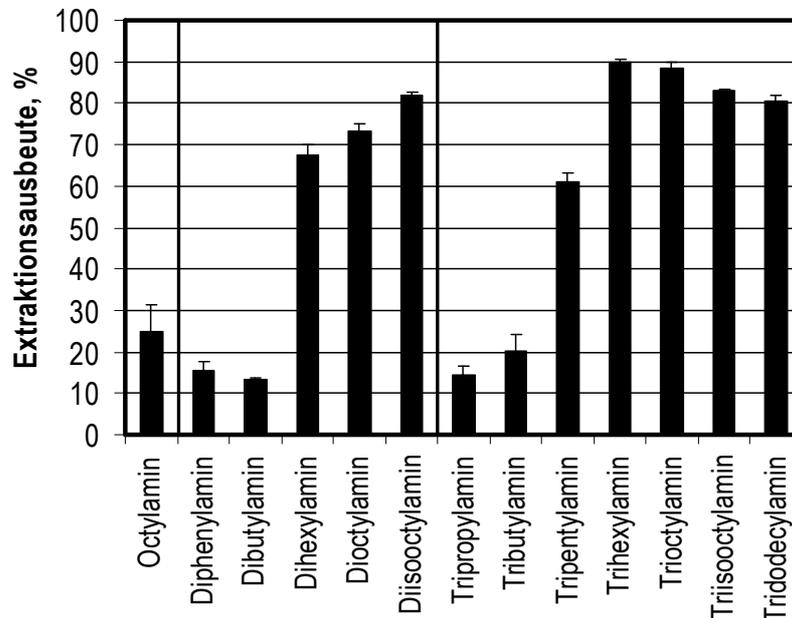


Abbildung 5-18: Extraktionsausbeuten primärer, sekundärer und tertiärer Amine im polar-aprotischen Lösungsmittel Methylisobutylketon. Extraktion von 0,5 molarer Bernsteinsäurelösung (pH 2,3) in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min. Eingesetzte Aminkonzentration 1,0 mol kg⁻¹.

Vergleicht man, wie in Abbildung 5-18 dargestellt, die Reaktivextraktionssysteme bestehend aus Methylisobutylketon und den Aminen Octylamin, Dioctylamin und Trioctylamin, so ist ein Anstieg der Extraktionsausbeute für Bernsteinsäure mit zunehmender Anzahl der aliphatischen Seitenketten der Amine beobachtbar. Während das Reaktivextraktionssystem mit Octylamin nur 24,8 % Ausbeute erzielt, sind es bei Dioctylamin 73,4 % und bei Trioctylamin 88,3 %. Bei den Reaktivextraktionssystemen mit tertiären Aminen ist die maximale Ausbeute bei Trihexylamin mit 90,0 % erreicht. Langkettigere Amine, wie Trioctylamin und Tridodecylamin, zeigen hier ebenfalls auf Grund ihrer schlechteren Solvatisierbarkeit niedrigere Ausbeuten als Trihexylamin. Die Isoformen Diisooctylamin und Triisooctylamin zeigen ähnliches Verhalten in Methylisobutylketon wie in Alkoholen. Diisooctylamin liegt um 8 % höher als Dioctylamin und Triisooctylamin um 5 % niedriger als das unverzweigte Trioctylamin. Das Arylamin Diphenylamin zeigt auf Grund seiner niedrigen Basizität in Kombination mit Methylisobutylketon ebenfalls nur sehr geringe Ausbeuten von 15,6 %.

Unpolare Lösungsmittel (Inert)

Neben aktiven Lösungsmitteln wurden auch unpolare Lösungsmittel, wie Alkane, untersucht. In Abbildung 5-19 sind die Extraktionsausbeuten der tertiären Amine mit *n*-Pentan, *n*-Hexan, *n*-Heptan, *n*-Decan, *n*-Dodecan und Kerosin (Gemisch aus Decan bis Hexadecan) als Lösungsmittel dargestellt.

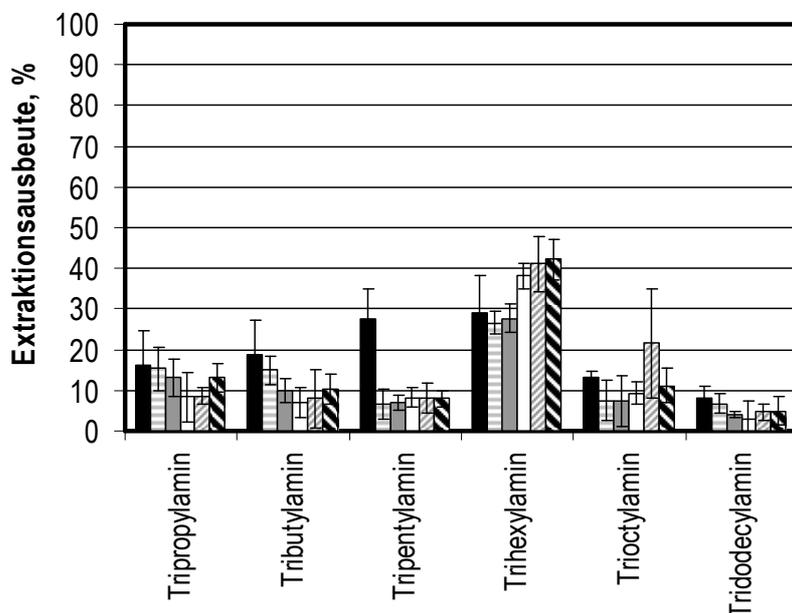


Abbildung 5-19: Extraktionsausbeuten tertiärer Amine in den unpolaren Lösungsmitteln *n*-Pentan ■, *n*-Hexan □, *n*-Heptan ▒, *n*-Decan □, *n*-Dodecan ▨ und Kerosin ▩. Extraktion von 0,5 molarer Bernsteinsäurelösung (pH 2,3) in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min. Eingesetzte Aminkonzentration 1,0 mol kg⁻¹ Lösungsmittel.

Anders als bei polaren Lösungsmitteln ist hierbei keine Steigerung der Extraktionsausbeute mit zunehmender Länge der Seitenketten der Amine feststellbar. Insgesamt liegen die Ausbeuten aller tertiären Amine in Alkanen mit 2,8 - 27,5 % sehr niedrig. Ausnahme ist Trihexylamin, mit dem höhere Ausbeuten von 26,6 - 42,2 % erzielt werden können. Grund für die insgesamt niedrigen Ausbeuten ist die geringere Solvatisierung der polaren Amin-Säure-Komplexe mit den unpolaren Alkanen. Tendenziell zeigen kurzkettige Alkane, wie *n*-Pentan oder *n*-Hexan, in Kombination mit tertiären Aminen die höchsten Ausbeuten. Ausnahme sind auch hier die Reaktivextraktionssysteme mit Trihexylamin, bei denen die Ausbeuten mit zunehmender Anzahl an Kohlenstoffen der Alkane steigen. Vergleicht man die erzielbaren Extraktionsausbeuten tertiärer Amine in Alkanen mit den Ausbeuten in Alkoholen (vgl. Abbildung 5-11), ist ein Rückgang von bis über 40 % erkennbar.

Etwas anders verhalten sich sekundäre Amine in inerten Lösungsmitteln, was in Abbildung 5-20 zu sehen ist.

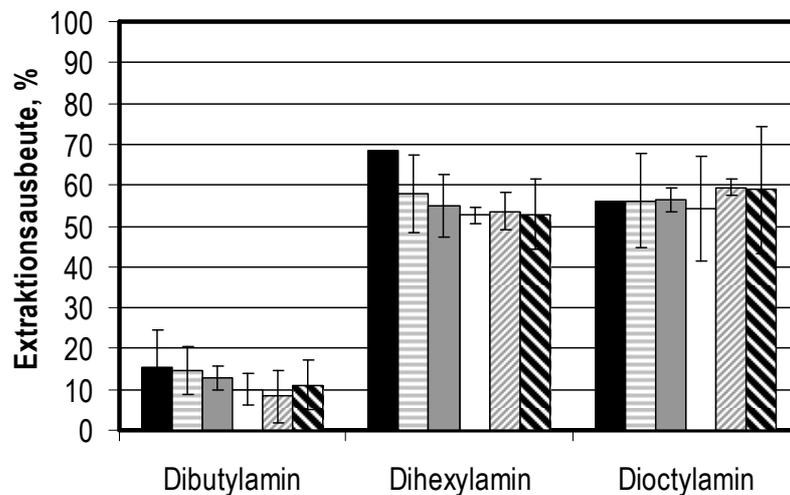


Abbildung 5-20: Extraktionsausbeuten sekundärer Amine in den unpolaren Lösungsmitteln *n*-Pentan ■, *n*-Hexan ▨, *n*-Heptan ■, *n*-Decan □, *n*-Dodecan ▩ und Kerosin ▩. Extraktion von 0,5 molarer Bernsteinsäurelösung (pH 2,3) in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min. Eingesetzte Aminkonzentration 1,0 mol kg⁻¹ Lösungsmittel.

Hier ist eine Zunahme der Extraktionsausbeute für Bernsteinsäure mit zunehmender Kettenlänge der Amine beobachtbar. Dibutylamin als Reaktivkomponente zeigt auf Grund der geringen Basizität nur sehr geringe Ausbeuten von 8,3 - 15,5 %. Die länger-kettigen Amine Dihexylamin und Dioctylamin liegen mit 52,9 - 78,6 % und 54,3 - 59,5 % Ausbeute, je nach eingesetztem inerten Lösungsmittel deutlich höher als Dibutylamin und die in Abbildung 5-19 dargestellten tertiären Amine. Dies lässt sich, wie bereits zuvor geschildert, auf eine bessere Solvatisierung der sekundären Säure-Amin-Komplexe zurückführen. Insgesamt liegen die erzielbaren Extraktionsausbeuten sekundärer Amine in Alkanen jedoch um 10 - 30 % niedriger als in polaren Lösungsmitteln (vgl. Abbildung 5-12). Grund hierfür ist die insgesamt schlechte Solvatisierungsfähigkeit der unpolaren Alkane.

Vergleicht man Octylamin, Dioctylamin und Trioctylamin (Abbildung 5-21) als Reaktivkomponente so ist dieser Effekt nochmals deutlich zu sehen.

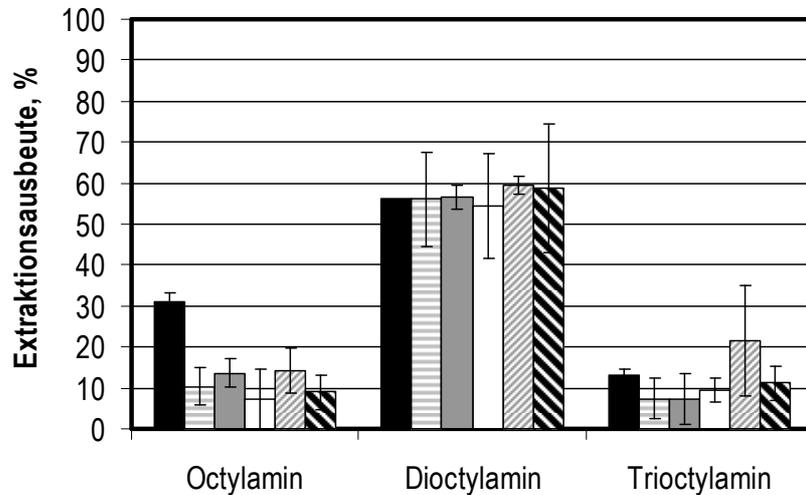


Abbildung 5-21: Vergleich der Extraktionsausbeuten primärer, sekundärer und tertiärer Amine in den unpolaren Lösungsmitteln *n*-Pentan ■, *n*-Hexan ▨, *n*-Heptan ▩, *n*-Decan □, *n*-Dodecan ▩ und Kerosin ▩. Extraktion von 0,5 molarer Bernsteinsäurelösung (pH 2,3) in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min. Eingesetzte Aminkonzentration 1,0 mol kg⁻¹ Lösungsmittel.

Reaktivextraktionssysteme mit Trioctylamin zeigen niedrigere Ausbeuten als Reaktivextraktionssysteme mit einem sekundären Amin. Grund hierfür ist die schlechtere Solvatisierbarkeit der tertiären Amine und die insgesamt geringe Solvatisierungsfähigkeit von Alkanen. Die Reaktivextraktionssysteme mit Octylamin, einem primären Amin, zeigen niedrige Ausbeuten, da Octylamin auf Grund seiner geringen Basizität eine ungeeignete Reaktivkomponente ist. Am besten geeignet ist eine Kombination von sekundären Aminen, wie Dioctylamin, mit Alkanen. Jedoch liegt auch diese mit 56,2 - 59,5 % Ausbeute deutlich niedriger als eine Kombination von Dioctylamin mit Alkoholen (vgl. Abbildung 5-13).

Neben der Untersuchung primärer, sekundärer und tertiärer Amine wurden auch hier Dioctylamin und Trioctylamin im Vergleich zu ihren Isoformen untersucht.

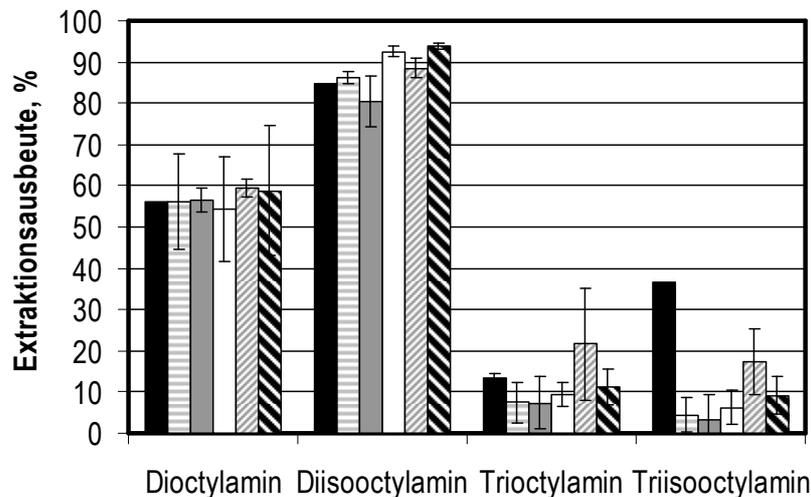


Abbildung 5-22: Einfluss sterischer Effekte bei der Extraktion mit Dioctylamin und Trioctylamin im Vergleich zu den Isoformen Diisooctylamin und Triisooctylamin in den unpolaren Lösungsmitteln *n*-Pentan ■, *n*-Hexan ▨, *n*-Heptan ▩, *n*-Decan □, *n*-Dodecan ▤ und Kerosin ▦. Extraktion von 0,5 molarer Bernsteinsäurelösung (pH 2,3) in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min. Eingesetzte Aminkonzentration 1,0 mol kg⁻¹ Lösungsmittel.

Wie in Abbildung 5-22 dargestellt, zeigen Reaktivextraktionssysteme mit Trioctylamin und Triisooctylamin in Alkanen sehr ähnlichen Extraktionsausbeuten für Bernsteinsäure. Insgesamt sind die Ausbeuten jedoch mit maximal 36,6 % niedrig. Reaktivextraktionssysteme mit Diisooctylamin sind im Vergleich zum unverzweigten Dioctylamin deutlich effizienter. Mit diesem Diisooctylamin lassen sich Ausbeuten zwischen 80,4 - 93,8 % erzielen. Das Amin lässt sich auf Grund seiner Verzweigung auch hier besser durch Alkane solvatisieren als die anderen drei Amine. Insgesamt liegen die Ausbeuten von Diisooctylamin in unpolaren Lösungsmitteln, wie Alkanen, mit 80,4 - 93,8 % damit annähernd so hoch wie in polaren Lösungsmitteln (Alkohole, vgl. Abbildung 5-14) mit 87,4 - 95,2 %.

Auch bei den Reaktivextraktionssystemen mit unpolaren Lösungsmitteln wurden tertiäre Amine mit unterschiedlichen Seitenketten untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-23 dargestellt.

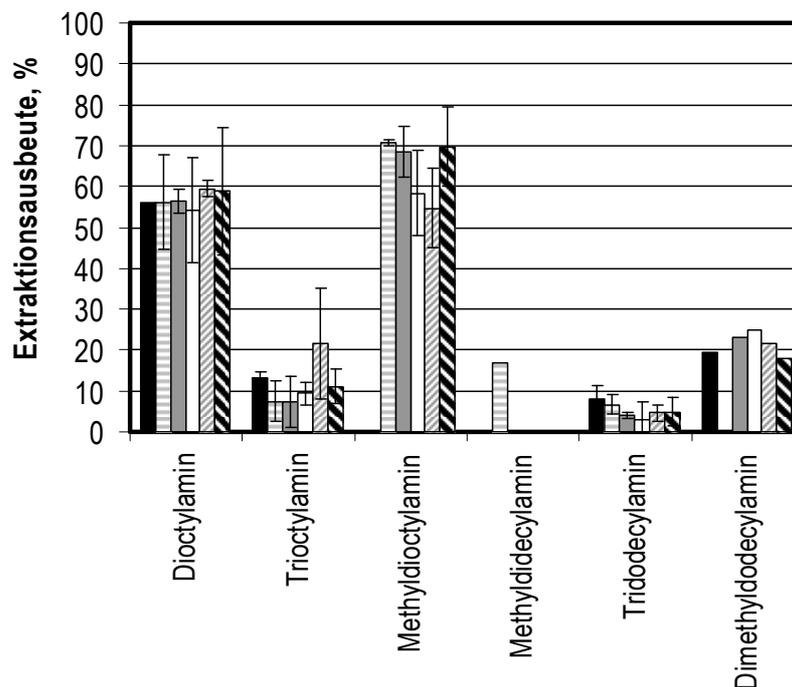


Abbildung 5-23: Sterische Effekte bei der Extraktion mit tertiärer Amine mit unterschiedlich langen Seitenketten in den unpolaren Lösungsmitteln *n*-Pentan ■, *n*-Hexan ▤, *n*-Heptan ▥, *n*-Decan □, *n*-Dodecan ▩ und Kerosin ▨. Extraktion von 0,5 molarer Bernsteinsäurelösung (pH 2,3) in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min. Eingesetzte Aminkonzentration 1,0 mol kg⁻¹ Lösungsmittel.

Die Amine Methyldidecylamin, Methyldioctylamin und Dimethyldodecylamin zeigen sehr unterschiedliche Ausbeuten in Alkanen. Reaktivextraktionssysteme mit dem einfach methylierten Methyldioctylamin erzielen bis zu 70,7 % Ausbeute. Dieses Amin lässt sich ebenfalls gut solvatisieren, besitzt jedoch eine höhere Basizität als das korrespondierende sekundäre Diocetylamin, weshalb die Ausbeuten höher sind. Lediglich in Kombination mit *n*-Pentan trat eine Aggregatbildung auf. Die maximale Ausbeute von Methyldidecylamin in *n*-Hexan liegt bei 17,0 %. In allen anderen Alkanen zeigte sich auf Grund der geringen Solvatisierung der Komplexe starke Aggregatbildung, weshalb keine Ausbeuten ermittelt werden konnten. Reaktivextraktionssysteme mit Dimethyldodecylamin liegen mit Extraktionsausbeuten von bis zu 24,9 % ebenfalls niedrig. Dieses Amin besitzt zwar eine mit zwölf Kohlenstoffatomen sehr lange Seitenkette, kann aber auf Grund der zwei Methylgruppen noch in geringem Umfang solvatisiert werden. Die Kombination mit *n*-Hexan führte dennoch zu starken Aggregaten, weshalb eine Bestimmung der Ausbeute auch hier nicht möglich war.

In einem letzten Teilexperiment wurden auch hier die Amine Dihexylamin (Alkylamin) und Diphenylamin (Arylamin) in Alkanen untersucht.

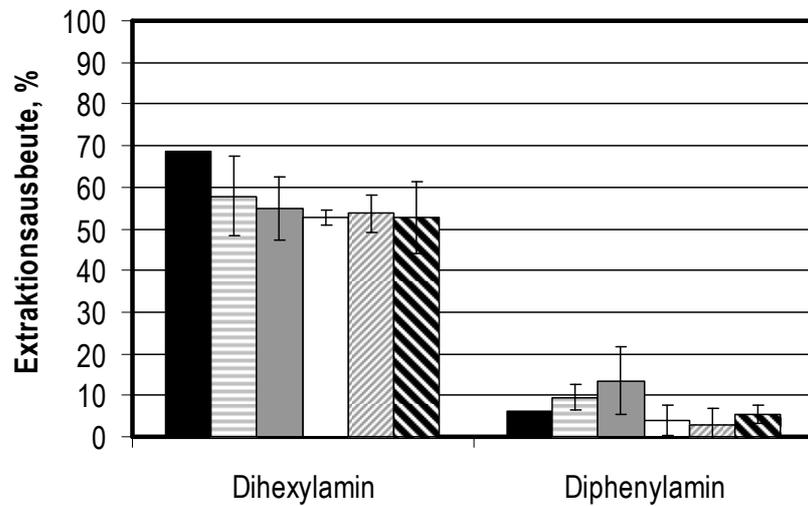


Abbildung 5-24: Vergleich der Extraktionsausbeuten eines sekundären Alkylamine (Dihexylamin) und eines sekundären Arylamine (Diphenylamin) in den unpolaren Lösungsmitteln *n*-Pentan ■, *n*-Hexan ▨, *n*-Heptan ▩, *n*-Decan □, *n*-Dodecan ▩ and Kerosin ▩. Extraktion von 0,5 molarer Bernsteinsäurelösung (pH 2,3) in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min. Eingesetzte Aminkonzentration 1,0 mol kg⁻¹ Lösungsmittel.

Hier zeigte sich, wie auch schon bei den Alkoholen (vgl. Abbildung 5-16), dass Diphenylamin in Alkanen signifikant geringere Ausbeuten liefert als Dihexylamin, obwohl beide Amine die gleiche Kohlenstoffanzahl besitzen. Diphenylamin, ein Aromat, hat eine deutlich geringere Basizität und eignet sich deshalb nur schlecht als Reaktivkomponente.

Zu den unpolaren Lösungsmitteln wird neben den Alkanen auch Toluol gezählt. Wie in Abbildung 5-25 dargestellt, zeigt Toluol in Reaktivextraktionssystemen mit den sekundären Aminen Dihexylamin und Dioctylamin mit 59,5 % und 61,8 % sowie Dibutylamin mit 11,6 % ähnlich hohe Ausbeuten wie die Kombination aus diesen Aminen mit Alkanen.

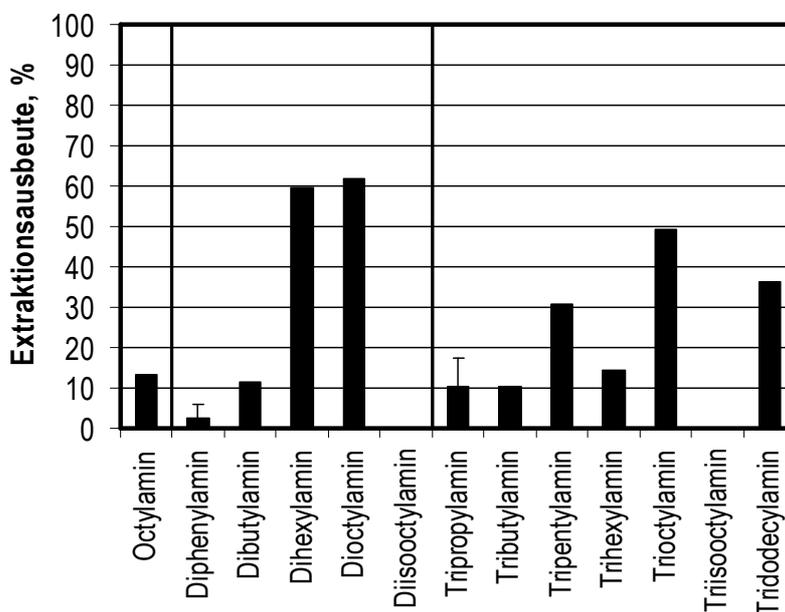


Abbildung 5-25: Extraktionsausbeuten primärer, sekundärer und tertiärer Amine im unpolaren aromatischen Lösungsmittel Toluol. Extraktion von 0,5 molarer Bernsteinsäurelösung (pH 2,3) in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min. Eingesetzte Aminkonzentration 1,0 mol kg⁻¹.

Auch hier nimmt die Extraktionsausbeute mit zunehmendem Alkylierungsgrad der Amine zu. Die Ausbeuten mit tertiären Aminen liegen mit maximal 49,2 % niedriger als mit den vergleichbaren sekundären Aminen. Insgesamt lassen sich Komplexe aus Bernsteinsäure und sekundären Aminen besser solvatisieren als Komplexe mit tertiären Aminen, wie bereits in Punkt 3.5.2 beschrieben. Auch das Arylamin Diphenylamin zeigt hier, wie in allen anderen untersuchten Lösungsmitteln, deutlich niedrigere Ausbeuten als das vergleichbare Dihexylamin. Die Isoformen Diisooctylamin und Triisooctylamin führten in Kombination mit Toluol zu einer starken Aggregatbildung, weshalb hier keine Werte angegeben werden konnten.

Alle untersuchten einfachen Reaktivextraktionssysteme sind zusammen mit ihren Extraktionsausbeuten im Anhang in Tabelle 12-11 nochmals zusammengefasst.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass polar-protische Lösungsmittel, wie Alkohole, die besten Lösungsmittel für die Reaktivextraktion von Bernsteinsäure darstellen, da sie die größte Solvatisierungsfähigkeit besitzen. Sie sind in der Lage mit den Amin-Bernsteinsäure-Komplexen Wasserstoffbrücken auszubilden und die Komplexe so zu stabilisieren. Alkohole eignen sich vor allem in Kombination mit langkettigen sekundären und tertiären Aminen mit einer Kettenlänge von sechs bis acht Kohlenstoffatomen für die Extraktion von Bernsteinsäure. Die maximalen Ausbeuten liegen bei diesen Reaktivextraktionssystemen mit Trihexylamin und Diisooctylamin bei bis zu 95 %.

Polar-aprotische Lösungsmittel wie Methylisobutylketon zeigen ähnlich hohe Ausbeuten wie Alkohole, da sie auf Grund ihrer Polarität gute Solvatisierungsmedien für die polaren Amin-Säure-Komplexe sind. Auch hier lassen sich die höchsten Extraktionsausbeuten mit langkettigen sekundären und tertiären Aminen (C₆ – C₈) erreichen. Das Maximum von 90 % kann ebenfalls mit Trihexylamin erzielt werden.

Unpolare (inerte) Lösungsmittel, wie Alkane und Toluol, zeigen nur sehr geringe Extraktionsausbeuten, da sie auf Grund ihrer unpolaren Eigenschaften die polaren Komplexe nur schlecht solvatisieren können. Hier sind lediglich sekundäre Amine geeignete Reaktivkomponenten, da diese eine höhere Basizität als primäre Amine besitzen, gleichzeitig jedoch auch besser solvatisiert werden können als tertiäre Amine. Die höchsten Ausbeuten von bis zu 93 % lassen sich hier mit Diisooctylamin erzielen.

Ein Vergleich der experimentell ermittelten Daten mit den in der Literatur (in Punkt 3.5.2) beschriebenen Tendenzen bestätigt, dass die Zunahme der Extraktionsausbeute mit zunehmendem Alkylierungsgrad und steigender Kettenlänge der Amine (\leq sechs Kohlenstoffatome) korreliert. Bei der Extraktion von Bernsteinsäure mit Alkoholen sind die maximalen Extraktionsausbeuten, wie erwartet, abhängig vom Alkylierungsgrad der Amine und von sterischen Effekten bei der Solvatisierung und folgen der Reihenfolge primär < sekundär > tertiär. Bei der Kombination von Aminen mit weniger polaren Lösungsmitteln wie Ketonen und Alkanen war auf Grund von Literaturdaten ein Anstieg der Extraktionsausbeuten mit zunehmendem Alkylierungsgrad analog zur Polarität reiner Amine (primär < sekundär < tertiär) zu erwarten. Für Methylisobutylketon konnte dies bestätigt werden.

In Alkanen verhielten sich die Extraktionsausbeuten mit Aminen jedoch anders als erwartet. Sowohl Reaktivextraktionssysteme mit primären als auch tertiären Aminen zeigten nur sehr geringe Ausbeuten für Bernsteinsäure. Lediglich mit sekundären Aminen konnte hier eine effiziente Isolierung der Säure erzielt werden. Die Ausbeuten folgen dementsprechend der Reihenfolge primär \approx tertiär < sekundär. Gründe für diese Reihenfolge sind die geringe Basizität von primären Aminen und die schlechte Solvatisierungsfähigkeit von Alkanen sowie die geringe Solvatisierung von tertiären Aminen durch sterische Effekte.

Obwohl eine Vielzahl einfacher effizienter Reaktivextraktionssysteme identifiziert werden konnte müssen hier zwei Einschränkungen gemacht werden.

In vielen der untersuchten Reaktivextraktionssysteme trat eine Aggregatbildung auf. Die Stärke der Aggregate variierte dabei zwischen leichten Aggregaten an der Phasengrenzfläche und einer kompletten Komplexierung beider vorhandenen Phasen. In Abbildung 5-26 ist das Auftreten und die Stärke der Aggregatbildung für die einfachen untersuchten Reaktivextraktionssysteme schematisch dargestellt.

	1-Butanol	1-Hexanol	1-Octanol	2-Octanol	1-Decanol	1-Dodecanol	MIBK	<i>n</i> -Pentan	<i>n</i> -Hexan	<i>n</i> -Heptan	<i>n</i> -Decan	<i>n</i> -Dodecan	Kerosin
Octylamin													
Dibutylamin													
Diethylamin													
Dioctylamin	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Diisooctylamin				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Diphenylamin								■	■	■	■	■	■
Tripropylamin													
Tributylamin													
Tripentylamin													
Trihexylamin													
Trioctylamin	■				■						■	■	■
Triisooctylamin	■										■	■	■
Tridodecylamin	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Methyldioctylamin	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■	■	■
Methyldidecylamin	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Dimethyldodecylamin	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■	■	■

Abbildung 5-26: Vorkommen und Stärke von Aggregaten bei der Extraktion mit einfachen Reaktivextraktionssystemen. Weiß entspricht keiner Aggregatbildung, schwarz starker Aggregatbildung -  +

Stark zur Aggregatbildung neigten vor allem Reaktivextraktionssysteme bestehend aus Alkanen und längerkettigen sekundären und tertiären Aminen. Die Stärke der Aggregatbildung stieg dabei mit zunehmender Kettenlänge der Alkane. Während bei *n*-Pentan teilweise nur leichte Aggregatbildung auftrat war diese bei Kerosin sehr stark. Dass vor allem die Kombinationen aus unpolaren Lösungsmitteln und langkettigen sekundären und tertiären Aminen zu Aggregaten führten, korreliert mit den bereits von der Arbeitsgruppe von Tamada und King (1990b) gezeigten Daten. Grund hierfür ist die

geringe Solvatisierungsfähigkeit der Alkane und die schlechte Solvatisierbarkeit der Amin-Säure-Komplexe bestehend aus langkettigen Aminen.

Auch langkettige Alkohole führten in Kombination mit langkettigen (mindestens acht Kohlenstoffatome) Aminen zu Aggregaten. Diese waren allerdings deutlich weniger stark ausgeprägt als bei den Alkanen. Kurzkettige Alkohole waren hingegen in der Lage nahezu alle untersuchten Amine in ihrer Komplexform mit der Bernsteinsäure zu solvatisieren.

Methylisobutylketon zeigte ebenfalls nur wenig Aggregatbildung in Kombination mit den tertiären Aminen Tridodecylamin und Methyldeceylamin. Etwas stärkere Aggregatbildung trat bei den Reaktivextraktionssystemen aus dem Keton mit sekundären Aminen auf. Nur Dibutylamin, Diphenylamin und das primäre Amin Octylamin lieferten hier eine Extraktion ohne Aggregate.

Unabhängig vom Lösungsmittel neigten tertiäre und sekundäre unverzweigte Amine ab einer Kettenlänge von acht Kohlenstoffatomen zu Aggregaten. Kurzkettigere sekundäre und tertiäre Amine genauso wie das primäre Octylamin zeigten keine Aggregatbildung. Die Solvatisierung des Amin-Säure-Komplexes funktionierte hier auf Grund der einzigen Seitenkette des Octylamins und der kurzen Ketten der anderen Amine relativ gut. Bei den Reaktivextraktionssystemen mit tertiären Aminen mit unterschiedlichen Seitenketten traten in Kombination mit jedem Lösungsmittel bei der Extraktion von Bernsteinsäure Aggregate auf.

Insgesamt zeigten somit 45 % aller untersuchten einfachen Reaktivextraktionssysteme eine Aggregatbildung. Je nach Stärke und Stabilität der Aggregate sind diese Reaktivextraktionssysteme für einen späteren Prozess im Zentrifugalextraktor problematisch und teilweise nicht einsetzbar, da die Bernsteinsäure nicht in die organische Phase überführt wird, sondern in einer Art dritten Phase vorliegt (vgl. Tamada und King 1990b). Des Weiteren kann eine Aggregatbildung zu Problemen bei der Phasentrennung führen.

Gerade Kombinationen aus Aminen und kurzkettigen Alkoholen (1-Butanol, 1-Hexanol) oder Ketonen lieferten im 1. Auswahlprüfverfahren nach einfachen Reaktivextraktionssystemen die höchsten Ausbeuten. Auf Grund der vergleichsweise hohen Wasserlöslichkeit dieser Lösungsmittel (siehe Tabelle 12-10 im Anhang), sind diese Reaktivextraktionssysteme jedoch nicht optimal für eine Reaktivextraktion von Bernsteinsäure geeignet. Vor allem 1-Butanol ist mit $1,04 \text{ mol L}^{-1}$ noch stark wasserlöslich. Die Wasserlöslichkeit von 1-Hexanol liegt mit $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ und von Methylisobutylketon mit $0,19 \text{ mol L}^{-1}$ niedriger. Im Vergleich zu den anderen Lösungsmitteln mit Löslichkeiten bis maximal $8,6 \text{ mmol L}^{-1}$ jedoch noch deutlich höher.

Betrachtet man nur die einfachen Reaktivextraktionssysteme ohne Aggregatbildung, ohne den Lösungsmitteln mit hoher Wasserlöslichkeit und mit mindestens 80 % Ausbeute, sind die in

Abbildung 5-27 dargestellten Reaktivextraktionssysteme die effizientesten für die Extraktion von Bernsteinsäure aus einer wässrigen Phase.

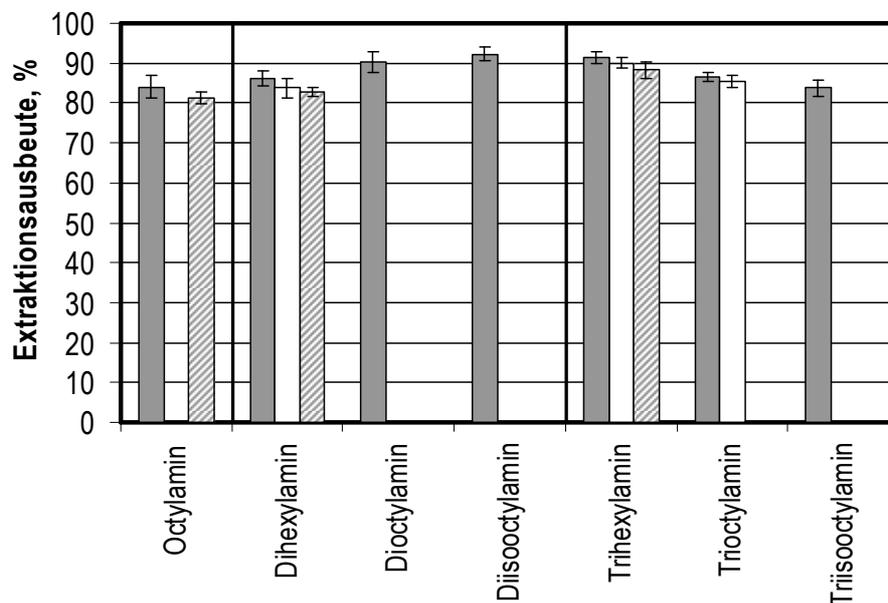


Abbildung 5-27: Beste einfache Reaktivextraktionssysteme ohne Aggregatbildung bestehend aus einem primären, sekundären oder tertiären Amin und einem der nicht wasserlöslichen Lösungsmittel 1-Octanol ■, 1-Decanol □ oder 1-Dodecanol ▨. Die Bernsteinsäurekonzentration betrug $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ bei einem pH von 2,3 und die Aminkonzentration $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel. Die Extraktion erfolgte in der Schwingmühle bei 30 Hz für 10 min in 1,5 mL-Glasfläschchen.

Trihexylamin und Dihexylamin sind dabei die einzigen Amine, die in Kombination mit allen langkettigen Alkoholen hohe Ausbeuten ohne Aggregatbildung erzielten. Ebenfalls hohe Ausbeuten zeigten die Kombination aus Dioctylamin und Diisooctylamin mit 1-Octanol mit 90,3 % und 92,3 %. Bei den Reaktivextraktionssystemen mit diesen Aminen und langkettigeren Alkoholen kam es jedoch zu Aggregaten. Mit Octylamin, Dihexylamin, Trioctylamin und Triisooctylamin in Kombination mit Alkoholen lassen sich mit 81,2 % bis 86,5 % etwas niedrigere Ausbeuten erzielen. Die besten identifizierten einfachen Reaktivextraktionssysteme mit Ausbeuten zwischen 89,9 % und 92,3 % und Verteilungskoeffizienten K zwischen 8,9 - 12,0 % sind dementsprechend die Reaktivextraktionssysteme:

1. Diisooctylamin + 1-Octanol ($E(\%) = 92,3 \%$, $K = 12,0$)
2. Trihexylamin + 1-Octanol ($E(\%) = 91,5 \%$, $K = 10,8$)
3. Dioctylamin + 1-Octanol ($E(\%) = 90,3 \%$, $K = 9,3$)
4. Trihexylamin + 2-Octanol ($E(\%) = 89,9 \%$, $K = 8,9$)
5. Trioctylamin + 1-Octanol ($E(\%) = 86,5 \%$, $K = 6,4$) (Hong und Hong 2000b, Hong *et al.* 2002)

Das Reaktivextraktionssystem mit Trioctylamin in 1-Octanol ist das bereits in der Literatur (Hong und Hong 2000b, Hong *et al.* 2002) beschriebene Reaktivextraktionssystem. Es konnten dementsprechend vier Reaktivextraktionssysteme mit höheren Extraktionsausbeuten für Bernsteinsäure identifiziert werden, als das beste bisher in der Literatur beschriebene Reaktivextraktionssystem.

Obwohl mit Diisooctylamin in 1-Octanol geringfügig höhere Ausbeuten als mit Trihexylamin in 1-Octanol erzielt werden konnten, wurde für die nähere Charakterisierung und die Untersuchungen im Zentrifugalextraktor das Reaktivextraktionssystem mit Trihexylamin gewählt. Grund hierfür war, dass Diisooctylamin in Kombination mit den längerkettigen Alkoholen, wie 1-Decanol und 1-Dodecanol, zur Aggregatbildung neigte, während das Reaktivextraktionssystem mit Trihexylamin (im Folgenden mit T1 abgekürzt) in allen langkettigen Lösungsmitteln eine geeignete Reaktivkomponente bei der Reaktivextraktion von Bernsteinsäure war. Hinzu kam, dass Diisooctylamin in Kombination mit 1-Octanol bei höheren Aminkonzentrationen und anderen untersuchten Extraktionsbedingungen ebenfalls häufig leichte Aggregate aufwies.

Die anderen in Abbildung 5-27 dargestellten Reaktivextraktionssysteme mit etwas niedrigeren Ausbeuten sollen hier nicht näher untersucht werden, könnten jedoch ebenfalls interessant für einen späteren Prozess sein.

5.3.2 Komplexe Reaktivextraktionssysteme

Um die Problematik der Aggregatbildung mancher Reaktivextraktionssysteme und die Menge an wasserlöslichem Lösungsmittel zu reduzieren, wurde ein zweites Auswahlprüfverfahren nach weiteren geeigneten Reaktivextraktionssystemen durchgeführt. Hier sollten komplexe Reaktivextraktionssysteme (Kombinationen von zwei Aminen und zwei Lösungsmitteln) untersucht werden. Durch eine Kombination von polaren und unpolaren Lösungsmitteln sollte die Aggregatbildung durch eine bessere Solvatisierung der Komplexe auf Grund des polaren Lösungsmittels vermieden und eine Reduzierung der Wasserlöslichkeit durch einen Teilersatz des polaren wasserlöslichen Lösungsmittels durch unpolares Lösungsmittel erzielt werden. Da hier auf Grund der hohen Anzahl an Variablen (16 Amine, 16 Lösungsmittel und deren Konzentrationen) theoretisch 3.317.760.000 verschiedene Kombinationen für ein Reaktivextraktionssystem möglich waren, wurde die Versuchsplanung mittels der Software GAME.opt (siehe Kapitel 4.3) durchgeführt (Link und Weuster-Botz, 2006).

In folgender Abbildung 5-28 sind die Pareto-Fronten der Generationen 1 bis 8 dargestellt. Auf Darstellung der Standardabweichung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Die Abweichungen lagen hier in der Regel bei maximal 5 % bei einem dreifachen Versuchsansatz. Die Extraktionsbedingungen wurden mit einer Konzentration der Bernsteinsäure von $0,847 \text{ mol L}^{-1}$ und einem pH von 4,0 so gewählt, dass sie den Bedingungen einer realen Fermentation gleichkamen und ausreichend Spielraum für eine Optimierung ließen. Deshalb lagen die Ausbeuten auf Grund der veränderten Extraktionsbedingungen niedriger als im Experiment mit den einfachen Reaktivextraktionssystemen. Die genaue Zusammensetzung aller untersuchten Reaktivextraktionssysteme der insgesamt acht durchgeführten Generationen ist in Tabelle 12-12 im Anhang zu finden.

Die Reaktivextraktionssysteme der 1. Generation liegen über den gesamten Aminkonzentrationsbereich von $0 - 1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ verteilt. Je höher die Aminkonzentration, desto höher ist auch die Extraktionsausbeute. Die höchste Ausbeute lässt sich dementsprechend mit 41,2 % bei einer Aminkonzentration von $0,867 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel erzielen. In der 2. Generation zeigen die Reaktivextraktionssysteme auf der Pareto-Front ein ähnliches Verhalten. Insgesamt fünf der acht Reaktivextraktionssysteme stammen aus Generation 2. In Generation 3 ist die Verteilung ein wenig in Richtung niedrigerer Aminkonzentrationen verschoben. Sechs Reaktivextraktionssysteme der Pareto-Front stammen aus Generation 3, drei aus Generation 2 und nur noch eins aus Generation 1. Das Maximum kann hier bereits mit einer Aminkonzentration von $0,7 \text{ mol kg}^{-1}$ erzielt werden und beträgt 1,3 %. Auch in der 4. Generation ist ein Voranschreiten der Pareto-Front beobachtbar. Sieben Reaktivextraktionssysteme stammen aus dieser Generation, drei aus der 3. Generation und keines kommt mehr aus den ersten beiden Generationen.

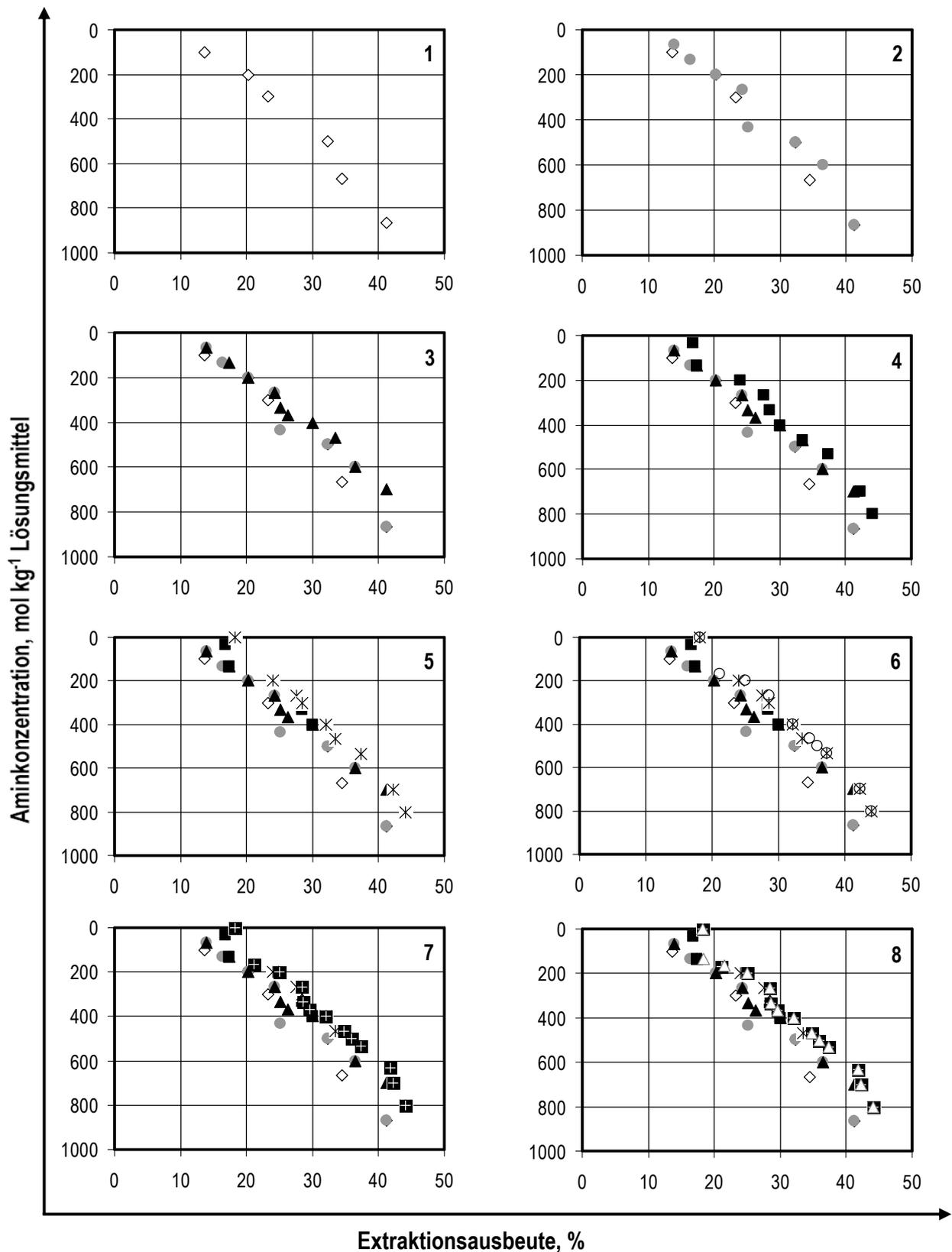


Abbildung 5-28: Darstellung der Pareto-Fronten der Generationen 1 \diamond , 2 \bullet , 3 \blacktriangle , 4 \blacksquare , 5 \times , 6 \circ , 7 \blacksquare und 8 \triangle des Auswahlprüfverfahrens nach komplexen Reaktivextraktionssystemen mit GAME.opt. Die Extraktion erfolgte in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz und 10 min. Die Bernsteinsäurekonzentration betrug 0,847 mol L⁻¹ bei einem pH von 4,0. Die Gesamaminkonzentration variierte zwischen 0 und 1,0 mol kg⁻¹ Lösungsmittel.

In Generation 5 können drei neue Reaktivextraktionssysteme in die Pareto-Front aufgenommen werden. Ein neues Maximum von 44,0 % wird bei einer Aminkonzentration von $0,8 \text{ mol kg}^{-1}$ erreicht. In Generation 6 können höhere Ausbeuten vor allem für niedrige Aminkonzentrationen erzielt werden. Sechs neue Individuen der 6. Generation befinden sich in der Pareto-Front. Ein neues Maximum wird jedoch nicht erreicht. Ähnlich verhalten sich die Reaktivextraktionssysteme der 7. und 8. Generation. Einige Ausbeuten liegen höher als in den vorangegangenen Generationen. Ein neues Maximum wird jedoch auch hier nicht erreicht. Da keine deutlichen Verbesserungen mehr erzielt werden konnten, wurde dieses Auswahlprüfverfahren nach der 8. Generation abgebrochen.

Um die besten Reaktivextraktionssysteme nach der 8. Generation mit den besten einfachen Reaktivextraktionssystemen vergleichen zu können, wurde eine weitere Extraktion unter anderen Extraktionsbedingungen durchgeführt. Die Aminkonzentration der Reaktivextraktionssysteme wurde auf $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel eingestellt, wobei das Verhältnis zwischen den zwei Aminen eines Reaktivextraktionssystems beibehalten wurde. Die Reaktivextraktionssysteme wurden anschließend zusammen mit den beiden besten einfachen Reaktivextraktionssystemen für die Extraktion von Bernsteinsäure aus einer wässrigen Lösung mit einer Konzentration von $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ und einem pH von 2,0 eingesetzt. Das Ergebnis ist Abbildung 5-29 zu entnehmen.

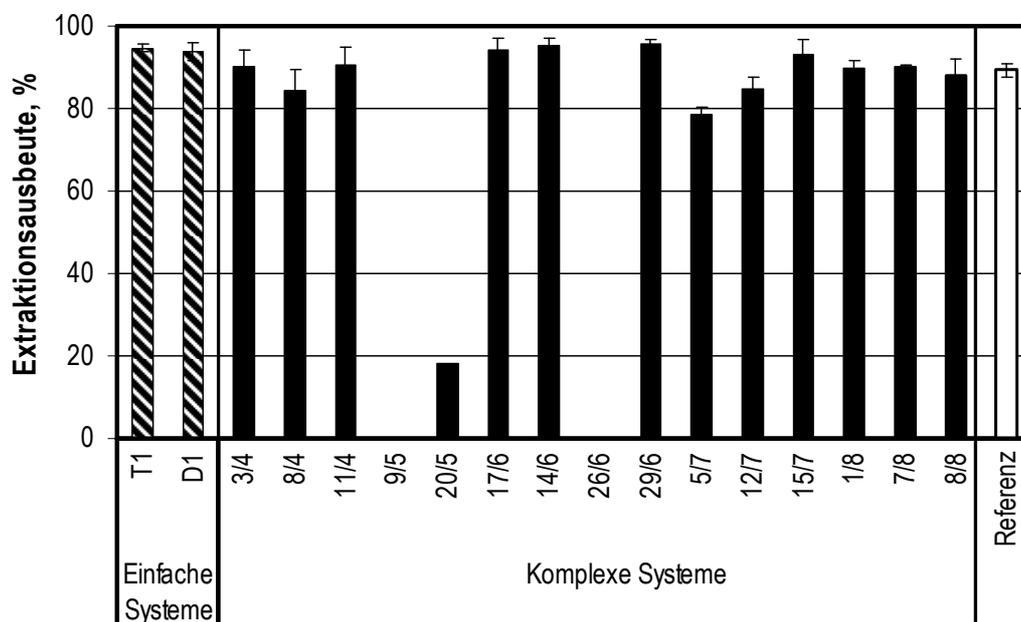


Abbildung 5-29: Darstellung der besten zwei einfachen Reaktivextraktionssysteme \square zusammen mit den effizientesten komplexen Reaktivextraktionssystemen \blacksquare und der Referenz Trioctylamin in 1-Octanol \square . Die Extraktion erfolgte in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz und 10 min. Die Bernsteinsäurekonzentration betrug $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ bei einem pH von 2,0. Die Gesamtaminkonzentration wurde auf $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel eingestellt.

In Schwarz dargestellt sind die besten komplexen Reaktivextraktionssysteme nach der 8. Generation des zweiten Auswahlprüfverfahrens. Das Reaktivextraktionssystem 20/5 liegt mit 18 % sehr niedrig, da es nur aus den Lösungsmitteln *n*-Pentan und *n*-Hexan besteht und kein Amin vorhanden ist. Alle anderen komplexen Reaktivextraktionssysteme zeigen mit Ausbeuten zwischen 78 - 96 % gute Extraktionsleistungen. Verglichen zur Referenz mit Trioctylamin in 1-Octanol (89,4 %; $K = 7,7$) erzielen vor allem die Reaktivextraktionssysteme 14/6 mit 95,2 %, 29/6 mit 95,5 %, 17/6 mit 94,1 % und 15/7 mit 93,2 % deutlich höhere Ausbeuten. Die einfachen Reaktivextraktionssysteme liegen mit Extraktionsausbeuten für Bernsteinsäure mit 94,7 % ($K = 17,9$) für das System T1 und 93,7 % für das Reaktivextraktionssystem Diisooctylamin in 1-Octanol ebenfalls über der Referenz und in derselben Höhe wie die effizientesten komplexen Reaktivextraktionssysteme. Die Reaktivextraktionssysteme 9/5 und 26/6 zeigten bei diesen Bedingungen Aggregatbildung und sind hier deshalb nicht abgebildet.

Für eine Optimierung im Zentrifugalextraktor wurde das Reaktivextraktionssystem 29/6 gewählt, welches unter diesen sowie unter anderen untersuchten Bedingungen die höchsten Ausbeuten von 95,5 % ($K = 21,2$) aufwies. Dieses Reaktivextraktionssystem sollte deshalb im Vergleich zum einfachen Reaktivextraktionssystem T1 näher charakterisiert und untersucht werden. Betrachtet man diese beiden Reaktivextraktionssysteme im Hinblick auf ihre Biokompatibilität so ist festzustellen, dass sowohl Reaktivextraktionssystem T1 (Trihexylamin, 1-Octanol) als auch Reaktivextraktionssystem 29/6 (Diisooctylamin, Dihexylamin, 1-Hexanol, 1-Octanol) aus Aminen und Lösungsmitteln bestehen, die nicht biokompatibel sind (vgl. Punkt 5-2). Diese Reaktivextraktionssysteme eignen sich zwar für eine Extraktion der Bernsteinsäure mit hohen Ausbeuten, eine Rückführung des abgereicherten Fermentationsüberstands nach der Extraktion ist hier allerdings nicht möglich. Um dennoch Reaktivextraktionssysteme zu identifizieren, die hohe Ausbeuten liefern und eine hohe Biokompatibilität aufweisen, wurde ein drittes Auswahlprüfverfahren nach biokompatiblen Reaktivextraktionssystemen durchgeführt.

5.3.3 Biokompatible Reaktivextraktionssysteme

Für das Auswahlprüfverfahren nach neuen biokompatiblen Reaktivextraktionssystemen mit hoher Ausbeute wurden nur Amine und Lösungsmittel eingesetzt, die in vorangegangenen Versuchen im Schüttelkolben keinen oder nur einen sehr geringen negativen Einfluss auf die Wachstumsrate der potentiellen Produktionsstämme zeigten (vgl. Abbildung 5-9 und Abbildung 5-10). Dies waren die Amine Tridodecylamin, Tributylamin, Tripropylamin und Triisooctylamin sowie die unpolaren Lösungsmittel *n*-Pentan, *n*-Hexan, *n*-Heptan, *n*-Decan, *n*-Dodecan, Kerosin und Toluol. Auch hier waren Aminkonzentrationen zwischen 0 und 1,0 mol kg⁻¹ Lösungsmittel für die Extraktion von Bernsteinsäure

(Konzentration $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,3) möglich. Die genaue Zusammensetzung aller untersuchten Reaktivextraktionssysteme ist im Anhang in Tabelle 12-13 zu finden. Das Voranschreiten der Pareto-Front von Generation 1 - 6 des dritten Auswahlprüfverfahrens mit GAME.opt ist in Abbildung 5-30 zusammengefasst.

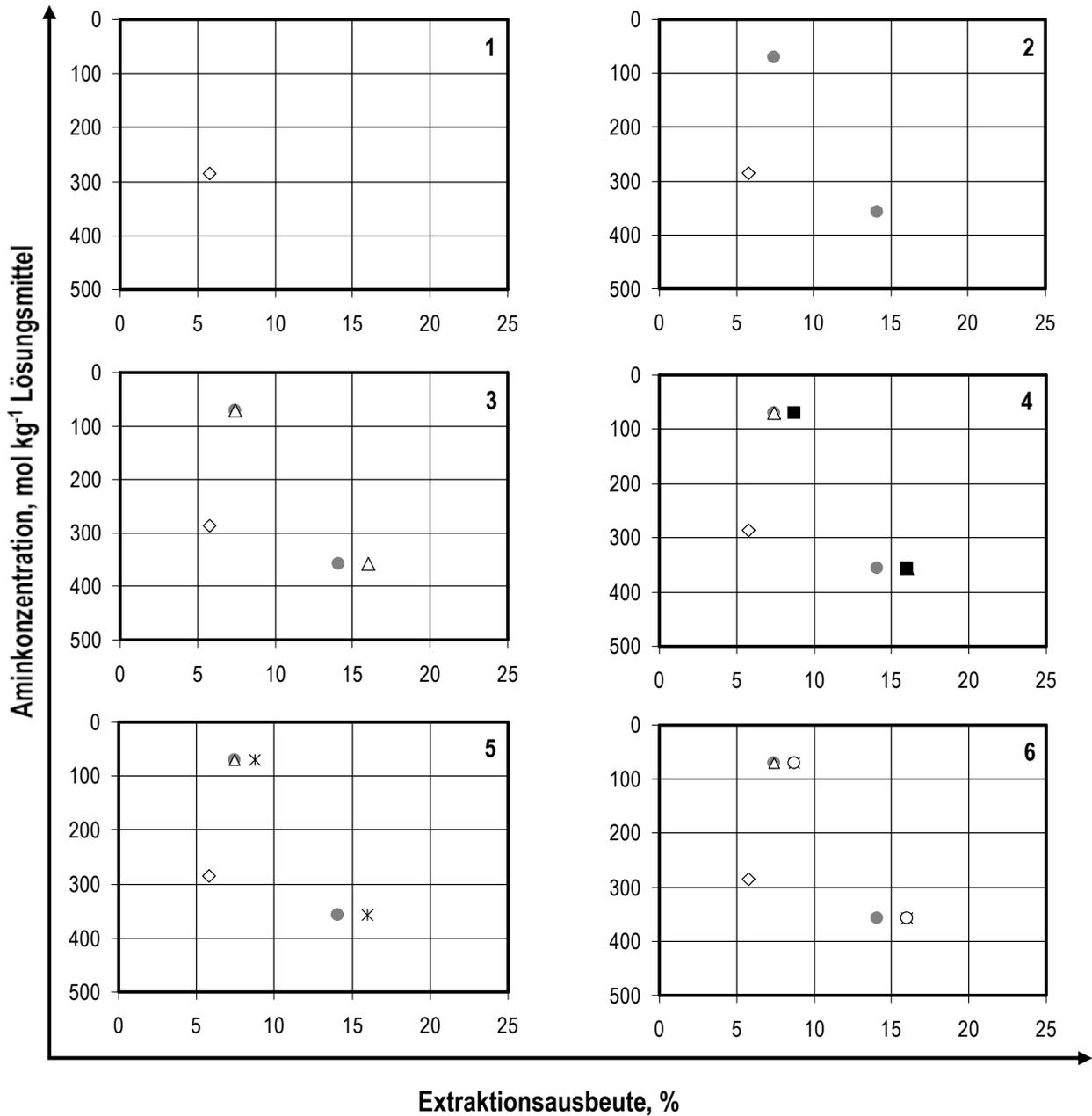


Abbildung 5-30: Darstellung der Pareto-Fronten der Generationen 1 \diamond , 2 \bullet , 3 \blacktriangle , 4 \blacksquare , 5 \ast und 6 \circ des Auswahlprüfverfahrens nach biokompatiblen Reaktivextraktionssystemen mit GAME.opt. Die Extraktion erfolgte in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz und 10 min. Die Bernsteinsäurekonzentration betrug $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ bei einem pH von 2,3. Die Gesamtaminkonzentration variierte zwischen 0 und $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel.

In Generation 1 wird nur ein Reaktivextraktionssystem gefunden, das die höchste Ausbeute mit der niedrigsten Aminkonzentration erzielt. In der 2. Generation liefern zwei Reaktivextraktionssysteme höhere Ausbeuten. Das Maximum der Ausbeute liegt hier mit 14,1 % bei einer Aminkonzentration von $0,357 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel. Auch in Generation 3 ist ein Voranschreiten der Pareto-Front zu beobachten. Das Maximum mit 16,0 % liegt hier ebenfalls bei einer Aminkonzentration von $0,357 \text{ mol kg}^{-1}$. In den Generationen 4 - 6 war keine Verbesserung der Reaktivextraktionssysteme mehr möglich, weshalb das 3. Auswahlprüfverfahren nach der 6. Generation abgebrochen wurde.

Die besten vier Reaktivextraktionssysteme 5/2 (A), 7/2 (B), 10/3 (C) und 14/4 (D) zeigen mit insgesamt maximal 16,0 % ($K \approx 0,2$) unter den hier eingestellten Bedingungen sehr niedrige Ausbeuten. Auch unter zu den anderen Auswahlprüfverfahren vergleichbaren Bedingungen ($1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel, Bernsteinsäure $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) liefern die Reaktivextraktionssysteme A mit maximal 13,5 %, B mit 12,0 %, C mit 19,0 % und D mit 22,1 % ($K = 0,3$) nur niedrige Ausbeuten und sind deshalb in einem einstufigen Ansatz nicht rentabel genug. Um höhere Ausbeuten zu erreichen würde hier eine mehrstufige Extraktion, wie in Abbildung 5-31 exemplarisch für Reaktivextraktionssystem D dargestellt, Sinn machen. Hierbei wurde die wässrige Bernsteinsäurelösung mehrfach mit neuem Reaktivextraktionssystem D extrahiert. Die Phasen wurden nach jeder Extraktion voneinander getrennt, die organische Phase verworfen und die wässrige Phase erneut extrahiert. Das Phasenverhältnis von wässriger zu organischer Phase betrug dabei in jedem Zyklus 1:1.

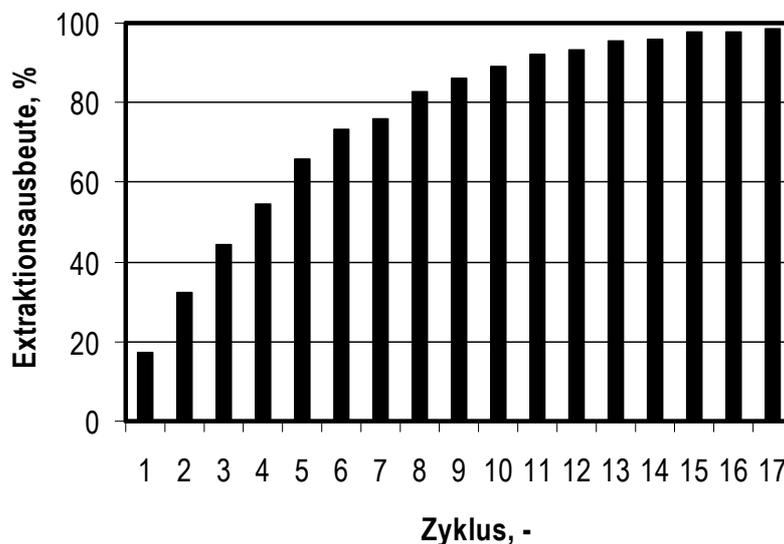


Abbildung 5-31: Mehrstufige Extraktion mit dem biokompatiblen Reaktivextraktionssystem D mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel, einer Bernsteinsäurekonzentration von $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ und einem pH von 2,0. Die Extraktionen erfolgten in Glasflaschen auf einer Mehrfachrührplatte bei 600 min^{-1} für 1,5 h.

Um 98,5 % Extraktionsausbeute zu erreichen sind mit Reaktivextraktionssystem D mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ 17 Zyklen notwendig. Dies ist für einen späteren Prozess durch eine mehrstufige Reaktivextraktion zu bewerkstelligen, jedoch mit hohen Kosten und einem hohen Volumen der organischen Phase verbunden. Vorteil ist die Biokompatibilität des Reaktivextraktionssystems, die eine Rezyklierung des abgereicherten Fermentationsüberstands ermöglicht.

Auf Grund der niedrigen Ausbeute im einstufigen Ansatz wird im Rahmen dieser Arbeit jedoch weder das hier gezeigte Reaktivextraktionssystem D noch eines der anderen biokompatiblen Reaktivextraktionssysteme näher charakterisiert oder optimiert.

5.3.4 Zusammenfassung und Diskussion

Für die Identifikation geeigneter Reaktivextraktionssysteme für Bernsteinsäure aus einer wässrigen Lösung wurden insgesamt drei Auswahlprüfverfahren durchgeführt. Dabei konnten sowohl einfache (Kombination aus einem Amin und einem Lösungsmittel) als auch komplexe (Kombination aus zwei Aminen und zwei Lösungsmitteln) Reaktivextraktionssysteme identifiziert werden, die höhere Ausbeuten, als das beste in der Literatur beschriebene Reaktivextraktionssystem (Triooctylamin in 1-Octanol) liefern. Mit Aminkonzentrationen von $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel zeigten das einfache Reaktivextraktionssystem T1 mit 94,7 % ($K = 17,9$) und das komplexe Reaktivextraktionssystem 29/6 mit 95,5 % ($K = 21,2$) hohe Ausbeuten im einstufigen Ansatz. Die Zusammensetzung beider Reaktivextraktionssysteme ist in Tabelle 5-2 aufgeführt.

Tabelle 5-2: Zusammensetzung der Reaktivextraktionssysteme T1 und 29/6

Reaktivextraktions-system	Komponenten	Volumenanteil, mL L^{-1}	Konzentration, mol L^{-1}
29/6	Diisooctylamin	101,66	0,34
	Dihexylamin	79,04	0,34
	1-Octanol	162,25	1,03
	1-Hexanol	657,06	5,27
T1	Trihexylamin	217,19	0,64
	1-Octanol	783,54	4,99

Diese beiden Reaktivextraktionssysteme eignen sich auf Grund ihrer mangelnden Biokompatibilität (auf die Wachstumsrate und nicht auf die Produktbildung bezogen) allerdings nur für einen Prozess ohne Rückführung des abgereicherten Fermentationsüberstands nach der Extraktion. Für einen Prozess mit

Rückführung wurden deshalb in einem dritten Auswahlprüfverfahren biokompatible Systeme identifiziert. Diese zeigten jedoch mit maximal 22 % ($K = 0,3$) bei einer Aminkonzentration von $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ nur sehr geringe Ausbeuten im einstufigen Ansatz. Durch eine mehrstufige Extraktion konnten innerhalb von etwa 17 Zyklen exemplarisch mit dem biokompatiblen Reaktivextraktionssystem D (Aminkonzentration $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$) 98,5 % der Säure extrahiert werden. Die hohe Stufenanzahl führt dabei zu hohen Volumina, die anschließend rückextrahiert werden müssen. Für eine nähere Charakterisierung und Optimierung im L-Maßstab wurden deshalb nur die beiden Reaktivextraktionssysteme T1 und 29/6 gewählt.

5.4 Reaktionstechnische Untersuchungen ausgewählter Reaktivextraktionssysteme

Bevor der Einsatz des einfachen Reaktivextraktionssystems T1 und des komplexen Reaktivextraktionssystems 29/6 im Zentrifugalextraktor untersucht wurden, erfolgte eine Charakterisierung und eine Optimierung im Milliliter-Maßstab. Hierfür wurden folgende Parameter untersucht:

- Extraktionskinetik in der Schwingmühle
- Maximalbeladung der Reaktivextraktionssysteme
- Mehrstufige Extraktion
- Ausbeute mit Fermentationsüberstand
- Einfluss von Ionen
- Koextraktion anderer organische Säuren

Extraktionskinetik

Die Extraktionskinetik der Reaktivextraktionssysteme wurde in der Schwingmühle bei 30 Hz für 10, 30 und 60 Sekunden Extraktionszeit bestimmt. Das Ergebnis ist Abbildung 5-32 zu entnehmen.

Bei 9 Hz Schüttelfrequenz kann bei jeder der untersuchten Extraktionszeiten sowohl für Reaktivextraktionssystem T1 als auch für System 29/6 das Gleichgewicht erreicht werden. Die Ausbeute liegt hier für die niedrigere Aminkonzentration bei 90,1 % (T1) und 92,8 % (29/6) und für die höhere Aminkonzentration von 1,5 mol kg⁻¹ bei 93,1 % und 94,2 %. Mit zunehmender Extraktionszeit kann dieses Gleichgewicht bereits bei niedrigeren Schüttelfrequenzen erreicht werden. Vergleicht man die Reaktivextraktionssysteme 29/6 und T1 miteinander, so lässt sich feststellen, dass das Reaktivextraktionssystem T1 etwas langsamer Bernsteinsäure aufnehmen kann als System 29/6. Lässt sich das Gleichgewicht mit Reaktivextraktionssystem 29/6 bei 60 s Extraktionszeit bereits bei 3 Hz im Fall des 1,5 mol kg⁻¹ Reaktivextraktionssystems und bei 6 Hz im Fall des 1,0 mol kg⁻¹ Systems erreichen, sind es bei T1 in beiden Fällen 9 Hz. Grund hierfür ist die schnellere Solvatisierung der Amin-Bernsteinsäure-Komplexe durch das in Reaktivextraktionssystem 29/6 enthaltene 1-Hexanol und die etwas unterschiedliche Dispergierung der beiden Reaktivextraktionssysteme in der wässrigen Phase.

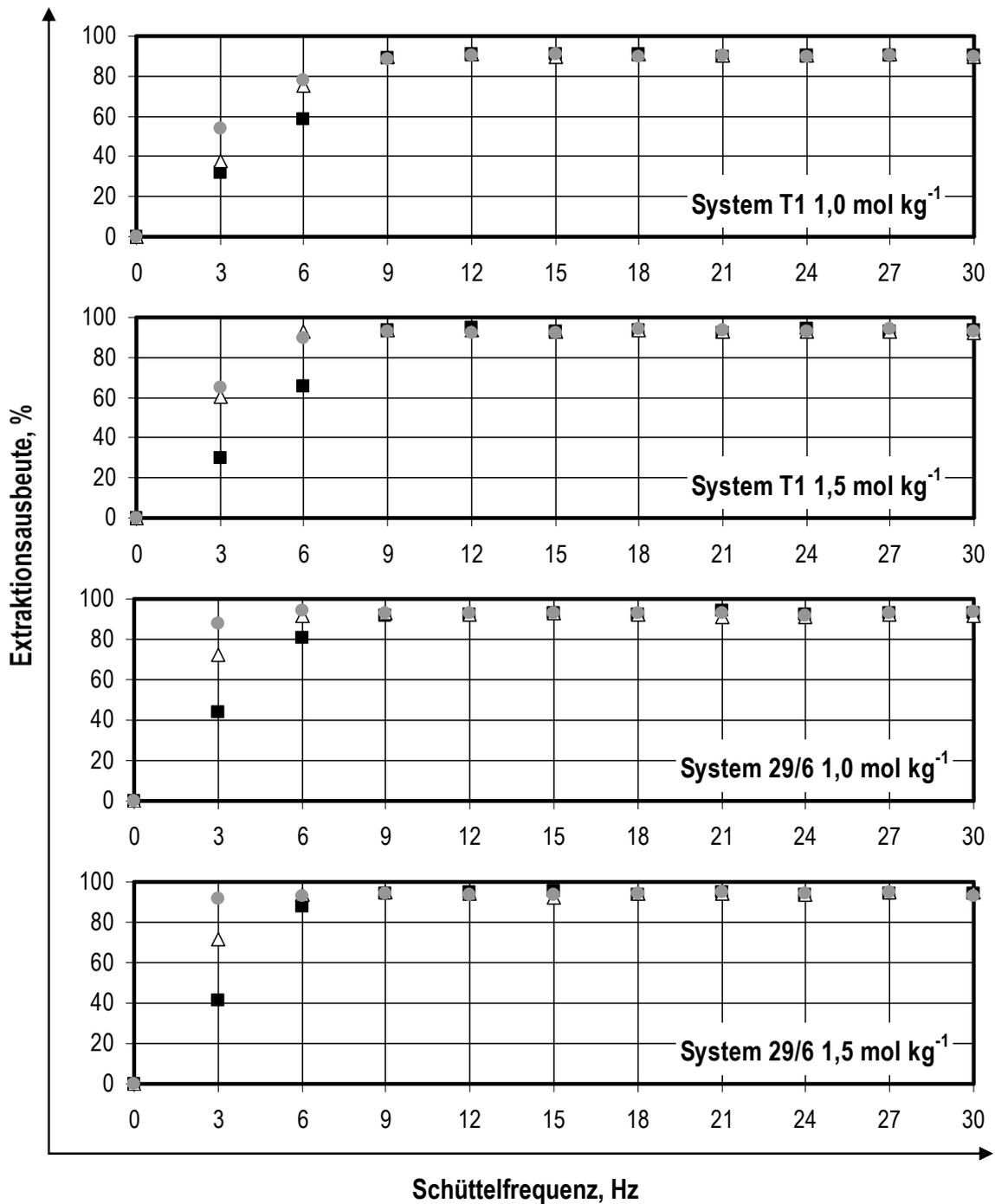


Abbildung 5-32: Extraktionskinetik/Durchmischungszeit bei der Extraktion mit den Reaktivextraktions-systemen T1 und 29/6 in der Schwingmühle in 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei steigender Frequenz und einer Extraktionszeit von 10 ■, 30 △ und 60 ● Sekunden. Die Aminkonzentration betrug 1,0 oder 1,5 mol kg⁻¹ Lösungsmittel.

Maximalbeladung

Neben der Geschwindigkeit der Extraktion ist von großer Bedeutung mit welcher maximalen Menge an Bernsteinsäure die Reaktivextraktionssysteme beladen werden können. Hierfür wurde die organische Phase (Reaktivextraktionssystem T1 oder 29/6) insgesamt zehnmal mit Bernsteinsäure mit einer Konzentration von $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ und einem pH von 2,0 oder einer Konzentration von $0,847 \text{ mol L}^{-1}$ und einem pH von 4,0 beladen. Die Extraktion erfolgte in 100 mL Glasgefäßen auf einer Mehrfachrührplatte für 1,5 h bei 600 min^{-1} . In Abbildung 5-33 sind die Maximalbeladungen der organischen Phase bei der Extraktion von $0,423 \text{ molarer}$ Bernsteinsäure und einem pH von 2,0 dargestellt. Die extrahierte Bernsteinsäure wird dabei in mol extrahierte Säure pro mol Amin betrachtet.

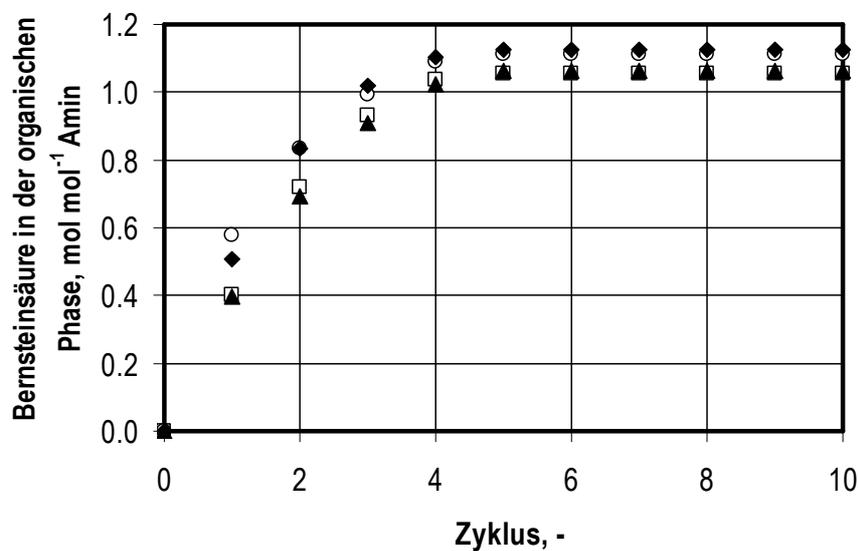


Abbildung 5-33: Maximale Beladung der Reaktivextraktionssysteme T1 mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ O}$ und $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel \square und 29/6 mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ ◆}$ und $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel \blacktriangle . Dargestellt ist die extrahierte Menge an Bernsteinsäure pro mol Amin. Die Extraktion erfolgte in 100 mL-Glasgefäßen bei 600 min^{-1} für 1,5 h. Die Bernsteinsäurekonzentration in der wässrigen Phase betrug $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ bei pH 2,0.

Unabhängig vom eingesetzten Reaktivextraktionssystem und der Aminkonzentration ist eine Beladung der organischen Phasen bis zum 5. Zyklus möglich. Für eine noch höhere Beladung reicht das Konzentrationsgefälle der Säure ab dem 5. Zyklus nicht mehr aus, was in konstanten Bernsteinsäurekonzentrationen in der organischen Phase von Zyklus 6 - 10 resultiert. Die maximalen Beladungen liegen hier für das Reaktivextraktionssystem T1 und das Reaktivextraktionssystem 29/6 mit Aminkonzentrationen von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ bei $1,06 \text{ mol}$ Bernsteinsäure pro mol Amin. Mit den Reaktivextraktionssystemen T1 und 29/6 mit $1,5 \text{ mol Amin L}^{-1}$ sind Beladungen bis zu $1,11 - 1,12 \text{ mol}$ Bernsteinsäure pro mol Amin zu erzielen. Damit wurden im Durchschnitt pro mol Amin bis zu $1,1 \text{ mol}$ Bernsteinsäure extrahiert. Es können dementsprechend nicht nur 1,1-Komplexe von Amin und Säure

entstanden sein. Knapp 10 % der Amine müssen zwei Bernsteinsäuremoleküle für diese Beladung gebunden haben (2,1-Komplexe).

Da in einem späteren Prozess von einem höheren pH und höheren Bernsteinsäurekonzentrationen auszugehen ist, wurde zusätzlich die Maximalbeladungen der Reaktivextraktionssysteme mit 0,847 molarer Bernsteinsäure und einem pH von 4,0 untersucht (siehe Abbildung 5-34).

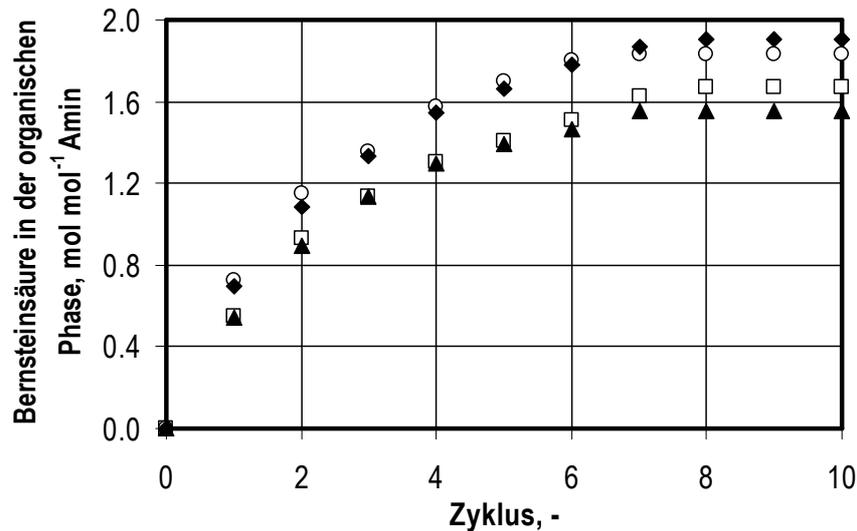


Abbildung 5-34: Maximale Beladung der Reaktivextraktionssysteme T1 mit einer Aminkonzentration von 1,0 ○ und 1,5 mol kg⁻¹ Lösungsmittel □ und 29/6 mit einer Aminkonzentration von 1,0 ◆ und 1,5 mol kg⁻¹ Lösungsmittel ▲. Dargestellt ist die extrahierte Menge an Bernsteinsäure pro mol Amin. Die Extraktion erfolgte in 100 mL-Glasgefäßen bei 600 min⁻¹ für 1,5 h. Die Bernsteinsäurekonzentration in der wässrigen Phase betrug 0,847 mol L⁻¹ bei pH 4,0.

Die Reaktivextraktionssysteme T1 und 29/6 können bei dieser höheren Bernsteinsäurekonzentration bis zum 8. Zyklus beladen werden. Darüber hinaus ist keine weitere Aufnahme von Bernsteinsäuremolekülen in die organische Phase möglich. Mit den Reaktivextraktionssystemen T1 und 29/6 mit einer Aminkonzentration von 1,0 mol kg⁻¹ lassen sich dabei zwischen 1,55 - 1,67 mol Bernsteinsäure pro mol Amin extrahieren. Liegt die Aminkonzentration der Systeme bei 1,5 mol kg⁻¹ sind sogar Beladungen bis 1,83 - 1,90 mol mol⁻¹ möglich. Damit können auch hier nicht nur 1,1-Komplexe entstanden sein. Die niedriger konzentrierten Reaktivextraktionssysteme müssen mit bis zu 55 - 67 % zweifach mit Bernsteinsäure beladen sein und die Reaktivextraktionssysteme mit höherer Aminkonzentration mit bis zu 82 - 90 %. Der höhere Anteil an 2,1-Komplexen ist durch das stärkere Konzentrationsgefälle bei der Extraktion von 0,847 molarer Bernsteinsäure zu begründen. Neben 2,1-Komplexen sind für beide Bernsteinsäurekonzentrationen auch 3-1-Komplexe möglich.

Zusammenfassend sind die eingesetzten Aminkonzentrationen der Reaktivextraktionssysteme mit der maximal möglichen Beladung in Tabelle 5-3 nochmals aufgelistet.

Tabelle 5-3: Maximale Beladung der Reaktivextraktionssysteme T1 und 29/6

Aminkonzentration, mol kg ⁻¹	Reaktiv- extraktions- system	Aminkonzentration, mol L ⁻¹	Beladung, mol mol ⁻¹ Amin (Bernsteinsäurelösung 0,423 mol L ⁻¹ , pH 2,0)	Beladung, mol mol ⁻¹ Amin (Bernsteinsäurelösung 0,847 mol L ⁻¹ , pH 4,0)
1,0	T1	0,64	1,06	1,67
	29/6	0,67	1,06	1,55
1,5	T1	0,87	1,11	1,82
	29/6	0,93	1,12	1,90

Mehrstufige Extraktion

Da die Reaktivextraktionssysteme 29/6 und T1, wie zuvor bereits beschrieben, nicht biokompatibel sind, ist eine Rückführung des abgereicherten Fermentationsüberstands nicht möglich. Bernsteinsäure, die nicht extrahiert wird, geht in diesem Schritt der Aufarbeitung unwiederbringlich verloren. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Experiment untersucht, ob eine mehrstufige Extraktion mit den Reaktivextraktionssystemen T1 und 29/6 möglich ist und wie viele Stufen benötigt werden, um Bernsteinsäure nahezu vollständig aus der Fermentationslösung zu entfernen.

Die Versuche wurden für die Extraktion von 0,423 molare Bernsteinsäurelösung mit einem pH von 2,0 und 0,847 molare Bernsteinsäurelösung mit einem pH von 4,0 durchgeführt. Die wässrige Bernsteinsäurelösung wurde hierfür mehrfach mit unbeladenem Reaktivextraktionssystem extrahiert. Die Extraktion erfolgte in 100 mL Glasgefäßen auf einer Mehrfachrührplatte für 1,5 h bei 600 min⁻¹. Die Ergebnisse der mehrfachen Extraktion der niedriger konzentrierten wässrigen Säurelösung sind in Abbildung 5-35 dargestellt.

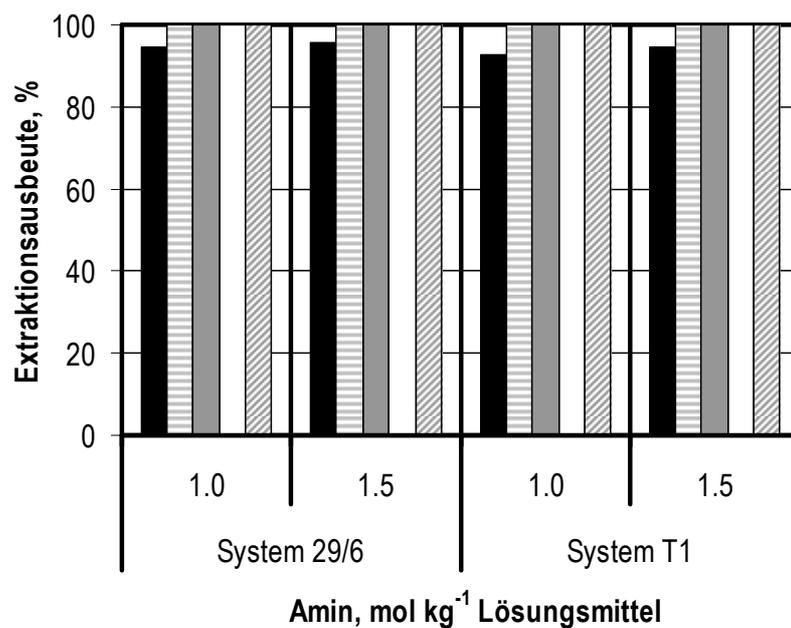


Abbildung 5-35: Mehrstufige Extraktion in 100 mL-Gefäßen auf einer Mehrfachrührplatte bei 600 min⁻¹ für 1,5 h. Die wässrige Bernsteinsäurelösung mit einer Konzentration von 0,423 mol L⁻¹ und einem pH von 2,0 wurde fünffach (1. Zyklus ■, 2. Zyklus ▨, 3. Zyklus ▩, 4. Zyklus □ und 5. Zyklus ▤) mit dem jeweiligen Reaktivextraktionssystem extrahiert. Die organische Phase wurde nach jedem Zyklus verworfen, die wässrige Phase für die nächsten Extraktionen wiederverwendet.

In der ersten Stufe können, je nach Aminkonzentration der Reaktivextraktionssysteme T1 und 29/6 zwischen 92,7 % und 95,8 % der vorhandenen Säure extrahiert werden. Bereits in der zweiten Extraktion ist für alle untersuchten Reaktivextraktionssysteme und Konzentrationen eine Überführung

der Säure aus der wässrigen Phase in die organische mit 99,5 % und 99,8 % möglich. Dementsprechend, reichen bei einer Bernsteinsäurekonzentration von $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ und einem pH von 2,0 bereits zwei Stufen für eine nahezu komplette Extraktion der Bernsteinsäure aus.

Für einen späteren Prozess mit Fermentationsüberstand sind jedoch höhere Bernsteinsäurekonzentrationen und ein pH von mindestens 4,0 realistisch. Deshalb wurden die benötigten Stufen der mehrstufigen Extraktion auch für wässrige Bernsteinsäurelösung mit einem pH von 4,0 und einer Konzentration von $0,847 \text{ mol L}^{-1}$ bestimmt.

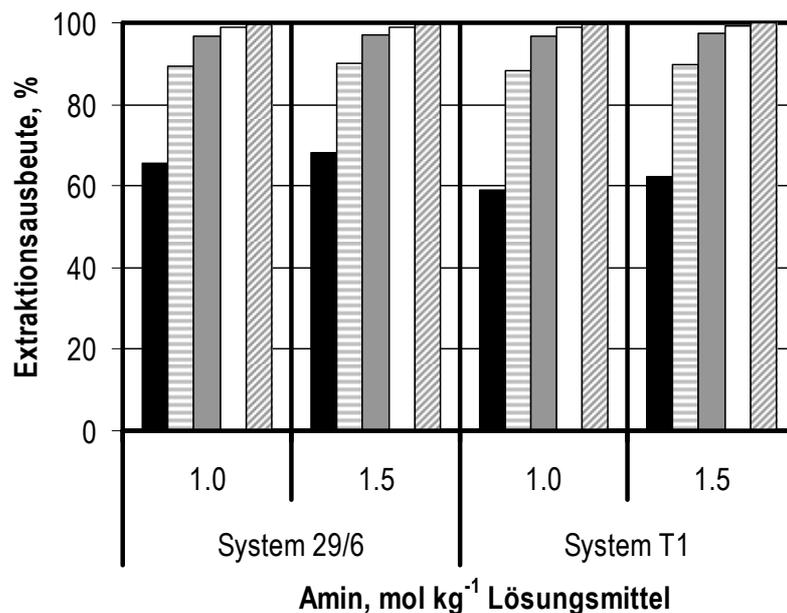


Abbildung 5-36: Mehrstufige Extraktion in 100 mL-Gefäßen auf einer Mehrfachrührplatte bei 600 min^{-1} für 1,5 h. Die wässrige Bernsteinsäurelösung mit einer Konzentration von $0,847 \text{ mol L}^{-1}$ und einem pH von 4,0 wurde fünffach (1. Zyklus ■, 2. Zyklus ▨, 3. Zyklus ▩, 4. Zyklus □ und 5. Zyklus ▤) mit dem jeweiligen Reaktivextraktionssystem extrahiert. Die organische Phase wurde nach jedem Zyklus verworfen, die wässrige Phase für die nächsten Extraktionen weiterverwendet.

Bei der Extraktion von Bernsteinsäure unter diesen Bedingungen sind die Ausbeuten der Reaktivextraktionssysteme T1 und 29/6 in der ersten Stufe mit 58,9 - 68,3 % deutlich niedriger als bei den zuvor untersuchten Bedingungen. Es werden mindestens fünf Extraktionsdurchgänge benötigt, um hier ebenfalls 99,5 % der Säure in die organische Phase zu überführen. Grund hierfür ist der höhere pH, der dazu führt, dass ein Teil der Säure in der dissoziierten und damit nicht extrahierbaren Form vorliegt. Bei einem noch höheren pH ist dementsprechend mit noch mehr Stufen zu rechnen. Gezeigt werden kann dennoch, dass eine mehrstufige Reaktivextraktion unter realistischen Fermentationsbedingungen möglich ist.

Fermentationsüberstand

Um den Unterschied der Extraktion von Bernsteinsäure aus einer wässrigen Lösung und aus Fermentationsüberstand zu untersuchen, wurde eine Extraktion mit den Reaktivextraktionssystemen 29/6 und T1 von 0,423 molarer Bernsteinsäure mit einem von pH 2,0 aus Wasser und aus Fermentationsüberstand durchgeführt. Die Extraktionsausbeuten von Bernsteinsäure aus Wasser und aus Überstand unterscheiden sich dabei deutlich, wie in Abbildung 5-37 zu sehen ist.

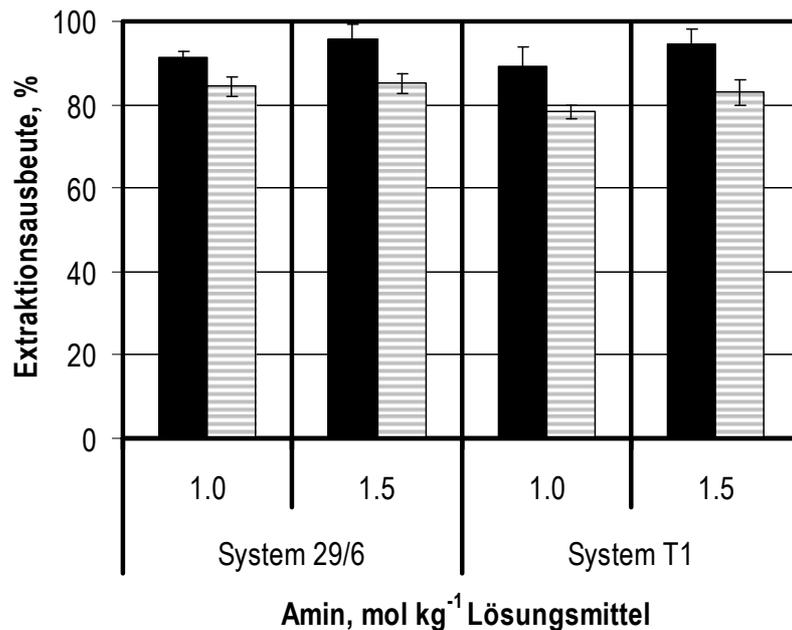


Abbildung 5-37: Extraktion von Bernsteinsäure mit einer Konzentration von 0,423 mol L⁻¹ aus Wasser ■ und aus Fermentationsüberstand ▨. Die Extraktion erfolgte in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min mit den Reaktivextraktionssystemen T1 oder 29/6 mit einer Aminkonzentration von 1,0 und 1,5 mol kg⁻¹ Lösungsmittel. Der pH lag in beiden wässrigen Phasen bei 2,0.

Während bei der Extraktion von Bernsteinsäure aus einer wässrigen Lösung mit dem Reaktivextraktionssystem 29/6 je nach eingesetzter Aminkonzentration 91,4 - 95,5 % möglich sind, kann aus Fermentationsüberstand bei vergleichbaren Bedingungen nur 84,4 - 85,1 % extrahiert werden. Für das Reaktivextraktionssystem T1 sind die Ausbeuten für Bernsteinsäure aus Überstand noch geringer. Hier lassen sich mit einer Aminkonzentration von 1,0 mol kg⁻¹ statt 89,2 % nur noch 78,3 % und mit einer Aminkonzentration von 1,5 mol kg⁻¹ statt 94,7 % nur noch 82,9 % erzielen. Unabhängig vom eingesetzten Reaktivextraktionssystem liegen damit die Ausbeuten für Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand in beiden Reaktivextraktionssystemen um 7 - 11 % niedriger als aus Wasser. Grund hierfür sind Ionen und Salze, die als Restbestandteile im Fermentationsüberstand vorhanden sind und die Extraktion der Säure behindern. Um den Einfluss dieser Stoffe besser zu verstehen, wurde

die Extraktion von Bernsteinsäure bei Vorhandensein verschiedener Salze, unterschiedlicher Salzkonzentrationen und unterschiedlicher Ionenstärke untersucht.

Einfluss von Ionen

In einem ersten Experiment wurde 0,423 molare Bernsteinsäurelösung mit einem pH von 4,5 mit unterschiedlichen Mengen an Natriumchlorid versetzt, um den Einfluss der Ionenstärke auf die Extraktion zu beschreiben. Der pH musste hier so hoch gewählt werden, um die Löslichkeit des Salzes auch bei hohen Konzentrationen zu gewährleisten.

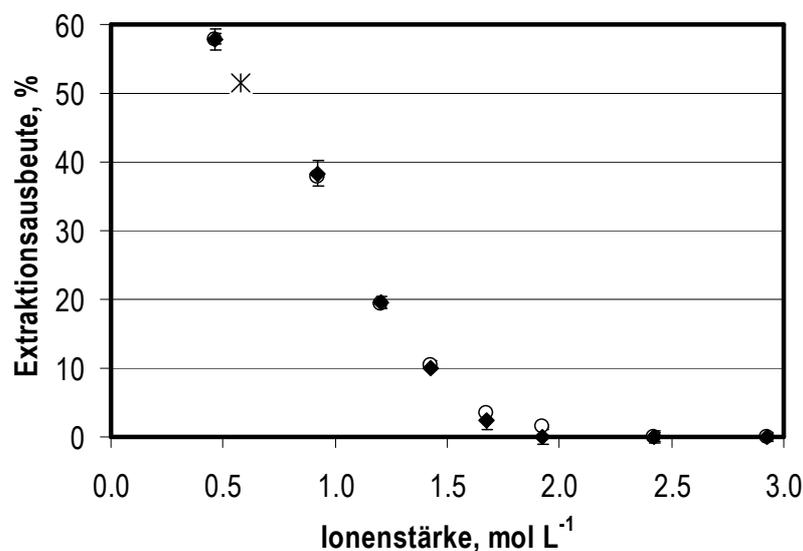


Abbildung 5-38: Einfluss der Ionenstärke bei der Extraktion mit den Reaktivextraktionssystemen T1 ○ und 29/6 ◆ (Aminkonzentration 1,0 mol kg⁻¹ Lösungsmittel). ✱ entspricht der berechneten Ionenstärke (~ 0,6 mol L⁻¹) des *E. coli*-Mediums. Die Extraktion erfolgte in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min. Die Bernsteinsäurekonzentration in der wässrigen Phase betrug 0,423 mol L⁻¹ bei einem pH von 4,5. Die Ionenstärke wurde durch Zugabe von NaCl auf Werte zwischen 0,5 und 3,0 mol L⁻¹ eingestellt.

Sowohl für Reaktivextraktionssystem T1 als auch für Reaktivextraktionssystem 29/6 ist eine starke Abnahme der Extraktionsausbeute mit Zunahme der Salzfracht und damit der Ionenstärke zu sehen. Während sich bei einem pH von 4,5 bei der Extraktion von Bernsteinsäure aus einer wässrigen Lösung ohne Natriumchlorid (Ionenstärke ~ 0,5 mol L⁻¹) mit beiden Reaktivextraktionssystemen Ausbeuten von knapp 60 % erzielen lassen, liegt die Ausbeute bei einer Ionenstärke von 1,0 mol L⁻¹ bereits nur noch bei 38 %. Ab 2,0 mol L⁻¹ Ionenstärke ist keine Extraktion mehr möglich. Die Ionenstärke des für die Versuche mit Fermentationsüberstand eingesetzten *E. coli* - Mediums liegt bei etwa 0,6 mol L⁻¹. Dieser Ionenstärke entspricht in etwa einem Verlust der Extraktionsausbeute um 7 % im Vergleich zur

Extraktion aus Wasser, was mit den tatsächlichen Werten für die Extraktion von Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand korreliert (vgl. Abbildung 5-37).

Um nachzuweisen, ob tatsächlich die Ionenstärke allein für die geringeren Ausbeuten verantwortlich ist, oder ob die Art des eingesetzten Salzes auch eine Rolle spielt, wurde in einem weiteren Experiment der Einfluss verschiedener Salze untersucht. Die Bernsteinsäurekonzentration betrug in jeder Lösung $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ bei einem pH von 2,5. Die Salze wurden in unterschiedlichen Konzentrationen eingewogen, so dass die Gesamtionenstärke (Bernsteinsäure + Salz) in jeder Lösung $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ betrug.

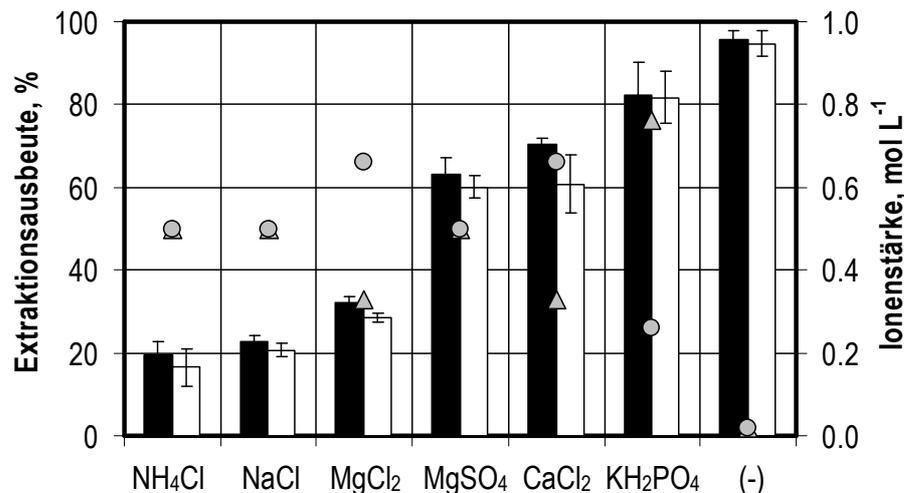


Abbildung 5-39: Einfluss der Salze NH_4Cl , NaCl , $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und KH_2PO_4 bei der Extraktion von Bernsteinsäure mit den Reaktivextraktionssystemen T1 \square und 29/6 \blacksquare mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel. (-) ist die Referenz ohne Zusatz. Die Extraktion erfolgte in der Schwingmühle in $1,5 \text{ mL}$ -Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min . Die Bernsteinsäurekonzentration in der wässrigen Phase betrug $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ bei einem pH von 2,5. Dargestellt sind neben den Extraktionsausbeuten die Ionenstärke der Kationen \bullet , die Ionenstärke der Anionen \blacktriangle . Die Gesamtionenstärke liegt hier für alle untersuchten Salzlösungen bei $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Dargestellt ist in Abbildung 5-39 neben den Extraktionsausbeuten von Bernsteinsäure mit den Reaktivextraktionssystemen T1 und 29/6, die Ionenstärke der Anionen, die Ionenstärke der Kationen sowie die Extraktionsausbeuten der Reaktivextraktionssysteme ohne Zusatz (-) von Salzen. Obwohl in allen Lösungen die Gesamtionenstärke $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ betrug, sind die erzielbaren Ausbeuten je nach Salz stark unterschiedlich. Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) hemmt die Extraktion gefolgt von Calciumchlorid (CaCl_2) am geringsten. Es lassen sich hier bei einer Ionenstärke von $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ 80% und $60 - 70 \%$ Ausbeute statt $94,7 - 95,5 \%$ erzielen. Auch Magnesiumsulfat (MgSO_4) behindert die Extraktion teilweise. Die möglichen Ausbeuten liegen hier bei etwa 60% . Stark reduziert wird die Höhe der Extraktion durch die Salze Ammoniumchlorid (NH_4Cl), Natriumchlorid (NaCl) und Magnesiumchlorid

(MgCl_2). Die Ausbeuten liegen hier zwischen 17 % und 32 %. Vergleicht man die Extraktionsausbeuten mit den korrelierenden Ionenstärken der Anionen und Kationen so ist kein eindeutiger Trend erkennbar. Auch die Gesamtionenstärke, die konstant $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ betrug, kann hier nicht ausschlaggebend für die unterschiedlichen Extraktionsausbeuten sein. Um zu untersuchen, ob die Ionenkonzentration für die niedrigeren Ausbeuten verantwortlich ist, sind in Abbildung 5-40 statt den Ionenstärken deshalb die Ionenkonzentrationen der zusätzlich eingewogenen Salze in den einzelnen Lösungen aufgetragen.

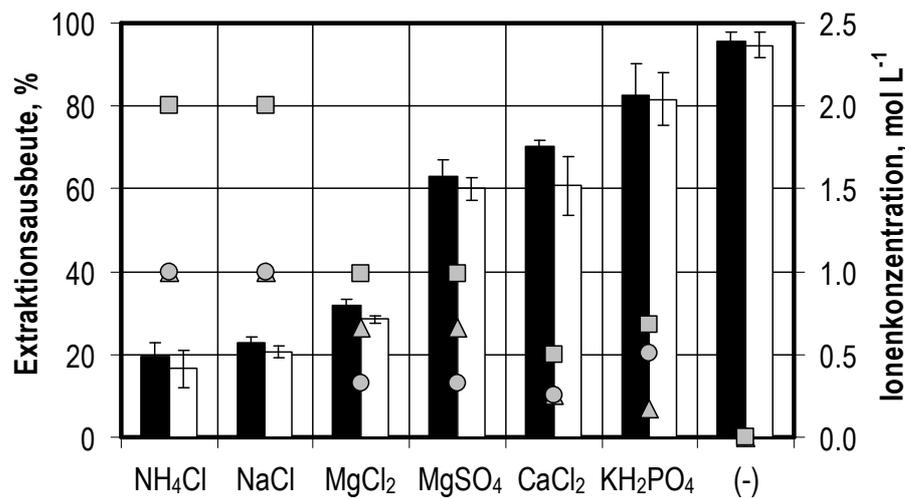


Abbildung 5-40: Einfluss der Salze NH_4Cl , NaCl , $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und KH_2PO_4 bei der Extraktion von Bernsteinsäure mit den Reaktivextraktionssystemen T1 □ und 29/6 ■ mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel. (-) ist die Referenz ohne Zusatz. Die Extraktion erfolgte in der Schwingmühle in $1,5 \text{ mL}$ -Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min . Die Bernsteinsäurekonzentration in der wässrigen Phase betrug $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ bei einem pH von $2,5$. Dargestellt sind neben den Extraktionsausbeuten die Konzentration der Kationen ●, die Konzentration der Anionen ▲ und die Salzkonzentration ■.

Der negative Einfluss auf die Extraktion von Bernsteinsäure ist hier eindeutig auf die Salzkonzentration zurückzuführen. Je höher die Salzkonzentration, desto stärker ist auch die Extraktionsausbeute von Bernsteinsäure reduziert. Dieser Effekt kann durch die Anionen des jeweiligen Salzes erklärt werden, die mit den Carboxylgruppen der Bernsteinsäure um die in der Lösung vorhandenen Protonen konkurrieren (Jun *et al.* 2007a). Die daraus resultierenden Säuren (HCl , H_2SO_4 oder H_3PO_4) werden mit Bernsteinsäure koextrahiert. Je höher die Konzentration an Anionen, desto geringer ist dementsprechend die Extraktionsausbeute von Bernsteinsäure. Die Ergebnisse zeigen damit deutlich, dass die geringeren Extraktionsausbeuten von Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand durch die im Medium vorhandenen Salze hervorgerufen werden. Ein Ziel der Bernsteinsäure-Fermentation muss deshalb die Minimierung der Salze im eingesetzten Medium sein.

Koextraktion anderer organischer Säuren

Neben Salzen und Ionen liegen in Fermentationsüberständen, wenn auch unter optimalen Produktionsbedingungen nur in sehr geringen Mengen, Nebenprodukte, wie andere organische Säuren vor. Um die Koextraktion dieser Säuren zu untersuchen, wurden wässrige Mischungen bestehend aus 0,423 mol L⁻¹ Bernsteinsäure, 0,083 mol L⁻¹ Essigsäure und 0,022 mol L⁻¹ Milchsäure mit einem pH von 2 bis 8 mit den Systemen 29/6 und T1 mit einer Konzentration von 1,0 mol kg⁻¹ Lösungsmittel extrahiert. Die pK_S-Werte der eingesetzten organischen Säuren sind Tabelle 5-4 zu entnehmen.

Tabelle 5-4: pK_S organischer Säuren Mono-, Di- und Polycarbonsäuren

Säure	pK _{S1}	pK _{S2}
Bernsteinsäure	4,17	5,64
Milchsäure	3,86	-
Essigsäure	4,76	-

Unabhängig von der Art der Säure nehmen die Extraktionsausbeuten mit sinkendem pH zu, wie in Abbildung 5-41 zu sehen ist. Grund hierfür ist, wie bereits in Punkt 3.5.2 beschrieben, dass nur die undissoziierten Säuremoleküle mit sekundären und tertiären Aminen extrahiert werden können.

Da alle drei vorhandenen Säuren einen pK_S von ~ 4 bis 5 haben ist erst ab einem pH kleiner des pK_S eine hohe Extraktionsausbeute möglich.

Alle drei vorhandenen Säuren werden bei einem pH von 7 - 8 (>> pK_S) mit ca. 20 % in gleicher Höhe, wenn auch nur mit geringer Ausbeute, extrahiert. Bei einem pH von 5 und 6 (> pK_S) kann mit 10 - 15 % Unterschied deutlich mehr Essigsäure als Milchsäure und Bernsteinsäure in die organische Phase überführt werden. Grund hierfür ist der höhere pK_S der Säure und die damit größere Menge an undissoziierten Säuremolekülen. Bei pH 4 zeigen die Säuren Extraktionsausbeuten, die mit ihrem pK_S korrelieren. Milchsäure hat mit 3,86 den niedrigsten pK_S und zeigt dementsprechend die geringste Ausbeute. Essigsäure zeigt mit einem pK_S von 4,76 eine hohe Ausbeute und Bernsteinsäure liegt auf Grund des pK_{S1} von 4,17 und des pK_{S2} von 5,64 etwa auf der gleichen Höhe. Nur bei einem sehr niedrigen pH von 2 - 3 lässt sich Bernsteinsäure mit Reaktivextraktionssystem 29/6 besser extrahieren als die anderen beiden Säuren. Da Bernsteinsäure eine Dicarbonsäure ist sind hier zwei protonierte Carboxylgruppen vorhanden und die Wahrscheinlichkeit der Bindung eines Amins ist höher als bei den Monocarbonsäuren. Die maximalen Ausbeuten liegen hier für Bernsteinsäure bei 84 - 88 %, für Essigsäure bei 70 - 72 % und für Milchsäure bei 61 - 63 %.

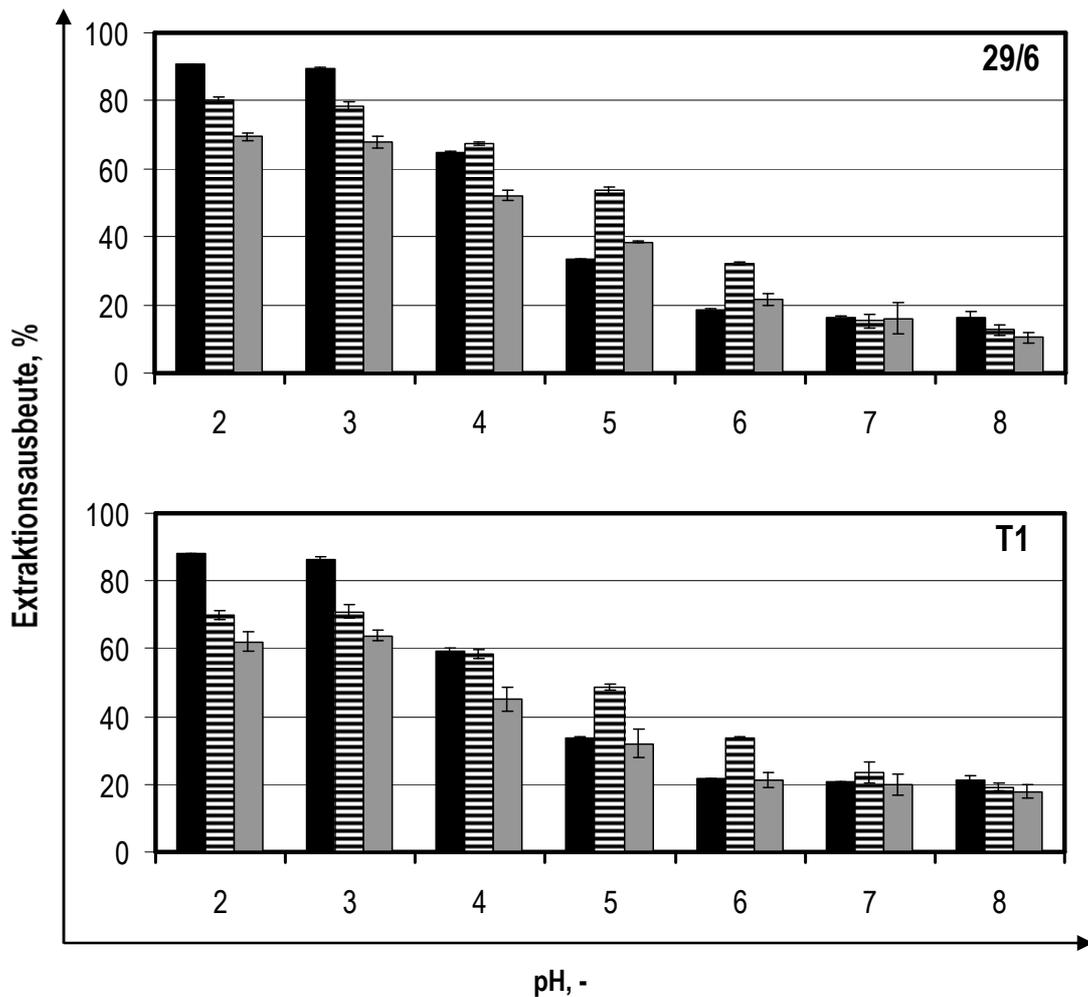


Abbildung 5-41: Koextraktion anderer organischer Säuren aus einer wässrigen Lösung bestehend aus $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ Bernsteinsäure ◆, $0,083 \text{ mol L}^{-1}$ Essigsäure ● und $0,022 \text{ mol L}^{-1}$ Milchsäure △ mit dem Reaktivextraktionssystem T1 (A) und 29/6 (B) mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel. Der pH in der wässrigen Phase wurde zwischen 2,0 und 8,0 variiert. Die Extraktion erfolgte in der Schwingmühle in 1,5 mL-Glasfläschchen bei 30 Hz für 10 min.

Nahezu identisch verhalten sich die Extraktionsausbeuten der drei organischen Säuren bei der Extraktion mit System 29/6. Auch hier zeigen Milchsäure, Essigsäure und Bernsteinsäure bei einem hohen pH von 7 - 8 ($\ll pK_S$) mit etwa 15% gleich hohe Ausbeuten.

Im mittleren untersuchten pH-Bereich wird Essigsäure auf Grund des höchsten pK_S am besten extrahiert. Ab pH 4 erreichen die Ausbeuten für Bernsteinsäure und Essigsäure die gleiche Höhe mit knapp 60 %. Im Durchschnitt liegen auch hier die Extraktionsausbeuten von Essigsäure um 15 % höher als die von Milchsäure. Nur bei pH 2 und 3 wird Bernsteinsäure auf Grund der zwei Carboxylgruppen von Reaktivextraktionssystem 29/6 besser extrahiert als die anderen Säuren. Die maximalen Ausbeuten liegen hier bei 89 - 90 % für Bernsteinsäure, 78 - 80 % für Essigsäure und 67 - 69 % für Milchsäure.

Für einen späteren biotechnologischen Prozess zur Erzeugung von Bernsteinsäure sind auf Grund der eben gezeigten Ergebnisse möglichst niedrige pH-Werte für die Aufarbeitung notwendig. Dennoch wird auch unter optimalen Bedingungen sowohl Milchsäure und Essigsäure in großer Menge mitextrahiert. Da mit den Reaktivextraktions-systemen keine Rückführung des abgereicherten Fermentations-überstands möglich ist kann eine pH-Absenkung durch einen pH-ungeregelten Prozess am Ende der Fermentation oder durch Zugabe von pH-Korrekturmitteln erzielt werden. Gleichzeitig ist durch die gezeigten Ergebnisse die Bedeutung einer geeigneten Prozessführung zur Vermeidung einer Nebenproduktbildung aufgezeigt.

5.5 Reaktionstechnische Untersuchungen im Zentrifugalextraktor

Wie bereits in Kapitel 3.5.5 beschrieben eignen sich vor allem Zentrifugalextraktoren für die Isolierung von Produkten aus wässrigen Fermentationslösungen. In dieser Arbeit wurde deshalb für die Maßstabsvergrößerung der CINC-Zentrifugalextraktor CS50 eingesetzt. Parameter, die die Extraktionsausbeute im Zentrifugalextraktor beeinflussen, sind die Wehrscheibe für den Ablauf der leichten Phase, der Volumenstrom der Phasen und die Rotationsgeschwindigkeit.

Wehrscheibe

Für die Bestimmung der passenden Wehrscheibe bei der Extraktion von Bernsteinsäure aus einer wässrigen Lösung oder aus Fermentationsüberstand mit den Reaktivextraktionssystemen T1 und 29/6 wurde das mit dem Zentrifugalextraktor gelieferte Programm „WeirCalc“ zur Berechnung verwendet. Die Ermittlung der optimalen Wehrscheibe basiert dabei auf den Dichteunterschieden (siehe Tabelle 12-16 im Anhang) der zwei eingesetzten Phasen. Da Faktoren, wie die Viskosität der Flüssigkeiten, bei der Berechnung nicht berücksichtigt werden, erfolgte eine experimentelle Überprüfung der vorgeschlagenen Wehrscheibe (Lochdurchmesser von 24,77 mm). Dabei konnten die Ergebnisse die theoretisch ermittelte Wehrscheibe bestätigen. Diese Wehrscheibe wurde im Folgenden für alle Reaktivextraktionen von Bernsteinsäure aus Wasser oder Fermentationsüberstand mit den Reaktivextraktionssystemen T1 und 29/6 eingesetzt.

Volumenstrom

Eine weitere Stellgröße, neben der Wehrscheibe, ist der Volumenstrom der beiden Phasen. Die maximale Durchflussmenge für den verwendeten Zentrifugalextraktor CS50 ist 2000 mL min^{-1} . Die maximalen Durchflussraten der hier eingesetzten Pumpen lagen jedoch bei nur 250 mL min^{-1} , was einem Gesamtvolumenstrom bei einem Phasenverhältnis von 1:1 von 500 mL min^{-1} entspricht. In folgendem Versuch wurden deshalb lediglich Volumenströme von $10 - 250 \text{ mL min}^{-1}$ je Phase eingestellt und die Ausbeuten bestimmt. Deutlich zu erkennen ist in Abbildung 5-42 das Absinken der Extraktionsausbeuten im Zentrifugalextraktor mit zunehmendem Volumenstrom der Phasen. Die Extraktionsausbeute von Reaktivextraktionssystem 29/6 mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ sinkt dabei von $84,9 \%$ auf $77,9 \%$ bei einer Erhöhung der Volumenströme von 10 mL min^{-1} auf 250 mL min^{-1} je Phase.

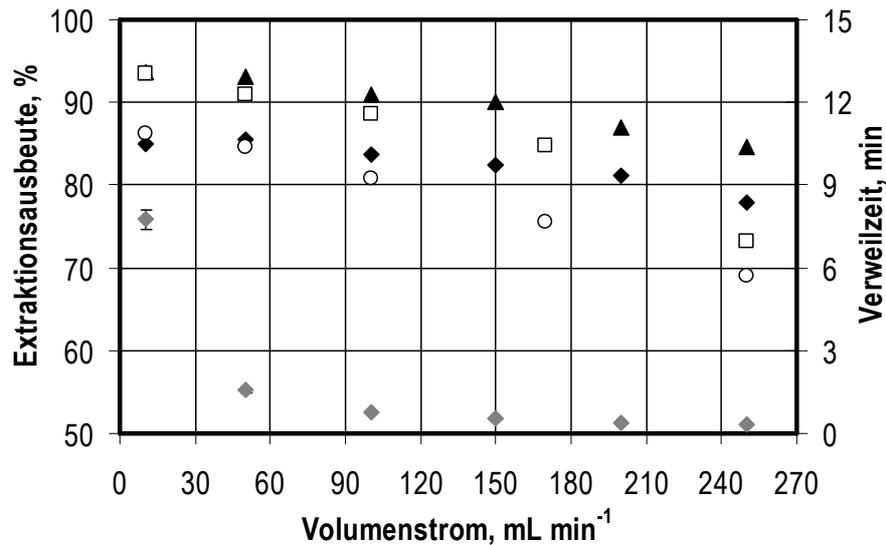


Abbildung 5-42: Einfluss der Volumenströme auf die Reaktivextraktion im Zentrifugalextraktor mit den Reaktivextraktionssystemen T1 und 29/6. Dargestellt sind die Extraktionsausbeuten der Reaktivextraktionssysteme 29/6 mit einer Aminkonzentration von 1,0 \blacklozenge und 1,5 mol kg^{-1} Lösungsmittel \blacktriangle und T1 mit einer Aminkonzentration von 1,0 \circ und 1,5 mol kg^{-1} Lösungsmittel \square . Die Volumenströme wurden zwischen 10 - 250 mL min^{-1} je Phase variiert. Zusätzlich dargestellt ist die durchschnittliche Verweilzeit \blacklozenge der Flüssigkeiten im Extraktor. Die Rotationsgeschwindigkeit betrug 50 Hz, die Wehrscheibe mit Lochdurchmesser 24,77 mm und die Bernsteinsäurekonzentration 0,423 mol L^{-1} bei einem pH von 2,0.

Für das 1,5 mol kg^{-1} konzentrierte Reaktivextraktionssystem 29/6 ist die Absenkung von 93,7 % auf 84,6 % vergleichbar. Damit führt eine Erhöhung der Volumenströme von 10 mL min^{-1} auf 250 mL min^{-1} bei Reaktivextraktionssystem 29/6 zu einer Senkung der Extraktionsausbeute von 7,0 - 9,1 %. Für das Reaktivextraktionssystem T1 mit einer Aminkonzentration von 1,0 mol kg^{-1} sinkt die Ausbeute von 86,2 % auf 68,9 % bei einer Erhöhung der Volumenströme von 10 mL min^{-1} auf 250 mL min^{-1} je Phase. Die Ausbeute mit dem 1,5 mol kg^{-1} konzentrierten T1 sinkt von 93,5 % auf 73,2 %. Insgesamt sind die Extraktionsausbeuten mit Reaktivextraktionssystem T1 bei einem Volumenstrom von 250 mL min^{-1} damit um 17,3 - 20,3 % niedriger als bei einem Volumenstrom von 10 mL min^{-1} . Des Weiteren lassen sich unabhängig vom eingesetzten Reaktivextraktionssystem insgesamt höhere Extraktionsausbeuten bei den höher konzentrierten Reaktivextraktionssystemen beobachten. Diese sinken jedoch mit zunehmendem Volumenstrom auch stärker ab als die Extraktionsausbeuten der niedriger konzentrierten Reaktivextraktionssysteme. Grund für die reduzierten Ausbeuten kann sein, dass die Reaktion zwischen Amin und Bernsteinsäure langsam abläuft und die erzielte Verweilzeit bei höheren Volumenströmen nicht ausreichend für die Gleichgewichtseinstellung ist (Reaktionslimitierung). Während die Verweilzeit bei einem Volumenstrom von 10 mL min^{-1} für die Flüssigkeiten etwa 7,75 min beträgt, sind es bei

250 mL min⁻¹ nur noch etwa 19 s. Die höchsten Extraktionsausbeuten lassen sich dementsprechend bei niedrigen Volumenströmen und damit längeren Verweilzeiten erzielen.

Das Reaktivextraktionssystem 29/6 liefert durchschnittlich etwas höhere Ausbeuten als Reaktivextraktionssystem T1. Außerdem ist der Abfall mit zunehmenden Volumenströmen für das Reaktivextraktionssystem 29/6 unabhängig von der Aminkonzentration weniger stark als für das Reaktivextraktionssystem T1. Dies korreliert mit den Ergebnissen zur Reaktionskinetik, die bereits gezeigt haben, dass das Reaktionsgleichgewicht mit Reaktivextraktionssystem 29/6 schneller erreicht wird als mit T1 (vgl. Abbildung 5-32). Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist deshalb hier eine Limitierung durch die Reaktionsgeschwindigkeit für die sinkenden Ausbeuten verantwortlich.

Neben den Extraktionsausbeuten wurden zusätzlich die Verunreinigungen der wässrigen Phase mit organischer Phase (Abbildung 5-43) und die Verunreinigung der organischen Phase mit wässriger Phase (Abbildung 5-44) für die Volumenströme zwischen 10 - 250 mL min⁻¹ bestimmt.

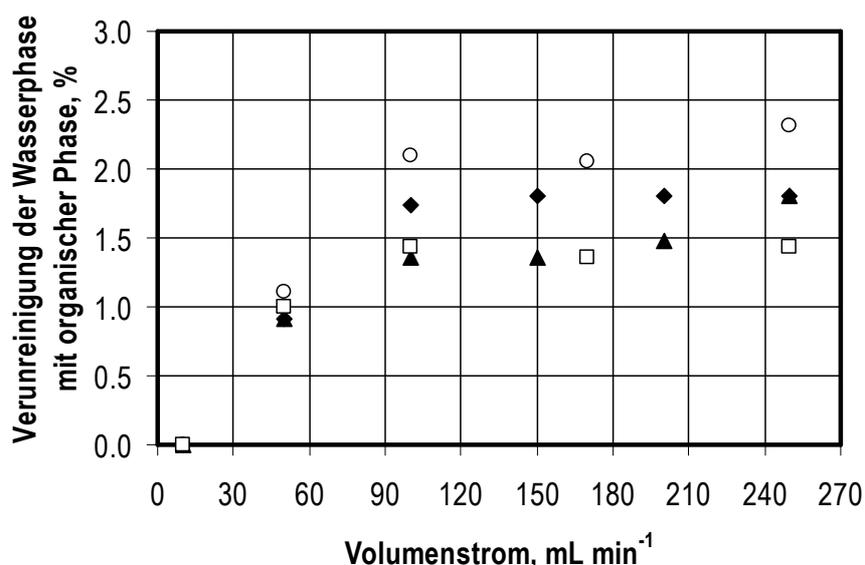


Abbildung 5-43: Verunreinigung der Wasserphase mit organischer Phase mit steigendem Volumenstrom. Dargestellt sind die Verunreinigungen bei der Extraktion der Reaktivextraktionssysteme 29/6 mit einer Aminkonzentration von 1,0 ◆ und 1,5 mol kg⁻¹ Lösungsmittel ▲ und T1 mit einer Aminkonzentration von 1,0 ○ und 1,5 mol kg⁻¹ Lösungsmittel □ im Zentrifugalextraktor. Die Volumenströme wurden von 10 bis 250 mL min⁻¹ je Phase variiert. Die Rotationsgeschwindigkeit betrug 50 Hz, die Wehrscheibe mit Lochdurchmesser 24,77 mm und die Bernsteinsäurekonzentration 0,423 mol L⁻¹ (pH 2,0).

Dabei ist zu erkennen, dass die Verunreinigung der wässrigen Phase mit organischer Phase mit steigenden Volumenströmen bis etwa 100 Hz zunimmt und auch bei höheren Volumenströmen auf diesem Niveau bleibt. Während bei 10 mL min⁻¹ je Phase keinerlei Verunreinigung auftritt sind es bei 250 mL min⁻¹ zwischen 1,4 - 2,3 % v/v an organischer Phase, die in der wässrigen Phase verbleiben.

Dies lässt auf eine unzureichende Phasentrennung mit zunehmendem Volumenstrom schließen. Grund hierfür ist ebenfalls die verkürzte Verweilzeit der Phasen im Zentrifugalextraktor mit zunehmendem Volumenstrom. Sinkt die Verweilzeit, sinkt auch die Trennzeit der Phasen im Rotorinneren und die Phasen sind am Auslass (am Wehr) noch nicht komplett getrennt. Ein geringer Anteil an organischer Phase befindet sich noch in der wässrigen Phase und tritt über das Wehr der schweren wässrigen Phase mit aus. Ebenfalls zu beobachten ist, dass die Verunreinigungen der wässrigen Phase mit organischer Phase für beide Reaktivextraktionssysteme bei einer höheren Aminkonzentration geringer sind als bei einer niedrigeren Aminkonzentration. Dies liegt vermutlich an den etwas größeren Dichtedifferenzen (vgl. Tabelle 12-16 im Anhang) zwischen den organischen Phasen mit einer Aminkonzentration von $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ und der wässrigen Bernsteinsäurephase im Vergleich zu den organischen Phasen mit einer Konzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$.

Genau gegenteilig verhält sich die Verunreinigung der organischen Phase mit wässriger Phase. Hier ist eine Abnahme der Verunreinigung mit zunehmenden Volumenströmen der Phasen zu beobachten (siehe Abbildung 5-44).

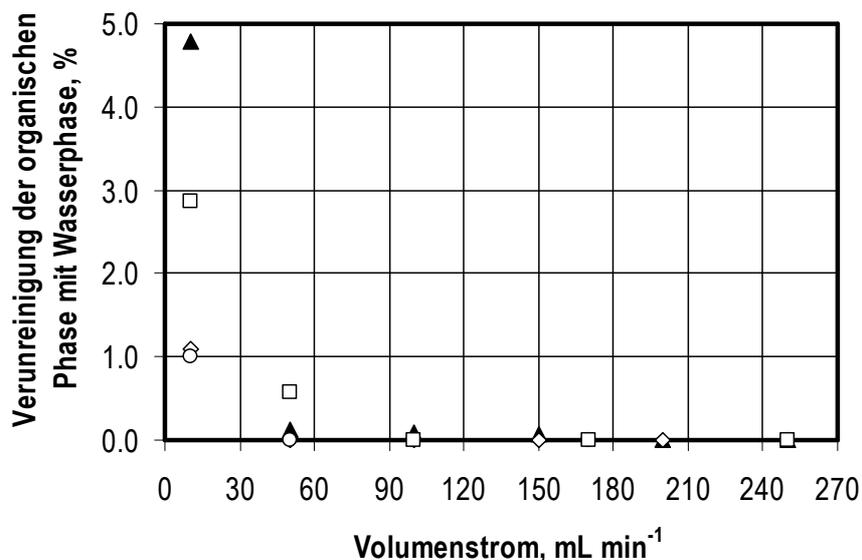


Abbildung 5-44: Verunreinigung der organischen Phase mit wässriger Phase bei steigendem Volumenstrom im Zentrifugalextraktor. Dargestellt sind die Verunreinigungen bei der Extraktion mit den Reaktivextraktionssystemen 29/6 mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ (◇) und $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel (▲) und T1 mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ (○) und $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel (□). Die Volumenströme wurden von 10 bis 250 mL min^{-1} je Phase variiert. Extraktionsbedingungen: Rotationsgeschwindigkeit 50 Hz , Wehrscheibe mit Lochdurchmesser $24,77 \text{ mm}$, Bernsteinsäurekonzentration $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH } 2,0$).

Während bei 10 mL min^{-1} Volumenstrom je Phase zwischen $1,0$ und $4,8 \text{ % v/v}$ der wässrigen Phase in der organischen Phase verbleiben, tritt ab etwa 100 mL min^{-1} keine Verunreinigung mehr auf. Die

Verunreinigung der organischen Phase mit wässriger Phase ist zudem bei den Reaktivextraktionssystemen mit höherer Aminkonzentration höher als bei niedrigerer Aminkonzentration. Grund hierfür ist vermutlich das sich mit dem Volumenstrom ändernde Phasenverhältnis in der Zentrifuge, das bei niedrigen Volumenströmen zu einem Austritt von Mischphase über das Wehr der leichten Phase führt. Ebenfalls möglich ist eine Rückvermischung durch Druckunterschiede auf Grund der eingesetzten peristaltischen Pumpen. Bei niedrigen Volumenströmen ist die Förderung der Phasen stark pulsierend, wird jedoch mit zunehmendem Volumenstrom gleichmäßiger.

Um die optimalen Volumenströme näher einzugrenzen, bei denen in keiner der beiden Phasen Verunreinigungen auftreten, wurde ein weiteres Experiment mit Volumenströmen von 10 -100 mL min⁻¹ durchgeführt.

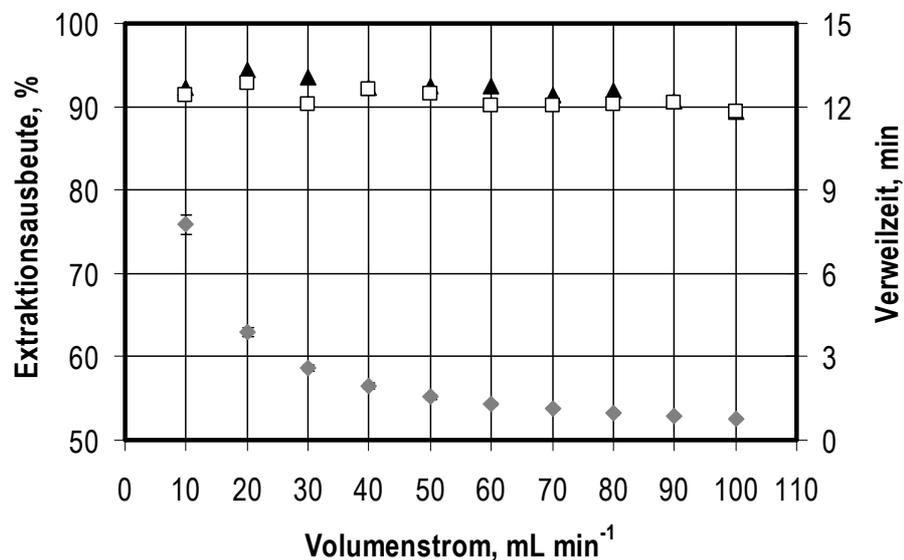


Abbildung 5-45: Einfluss des Volumenstroms bei der Reaktivextraktion im Zentrifugalextraktor. Die Extraktion erfolgte mit den Reaktivextraktionssystemen 29/6 ▲ und T1 □ mit einer Aminkonzentration von 1,5 mol kg⁻¹ Lösungsmittel. Die Volumenströme wurden von 10 bis 100 mL min⁻¹ je Phase variiert. Zusätzlich dargestellt ist die durchschnittliche Verweilzeit ◆ der Flüssigkeiten im Extraktor. Die Rotationsgeschwindigkeit betrug 50 Hz, die Wehrscheibe 24,77 mm und die Bernsteinsäure-konzentration 0,423 mol L⁻¹ bei einem pH von 2,0.

Wie in Abbildung 5-45 dargestellt, ist auch in diesem Bereich eine Absenkung der Extraktionsausbeuten zwischen 20 und 100 mL min⁻¹ feststellbar. Die Ausbeuten sinken hier für Reaktivextraktionssystem T1 von 92,8 % auf 89,5 % und für Reaktivextraktionssystem 29/6 von 94,5 % auf 89,4 %. Dabei ist ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Senkung der Ausbeute und der sinkenden Verweilzeit feststellbar, was auf eine Reaktionslimitierung hindeutet.

Bei 10 mL min⁻¹ liegen die Ausbeuten sowohl für das Reaktivextraktionssystem 29/6 als auch für T1 niedriger als bei 20 mL min⁻¹. Dies ist auf die eingesetzten peristaltischen Pumpen zurückzuführen, die

bei sehr geringen Volumenströmen unregelmäßig (pulsierend) die Phasen befördern. Dadurch kann es im Extraktor zu Druckschwankungen kommen, die zu einer Rückvermischung der Phasen und damit niedrigeren Ausbeuten führen. Zum anderen kann auch eine unzureichende Mischung und Trennung der Phasen im Zentrifugalextraktor bei sehr niedrigen Volumenströmen dafür verantwortlich sein.

Auch für den Bereich der Volumenströme von 10 - 100 mL min⁻¹ je Phase wurden die Verunreinigungen der Phasen bestimmt, was in Abbildung 5-46 dargestellt ist.

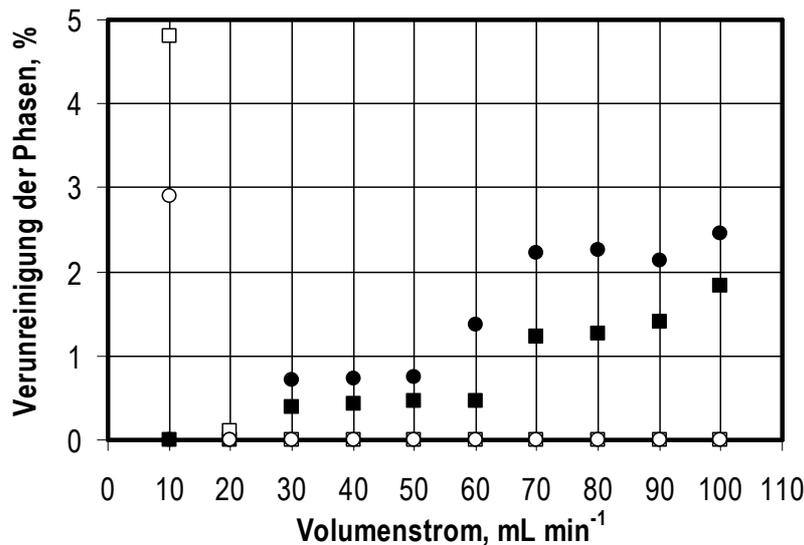


Abbildung 5-46: Verunreinigungen der Phasen bei der Extraktion mit den Reaktivextraktionssystemen 29/6 und T1 im Zentrifugalextraktor mit steigenden Volumenströmen von 10 - 100 mL min⁻¹ beider Phasen. Verunreinigung der wässrigen mit organischer Phase T1 ■ und 29/6 ●. Verunreinigung der organischen Phase T1 □ und 29/6 ○ mit wässriger Phase. Die Rotationsgeschwindigkeit betrug 50 Hz, die Wehrscheibe mit Lochdurchmesser 24,77 mm und die Bernsteinsäurekonzentration 0,423 mol L⁻¹ bei einem pH von 2,0.

Dabei ist ebenfalls eine Zunahme der Verunreinigung der wässrigen Phase mit organischer bei steigenden Volumenströmen feststellbar. Während bei 10 und 20 mL min⁻¹ keine Verunreinigungen der wässrigen Phase auftreten, sind es bei 100 mL min⁻¹ je nach eingesetztem Reaktivextraktionssystem zwischen 1,8 % und 2,5 % v/v. Genau gegenteilig verhält sich auch hier die Verunreinigung der organischen mit wässriger Phase. Bei 10 mL min⁻¹ verbleiben bis zu 4,8 % v/v der wässrigen in der organischen Phase. Ab 20 mL min⁻¹ ist hier keine Verunreinigung der organischen Phase mehr feststellbar. Vergleicht man die Höhe der Verunreinigungen mit der erzielbaren Ausbeute (siehe Abbildung 5-45) ist ein Volumenstrom von 20 mL min⁻¹ je Phase bzw. ein Gesamtvolumenstrom von 40 mL min⁻¹ als Optimum identifizierbar. An diesem Betriebspunkt können sowohl die höchsten Ausbeuten für Bernsteinsäure als auch die geringsten Verunreinigungen erzielt werden.

Da hier lediglich ein optimaler prozessgeeigneter Volumenstrom identifiziert werden konnte, wurden in einem weiteren Experiment unterschiedliche Volumenströme von wässriger und organischer Phase auf ihre Ausbeuten untersucht. In Abbildung 5-47 gezeigt sind die Verhältnisse der Volumenströme von wässriger und organischer Phase von 20/10, 10/20, 10/30 und 10/40 mL min⁻¹ im Vergleich zu den bereits besten identifizierten Volumenströmen von 20/20 mL min⁻¹.

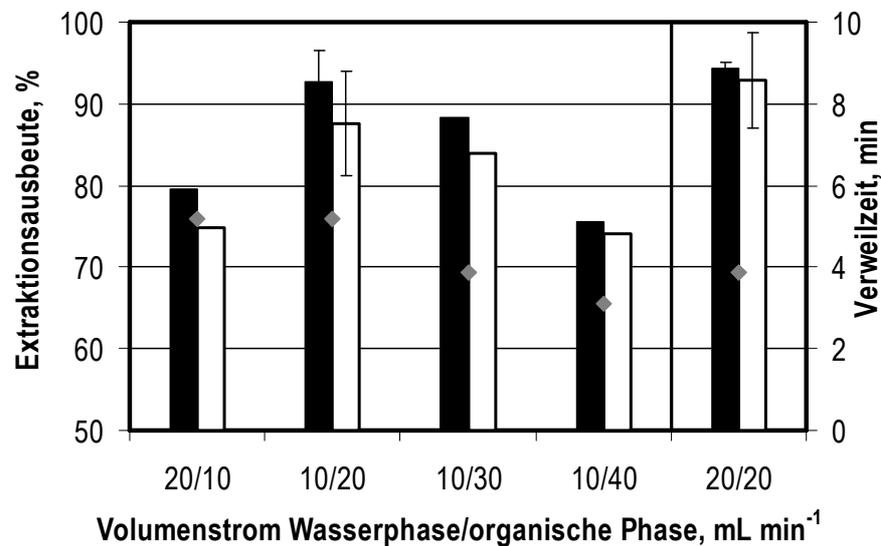


Abbildung 5-47: Einfluss unterschiedlicher Volumenströme von wässriger und organischer Phase auf die Reaktivextraktion im Zentrifugalextraktor. Die Extraktion erfolgte mit den Reaktivextraktionssystemen 29/6 ■ und T1 □ mit einer Aminkonzentration von 1,5 mol kg⁻¹ Lösungsmittel. Zusätzlich dargestellt ist die durchschnittliche Verweilzeit ♦ der Flüssigkeiten im Extraktor. Die Rotationsgeschwindigkeit betrug 50 Hz, die Wehrscheibe mit einem Lochdurchmesser 24,77 mm und die Bernsteinsäurekonzentration 0,423 mol L⁻¹ bei einem pH von 2,0.

Alle unterschiedlichen Volumenströme zeigen dabei niedrigere maximale Ausbeuten als der für beide Phasen gleiche Volumenstrom von 20 mL min⁻¹. Wird mehr wässrige Phase als organische Phase eingesetzt (Volumenstrom 20/10 mL min⁻¹) liegen die Ausbeuten je nach eingesetztem Reaktivextraktionssystem bei 75 - 79 %. Dies ist für einen einstufigen Ansatz zu niedrig, kann aber für eine mehrstufige Extraktion interessant sein, da hier das Volumen auf die Hälfte reduziert werden kann. Wird mehr organische als wässrige Phase eingesetzt, wie bei den Volumenströmen 10/20, 10/30 und 10/40 mL min⁻¹, sind höhere Ausbeuten erreichbar. Diese nehmen jedoch mit zunehmendem Volumenstrom der organischen Phase ab. Grund hierfür ist die kürzere Verweilzeit der Flüssigkeiten im Extraktor mit steigendem Gesamtvolumenstrom der Phasen. Dementsprechend sind höhere Volumenströme der organischen Phase nicht von Vorteil. Die höchsten Ausbeuten lassen sich weiterhin bei einem Volumenstrom von je 20 mL min⁻¹ der beiden Phasen erzielen.

Rotationsgeschwindigkeit

Neben den beiden bereits untersuchten Stellgrößen Wehrscheibe und Volumenstrom ist auch die Rotationsgeschwindigkeit von großer Bedeutung für die erzielbaren Ausbeuten. In Abbildung 5-48 dargestellt sind die Extraktionsausbeuten von Bernsteinsäure mit den Reaktivextraktionssystemen T1 und 29/6 bei einem Volumenstrom beider Phasen von 20 mL min^{-1} und Rotationsgeschwindigkeiten von 10 - 100 Hz. Eine Tabelle mit den Umrechnungen der Rotationsgeschwindigkeit von Hz in min^{-1} und g ist im Anhang zu finden.

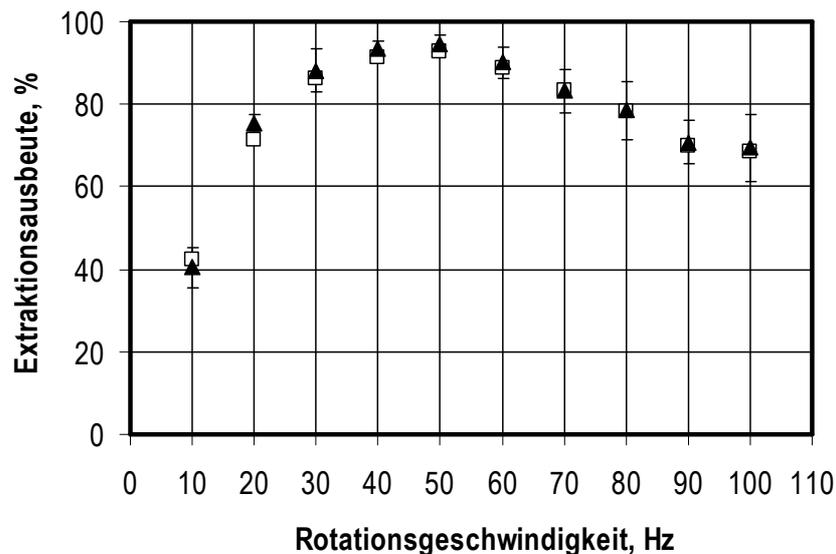


Abbildung 5-48: Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit auf die Reaktivextraktion im Zentrifugalextraktor. Die Extraktion erfolgte mit den Reaktivextraktionssystemen 29/6 ▲ und T1 □ mit einer Aminkonzentration von $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel. Die Rotationsgeschwindigkeiten variierten von 10 bis 100 Hz. Der Volumenstrom beider Phasen betrug 20 mL min^{-1} , die Wehrscheibe mit Lochdurchmesser 24,77 mm und die Bernsteinsäurekonzentration $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ bei einem pH von 2,0.

Unabhängig vom eingesetzten Reaktivextraktionssystem ist zuerst ein Anstieg der Ausbeuten bis 50 Hz beobachtbar. Ab 50 Hz fällt die Extraktionsausbeute dann wieder ab. Dieser Kurvenverlauf beruht auf zwei unterschiedlichen Effekten. Der Anstieg bis 50 Hz ist durch die bessere Durchmischung der Phasen mit steigender Rotationsgeschwindigkeit zu erklären. Der Abfall der Ausbeute ab 50 Hz kommt durch die gleichzeitig mit steigender Rotationsgeschwindigkeit früher einsetzende Phasentrennung zustande. Eine frühere Trennung bedeutet in diesem Fall eine kürzere Mischzeit im Zentrifugalextraktor und damit niedrigere Ausbeuten. Bei 50 Hz wird dementsprechend die höchste Extraktionsausbeute durch eine optimale Mischung der Phasen, eine optimal lange Mischzeit und eine nicht zu früh einsetzende und dennoch ausreichende Trennung der Phasen erreicht.

Auch bei den Experimenten zum Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit wurden die Verunreinigungen der Raffinat- und Extraktphase bestimmt. Dabei konnte die Raffinatphase bei allen untersuchten Rotationsgeschwindigkeiten rein gewonnen werden. Auf eine Abbildung wurde deshalb verzichtet. Die Verunreinigung der Extraktphase mit Raffinatphase ist in Abbildung 5-49 dargestellt.

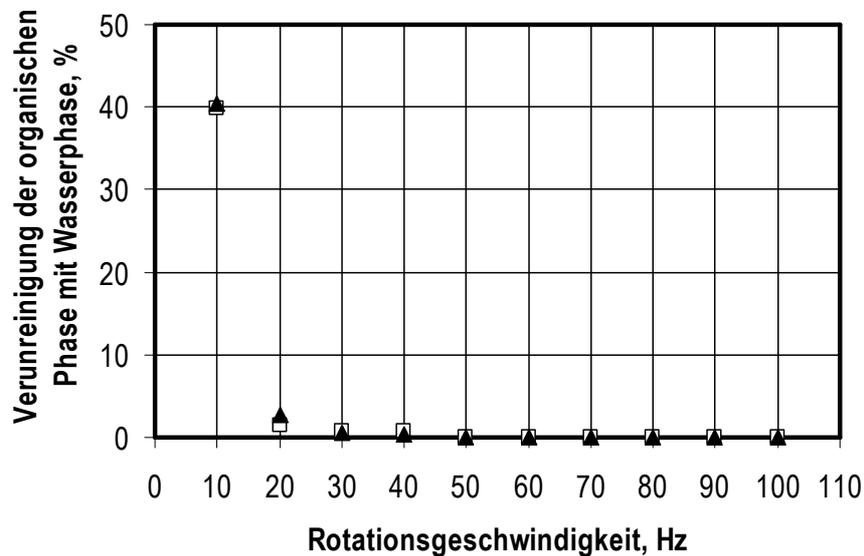


Abbildung 5-49: Verunreinigung der organischen Phase mit Wasserphase bei der Extraktion der Reaktivextraktionssysteme 29/6 ▲ und T1 □ mit einer Aminkonzentration von $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel im Zentrifugalextraktor mit unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeiten von 10 bis 100 Hz. Der Volumenstrom beider Phasen betrug 20 mL min^{-1} , die Wehrscheibe mit Lochdurchmesser 24,77 mm und die Bernsteinsäurekonzentration $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ bei einem pH von 2,0.

Bei niedrigen Rotationsgeschwindigkeiten von 10 Hz lief nahezu die komplette Raffinatphase über das Wehr der leichten Phase mit in die Extraktphase. Grund hierfür ist eine unzureichende Phasentrennung. Bei niedrigen Rotationsgeschwindigkeiten trennen sich die Phasen nur langsam und ein großer Anteil als Mischphase bleibt bestehen. Dieser Effekt ist jedoch bereits bei 20 Hz nahezu verschwunden. Hier betragen die Verunreinigungen der Extraktphase noch maximal zwischen 1,4 und 2,8 % v/v. Ab 50 Hz sind keine Verunreinigungen der Phasen mehr feststellbar. Somit ist eine Rotationsgeschwindigkeit von 50 Hz bei Volumenströmen von 20 mL min^{-1} auch im Hinblick auf mögliche Verunreinigungen die beste Bedingung für die Extraktion von Bernsteinsäure mit den Reaktivextraktionssystemen T1 und 29/6.

Die Optimierung der Reaktivextraktion erfolgte bisher nur mit $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ Bernsteinsäure und einem pH von 2,0 aus Wasser. Um unter realistischen Bedingungen, wie später in einem Produktionsprozess mit Fermentationslösung, die maximalen Extraktionsausbeuten im Zentrifugalextraktor zu bestimmen, wurden in einem weiteren Experiment deshalb zusätzlich die Extraktionsausbeuten bei einer Bernsteinsäurekonzentration von $0,847 \text{ mol L}^{-1}$ und einem pH von 4,0 in Wasser und $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ und

einem pH von 2,0 in Fermentationsüberstand bestimmt. Die Ausbeuten sind in Abbildung 5-50 und Abbildung 5-51 dargestellt.

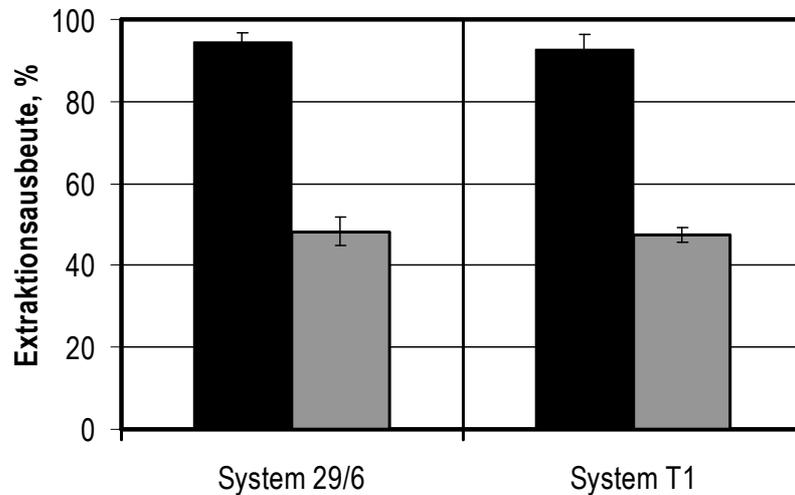


Abbildung 5-50: Einfluss unterschiedlicher Bernsteinsäurekonzentrationen auf die Reaktivextraktion im Zentrifugalextraktor. Die Extraktion erfolgte mit den Reaktivextraktionssystemen 29/6 und T1 mit einer Aminkonzentration von 1,5 mol kg⁻¹ am optimalen Betriebspunkt (Volumenstrom 20 mL min⁻¹ je Phase, Rotationsgeschwindigkeit 50 Hz, Wehrscheibe mit Lochdurchmesser 24,77 mm). Die Bernsteinsäurekonzentration betrug in Wasser 0,423 mol L⁻¹ bei pH 2,0 ■ sowie 0,847 mol L⁻¹ bei pH 4,0 ■.

Die Ausbeuten liegen mit beiden eingesetzten Reaktivextraktionssystemen für die 0,847 molare Bernsteinsäurelösung mit 48 - 49 % deutlich niedriger als für die 0,423 molare Säurelösung. Dies ist auf den hohen pH von 4,0 zurückzuführen, bei dem ein großer Anteil an Säuremolekülen in der dissoziierten nicht extrahierbaren Form vorliegt. Insgesamt sind die Ausbeuten jedoch um 14 - 19 % niedriger als im mL-Ansatz mit 62 - 68 % (vgl. 1. Stufe Abbildung 5-36). Diese Ergebnisse deuten auf eine Reaktionslimitierung hin. Die Komplexbildungsreaktion zwischen Säure und Amin ist zu langsam, um bei der vorhandenen Verweilzeit im Zentrifugalextraktor (etwa 4 Minuten) und der hohen Säurekonzentration das Gleichgewicht zu erreichen. Dementsprechend sind hohe Säurekonzentrationen bei gleicher Aminkonzentration (Überschuss) in der organischen Phase schlechter zu extrahieren als niedrigere. Eine Erhöhung der Aminkonzentration ist auf Grund der Viskosität und der schlechten Solvatisierungsfähigkeit von Aminen nicht zielführend. Auch die eingestellten Extraktionsbedingungen (niedriger Volumenstrom, optimale Frequenz) gewähren bereits eine sehr hohe Verweilzeit. Um höhere Ausbeuten zu erzielen, müsste die Extraktion deshalb mehrstufig erfolgen.

Die bisherigen Ergebnisse basieren alle auf der Extraktion reiner wässriger Bernsteinsäurelösungen. Für einen industriellen Prozess sind jedoch vor allem Daten über die Phasentrennung und Emulsionsbildung von realen Fermentationsüberständen interessant. Aus diesem Grund wurden in

einem weiteren Experiment die Extraktionsausbeuten mit wässriger Bernsteinsäurelösung im Vergleich zu Fermentationsüberstand bei gleicher Ausgangskonzentration und gleichem pH bei unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeiten bestimmt (siehe Abbildung 5-51).

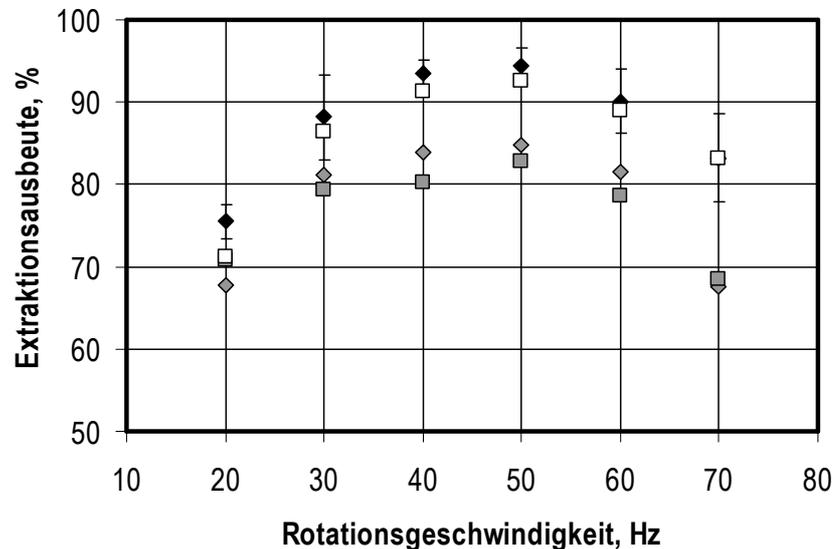


Abbildung 5-51: Einfluss von unterschiedlichen Bernsteinsäurephasen (Wasser vs. Fermentationsüberstand) auf die Reaktivextraktion im Zentrifugalextraktor. Die Extraktion erfolgte mit den Reaktivextraktionssystemen 29/6 ▲ und T1 □ mit einer Aminkonzentration von $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel aus Wasser sowie aus Fermentationsüberstand (29/6 ◆ und T1 ■). Die Rotationsgeschwindigkeiten wurden von 20 bis 70 Hz variiert. Extraktionsbedingungen: Volumenstrom beider Phasen 20 mL min^{-1} , Wehrscheibe mit Lochdurchmesser 24,77 mm und Bernsteinsäurekonzentration in der Wasserphase sowie im Fermentationsüberstand $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ bei einem pH von 2,0.

Auch für die Extraktion von Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand lässt sich ein Anstieg bis 50 Hz Rotationsgeschwindigkeit und ein nachfolgende Abfall beobachten. Insgesamt liegen die Ausbeuten jedoch deutlich niedriger als für die wässrige Lösung. Mit dem Reaktivextraktionssystem T1 lassen sich bei der Extraktion von Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand im Zentrifugalextraktor statt 92,7 % nur noch 82,8 % extrahieren, bei Reaktivextraktionssystem 29/6 statt 94,4 % nur noch 84,7 %. In beiden Fällen ist die Differenz bei optimalen Extraktionsbedingungen somit etwa 10 %. Dieses Phänomen lässt sich wie auch im mL-Ansatz durch die höhere Ionenstärke ($\sim 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ im Vergleich zu $< 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) und die vorhandenen Salze im Medium erklären. Auch hier ist auf Grund der bereits optimierten Bedingungen keine längere Verweilzeit mehr zu erreichen. Höhere Ausbeuten müssen durch eine mehrstufige Extraktion erfolgen. Des Weiteren konnten in beiden Fällen keine Verunreinigungen oder Emulsionen detektiert werden. Die Phasentrennung ist dem zu Folge auch mit Fermentationsüberstand problemlos möglich.

5.6 Zusammenfassung und Diskussion

Die Reaktivextraktionssysteme T1 und 29/6 wurden im mL-Ansatz charakterisiert. Es konnte die maximale Beladung, die Koextraktion anderer organischer Säuren und der Einfluss von Ionen und Salzen auf die Extraktion von Bernsteinsäure beschrieben werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein pH von 2 - 3 ($\ll pK_{S1} = 4,17$) für eine möglichst selektive und effiziente Extraktion von Bernsteinsäure, bei Vorhandensein anderer organischer Säuren nötig ist. Des Weiteren wurden Ionen (Art und Konzentration) für die niedrigeren Extraktionsausbeuten von Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand identifiziert. Je höher die Menge an vorhandenen Salzen, desto geringer sind die Ausbeuten. Ziel der Fermentation muss es deshalb auch sein Nebenprodukte und Salze zu reduzieren, um so einen effektiven Aufarbeitungsprozess zu gewährleisten.

Die maximale Beladung der Reaktivextraktionssysteme korreliert mit den Literaturergebnissen, die eine 2,1-Komplexbildung beschreiben (Tamada und King 1990b). Je nach Aminkonzentration, Bernsteinsäurekonzentration und pH der wässrigen Lösung konnte die organische Phase mit 1,1 - 1,9 mol Säure pro mol Amin pro Liter beladen werden. Damit müssen 10 - 90 % der Amine zweifach mit Säure beladen sein. Es können jedoch auch in entsprechend geringerem Umfang 3,1-Komplexe entstanden sein.

Nach der Charakterisierung im mL-Ansatz wurde die Reaktivextraktion im L-Ansatz im Zentrifugalextraktor optimiert. Die optimalen Betriebspunkte konnten für die Extraktion von Bernsteinsäure mit den Reaktivextraktionssystemen T1 und 29/6 identifiziert werden. Diese sind eine Wehrscheibe mit einem Lochdurchmesser von 24,77 mm, ein Volumenstrom je Phase von 20 mL min^{-1} und eine Rotationsgeschwindigkeit von 50 Hz. Unter diesen Bedingungen ließen sich die maximalen Extraktionsausbeuten ohne Verunreinigungen von Raffinat- oder Extraktphase und eine stabile Phasentrennung erzielen. Die Verweilzeit betrug hier im Zentrifugalextraktor etwa 4,0 Minuten.

Vergleicht man die Extraktionsausbeuten von Bernsteinsäure in wässriger Lösung und Fermentationsüberstand im mL-Maßstab (Schwingmühle) mit dem L-Maßstab (Zentrifugalextraktor) so lassen sich die in Abbildung 5-52 zusammengefassten Beobachtungen machen.

Insgesamt sind die Ausbeuten der Reaktivextraktionssysteme T1 und 29/6 im mL- und L-Maßstab nahezu gleich hoch. Die Extraktion konnte somit erfolgreich auf den L-Maßstab übertragen werden. Für das Reaktivextraktionssystem T1 lassen sich bei der Extraktion von Bernsteinsäure aus Wasser 92,7 - 94,7 % Ausbeute erzielen und bei der Extraktion von Säure aus Fermentationsüberstand 82,8 - 83,0 %. Mit dem Reaktivextraktionssystem 29/6 sind es für die wässrige Bernsteinsäurelösung zwischen 94,4 % und 95,5 % und für Bernsteinsäure aus Überstand 84,7 - 85,1 %.

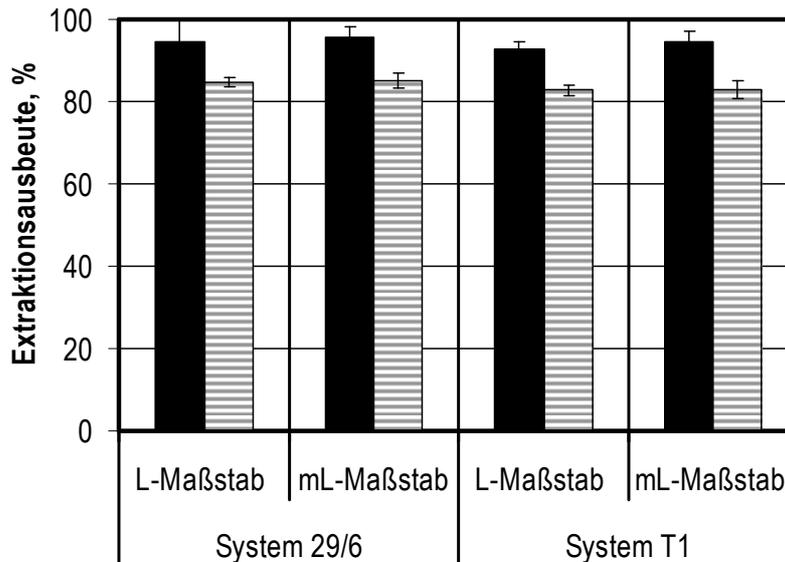


Abbildung 5-52: Vergleich der Extraktion im Zentrifugalextraktor (Volumenstrom beider Phasen 20 mL min^{-1} , Rotationsgeschwindigkeit 50 Hz , Wehrscheibe $24,77 \text{ mm}$) und in der Schwingmühle ($1,5 \text{ mL}$ -Glasfläschchen, 10 min , 30 Hz). Die Extraktion erfolgte mit den Reaktivextraktionssystemen 29/6 und T1 mit einer Aminkonzentration von $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$. Die Bernsteinsäurekonzentration in Wasser ■ sowie in Fermentationsüberstand ▨ betrug $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ bei einem pH von 2,0.

Sowohl in der Schwingmühle als auch im Zentrifugalextraktor ist die Ausbeute für Bernsteinsäure aus einer wässrigen Lösung somit um etwa 10 % höher als aus Fermentationsüberstand. Auch die Verteilungskoeffizienten spiegeln dieses Phänomen mit Werten zwischen 14,7 - 21,2 für die Extraktion von Bernsteinsäure aus Wasser und 4,8 - 5,7 für die Extraktion aus Überstand wieder. Grund hierfür ist die höhere Ionenstärke des Überstands.

Bei der Extraktion von Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand konnte zudem beobachtet werden, dass die organische Phase die orange-braune Farbe des Fermentationsüberstands annahm. Es müssen dementsprechend außer Bernsteinsäure andere Stoffe mitextrahiert worden sein, die für die Farbe verantwortlich sind. Diese hatten jedoch keinen Einfluss auf die Phasentrennung. Weder Emulsionen noch Verunreinigungen der Phasen konnten beobachtet werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Verweilzeit ($3,75 - 4,0 \text{ min}$) am optimalen Betriebspunkt bei hohen Bernsteinsäurekonzentrationen nicht ausreichend für eine effiziente Extraktion ist. Die Reaktion zwischen Amin und Säure ist hier der limitierende Schritt. Durch eine mehrstufige Extraktion können die notwendigen hohen Ausbeuten erzielt werden. Im mL-Ansatz konnte gezeigt werden, dass für die Extraktion von $0,847 \text{ molarer}$ Säure aus Wasser und einem pH von 4,0 unabhängig vom eingesetzten Reaktivextraktionssystem dafür fünf Zyklen nötig sind. Eine mehrstufige Extraktion ist

prinzipiell ebenfalls mit Zentrifugalextraktoren möglich. Jeder Zentrifugalextraktor entspricht dabei einer theoretischen Stufe. Um das gewünschte Extraktionsergebnis zu erzielen, werden mehrere Geräte in Reihe (Kreuzstrom) geschaltet (siehe Abbildung 5-53).

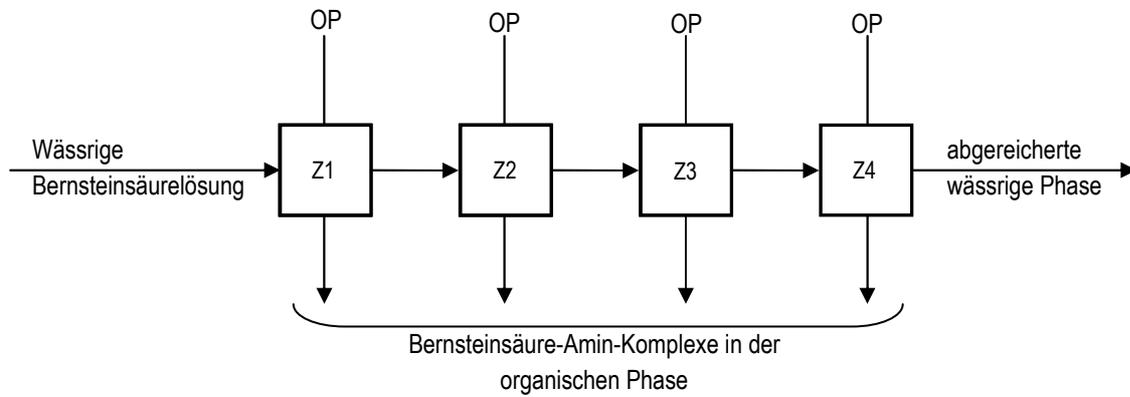


Abbildung 5-53: Schema einer mehrstufigen Extraktion im Kreuzstrom

6 Rückextraktion von Bernsteinsäure

Das folgende Kapitel widmet sich dem zweiten Schritt der Aufarbeitung, der Rückextraktion mit Trimethylamin (siehe Abbildung 6-1).



Abbildung 6-1: Prozessschema integrierte Reaktivextraktion von Bernsteinsäure - 2. Rückextraktion

Die Rückextraktion wurde zunächst im Milliliter-Maßstab optimiert und anschließend auf den Liter-Maßstab (Zentrifugalextraktor) übertragen.

6.1 Reaktionstechnische Untersuchungen ausgewählter Reaktivextraktionssysteme

Für die Rückextraktion von Bernsteinsäure aus einer organischen Phase wurde eine wässrige Trimethylaminlösung eingesetzt. Wie bei der Reaktivextraktion erfolgte auch für die Rückextraktion zunächst eine Charakterisierung im mL-Maßstab. Hierfür wurden folgende Parameter untersucht:

- Kinetik der Rückextraktion
- Benötigte Trimethylaminkonzentration
- Einfluss der ursprünglichen Beladung der organischen Phase mit Bernsteinsäure aus Wasser oder Fermentationsüberstand

Kinetik

In einem ersten Experiment sollte die Kinetik der Rückextraktion aufgezeichnet werden. Die Gleichgewichtsreaktion zwischen Trimethylamin und Bernsteinsäure lief dabei jedoch so schnell ab (<1 Sekunde), dass keine Kinetik aufgenommen werden konnte. Damit ist die Rückextraktion deutlich schneller als die Reaktivextraktion (vgl. Abbildung 5-32).

Trimethylaminkonzentration

Entscheidend für die Rückextraktionsausbeute ist primär die eingesetzte Menge an Trimethylamin. In einem Experiment wurden deshalb Trimethylaminkonzentrationen zwischen 0,5 und 5,0 mol pro mol

Bernsteinsäure in der organischen Phase für die Rückextraktion von Bernsteinsäure ($0,423 \text{ mol L}^{-1}$ organische Phase) eingesetzt. Die Ergebnisse sind Abbildung 6-2 zu entnehmen.

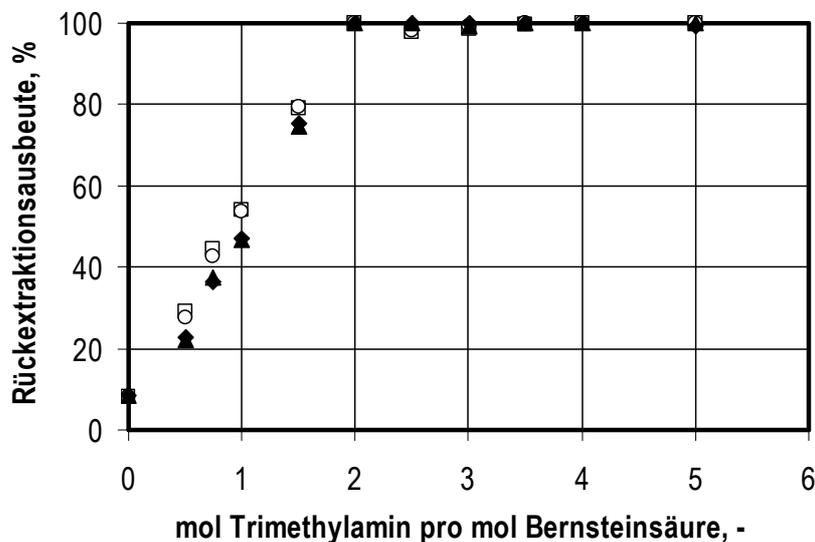


Abbildung 6-2: Einfluss der Trimethylaminkonzentration bei der Rückextraktion. Dargestellt ist die Rückextraktionsausbeute aus den organischen Phasen 29/6 mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel \blacklozenge und $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel \blacktriangle sowie T1 mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel \circ und $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel \square . Die Rückextraktion erfolgte in der Schwingmühle in $1,5 \text{ mL}$ -Glasfläschchen für 10 min bei 30 Hz . Die Bernsteinsäurekonzentration in der organischen Phase betrug $0,423 \text{ mol L}^{-1}$.

Eine Rückextraktionsausbeute von knapp 10 % bei 0 mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure entspricht der Rückextraktionsausbeute mit reinem Wasser ohne Trimethylamin. Von $0,5$ bis $2,0 \text{ mol}$ Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure ist ein Anstieg bis auf 100 % Rückextraktionsausbeute zu sehen. Trimethylaminkonzentrationen, die höher als $2,0 \text{ mol}$ pro mol Bernsteinsäure sind, liefern stets Ausbeuten von 100 % . Dies lässt sich durch die zwei Carboxylgruppen der Säure erklären, die für eine Rückextraktion mit Trimethylamin besetzt werden müssen. Pro mol Säure werden deshalb zwei mol Trimethylamin benötigt (vgl. Poole und King 1991). Trimethylamin kann dabei die Amine aus dem Amin-Bernsteinsäure-Komplex verdrängen, an beiden Carboxylgruppen eine erneute Anlagerung verhindern und so die Säure in Form ihres Salzes in die Wasserphase überführen. Keinen Einfluss auf die Höhe der Rückextraktionsausbeute hatte in diesem Versuch die Aminkonzentration in der mit Bernsteinsäure beladenen organischen Phase. Insgesamt scheint die Rückextraktion mit niedrigeren Trimethylaminkonzentrationen jedoch für Bernsteinsäure aus Reaktivextraktionssystem T1 geringfügig besser zu funktionieren als für Bernsteinsäure aus Reaktivextraktionssystem 29/6. Grund hierfür könnte die bessere Solvatisierung durch 1-Hexanol in Reaktivextraktionssystem 29/6 sein, die die Bindung von Trimethylamin behindert.

Obwohl gezeigt werden konnte, dass Trimethylaminkonzentrationen von 2,0 mol pro mol Bernsteinsäure für eine komplette Rückextraktion ausreichen, wurden alle weiteren Versuche im mL-Maßstab mit käuflich erwerblicher 25 % Trimethylaminlösung durchgeführt. Dies entspricht für die Extraktion von 0,423 mol L⁻¹ Bernsteinsäure einer Konzentration von 9,3 mol Trimethylamin pro mol Säure. Grund hierfür ist, das Trimethylamin bei Raumtemperatur gasförmig ist und sehr schnell aus der wässrigen Lösung verdampft. Mit der hohen Trimethylaminkonzentration sollte sichergestellt werden, dass 100 % Ausbeute bei der Rückextraktion erzielt werden können.

Fermentationsüberstand

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob ein Unterschied bei der Rückextraktion besteht, wenn die Reaktivextraktionssysteme zuvor mit Bernsteinsäure aus Wasser oder aus Fermentationsüberstand beladen wurden. Hierfür wurden sowohl für Reaktivextraktionssystem 29/6 als auch für Reaktivextraktionssystem T1 Extraktionen mit 0,423 molarer Bernsteinsäure aus Wasser und aus Fermentationsüberstand bei einem pH von 2,0 durchgeführt. Die Extraktphasen wurden anschließend mit unbeladenem Reaktivextraktionssystem auf die gleiche Bernsteinsäurekonzentration in der organischen Phase von 0,32 mol L⁻¹ eingestellt. Diese organischen Phasen wurden in einem weiteren Schritt mit 25 % Trimethylaminlösung (entspricht hier 12,3 mol pro mol Säure) rückextrahiert. Die Ergebnisse dieser Rückextraktion sind Abbildung 6-3 zu entnehmen.

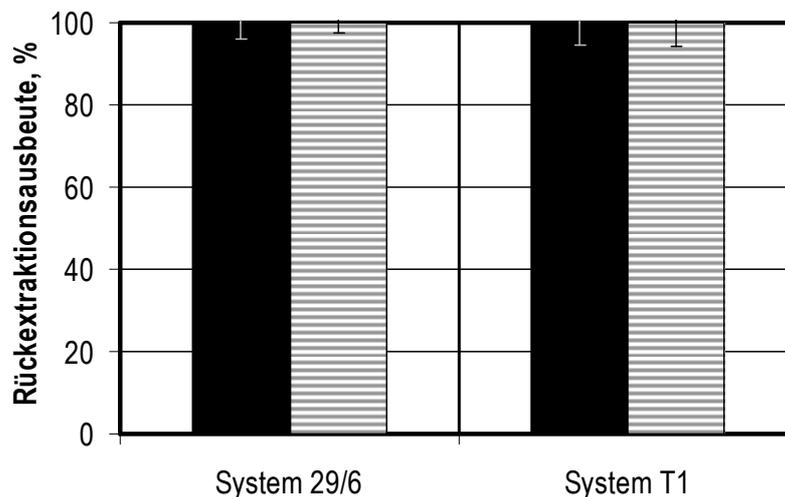


Abbildung 6-3: Einfluss verschiedener Bernsteinsäurephasen (Wasser vs. Fermentationsüberstand) bei der Rückextraktion. Die Rückextraktion erfolgte in 1,5 mL-Glasfläschchen in der Schwingmühle mit den Reaktivextraktionssystemen 29/6 und T1 mit einer Aminkonzentration von 1,5 mol kg⁻¹ bei 30 Hz für 10 min. Die Bernsteinsäurekonzentration in den jeweiligen organischen Phasen betrug 0,32 mol L⁻¹. Die Beladung der organischen Phase erfolgte zuvor mit Bernsteinsäure aus Wasser ■ oder Fermentationsüberstand ▨. Die Rückextraktion erfolgte mit Trimethylamin mit einer Konzentration von 12,3 mol pro mol Bernsteinsäure.

Bei der Rückextraktion der Extraktphasen der Reaktivextraktionssysteme T1 und 29/6, beladen mit Säure aus Wasser oder Überstand, zeigte sich kein Unterschied in der Höhe der Rückextraktionsausbeute. Unabhängig davon, ob die Säure ursprünglich aus Wasser oder Überstand in die organische Phase extrahiert wurde, sind Rückextraktionsausbeuten im Rahmen der Messgenauigkeit von 100 % möglich.

6.2 Reaktionstechnische Untersuchungen im Zentrifugalextraktor

Auch für die Rückextraktion wurden die Stellgrößen Wehrscheibe, Volumenstrom der Phasen und Rotationsgeschwindigkeit im Zentrifugalextraktor optimiert. Da bereits in den Vorversuchen zur Rückextraktion gezeigt werden konnte, dass kaum Unterschied in den Rückextraktionsausbeuten der Reaktivextraktionssysteme T1 und 29/6 besteht (vgl. Abbildung 6-3), wurden die Stellgrößen exemplarisch mit Reaktivextraktionssystem 29/6 ermittelt. Dabei wurde stets 25 % Trimethylaminlösung eingesetzt.

Wehrscheibe

Die passende Wehrscheibe wurde ebenfalls zuvor mit der mitgelieferten Software „WeirCalc“ über die Dichteunterschiede der Phasen berechnet und anschließend im Experiment überprüft. Die theoretisch bestimmte Wehrscheibe konnte hier experimentell validiert werden. Diese hat für die Rückextraktion mit der Extraktphase des Reaktivextraktionssystems 29/6 und einer wässrigen Trimethylaminlösung den Innendurchmesser von 22,86 mm. In allen weiteren Rückextraktionen im Zentrifugalextraktor wurde im Folgenden mit dieser Wehrscheibe gearbeitet.

Volumenstrom

Nach der Ermittlung der passenden Wehrscheibe wurde der Einfluss unterschiedlicher Volumenströme zwischen 10 und 250 mL min⁻¹ je Phase auf die Rückextraktionsausbeute untersucht. Die Rückextraktionsausbeuten schwanken dabei im Rahmen der Messgenauigkeit, wie in Abbildung 6-4 dargestellt, um 100 %. Eine sinkende Tendenz mit zunehmenden Volumenströmen und damit abnehmender Verweilzeit im Extraktor ist dabei nicht feststellbar. Die Reaktion bei der Rückextraktion läuft, wie bereits im mL-Maßstab beschrieben, sehr schnell ab (keine Reaktionslimitierung), sodass auch kurze Verweilzeiten von wenigen Sekunden für eine effektive Rückextraktion ausreichen. Somit können bei der Rückextraktion deutlich höhere Volumenströme als bei der Reaktivextraktion eingesetzt werden. Lediglich bei 10 mL min⁻¹ Volumenstrom der Phasen ist eine niedrigere Ausbeute

von nur 96 % erzielbar. Grund hierfür können auch hier die eingesetzten peristaltischen Pumpen sein, die bei sehr geringen Volumenströmen zu einem ungleichmäßigen Transport (pulsierend) der Phasen führen können. Dies kann wiederum in Druckschwankungen und einer Rückmischung der Phasen resultieren.

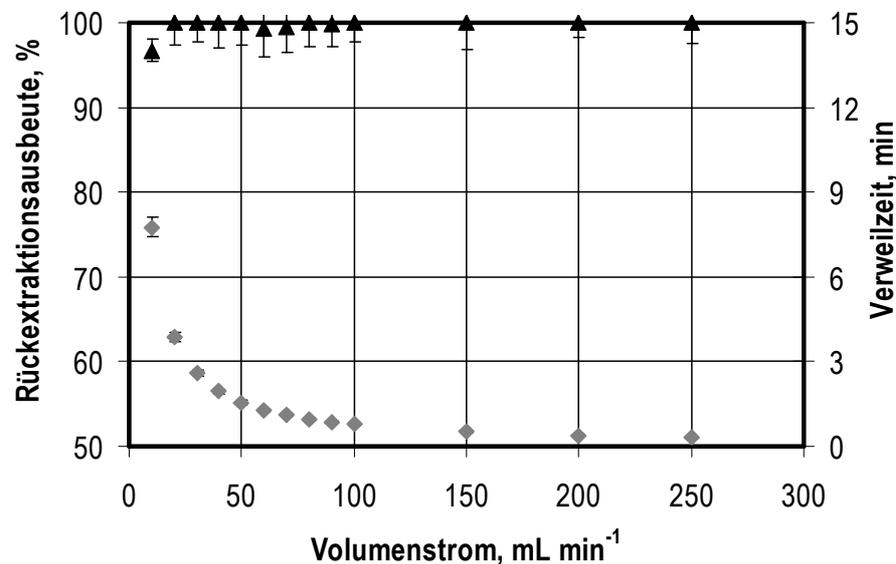


Abbildung 6-4: Rückextraktionsausbeuten bei variierenden Volumenströmen von 10 bis 250 mL min⁻¹ je Phase im Zentrifugalextraktor. Die Rückextraktion erfolgte mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 50 Hz und der Wehrscheiben mit einem Durchmesser von 22,86 mm. Die organische Phase 29/6 ▲ mit einer Aminkonzentration von 1,5 mol kg⁻¹ Lösungsmittel wurde zuvor mit 0,423 mol L⁻¹ Bernsteinsäure beladen. Die Rückextraktion erfolgte mit 9,3 mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure. Zusätzlich dargestellt ist die durchschnittliche Verweilzeit ◆ der Flüssigkeiten im Zentrifugalextraktor.

Verunreinigungen der Raffinatphase oder Extraktphase waren bei der hier gewählten Rotationsgeschwindigkeit von 50 Hz bei keiner der untersuchten Volumenströme feststellbar.

Für alle weiteren Rückextraktionen im Zentrifugalextraktor wurde aus Kostengründen mit niedrigen Volumenströmen zwischen 20 und 60 mL min⁻¹ jeder Phase gearbeitet. Für einen späteren Prozess sind jedoch auch deutlich höhere Volumenströme denkbar und aus ökonomischen Gründen sinnvoll. Volumenströme über 250 mL min⁻¹ jeder Phase bzw. 500 mL min⁻¹ Gesamtvolumenstrom waren mit den vorhandenen Pumpen nicht möglich. Für die Rückextraktion wären eventuell jedoch auch vierfach höhere Volumenströme bis zum Maximum des Zentrifugalextraktors CS50 von 2000 mL min⁻¹ denkbar.

Rotationsgeschwindigkeit

Obwohl hier bereits in einem ersten Versuch gezeigt werden konnte, dass bei keinem der Volumenströme bei 50 Hz Rotationsgeschwindigkeit Verunreinigungen auftraten, sollte der für eine Rückextraktion mögliche Frequenzbereich näher bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-5 zusammengefasst.

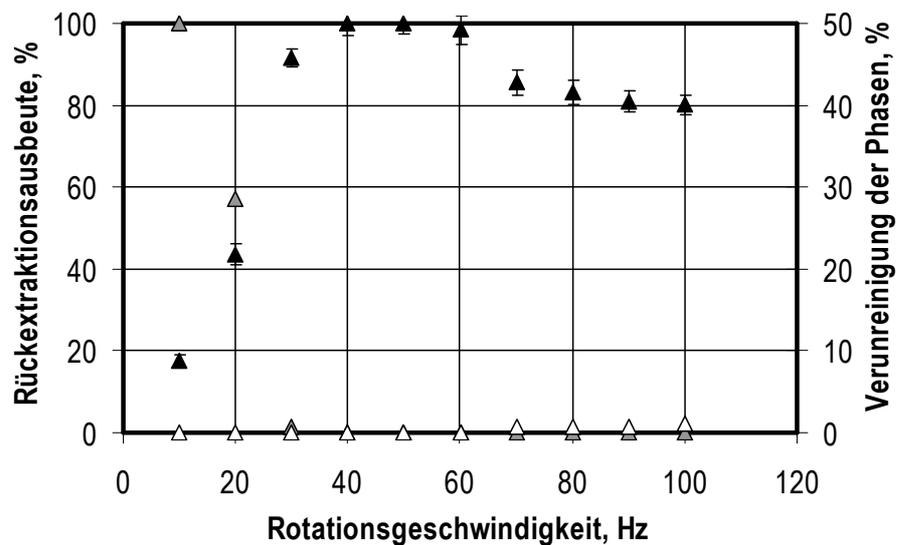


Abbildung 6-5: Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit bei der Rückextraktion im Zentrifugalextraktor. Die Rotationsgeschwindigkeit wurde von 10 bis 100 Hz variiert. Es wurde die Wehrscheibe mit einem Durchmesser von 22,86 mm und Volumenströme beider Phasen von 60 mL min^{-1} eingesetzt. Die organische Phase 29/6 ▲ mit einer Aminkonzentration von $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel wurde zuvor mit $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ Bernsteinsäure beladen. Die Rückextraktion erfolgte mit $9,3 \text{ mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure}$. Ebenfalls dargestellt sind die Verunreinigung der wässrigen Phase mit organischer Phase △ und der organischen mit wässriger Phase ▲.

Ähnlich wie bei der Extraktion sind auch hier zuerst ein Anstieg der Rückextraktionsausbeute bis 40 - 50 Hz und ein anschließender Abfall zu erkennen. Auch hier resultiert der Kurvenverlauf aus zwei Effekten. Mit steigender Rotationsgeschwindigkeit nimmt die Durchmischung der Phasen und damit auch die Rückextraktionsausbeute zu. Ab einer bestimmten Frequenz (hier 50 Hz) nimmt die Mischzeit jedoch ab, da die Phasentrennung auf Grund der steigenden Rotationsgeschwindigkeit früher einsetzt. Das Optimum liegt hier ebenfalls bei 40 bis 50 Hz.

Betrachtet man die Verunreinigung der organischen Phase mit wässriger Trimethylaminlösung ist ein starker Volumenverlust der wässrigen Phase bei niedrigen Rotationsgeschwindigkeiten zu beobachten. Die komplette wässrige Phase fließt bei einer Frequenz von 10 Hz mit über das Wehr der leichten Phase in die organische Raffinatphase. 50 % des Volumens der organischen Phase sind somit wässrige Phase. Grund hierfür ist, wie auch bei der Extraktion, die ungenügende Phasentrennung bei

einer Rotationsgeschwindigkeit von 10 Hz. Es entsteht nicht die charakteristische Schichtung der Phasen (vgl. Abbildung 3-26) und beide Flüssigkeiten laufen als Mischphase über das Wehr der leichten Phase ab. Die Verunreinigung der organischen Phase mit wässriger Phase nimmt mit zunehmender Rotationsgeschwindigkeit schnell ab. Bei 20 Hz sind nur noch 28 % v/v wässrige Phase in der organischen Phase vorhanden. Ab 30 Hz ist nahezu keine Verunreinigung der organischen Phase mit wässriger mehr beobachtbar.

Gegenteilig verhält sich die Verunreinigung der wässrigen Phase mit organischer. Bis 60 Hz ist keine Verunreinigung festzustellen. Ab 70 Hz nimmt die Verunreinigung der wässrigen Phase durch organische Phase zu. Das Maximum der Verunreinigung bei 100 Hz liegt hier jedoch mit 1,1 % v/v niedrig. In Anbetracht der Rückextraktionsausbeuten und Verunreinigungen lässt sich als optimaler Frequenzbereich bei Volumenströmen von 60 mL min^{-1} deshalb der Bereich zwischen 40 - 60 Hz bestimmen.

Ebenfalls im Zentrifugalextraktor untersucht werden sollte der Einfluss von Wasser bzw. Fermentationsüberstand als Donorphasen bei der vorangegangenen Beladung der organischen Phasen T1 und 29/6 auf die Rückextraktion. Hierfür wurden das jeweilige Reaktivextraktionssystem mit $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ Bernsteinsäure aus Wasser oder Fermentationsüberstand mit einem pH von 2,0 beladen. Die Bernsteinsäurekonzentration wurde mit unbeladenem Reaktivextraktionssystem auf eine einheitliche Ausgangskonzentration von $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ geringfügig korrigiert. In einem weiteren Schritt erfolgte die Rückextraktion mit 25 % Trimethylamin (entspricht hier $13,0 \text{ mol pro mol Säure}$).

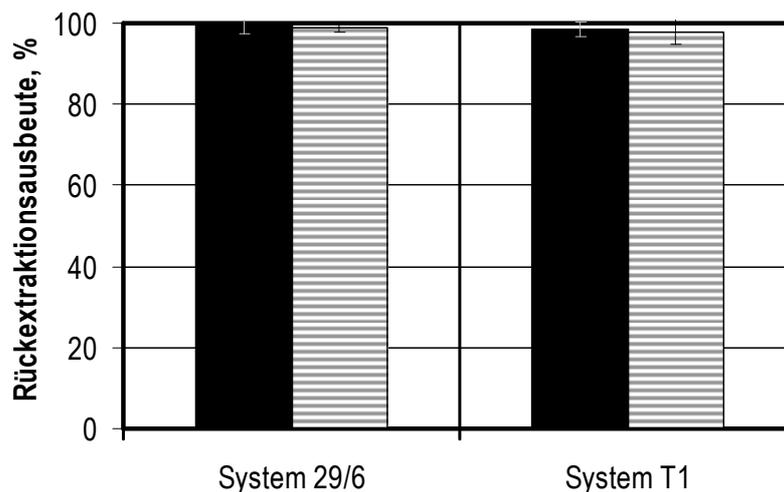


Abbildung 6-6: Vergleich verschiedener Bernsteinsäurelösungen (Wasser vs. Fermentationsüberstand) bei der Rückextraktion im Zentrifugalextraktor. Die Rückextraktion erfolgte mit $13,0 \text{ mol}$ Trimethylamin pro mol Säure bei 50 Hz, der Wehrscheibe $22,86 \text{ mm}$ und Volumenströmen beider Phasen von 20 mL min^{-1} . Die Aminkonzentration der Reaktivextraktionssysteme 29/6 und T1 betrug $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$. Die Beladung der organischen Phase (auf $0,3 \text{ mol L}^{-1}$) erfolgte zuvor mit Bernsteinsäure aus Wasser ■ oder Fermentationsüberstand ▨.

Unabhängig von der vorangegangenen Beladung der Reaktivextraktionssysteme 29/6 und T1 mit Bernsteinsäure aus Wasser oder Fermentationsüberstand, ließen sich Rückextraktionsausbeuten im Zentrifugalextraktor von nahezu 100 % erzielen. Dementsprechend ist auch, wie im mL-Ansatz in der Schwingmühle, kein Unterschied in der Ausbeute bei der Rückextraktion mit Trimethylamin im Zentrifugalextraktor feststellbar. Des Weiteren konnten in keinem der beiden Reaktivextraktionssysteme noch in den unterschiedlichen Raffinatphasen Verunreinigungen festgestellt werden.

6.3 Zusammenfassung und Diskussion

Für die Rückextraktion von Bernsteinsäure aus den organischen Phasen T1 und 29/6 werden mindestens 2,0 mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure benötigt. Dieses Ergebnis bestätigt die Literaturdaten von Poole und King (1991).

Der pH in der wässrigen Trimethylaminlösung sinkt bei der Rückextraktion dabei von ursprünglich 11 auf 9 - 10. Die pH-Senkung ist durch das extrahierte Ammoniumsalz der Bernsteinsäure zu erklären, das in der wässrigen Lösung in seine Ionen zerfällt und somit den pH senkt. Da der pH mit 9 - 10 auch nach der Rückextraktion noch sehr hoch ist, liegt die komplette rückextrahierte Bernsteinsäure in der wässrigen Phase in ihrer zweifach dissoziierten Form vor. Diese dissoziierte Form ist von den Aminen der organischen Phase nicht mehr extrahierbar, weshalb nur die Hinreaktion in die wässrige Phase aber keine Rückreaktion mehr möglich ist.

Nach der Optimierung der Rückextraktion im mL-Maßstab erfolgte die Maßstabsübertragung auf den Zentrifugalextraktor (L-Maßstab). Die optimalen Bedingungen für die Rückextraktion der Bernsteinsäure im Zentrifugalextraktor konnten identifiziert werden. Diese sind eine Wehrscheibe mit einem Innendurchmesser von 22,86 mm, eine Rotationsgeschwindigkeit von 40 - 60 Hz und Volumenströme von 20 - 250 mL min⁻¹ (entspricht Gesamtvolumenströmen von 40 - 500 mL min⁻¹). Die Verweilzeit liegt bei den hier untersuchten Volumenströmen zwischen 4 min und 19 s. Höhere Volumenströme bis zum Maximum des Zentrifugalextraktors (2000 mL min⁻¹) sind denkbar, da die Rückreaktion sehr schnell abläuft (keine Reaktionslimitierung), konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch auf Grund der eingesetzten Pumpen nicht untersucht werden.

Insgesamt traten bei der Rückextraktion im Zentrifugalextraktor weniger Verunreinigungen als bei der Extraktion auf, obwohl die Dichteunterschiede zwischen den Phasen geringer sind. Die Phasentrennung müsste hier dementsprechend eigentlich schwieriger sein, konnte jedoch ebenfalls problemlos erzielt werden.

Auch für die Rückextraktion sind die Ergebnisse des mL-Maßstabs mit den Ergebnissen des L-Maßstabs vergleichbar (siehe Abbildung 6-7).

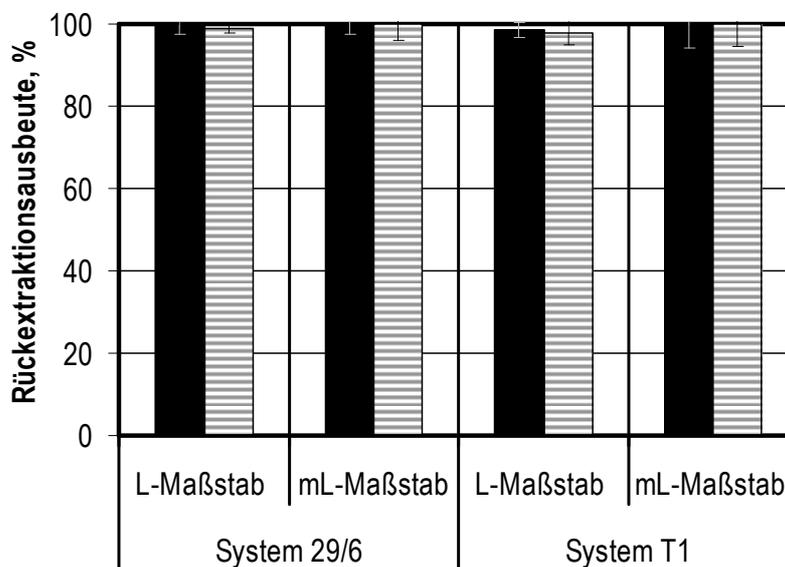


Abbildung 6-7: Vergleich der Rückextraktionsausbeuten im Zentrifugalextraktor (Volumenstrom 20 mL min^{-1} je Phase, Rotationsgeschwindigkeit 50 Hz , Wehrscheibe $22,86 \text{ mm}$) und in der Schwingmühle ($1,5 \text{ mL}$ -Glasfläschchen, 10 min , 30 Hz). Die Beladung der organischen Phasen T1 und 29/6 (Aminkonzentration $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel) erfolgte zuvor mit Bernsteinsäure aus Wasser ■ oder Fermentationsüberstand ▨. Die Rückextraktion erfolgte mit Trimethylamin mit einer Konzentration von $9,3 \text{ mol pro mol Bernsteinsäure}$.

Es konnten für die Rückextraktion von Bernsteinsäure aus Reaktivextraktionssystem 29/6 und T1, unabhängig vom Ursprung der Säure aus Wasser oder Fermentationsüberstand, im L-Maßstab dieselben Ausbeuten wie im mL-Maßstab erzielt werden. Für die Rückextraktion von Bernsteinsäure aus Reaktivextraktionssystem T1 sind dies $97,9 - 100,0 \%$ ($K \geq 46,6$) und für Bernsteinsäure aus Reaktivextraktionssystem 29/6 $98,9 - 100,0 \%$ ($K \geq 89,9$).

Zu beobachten war hier jedoch, dass die Trimethylaminphase nach der Rückextraktion der mit Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand beladenen organischen Phase, die orange-braune Farbe des Fermentationsmediums annahm. Die organische Phase war nach der Rückextraktion wieder nahezu farblos. Dies bedeutet, dass die für die Farbe verantwortlichen Stoffe sowohl bei der Extraktion als auch bei der Rückextraktion mitextrahiert wurden. Es konnte dennoch eine vollständige Phasentrennung erzielt und eine Emulsionsbildung vermieden werden.

7 Verdampfungskristallisation von Bernsteinsäure

Letzter Aufarbeitungsschritt nach der Extraktion und Rückextraktion ist eine Verdampfung des Trimethylamins und eine Kristallisation der Bernsteinsäure (siehe Abbildung 7-1).

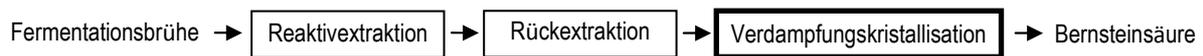


Abbildung 7-1:: Prozessschema integrierte Reaktivextraktion von Bernsteinsäure - 3. Verdampfungskristallisation

Im Labormaßstab wurde die Verdampfungskristallisation mit einem Rotationsverdampfer durchgeführt. Die Bernsteinsäure kristallisierte dabei häufig in der oberen Hälfte des Rundkolbens und teilweise auch am Kolbenhals. Dies erschwerte die Rückgewinnung und damit die Mengenbestimmung, da häufig nicht die gesamte Säure aus der Apparatur gewonnen werden konnte. Die Ausbeute an kristalliner Bernsteinsäure bezogen auf die eingesetzte Menge in Lösung waren deshalb mit $88,2 \pm 11,2$ % für Bernsteinsäure aus Reaktivextraktionssystem 29/6 und $89,0 \pm 9,1$ % für Bernsteinsäure aus Reaktivextraktionssystem relativ T1 niedrig und sehr ungenau. Da keine Zersetzungsprodukte von Bernsteinsäure bei der Verdampfungskristallisation gefunden werden konnten, ist jedoch von geschätzten Ausbeuten von nahezu 100 % im technischen Maßstab auszugehen.

Interessanter ist bei diesem letzten Aufarbeitungsschritt die Reinheit der Bernsteinsäurekristalle. Hierfür wurde die kristallisierte Bernsteinsäure in Wasser und in Lösungsmittel definiert eingewogen und sowohl die Bernsteinsäurekonzentration als auch die vorhandenen Verunreinigungen bestimmt. Die erzielbaren Massenanteile (Reinheit) sind in Abbildung 7-2 für die ursprünglich mit Reaktivextraktionssystem 29/6 und T1 extrahierte Bernsteinsäure dargestellt.

Insgesamt lassen sich dabei für Bernsteinsäure, die in einem ersten Aufarbeitungsschritt mit den Reaktivextraktionssystemen 29/6 und T1 extrahiert wurde, hohe Reinheiten erzielen. Diese liegen für die mit Reaktivextraktionssystem 29/6 extrahierte und mit Trimethylamin rückextrahierte Säure bei 99,5 % w/w und für die mit Reaktivextraktionssystem T1 extrahierte und mit Trimethylamin rückextrahierte Säure bei 98,3 % w/w.

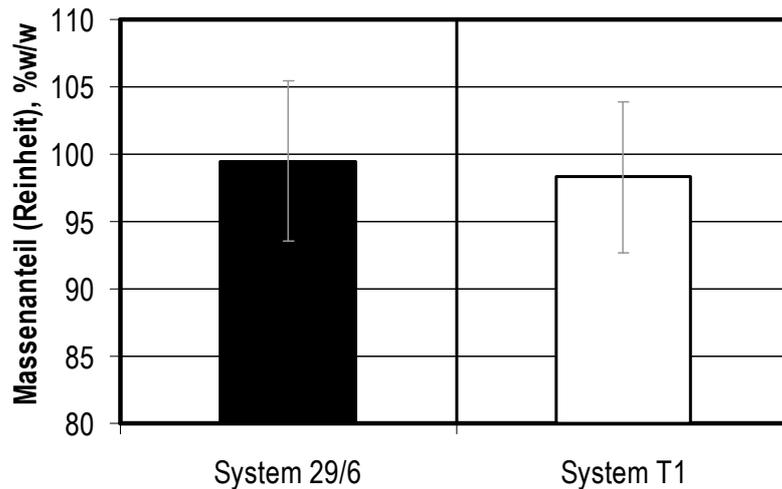


Abbildung 7-2: Massenanteil (Reinheit) von Bernsteinsäure bei der Verdampfungskristallisation des Trimethylammoniumsuccinats bei 160°C und 4 mbar. Die Beladung der Reaktivextraktionssysteme 29/6 und T1 mit einer Aminkonzentration von 1,5 mol kg⁻¹ Lösungsmittel erfolgte zuvor mit 0,423 molarer Bernsteinsäure (pH 2,0) bei 600 min⁻¹ für 1,5 h. Anschließend wurde eine Rückextraktion mit 4,0 mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure durchgeführt.

Die Differenz von 0,5 % w/w bzw. 1,7 % w/w entspricht den vorhandenen Verunreinigungen der Bernsteinsäurekristalle. Diese sind in Abbildung 7-3 für die ursprünglich mit Reaktivextraktionssystem T1 extrahierte Säure und in Abbildung 7-4 für die ursprünglich mit 29/6 extrahierte Säure dargestellt.

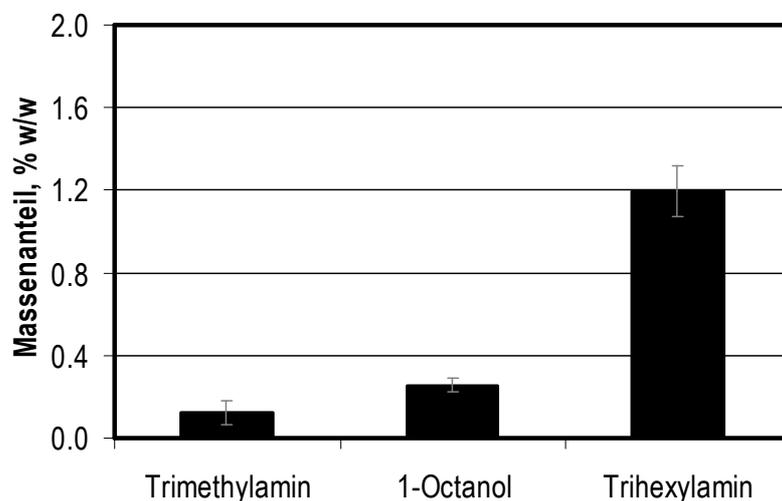


Abbildung 7-3: Verunreinigungen der Bernsteinsäurekristalle nach der Verdampfungskristallisation des Trimethylammoniumsuccinats eines Prozesses mit Reaktivextraktionssystem T1. Die Beladung des Reaktivextraktionssystems T1 mit einer Aminkonzentration von 1,5 mol kg⁻¹ Lösungsmittel erfolgte zuvor mit 0,423 molarer Bernsteinsäure (pH 2,0) bei 600 min⁻¹ für 1,5 h. Anschließend wurde eine Rückextraktion mit 4,0 mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure durchgeführt. Die Verdampfung und Kristallisation erfolgte bei 160°C und 4 mbar.

Zu finden sind in der kristallinen Bernsteinsäure Verunreinigungen aus allen Aufarbeitungsschritten. 1-Octanol und Trihexylamin, die Bestandteile des Reaktivextraktionssystems T1, stammen aus der Extraktion und Trimethylamin aus der Rückextraktion. Trimethylamin ist mit lediglich 0,12 % w/w die geringste Verunreinigung und nahezu vollständig entfernt. Hauptrückstände sind 1-Octanol und Trihexylamin. 1-Octanol ist auf Grund seiner, wenn auch geringen, Wasserlöslichkeit in der wässrigen Trimethylaminphase nach der Rückextraktion vorhanden. Da 1-Octanol einen hohen Siedepunkt von 195°C besitzt, ist die Verdampfung unter den im Labor im Rotationsverdampfer möglichen Bedingungen sehr langsam, weshalb ein entsprechender Anteil im Kristall zurückbleibt. Dies macht mit 0,25 % w/w den zweitgrößten Anteil an den vorhandenen Verunreinigungen aus. Trihexylamin ist mit 1,2 % w/w Massenanteil die größte Verunreinigung. Zum Einen kann es durch seine geringe Wasserlöslichkeit bei der Rückextraktion in die wässrige zu verdampfende Trimethylaminphase gelangen. Zum Anderen ist aber auch denkbar, dass teilweise nicht nur homogene Trimethylammoniumsalze, bestehend aus einem Säure- und zwei Trimethylaminmolekülen, entstehen, sondern auch in sehr geringen Umfang heterogene Salze aus einem Säuremolekül, einem Trimethylamin- und einem Trihexylaminmolekül. Die Spaltung der Bindung zwischen Trihexylamin und Säure ist auf Grund der hohen Basizität und der geringen Wasserlöslichkeit des Amins sehr schwer, weshalb noch deutliche Mengen Trihexylamin im Kristall enthalten ist. Die Gesamtmenge an Verunreinigungen entspricht hier mit 1,57 % w/w im Rahmen der Messgenauigkeit der Differenz der Bernsteinsäurekonzentration von 1,7 % w/w, die in der HPLC ermittelt wurde.

Auch im Fall von Bernsteinsäure, die ursprünglich mit dem Reaktivextraktionssystem 29/6 extrahiert wurde, sind Verunreinigungen aus allen Aufarbeitungsschritten in geringem Umfang feststellbar (siehe Abbildung 7-4).

Trimethylamin ist mit 0,17 % w/w nach 1-Octanol mit 0,42 % w/w die stärkste Verunreinigung, wurde jedoch ebenfalls nahezu vollständig entfernt. Die Lösungsmittel 1-Octanol, 1-Hexanol und die Amine Dihexylamin und Diisooctylamin stammen aus dem für die Extraktion eingesetzten Reaktivextraktionssystem 29/6. 1-Octanol und 1-Hexanol sind auch hier auf Grund ihrer geringen Wasserlöslichkeit in der wässrigen Trimethylaminlösung und dadurch im Kristall enthalten. Da der Siedepunkt von 1-Hexanol mit 157°C deutlich unter dem von 1-Octanol mit 195°C liegt ist die Verdampfung für 1-Hexanol einfacher als für 1-Octanol. Dementsprechend macht 1-Hexanol nur 0,046 % Massenanteil der Bernsteinsäurekristalle aus während es bei 1-Octanol 0,42 % w/w sind.

Auch die Amine sind mit 0,024 % w/w im Fall von Dihexylamin und 0,04 % w/w im Fall von Diisooctylamin nur noch in geringen Mengen vorhanden. Sie stammen ebenfalls aus dem Reaktivextraktionssystem und sind auf Grund ihrer Restlöslichkeit in Wasser im Kristall vorhanden.

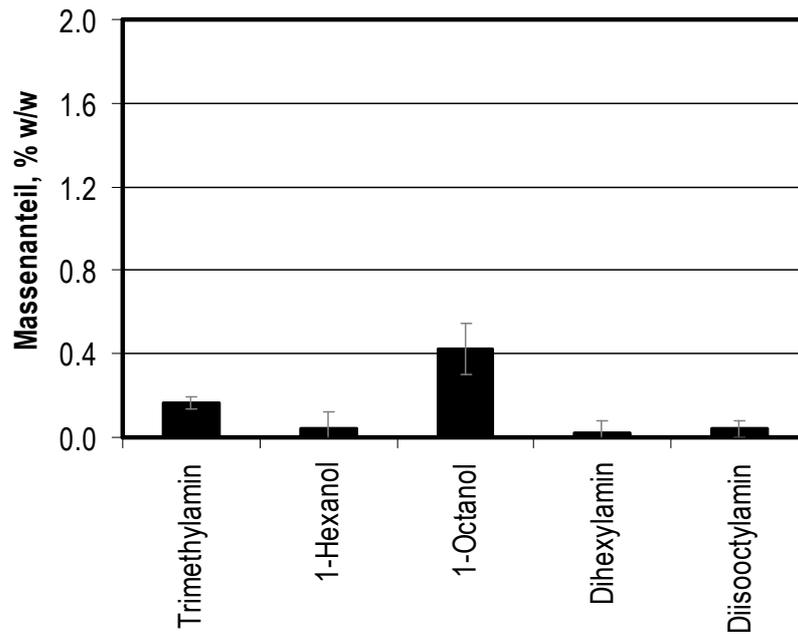


Abbildung 7-4: Verunreinigungen der Bernsteinsäurekristalle nach der Verdampfungskristallisation des Trimethylammoniumsuccinats eines Prozesses mit Reaktivextraktionssystem 29/6. Die Beladung des Reaktivextraktionssystems 29/6 mit einer Aminkonzentration von $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel erfolgte zuvor mit $0,423$ molarer Bernsteinsäure ($\text{pH } 2,0$) bei 600 min^{-1} für $1,5 \text{ h}$. Anschließend wurde eine Rückextraktion mit $4,0 \text{ mol}$ Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure durchgeführt. Die Verdampfung und Kristallisation erfolgte bei 160°C und 4 mbar .

Denkbar ist auch hier wieder die Entstehung von heterogenen Salzen aus Säure, Trimethylamin und Diisooctylamin bzw. Dihexylamin. In der Summe nehmen die Verunreinigungen einen Massenanteil von $0,7 \text{ \% w/w}$ ein, was der Differenz der Konzentration der Säure in der HPLC von $0,5 \text{ \% w/w}$ im Rahmen der Messgenauigkeit entspricht.

Unabhängig vom Reaktivextraktionssystem wäre gegebenenfalls eine noch längere Verdampfung sinnvoll, um das Trimethylamin und die anderen Verunreinigungen komplett zu entfernen.

8 Prozessintegration

Gegen den derzeitigen petrochemischen Produktionsprozess von Bernsteinsäure kann ein biotechnologischer Prozess nur bestehen, wenn sowohl die Kosten für die Produktion und Aufarbeitung minimiert, als auch gleichzeitig die Ausbeuten maximiert werden. Hierfür ist eine mehrfache Nutzung der eingesetzten Hilfsmittel, wie Amine und Lösungsmittel, notwendig. In mehreren Experimenten wurde deshalb die Rezyklierbarkeit der Reaktivextraktionssysteme T1 und 29/6 untersucht. Dabei wurde die organische Phase nach der Reaktivextraktion stets durch Rückextraktion mit Trimethylamin aufbereitet und erneut für Extraktionen eingesetzt.

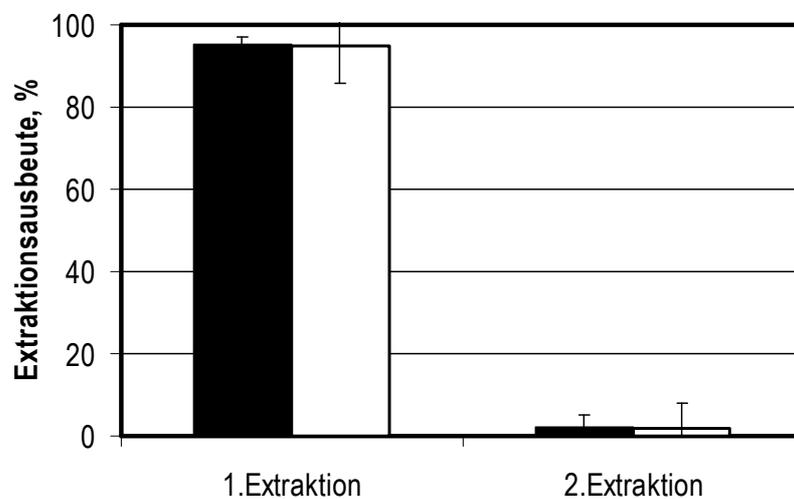


Abbildung 8-1: Extraktionsausbeuten im 1. und 2. Zyklus der Extraktion mit den Reaktivextraktionssystemen T1 □ und 29/6 ■ mit einer Aminkonzentration von $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel. Die Bernsteinsäurekonzentration bei der Extraktion wurde $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ bei pH 2,0 gewählt. Die Regenerierung der organischen Phase erfolgte mittels Rückextraktion mit $9,3 \text{ mol}$ Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure in der organischen Phase. Sowohl Extraktion als auch Rückextraktion wurden in Glasgefäßen für $1,5 \text{ h}$ bei 600 min^{-1} durchgeführt.

Wie in Abbildung 8-1 dargestellt, zeigte sich dabei schon im 2. Zyklus ein Rückgang der Extraktionsleistung von über 90 %. Durch GC-Messungen (hier nicht dargestellt) konnte gezeigt werden, dass Trimethylamin, wenn wie hier im Überschuss vorhanden, bei der Rückextraktion in die organische Phase übergeht. Da Trimethylamin stark wasserlöslich ist, lag die Vermutung nahe, dass es bei einer erneuten Extraktion von der organischen Phase in die wässrige Phase übergeht und dort die Extraktion behindert, indem es die freie Bernsteinsäure bindet (siehe Abbildung 8-2). Insgesamt sind dadurch weniger freie Bernsteinsäuremoleküle vorhanden, die in die organische Phase extrahiert werden können.

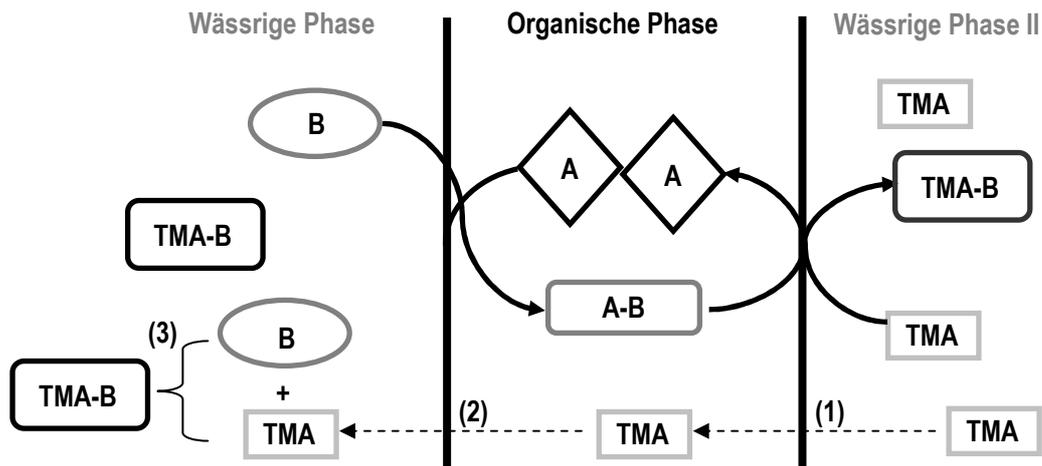


Abbildung 8-2: Schematische Darstellung eines Prozesses bestehend aus Reaktivextraktion von Bernsteinsäure (B) mit Aminen (A) und Rückextraktion mit Trimethylamin (TMA). Bei der Reaktivextraktion entsteht ein Amin-Bernsteinsäure-Komplex (A-B) - bei der Rückextraktion das Trimethylammoniumsalz der Bernsteinsäure (TMA-B). Ist TMA im Überschuss vorhanden, kann es bei der Rückextraktion in die organische Phase übergehen (1). Hypothese: Bei einer erneuten Reaktivextraktion geht TMA aus der organischen Phase in die wässrige Bernsteinsäurelösung über (2) und bindet dort Bernsteinsäure. Bernsteinsäure liegt dadurch als Trimethylammoniumsalz (3) und nicht mehr als extrahierbare freie Säure vor.

Um diese Hypothese zu belegen, wurden in einem weiteren Experiment die Reaktivextraktionssysteme T1 und 29/6 nach einer ersten Extraktion (Ausbeuten hier 94,9 % und 95,2 %) und einer Aufbereitung mit unterschiedlichen Trimethylaminkonzentrationen für eine weitere Extraktion eingesetzt. Dabei wurde die Trimethylaminkonzentration in der organischen Phase vor und nach der Reaktivextraktion gaschromatographisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8-3 dargestellt.

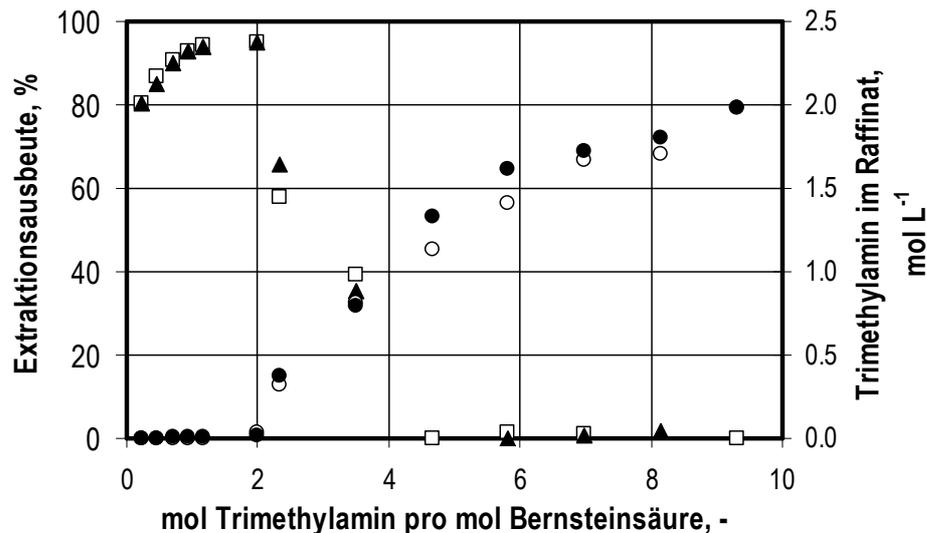


Abbildung 8-3: Einfluss der Trimethylaminkonzentration der Rückextraktion auf eine erneute Extraktion. Extraktionsausbeuten der Reaktivextraktion des 2. Zyklus mit den Reaktivextraktionssystemen T1 □ und 29/6 ▲ mit einer Aminkonzentration von $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel. Zusätzlich dargestellt sind die Trimethylaminkonzentrationen im Raffinat nach der 2. Extraktion mit den Reaktivextraktionssystemen T1 ○ und 29/6 ●. Die Bernsteinsäurekonzentration bei der Extraktion wurde $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ bei pH 2,0 gewählt. Die Regenerierung der organischen Phase erfolgte mittels Rückextraktion mit unterschiedlichen Trimethylaminkonzentrationen pro mol Bernsteinsäure in der organischen Phase. Sowohl Extraktion als auch Rückextraktion wurden in Glasgefäßen für 1,5 h bei 600 min^{-1} durchgeführt.

Die durch unterschiedliche Trimethylaminkonzentrationen aufbereiteten Reaktivextraktionssysteme T1 und 29/6 zeigen stark unterschiedliche Ausbeuten bei einer erneuten Extraktion. Zwischen Konzentrationen von 0,23 und 2,0 mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure bei der Rückextraktion, können in einer folgenden Extraktion Ausbeuten von 80 - 95 % erzielt werden. Je höher dabei die Trimethylaminkonzentration für die Rückextraktion ist, desto höher ist auch die Ausbeute bei einer erneuten Extraktion. Der Anstieg lässt sich durch den Grad der Aufbereitung der organischen Phasen erklären. Je höher die Trimethylaminkonzentration, desto mehr Bernsteinsäure wird rückextrahiert und desto weniger verbleibt in der organischen Phase. Je weniger Bernsteinsäure wiederum in der aufbereiteten Phase verbleibt, desto mehr freies Amin steht bei einer folgenden Extraktion von Bernsteinsäure zur Verfügung und die Extraktionsausbeuten sind dementsprechend höher. Bei der erneuten Extraktion nach der Aufbereitung der organischen Phasen mit 2,0 mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure lassen sich dabei wieder die maximalen Ausbeuten von rund 95 % in der Höhe des ersten Zyklus erzielen.

Werden die Reaktivextraktionssysteme mit höheren Trimethylaminkonzentrationen als 2,0 mol pro mol Säure aufbereitet, zeigt sich ein starker Abfall der Extraktionsausbeute im 2. Zyklus. Bereits bei 2,3 mol Trimethylamin pro mol Säure sind in der nächsten Extraktionsstufe nur noch um die 60 % Ausbeute

möglich. Ab 4,7 mol Trimethylamin pro mol Säure und allen höheren Konzentrationen sinkt die Extraktionsausbeute im nächsten Schritt auf Null.

Vergleicht man die Extraktionsausbeuten mit der Trimethylaminkonzentration in der wässrigen Phase während der 2. Extraktion, so ist feststellbar, dass bis 2,0 mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure keine Akkumulierung von Trimethylamin in der wässrigen Phase auftritt. Trimethylamin bindet komplett an die Bernsteinsäure in der organischen Phase und überführt das korrespondierende Ammoniumsalz in die wässrige Phase. Dementsprechend ist bei diesen niedrigen Konzentrationen kein freies Trimethylamin vorhanden, das bei einer Rückextraktion in die organische und bei einer anschließenden zweiten Extraktion in die wässrige Phase übertreten kann. Erst mit höheren Trimethylaminkonzentrationen bei der Rückextraktion steigt auch die Trimethylaminkonzentration in der Wasserphase bei einer erneuten Extraktion an. Ab etwa 1,4 mol L⁻¹ Trimethylamin in der wässrigen Phase ist dabei keine Extraktion mehr möglich.

Die Höhe der Extraktionsausbeute bei einer erneuten Extraktion korreliert dementsprechend mit der Trimethylaminkonzentration bei der vorangegangenen Rückextraktion, was die zuvor aufgestellte Hypothese bestätigt. Ist Trimethylamin im Überschuss (mehr als 2,0 mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure) bei der Rückextraktion vorhanden, geht ein Teil in die organische Phase verloren. Bei einer erneuten Extraktion geht wiederum das stark wasserlösliche Trimethylamin in die wässrige Phase über, bindet dort auf Grund seiner hohen Basizität und des steigenden pH Bernsteinsäure. Diese ist nun nicht mehr für eine Extraktion verfügbar. Abhängig von der Menge an Trimethylamin sind auch die Menge an abgefangener Säure und damit die maximale mögliche Extraktionsausbeute geringer.

Für einen integrierten Aufarbeitungsprozess ist deshalb wichtig maximal 2,0 mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure für die Rückextraktion einzusetzen, um eine Akkumulierung des Amins in der Wasserphase bei einer erneuten Extraktion zu vermeiden. Um dies sicherzustellen sind zwei Möglichkeiten der Prozessführung vorstellbar. Zum Einen kann mit niedrigeren Trimethylaminkonzentrationen gearbeitet werden. Dies bedeutet allerdings eine etwas geringere einstufige Rückextraktionsausbeute und macht eine mehrstufige Rückextraktion notwendig. Zum Anderen ist aber auch eine einstufige Rückextraktion mit hohen Trimethylaminkonzentrationen und Verdampfung des Trimethylamins aus der organischen Phase vor einer erneuten Extraktion vorstellbar. Das abverdampfte Trimethylamin kann anschließend wieder in Wasser eingeleitet werden und steht somit für weitere Rückextraktionen zur Verfügung. Beide Varianten sollen im Folgenden untersucht und bewertet werden.

Prozessvariante (1) mit mehrstufiger Rückextraktion

Bei der Rückextraktion mit niedrigen Trimethylaminkonzentrationen wird die mit Bernsteinsäure beladenen organische Phase mehrfach mit neuer Trimethylaminlösung rückextrahiert, bis eine nahezu vollständige Entfernung der Bernsteinsäure aus der organischen Phase erreicht ist. Die wässrigen mit Bernsteinsäure beladenen Trimethylaminphasen können zusammengeführt und über eine Verdampfungskristallisation aufgearbeitet werden, wie in Abbildung 8-4 dargestellt.

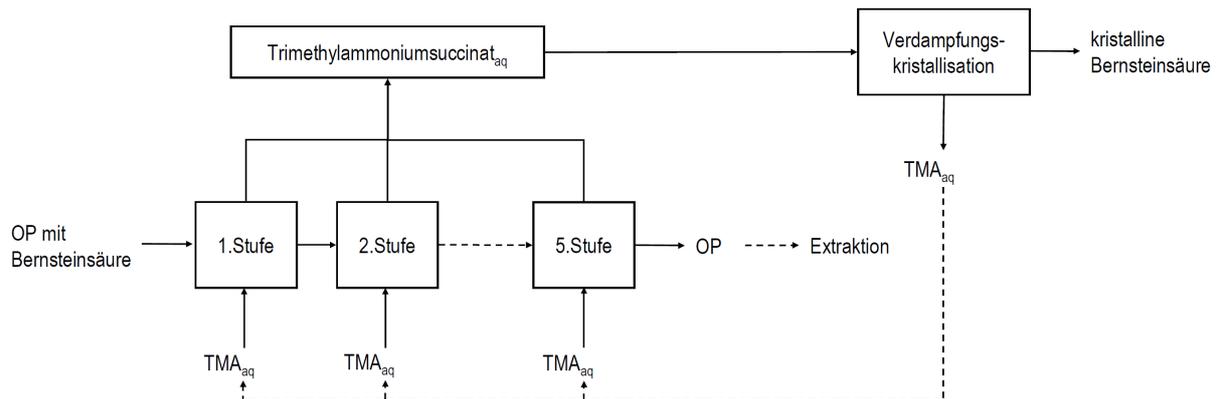


Abbildung 8-4: Schematischer mehrstufiger Rückextraktionsprozess von Bernsteinsäure aus einer organischen Phase (OP) mit einer wässrigen Trimethylamin Phase (TMA_{aq}) mit Trimethylaminkonzentrationen < 2,0 mol pro mol Bernsteinsäure und anschließender Verdampfungskristallisation (Prozessvariante 1).

In der Verdampfungskristallisation erfolgen dabei die thermische Spaltung des Trimethylammoniumsalzes und die Kristallisation der Bernsteinsäure. Das abverdampfte Trimethylamin kann kondensiert und für weitere Rückextraktionen eingesetzt werden. Die abgereicherte organische Phase steht für eine erneute Reaktivextraktion zur Verfügung.

In Abbildung 8-5 sind vier Extraktionen und die dazwischen durchgeführte Aufbereitung der organischen Phase durch mehrstufige Rückextraktion mit unterschiedlichen Trimethylaminkonzentrationen von 0,5 - 2,0 mol pro mol Bernsteinsäure zu sehen. Diese Art der Prozessführung ist hier exemplarisch für Reaktivextraktionssystem T1 gezeigt.

Die Beladung des Reaktivextraktionssystems T1 mit einer Aminkonzentration von 1,5 mol kg⁻¹ erfolgte für alle vier Extraktionen mit Bernsteinsäure aus Wasser mit einer Konzentration von 0,423 mol L⁻¹ und einem pH von 2,0. Die Rückextraktion der Säure und somit Aufbereitung der organischen Phase wurde in mehreren Stufen durchgeführt. Die Stufenanzahl variierte bei allen drei hier durchgeführten Rückextraktionen zwischen zwei und sechs Stufen je nach eingesetzter Trimethylaminkonzentration von 0,5 - 1,75 mol pro mol Bernsteinsäure.

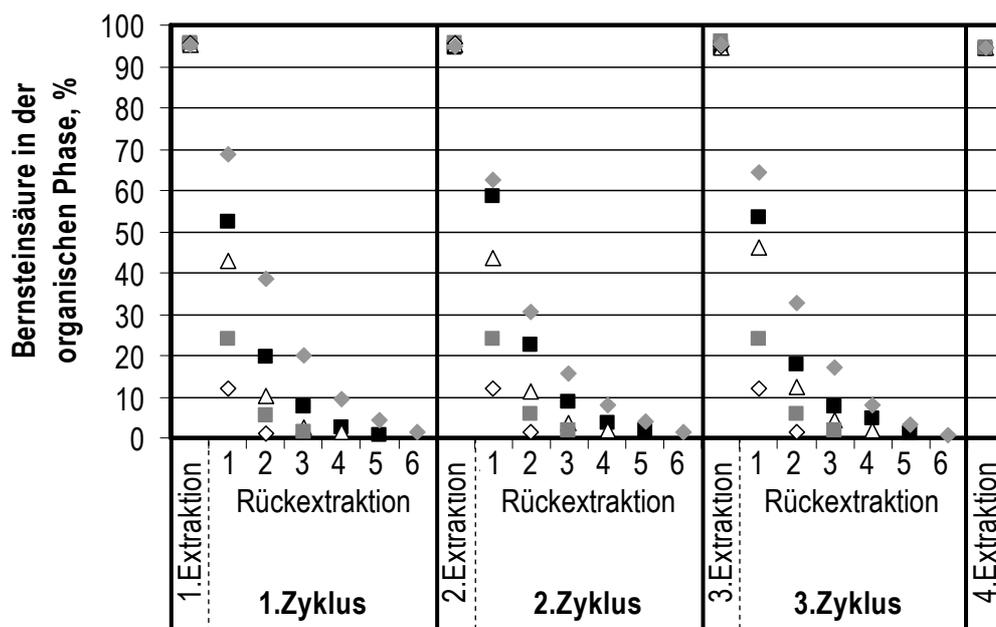


Abbildung 8-5: Recycling des Reaktivextraktionssystems T1 (Aminkonzentration $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel) durch mehrstufige Rückextraktion mit $0,5 \text{ mol}$ ◆, $0,75 \text{ mol}$ ■, $1,0 \text{ mol}$ △, $1,5 \text{ mol}$ ■ und $1,75 \text{ mol}$ ◇ Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure in der organischen Phase (Prozessvariante 1). Das Reaktivextraktionssystem T1 wurde insgesamt viermal für eine Extraktion von $0,423$ molarer Bernsteinsäure bei pH 2,0 eingesetzt. Sowohl Extraktion als auch Rückextraktion erfolgten in Glasgefäßen bei 600 min^{-1} für $1,5 \text{ h}$.

Es konnte eine nahezu vollständige Rückextraktion der Bernsteinsäure ohne eine Akkumulation von Trimethylamin in der wässrigen Phase erzielt werden.

Lediglich bei der Rückextraktion mit $2,0 \text{ mol}$ Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure trat vereinzelt eine geringe Akkumulation des Trimethylamins in der wässrigen Phase bei einer erneuten Extraktion auf. Auf eine graphische Darstellung dieser Ergebnisse wurde hier verzichtet, da die Extraktionsausbeuten ab dem zweiten Zyklus deutlich abnahmen. Grund hierfür waren die mit einem Fehler von bis zu 5% bestimmten Bernsteinsäurekonzentrationen, die für die Konzentrationsberechnung des Trimethylamins verwendet wurden. Bereits geringfügige Abweichungen führten somit zu einer geringfügig höheren Trimethylaminkonzentration und zu einer Akkumulation des Trimethylamins. Sinnvoller sind deshalb etwas unter dem stöchiometrischen Wert liegende Konzentrationen des Trimethylamins, wie $1,75 \text{ mol}$ pro mol Säure.

Insgesamt wurden vier Extraktions-Zyklen mit der mehrfach aufbereiteten organischen Phase durchgeführt. Innerhalb dieser vier Zyklen war im Rahmen der Messgenauigkeit keine sinkende Tendenz der Extraktionsausbeuten zu sehen. Die Extraktionsausbeuten schwankten lediglich zwischen

94,1 % und 96,0 %. Des Weiteren konnte bei keinem der Schritte der Rückextraktionen oder der Extraktion eine Aggregatbildung oder eine ungenügende Phasentrennung beobachtet werden.

Die mehrstufige Rückextraktion und die Rezyklierbarkeit der organischen Phase wurden bisher nur für die Extraktion von Bernsteinsäure aus Wasser gezeigt. In einem weiteren Experiment sollte dies auch für Fermentationslösung untersucht werden. Für die Rückextraktion wurde, wie soeben beschrieben, Trimethylamin mit einer Konzentration von 1,75 mol pro mol Bernsteinsäure eingesetzt. Die Ergebnisse für die Rezyklierbarkeit des Reaktivextraktionssystems T1 mit Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand sind in Abbildung 8-6 und die Ergebnisse für das Reaktivextraktionssystem 29/6 in Abbildung 8-7 dargestellt.

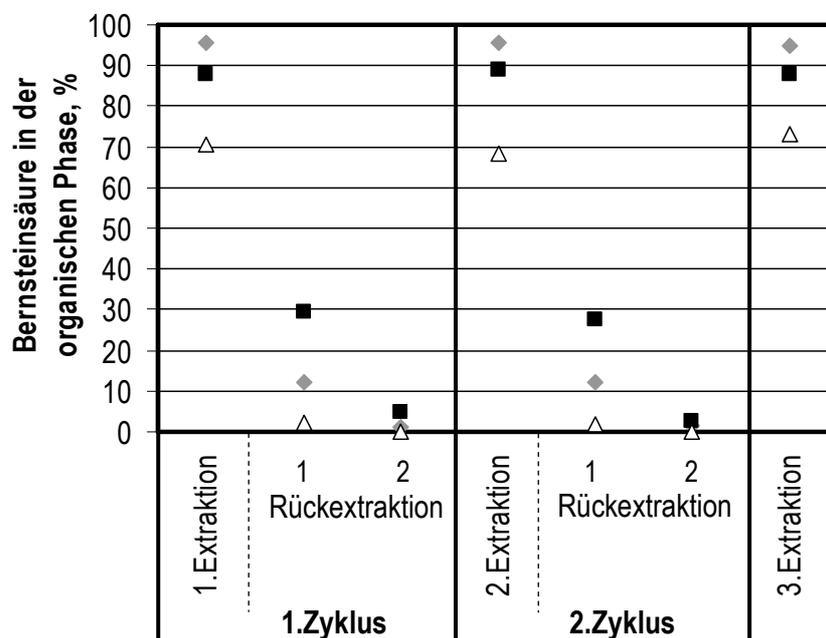


Abbildung 8-6: Recycling des Reaktivextraktionssystems T1 (Aminkonzentration $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel) durch mehrstufige Rückextraktion mit $1,75 \text{ mol}$ Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure in der organischen Phase (Prozessvariante 1). Die Beladung erfolgte durch Extraktion von Bernsteinsäure mit einer Konzentration von $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ aus Wasser bei pH 2,0 ◆, $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ aus Überstand bei pH 2,0 ■ und $0,847 \text{ mol L}^{-1}$ bei pH 4,0 △. Das Reaktivextraktionssystem T1 wurde insgesamt dreimal für eine Extraktion eingesetzt. Sowohl Extraktion als auch Rückextraktion erfolgten in Glasgefäßen bei 600 min^{-1} für 1,5 h.

Innerhalb der drei untersuchten Zyklen war auch hier mit dem Reaktivextraktionssystem T1 keine sinkende Tendenz der Ausbeuten bei der Extraktion beobachtbar. Diese schwanken je nach eingesetzter Bernsteinsäurelösung und pH zwischen 68 - 73 % (Überstand $0,847 \text{ mol L}^{-1}$ Bernsteinsäure, pH 4,0), 86 - 87 % (Überstand $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ Bernsteinsäure, pH 2,0) und 95 - 96 % (Wasser $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ Bernsteinsäure, pH 2,0). Auch hier wurde nach jeder Extraktion eine Rückextraktion mit $1,75 \text{ mol}$ Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure in der organischen Phase

durchgeführt. Sowie für Reaktivextraktionssystem T1 beladen mit Bernsteinsäure aus Wasser als auch beladen mit Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand ließ sich die Bernsteinsäure mit einer zweistufigen Rückextraktion dabei annähernd restlos aus der organischen Phase entfernen.

Ähnlich sehen die Daten für das Reaktivextraktionssystem 29/6 aus, was in Abbildung 8-7 dargestellt ist. Auch hier ließen sich die mit Bernsteinsäure beladenen organischen Phasen in einer zweistufigen Rückextraktion mit 1,75 mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure komplett entladen.

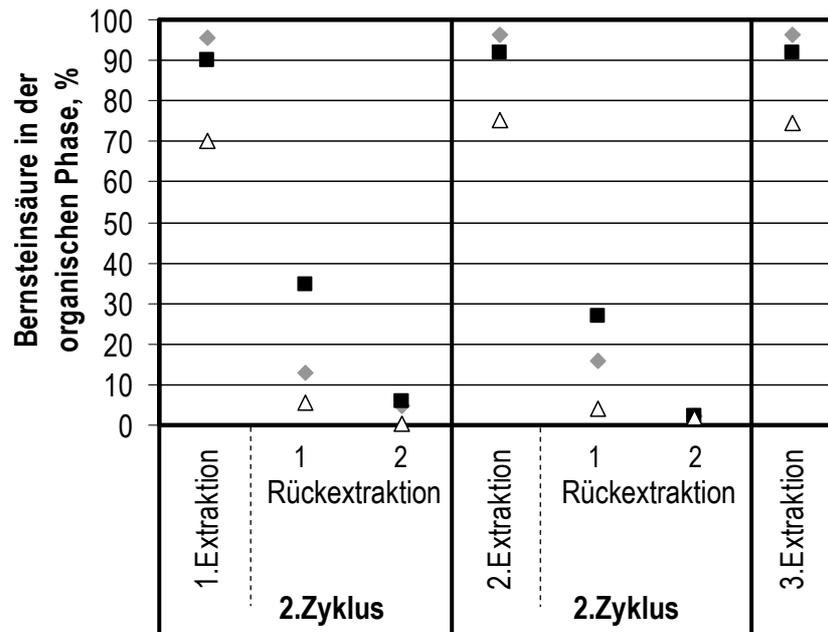


Abbildung 8-7: Recycling des Reaktivextraktionssystems 29/6 (Aminkonzentration von 1,5 mol kg⁻¹ Lösungsmittel) durch mehrstufige Rückextraktion mit 1,75 mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure in der organischen Phase (Prozessvariante 1). Die Beladung erfolgte durch Extraktion von Bernsteinsäure mit einer Konzentration von 0,423 mol L⁻¹ aus Wasser bei pH 2,0 ◆, 0,423 mol L⁻¹ aus Überstand bei pH 2,0 ■ und 0,847 mol L⁻¹ bei pH 4,0 △. Das Reaktivextraktionssystem 29/6 wurde insgesamt dreimal für eine Extraktion eingesetzt. Sowohl Extraktion als auch Rückextraktion erfolgten in Glasgefäßen bei 600 min⁻¹ für 1,5 h.

Innerhalb der drei durchgeführten Zyklen ist ebenfalls keine sinkende Tendenz der Extraktionsausbeute feststellbar. Die Ausbeuten schwanken hier lediglich zwischen 96 - 97 % (0,423 mol L⁻¹ Bernsteinsäure aus Wasser, pH 2,0), 86 - 88 % (0,423 mol L⁻¹ Bernsteinsäure aus Überstand, pH 2,0) und 70 - 75 % (0,847 mol L⁻¹ Bernsteinsäure aus Überstand, pH 4,0).

Insgesamt liegen die Extraktionsausbeuten für Reaktivextraktionssystem 29/6 somit um 1 - 2 % höher als für Reaktivextraktionssystem T1 (vgl. Abbildung 8-6). Für beide Reaktivextraktionssysteme konnte in allen Teilschritten eine komplette Phasentrennung problemlos erzielt werden. Im Rahmen der hier gezeigten Versuche konnte gezeigt werden, dass eine Extraktion von Bernsteinsäure aus

Fermentationsüberstand in Kombination mit einer mehrstufigen Rückextraktion mit niedrigen Trimethylaminkonzentrationen eine Kreislaufführung der Reaktivextraktionssysteme T1 und 29/6 ermöglicht.

Prozessvariante (2) mit einstufiger Rückextraktion und Verdampfung

Wie zuvor beschrieben gibt es neben der mehrstufigen Rückextraktion mit niedrigen Trimethylaminkonzentrationen auch die Möglichkeit hohe Trimethylaminkonzentrationen für die Rückextraktion einzusetzen und vor einer erneuten Extraktion das Trimethylamin aus der organischen Phase zu verdampfen. Für diese Prozessvariante reicht bereits eine Stufe aus, um die Bernsteinsäure vollständig aus der organischen Phase zu entfernen. Das bei der Rückextraktion erzeugte Trimethylammoniumsalz der Säure wird auch hier anschließend durch eine Verdampfungskristallisation thermisch gespalten und die Bernsteinsäure kristallisiert.

Da bei dieser Prozessvariante hohe Konzentrationen an Trimethylamin eingesetzt werden ($> 2,0$ mol pro mol Bernsteinsäure) akkumuliert das überschüssige Trimethylamin in der organischen Phase. Um bei einer erneuten Extraktion einen Übergang in die wässrige Phase zu vermeiden, muss Trimethylamin zuvor aus der organischen Phase verdampft werden. Sowohl das hier abverdampfte, als auch das bei der Verdampfungskristallisation anfallende Trimethylamin können für weitere Rückextraktionen eingesetzt werden. Die aufbereitete organische Phase steht für eine erneute Reaktivextraktion zur Verfügung. Der Prozess ist schematisch in Abbildung 8-8 dargestellt.

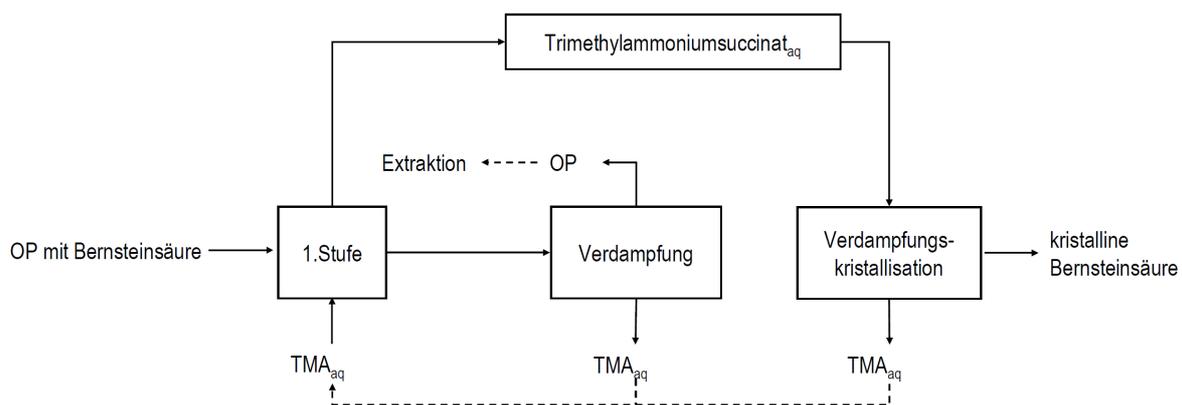


Abbildung 8-8: Schematischer einstufiger Rückextraktionsprozess von Bernsteinsäure aus einer organischen Phase (OP) mit einer wässrigen Trimethylamin Phase (TMA_{aq}), mit einer Konzentration $> 2,0$ mol TMA pro mol Bernsteinsäure (Prozessvariante 2). Anschließend finden eine Verdampfung des Trimethylamins aus der organischen Phase und eine Verdampfungskristallisation statt.

Für die Reaktivextraktionssysteme 29/6 und T1 wurde diese zweite Prozessvariante innerhalb von zwölf Extraktionen mit anschließender Rückextraktion und Verdampfung des Trimethylamins bei Raumtemperatur gezeigt. Die Trimethylaminkonzentration wurde hierbei auf 4,0 mol pro mol Bernsteinsäure eingestellt, um 100 % Rückextraktion zu ermöglichen, gleichzeitig jedoch auch nur eine geringe Akkumulation in der organischen Phase zu erreichen. Die Ausbeuten der Reaktivextraktion mit Reaktivextraktionssystem T1 beladen mit Bernsteinsäure aus Wasser ($0,423 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0) und aus Fermentationsüberstand ($0,423 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0 und $0,847 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,0) sind zusammen mit den linearen Regressionslinien in Abbildung 8-9 dargestellt.

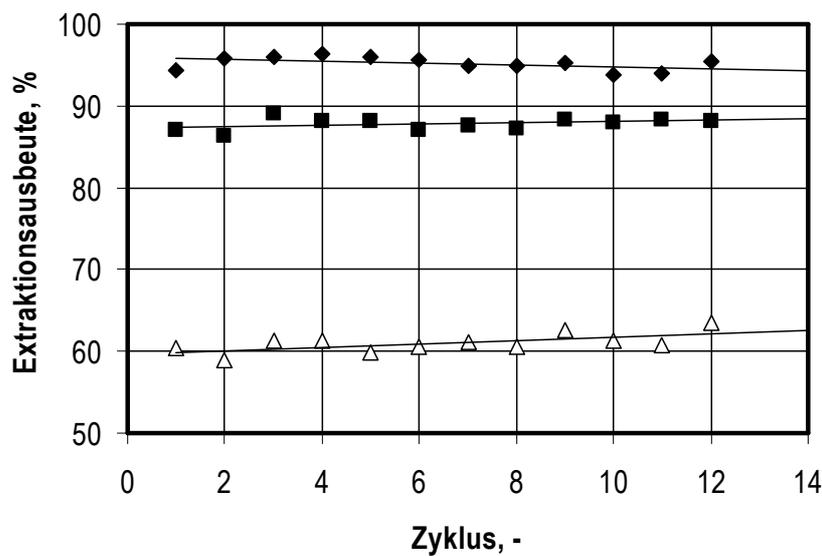


Abbildung 8-9: Recycling des Reaktivextraktionssystems T1 mit einer Aminkonzentration von $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel durch einstufige Rückextraktion mit $4,0 \text{ mol}$ Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure in der organischen Phase und anschließender Verdampfung des Trimethylamins aus der organischen Phase vor einer erneuten Extraktion (Prozessvariante 2). Die Beladung erfolgt durch Extraktion von Bernsteinsäure mit einer Konzentration von $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ aus Wasser bei pH 2,0 \blacklozenge , $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ aus Überstand bei pH 2,0 \blacksquare und $0,847 \text{ mol L}^{-1}$ aus Überstand bei pH 4,0 \triangle . Das Reaktivextraktionssystem T1 wurde insgesamt zwölfmal für eine Extraktion eingesetzt. Sowohl Extraktion als auch Rückextraktion erfolgten in Glasgefäßen bei 600 min^{-1} für 1,5 h.

Innerhalb der zwölf durchgeführten Zyklen ist für keines der mit Bernsteinsäure aus Wasser oder Überstand beladene Reaktivextraktionssysteme T1 eine Absenkung der Extraktionsausbeute mit zunehmender Zyklenzahl zu sehen. Die Ausbeuten liegen abhängig von der eingesetzten Bernsteinsäurelösung und dem pH bei 93,9 - 96,4 % ($0,423 \text{ mol L}^{-1}$ Bernsteinsäure aus Wasser, pH 2,0), 86,2 - 89,0 % ($0,423 \text{ mol L}^{-1}$ Bernsteinsäure aus Überstand, pH 2,0) und 59,0 - 63,6 % ($0,847 \text{ mol L}^{-1}$ Bernsteinsäure aus Überstand, pH 4,0). Auch die Phasentrennung konnte innerhalb der hier durchgeführten Zyklen stabil erhalten werden. Die Trimethylaminkonzentration in der organischen

Phase nach der Rückextraktion lag für alle zwölf Zyklen und alle untersuchten Bernsteinsäurelösungen bei durchschnittlich $1,23 \pm 0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Die anschließende Verdampfung erfolgte bei Raumtemperatur für mindestens 24 Stunden. Dies wurde zuvor bei Vorversuchen mit unterschiedlichen Temperaturen ermittelt und ist in Tabelle 12-15 im Anhang zusammengefasst. Durch die Verdampfung des Trimethylamins kam es dabei in jedem Zyklus gleichzeitig zu einem Volumenverlust der organischen Phase von 11 - 23 % (Schwankungen sind messtechnisch bedingt). Trimethylamin und Wasser haben mit $2,9^\circ\text{C}$ und 100°C die niedrigsten Siedepunkte im Gemisch und verdampfen deshalb am stärksten. In geringerem Umfang verdampfen Trihexylamin ($150 - 159^\circ\text{C}$) und 1-Octanol (195°C), die Bestandteile des Reaktivextraktionssystems T1.

Auch für das Reaktivextraktionssystem 29/6 beladen mit Bernsteinsäure aus Wasser ($0,423 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0) und aus Fermentationsüberstand ($0,423 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0 und $0,847 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,0) wurde die zweite Prozessvariante innerhalb von zwölf Zyklen untersucht. Die Rückextraktion erfolgte ebenfalls mit $4,0 \text{ mol}$ Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure. Die Ergebnisse sind zusammen mit den linearen Regressionslinien in Abbildung 8-10 dargestellt.

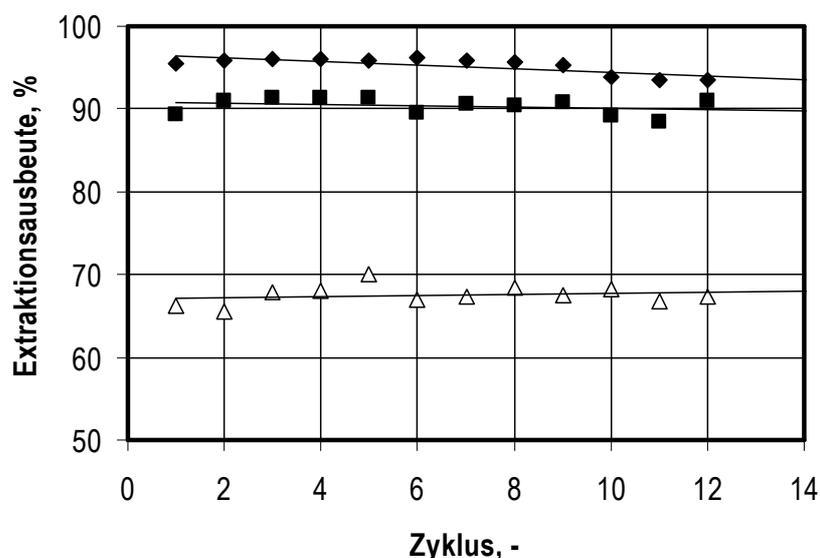


Abbildung 8-10: Recycling des Reaktivextraktionssystems 29/6 mit einer Aminkonzentration von $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel durch einstufige Rückextraktion mit $4,0 \text{ mol}$ Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure in der organischen Phase und anschließender Verdampfung des Trimethylamins aus der organischen Phase vor einer erneuten Extraktion (Prozessvariante 2). Die Beladung erfolgt durch Extraktion von Bernsteinsäure mit einer Konzentration von $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ aus Wasser bei pH 2,0 \blacklozenge , $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ aus Überstand bei pH 2,0 \blacksquare und $0,847 \text{ mol L}^{-1}$ aus Überstand bei pH 4,0 \triangle . Das Reaktivextraktionssystem 29/6 wurde insgesamt zwölfmal für eine Extraktion eingesetzt. Sowohl Extraktion als auch Rückextraktion erfolgten in Glasgefäßen bei 600 min^{-1} für 1,5 h.

Auch hier konnten zwölf Zyklen mit gleich hohen Extraktionsausbeuten unabhängig von der Beladung mit Bernsteinsäure aus Wasser oder Fermentationsüberstand durchgeführt werden. Die durchschnittlichen Extraktionsausbeuten lagen bei 93,8 - 96,1 %, (0,423 mol L⁻¹ Bernsteinsäure aus Wasser, pH 2,0), 88,4 - 91,4 % (0,423 mol L⁻¹ Bernsteinsäure aus Überstand, pH 2,0) und 65,6 - 70,0 % (0,847 mol L⁻¹ Bernsteinsäure aus Überstand, pH 4,0). Die Phasentrennung war innerhalb der zwölf durchgeführten Zyklen stabil erzielbar. Die durchschnittliche Trimethylaminkonzentration in der organischen Phase betrug nach der Rückextraktion $1,17 \pm 0,05$ mol L⁻¹. Auch hier trat ein Volumenverlust durch die nach den Rückextraktionen folgende Verdampfung des Trimethylamins auf. Dieser lag für das Reaktivextraktionssystem 29/6 zwischen 15 - 30 % (Schwankungen messtechnisch bedingt). Der größte Volumenverlust kommt auch hier durch die Verdampfung des leicht siedenden Trimethylamins und des im Reaktivextraktionssystem gelösten Wassers zustande. In geringerer Menge gehen hier 1-Hexanol mit einem Siedepunkt von 157°C, Dihexylamin mit 192 - 194°C und Diisooctylamin mit 122 - 124°C verloren. Den geringsten Anteil macht auf Grund des hohen Siedepunkts von 195°C 1-Octanol aus. Insgesamt verdampft hier mehr organische Phase als im Fall von Reaktivextraktionssystem T1. Dies ist vor allem auf den Verlust des niedriger siedenden Alkohols 1-Hexanol zurückzuführen.

Die bisherigen Versuche zur Rezyklierbarkeit der Reaktivextraktionssysteme fanden im mL-Maßstab statt. In einem weiteren Experiment sollte deshalb gezeigt werden, dass auch im L-Maßstab (Zentrifugalextraktor) mehrere Zyklen mit Verdampfung des Trimethylamins aus der wässrigen Phase möglich sind. Dies wurde exemplarisch mit Reaktivextraktionssystem T1 für die Extraktion von 0,423 molarer Bernsteinsäure aus Wasser und aus Fermentationsüberstand mit einem pH von 2,0, einer einstufigen Rückextraktion mit 4,0 mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure und anschließender Verdampfung des Trimethylamins gezeigt. Die Extraktion und Rückextraktion erfolgte im Zentrifugalextraktor mit den zuvor identifizierten optimalen Betriebspunkten. Dies sind für die Extraktion eine Wehrscheibe mit einem inneren Durchmesser von 24,77 mm, ein Volumenstrom von 20 mL min⁻¹ je Phase und eine Rotationsgeschwindigkeit von 50 Hz (235 g). Für die Rückextraktion wurde eine Wehrscheibe mit einem inneren Durchmesser von 22,86 mm, ein Volumenstrom von ebenfalls 20 mL min⁻¹ je Phase und eine Frequenz von 50 Hz (235 g) eingesetzt. Die Extraktionsausbeuten in jedem Zyklus sind im Vergleich zu den Ausbeuten im mL-Maßstab in Abbildung 8-11 dargestellt.

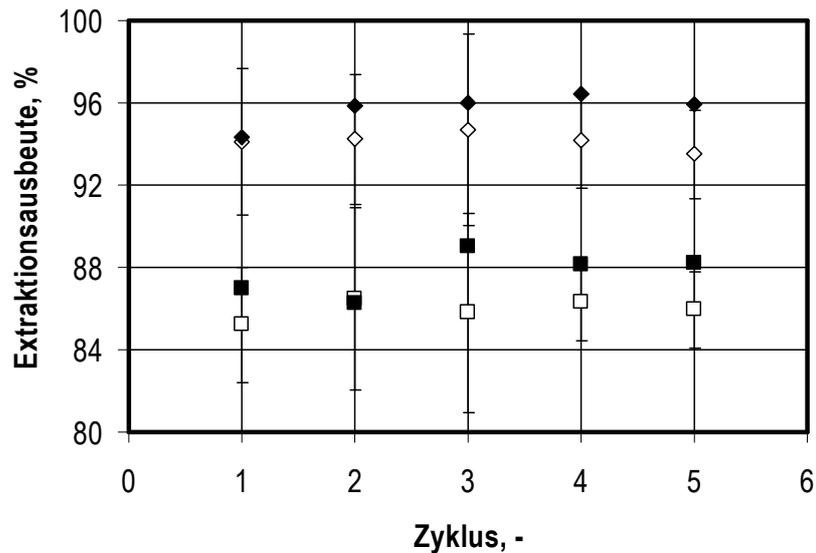


Abbildung 8-11: Recycling des Reaktivextraktionssystems T1 (Aminkonzentration $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$) durch einstufige Rückextraktion mit $4,0 \text{ mol}$ Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure und anschließender Verdampfung des Trimethylamins aus der organischen Phase (Prozessvariante 2). Die Beladung erfolgte durch Extraktion von Bernsteinsäure mit einer Konzentration von $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ aus Wasser bei pH 2,0 im mL-Ansatz ◆ und L-Ansatz ◇ sowie durch Extraktion von Bernsteinsäure mit einer Konzentration von $0,423 \text{ mol L}^{-1}$ aus Fermentationsüberstand bei pH 2,0 im mL-Ansatz ■ und im L-Ansatz □. Das Reaktivextraktionssystem T1 wurde insgesamt fünfmal für eine Extraktion eingesetzt. Sowohl Extraktion als auch Rückextraktion erfolgten für den mL-Ansatz in Glasgefäßen bei 600 min^{-1} für 1,5 h. Die Extraktion im L-Ansatz erfolgte im Zentrifugalextraktor mit den identifizierten optimalen Betriebspunkten.

Auch im Zentrifugalextraktor lassen sich innerhalb von fünf Zyklen Extraktionsausbeuten in nahezu derselben Höhe wie im mL-Maßstab erzielen. Während die Extraktionsausbeuten im mL-Maßstab für die Extraktion von Bernsteinsäure aus Wasser zwischen 94 - 96 % und für Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand zwischen 86 - 89 % schwanken sind es im Zentrifugalextraktor zwischen 93 - 94 % und 85 - 86 %. Innerhalb der fünf durchgeführten Zyklen ist auch hier keine sinkende Tendenz in der Extraktionsleistung des Reaktivextraktionssystems festzustellen. Des Weiteren war über die komplette Prozesszeit im Zentrifugalextraktor eine optimale Phasentrennung zu erzielen. Die Ergebnisse der Rezyklierbarkeit konnten dementsprechend auf den L-Maßstab übertragen werden.

Auch hier kam es durch die nach der jeweiligen Rückextraktion durchgeführten Verdampfung (1000 mL Glasgefäße, mind. 24 h) des Trimethylamins aus der organischen Phase zu einem Volumenverlust. Dieser betrug in jedem Zyklus zwischen 9 - 10 %.

Vergleicht man beide Prozessvarianten so sind folgende Nachteile (-) und Vorteile (+) für die erste mögliche Prozessführung (mehrstufige Rückextraktion mit niedrigen Trimethylaminkonzentrationen, (siehe Abbildung 8-4) zu nennen:

- + keine Akkumulation von Trimethylamin in der organischen Phase
- + wenige Prozessschritte (Rückextraktion und Verdampfungskristallisation)
- + Rezyklierung des Trimethylamins
- höhere Prozesskosten durch mehrstufige Rückextraktion
- höhere Volumina in der Verdampfungskristallisation zu bewältigen

Die Vor- und Nachteile der zweiten Prozessvariante (einstufige Rückextraktion mit hohen Trimethylaminkonzentrationen und Verdampfung des Trimethylamins aus der organischen Phase, siehe Abbildung 8-8) sind folgende:

- + einstufige Rückextraktion mit hoher Ausbeute
- + geringes Volumen in der Verdampfungskristallisation zu bewältigen
- + Rezyklierung des Trimethylamins
- hohe Trimethylaminkonzentration führt zur Akkumulation in der organischen Phase
- zusätzlicher Verfahrensschritt: Verdampfung des Trimethylamin aus der organischen Phase
- hoher Volumenverlust der organischen Phase bei der Verdampfung

Die Spaltung des Trimethylammoniumsalzes erfolgt in beiden Prozessvarianten durch eine Verdampfung der wässrigen Trimethylaminlösung und einer Kristallisation der Bernsteinsäure. Dies konnte bereits im Rahmen dieser Arbeit im Labormaßstab gezeigt werden (vgl. Punkt 5.3). In Prozessvariante 2 fällt zusätzlich weiteres abverdampftes Trimethylamin aus der organischen Phase an. Trimethylamin kann in beiden Fällen prinzipiell kondensiert, in Wasser eingeleitet und so mehrfach für neue Extraktionen eingesetzt werden. Die Rezyklierung des Trimethylamins wurde in dieser Arbeit jedoch nicht mehr experimentell gezeigt.

Auf Grund der starken Verluste durch die Verdampfung und den zusätzlich notwendigen Schritt in Prozessvariante 2 erscheint Prozessvariante 1 mit einer zweistufigen Rückextraktion mit geringeren Konzentrationen von 1,75 mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure insgesamt die bessere Wahl.

Betrachtet man den Gesamtprozess so lassen sich mit den Reaktivextraktionssystemen T1 und 29/6 bei der einstufigen Extraktion von Bernsteinsäure aus einer wässrigen Fermentationslösung Ausbeuten von 82,8 - 84,2 % erzielen. Durch eine mehrstufige Rückextraktion mit 1,75 mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure (Prozessvariante 1) kann Bernsteinsäure anschließend innerhalb von zwei Zyklen

nahezu vollständig mit mehr als 99 % rückextrahiert werden. Dementsprechend liegen die Gesamtausbeuten nach diesem Schritt nur geringfügig niedriger bei 81,3 - 83,5 %. Im letzten Aufarbeitungsschritt, der Verdampfungskristallisation lässt sich Bernsteinsäure mit geschätzten Ausbeuten in Höhe der erzielten Reinheiten von 98,3 - 99,5 % kristallisieren. Dies entspricht einer Ausbeute des Kompletprozesses von 79,9 % (T1) bis 83,1 % (29/6). Der limitierende Schritt ist hier die Reaktivextraktion. Wie bereits in Abbildung 5-35 und Abbildung 5-36 gezeigt werden konnte, ist jedoch eine Erhöhung der Ausbeute durch eine mehrstufige Reaktivextraktion und somit auch eine Steigerung der Gesamtausbeute möglich.

9 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung

Die biotechnologische Produktion von Bernsteinsäure ist von großem Interesse für die chemische Industrie, da Bernsteinsäure das Potential hat als Plattformchemikalie Maleinsäureanhydrid zu verdrängen und so als Ausgangsstoff für viele auf C₄-Körper basierende Chemikalien zu dienen. Während in der Stammentwicklung bereits effiziente Mikroorganismen identifiziert werden konnten, gibt es noch kein geeignetes industriell einsetzbares Aufarbeitsverfahren für Bernsteinsäure.

Bei der Untersuchung und dem Vergleich verschiedener in der Literatur beschriebener Isolierungs- und Reinigungsmethoden für Bernsteinsäure aus wässrigen Lösungen im Labormaßstab scheint vor allem die Reaktivextraktion eine geeignete und erfolgversprechende Methode zu sein (Cascaval und Balaction 2004). Dabei handelt es sich um eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit zusätzlichen Reaktivkomponenten (hier: Amine), die die Bernsteinsäuremoleküle selektiv an der Phasengrenzfläche binden können. Die dabei entstehenden reversiblen Komplexe gehen in die organische Phase über und werden dort von den Lösungsmittelmolekülen solvatisiert.

Um die extrahierte Bernsteinsäure von der organischen Phase in eine zweite wässrige Phase zu überführen, wird häufig als weiterer Aufarbeitungsschritt eine Rückextraktion mit einer wässrigen Trimethylaminlösung vorgeschlagen (Tung und King 1994b; Poole und King 1991). Trimethylamin kann dabei an der Phasengrenzfläche mit dem Amin-Säure-Komplex wechselwirken und Bernsteinsäure in Form des korrespondierenden Trimethylammoniumsalzes in die wässrige Phase überführen.

Im Vergleich zu primären und sekundären Aminen tritt bei Trimethylamin in Gegenwart von Carbonsäuren bei höheren Temperaturen keine Amidbildung auf (Mitchell und Reid 1931; Poole und King 1991; Streitwieser und Heathcock 1976), weshalb in einem letzten Schritt eine einfache thermische Spaltung des Trimethylammoniumsalzes der Bernsteinsäure durch eine Verdampfungskristallisation erfolgen kann (Tung und King 1994b).

Basierend auf den Literaturdaten zu den einzelnen Aufarbeitungsmethoden sollte im Rahmen dieser Arbeit ein integrierter Prozess für die selektive Gewinnung von Bernsteinsäure aus wässrigen Fermentationslösungen, bestehend aus einer Reaktivextraktion mit geeigneten Aminen und Lösungsmitteln, einer Rückextraktion mit Trimethylamin und einer Verdampfungskristallisation entwickelt werden. Hierfür sollten die Reaktiv- und Rückextraktion in Zentrifugalextraktoren und die Verdampfungskristallisation in einem Rotationsverdampfer untersucht und optimiert werden. Da sowohl bei der Reaktivextraktion als auch bei der Rückextraktion teilweise kostenintensive Chemikalien

eingesetzt werden, sollte zudem eine Minimierung des Hilfsmittelverbrauchs durch eine Kreislaufführung erfolgen. In einem letzten Schritt sollte des Weiteren gezeigt werden, dass eine Prozessintegration der einzelnen Aufarbeitungsschritte möglich ist.

Für die Reaktivextraktion von Bernsteinsäure wurden in einem ersten Schritt drei Auswahlprüfverfahren durchgeführt. Hierbei konnten sowohl geeignete einfache (ein Amin + ein Lösungsmittel), komplexe (zwei Amine + zwei Lösungsmittel) als auch biokompatible Reaktivextraktionssysteme (zwei biokompatible Amine + zwei biokompatible Lösungsmittel) identifiziert werden. Die maximalen Ausbeuten einer einstufigen Reaktivextraktion von Bernsteinsäure aus einer wässrigen Lösung im mL-Ansatz konnten mit dem einfachen Reaktivextraktionssystem T1 (Trihexylamin, 1-Octanol) mit 94,7 % (Verteilungskoeffizient $K = 17,9$) und mit dem komplexen Reaktivextraktionssystem 29/6 (Diisooctylamin, Dihexylamin, 1-Hexanol, 1-Octanol) mit 95,5 % ($K = 21,2$) mit Aminkonzentrationen von $1,5 \text{ mol kg}^{-1}$ Lösungsmittel erzielt werden. Ebenfalls gezeigt werden konnte, dass eine Steigerung der Extraktionsausbeute bis auf 100 % durch eine mehrstufige Reaktivextraktion möglich ist.

Die beiden Systeme T1 und 29/6 zeichnen sich durch hohe Ausbeuten aus, sind jedoch auf Grund der mangelnden Biokompatibilität ihrer Einzelkomponenten nicht für einen Prozess mit Rezyklierung des abgereicherten Fermentationsüberstand einsetzbar. Anders verhält es sich mit dem effizientesten biokompatiblen Reaktivextraktionssystem D (Tridodecylamin, *n*-Hexan, Toluol). Hier ist ein integrierter Ansatz mit Rückführung des abgereicherten Fermentationsüberstands möglich, da weder die eingesetzten Lösungsmittel (*n*-Hexan, Toluol) noch das eingesetzte Amin (Tridodecylamin) toxisch auf die untersuchten Mikroorganismen (*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Corynebacterium glutamicum*) wirken. Die Ausbeute dieses Reaktivextraktionssystems mit einer Aminkonzentration von $1,0 \text{ mol kg}^{-1}$ ist im einstufigen Verfahren mit 17 % ($K = 0,2$) gering, kann aber durch eine mehrstufige Extraktion (~ 17 Stufen) bis auf 98,5 % erhöht werden. Auf Grund der geringen Ausbeute im einstufigen Ansatz wurde dieses Reaktivextraktionssystem dennoch nicht weiter untersucht, während für die effizienten Reaktivextraktionssysteme T1 und 29/6 im mL-Ansatz eine nähere Charakterisierung stattfand.

Hierbei wurde die maximal mögliche Beladung der Reaktivextraktionssysteme sowie der Einfluss von Ionen und anderen organischen Säuren bei der Extraktion untersucht. Sind Nebenprodukte, wie andere organische Säuren vorhanden, muss als pH in der wässrigen Ausgangslösung ein pH von 2 -3 ($\ll \text{pK}_{\text{S}1} = 4,17$) gewählt werden, um eine möglichst selektive Extraktion der Bernsteinsäure mit hoher Ausbeute zu erzielen. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Art und Konzentration der in der wässrigen Ausgangslösung vorhandenen Ionen ebenfalls einen großen Einfluss auf die maximal erzielbaren Extraktionsausbeuten hat. Je höher die Ionenstärke, desto geringer ist die Extraktionsausbeute von Bernsteinsäure, da Salzionen mitextrahiert werden und so die Effizienz der

Reaktivextraktion stark herabsetzten. Gerade bei der Extraktion von Bernsteinsäure aus salzhaltigen Fermentationslösungen spielt dies eine große Rolle. Bei gleichen Ausgangsbedingungen konnten mit dem Reaktivextraktionssystem T1 nur 83,0 % ($K = 4,9$) statt 94,7 % und mit dem Reaktivextraktionssystem 29/6 nur 85,1 % ($K=5,7$) statt 95,5 % bei der einstufigen Extraktion von Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand im mL-Maßstab erzielt werden. Ziel der Prozessoptimierung bei der Fermentation muss es deshalb auch sein, hohe Salzfrachten und große Nebenproduktbildungen zu vermeiden, um einen effizienten Gesamtprozess (Fermentation und Aufarbeitung) zu ermöglichen.

Nach der Charakterisierung und Untersuchung der Reaktivextraktionssysteme T1 und 29/6 im mL-Maßstab folgte die Übertragung in den Zentrifugalextraktor (L-Maßstab). Hierbei konnten die optimalen Extraktionsbedingungen ermittelt und eine hohe Extraktionsausbeute erzielt werden. Die optimalen Betriebspunkte liegen für die Reaktivextraktion im Labormaßstab ($V = 150 - 160$ mL) bei einem Volumenstrom von 20 mL min^{-1} je Phase, einer Wehrscheibe mit einem Lochdurchmesser von 24,77 mm und einer Rotationsgeschwindigkeit von 50 Hz (235 g). Insgesamt lassen sich damit im L-Maßstab bei der Extraktion von Bernsteinsäure aus einer wässrigen 0,423 molaren Lösung mit 92,7 % ($K = 14,7$) für das Reaktivextraktionssystem T1 und 94,4 % ($K = 16,9$) für das Reaktivextraktionssystem 29/6 nahezu gleich hohe Ausbeuten wie im mL-Maßstab erzielen. Auch die Ausbeuten für Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand liegen bei diesen beiden Reaktivextraktionssystemen an den optimalen Betriebspunkten im L-Maßstab mit 82,8 % ($K = 4,8$) und 84,2 % ($K = 5,3$) in derselben Höhe wie im mL-Maßstab. Bei allen Experimenten konnte zudem eine stabile Phasentrennung erzielt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Verweilzeit im Zentrifugalextraktor (~ 4 min) bei höheren Säurekonzentrationen nicht ausreichend für die Gleichgewichtseinstellung ist. Die langsame Reaktion zwischen Säure und Amin ist hier der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Eine Erhöhung der Verweilzeit kann in diesem Fall durch den Einsatz einer größeren Zentrifuge oder mehrerer hintereinander geschalteter Apparate erfolgen.

Für die weitere Aufarbeitung der Bernsteinsäure und der Rezyklierung der eingesetzten Reaktivextraktionssysteme wurde die Rückextraktion mit Trimethylamin im mL-Maßstab optimiert und anschließend auf den L-Maßstab im Zentrifugalextraktor übertragen. Dabei konnte festgestellt werden, dass eine vollständige Rückextraktion möglich ist, wenn pro mol Bernsteinsäure 2,0 mol Trimethylamin in wässriger Lösung eingesetzt werden. Grund hierfür sind die zwei Carboxylgruppen der Bernsteinsäure, die für den Phasenwechsel mit Trimethylaminmolekülen besetzt werden müssen. Für das mit Bernsteinsäure beladene Reaktivextraktionssystem T1 konnten im Zentrifugalextraktor ($V = 150 - 160$ mL) an den optimalen Betriebspunkten (Wehrscheibe mit Lochdurchmesser 22,86 mm,

Volumenstrom 20 mL min^{-1} je Phase, Rotationsgeschwindigkeit 50 Hz (235 g) bei einer einstufigen Rückextraktion durchschnittlich $98,2 \%$ ($K \geq 54,5$) der Säure rückextrahiert werden - für mit Bernsteinsäure beladenes Reaktivextraktionssystem 29/6 $99,2 \%$ ($K \geq 124$). Dabei konnte kein Unterschied in der Höhe der Rückextraktionsausbeute zwischen einer organischen Phase beladen mit Bernsteinsäure aus Wasser oder Fermentationsüberstand noch bei unterschiedlicher Aminkonzentration in der organischen Phase festgestellt werden. Die Reaktion zwischen den Bernsteinsäuremolekülen in der organischen Phase und den Trimethylaminmolekülen ist dabei deutlich schneller als bei der Reaktivextraktion. Dementsprechend sind bei der Rückextraktion theoretisch deutlich höhere Volumenströme als die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gesamtvolumenströme von 500 mL min^{-1} möglich, da auch kurze Verweilzeiten von wenigen Sekunden für die Gleichgewichtsreaktion ausreichen. Auch bei allen Experimenten zur Rückextraktion konnte eine stabile Phasentrennung erzielt werden.

Für die wirtschaftliche Nutzbarkeit des Gesamtprozesses ist es notwendig die Reaktivextraktionssysteme mehrfach nutzen zu können. Um dies zu zeigen, wurden mehrere Zyklen mit durch Rückextraktion aufbereiteter organischer Phase durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass es zu einer starken Reduktion der Extraktionsausbeute in der zweiten Reaktivextraktion kommt, wenn bei der vorangegangenen Rückextraktion geringfügig mehr als zwei mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure vorhanden waren. Es konnte gezeigt werden, dass Trimethylamin bei hohen Konzentrationen in die organische Phase verloren geht. Bei einer erneuten Reaktivextraktion geht dieses Trimethylamin in die wässrige Fermentationslösung über, reagiert mit den Bernsteinsäuremolekülen zum korrespondierenden Trimethylammoniumsalz und verhindert so die Extraktion der Säure. Auf Grund dieses Effekts wurden zwei alternative Prozessführungen untersucht: eine Reaktivextraktion mit anschließender mehrstufiger Rückextraktion mit niedrigen Trimethylaminkonzentrationen ($< 2 \text{ mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure}$) und eine Reaktivextraktion mit anschließender Rückextraktion mit hohen Trimethylaminkonzentrationen ($> 2 \text{ mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure}$) und zusätzlicher Verdampfung des Trimethylamins aus der organischen Phase.

Bei der ersten untersuchten Prozessführung konnte exemplarisch mit Reaktivextraktionssystem T1 in vier Zyklen gezeigt werden, dass kein Abfall der Extraktionsausbeuten bei einer Aufbereitung der organischen Phase mit niedrigen Trimethylaminkonzentrationen auftritt. Je nach eingesetzter Menge an Trimethylamin waren jedoch zwischen zwei bis fünf Stufen nötig, um eine vollständige Rückextraktion der Bernsteinsäure zu erzielen. Auch bei der Extraktion von Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand konnten mit dieser Prozessvariante für beide Reaktivextraktionssysteme hohe und konstante Ausbeute in drei Zyklen erzielt werden. Die höhere Stufenanzahl bringt jedoch zum einen

höhere Kosten und zum anderen höhere Volumina bei der anschließenden Verdampfungskristallisation mit sich.

Bei der zweiten Prozessvariante konnte bereits in einem Schritt die gesamte in der organischen Phase vorhandene Bernsteinsäure rückextrahiert werden. Innerhalb der 16 durchgeführten Zyklen war hier somit eine konstante Extraktionsleistung der Reaktivextraktionssysteme T1 und 29/6 zu erzielen. Die höheren Trimethylaminkonzentrationen führten jedoch bei diesem Ansatz zu einer Akkumulation des Trimethylamins in der organischen Phase. Vor einer erneuten Extraktion musste dieses durch Verdampfen bei Raumtemperatur entfernt werden. Das abverdampfte Trimethylamin kann prinzipiell kondensiert und wieder in Wasser eingeleitet werden, um so für mehrere Rückextraktionen zur Verfügung zu stehen. Problematisch bei der Verdampfung des Trimethylamins ist der gleichzeitige Verlust an organischer Phase. Bereits bei einer Verdampfung von $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ Trimethylamin gingen dabei auch 11 - 30 % der organischen Phase je nach eingesetztem Reaktivextraktionssystem mit verloren. Ziel muss es hier deshalb sein, möglichst nur knapp über der stöchiometrischen Menge von $2,0 \text{ mol}$ Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure zu liegen um die Verdampfungszeit und den Verlust somit zu minimieren. Auf Grund des zusätzlich notwendigen Verdampfungsschritts und dem hohen Verlust an organischer Phase scheint die zweite Prozessvariante jedoch insgesamt weniger gut geeignet zu sein als die erste.

Unabhängig von der gewählten Prozessvariante erfolgen in einem letzten Schritt die thermische Spaltung des Trimethylammoniumsalzes und die Kristallisation der Bernsteinsäure. Im Labormaßstab konnte dies im Rotationsverdampfer prinzipiell gezeigt werden. Die Bestimmung der Ausbeuten mit $88,2 \pm 11,2 \%$ (T1) und $89,0 \pm 9,1 \%$ war jedoch auf Grund der Bauart des eingesetzten Rotationsverdampfers schwierig und stark fehlerbehaftet. Da keine Zersetzungsprodukte von Bernsteinsäure in diesem Aufarbeitungsschritt gefunden werden konnten, ist von geschätzten Ausbeuten von $> 99 \%$ im technischen Maßstab auszugehen. Das abverdampfte Trimethylamin kann prinzipiell kondensiert und erneut für Rückextraktionen eingesetzt werden. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht gezeigt.

Die Gesamtausbeute des Prozesses, bestehend aus einer einstufigen Reaktivextraktion von Bernsteinsäure aus Fermentationsüberstand ($0,423 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0), einer zweistufigen Rückextraktion mit $1,75 \text{ mol}$ Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure (Prozessvariante 1) und einer Verdampfungskristallisation, liegt bei $79,9 \%$ (T1) bis $83,1 \%$ (29/6). Die Ausbeuten nach jedem Aufarbeitungsschritt sowie die Volumenänderung sind in

Abbildung 9-1 schematisch für das Reaktivextraktionssystem 29/6 nochmals zusammengefasst.

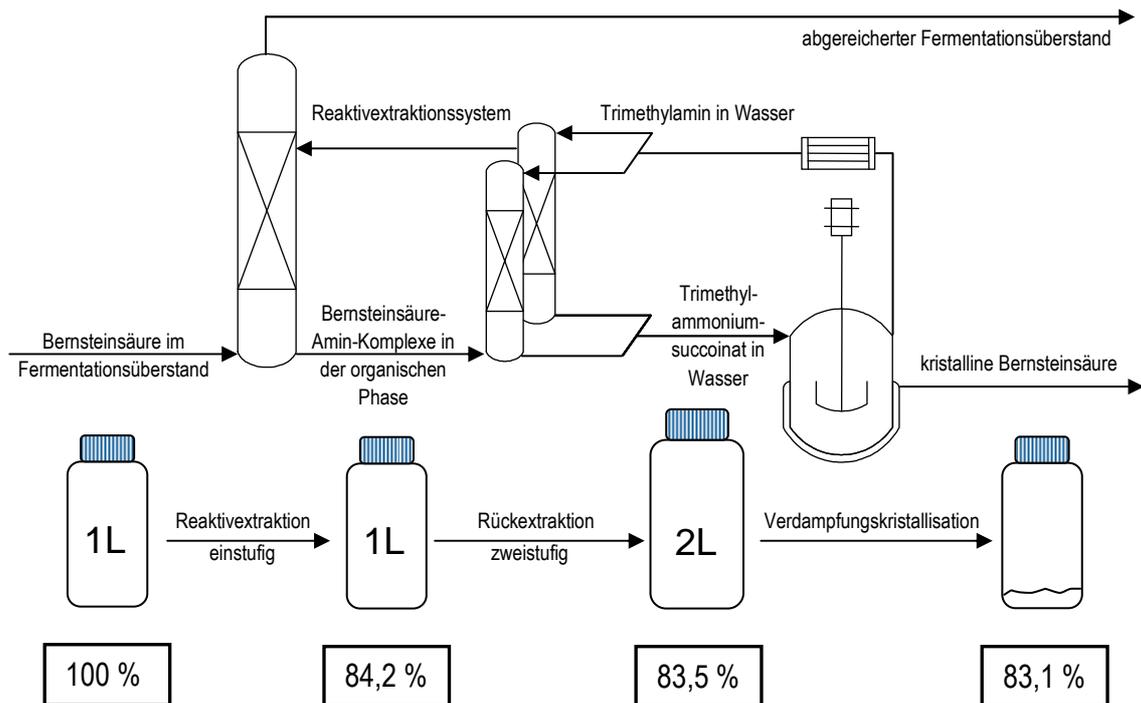


Abbildung 9-1: Gesamtprozess der integrierten Aufarbeitung von Bernsteinsäure aus einer wässrigen Fermentationslösung. 1. Schritt: einstufige Reaktivextraktion (Reaktivextraktionssystem 29/6) mit 84,2 % Ausbeute im Zentrifugalextraktor. 2. Schritt: zweistufige Rückextraktion mit 1,75 mol Trimethylamin pro mol Bernsteinsäure mit 99,2 % Ausbeute im Zentrifugalextraktor (Gesamtausbeute nach Reaktiv- und Rückextraktion 83,5 %; Volumenverdopplung). 3. Schritt: Verdampfungskristallisation mit 99,5 % Ausbeute (Gesamtausbeute nach Reaktivextraktion, Rückextraktion und Verdampfungskristallisation 83,1 %).

Da die Rückextraktion deutlich schneller als die Reaktivextraktion abläuft (keine Reaktionslimitierung) und somit geringere Verweilzeiten für eine hohe Rückextraktionsausbeute ausreichend sind, ist die Dimensionierung der einsetzbaren Zentrifugalextraktoren kleiner. Für die mehrstufige Rückextraktion sind jedoch im Fall einer Trimethylaminkonzentration von 1,75 mol pro mol Bernsteinsäure (Prozessvariante 1) zwei Apparate nötig und es kommt in diesem Schritt zu einer Verdopplung des Ausgangsvolumens.

Da die Einzelkomponenten des Reaktivextraktionssystems 29/6 (Diisooctylamin, Dihexylamin, 1-Hexanol, 1-Octanol) nicht biokompatibel sind, muss der gesamte abgereicherte Fermentationsüberstand nach der Reaktivextraktion verworfen werden. Sowohl das Reaktivextraktionssystem als auch die wässrige Trimethylaminlösung können jedoch im Kreislauf geführt und somit die Menge an eingesetzten Hilfsmitteln minimiert werden.

Vergleicht man den in dieser Arbeit untersuchten und optimierten Aufarbeitungsprozess mit dem von Song *et al.* (2007) beschriebenen Prozess, bestehend aus einer Reaktivextraktion mit Trioctylamin in

1-Octanol und anschließender Vakuumdestillation und Kristallisation, mit einer Ausbeute von 67,05 %, liegt der im Rahmen dieser Arbeit beschriebene mehrstufige gesamten Aufarbeitungsprozesses um 14,3 - 16,3 % abhängig vom eingesetzten Reaktivextraktionssystem höher. Auch gegenüber des von Huh *et al.* (2006) beschriebenen Prozesses mit einer Reaktivextraktion zur Entfernung anderer Säuren und anschließender Verdampfungskristallisation der Bernsteinsäure mit einer Gesamtausbeute von 71,3 %, ist der hier vorgestellte Prozess somit deutlich effizienter.

Ausblick

Die Daten für „Miniplant“-Untersuchungen sind nun verfügbar, sodass eine entsprechende Kompletanlage aufgebaut und die Betriebsoptimierung vorangetrieben werden kann. Wichtig sind vor allem Untersuchungen zur Dauerstabilität und zum maximalen Verbrauch der Hilfsmittel, sowie die Bestimmung des Energiebedarfs. Auch sollten optimale Betriebspunkte in der „Miniplant“-Anlage mit realen Fermentationslösungen, sowie die Möglichkeit einer mehrstufigen Reaktivextraktion überprüft werden.

Ebenfalls sinnvoll wären weitere Untersuchungen zur Identifikation von biokompatiblen Reaktivextraktionssystemen. Hierbei sollte nicht nur der Einfluss von Amin und Lösungsmittel auf das Wachstum der Produktionsorganismen, sondern vor allem auf die Produktbildung näher untersucht werden. Hier würde sich gegebenenfalls ein weiteres Auswahlprüfverfahren anbieten.

Des Weiteren kann mit den in der „Miniplant“ gewonnenen Daten eine ökonomische Bewertung (Kostenanalyse) und damit auch eine ökologische Bewertung des Gesamtprozesses erfolgen.

10 Literaturverzeichnis

Anonymous (2005) Prices & people. Chem Mark Rep 267:16-18

Arikawa Y, Kuroyanagi T, Shimosaka M, Muratsubaki H, Enomoto K, Kodaira R, et al. (1999) Effect of gene disruptions of the TCA cycle on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biosci Bioeng 87:28–36

Baier G (1999) Liquid-liquid extraction based on a new flow pattern: two fluid Taylor-Couette flow, University of Wisconsin, Dissertation, 1999

Bailly M, Roux-de Balmann H, Aimar P, Lutin F, Cheryan M (2001) Production processes of fermented organic acids targeted around membrane operations: design of the concentration step by conventional electro dialysis. J Membr Sci 191:129–142

Baniel AM, Blumberg R, Hajdu K (1981) Recovery of acids from aqueous solutions. US patent 4,275,234

Baniel AM, Eyal AM (1995) Citric acid extraction. US patent 5,426,220

Barrow GM, Yerger EA (1954) Acid-base reactions in non-dissociating solvents. Acetic acid and triethylamine in carbon tetrachloride and chloroform. J Am Chem SOC 76:5211-5216

Barrow GM (1956) The nature of hydrogen bonded ion-pairs: The reaction of pyridine and carboxylic acids in chloroform. J Am Chem SOC 78:5802-5806

Bart HJ (2001) Reactive extraction. Springer Verlag, Berlin und Heidelberg

Beauprez JJ, De Mey M, Soetaert WK (2010) Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers. Proc Biochem, 45:1103-1114

Berglund KA, Elankovan P, Glassner DA (1991) Carboxylic acid purification and crystallization process. US patent 5,034,105

Blattner FR, Burland V, Plunkett B, Sofia HJ, Daniels DL (1993) Analysis of the *Escherichia coli* genome. 4. DNA-Sequence of the region from 89.2 to 92.8 minutes. Nucleic Acids Research 21(23):5408-5417

Boychyn M, Yim S, Ayza S, Shamlou P, Blumer M, More J, Hoare M (2001) Characterization of flow intensity in continuous centrifuges for the development of laboratory mimics. Chem Eng Sci 56:4759-4770

Brandt HW, Reissinger KH, Schröter J (1978) Moderne Flüssig/Flüssig- Extraktoren - Übersicht und Auswahlkriterien. Chem Ing Tech 50: 345-354

Brockhaus Enzyklopädie online (2005-2009) Bibliographisches Institut & F. A. Brockhaus AG

Bruce LJ und Daugulis AJ (1991) Solvent selection strategies for extractive biocatalysis. Biotechnology Progress 7:116-124

Büchner W, Schliebs R, Winter G, Büchel KH (1986) Industrielle anorganische Chemie, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, S. 597 ff

Cascaval D, Balaction AI (2004) New separation techniques on bioseparations 1. Reactive extraction. Chem Ind 58(9):375–386

Chmiel H Hrsg. (1991) Bioprozeßtechnik: Einführung in die Bioverfahrenstechnik. Stuttgart, New York: G . Fischer Verlag, 1991

Christen DS (2010) Praxiswissen der chemischen Verfahrenstechnik, 2. bearbeitete und ergänzte Fassung. Springer Verlag, Heidelberg

- Cornils B**, Lappe P (2005) Dicarboxylic acids, aliphatic. Ullmann's Encyclopaedia of Industrial Chemistry; VCH: Weinheim, 1989; Vol. A8
- Danckwerts PV** (1951) Significance of liquid-film coefficients in gas absorption. *Ind Eng Chem* 43:1460
- Datta R** (1992) Process for the production of succinic acid by anaerobic fermentation. US patent 5,143,833
- Datta R**, Glassner DA, Jain MK, Vicky Roy JR (1992) Fermentation and purification process for succinic acid. US patent 5,168,055
- Davis CP**, Cleven D, Brown J, Balish E (1976) *Anaerobiospirillum*, a new genus of spiral-shaped bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 26:498-504
- Delhomme C**, Weuster-Botz D, Kühn FE (2009) Succinic acid from renewable resources as a C4 building-block chemical - a review of the catalytic possibilities in aqueous media. *Green Chem* 11:13–26
- Fargues C**, Broyart B, Benmami M, Lameloise LM (2006) Complete decalcification of saline effluent by associating a carboxylic resin with a chelating resin, *Sep. Sci. Technol.* 41:359–377
- Franke D** (2002) Funktionalisierte Cyclohexadien-trans-1,2-diole: Zugang durch Techniken des metabolic engineering und Verwendung als Bausteine in der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese. Dissertation. Berichte des Forschungszentrum Jülich (3992)
- Frieling von P**, Schügerl K (1983) Recovery of lactic acid from aqueous model solutions and fermentation broth. *Proc Bio* 34:685-696
- Gebauer K**, Steiner L, Hartland S (1982) Zentrifugalextraktion - eine Literaturübersicht. *Chem Eng Technol* 54:476-496
- Gebhardt G**, (2010) Reaktionstechnische Untersuchungen von rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae* zur Bernsteinsäureherstellung, Dissertation
- Glassner DA**, Datta R (1992) Process for the production and purification of succinic acid. US patent 5,143,834
- Gossauer A** (Hrsg.) (2006) Struktur und Reaktivität der Biomoleküle. Wiley-VHC, Schweiz
- Guettler MV**, Jain MK, Soni BK (1996b) Process for making succinic acid, microorganisms for use in the process and methods of obtaining the microorganisms. US Patent 5,504,004
- Guettler MV**, Rumler D, Jain MK (1999) *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic acid producing strain from the bovine rumen. *Int J Syst Bacteriol* 49: 207-216
- Gusakova GV**, Denisov GS, Smolyanskii AL, Shraiber VM (1970) Hydrogen bonding and proton transfer in carboxylic acid-amine systems. Spectroscopic investigation of the equilibrium between a molecular complex and an ion pair. *Proc Acad Sci USSR (Engl. Transl.)* 193:577-579; *Dokl Akad Nauk SSSR* 193:1065-1068
- Gusakova GV**, Denisov GS, Smolyanskii AL (1986) Infrared spectra and structures of complexes formed for dibasic carboxylic acids with amines in nonaqueous solvents: Malonic acid. *J Gen Chem IJSSR (Engl. Transl.)* 56:531-536; *Zh Obshch Khim.* 56:600-607
- Hafez M** (1983) Centrifugal Extractors. In: Lo TC (Hrsg.), Baird MHI (Hrsg.), Hanson C (Hrsg.): Handbook of solvent extraction. New York : John Wiley, Inc., 459-474
- Han DH**, Hong WH (1998) Reactive extraction of lactic acid in a packed column. *Kor J Chem Eng* 15:324-329
- Han DH**, Hong YK, Hong WH (2000) Separation characteristics of lactic acid in reactive extraction and stripping. *Kor J Chem Eng* 17:528-533
- Hart H** (Hrsg.) (1989) Organische Chemie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

- Hartl J, Marr R (1993)** Dreiphasenextraktion zur Anreicherung bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion von Carbonsäuren. *Chem Ing Tech* 65:810-818
- Hatti-Kaul R, Mattiasson B (2006)** Basic biotechnology: Downstream processing in biotechnology. Chapter 9. Cambridge University Press
- Hermann BG, Patel M (2007)** Today's and tomorrow's bio-based bulk chemicals from white biotechnology—a techno-economic analysis. *Appl Biochem Biotechnol* 136:361–388
- Heyberger A, Prochazka J, Volaufova E (1997)** Extraction of citric acid with tertiary amine—third phase formation. *Chem Eng Sci* 97:00321–00327
- Higbie R (1935)** The rate of absorption a pure gas into a still liquid during short periods of exposure. *Trans Amer Inst Chem Eng* 31:365-389
- Hiller K, Kehrer P (2000)** Erdöl Erdgas Kohle 116:427
- Hong YK, Hong WH, Chang HN (2000)** Selective extraction of succinic acid from binary mixtures of succinic acid and acetic acid. *Biotechnol Lett* 22:871-874
- Hong YK, Hong WH (2000a)** Reactive extraction of succinic acid with tripropylamine (TPA) in various diluents. *Bioproc Eng* 22:281–284
- Hong YK, Hong WH (2000b)** Equilibrium studies on reactive extraction of succinic acid from aqueous solutions with tertiary amines. *Bioproc Eng* 22:477–481
- Hong YK, Hong WH (2000c)** Extraction of succinic acid with 1-octanol/n-heptane solutions of mixed tertiary amine. *Bioproc Eng* 23:535–538
- Hong YK, Hong WH, Han DH (2001)** Application of reactive extraction to recovery of carboxylic acids. *Biotechnol Bioproc Eng* 6:386–394
- Hong YK, Han DH, Hong WH (2002)** Water enhanced solubilities of succinic acid in reactive extraction using tertiary amines /alcohol systems. *Korean J Chem Eng* 19:83–86
- Hong YK, Hong WH (2004)** Influence of chain length of tertiary amines on extractability and chemical interactions in reactive extraction of succinic acid. *Korean J Chem Eng* 21:488–493
- Hong YK, Hong WH (2005)** Removal of acetic acid from aqueous solutions containing succinic acid and acetic acid by tri-n-octylamine. *Sep Pur Rechnol* 42:151-157
- Huang C, Xu T, Zhang Y, Xue Y, Chen G (2007)** Application of electrodialysis to the production of organic acids: State-of-the-art and recent developments. *J Memb Sci* 288:1-12
- Huh YS, Hong YK, Hong WH, Chang HN (2004)** Selective extraction of acetic acid from the fermentation broth produced by *Mannheimia succiniciproducens*. *Biotechnol Lett* 26:1581–1584
- Huh YS, Jun Y-S, Kong YK, Song H, Lee SY, Hong WH (2006)** Effective purification of succinic acid from fermentation broth produced by *Mannheimia succiniciproducens*. *Proc Biochem* 41:1461–1465
- Inci I (2007)** Linear solvation energy relationship modeling and kinetic studies on reactive extraction of succinic acid by tridodecylamine dissolved in MIBK. *Biotechnol Prog* 23:1171-1179
- Javed KH (1992)** Mass transfer coefficients, interfacial effects, and surface renewal. In: Thornton, J.D. (Hrsg.): Science and practice of liquid-liquid extraction. Bd. 1. Oxford : Clarendon Press, 210-243
- Jenzsch M, Gnoth S, Beck M, Kleinschmidt M, Simutis R, Lübbert A (2006)** Open-loop control of the biomass concentration within the growth phase of recombinant protein production processes. *J Biotechnol* 127:84-94

- Juang** RS, Huang RH (1996) Comparison of extraction equilibria of succinic and tartaric acids from aqueous solutions with tri-n-octylamine. *Ind Eng Chem Res* 35:1944-1950
- Jun** YS, Lee EZ, Huh YS, Hong YK, Hong WH, Lee SY (2007a) Kinetic study for the extraction of succinic acid with TOA in fermentation broth; effects of pH, salt and contaminated acid. *Biochem Eng J* 36:8-13
- Jun** YS, Huh YS, Park HS, Thomas A, Jeon SJ, Lee EZ, Won HJ, Hong WH, Lee SY, Hong YK (2007b) Adsorption of pyruvic and succinic acid by amine-functionalized SBA-15 for the purification of succinic acid from fermentation broth. *J Phys Chem C* 200(111):13076–13086
- Jung** M, Schierbaum B, Vogel H (2000) Extraction of carboxylic acids from aqueous solutions with the extractant system alcohol/tri-n-alkylamines. *Chem Eng Technol* 23(1):70-74
- Kawamoto** T, Kanda T, Tanaka A (2001) Preparation of an organic solvent-tolerant strain from baker's yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 55:476-479
- Kertes** AS, King CJ (1985) Extraction chemistry of fermentation product carboxylic acids. *Biotechnol Bioeng* 28:269
- Keshav** A, Wasewar KL (2010) Back extraction of propionic acid from loaded organic phase. *Chem Eng Sci* 65:2751-2757
- Kidwell** H (2008) Bio-succinic acid to go commercial. <http://www.in-pharmatechnologist.com/Materials-formulation/Bio-succinic-acid-to-go-commercial>. Zitiert August 2010
- King** CJ (1983) in *Handbook of Extraction*. Wiley & Son, New York, 567-573
- King** CJ, Dtarr J (1990) Recovery of carboxylic acids from water by precipitation from organic solutions. US patent 5,104,492
- King** CJ (1992) Amine-based systems for carboxylic acid recovery. *Chemtech*. May : 285-291
- King** CJ, Poole LJ (1993) Carboxylic acid sorption regeneration process. US patent 5,412,126
- King** CJ, Sanchez PA (1985) Process for sorption solute recovery. US patent 4,670,155
- Kinoshita** S, Ukada S, Shimono M (1957) Amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol* 3:193-205
- Kirk-Othmer** (1979) *Encyclopedia of chemical technology*, 3rd edn. Wiley, New York. Citric acid, Vol. 6; Hydroxycarboxylic acids, vol 13
- Kirsch** T, Maurer G (1997) Phasengleichgewichte bei der Reaktivextraktion von Carbonsäuregemischen. *Chem Ing Tech* 69:1104-1108
- Knippers** R (Hrsg.) (2006) *Molekulare Genetik*. 9. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart
- Kurusu** Y, Kainuma M, Inui M, Satoh Y, Yukawa H (1990) Electroporation-transformation system for coryneform bacteria by auxotrophic complementation. *Agric Biol Chem* 54:443-447
- Kurzrock** T, Weuster-Botz D (2010) Recovery of succinic acid from fermentation broth. *Biotechnol Lett* 32:332-339
- Kushiku** T, Fujiwara K, Satou T, Sano (2006) Method for purifying succinic acid from fermentation broth. US patent 2006/0276674A1
- Laane** C, Boeren S, Vos K, Veeger C (1987) Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol Bioeng* 30(1), 81-87

- Lang C**, Looman AC (1995) Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 44(1-2), 147-156.
- Lee SJ**, Song H, Lee SY (2006b) Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production. *Appl Environ Microbiol* 72:1939–1948
- Lee SY**, Kim JM, Song H, Lee JW, Kim TY, Yang YS (2008) From genome sequence to integrated bioprocess for succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens*. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:11–22
- Leonard RA**, Bernstein GJ, Zeigler AA, Pelto RH (1980) Annular centrifugal contactors for solvent extraction. *Sep Sci Technol* 15:925:943
- Lewis WK**, Whitman WG (1924) Principles of gas absorption. *Ind Eng Chem* 19:1215-1220
- Li Q**, Wang D, Wu Y, Li W, Zhang Y, Xing J, Su Z (2010) One step recovery of succinic acid from fermentation broths by crystallization. *Sep Pur Tech* 72:294-300
- Li Q**, Li WL, Wang D, Liu BB, Tang H, Yang MH, Liu Q, Xing JM, Su ZG (2008) pH neutralization while succinic acid adsorption onto anion-exchange resins. *Appl Biochem Biotechnol*. doi:10.1007/s12010-008-8355-4
- Likidis Z**, Schuegerl K (1987) Recovery of penicillin by reactive extraction in centrifugal extractors. *Biotechnol Bioeng* 30:1032-1040
- Ling ETM**, Dibble JT, Houston MR, Lockwood LB, Elliott LP (1978) Accumulation of 1-trans-2,3-epoxysuccinic acid and succinic acid by *Paecilomyces varioti*. *Appl Environ Microbiol* 35:1213–5
- Link H**, Weuster-Botz D (2006) Genetic algorithm for multi-objective experimental optimization. *Bioprocess Biosyst Eng* 29:385–390
- Lo TC**, Baird MHI, Hanson C (1983) Handbook of Solvent Extraction. New York, John Wiley, Inc.
- Lohrengel B** (2007) Einführung in die thermischen Trennverfahren. Oldenbourg Wissenschaftsverlag, München
- Luo GS**, Pan S, Liu JG (2002) Use of the electrodialysis process to concentrate a formic acid solution, *Desalination* 150:227–234
- Madigan MT**, Martinko JM (Hrsg.) (2006) Brock – Biology of mikroorganisms. 11th Edition. Paerson Education, New Jearsey
- Magarifuchi T**, Goto K, Limura Y, Tadenuma M, Tamura G (1995) Effect of yeast fumarase gene (FUM1) disruption on production of malic, fumaric and succinic acids in sake mash. *J Ferm Bioeng* 80:355–61
- Manenok GS**, Korobanova VI, Yudina TN, Soldatov VS (1979) Influence of the nature of the solvent on extraction of certain mono- and dicarboxylic acids by amines. *Russ J App. Chem (Engl. Transl.)* 52:156-160; *Zh. Prikl. Khim.* 52:173-183
- Marr R**, Bart HJ (1982) Metallsalzextraktion. *Chem Ing Tech* 2:119-129
- McKinlay JB**, Vieille C, Zeikus JG (2007) Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 727-740
- Meikrantz DH**, Meikrantz SB, Macaluso LL (2001) Annular centrifugal contactors for multiple stage extraction processes. *Chem Eng Com* 188:115-127
- Min-tian G**, Hirata M, Koide M, Takanashi H, Hano T (2004) Production of L-lactic acid by electrodialysis fermentation (EDF). *Process Biochem* 39:1903-1907
- Mitchell JA**, Reid EE (1931) The pervaporation of aliphatic amides. *J Am Chem Soc*, 1879–1883

- Neidhardt** FC (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella* – Cellular and Molecular Biology. Washington DC: ASM Press 2.Edition
- Nghiem** NP, Davison BH, Suttle BE, Richardson GR (1997) Production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl Biochem Biotechnol* 63-65: 565-576
- Okino** S, Noburyu R, Suda M, Jojima T, Inui M, Yukawa H (2008) An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:459–464
- Ortiz de ESP** (1992) Marangoni phenomena. In: Thornton JD (Hrsg.): Science and practice of liquid-liquid extraction Bd. 1. Oxford, Clarendon Press, 157-209
- Otillinger** F, Blass E (1985) Residence-time behaviour of two liquids in a centrifugal extractor. *Chem Ing Tech* 57(9):796-797
- Pai** RA, Doherty MF, Malone MF (2002) Design of reactive extraction systems for bioproduct recovery. *AIChE J* 48:514–526
- Paster** M, Pellegrino JL, Carole TM (2003) Industrial bioproducts: today and tomorrow. Energetics, Incorporated, Columbia, MD
- Patel** M, Crank M, Dornburg V, Hermann B, Hüsing B, Overbeek L, Terragni F, Recchia E (2006) *Medium and long-term opportunities and risks of the biotechnological production of bulk chemicals from renewable resources –The potential of white biotechnology: The Brew Project*, European Commission's GROWTH Programme (DG Research), Utrecht 2006. <http://www.chem.uu.nl/brew/>. Zitiert August 2010
- Pazouki** M, Panda T (1998) Recovery of citric acid—a review. *Bioproc Eng* 19:435–439
- Playne** MJ; Smith BR (1999) Toxicity of organic extraction reagents on anaerobic bacteria. *Biotechnol Bioeng* 25:1251-1265
- Poole** LJ, King CJ (1991) Regeneration of carboxylic acid-amine extracts by back-extraction with an aqueous solution of a volatile amine. *Ind Eng Chem Res* 30:923–929
- Präve** P, Faust U, Sittig W, Sukatsch DA (1994) *Handbuch der Biotechnologie*. Oldenburg Verlag, München
- Reichardt** C (1988) *Solvents and solvents effects in organic chemistry*, 2. Aufl., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York
- Roempp** (1999) *Lexikon Chemie*. 2.Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
- Rossi** C, Hauber J, Singer TP (1964) Mitochondrial and cytoplasmic enzymes for the reduction of fumarate to succinate in yeast. *Nature* 204:167–70
- Rüffer** N (2004a) Fermentative Produktion von L-Phenylalanin mit *Escherichia coli* und integrierter Produktabtrennung. Dissertation. Institut für Biotechnologie. Forschungszentrum Jülich
- Rüffer** N, Heidersdorf U, Kretzers I, Sprenger GA, Raeven L, Takors R (2004b) Fully integrated L-phenylalanine separation and concentration using reactive-extraction with liquid-liquid centrifuges in a fed-batch process with *E. coli*. *Bioprocess Biosyst Eng* 26:239–248
- Rydborg** J, Musikas C, Choppin GR (1992) *Principles and practice of solvent extraction*. New York : Marcel Dekker Inc.
- Schaefer** U, Boos W, Takors R, Weuster-Botz D (1999): Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics. *Anal Biochem* 270:88-96
- Schlegel** HG Hrsg. (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*. 7.Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag

- Schlichting** E, Halwachs W, Schuegerl K (1987) Reactive extraction of salicylic acid and D/L phenylalanine in a stirred cell. *Chem Eng Com* 151:193-205
- Scholten** E, Dägele D (2008) Succinic acid production by a newly isolated bacterium. *Biotechnol Lett* Volume 30, Number 12, 2143-2146
- Schröter** W, Lautenschläger KH, Teschner J (2006) Taschenbuch der Chemie. 19. überarbeitete Auflage. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt
- Schügerl** K, Hänsel R, Schlichting E, Halwachs W (1986) Reaktivextraktion. *Chem Ing Tech* 58:308-317
- Schügerl** K, Lübbert A, Schieper T (1987) Online-Prozeßanalyse in Bioreaktoren. *Chem Ing Tech*, 59 (1987), Nr. 9, S. 701-714
- Schügerl** K, Degner W (1989) Gewinnung niedermolekularer Verbindungen aus komplexen organischer Gemischen durch Extraktion. *Chem Ing Tech* 61(10):796-804
- Schuegerl** K (1994) Solvent extraction in biotechnology: recovery of primary and secondary metabolites. Springer Verlag, Berlin
- Schügerl** K, Bellgardt KH (2000) Bioreaction engineering. Modeling and control. Springer Verlag, Berlin
- Siebenhofer** M (1987) Extraktionsverfahren. *Osterr Chem Ztg* 88:61
- Shen** JY, Duan JR, Liu YS, Yu LX, Xing XH (2005) Demineralization of glutamine fermentation broth by electrodialysis, *Desalination* 172:129–135
- Shen** JY, Duan LR, Yu LX, Xing XH, Xu P (2006) Desalination of glutamine fermentation broth by electrodialysis, *Process Biochem.* 41:720–726
- Song** H, Lee SY (2005) Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzym Microbial Technol* 39:352–361
- Song** H, Huh YS, Lee SY, Hong WH, Hong YK (2007) Recovery of succinic acid produced by fermentation of a metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens* strain. *J Biotechnol* 132:445–452
- Streitwieser** JA, Heathcock CH (1976) Introduction to organic chemistry. Macmillan, New York (Chapters 17+18)
- Stuckey** DC (1996) Solvent extraction in biotechnology. ISEC '96 Proceedings, Value Added Through Solvent Extraction 1:25-34
- Sykes** P (1988) Reaktionsmechanismen der Organischen Chemie, 9. Aufl., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, S. 76 ff
- Tamada** JA (1989) Extraction of carboxylic acids with amine extractants. Ph. D. Thesis. Univ. of California at Berkeley, USA
- Tamada** JA, Kertes As, King CJ (1990a) Extraction of carboxylic acids with amine extractants: 1. Equilibria and law of mass action modeling. *Ind Eng Chem Res* 29:1319–1326
- Tamada** JA, King CJ (1990b) Extraction of carboxylic acids with amine extractants: 2. Chemical interactions and interpretation of data. *Ind Eng Chem Res* 29:1327–1333
- Tamada** JA, King CJ (1990c) Extraction of carboxylic acids with amine extractants: 3. Effects of temperature, water coextraction and process considerations. *Ind Eng Chem Res* 29:1333–1338
- Thang** VH, Koschuh; Kulbe KD, Novalin S (2005) Detailed investigation of an electrodialytic process during the separation of lactic acid from a complex mixture. *J Membr Sci* 249:173–182

- Tilton H** (2003) Prices & people. Chem Mark Rep 264:20-22
- Tokiwa Y, Calabia BP** (2008) Biological production of functional chemicals from renewable resources. Can J Chem 86:548-555
- Tung LA, King CJ** (1994a) Sorption and extraction of lactic and succinic acids at $\text{pH} > \text{pK}_a$. 1. Factors governing equilibria. Ind Eng Chem Res 33:3217–3223
- Tung LA, King CJ** (1994b) Sorption and extraction of lactic and succinic acids at $\text{pH} > \text{pK}_a$. 2. Regeneration and process considerations. Ind Eng Chem Res 33:3224–3229
- Varma A, Palsson BØ** (1994) Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. Appl Environ Microbiol, 60, 3724-3731
- Vauck WAR, Müller HA** (1994) Grundoperationen chemischer Verfahrenstechnik. 10. Ausgabe. Leipzig: Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie
- Vemuri GN, Eiteman MA, Altman E** (2002) Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. J Ind Microbiol Biotechnol 28:325–332
- Verrall MS** (1992) Liquid-liquid partition in the pharmaceutical industry. In Thornton JD (Hrsg.): Science and practice of liquid-liquid extraction Bd.2. Claredon Press 194-308
- Vermue M, Sikkema J, Verheul A, Bakker R, Tramper J** (1993) Toxicity of Homologous Series of Organic Solvents. Biotechnol Bioeng 42:747-758
- Vickroy TB** (1985) Lactic acid. In: Comprehensive Biotechnology, Blanch HW, Drew S, Wang DIC (eds) Comprehensive biotechnology, vol 3, pp 761–776. Pergamon Press, New York
- Vieux AS, Rutagengwa N, Rulinda JB, Balikungeri A** (1974) Extraction of some dicarboxylic acids by tri-isooctylamine. Analytica Chimica Acta. 68:415-424
- Waetherley LR** (1994) Engineering process for bioseparations. Oxford: Butterworth Heinemann
- Wennersten** (1983) The extraction of citric acid from fermentation broth using a solution of a tertiary amine. J Chem Technol Biotechnol 33B: 85-94
- Werpy T, Petersen G** (2004) Top value added chemicals from biomass. Volume I — Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. Produced by the staff at Pacific Northwest National Laboratory (PNNL); National Renewable Energy Laboratory (NREL), Office of Biomass Program (EERE). Zitiert August 2010
- Wilke D** (1995) What should and what can biotechnology contribute to chemical bulk production? FEMS Microbiol Rev 16:89–100
- Wilke D** (1999) Chemicals from biotechnology: molecular plant genetics will challenge the chemical and fermentation industry. Appl Microbiol Biotechnol 52:135–145
- Willke T, Vorlop K-D** (2004) Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. Appl Microbiol Biotechnol 66:131–142
- Wojtech B, Mayer M** (1985) Synergistische Effekte bei der Extraktion mit tertiären Aminen. Chem Ing Tech 57:134-136
- Yang SH, White SA, Hsu ST** (1991) Extraction of carboxylic acids with tertiary and quaternary amines: Effect of pH. Ind Eng Chem Res 30:1335-1342
- Yang C, Cussler EL** (2000) Reactive extraction of penicillin G in hollow-fiber and hollow-fiber fabric modules. J Biol Bioeng 69:66-73

Yabannawar VM, Wang DIC (1991a) Extractive fermentation for lactic acid production. *Biotechnol Bioeng* 37:1095-1100

Yabannawar VM, Wang DIC (1991b) Strategies for reducing solvent toxicity in extractive fermentations. *Biotechnol Bioeng* 37:716-722

Yedur S, Berglund K, Dunuwila DD (2001) Succinic acid production and purification. US patent 6,265,190

Yerger EA, Barrow GM (1955a) Acid-base reactions in non-dissociating solvents. Acetic acids and diethylamine in carbon tetrachloride and chloroform. *J Am Chem Soc* 77:4474-4481

Yerger EA, Barrow GM (1955b) Acid-base reactions in non-dissociating solvents n-butylamine and acetic in carbon tetrachloride and chloroform. *J Am Chem Soc* 77:6206-6207

Zang JA, Moshy RJ, Smith RN (1966) Electrodialysis in food processing. *Chem Eng Progress Symp Ser* 62:105-110

Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P (1999) Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Environ Microbiol* 51:545-552

Zelic B, Gostovic S, Vuorilehto K, Vasic-Racki D, Takors R (2004) Process strategies to enhance pyruvate production with recombinant *Escherichia coli*: from repetitive fed-batch to in situ product recovery with fully integrated electrodialysis. *Biotechnol Bioeng* 85:638-646

11 Abkürzungsverzeichnis

1°	primäres Amin
2°	sekundäres Amin
3°	tertiäres Amin
A	Amin
B	Bernsteinsäure
BTM	Biotrockenmasse
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
DIBK	Diisobutylketon
E(%)	Extraktionsausbeute
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E korr %	Mit Wachstumsrate korrigierte Extraktionsausbeute für das 3.Auswahlprüfverfahren
GC	Gaschromatographie
HPLC	Flüssigkeitschromatographie
K	Verteilungskoeffizient
LM	Lösungsmittel
MIBK	Methylisobutylketon
OD	Optische Dichte bei Wellenlänge 660 nm
pKS	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante, Maß für die Säurestärke
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
System 29/6	Reaktivextraktionssystem 29/6 (komplexes System aus: Diisooctylamin, Dihexylamin, 1-Hexanol, 1-Octanol)
System D	Reaktivextraktion System D (biokompatibles System aus: Tridodecylamin, n-Hexan, Toluol)
System T1	Reaktivextraktionssystem T1 (einfaches System aus: Trihexylamin, 1-Octanol)
TBA	Tributylamin
TMA	Trimethylamin
TOA	Trioctylamin
TPA	Tripropylamin
TPeA	Tripentylamin
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
% v/v	Volumenprozent
% w/w	Gewichtsprozent

12 Anhang

12.1 Allgemeines Material

12.1.1 Geräte

Tabelle 12-1: Allgemeine Laborgeräte

Komponente	Hersteller/Spezifikation
Trockenschrank E 28	Binder, Tuttlingen
Standzentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen
Schüttelinkubator Multitron	Infors HT, Bottmingen-Basel, Schweiz
pH-Elektrode BlueLine 14 pH	Schott, Mainz
pH-Meter CG 843	Schott, Mainz
Photospektrometer Genesys 20	Thermo Spectronic, Neuss
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Schwingarmmühle MM200	Retsch, Haan
Mehrfachrührplatte Variomag Poly 15	H+P Labortechnik, Oberschleißheim

Tabelle 12-2: Flüssigkeitschromatographie-Anlage (HPLC) und eingesetzte Säule

Komponente	Hersteller/Spezifikation
HPLC Agilent 1100 Series	Agilent, Waldbronn
Quat. Pumpe: DE14918242	Agilent, Waldbronn
Probengeber: DE14918655	Agilent, Waldbronn
A/D-Wandler: CN 00003423	Agilent, Waldbronn
Degasser: JP05033450	Agilent, Waldbronn
Software A.05.01 + Rev E.01.02	Agilent, Waldbronn
Brechungsindex-Detektor 1200 Serie G1362A	Agilent, Waldbronn
UV-Detektor S 3300	Knauer, Berlin
Trennsäule Aminex HPX-87H	Biorad, München
Vorsäule HPLC Cation H Refill, 30*4.6MM	Biorad, München

Tabelle 12-3: Gaschromatographie-Anlage und eingesetzte Säule

Komponente	Hersteller/Spezifikation
Gaschromatograph CP-3800	Varian, Darmstadt
Injektor 1079 PTV	temperaturprogrammierbar
Splitregelung	elektronische Flusskontrolle (EFC)
FID-Detektor	Brenngase Wasserstoff und Luft, Trärgas/Make-Up-Gas Helium
Software Star Version 5.51	Varian, Darmstadt
Probengeber CombiPal	CTC Analytics, Zwingen, Schweiz
Trennsäule CP8940 VF-5ms FS 15x25 (1.0)	Varian, Darmstadt
Helium 99.999 % (v/v)	Air Liquide, Krefeld
Wasserstoff 99.999 % (v/v)	Air Liquide, Krefeld
Synthetische Luft	Hausleitung

Tabelle 12-4: Techfors-Bioreaktor und Peripherie

Komponente	Hersteller/Spezifikation
Techfors Fermenter 42L	Infors, Einsbach
Kessel	Doppelmantel aus Edelstahl
Rührer	3 Flachblattrührer (Rushton)
Antrieb	im Boden gelagertes Rührwerk mit doppelter Gleitringdichtung
Begasung	Begasungsrohr mit Massendurchflussregler
Prozesskontrollsoftware	Iris-NT Pro Version 4.11
pH-Sonde HA405-DPA-SC-S8	Mettler-Toledo, Giessen
pO ₂ -Sonde InPro 6000	Mettler-Toledo, Giessen
Antischaum Messfühler	Infors, Einsbach
Drucksensor PR-25HT/8931A	Keller, Winterthur, Schweiz
Abgasanalytik Easy Line	Easy Line ABB, Frankfurt
Peristaltische Pumpe Ecoline VC	Ismatech, Wertheim-Mondfeld

Tabelle 12-5: Zentrifugalextraktor und Peripherie

Komponente	Hersteller/Spezifikation
Zentrifugalextraktor V-02 bzw. CS 50	Cinc, Brakel
Mischungseinsatz	High Mix (Extraktion) und Direct Feed (Separation)
Motor 400V / 50 Hz IP 55	0,25 kW EEx de II C T4 bis 6000 min ⁻¹
Motorsteuerung 400 V Frequenzumformer	220 V / 50 Hz nicht Ex geschützt
15 Wehrscheiben	0,825 - 1,175
Pumpe (1) Masterflex Economy Drive	Cole-Parmer
Pumpe (2) Masterflex	Cole-Parmer
Pumpenschlauch Einlass Zentrifugalextraktor; Norprene A-60-G ID 6,4 mm AD 11,2 mm	Ismatech, Wertheim-Mondfeld
Pumpenschlauch Auslass Zentrifugalextraktor; Norprene A-60-G ID 12,7 mm AD 19,1 mm	Ismatech, Wertheim-Mondfeld

Tabelle 12-6: Rotationsverdampfer

Komponente	Hersteller/Spezifikation
Rotationsverdampfer LABOROTA 4003	Heidolph, Schwabach
Vakuumpumpe ROTAVAC vario control	Heidolph, Schwabach

12.1.2 Chemikalien

Tabelle 12-7: Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Summenformel	Hersteller	Produktnummer
Aluminium(III)chlorid	$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Merck	1.01084
Ammoniumchlorid	NH_4Cl	Roth	5470
Ammoniumdihydrogenphosphat	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Merck	1.01126
Ammoniumhydroxid	NH_4OH	Roth	5460
Ammoniumsulfat	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Merck	1.01217
Antimycoticum		Invitrogen	15240-062
Bernsteinsäure	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$	Roth	8268.2
Biotin	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	Roth	3822.1
Borsäure	H_3BO_3	Sigma	B6768
Calciumchlorid	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck	102382
Casaminosäuren	-	Roth	AE41.2
Chloramphenicol	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$	Sigma	C-0378
D-Glucose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Roth	6780
Eisen(II)sulfat	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck	P015.1
Essigsäure (Natriumacetat)	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$	Merck	100056
Na_2 -Ethylendiamintetraessigsäure	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_8$	Merck	108418
Genitacin	$\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{10}$	Roth	CP11.3
Glycerin	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	Roth	7530
Harnstoff	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	Roth	3941.1
Hefeextrakt OHLY KAT	-	Dt. Hefewerke	-
Histidin	$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	Roth	3852.3
Kaliumchlorid	KCl	Merck	1.04936
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Roth	3907
di-Kaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	Roth	P749
Kanamycinsulfat	$\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_{15}\text{S}$	Roth	T832.4
α -Ketoglutarinsäure	$\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_5$	Fluka	75890
Kobalt(II)chlorid	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Merck	1.012539
Kupfer(II)chlorid	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck	1.02733
Kupfer(II)sulfat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Merck	102790
Magnesiumchlorid	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Roth	2189.1

Tabelle 12-7: Allgemeine Chemikalien (Fortsetzung)

Chemikalie	Summenformel	Hersteller	Produktnummer
Magnesiumsulfat	MgSO ₄ *7H ₂ O	Merck	105886
Mangan(II)chlorid	MnCl ₂ *4H ₂ O	Merck	105927
Maleinsäure	C ₄ H ₄ O ₄	Roth	3538.1
Mangan(II)sulfat	MnSO ₄ *H ₂ O	Merck	105941
Milchsäure	C ₃ H ₆ O ₃	Roth	4071.1
Myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	Fluka	57570
Natriumchlorid	NaCl	Roth	P029
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	Merck	106346
Natriumhydroxid	NaOH	Roth	9356
Natriummolybdat	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	Merck	106521
Nicotinsäureamid	C ₆ H ₆ N ₂ O	Applichem	APPCA0959
Calciumpanthothenat	C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	Roth	3812.1
Pyridoxin	C ₈ H ₁₁ NO ₃	Roth	T914.2
Salzsäure	HCl	Roth	4625.2
Schwefelsäure	H ₂ SO ₄	Merck	1.00731
Thiaminchlorid	C ₁₂ H ₁₈ N ₄ OS ²⁺ 2 Cl ⁻	Aldrich	10,917-7
VE-Wasser	H ₂ O	Hausleitung	-
Zink(II)sulfat	ZnSO ₄ *7H ₂ O	Merck	108883
Zitronensäure	C ₆ H ₈ O ₇	Roth	5110

Tabelle 12-8: Lösungsmittel

Lösungsmittel	Summenformel	Hersteller	Produktnummer
1-Butanol	C ₄ H ₁₀ O	Merck	1.01990
1-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	Merck	8.04393
1-Octanol	C ₈ H ₁₈ O	Merck	8.20931
2-Octanol	C ₈ H ₁₈ O	Merck	8.20925
1-Nonanol	C ₁₀ H ₂₀ O	Merck	SAFF74280
1-Decanol	C ₁₀ H ₂₂ O	Sigma	150584
1-Dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	Sigma	126799

Tabelle 12-8: Lösungsmittel (Fortsetzung)

Lösungsmittel	Summenformel	Hersteller	Produktnummer
<i>n</i> -Pentan	C ₅ H ₁₂	Merck	1.07177
<i>n</i> -Hexan	C ₆ H ₁₄	Merck	1.04367
<i>n</i> -Heptan	C ₇ H ₁₆	Roth	8654.1
<i>n</i> -Octan	C ₈ H ₁₈	Merck	8.06910
<i>n</i> -Nonan	C ₉ H ₂₀	Merck	8.06838
<i>n</i> -Decan	C ₁₀ H ₂₂	Merck	8.03405
<i>n</i> -Dodecan	C ₁₂ H ₂₆	Merck	8,20543
Kerosin	Stoffgemisch aus C ₁₀ H ₂₂ bis C ₁₆ H ₃₄	Sigma	60710
Toluol	C ₇ H ₈	Merck	1.08325
Methylisobutylketon	C ₆ H ₁₂ O	Roth	0338.1
Diisobutylketon	C ₉ H ₁₈ O	Merck	8.18831

Tabelle 12-9: Amine

Amine	Summenformel	Hersteller	Produktnummer
Octylamin	C ₈ H ₁₉ N	Merck	8.06917
Dibutylamin	C ₈ H ₁₉ N	Merck	8.03222
Dihexylamin	C ₁₂ H ₂₇ N	Merck	8.20465
Dioctylamin	C ₁₆ H ₃₅ N	Merck	SAFF42390
Diisooctylamin	C ₁₆ H ₃₅ N	Merck	8.20383
Diphenylamin	C ₁₂ H ₁₁ N	Merck	8.20528
Trimethylamin 25 % in Wasser	C ₃ H ₉ N	Sigma	426474
Tripropylamin	C ₉ H ₂₁ N	Merck	8.21201
Tributylamin	C ₁₂ H ₂₇ N	Merck	8.08358
Tripentylamin	C ₁₅ H ₃₃ N	Sigma	472034
Trihexylamin	C ₁₈ H ₃₉ N	Sigma	183997
Trioctylamin	C ₂₄ H ₅₁ N	Merck	8.08649
Triisooctylamin	C ₂₄ H ₅₁ N	Sigma	261491
Tridodecylamin	C ₃₆ H ₇₅ N	Merck	8.21160
Methyldioctylamin	C ₁₇ H ₃₇ N	Merck	8.20790
Methyldidecylamin	C ₂₁ H ₄₅ N	Merck	SAFF36755
Dimethyldodecylamin	C ₁₄ H ₃₁ N	Merck	SAFS39150

12.2 Reaktivextraktionssysteme

12.2.1 Physikalische und chemische Eigenschaften Amine und Lösungsmittel

Tabelle 12-10: Eingesetzte Lösungsmittel und Amine

Lösungsmittel	Einteilung	Molekulargewicht, g mol ⁻¹	Dichte, g cm ⁻³
1-Butanol	polar-protisch	74,12	0,81
1-Hexanol	polar-protisch	102,18	0,82
1-Octanol	polar-protisch	130,23	0,82
2-Octanol	polar-protisch	130,23	0,83
1-Nonanol	polar-protisch	144,26	0,83
1-Decanol	polar-protisch	158,29	0,83
1-Dodecanol	polar-protisch	186,34	0,83
Methylisobutylketon	polar-aprotisch	100,16	0,80
Diisobutylketon	polar-aprotisch	142,24	0,81
<i>n</i> -Pentan	unpolar	72,15	0,63
<i>n</i> -Hexan	unpolar	86,18	0,66
<i>n</i> -Heptan	unpolar	100,21	0,68
<i>n</i> -Octan	unpolar	128,26	0,72
<i>n</i> -Nonan	unpolar	114,23	0,70
<i>n</i> -Decan	unpolar	142,29	0,73
<i>n</i> -Dodecan	unpolar	170,34	0,75
Kerosin	unpolar	184,40	etwa 0,75 - 0,84
Toluol	unpolar	92,14	0,87

Tabelle 12-10: Eingesetzte Lösungsmittel und Amine (Fortsetzung)

Lösungsmittel	Löslichkeit in Wasser, g L ⁻¹	Löslichkeit in Wasser, mmol L ⁻¹	Verteilungskoeffizient 1-Octanol/Wasser (logPow)
1-Butanol	77,0	1038,9	0,88
1-Hexanol	5,9	57,7	2,03
1-Octanol	0,3	2,3	2,80
2-Octanol	1,1	8,6	2,90
1-Nonanol	1,0	6,9	3,77
1-Decanol	3,7x10 ⁻²	0,2	4,57
1-Dodecanol	4,0x10 ⁻³	2,1x10 ⁻²	5,13
Methylisobutylketon	18,0 - 20,0	189,7	1,31
Diisobutylketon	0,5	3,5	2,56
<i>n</i> -Pentan	0,4	5,0	3,39
<i>n</i> -Hexan	9,5x10 ⁻³	0,1	4,11
<i>n</i> -Heptan	5,0x10 ⁻²	0,5	4,66
<i>n</i> -Octan	7,0x10 ⁻⁴	6,0x10 ⁻³	5,15
<i>n</i> -Nonan	unlöslich	unlöslich	4,76
<i>n</i> -Decan	5,0x10 ⁻⁵	3,5x10 ⁻⁴	5,98
<i>n</i> -Dodecan	fast unlöslich	0,0	6,8
Kerosin	unlöslich	0,0	5,98 - 8,8
Toluol	0,5	5,6	2,65

Tabelle 12-10: Eingesetzte Lösungsmittel und Amine (Fortsetzung)

Name	Einteilung	Dichte, g cm ⁻³	Molekulargewicht, g mol ⁻¹
Octylamin	primäres Alkylamin	0,78	129,25
Dibutylamin	sekundäres Alkylamin	0,76	129,25
Dihexylamin	sekundäres Alkylamin	0,79	185,36
Diocetylamin	sekundäres Alkylamin	0,80	241,46
Diisooctylamin	sekundäres Alkylamin	0,80	241,46
Diphenylamin	sekundäres Arylamin	1,16	169,23
Trimethylamin 25 % w/w	tertiäres Alkylamin	0,93	59,11
Tripropylamin	tertiäres Alkylamin	0,76	143,27
Tributylamin	tertiäres Alkylamin	0,78	185,36
Tripentylamin	tertiäres Alkylamin	0,78	227,44
Trihexylamin	tertiäres Alkylamin	0,80	269,51
Triocetylamin	tertiäres Alkylamin	0,81	353,68
Triisooctylamin	tertiäres Alkylamin	0,82	353,68
Tridodecylamin	tertiäres Alkylamin	0,82	522,01
Methyldioctylamin	tertiäres Alkylamin	0,79	255,49
Methyldidecylamin	tertiäres Alkylamin	0,81	311,59
Dimethyldodecylamin	tertiäres Alkylamin	0,79	213,41

Tabelle 12-10: Eingesetzte Lösungsmittel und Amine (Fortsetzung)

Name	Löslichkeit in Wasser, g L ⁻¹	Löslichkeit in Wasser, mmol L ⁻¹	Verteilungskoeffizient 1-Octanol/Wasser (logPow)
Octylamin	0,2	1,6	0,76
Dibutylamin	4,1	31,3	2,06
Dihexylamin	0,3	1,6	4,81
Dioctylamin	unlöslich	unlöslich	4,76
Diisooctylamin	4,5x10 ⁻²	0,2	6,56
Diphenylamin	5,0x10 ⁻²	0,3	3,50
Trimethylamin 25 % w/w	650L L ⁻¹ H ₂ O	1,025x10 ⁴	0,25
Tripropylamin	2,6	18,2	2,68
Tributylamin	0,3	1,6	4,60
Tripentylamin	<1,0	4,4	5,71-5,93
Trihexylamin	0,3*	1,1*	7,90
Trioctylamin	<1,0x10 ⁻⁴	2,8x10 ⁻⁴	10,35
Triisooctylamin	0,2	0,6	9,60
Tridodecylamin	unlöslich	unlöslich	16,24
Methyldioctylamin	0,3*	1,2*	6,91
Methyldidecylamin	0,3*	1,0*	n.b.
Dimethyldodecylamin	5,0*	23,4*	5,41

* Löslichkeiten nicht bekannt aber für Biokompatibilitätsversuche anhand von Homologie zu anderen Aminen abgeschätzt

12.2.2 Einfache Reaktivextraktionssysteme des 1. Auswahlprüfverfahrens

Tabelle 12-11: Einfache Reaktivextraktionssysteme des 1. Auswahlprüfverfahrens

	1-Butanol	1-Hexanol	1-Octanol	2-Octanol	1-Decanol	1-Dodecanol	MIBK
Octylamin	-	85,4 ± 1,1	84,0 ± 2,7	78,9 ± 2,7	81,2 ± 1,4	72,3	24,8 ± 6,6
Dibutylamin	51,0 ± 4,8	30,8 ± 4,3	20,6 ± 5,0	15,7 ± 3,1	22,3	19,3	13,3 ± 0,4
Dihexylamin	91,1 ± 1,3	89,4 ± 1,4	86,1 ± 1,8	83,7 ± 2,5	82,8 ± 1,2	79,8	67,6 ± 2,6
Diocetylamin	95,0 ± 0,6	93,3 ± 0,8	90,3 ± 2,7	84,3 ± 2,3	83,3 ± 2,5	78,1 ± 3,5	73,4 ± 1,8
Diisooctylamin	95,2 ± 0,3	94,2 ± 0,6	92,3 ± 1,6	92,0 ± 1,1	89,7 ± 0,6	87,4	82,0 ± 0,7
Diphenylamin	49,8 ± 2,0	28,1 ± 6,0	21,9 ± 0,7	17,8 ± 11,2	6,5 ± 6,0	7,3 ± 6,9	15,6 ± 2,2
Tripropylamin	35,6 ± 0,4	17,7 ± 2,8	18,2 ± 0,7	8,7 ± 7,5	11,7	14,3	14,3 ± 2,5
Tributylamin	67,5 ± 1,2	51,5 ± 4,0	37,8 ± 1,9	27,2 ± 2,4	33,8	23,4	20,2 ± 4,0
Tripentylamin	86,6 ± 0,7	80,8 ± 1,5	74,5 ± 1,9	67,3 ± 3,5	64,4	59,3	60,9 ± 2,1
Trihexylamin	95,5 ± 0,8	93,2 ± 0,2	91,5 ± 1,5	89,9 ± 1,3	88,3 ± 2,1	77,7	90,0 ± 0,7
Triocetylamin	91,1 ± 1,9	90,2 ± 0,3	86,5 ± 1,0	85,3 ± 1,4	81,2 ± 0,4	72,4	88,3 ± 1,7
Triisooctylamin	91,2 ± 2,4	88,1 ± 1,7	83,7 ± 2,1	82,5 ± 3,1	77,3 ± 0,8	70,0	83,1 ± 0,2
Tridodecylamin	76,3 ± 2,1	85,3 ± 1,9	81,7 ± 1,6	75,9 ± 6,3	74,0 ± 2,5	AGG	80,6 ± 1,3
Methyldioctylamin	94,5 ± 0,7	91,8 ± 1,6	90,9 ± 2,1	90,9 ± 2,0	87,5 ± 0,7	AGG	89,7 ± 5,4
Methyldidecylamin	93,6	92,5	90,3 ± 0,5	88,6 ± 2,0	87,6 ± 0,8	AGG	92,1
Dimethyldodecylamin	53,5	68,4	AGG	73,7	AGG	AGG	34,9

Tabelle 12-11: Reaktivextraktionssysteme des 1. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

	<i>n</i> -Pentan	<i>n</i> -Hexan	<i>n</i> -Heptan	<i>n</i> -Decan	<i>n</i> -Dodecan	Kerosin	Toluol
Octylamin	31,1 ± 2,3	10,3 ± 4,5	13,6 ± 3,4	7,3 ± 7,3	14,3 ± 5,5	9,0 ± 4,1	13,4
Dibutylamin	15,5 ± 8,8	14,6 ± 5,9	12,8 ± 2,9	10,0 ± 3,8	8,3 ± 6,4	11,1 ± 6,1	11,6
Dihexylamin	68,6	57,9 ± 9,5	54,9 ± 7,7	52,6 ± 1,9	53,7 ± 4,5	52,9 ± 8,7	59,5
Diocetylamin	56,2	56,1 ± 11,5	56,5 ± 3,0	54,3 ± 12,7	59,5 ± 2,1	58,8 ± 15,7	61,8
Diisooctylamin	84,7 ± 0,2	86,2 ± 1,5	80,4 ± 6,3	92,5 ± 1,3	88,6 ± 2,4	93,8 ± 0,8	95,1 ± 3,5
Diphenylamin	6,1	9,5 ± 3,1	13,5 ± 8,3	3,9 ± 3,6	2,7 ± 4,0	5,5 ± 2,1	0,0
Tripropylamin	16,0 ± 8,5	15,3 ± 5,3	13,2 ± 4,6	8,3 ± 6,2	8,5 ± 2,0	13,2 ± 3,5	10,5 ± 6,9
Tributylamin	18,9 ± 8,3	14,9 ± 3,5	9,9 ± 3,0	7,0 ± 3,5	8,0 ± 7,2	10,3 ± 3,8	10,5
Tripentylamin	27,5 ± 7,6	6,6 ± 3,5	6,9 ± 1,8	8,1 ± 2,3	8,0 ± 3,6	8,0 ± 2,0	30,6
Trihexylamin	29,1 ± 9,0	26,6 ± 2,9	27,7 ± 3,4	38,1 ± 3,2	41,0 ± 6,7	42,2 ± 5,0	14,5
Triocetylamin	13,3 ± 1,4	7,4 ± 5,0	7,3 ± 6,3	9,3 ± 2,9	21,6 ± 13,4	11,1 ± 4,3	49,2
Triisooctylamin	36,6	4,5 ± 4,1	3,4 ± 5,9	6,3 ± 4,2	17,5 ± 7,9	9,2 ± 4,6	43,4
Tridodecylamin	8,0 ± 3,2	6,7 ± 2,4	3,9 ± 0,8	2,8 ± 4,4	4,6 ± 2,0	4,9 ± 3,4	36,4
Methyldioctylamin	AGG	70,7 ± 0,7	68,6 ± 6,3	58,4 ± 10,4	54,7 ± 9,8	69,7 ± 9,8	71,6
Methyldidecylamin	AGG	17,0	AGG	AGG	AGG	AGG	61,3
Dimethyldodecylamin	19,3	AGG	23,2	24,9	21,7	18,0	26,8

12.2.3 Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahren

Tabelle 12-12: Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahrens

Reaktivextraktions-system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel, % w/w des Gesamtlösungsmittels	Extraktionsausbeute, %
1/1	Octylamin	333,3	9,0 ± 1,5
	Diphenylamin	366,7	
	<i>n</i> -Decan	93,3	
	<i>n</i> -Heptan	6,7	
2/1	Triisooctylamin	100,0	13,6 ± 1,3
	Tridodecylamin	0,0	
	Diisobutylketon	33,3	
	1-Nonanol	66,7	
3/1	Dimethyldodecylamin	500,0	0
	Tripropylamin	366,7	
	Toluol	100,0	
	<i>n</i> -Decan	0,0	
4/1	Dihexylamin	0,0	23,3 ± 1,5
	Methyldidecylamin	300,0	
	2-Octanol	80,0	
	<i>n</i> -Nonan	20,0	
5/1	Trioctylamin	433,3	0
	Dioctylamin	500,0	
	<i>n</i> -Dodecan	100,0	
	1-Dodecanol	0,0	
6/1	Diphenylamin	266,7	8,5 ± 0,2
	Dibutylamin	333,3	
	<i>n</i> -Hexan	86,7	
	<i>n</i> -Heptan	13,3	
7/1	Diisooctylamin	233,3	0
	Trioctylamin	333,3	
	<i>n</i> -Pentan	80,0	
	<i>n</i> -Nonan	20,0	
8/1	Diphenylamin	466,7	30,7 ± 2,2
	Dihexylamin	500,0	
	Methylisobutylketon	0,0	
	1-Hexanol	100,0	
9/1	Triisooctylamin	166,7	25,0 ± 2,7
	Dihexylamin	333,3	
	Diisobutylketon	60,0	
	<i>n</i> -Dodecan	40,0	
10/1	Tripropylamin	266,7	16,1 ± 4,8
	Tridodecylamin	133,3	
	<i>n</i> -Hexan	40,0	
	1-Hexanol	60,0	
11/1	Octylamin	466,7	41,2 ± 0,9
	Tributylamin	400,0	
	1-Octanol	33,3	
	Toluol	66,7	
12/1	Tridodecylamin	166,7	0
	Tributylamin	0,0	
	<i>n</i> -Hexan	0,0	
	<i>n</i> -Hexan	100,0	
13/1	Tridodecylamin	166,7	26,3 ± 1,2
	Tributylamin	66,7	
	<i>n</i> -Hexan	40,0	
	1-Hexanol	60,0	
14/1	Tripentylamin	366,7	30,2 ± 0,9
	Tridodecylamin	333,3	
	1-Nonanol	86,7	
	<i>n</i> -Decan	13,3	
15/1	Dibutylamin	366,7	20,1 ± 3,5
	Tributylamin	333,3	
	1-Decanol	100,0	
	1-Hexanol	0,0	

Tabelle 12-12: Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions- system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel, % w/w des Gesamtlösungsmittels	Extraktionsausbeute, %
16/1	Tridodecylamin	300,0	0
	Tripentylamin	200,0	
	Methylisobutylketon	6,7	
	Kerosin	93,3	
17/1	Tridodecylamin	66,7	32,4 ± 4,2
	Trihexylamin	433,3	
	2-Octanol	100,0	
	Toluol	0,0	
18/1	Tributylamin	100,0	8,2 ± 0,9
	Trihexylamin	233,3	
	<i>n</i> -Heptan	60,0	
	<i>n</i> -Pentan	40,0	
19/1	Trioctylamin	266,7	34,4 ± 1,3
	Octylamin	400,0	
	1-Nonanol	86,7	
	<i>n</i> -Heptan	13,3	
20/1	Diphenylamin	500,0	12,6 ± 1,2
	Trioctylamin	133,3	
	<i>n</i> -Decan	13,3	
	2-Octanol	86,7	
21/1	Dioctylamin	233,3	19,8 ± 2,0
	Trioctylamin	0,0	
	Diisobutylketon	46,7	
	1-Octanol	53,3	
22/1	Octylamin	366,7	22,0 ± 2,4
	Tripropylamin	366,7	
	<i>n</i> -Decan	66,7	
	1-Octanol	33,3	
23/1	Trioctylamin	333,3	24,8 ± 1,3
	Trihexylamin	333,3	
	<i>n</i> -Dodecan	0,0	
	Diisobutylketon	100,0	
24/1	Diphenylamin	500,0	19,4 ± 3,2
	Trioctylamin	366,7	
	<i>n</i> -Pentan	33,3	
	1-Octanol	66,7	
25/1	Diisooctylamin	100,0	0
	Trioctylamin	100,0	
	Toluol	80,0	
	<i>n</i> -Hexan	20,0	
26/1	Tripentylamin	433,3	13,0 ± 0,7
	Trihexylamin	333,3	
	<i>n</i> -Nonan	73,3	
	Methylisobutylketon	26,7	
27/1	Tripropylamin	100,0	8,9 ± 3,7
	Trioctylamin	33,3	
	<i>n</i> -Pentan	86,7	
	1-Hexanol	13,3	
28/1	Tripropylamin	233,3	0
	Diisooctylamin	366,7	
	<i>n</i> -Nonan	73,3	
	2-Octanol	26,7	
29/1	Methyldidecylamin	133,3	0
	Diisooctylamin	466,7	
	Methylisobutylketon	80,0	
	Toluol	20,0	
30/1	Dimethyldodecylamin	166,7	20,3 ± 3,9
	Tripropylamin	33,3	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Octanol	46,7	

Tabelle 12-12: Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktionssystem/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	Extraktionsausbeute, %
1/2	Tridodecylamin	66,7	22,9 ± 0,3
	Tributylamin	400,0	
	2-Octanol	100,0	
	Toluol	0,0	
2/2	Dimethyldodecylamin	233,3	24,3 ± 0,8
	Tripropylamin	33,3	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Octanol	46,7	
3/2	Triisooctylamin	0,0	6,9 ± 0,8
	Dihexylamin	66,7	
	Diisobutylketon	6,7	
	<i>n</i> -Dodecan	93,3	
4/2	Octylamin	366,7	25,3 ± 1,8
	Tripropylamin	333,3	
	1-Nonanol	73,3	
	1-Octanol	26,7	
5/2	Dihexylamin	66,7	0
	Methyldidecylamin	300,0	
	1-Decanol	100,0	
	<i>n</i> -Nonan	0,0	
6/2	Trioctylamin	333,3	17,0 ± 0,3
	Tripentylamin	333,3	
	<i>n</i> -Dodecan	6,7	
	Diisobutylketon	93,3	
7/2	Trioctylamin	0,0	16,4 ± 0,8
	Tridodecylamin	133,3	
	1-Hexanol	80,0	
	<i>n</i> -Heptan	20,0	
8/2	Dioctylamin	300,0	21,8 ± 0,9
	Tridodecylamin	0,0	
	Diisobutylketon	33,3	
	1-Octanol	66,7	
9/2	Dibutylamin	500,0	18,6 ± 1,5
	Tributylamin	333,3	
	1-Decanol	100,0	
	1-Hexanol	0,0	
10/2	Tripropylamin	0,0	25,2 ± 0,8
	Trihexylamin	433,3	
	<i>n</i> -Hexan	40,0	
	1-Hexanol	60,0	
11/2	Diisooctylamin	233,3	0
	Diisooctylamin	500,0	
	<i>n</i> -Decan	73,3	
	2-Octanol	26,7	
12/2	Dioctylamin	200,0	17,5 ± 0,7
	Dihexylamin	0,0	
	Diisobutylketon	46,7	
	1-Octanol	53,3	
13/2	Tridodecylamin	200,0	0,7 ± 0,0
	Diphenylamin	466,7	
	<i>n</i> -Hexan	0,0	
	<i>n</i> -Hexan	100,0	
14/2	Methyldioctylamin	333,3	0
	Trihexylamin	433,3	
	<i>n</i> -Nonan	86,7	
	<i>n</i> -Heptan	13,3	
15/2	Tridodecylamin	166,7	0
	Tributylamin	0,0	
	<i>n</i> -Hexan	80,0	
	<i>n</i> -Hexan	20,0	

Tabelle 12-12: Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions- system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	Extraktionsausbeute, %
16/2	Tridodecylamin	166,7	0
	Trihexylamin	33,3	
	<i>n</i> -Hexan	0,0	
	<i>n</i> -Heptan	100,0	
17/2	Tripropylamin	100,0	0
	Trioctylamin	33,3	
	Kerosin	86,7	
	1-Hexanol	13,3	
18/2	Dihexylamin	166,7	5,9 ± 0,6
	Methyldidecylamin	300,0	
	Kerosin	80,0	
	<i>n</i> -Nonan	20,0	
19/2	Tripropylamin	366,7	0
	Tridodecylamin	366,7	
	<i>n</i> -Decan	80,0	
	<i>n</i> -Decan	20,0	
20/2	Dibutylamin	366,7	0
	Tributylamin	333,3	
	Kerosin	80,0	
	1-Hexanol	20,0	
21/2	Tridodecylamin	366,7	12,3 ± 1,8
	Methyldioctylamin	333,3	
	1-Nonanol	86,7	
	<i>n</i> -Decan	13,3	
22/2	Tripropylamin	266,7	0
	Octylamin	133,3	
	<i>n</i> -Decan	40,0	
	1-Hexanol	60,0	
23/2	Triisooctylamin	200,0	0,8 ± 0,0
	Trioctylamin	0,0	
	Diisobutylketon	33,3	
	1-Nonanol	66,7	
24/2	Tridodecylamin	200,0	2,7 ± 1,9
	Tributylamin	66,7	
	<i>n</i> -Hexan	40,0	
	1-Hexanol	60,0	
25/2	Tridodecylamin	333,3	27,2 ± 1,1
	Tridodecylamin	166,7	
	2-Octanol	100,0	
	Toluol	0,0	
26/2	Trioctylamin	266,7	29,3 ± 0,1
	Octylamin	266,7	
	2-Octanol	86,7	
	<i>n</i> -Heptan	13,3	
27/2	Octylamin	466,7	34,6 ± 0,2
	Methyldidecylamin	400,0	
	1-Octanol	33,3	
	<i>n</i> -Heptan	66,7	
28/2	Diphenylamin	266,7	7,3 ± 0,4
	Dibutylamin	0,0	
	<i>n</i> -Hexan	86,7	
	<i>n</i> -Heptan	13,3	
29/2	Diisooctylamin	266,7	36,5 ± 0,5
	Trihexylamin	333,3	
	1-Hexanol	100,0	
	Toluol	0,0	
30/2	Tripropylamin	33,3	13,9 ± 0,5
	Triisooctylamin	33,3	
	1-Dodecanol	6,7	
	1-Hexanol	93,3	

Tabelle 12-12: Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions- system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	Extraktionsausbeute, %
1/3	Tridodecylamin	333,3	0
	Trihexylamin	433,3	
	Kerosin	93,3	
	Toluol	6,7	
2/3	Tripropylamin	200,0	29,6 ± 0,3
	Trihexylamin	433,3	
	<i>n</i> -Hexan	40,0	
	1-Hexanol	60,0	
3/3	Diisooctylamin	266,7	41,3 ± 0,9
	Trihexylamin	433,3	
	1-Hexanol	46,7	
	Toluol	53,3	
4/3	Tripropylamin	466,7	26,0 ± 0,5
	Trihexylamin	433,3	
	2-Octanol	100,0	
	Toluol	0,0	
5/3	Trioctylamin	400,0	25,8 ± 0,4
	Tridodecylamin	133,3	
	1-Hexanol	53,3	
	<i>n</i> -Heptan	46,7	
6/3	Octylamin	366,7	26,3 ± 1,0
	Tripropylamin	0,0	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Octanol	46,7	
7/3	Trioctylamin	0,0	0
	Tridodecylamin	400,0	
	<i>n</i> -Decan	73,3	
	<i>n</i> -Hexan	26,7	
8/3	Triisooctylamin	200,0	20,0 ± 1,7
	Trioctylamin	33,3	
	<i>n</i> -Hexan	0,0	
	1-Nonanol	100,0	
9/3	Diocetylamin	466,7	0
	Tributylamin	400,0	
	1-Dodecanol	33,3	
	<i>n</i> -Heptan	66,7	
10/3	Triocetylamin	333,3	30,0 ± 0,9
	Tripentylamin	66,7	
	1-Dodecanol	26,7	
	1-Hexanol	73,3	
11/3	Tridodecylamin	66,7	23,1 ± 0,5
	Tributylamin	466,7	
	2-Octanol	100,0	
	Toluol	0,0	
12/3	Octylamin	466,7	13,3 ± 0,9
	Methyldidecylamin	133,3	
	<i>n</i> -Hexan	33,3	
	<i>n</i> -Heptan	66,7	
13/3	Diisooctylamin	466,7	25,2 ± 0,4
	Trihexylamin	333,3	
	1-Hexanol	73,3	
	Toluol	26,7	
14/3	Triocetylamin	333,3	3,7 ± 2,1
	Tripentylamin	333,3	
	<i>n</i> -Dodecan	86,7	
	Toluol	13,3	
15/3	Diocetylamin	300,0	23,5 ± 0,8
	Tripentylamin	0,0	
	Diisobutylketon	33,3	
	1-Octanol	66,7	

Tabelle 12-12: Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions- system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	Extraktionsausbeute, %
16/3	Tridodecylamin	66,7	22,9 ± 0,3
	Tributylamin	433,3	
	2-Octanol	100,0	
	Toluol	0,0	
17/3	Octylamin	266,7	31,4 ± 1,1
	Tributylamin	400,0	
	1-Octanol	33,3	
	Toluol	66,7	
18/3	Tridodecylamin	66,7	33,3 ± 1,7
	Trihexylamin	466,7	
	2-Octanol	100,0	
	1-Dodecanol	0,0	
19/3	Tripentylamin	66,7	22,6 ± 1,0
	Methyldodecylamin	400,0	
	1-Dodecanol	46,7	
	<i>n</i> -Heptan	53,3	
20/3	Octylamin	66,7	22,2 ± 0,1
	Tributylamin	400,0	
	1-Octanol	33,3	
	1-Dodecanol	66,7	
21/3	Tridodecylamin	166,7	17,2 ± 0,3
	Tripentylamin	333,3	
	1-Nonanol	100,0	
	<i>n</i> -Hexan	0,0	
22/3	Octylamin	233,3	33,5 ± 0,5
	Diisooctylamin	233,3	
	1-Hexanol	80,0	
	1-Nonanol	20,0	
23/3	Tridodecylamin	166,7	8,6 ± 0,2
	Trihexylamin	0,0	
	Diisobutylketon	6,7	
	Toluol	93,3	
24/3	Tripentylamin	0,0	17,4 ± 0,1
	Dimethyldodecylamin	133,3	
	1-Hexanol	80,0	
	<i>n</i> -Heptan	20,0	
25/3	Tripentylamin	33,3	11,9 ± 0,0
	Triisooctylamin	300,0	
	<i>n</i> -Dodecan	6,7	
	Diisobutylketon	93,3	
26/3	Tridodecylamin	166,7	0
	Trihexylamin	33,3	
	1-Hexanol	0,0	
	<i>n</i> -Heptan	100,0	
27/3	Tridodecylamin	200,0	28,3 ± 0,1
	Tributylamin	333,3	
	1-Octanol	40,0	
	1-Hexanol	60,0	
28/3	Tripentylamin	300,0	13,1 ± 0,6
	Triisooctylamin	33,3	
	1-Dodecanol	6,7	
	1-Octanol	93,3	
29/3	Tridodecylamin	66,7	20,4 ± 1,2
	Trihexylamin	300,0	
	2-Octanol	20,0	
	Diisobutylketon	80,0	
30/3	Dihexylamin	0,0	26,3 ± 0,2
	Methyldioctylamin	433,3	
	<i>n</i> -Hexan	40,0	
	1-Hexanol	60,0	

Tabelle 12-12: Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions- system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	Extraktionsausbeute, %
1/4	Dihexylamin	0,0	32,5 ± 1,0
	Methyldioctylamin	466,7	
	2-Octanol	100,0	
	1-Octanol	0,0	
2/4	Dimethyldodecylamin	233,3	23,1 ± 1,0
	Tripropylamin	33,3	
	2-Octanol	46,7	
	1-Octanol	53,3	
3/4	Diisooctylamin	266,7	42,2 ± 0,6
	Trihexylamin	433,3	
	1-Hexanol	33,3	
	Toluol	66,7	
4/4	Tripropylamin	466,7	17,8 ± 0,3
	Trihexylamin	33,3	
	1-Hexanol	80,0	
	Toluol	20,0	
5/4	Tridodecylamin	66,7	18,4 ± 0,3
	Tributylamin	166,7	
	1-Hexanol	33,3	
	1-Dodecanol	66,7	
6/4	Dimethyldodecylamin	233,3	27,5 ± 0,9
	Tributylamin	33,3	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Octanol	46,7	
7/4	Trioctylamin	333,3	24,4 ± 0,1
	Tripentylamin	66,7	
	1-Dodecanol	73,3	
	Toluol	26,7	
8/4	Octylamin	366,7	44,0 ± 0,4
	Trihexylamin	433,3	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Octanol	46,7	
9/4	Tridodecylamin	66,7	28,7 ± 0,2
	Triisooctylamin	466,7	
	1-Nonanol	100,0	
	1-Dodecanol	0,0	
10/4	Tridodecylamin	166,7	9,1 ± 0,5
	Dibutylamin	33,3	
	1-Hexanol	0,0	
	Toluol	100,0	
11/4	Diisooctylamin	33,3	37,3 ± 0,4
	Trihexylamin	500,0	
	1-Hexanol	46,7	
	Toluol	53,3	
12/4	Octylamin	66,7	27,5 ± 0,4
	Tributylamin	466,7	
	2-Octanol	100,0	
	1-Dodecanol	0,0	
13/4	Tripropylamin	66,7	16,9 ± 0,8
	Triisooctylamin	0,0	
	<i>n</i> -Pentan	6,7	
	1-Hexanol	93,3	
14/4	Trioctylamin	66,7	24,0 ± 0,7
	Tributylamin	466,7	
	1-Nonanol	100,0	
	<i>n</i> -Heptan	0,0	
15/4	Dimethyldodecylamin	166,7	24,0 ± 0,5
	Tripropylamin	33,3	
	1-Hexanol	100,0	
	Toluol	0,0	

Tabelle 12-12: Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions-system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	Extraktionsausbeute, %
16/4	Tridodecylamin	66,7	12,2 ± 0,0
	Tributylamin	433,3	
	<i>n</i> -Hexan	13,3	
	<i>n</i> -Dodecan	86,7	
17/4	Diisooctylamin	266,7	40,8 ± 1,2
	Trihexylamin	433,3	
	1-Hexanol	53,3	
	Toluol	46,7	
18/4	Octylamin	66,7	20,4 ± 1,1
	Tributylamin	400,0	
	1-Octanol	46,7	
	1-Dodecanol	53,3	
19/4	Dimethyldodecylamin	233,3	22,9 ± 0,8
	Tripropylamin	433,3	
	2-Octanol	73,3	
	1-Octanol	26,7	
20/4	Octylamin	366,7	39,1 ± 0,1
	Diocetylamin	400,0	
	1-Nonanol	100,0	
	Toluol	0,0	
21/4	Diisooctylamin	266,7	34,0 ± 0,8
	Tripentylamin	333,3	
	1-Decanol	86,7	
	Toluol	13,3	
22/4	Diphenylamin	0,0	28,4 ± 0,5
	Trihexylamin	333,3	
	1-Hexanol	26,7	
	1-Hexanol	73,3	
23/4	Tripropylamin	466,7	10,6 ± 0,2
	Tripropylamin	66,7	
	2-Octanol	100,0	
	Toluol	0,0	
24/4	Tripentylamin	100,0	24,6 ± 1,8
	Methyldidecylamin	400,0	
	1-Decanol	46,7	
	<i>n</i> -Heptan	53,3	
25/4	Tridodecylamin	166,7	15,2 ± 0,5
	Dimethyldodecylamin	0,0	
	Diisobutylketon	60,0	
	1-Octanol	40,0	
26/4	Tripropylamin	0,0	9,5 ± 0,0
	Triisooctylamin	300,0	
	<i>n</i> -Dodecan	6,7	
	Diisobutylketon	93,3	
27/4	Tridodecylamin	66,7	10,6 ± 1,6
	Tripropylamin	400,0	
	1-Octanol	33,3	
	Toluol	66,7	
28/4	Tridodecylamin	166,7	5,8 ± 0,4
	Trihexylamin	33,3	
	Toluol	6,7	
	Toluol	93,3	
29/4	Tridodecylamin	400,0	23,3 ± 1,8
	Tridodecylamin	133,3	
	1-Hexanol	53,3	
	Toluol	46,7	
30/4	Tripropylamin	466,7	16,4 ± 1,2
	Trihexylamin	166,7	
	2-Octanol	53,3	
	1-Octanol	46,7	

Tabelle 12-12: Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions- system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	Extraktionsausbeute, %
1/5	Diisooctylamin	266,7	28,5 ± 0,6
	Trihexylamin	33,3	
	1-Hexanol	46,7	
	Toluol	53,3	
2/5	Dibutylamin	366,7	20,0 ± 0,5
	Trihexylamin	433,3	
	<i>n</i> -Dodecan	60,0	
	1-Octanol	40,0	
3/5	Methyldioctylamin	233,3	33,3 ± 0,8
	Diisooctylamin	233,3	
	1-Hexanol	26,7	
	1-Hexanol	73,3	
4/5	Tridodecylamin	66,7	25,2 ± 0,9
	Tributylamin	433,3	
	1-Hexanol	46,7	
	1-Dodecanol	53,3	
5/5	Tripropylamin	166,7	0
	Dimethyldodecylamin	166,7	
	1-Nonanol	80,0	
	1-Octanol	20,0	
6/5	Methyldioctylamin	266,7	36,9 ± 0,5
	Trihexylamin	433,3	
	1-Octanol	53,3	
	1-Dodecanol	46,7	
7/5	Tridodecylamin	333,3	8,6 ± 0,7
	Tripentylamin	66,7	
	1-Dodecanol	26,7	
	<i>n</i> -Hexan	73,3	
8/5	Tripentylamin	66,7	28,4 ± 0,1
	Methyldidecylamin	400,0	
	1-Decanol	60,0	
	1-Octanol	40,0	
9/5	Diisooctylamin	266,7	32,1 ± 0,1
	Dimethyldodecylamin	133,3	
	1-Hexanol	80,0	
	Toluol	20,0	
10/5	Diisooctylamin	266,7	0
	Tripentylamin	333,3	
	<i>n</i> -Dodecan	86,7	
	Toluol	13,3	
11/5	Tripropylamin	166,7	14,5 ± 0,8
	Triisooctylamin	0,0	
	1-Nonanol	20,0	
	1-Hexanol	80,0	
12/5	Diphenylamin	366,7	32,0 ± 0,2
	Methyldioctylamin	433,3	
	1-Hexanol	26,7	
	1-Hexanol	73,3	
13/5	Diisooctylamin	366,7	36,1 ± 0,3
	Trihexylamin	500,0	
	1-Hexanol	100,0	
	<i>n</i> -Heptan	0,0	
14/5	Dihexylamin	200,0	18,7 ± 1,3
	Tributylamin	33,3	
	1-Nonanol	100,0	
	<i>n</i> -Heptan	0,0	
15/5	Tridodecylamin	333,3	22,8 ± 0,1
	Methyldidecylamin	0,0	
	Diisobutylketon	60,0	
	1-Octanol	40,0	

Tabelle 12-12: Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions- system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	Extraktionsausbeute, %
16/5	Dimethyldodecylamin	166,7	21,8 ± 0,5
	Tripropylamin	433,3	
	1-Hexanol	86,7	
	<i>n</i> -Heptan	13,3	
17/5	Tripropylamin	0,0	13,6 ± 0,2
	Triisooctylamin	300,0	
	1-Hexanol	0,0	
	Diisobutylketon	100,0	
18/5	Octylamin	66,7	30,8 ± 0,5
	Trihexylamin	333,3	
	1-Hexanol	80,0	
	1-Nonanol	20,0	
19/5	Dimethyldodecylamin	233,3	24,8 ± 0,2
	Tripropylamin	33,3	
	2-Octanol	33,3	
	1-Octanol	66,7	
20/5	Tripentylamin	0,0	18,2 ± 0,1
	Triisooctylamin	0,0	
	<i>n</i> -Pentan	60,0	
	<i>n</i> -Hexan	40,0	
21/5	Diisooctylamin	0,0	29,4 ± 1,2
	Methyldidecylamin	466,7	
	1-Nonanol	100,0	
	Toluol	0,0	
22/5	Dihexylamin	33,3	35,4 ± 1,0
	Trihexylamin	500,0	
	1-Decanol	46,7	
	1-Dodecanol	53,3	
23/5	Octylamin	366,7	36,7 ± 0,3
	Trihexylamin	433,3	
	1-Hexanol	40,0	
	<i>n</i> -Hexan	60,0	
24/5	Tripentylamin	0,0	18,9 ± 0,0
	Trihexylamin	433,3	
	1-Hexanol	33,3	
	<i>n</i> -Heptan	66,7	
25/5	Diphenylamin	0,0	26,0 ± 0,6
	Trihexylamin	333,3	
	1-Octanol	26,7	
	1-Hexanol	73,3	
26/5	Trioctylamin	433,3	27,3 ± 0,3
	Tripropylamin	33,3	
	1-Decanol	86,7	
	Toluol	13,3	
27/5	Octylamin	0,0	28,3 ± 0,4
	Trihexylamin	333,3	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Octanol	46,7	
28/5	Tripentylamin	0,0	16,1 ± 0,4
	Dimethyldodecylamin	133,3	
	1-Hexanol	26,7	
	Toluol	73,3	
29/5	Dimethyldodecylamin	100,0	30,2 ± 0,3
	Tributylamin	466,7	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Octanol	46,7	
30/5	Octylamin	166,7	34,8 ± 1,0
	Tripentylamin	433,3	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Octanol	46,7	

Tabelle 12-12: Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions- system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	Extraktionsausbeute, %
1/6	Tripentylamin	166,7	19,8 ± 0,4
	Triisooctylamin	0,0	
	<i>n</i> -Decan	20,0	
	1-Hexanol	80,0	
2/6	Octylamin	166,7	20,1 ± 0,6
	Tripentylamin	333,3	
	1-Octanol	53,3	
	1-Octanol	46,7	
3/6	Octylamin	366,7	39,2 ± 0,8
	Trihexylamin	400,0	
	1-Hexanol	40,0	
	Toluol	60,0	
4/6	Octylamin	166,7	15,8 ± 0,2
	Tripropylamin	33,3	
	1-Hexanol	100,0	
	1-Nonanol	0,0	
5/6	Diisooctylamin	400,0	29,2 ± 0,5
	Tributylamin	100,0	
	1-Hexanol	80,0	
	<i>n</i> -Dodecan	20,0	
6/6	Octylamin	33,3	29,8 ± 0,5
	Trihexylamin	466,7	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Nonanol	46,7	
7/6	Tripentylamin	0,0	20,8 ± 0,5
	Trihexylamin	300,0	
	1-Hexanol	60,0	
	<i>n</i> -Hexan	40,0	
8/6	Tridodecylamin	366,7	33,9 ± 0,1
	Trihexylamin	433,3	
	1-Hexanol	33,3	
	Toluol	66,7	
9/6	Diisooctylamin	366,7	35,3 ± 0,4
	Trihexylamin	433,3	
	1-Hexanol	40,0	
	<i>n</i> -Dodecan	60,0	
10/6	Octylamin	0,0	20,6 ± 0,1
	Tridodecylamin	266,7	
	1-Hexanol	33,3	
	Toluol	66,7	
11/6	Tridodecylamin	0,0	27,4 ± 0,9
	Methyldidecylamin	400,0	
	1-Nonanol	100,0	
	Toluol	0,0	
12/6	Tripentylamin	0,0	8,7 ± 0,1
	Triisooctylamin	0,0	
	<i>n</i> -Hexan	60,0	
	<i>n</i> -Heptan	40,0	
13/6	Diisooctylamin	0,0	34,5 ± 0,1
	Trioctylamin	500,0	
	1-Hexanol	46,7	
	Toluol	53,3	
14/6	Diisooctylamin	233,3	27,3 ± 0,5
	Methyldidecylamin	33,3	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Nonanol	46,7	
15/6	Octylamin	200,0	23,8 ± 0,2
	Diphenylamin	100,0	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Octanol	46,7	

Tabelle 12-12: Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions-system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	Extraktionsausbeute, %
16/6	Tripropylamin	0,0	0
	Dimethyldodecylamin	133,3	
	<i>n</i> -Hexan	26,7	
	Toluol	73,3	
17/6	Diphenylamin	0,0	34,9 ± 0,0
	Trihexylamin	500,0	
	1-Hexanol	26,7	
	1-Hexanol	73,3	
18/6	Diisooctylamin	33,3	25,5 ± 0,3
	Trihexylamin	433,3	
	1-Hexanol	46,7	
	<i>n</i> -Hexan	53,3	
19/6	Trioctylamin	233,3	30,2 ± 0,0
	Diisooctylamin	233,3	
	1-Hexanol	80,0	
	Toluol	20,0	
20/6	Octylamin	200,0	23,4 ± 0,5
	Tridodecylamin	133,3	
	1-Hexanol	86,7	
	1-Nonanol	13,3	
21/6	Octylamin	200,0	31,7 ± 0,6
	Tripentylamin	300,0	
	1-Hexanol	80,0	
	1-Nonanol	20,0	
22/6	Diisooctylamin	0,0	4,2 ± 0,0
	Triisooctylamin	0,0	
	<i>n</i> -Pentan	33,3	
	Toluol	66,7	
23/6	Tributylamin	0,0	21,3 ± 0,1
	Tributylamin	466,7	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Octanol	46,7	
24/6	Octylamin	300,0	33,4 ± 0,5
	Trioctylamin	433,3	
	1-Hexanol	33,3	
	<i>n</i> -Heptan	66,7	
25/6	Diisooctylamin	266,7	26,6 ± 0,1
	Dibutylamin	166,7	
	1-Hexanol	80,0	
	Diisobutylketon	20,0	
26/6	Tripentylamin	0,0	23,7 ± 0,1
	Dimethyldodecylamin	200,0	
	1-Hexanol	26,7	
	Toluol	73,3	
27/6	Tripentylamin	0,0	15,9 ± 1,1
	Dimethyldodecylamin	0,0	
	<i>n</i> -Pentan	80,0	
	<i>n</i> -Dodecan	20,0	
28/6	Dimethyldodecylamin	166,7	16,4 ± 0,2
	Diphenylamin	33,3	
	1-Hexanol	100,0	
	Toluol	0,0	
29/6	Dihexylamin	233,3	33,6 ± 0,0
	Diisooctylamin	233,3	
	1-Hexanol	80,0	
	1-Octanol	20,0	
30/6	Dibutylamin	100,0	27,5 ± 0,7
	Trihexylamin	333,3	
	1-Hexanol	80,0	
	1-Nonanol	20,0	

Tabelle 12-12: Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions- system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	Extraktionsausbeute, %
1/7	Tripentylamin	0,0	6,8 ± 1,3
	Triisooctylamin	133,3	
	<i>n</i> -Hexan	60,0	
	<i>n</i> -Heptan	40,0	
2/7	Tripentylamin	266,7	7,8 ± 0,6
	Trihexylamin	33,3	
	<i>n</i> -Hexan	60,0	
	Toluol	40,0	
3/7	Tripentylamin	0,0	7,4 ± 0,9
	Tripentylamin	300,0	
	Kerosin	73,3	
	<i>n</i> -Hexan	26,7	
4/7	Tripentylamin	200,0	24,8 ± 1,0
	Tripentylamin	300,0	
	1-Hexanol	26,7	
	Toluol	73,3	
5/7	Octylamin	166,7	41,8 ± 0,8
	Trihexylamin	466,7	
	1-Hexanol	60,0	
	<i>n</i> -Pentan	40,0	
6/7	Diisooctylamin	366,7	0
	Trihexylamin	233,3	
	2-Octanol	40,0	
	<i>n</i> -Dodecan	60,0	
7/7	Diisooctylamin	0,0	33,2 ± 0,4
	Trihexylamin	500,0	
	1-Hexanol	33,3	
	Toluol	66,7	
8/7	Octylamin	366,7	0
	Trihexylamin	133,3	
	<i>n</i> -Hexan	26,7	
	1-Dodecanol	73,3	
9/7	Tridodecylamin	0,0	28,9 ± 0,1
	Triisooctylamin	400,0	
	1-Hexanol	33,3	
	Toluol	66,7	
10/7	Tripentylamin	0,0	10,6 ± 3,1
	Methyldidecylamin	166,7	
	<i>n</i> -Pentan	60,0	
	<i>n</i> -Hexan	40,0	
11/7	Dibutylamin	100,0	8,3 ± 2,7
	Trihexylamin	0,0	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Nonanol	46,7	
12/7	Diisooctylamin	0,0	29,6 ± 0,1
	Trihexylamin	366,7	
	1-Hexanol	26,7	
	Toluol	73,3	
13/7	Tripentylamin	0,0	22,4 ± 1,8
	Trihexylamin	166,7	
	1-Hexanol	80,0	
	1-Hexanol	20,0	
14/7	Dihexylamin	233,3	17,9 ± 1,9
	Triisooctylamin	0,0	
	1-Nonanol	80,0	
	1-Octanol	20,0	
15/7	Diisooctylamin	100,0	28,6 ± 0,8
	Trioctylamin	233,3	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Nonanol	46,7	

Tabelle 12-12: Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions- system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	Extraktionsausbeute, %
16/7	Diisooctylamin	266,7	26,2 ± 1,1
	Dimethyldodecylamin	0,0	
	1-Hexanol	80,0	
	Toluol	20,0	
17/7	Octylamin	100,0	32,5 ± 0,6
	Triisooctylamin	400,0	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Octanol	46,7	
18/7	Octylamin	200,0	19,3 ± 0,8
	Triisooctylamin	0,0	
	1-Octanol	80,0	
	1-Nonanol	20,0	
19/7	Dihexylamin	0,0	20,9 ± 0,2
	Dimethyldodecylamin	200,0	
	1-Hexanol	80,0	
	1-Nonanol	20,0	
20/7	Diisooctylamin	33,3	34,9 ± 0,9
	Trihexylamin	500,0	
	1-Hexanol	40,0	
	Toluol	60,0	
21/7	Triooctylamin	233,3	35,3 ± 0,9
	Diisooctylamin	433,3	
	1-Hexanol	80,0	
	Diisobutylketon	20,0	
22/7	Diisooctylamin	33,3	0
	Triisooctylamin	0,0	
	<i>n</i> -Pentan	46,7	
	Toluol	53,3	
23/7	Tripropylamin	0,0	0
	Dimethyldodecylamin	433,3	
	1-Octanol	53,3	
	<i>n</i> -Heptan	46,7	
24/7	Octylamin	266,7	9,4 ± 1,0
	Trihexylamin	33,3	
	<i>n</i> -Heptan	60,0	
	<i>n</i> -Heptan	40,0	
25/7	Diisooctylamin	233,3	21,1 ± 0,6
	Triisooctylamin	0,0	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Nonanol	46,7	
26/7	Tripenylamin	0,0	10,3 ± 0,9
	Triisooctylamin	333,3	
	Methylisobutylketon	60,0	
	<i>n</i> -Hexan	40,0	
27/7	Diphenylamin	66,7	6,0 ± 0,4
	Triisooctylamin	0,0	
	<i>n</i> -Pentan	33,3	
	2-Octanol	66,7	
28/7	Diisooctylamin	100,0	0
	Diisooctylamin	366,7	
	1-Hexanol	26,7	
	<i>n</i> -Dodecan	73,3	
29/7	Tripenylamin	0,0	18,9 ± 1,0
	Diisooctylamin	233,3	
	1-Decanol	60,0	
	<i>n</i> -Hexan	40,0	
30/7	Octylamin	166,7	28,5 ± 0,8
	Triisooctylamin	366,7	
	1-Hexanol	20,0	
	Diisobutylketon	80,0	

Tabelle 12-12: Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions- system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	Extraktionsausbeute, %
1/8	Tripentylamin	0,0	18,4 ± 0,5
	Triocetylamin	133,3	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Nonanol	46,7	
2/8	Tripentylamin	0,0	23,4 ± 0,2
	Triisooctylamin	233,3	
	2-Octanol	53,3	
	1-Nonanol	46,7	
3/8	Diisooctylamin	100,0	28,1 ± 0,3
	Triocetylamin	233,3	
	1-Hexanol	53,3	
	<i>n</i> -Pentan	46,7	
4/8	Diisooctylamin	266,7	40,6 ± 0,4
	Trihexylamin	433,3	
	1-Hexanol	53,3	
	1-Octanol	46,7	
5/8	Octylamin	266,7	16,0 ± 0,4
	Dimethyldodecylamin	133,3	
	<i>n</i> -Hexan	60,0	
	<i>n</i> -Pentan	40,0	
6/8	Tripentylamin	433,3	41,3 ± 0,3
	Tripentylamin	433,3	
	1-Hexanol	20,0	
	1-Hexanol	80,0	
7/8	Tripentylamin	0,0	21,5 ± 0,3
	Triisooctylamin	166,7	
	1-Hexanol	86,7	
	<i>n</i> -Decan	13,3	
8/8	Tridodecylamin	0,0	29,6 ± 0,4
	Trihexylamin	366,7	
	1-Hexanol	33,3	
	Toluol	66,7	
9/8	Tripentylamin	0,0	7,4 ± 0,8
	Triocetylamin	366,7	
	<i>n</i> -Hexan	60,0	
	<i>n</i> -Hexan	40,0	
10/8	Diisooctylamin	266,7	0
	Dimethyldodecylamin	133,3	
	<i>n</i> -Pentan	53,3	
	<i>n</i> -Hexan	46,7	
11/8	Dihexylamin	100,0	34,7 ± 0,4
	Diisooctylamin	500,0	
	1-Decanol	53,3	
	<i>n</i> -Heptan	46,7	
12/8	Tripentylamin	0,0	0
	Dimethyldodecylamin	433,3	
	1-Octanol	73,3	
	<i>n</i> -Hexan	26,7	
13/8	Tripentylamin	0,0	1,4 ± 0,7
	Trihexylamin	33,3	
	<i>n</i> -Heptan	60,0	
	<i>n</i> -Heptan	40,0	
14/8	Octylamin	366,7	9,1 ± 0,5
	Trihexylamin	133,3	
	<i>n</i> -Pentan	60,0	
	<i>n</i> -Hexan	40,0	
15/8	Dihexylamin	166,7	34,9 ± 0,3
	Methyldioctylamin	466,7	
	1-Hexanol	60,0	
	<i>n</i> -Pentan	40,0	

Tabelle 12-12: Komplexe Reaktivextraktionssysteme des 2. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktionssystem/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	Extraktionsausbeute, %
16/8	Diisooctylamin	100,0	21,9 ± 0,1
	Triooctylamin	133,3	
	<i>n</i> -Hexan	60,0	
	<i>n</i> -Heptan	40,0	
17/8	Diisooctylamin	100,0	0
	Triooctylamin	466,7	
	Methylisobutylketon	60,0	
	<i>n</i> -Hexan	40,0	
18/8	Octylamin	166,7	30,8 ± 0,1
	Trihexylamin	400,0	
	1-Hexanol	60,0	
	1-Nonanol	40,0	
19/8	Octylamin	366,7	34,4 ± 0,9
	Methyldodecylamin	433,3	
	2-Octanol	20,0	
	Toluol	80,0	
20/8	Diisooctylamin	33,3	35,6 ± 3,2
	Trihexylamin	466,7	
	1-Hexanol	80,0	
	Toluol	20,0	
21/8	Diisooctylamin	0,0	2,7 ± 0,3
	Triisooctylamin	0,0	
	<i>n</i> -Decan	33,3	
	<i>n</i> -Heptan	66,7	
22/8	Diisooctylamin	266,7	0
	Trihexylamin	433,3	
	<i>n</i> -Hexan	6,7	
	<i>n</i> -Hexan	93,3	
23/8	Diphenylamin	0,0	6,7 ± 0,2
	Triisooctylamin	400,0	
	1-Hexanol	26,7	
	Toluol	73,3	
24/8	Octylamin	166,7	7,3 ± 1,7
	Diphenylamin	233,3	
	1-Decanol	20,0	
	Diisobutylketon	80,0	
25/8	Trihexylamin	0,0	2,6 ± 0,1
	Triisooctylamin	0,0	
	1-Hexanol	80,0	
	<i>n</i> -Dodecan	20,0	
26/8	Octylamin	366,7	31,5 ± 0,3
	Trihexylamin	166,7	
	1-Hexanol	80,0	
	1-Octanol	20,0	
27/8	Dihexylamin	33,3	0,3 ± 0,6
	Tripentylamin	300,0	
	Kerosin	53,3	
	<i>n</i> -Heptan	46,7	
28/8	Octylamin	0,0	0
	Triisooctylamin	133,3	
	<i>n</i> -Hexan	60,0	
	<i>n</i> -Heptan	40,0	
29/8	Tripentylamin	0,0	0
	Triisooctylamin	0,0	
	<i>n</i> -Hexan	26,7	
	1-Dodecanol	73,3	
30/8	Diphenylamin	0,0	29,4 ± 0,3
	Trihexylamin	500,0	
	1-Hexanol	33,3	
	1-Hexanol	66,7	

12.2.4 Biokompatible Reaktivextraktionssysteme des 3. Auswahlprüfverfahrens

Tabelle 12-13: Biokompatible Reaktivextraktionssysteme des 3. Auswahlprüfverfahrens

Reaktivextraktions- system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	E, %	Wachstumsrate, % des normalen Wachstums	E korr, %
1/1	Tripropylamin	214,3	11,2 ± 1,4	6,5	0,7
	Tridodecylamin	142,9			
	<i>n</i> -Pentan	73,3			
	<i>n</i> -Heptan	26,7			
2/1	Triisooctylamin	142,9	5,8 ± 1,3	1,3	0,1
	Tripropylamin	142,9			
	<i>n</i> -Pentan	73,3			
	<i>n</i> -Decan	26,7			
3/1	Tripropylamin	71,4	7,1 ± 0,1	7,9	0,6
	Tripropylamin	357,1			
	<i>n</i> -Heptan	33,3			
	<i>n</i> -Dodecan	66,7			
4/1	Tributylamin	71,4	16,6 ± 0,2	6,9	1,1
	Tributylamin	285,7			
	Toluol	40,0			
	<i>n</i> -Hexan	60,0			
5/1	Tributylamin	0,0	10,7 ± 1,0	2,4	0,3
	Tridodecylamin	357,1			
	<i>n</i> -Dodecan	40,0			
	<i>n</i> -Pentan	60,0			
6/1	Tributylamin	214,3	0,9 ± 1,3	0,0	0,0
	Triisooctylamin	428,6			
	<i>n</i> -Decan	40,0			
	<i>n</i> -Octan	60,0			
7/1	Tributylamin	428,6	9,5 ± 0,4	8,3	0,8
	Tripropylamin	142,9			
	<i>n</i> -Heptan	66,7			
	<i>n</i> -Decan	33,3			
8/1	Triisooctylamin	428,6	8,1 ± 1,1	3,5	0,3
	Tripropylamin	71,4			
	<i>n</i> -Octan	20,0			
	<i>n</i> -Hexan	80,0			
9/1	Tridodecylamin	71,4	1,5 ± 3,8	81,1	1,2
	Tripropylamin	285,7			
	<i>n</i> -Octan	66,7			
	<i>n</i> -Hexan	33,3			
10/1	Triisooctylamin	142,9	12,5 ± 0,5	0,3	0,0
	Tributylamin	428,6			
	<i>n</i> -Pentan	66,7			
	<i>n</i> -Dodecan	33,3			
11/1	Tributylamin	214,3	5,5 ± 0,9	8,5	0,5
	Tripropylamin	285,7			
	<i>n</i> -Octan	26,7			
	<i>n</i> -Pentan	73,3			
12/1	Triisooctylamin	357,1	0,0	0,3	0,0
	Tripropylamin	0,0			
	<i>n</i> -Hexan	26,7			
	<i>n</i> -Dodecan	73,3			
13/1	Tripropylamin	357,1	3,8 ± 0,8	8,4	0,3
	Tripropylamin	357,1			
	<i>n</i> -Octan	26,7			
	<i>n</i> -Decan	73,3			
14/1	Tripropylamin	357,1	2,6 ± 1,4	8,1	0,2
	Tripropylamin	0,0			
	Kerosin	93,3			
	<i>n</i> -Heptan	6,7			

Tabelle 12-13: Biokompatible Reaktivextraktionssysteme des 3. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions- system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	E, %	Wachstumsrate, % des normalen Wachstums	E korr, %
1/2	Tripropylamin	500,0	5,9 ± 0,6	83,5	4,9
	Tributylamin	71,4			
	<i>n</i> -Octan	26,7			
	<i>n</i> -Decan	73,3			
2/2	Triisooctylamin	142,9	3,8 ± 2,8	98,0	3,8
	Tributylamin	0,0			
	<i>n</i> -Pentan	40,0			
	<i>n</i> -Decan	60,0			
3/2	Tributylamin	357,1	6,6 ± 1,5	79,9	5,3
	Tributylamin	0,0			
	<i>n</i> -Octan	93,3			
	<i>n</i> -Octan	6,7			
4/2	Tributylamin	71,4	6,9 ± 2,0	10,7	0,7
	Tributylamin	357,1			
	<i>n</i> -Octan	33,3			
	<i>n</i> -Decan	66,7			
5/2 (A)	Tripropylamin	0,0	7,4 ± 4,1	81,5	6,1
	Tridodecylamin	71,4			
	Kerosin	93,3			
	<i>n</i> -Heptan	6,7			
6/2	Triisooctylamin	142,9	12,7 ± 1,7	12,6	1,6
	Tributylamin	142,9			
	<i>n</i> -Pentan	26,7			
	<i>n</i> -Dodecan	73,3			
7/2 (B)	Tributylamin	214,3	14,1 ± 1,3	93,8	13,2
	Tridodecylamin	142,9			
	<i>n</i> -Hexan	13,3			
	<i>n</i> -Heptan	86,7			
8/2	Triisooctylamin	142,9	9,9 ± 0,4	6,5	0,6
	Triisooctylamin	285,7			
	<i>n</i> -Octan	20,0			
	<i>n</i> -Hexan	80,0			
9/2	Tripropylamin	0,0	8,8 ± 0,5	100,0	8,8
	Tridodecylamin	357,1			
	<i>n</i> -Dodecan	73,3			
	<i>n</i> -Pentan	26,7			
10/2	Tributylamin	71,4	7,0 ± 0,0	64,4	4,5
	Tributylamin	357,1			
	Kerosin	40,0			
	<i>n</i> -Decan	60,0			
11/2	Tributylamin	71,4	6,4 ± 0,9	43,2	2,8
	Tributylamin	142,9			
	<i>n</i> -Heptan	53,3			
	<i>n</i> -Dodecan	46,7			
12/2	Tributylamin	357,1	16,4 ± 2,4	69,4	11,4
	Tributylamin	285,7			
	<i>n</i> -Dodecan	40,0			
	<i>n</i> -Pentan	60,0			
13/2	Triisooctylamin	357,1	3,3 ± 0,7	6,6	0,2
	Tributylamin	0,0			
	<i>n</i> -Hexan	73,3			
	<i>n</i> -Decan	26,7			
14/2	Triisooctylamin	142,9	6,6 ± 3,1	5,1	0,3
	Tributylamin	142,9			
	<i>n</i> -Pentan	73,3			
	<i>n</i> -Dodecan	26,7			

Tabelle 12-13: Biokompatible Reaktivextraktionssysteme des 3. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions- system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	E, %	Wachstumsrate, % des normalen Wachstums	E korr, %
1/3	Tributylamin	71,4	4,2 ± 2,2	81,7	3,4
	Tributylamin	357,1			
	<i>n</i> -Octan	46,7			
	<i>n</i> -Decan	53,3			
2/3	Tributylamin	357,1	11,7 ± 1,1	38,3	4,5
	Tripropylamin	0,0			
	<i>n</i> -Hexan	73,3			
	<i>n</i> -Hexan	26,7			
3/3	Tridodecylamin	0,0	13,4 ± 3,4	52,8	7,1
	Tridodecylamin	357,1			
	<i>n</i> -Dodecan	20,0			
	Toluol	80,0			
4/3	Tributylamin	214,3	6,8 ± 0,4	100,0	6,8
	Tridodecylamin	142,9			
	<i>n</i> -Hexan	40,0			
	Toluol	60,0			
5/3	Tributylamin	357,1	9,7 ± 0,5	7,0	0,7
	Triisooctylamin	285,7			
	<i>n</i> -Octan	13,3			
	<i>n</i> -Hexan	86,7			
6/3	Triisooctylamin	214,3	6,7 ± 1,3	5,6	0,4
	Tributylamin	357,1			
	<i>n</i> -Heptan	26,7			
	<i>n</i> -Decan	73,3			
7/3	Triisooctylamin	71,4	6,4 ± 2,4	19,4	1,2
	Tridodecylamin	428,6			
	<i>n</i> -Dodecan	46,7			
	<i>n</i> -Pentan	53,3			
8/3	Tripropylamin	500,0	10,6 ± 0,2	84,3	9,0
	Tributylamin	357,1			
	Kerosin	26,7			
	<i>n</i> -Decan	73,3			
9/3	Triisooctylamin	357,1	8,0 ± 1,6	4,2	0,3
	Tributylamin	285,7			
	<i>n</i> -Dodecan	40,0			
	<i>n</i> -Decan	60,0			
10/3 (C)	Tributylamin	214,3	16,0 ± 7,5	96,0	15,4
	Tridodecylamin	142,9			
	<i>n</i> -Hexan	13,3			
	<i>n</i> -Pentan	86,7			
11/3	Tributylamin	71,4	5,2 ± 0,7	9,7	0,5
	Triisooctylamin	142,9			
	<i>n</i> -Heptan	53,3			
	<i>n</i> -Dodecan	46,7			
12/3	Triisooctylamin	142,9	7,5 ± 1,7	3,8	0,3
	Triisooctylamin	285,7			
	<i>n</i> -Octan	20,0			
	<i>n</i> -Pentan	80,0			
13/3	Tributylamin	142,9	4,7 ± 2,2	47,0	2,2
	Tributylamin	0,0			
	Toluol	66,7			
	<i>n</i> -Dodecan	33,3			
14/3	Tributylamin	500,0	10,6 ± 0,7	78,3	8,3
	Tributylamin	142,9			
	<i>n</i> -Hexan	66,7			
	<i>n</i> -Heptan	33,3			

Tabelle 12-13: Biokompatible Reaktivextraktionssysteme des 3. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions- system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	E, %	Wachstumsrate, % des normalen Wachstums	E korr, %
1/4	Tributylamin	357,1	7,8 ± 1,0	55,7	4,4
	Tripropylamin	71,4			
	<i>n</i> -Dodecan	53,3			
	<i>n</i> -Dodecan	46,7			
2/4	Tributylamin	0,0	13,5 ± 1,3	9,5	1,3
	Tripropylamin	357,1			
	<i>n</i> -Hexan	40,0			
	Toluol	60,0			
3/4	Tributylamin	214,3	8,8 ± 1,2	93,3	8,2
	Tridodecylamin	285,7			
	<i>n</i> -Hexan	40,0			
	Toluol	60,0			
4/4	Tributylamin	71,4	5,2 ± 0,2	86,5	4,5
	Tridodecylamin	71,4			
	Kerosin	66,7			
	<i>n</i> -Dodecan	33,3			
5/4	Tripropylamin	500,0	7,4 ± 1,4	67,2	5,0
	Tributylamin	0,0			
	<i>n</i> -Heptan	53,3			
	<i>n</i> -Dodecan	46,7			
6/4	Triisooctylamin	142,9	16,6 ± 1,7	1,9	0,3
	Triisooctylamin	428,6			
	Toluol	80,0			
	<i>n</i> -Hexan	20,0			
7/4	Tripropylamin	142,9	5,7 ± 1,4	82,3	4,7
	Tridodecylamin	428,6			
	<i>n</i> -Dodecan	73,3			
	<i>n</i> -Pentan	26,7			
8/4	Tributylamin	71,4	9,5 ± 1,1	9,4	0,9
	Triisooctylamin	142,9			
	Toluol	100,0			
	<i>n</i> -Hexan	0,0			
9/4	Tripropylamin	214,3	7,6 ± 0,8	80,9	6,2
	Tridodecylamin	142,9			
	<i>n</i> -Dodecan	20,0			
	<i>n</i> -Decan	80,0			
10/4	Tridodecylamin	500,0	7,6 ± 0,3	87,6	6,6
	Tributylamin	214,3			
	Kerosin	26,7			
	<i>n</i> -Decan	73,3			
11/4	Tripropylamin	0,0	3,5 ± 1,0	10,2	0,4
	Triisooctylamin	142,9			
	<i>n</i> -Heptan	80,0			
	<i>n</i> -Heptan	20,0			
12/4	Tripropylamin	71,4	6,8 ± 2,1	66,8	4,6
	Tributylamin	357,1			
	Kerosin	26,7			
	<i>n</i> -Decan	73,3			
13/4	Tributylamin	71,4	4,1 ± 2,9	10,1	0,4
	Triisooctylamin	285,7			
	<i>n</i> -Octan	20,0			
	<i>n</i> -Decan	80,0			
14/4 (D)	Tributylamin	0,0	8,8 ± 3,0	96,5	8,4
	Tridodecylamin	71,4			
	<i>n</i> -Hexan	46,7			
	Toluol	53,3			

Tabelle 12-13: Biokompatible Reaktivextraktionssysteme des 3. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions- system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	E, %	Wachstumsrate, % des normalen Wachstums	E korr, %
1/5	Tributylamin	214,3	4,8 ± 2,0	72,6	3,5
	Tridodecylamin	71,4			
	<i>n</i> -Hexan	40,0			
	Toluol	60,0			
2/5	Tributylamin	142,9	11,4 ± 1,8	88,6	10,1
	Tridodecylamin	428,6			
	Toluol	80,0			
	Kerosin	20,0			
3/5	Tributylamin	357,1	5,5 ± 0,8	64,5	3,6
	Tributylamin	71,4			
	<i>n</i> -Dodecan	93,3			
	<i>n</i> -Dodecan	6,7			
4/5	Tripropylamin	214,3	10,4 ± 1,1	51,3	5,3
	Tributylamin	428,6			
	Toluol	26,7			
	<i>n</i> -Decan	73,3			
5/5	Tripropylamin	214,3	8,2 ± 1,6	74,7	6,1
	Tridodecylamin	214,3			
	Toluol	80,0			
	<i>n</i> -Dodecan	20,0			
6/5	Tributylamin	71,4	5,3 ± 1,0	92,0	4,9
	Tridodecylamin	142,9			
	Toluol	100,0			
	<i>n</i> -Dodecan	0,0			
7/5	Tributylamin	71,4	4,2 ± 0,1	99,4	4,2
	Tridodecylamin	71,4			
	Kerosin	80,0			
	<i>n</i> -Hexan	20,0			
8/5	Tributylamin	0,0	8,6 ± 0,6	38,7	3,3
	Tripropylamin	285,7			
	<i>n</i> -Hexan	46,7			
	Toluol	53,3			
9/5	Triisooctylamin	142,9	6,0 ± 2,0	0,0	0,0
	Triisooctylamin	71,4			
	<i>n</i> -Hexan	46,7			
	<i>n</i> -Pentan	53,3			
10/5	Tripropylamin	71,4	14,9 ± 5,4	1,8	0,3
	Triisooctylamin	142,9			
	<i>n</i> -Pentan	60,0			
	<i>n</i> -Hexan	40,0			
11/5	Triisooctylamin	142,9	9,3 ± 1,4	0,0	0,0
	Tributylamin	357,1			
	Kerosin	80,0			
	<i>n</i> -Hexan	20,0			
12/5	Tributylamin	71,4	10,4 ± 5,1	0,0	0,0
	Triisooctylamin	142,9			
	<i>n</i> -Dodecan	20,0			
	<i>n</i> -Pentan	80,0			
13/5	Tributylamin	71,4	4,1 ± 0,9	1,1	0,0
	Triisooctylamin	71,4			
	Kerosin	66,7			
	<i>n</i> -Hexan	33,3			
14/5	Tridodecylamin	500,0	6,3 ± 1,2	77,4	4,8
	Tributylamin	214,3			
	Toluol	0,0			
	<i>n</i> -Decan	100,0			

Tabelle 12-13: Biokompatible Reaktivextraktionssysteme des 3. Auswahlprüfverfahrens (Fortsetzung)

Reaktivextraktions- system/Generation	Bestandteile	Amin, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel, Lösungsmittel % w/w des Gesamtlösungsmittels	E, %	Wachstumsrate, % des normalen Wachstums	E korr, %
1/6	Triisooctylamin	142,9	4,0 ± 0,9	1,1	0,0
	Triisooctylamin	0,0			
	<i>n</i> -Hexan	13,3			
	<i>n</i> -Hexan	86,7			
2/6	Tripropylamin	0,0	10,4 ± 5,1	10,1	1,0
	Triisooctylamin	142,9			
	<i>n</i> -Pentan	60,0			
	<i>n</i> -Pentan	40,0			
3/6	Tributylamin	214,3	10,6 ± 6,4	7,0	0,7
	Triisooctylamin	142,9			
	<i>n</i> -Dodecan	20,0			
	Kerosin	80,0			
4/6	Tributylamin	0,0	3,9 ± 2,0	79,9	3,1
	Tridodecylamin	71,4			
	Kerosin	13,3			
	Toluol	86,7			
5/6	Tributylamin	71,4	12,7 ± 4,4	79,2	10,1
	Tributylamin	357,1			
	Kerosin	0,0			
	<i>n</i> -Pentan	100,0			
6/6	Tripropylamin	71,4	7,7 ± 1,6	23,0	1,8
	Tributylamin	71,4			
	<i>n</i> -Hexan	60,0			
	<i>n</i> -Hexan	40,0			
7/6	Tributylamin	0,0	2,9 ± 1,2	90,4	2,6
	Tridodecylamin	71,4			
	<i>n</i> -Heptan	40,0			
	Kerosin	60,0			
8/6	Tributylamin	71,4	7,0 ± 1,1	1,5	0,1
	Triisooctylamin	142,9			
	Kerosin	46,7			
	<i>n</i> -Pentan	53,3			
9/6	Tripropylamin	71,4	5,5 ± 0,5	79,7	4,4
	Tridodecylamin	357,1			
	<i>n</i> -Dodecan	60,0			
	<i>n</i> -Hexan	40,0			
10/6	Tributylamin	71,4	22,0 ± 6,4	1,2	0,3
	Triisooctylamin	71,4			
	<i>n</i> -Hexan	40,0			
	<i>n</i> -Pentan	60,0			
11/6	Tributylamin	71,4	6,5 ± 0,7	59,5	3,9
	Tributylamin	285,7			
	Kerosin	100,0			
	<i>n</i> -Hexan	0,0			
12/6	Triisooctylamin	142,9	4,2 ± 3,2	1,0	0,0
	Triisooctylamin	142,9			
	<i>n</i> -Dodecan	86,7			
	<i>n</i> -Hexan	13,3			
13/6	Tributylamin	142,9	9,3 ± 2,2	2,9	0,3
	Triisooctylamin	142,9			
	<i>n</i> -Decan	93,3			
	<i>n</i> -Dodecan	6,7			
14/6	Tributylamin	71,4	10,5 ± 1,6	79,2	8,3
	Tributylamin	0,0			
	<i>n</i> -Pentan	60,0			
	<i>n</i> -Heptan	40,0			

12.2.5 Umrechnungstabelle der Konzentrationen der Reaktivextraktionssysteme

Tabelle 12-14: Umrechnungstabelle der Konzentrationen der besten Reaktivextraktions- und Literatursysteme

Reaktivextraktions- system, mol kg ⁻¹ Lösungsmittel	Bestandteile	mL L ⁻¹	g L ⁻¹	mol L ⁻¹	mmol L ⁻¹
29/6 1,0	Diisooctylamin	101,7	81,3	0,34	336,8
	Dihexylamin	79,0	62,4	0,34	336,9
	1-Octanol	162,3	134,7	1,03	1034,1
	1-Hexanol	657,1	538,8	5,27	5272,9
29/6 1,5	Diisooctylamin	140,0	112,0	0,46	463,8
	Dihexylamin	108,8	86,0	0,46	463,9
	1-Octanol	148,9	123,6	0,95	949,3
	1-Hexanol	603,2	494,6	4,84	4840,6
T1 1,0	Trihexylamin	217,2	173,1	0,64	642,3
	1-Octanol	783,5	650,3	4,99	4993,8
T1 1,5	Trihexylamin	293,8	234,1	0,87	868,7
	1-Octanol	706,5	586,4	4,50	4502,9
TPA 1,0	Tripropylamin	135,4	102,9	0,72	718,0
	1-Octanol	865,2	718,1	5,51	5514,2
TBA 1,0	Tributylamin	164,7	128,5	0,69	693,0
	1-Octanol	835,1	693,1	5,32	5322,2
TPeA 1,0	Tripentylamin	194,5	152,1	0,67	668,7
	1-Octanol	805,8	668,8	5,14	5135,5
TOA 1,0	Trioctylamin	265,9	215,4	0,61	609,0
	1-Octanol	733,9	609,1	4,68	4677,1

12.2.6 Verdampfung Trimethylamin aus der organischen Phase

Tabelle 12-15: Verdampfung Trimethylamin aus der organischen Phase

Temperatur, °C	Zeit, h	Verlust, %
25	4,0	2,1
50	3,0	5,0
75	2,0	6,0
100	1,5	8,1

12.3 Zentrifugalextraktor

12.3.1 Dichteberechnung der eingesetzten Phasen

Tabelle 12-16: Dichten der eingesetzten Phasen im Zentrifugalextraktor

Phase	Verwendung	Dichte, g cm ⁻³
Reaktivextraktionssystem T1 1,0 mol kg ⁻¹ Lösungsmittel	Akzeptorphase Extraktion	0,823
Reaktivextraktionssystem T1 1,5 mol kg ⁻¹ Lösungsmittel	Akzeptorphase Extraktion	0,82
Reaktivextraktionssystem 29/6 1,0 mol kg ⁻¹ Lösungsmittel	Akzeptorphase Extraktion	0,817
Reaktivextraktionssystem 29/6 1,5 mol kg ⁻¹ Lösungsmittel	Akzeptorphase Extraktion	0,815
Bernsteinsäure 0,423 mol L ⁻¹ in Wasser	Donorphase Extraktion	1,021
Bernsteinsäure 0,847 mol L ⁻¹ in Wasser	Donorphase Extraktion	1,050
Bernsteinsäure 0,423 mol L ⁻¹ in Überstand	Donorphase Extraktion	1,035
Bernsteinsäure 0,847 mol L ⁻¹ in Überstand	Donorphase Extraktion	1,062
Reaktivextraktionssystem T1 1,0 mol kg ⁻¹ Lösungsmittel beladen mit 0,423 mol L ⁻¹ Bernsteinsäure	Donorphase Rückextraktion	0,855
Reaktivextraktionssystem T1 1,5 mol kg ⁻¹ Lösungsmittel beladen mit 0,423 mol L ⁻¹ Bernsteinsäure	Donorphase Rückextraktion	0,853
Reaktivextraktionssystem 29/6 1,0 mol kg ⁻¹ Lösungsmittel beladen mit 0,423 mol L ⁻¹ Bernsteinsäure	Donorphase Rückextraktion	0,857
Reaktivextraktionssystem 29/6 1,5 mol kg ⁻¹ Lösungsmittel beladen mit 0,423 mol L ⁻¹ Bernsteinsäure	Donorphase Rückextraktion	0,854
Trimethylamin in Wasser 0,5 - 25 % w/w	Akzeptorphase Rückextraktion	0,980-0,932

12.3.2 Umrechnung der Rotationsgeschwindigkeit

Tabelle 12-17: Umrechnung der Rotationsgeschwindigkeit des Zentrifugalextraktors CS50

Hz	min ⁻¹	g
10	600	9
20	1200	38
30	1800	85
40	2400	150
50	3000	235
60	3600	339
70	4200	461
80	4800	603
90	5400	763
100	6000	942

12.3.3 Produktdaten Zentrifugalextraktoren

Tabelle 12-18: Produktdaten verschiedener Zentrifugalextraktormodelle

Zentrifugalextraktor Modell	CS 50	CS 125	CS 250	CS 400	CS 500
Rotordurchmesser, mm	50	125	250	400	500
Maximaler Durchfluss, L min ⁻¹	2	22	113	340	757
Länge x Breite x Höhe, cm	23x23x64	31x31x94	70x70x153	92x92x227	122x122x271
Masse in Edelstahl, kg	12	68	340	1361	2041
Temperaturbereich, °C	-30 - 100	-30 - 100	-30 - 100	-30 - 100	-30 - 100
Leistung, kW	0,25	1,5	5,5	22	45
Phasen	1/3	1/3	3	3	3
Maximale Drehzahl, min ⁻¹	6000	3500	3500	2800	2500
Maximale Beschleunigung, g	1000	1000	2000	2000	2000