

Stoffliche und energetische
Rohstoffnutzung von
teilentzuckertem Molkenkonzentrat
(TEM 30)

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

M.Sc. Christopher Wagner

geboren am 22.07.1983, in Bad Pyrmont

Referent: Herr Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Leibniz Universität Hannover

Korreferent: Herr Prof. Dr. Detlef Bahnemann
Institut für Technische Chemie
Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 20.11.2013

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst habe und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden. Diese Arbeit wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, im September 2013

Danksagung

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen das möglichste getan hat.“

(Johann Wolfgang von Goethe)

Zu allererst danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Möglichkeit, am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover promovieren zu können. Vielen Dank für die Bereitstellung und die fachliche Begleitung meiner Arbeit in der angenehmen Atmosphäre. Ich freue mich heute noch sehr darüber, dass ich meine Arbeit im Bereich des Technikums anfertigen durfte.

Herrn Prof. Dr. Detlef Bahnemann danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Mein ganz besonderer Dank gilt unserem Arbeitsgruppen- und Technikumsleiter Dr. Sascha Beutel. Vielen Dank für die stetige Begleitung meiner Arbeiten von Anfang der Masterarbeit bis zum Ende meiner Promotion. Das Interesse an meinen Fortschritten, Ergebnissen und Präsentationen, sowie die nebenberuflichen Gespräche haben mir sehr geholfen.

Meinen weiteren Dank möchte ich Herrn Dr. Heinrich Buchholz von der Firma Biolac GmbH & Co.KG aussprechen. Danke für das große Interesse an der Bearbeitung des Projektes sowie die Bereitstellung von finanziellen Mitteln. Der fachliche Austausch und das Umfeld in den Projekttreffen waren immer sehr hilfreich. Ich danke zudem Herrn Oltmanns für die vielen freundlichen Telefonate und die Besichtigung der Firma Biolac.

Ich danke zudem Herrn Ludz Wilkening und Herrn Reinhard Finke von der Firma KWST GmbH für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere Herrn Finke möchte ich für die spannenden, gemeinsam geplanten und durchgeführten Experimente und gemeisterten Hürden im technischen Maßstab danken. Es war ein Erlebnis und es hat eine Menge Spaß gemacht. Schade, dass wir den Seed-Train nicht ans Ziel gebracht haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Martina Weiss und Martin Pähler. Wenn ein Gerät nicht mehr so funktionierte, wie es das bis vor 5 Minuten noch tat, dann war Martina jederzeit da. Liebe Martina, lieber Martin, danke für die Hilfe und für die interessanten Gespräche. Durch und von Euch habe ich einen Großteil meines jetzigen Laborwissens und das Handling für viele Geräte.

Ich danke Dr. Patrick Stolle für die mikrobiologische Untersuchung meiner Kulturen sowie die guten Tipps zur Stammhaltung.

Rene Frankfurter und Frau Prof. Dr. Vogt danke ich für Möglichkeit zur Messung der Kationenkonzentrationen mittels OES.

Lucienne Giesler und Herrn Prof. Dr. Berger danke ich dafür, dass ich die Elektrodialyse im Institut für Lebensmittelchemie benutzen durfte.

Meine Bachelor- und Schwerpunkt-Praktikanten Juri Böttcher, Bastian Quaas und Philipp Grünert danke ich dafür, dass sie mir in sonnigen Zeiten etwas mehr Freizeit ermöglicht haben und auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Danke euch Jungs.

Ich danke zudem Dr. Mike Büring und Dr. Ismet Bice für die vielen vielen coolen Gespräche und die Einführung in das Technikum. Von euch habe ich wohl am allermeisten gelernt. Im Technikum habe ich mich von Anfang an wohlfühlt, deswegen möchte ich auch noch meinen Vorgänger Dr. Christian Benecke sowie Dr. Christian Endres danken, von denen ich sicher auch viel mitbekommen habe. Außerdem danke ich auch Hilal Gürakin und Mehmet Ünal – geteiltes Leid ist halbes Leid.

Kai und Johanna danke ich für die guten Tipps zum richtigen Klang einer Dissertation.

Ich danke den Feinmechanikern Friedbert und Thorsten für die Herstellung diverser Sonderanfertigungen, sowie für die spaßigen Momente (beim Sommerfest), die saloppen Sprüche und die gemütlichen vor- und nachfeierabendlichen Biere. Ich danke außerdem Thorleif und Burghard für die stete Hilfe bei elektronischen, elektrotechnischen und steuertechnischen Problemen. Genauso danke ich Ivo und Michael für die schnellen Lösungen bei informatischen und computertechnischen Problemen. –Schickt die RISP mal endlich in Rente!

Ich danke meinen Büromitstreitern Dr. Andy, Marko, Alex und Janis.

Ein ganz besondere Dank geht an Patrick Jonczyk, der mich von Beginn meines Studiums bis Dato begleitet hat. Patrick, 7,5 Jahre haben wir Seite an Seite gekämpft. Jetzt beenden wir die Sache auch (fast) gemeinsam. Es war mir eine Ehre.

Des Weiteren danke ich meinen Studiums- und Arbeitskollegen Michael Meyer und Matthias Krätzig. -Wenn ich an den Party-Mittwoch, den Morgen danach oder die diversen Grillfeten denke, Hut auf!

Danke sagen möchte ich auch meiner Familie, die meine Launen, aber auch meine Euphorie immer aushalten mussten. Ich sage ganz ausdrücklich Danke zu meinem Vater Bernhard, der an mich geglaubt, mich gefördert, mich animiert und mich beruhigt hat – vor dem Studium, während des Studiums, während der Promotion und vermutlich wirst du es auch in Zukunft tun. Danke Papa! Auch meiner Mutter Anita möchte ich für ihr Verständnis, ihren Trost, ihre Wärme und ihre Motivation danken. Danke Mama. Auch meinen Geschwistern Philipp, Sara und Katharina möchte ich danken. Ihr ward immer für mich da und habt mich unterstützt und ausgehalten. Danke! Eine ganz besondere Freude und ein guter Ausgleich während des Studiums war Amy. Danke für die vielen schönen Wochenenden! Und auch Sam danke ich dafür, dass er immer so lieb und geduldig gewartet hat, wenn der Arbeitstag mal wieder sehr lang war. Sam, du bist der Coolste!

Mein letzter und innigster Dank gilt meiner Sweetie. Liebe Steffi, cool dass wir uns während meiner Promotion kennen gelernt haben! - 2 Jahre nach dir bin ich auch durch. Du bist die Allerbeste! Danke, dass wir so unendlich viel in so kurzer Zeit zusammen erlebt haben. - Obwohl das bei uns ja scheinbar normal ist. Mal sehen wie oft wir noch zusammen umziehen... So lange kennen wir uns zwar noch nicht, aber ich freue mich auf unsere Familie!!!!

Zu guter Letzt möchte ich noch meinen ganzen Freunden für die spaßigen Jahre danken. Jetzt wo ich durch bin, heben wir mal wieder richtig Einen. Ansonsten danke ich allen, die ich jetzt an dieser Stelle vergessen habe.

Danke!

für Leo

Inhalt

1	Einleitung	3
2	Aufgabenstellung	4
3	Theoretische Grundlagen	5
3.1	Molke – Aufkommen, Verarbeitung und Wertschöpfung	5
3.1.1	Aufkommen und Problematik.....	5
3.1.2	Technische Verarbeitung	6
3.1.3	Biotechnologische Verwertung von Molke und Molkenkonzentraten	8
3.1.3.1	Biotechnologische Gewinnung von Energieträgern aus Molke.....	9
3.1.3.2	Ethanolgewinnung aus Molke.....	9
3.1.3.3	Biogaserzeugung aus Molke	11
3.2	Bestehende und angestrebte Prozesskette	12
3.3	Biochemie von Hefen - Atmung und Gärung	13
3.3.1	Milchzuckerstoffwechsel	13
3.3.2	Metabolische Effekte von Hefen.....	16
3.4	Bewertungskriterien und Wachstumscharakteristika von Bioprozessen	17
4	Experimenteller Teil	19
4.1	Stoffliche Nutzung – Gewinnung von Biomasse aus TEM 30	19
4.1.1	Ausgangsbedingungen	20
4.1.2	Optimierung der Prozessbedingungen zur Biomassegewinnung.....	20
4.1.2.1	Zwischenfazit	28
4.1.3	Aufskalierung.....	28
4.1.3.1	Prozessüberwachung im Bioreaktor	30
4.1.3.2	Sauerstoffversorgung im technischen Maßstab	30
4.1.3.3	Biomassegewinnung vom Labormaßstab bis in den Kubikmetermaßstab .	34
4.1.3.4	Zweistufige Anzucht im Labormaßstab.....	35

4.1.3.5	Dreistufige Anzucht im Labormaßstab	36
4.1.3.6	Anzucht im Pilotmaßstab	37
4.1.3.7	Zwischenfazit	42
4.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Gewinnung von Biomasse aus TEM 30	42
4.2	Energetische Nutzung – Gewinnung von Ethanol aus TEM 30	44
4.2.1	Ausgangsbedingungen	44
4.2.2	Entsalzungsstrategien für TEM 30 und deren Auswirkung auf die alkoholische Gärung	46
4.2.2.1	Entsalzung mittels Nanofiltration	47
4.2.2.2	Entsalzung mittels Elektrodialyse	51
4.2.2.3	Weitere Entsalzungsmethoden	56
4.2.2.4	Zwischenfazit	57
4.2.3	Optimierung der Prozessbedingungen zur Ethanolgewinnung	57
4.2.3.1	Zwischenfazit	63
4.2.4	Aufskalierung	64
4.2.4.1	Zwischenfazit	66
4.2.5	Heferückführung: Das repeated batch-Verfahren	66
4.2.5.1	Zwischenfazit	68
4.2.6	Fed batch-Strategie zur Vergärung von TEM 30	68
4.2.7	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Ethanolgewinnung aus TEM 30	70
4.3	Aufstellung eines Gesamtkonzeptes	72
4.3.1	Übersicht	72
4.3.1.1	Rohstofflagerung und –aufbereitung	72
4.3.1.2	Stammhaltung und Lagerung	73
4.3.1.3	Auslegung der Verarbeitungsskalierung	74

4.3.1.4	Abwasserverwertung und Entsorgung	74
4.3.2	Bewertung und Bilanzierung der energetischen Nutzung von TEM 30	75
4.3.3	Alternative Prozessführungen - Erweiterung der bestehenden Verarbeitungskette von Molkenpermeat	75
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	77
6	Anhang	80
6.1	Teilentzuckertes Molkenkonzentrat (TEM 30).....	80
6.2	Verwendete Zellen	81
6.3	Verwendete Medien	82
6.4	Methoden	83
6.4.1	Lagerung der Hefestämme	83
6.4.2	Anzucht der Hefe	83
6.4.2.1	Anzucht im Schüttelkoben mit Schikanen	83
6.4.2.2	Anzucht im 2 L Bioreaktor	84
6.4.2.3	Anzucht im 10 L Bioreaktor	84
6.4.2.4	Anzucht im 50 L, 1.200 L und 1.700 L Bioreaktor	84
6.4.3	Bestimmung der Biomassekonzentration.....	85
6.4.4	Bestimmung des Milchzuckergehalts	86
6.4.5	Bestimmung des Ethanolgehalts	87
6.4.6	Aufkonzentrierung der Hefen	88
6.4.7	Vergärung von TEM 30 und anderen Lösungen.....	88
6.4.7.1	Vergärung im Schüttelkolben ohne Schikanen	89
6.4.7.2	Vergärung im 2 L, 10 L und 30 L Bioreaktor	89
6.4.7.3	Vergärung im 2.000 L Bioreaktor.....	89
6.4.8	Entsalzung von TEM 30 mittels Kationenaustauschern	90
6.4.9	Entsalzung von TEM 30 mittels Nanofiltration	90

6.4.10	Entsalzung von TEM 30 mittels Elektrodialyse	91
6.4.11	Bestimmung der Kationenkonzentration mittels optischer Emissionsspektrometrie	91
6.4.12	Rückgewinnung der Biomasse.....	93
6.5	Abkürzungsverzeichnis	94
6.6	Geräte und Laborausstattung	97
6.7	Verwendete Chemikalien	99
6.8	Verwendete großtechnische Reaktoren.....	100
6.8.1	50 L Blasensäulenreaktoren	101
6.8.2	2.000 L Blasensäulenreaktor	102
6.8.3	1.200 L Rührkesselreaktor	102
6.9	Verbrauchsmaterialien	103
6.10	Weitere Daten	104
6.10.1	Vergleich der Anzucht verschiedener <i>K. marxianus</i> -Stämme in TEM 30	104
6.10.2	Optimierung der Biomassegewinnung.....	105
6.10.3	Substrat- und Produkthemmung bei <i>K. marxianus</i> DSM 5422	112
6.10.4	Ethanolgewinnung in TEM 30 – Vergleich verschiedener <i>K. marxianus</i> -Stämme.....	112
6.10.5	Osmolarität verschiedener TEM 30-Verdünnungen	113
6.10.6	Teilentsalzung von TEM 30 mittels Ionenaustauschern	113
6.10.7	Optimierung der Ethanolgewinnung.....	114
7	Literaturverzeichnis.....	117

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Molkenproduktion und dessen ursprüngliche Verwertung (rot) [3].....	6
Abbildung 3-2: Stand der heutigen technischen Verarbeitung von Molke unter Rückgewinnung von Molkeproteinen und Milchzucker (blau), neben der klassischen Verwertung (rot).	7
Abbildung 3-3: Biotechnologische Verfahren zur Verwertung von Molke und milchzuckerhaltigen Restlösungen (grün), neben der klassischen (rot) und technischen Verarbeitung (blau) [3, 22, 27].....	8
Abbildung 3-4: Schema zur Prozesskette von Süßmolkenpermeat unter Verwertung des entstehenden Nebenproduktes zur Gewinnung von Bioenergieträgern. Blau hervorgehoben: Die in dieser Arbeit thematisierte Vergärung von TEM 30 zu Ethanol.....	13
Abbildung 3-5: Schematischer Verlauf der Milchzuckerverstoffwechslung [77].	14
Abbildung 3-6: Bildung und Regeneration von NAD ⁺ /NADH [77].	16
Abbildung 4-1: Hefeanzucht unter den ursprünglich aufgestellten Bedingungen (Schüttelkolben, TEM 30 (10% (v/v)), 100 mL Medium, 30 °C, pH 5,7, 150 rpm).	22
Abbildung 4-2: Wachstumscharakteristika der Hefe in verdünntem TEM 30 unter Variation des pH-Wertes (Schüttelkolben, 100 mL Medium 20% (v/v) TEM 30, 30°C, 150 rpm).	24
Abbildung 4-3: Wachstumscharakteristika der Hefe in verdünntem TEM 30 unter Variation der Temperatur (Schüttelkolben, 100 mL Medium 20% (v/v) TEM 30, pH 5,7, 150 rpm).	25
Abbildung 4-4: Wachstumscharakteristika der Hefe in verdünntem TEM 30 unter Variation der Schüttelgeschwindigkeit und der Temperatur (Schüttelkolben, 100 mL Medium 10% (v/v) TEM 30, pH 5,7).....	26
Abbildung 4-5: Wachstumscharakteristika der Hefe in verdünntem TEM 30 unter Variation der Anfangsbiomasse (Schüttelkolben, 100 mL Medium 20% (v/v) TEM 30, pH 5,7, 30 °C, 150 rpm).	27

Abbildung 4-6: Übersicht über die Teilstufen der Anzucht-kaskade.....	29
Abbildung 4-7: Wachstumscharakteristika der Hefe in TEM 30 (20% (v/v)) mit 0,1% (w/v) Hefeextrakt unter Variation der Rührerdrehzahl (Bioreaktor, 10 L Medium, pH 5,7, 37 °C).	31
Abbildung 4-8: Abgascharakteristika: CO ₂ -Produktionsrate (CPR), O ₂ -Transferrate (OTR) und respiratorischer Quotient (RQ).	32
Abbildung 4-9: Prozesscharakteristika der Hefeanzucht im 10 L Rührkesselreaktor (20% (v/v) TEM 30, 0,1% (w/v) Hefeextrakt, 2 vvm, 300 rpm).	35
Abbildung 4-10: Charakteristika zweier ausgewählter Prozesse zur Hefeanzucht im 50 L-Maßstab in 20% (v/v) TEM 30. Unter Zusatz von Hefeextrakt (HE).....	38
Abbildung 4-11: Charakteristika der Hefeanzucht im Kubikmetermaßstab in unterschiedlichen Reaktorarchitekturen: Rührkessel und Blasensäule.....	40
Abbildung 4-12: Schema der Entsalzung von TEM 30 mittels Nano-Diafiltration im Kreuzstrombetrieb.	48
Abbildung 4-13: Übersicht über die Kationenkonzentration von TEM 30 vor und nach der Nanofiltration, A: Kationenkonzentrationen, B: prozentuale Verminderung der Kationenkonzentrationen.	49
Abbildung 4-14: Vergärung von nanofiltriertem TEM 30, 100% TEM 30 und 65% (v/v) TEM 30 (Schüttelkolben, 200 mL Medium, 110 rpm, 30 °C, 0,8 g L ⁻¹ iBTM).....	50
Abbildung 4-15: Osmolarität von TEM 30 und der TEM 30-Klarphase nach Zentrifugation (8.000 x g), gemessen mittels Osmometer (K-7000, Knauer, Berlin).	52
Abbildung 4-16: Schema der Entsalzung der TEM 30-Klarphase mittels Elektrodialyse im Kreuzstrombetrieb.....	53
Abbildung 4-17: Übersicht über die Kationenkonzentration der TEM 30-Klarphase vor und nach der Elektrodialyse (durchgeführt in zwei unterschiedlich langen Entsalzungsprozessen), A: Kationenkonzentrationen, B: prozentuale Verminderung der Kationenkonzentrationen.	54

Abbildung 4-18: Vergärung von elektrodialysierten TEM 30-Medien und der TEM 30-Klarphase (Schüttelkolben, 200 mL Medium, 110 rpm, 30 °C, 0,8 g L ⁻¹ iBTM).....	55
Abbildung 4-19: Vergärung von TEM 30 in unterschiedlichen Konzentrationen (Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, 30 °C, pH 5,7, 0,8 g L ⁻¹ iBTM).....	59
Abbildung 4-20: Einfluss des pH-Wertes auf die Osmolarität von TEM 30.	60
Abbildung 4-21: Vergärung von 60% (v/v) TEM 30 bei Variation der Temperatur (<i>K. marxianus</i> DSM 5422, Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, pH 5,7, 1,1 g L ⁻¹ iBTM).	61
Abbildung 4-22: Vergärung von TEM 30 (60% (v/v)) unter Variation der initialen Biomassekonzentration (<i>K. marxianus</i> DSM 5422, Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, pH 5,7, 30 °C).....	62
Abbildung 4-23: Prozessdauer in Abhängigkeit von der Konzentration an zugesetztem Hefeextrakt (HE) bei der Vergärung von TEM 30 (60% (v/v)) (<i>K. marxianus</i> DSM 5422, Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, pH 5,7, 37 °C, 1,5 g L ⁻¹ iBTM).	62
Abbildung 4-24: Vergärung von TEM 30 (60 - 65%, v/v) in verschiedenen Skalierungsstufen (<i>K. marxianus</i> DSM 5422, pH 5,7, 30 °C, 1 g L ⁻¹ iBTM).....	65
Abbildung 4-25: Vergärung von 50% (v/v) und 60% (v/v) TEM 30 im repeated batch-Modus (<i>K. marxianus</i> DSM 5422, 300 mL Schüttelkolben, 110 rpm, pH 5,7, 30 °C, 1,1 g L ⁻¹ iBTM im 1. batch, bzw. 2 L Bioreaktor, 200 rpm, pH 5,7, 37 °C, 2,9 g L ⁻¹ iBTM im 1. batch).	67
Abbildung 4-26: Schema zur durchgeführten fed batch-Strategie.	69
Abbildung 4-27: Vergleich von batch- und fed batch-Strategie zur Vergärung von TEM 30 (<i>K. marxianus</i> DSM 5422, 10 L-Bioreaktor, 200 rpm, pH 5,7, 37 °C, 1,2 g L ⁻¹ iBTM).	69
Abbildung 4-28: Neustrukturierte Verarbeitungskette von Süßmolkenpermeat mit zwischengeschaltetem Entsalzungsschritt in Anlehnung an Abbildung 3-4.....	76
Abbildung 6-1: Korrelation zwischen der optischen Dichten und der Biotrockenmasse (BTM).	86

Abbildung 6-2: 50 L Blasensäulenreaktor; A & B: baugleiche Reaktoren, C: Deckel mit Sichtfenster und Versorgungsports, D & E: alter Begasungsring mit Bohrungen, F: neues Begasungssystem aus Sintermetallrohren.	101
Abbildung 6-3: 2.000 L Reaktor.	102
Abbildung 6-4: 1.200 L Rührkesselreaktor; A: Reaktor mit Rohrleitungen, B: Deckel und Rührwerk, C: Schrägblattrührer.	103
Abbildung 6-5: Wachstumscharakteristika der getesteten <i>K. marxianus</i> -Stämme (DSM 5422, DSM 70073 und CBS 6556) in TEM 30 (10% (v/v)) (Schüttelkolben, 200 mL Medium, 30 °C, 130 rpm, Zusatz: 0,1% (w/v) Hefeextrakt).....	104
Abbildung 6-6: Biomassentwicklung in unterschiedlichen TEM 30-Konzentrationen (Schüttelkolben, 100 mL Medium, 30°C, 150 rpm).	105
Abbildung 6-7: Wachstumscharakteristika der Hefe in unterschiedlichen TEM 30-Konzentrationen (Schüttelkolben, 100 mL Medium, 30°C, pH 5,7, 150 rpm).....	105
Abbildung 6-8: Wachstumscharakteristika der Hefe in verdünntem TEM 30 unter Variation des pH-Wertes (Schüttelkolben, 100 mL Medium TEM 30 (20% (v/v)), 30°C, 150 rpm).	106
Abbildung 6-9: Wachstumscharakteristika der Hefe in verdünntem TEM 30 unter Variation der Temperatur (Schüttelkolben, 100 mL Medium TEM 30 (20% (v/v)), pH 5,7, 150 rpm).	106
Abbildung 6-10: Vergleich des Einflusses der Temperatur auf $Y_{X/S}$ und $Y_{P/S}$	107
Abbildung 6-11: Wachstumscharakteristika der Hefe in verdünntem TEM 30 unter Variation der Schüttelgeschwindigkeit und der Temperatur (Schüttelkolben, 100 mL Medium TEM 30 (10% (v/v)), pH 5,7).	107
Abbildung 6-12: Spezifische Biomasse - und Ethanolausbeutefaktoren in verdünntem TEM 30 unter Variation der Schüttelgeschwindigkeit und der Temperatur (Schüttelkolben, 100 mL Medium TEM 30 (10% (v/v)), pH 5,7).	108

Abbildung 6-13: Wachstumscharakteristika der Hefe in verdünntem TEM 30 unter Variation der initialen Biomasse (Schüttelkolben, 100 mL Medium TEM 30 (20% (v/v)), pH 5,7, 30 °C, 150 rpm).....	109
Abbildung 6-14: Wachstumscharakteristika der Hefe in verschiedenen Medien unter Variation der Temperatur (Schüttelkolben, 100 mL Medium,150 rpm).....	110
Abbildung 6-15: Wachstumscharakteristika der Hefe in TEM 30 (20% (v/v)) unter Supplementierung von 0,1% (w/v) Hefeextrakt bei 30 °C und 37 °C (Rührkesselreaktor, 10 L Medium, pH 5,7, 300 rpm).	111
Abbildung 6-16: Vergärung von Komplexmedien mit unterschiedlichen Milchzuckerkonzentrationen: YMPL 100: 100 g L ⁻¹ (0,28 mol L ⁻¹); YMPL 150: 150 g L ⁻¹ (0,42 mol L ⁻¹); YMPL 200: 200 g L ⁻¹ (0,56 mol L ⁻¹); (Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, 30 °C, 0,35 g L ⁻¹ iBTM).	112
Abbildung 6-17: Fermentationscharakteristika unterschiedlicher <i>K. marxianus</i> -Stämme bei der Vergärung von TEM 30 (50% (v/v)) (Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, 30 °C, pH 5,7, 1,1 bzw. 1,4 g L ⁻¹ iBTM).	112
Abbildung 6-18: Osmolarität verschiedener TEM 30-Konzentrationen vor und nach einer 100 h dauernden Fermentation.	113
Abbildung 6-19: Teilentsalzung von TEM 30 mittels Kationenaustauscher: Durchbruchskurve der TEM 30-Klarphase (nach Zentrifugation, 10 min bei 8.000 x g), Austauschermaterial: Amberlite FPC 23 H (Dow Chemicals, Schwalbach).	113
Abbildung 6-20: Vergärung von TEM 30 (60% (v/v)) bei Variation des pH-Wertes (<i>K. marxianus</i> DSM 5422, Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, 30 °C, 0,8 g L ⁻¹ iBTM).	114
Abbildung 6-21: Vergärung von TEM 30 (60% (v/v)) bei Variation des Temperatur (<i>K. marxianus</i> DSM 5422, Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, pH 5,7, 1,1 g L ⁻¹ iBTM).	114
Abbildung 6-22: Vergärung von TEM 30 in unterschiedlichen Konzentrationen unter Variation der initialen Biomassekonzentration (<i>K. marxianus</i> DSM 5422, Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, pH 5,7, 30 °C).....	115

Abbildung 6-23: Vergärung von TEM 30 (60% (v/v)) unter Zusatz von Hefeextrakt in unterschiedlichen Konzentrationen (<i>K. marxianus</i> DSM 5422, Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, pH 5,7, 37 °C, 1,5 g L ⁻¹ iBTM).....	116
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Zusammensetzung der unterschiedlichen Molkentypen [2]:.....	5
Tabelle 4-1: Übersicht über die ausgewählten Prozessvariablen zur Optimierung der Anzuchtbedingungen.....	21
Tabelle 4-2: Optimierung der Anzuchtbedingungen: Übersicht über die ausgewählten Prozessvariablen und deren Effekte.	23
Tabelle 4-3: Übersicht über die Vergleichsgrößen (BTM, μ und $Y_{X/S}$) für die Biomassegewinnung in unterschiedlich verdünntem TEM 30.	24
Tabelle 4-4: Kaskade zur Biomasseproduktion im Labormaßstab bis 10 L.	37
Tabelle 4-5: Übersicht über die ausgewählten Prozessvariablen zur Optimierung der Anzuchtbedingungen.....	58
Tabelle 4-6: Optimierung der Ethanolgewinnung: Übersicht über die ausgewählten Prozessvariablen und deren Effekte.	60
Tabelle 6-1: Datenblatt zu TEM 30	80
Tabelle 6-2: Übersicht des Aminosäurespektrum in TEM 30	81
Tabelle 6-3: Technische Daten der HPLC.	87
Tabelle 6-4: Technische Daten des Gaschromatographen GC-2010 plus	87
Tabelle 6-5: Technische Daten des Gaschromatographen GC-14 b.....	88
Tabelle 6-6: Technische Daten des OES.....	92
Tabelle 6-7: Übersicht der Detektionswellenlängen der einzelnen Kationen im OES.	92

Tabelle 6-8: Übersicht zu den verwendeten Standards zur Quantifizierung der Kationenkonzentrationen im OES.....	92
Tabelle 6-9: Übersicht der Bewertungskriterien (Biomasse, $Y_{X/S}$, Ethanol, $Y_{P/S}$) nach 11 h bzw. 12 h für die Biomassegewinnung in verdünntem TEM 30 bei variierender Schüttelgeschwindigkeit und Temperatur.....	108
Tabelle 6-10: Übersicht der Bewertungskriterien (Wachstumsrate μ nach 12 h, μ_{\max} , Biomassekonzentration nach 12 h, $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$) für die Biomassegewinnung in verschiedenen Medien bei variierender Temperatur.....	111

Zusammenfassung

Die Herausforderung in der Molkereiindustrie ist die Verminderung der in großen Mengen anfallenden organisch belasteten Abwässer. Nach heutigem Stand der Technik lassen sich aus der Molke ein Teil der Proteine und des Milchzuckers zurückgewinnen. Das als Abwasser zurückbleibende teilentzuckerte Molkenkonzentrat (TEM 30, Trockenmasseanteil 30%) enthält mit etwa 18 % (w/v) Milchzucker und geringen Mengen an Protein (1 %) eine hohe organische Belastung. Durch eine industrielle biotechnologische Verwertung zu Bioenergieträgern kann eine weitere Wertschöpfung erfolgen und die Umweltbelastung gesenkt werden.

Die biotechnologische Verwertung erfolgt in zwei Stufen: In der ersten Stufe wird TEM 30 zur Gewinnung von mikrobieller Biomasse (Hefen der Spezies *Kluyveromyces marxianus*) eingesetzt. In der zweiten Stufe wird der in TEM 30 enthaltene Milchzucker mit den in der ersten Stufe produzierten Hefen zu Bioethanol umgewandelt.

Der optimierte Prozess zur Biomassegewinnung erfolgt in verdünntem TEM 30 (20% (v/v)), bei 37 °C und unter Zusatz von Hefeextrakt (0,1% (w/v)). Der Prozess verläuft vom Schüttelkolben- bis in den Kubikmetermaßstab (1.200 L) stabil und reproduzierbar, wobei Hefekonzentrationen $> 8 \text{ g L}^{-1}$ in $< 12 \text{ h}$ erreicht werden.

Eine Umsetzung zu Bioethanol ist aufgrund der hohen Salzfracht nur in TEM 30 mit verminderter Salzkonzentration möglich. Vorgeschaltete technische Entsalzungsverfahren sind entweder nicht praktikabel (Ionenaustauscher, Fällung) oder sehr aufwändig (Elektrodialyse, Nanofiltration), sodass eine Verdünnung des TEM 30 auf $< 65 \%$ die effizienteste Methode ist. Unter optimierten Prozessbedingungen (37 °C, Zusatz von Hefeextrakt) lassen sich in $< 70 \text{ h}$ $> 7,5 \text{ vol\%}$ Ethanol mit Ausbeuten $> 90\%$ produzieren. Der Prozess lässt sich im batch-Verfahren bis in den 2.000 L-Maßstab stabil reproduzieren. Durch eine Heferückführung kann eine halbkontinuierliche Prozessführung erreicht werden, welche im Labormaßstab erfolgreich angewendet wurde.

Aus den durchgeführten Experimenten zur Entwicklung und Optimierung der Biomasse- und zur Ethanolgewinnung in TEM 30, insbesondere im Kubikmetermaßstab, lassen sich wichtige Schlüsse ziehen, die den Grundstein für eine industrielle Nutzung bilden.

Schlagnworte: Molke, Molkenkonzentrat, Bioethanol, *Kluyveromyces*

Abstract

It is a challenge for the whey industry to decrease the large amount of organically contaminated wastewater. With today's state of the art some of the proteins and the lactose can be recovered from the whey. The remaining wastewater is comprised of partly desugared whey concentrate (TEM 30, with a dry matter of 30%) which contains a high organic load due to its lactose content of about 18 % and its low protein content (1%). An industrial biotechnological utilization by converting it into biofuels could lead to a further valorization and would reduce the environmental pollution.

The biotechnology utilization is performed in two steps: In the first step TEM 30 is used as a raw material for the production of biomass (yeast of the species *Kluyveromyces marxianus*). In the second step the lactose from TEM 30 is converted into bioethanol catalyzed by the yeast produced in the first step.

The optimized process for the biomass production is performed in diluted TEM 30 (20% (v/v)), at 37 °C, supplemented with yeast extract (0.1% (w/v)). The process is stable and reproducible from shake flask up to a cubic meter scale resulting in yeast concentrations of $> 8 \text{ g l}^{-1}$ in $< 12 \text{ h}$.

Due to the high salt loads a conversion into bioethanol is only possible in TEM 30 with reduced salt concentration. Technical desalination processes during the upstream are either inefficient (ionic exchange, precipitation) or very complex (electrodialysis, nanofiltration), thus a dilution of TEM 30 to $< 65\%$ is the method of choice. The optimized process conditions (37 °C and supplementation of yeast extract) result in $> 7.5 \text{ vol\%}$ of ethanol in $< 70 \text{ h}$ with a yield of $> 90\%$. The batch-process is reproducible up to a 2,000 l-scale. A semi-continuously process management can be achieved by yeast recirculation, which was successfully performed in lab-scale.

Important conclusions have been drawn on the basis of the performed experiments for the development and optimization of the biomass- and ethanol production in TEM 30, especially in cubic meter scale. These lead to a solid foundation and understanding of the entire process which can be used for an industrial application.

Keywords: whey, whey concentrate, bioethanol, *Kluyveromyces*

1 Einleitung

Die wachsende Weltbevölkerung und der steigende Energiebedarf großer Industriestaaten verknappen das Rohstoffangebot auf dem Weltmarkt. Dadurch steigen die Preise und die fossilen Energiequellen werden schneller aufgebraucht. Staaten wie z.B. Deutschland sind davon besonders betroffen, da sie auf den Import fossiler Energieträger beispielsweise für Kraftstoffe angewiesen sind. Alternativ lassen sich Kraftstoffe aus Reststoffen verschiedenster Produktionsbereiche herstellen. Dies würde Importländer wie Deutschland weniger abhängig vom Weltmarkt machen und zu einer Schonung der Umwelt führen.

In Deutschland fielen im Jahr 2012 in der Molkereiindustrie bei der Herstellung von Käse, Joghurt und Quark über 15 Mio. t Molke an. Dieses Restprodukt besteht zu über 93 % (v/v) aus Wasser und enthält zu etwa 5 % (w/v) Milchzucker und ernährungsphysiologisch wertvolle Eiweiße und Salze. Ein großer Teil der genannten Substanzen lässt sich technisch zurückgewinnen. Milchzucker wird hauptsächlich in der Nahrungsmittelindustrie verwendet und dient im Pharmabereich als Trägermaterial für Tabletten. Die Molkenproteine werden vorwiegend zur Herstellung von Molkereiprodukten verwendet. Am Ende der etablierten technischen Molkenverwertung bleibt teilentzuckertes Molkenkonzentrat als Restprodukt zurück, indem immer noch ein bedeutender Teil an Milchzucker enthalten ist. Dieses Restprodukt weist einen hohen organischen Anteil auf und wird zum großen Teil in der Landwirtschaft zur Mast und als Dünger eingesetzt oder im Abwasser entsorgt. Als Rohstoffquelle ist es bisher noch weitestgehend ungenutzt.

Die Gewinnung von Bioethanol und Biogas aus Molkerestströmen bietet interessante Ansätze. Die Entwicklung und Etablierung von Verfahren zur Verwertung von Reststoffen würde die Wertschöpfungskette von Milch bzw. Molke erweitern. Auf diese Weise könnten aus dem Naturprodukt Milch neben Käse, technisch gewonnenem Milchzucker und Molkenproteinen zusätzlich Energieträger gewonnen werden. Zudem ließe sich die organische Abwasserbelastung der Molkereiindustrie deutlich senken.

2 Aufgabenstellung

In dieser Dissertation soll die biotechnologische Verwertung von teilentzuckertem Molkenkonzentrat (TEM 30, 30% Trockenmasse) evaluiert werden. Ziel ist eine Verwertungsstrategie in zwei Stufen: In der ersten Stufe soll TEM 30 zur Gewinnung von mikrobieller Biomasse (Hefen der Spezies *Kluyveromyces marxianus*) erfolgen. In der zweiten Stufe soll der in TEM 30 enthaltene Milchzucker mit den produzierten Hefen zu Ethanol umgewandelt werden. Die Prozesse sollen zunächst jeweils im Labormaßstab optimiert werden. Der optimierte Prozess soll anschließend bis in den Kubikmetermaßstab als Pilotversuch getestet und reproduziert werden.

Diese Dissertation gliedert sich in drei Hauptteile. Im ersten Teil soll gezeigt werden, dass in TEM 30 eine schnelle Prozessführung zur Hefeanzucht möglich ist. Durch Variation der TEM 30-Konzentration, der Temperatur, des pH-Wertes, der Anfangsbiomassekonzentration, des Sauerstoffeintrags und durch Zusatz von Additiven soll die Biomassegewinnung optimiert werden. Anschließend sollen die Experimente aus dem Schüttelkolbenmaßstab bis in den Kubikmetermaßstab (1.700 L) übertragen und reproduziert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll der in TEM 30 enthaltene Milchzucker mittels Hefen zu Ethanol umgesetzt werden. Der Bioprozess zur Gewinnung von Ethanol wird erst durch eine Verminderung der Salzkonzentration im TEM 30 ermöglicht. Auf der einen Seite sollen technische Verfahren zur Teilentsalzung (insbesondere Nanofiltration und Elektrodialyse) getestet werden. Auf der anderen Seite soll eine Verminderung der Salzkonzentration durch eine Verdünnung erreicht werden. Durch Optimierung der TEM 30-Konzentration, des pH-Wertes, der Temperatur, der Hefekonzentration und durch Zusatz von Additiven sollen die Prozessdauer minimiert und der finale Ethanolgehalt maximiert werden. Die Prozessführung soll im batch-Ansatz, im fed batch-Ansatz und im repeated batch-Ansatz getestet werden. Unter optimierten Prozessbedingungen soll die Ethanolgewinnung bis in den Kubikmetermaßstab (bis 2.000 L) reproduziert werden.

Im dritten Teil sollen weitere Aspekte dargestellt werden, die die Aufstellung eines Gesamtkonzeptes ermöglichen.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Molke – Aufkommen, Verarbeitung und Wertschöpfung

Ausgehend von den aktuellen Herausforderungen der Molkereiindustrie (Abschnitt 3.1.1) sollen in den folgenden Abschnitten die heutigen Verarbeitungstechniken (Abschnitt 3.1.2) und mögliche biotechnologische Verwertungsstrategien (Abschnitt 3.1.3) dargestellt werden.

3.1.1 Aufkommen und Problematik

In der Molkereiindustrie fallen in Deutschland jährlich etwa 15 Mio. t Abwasser an, die sog. Molke [1]. Je nach Verarbeitungsweg wird zwischen Süßmolke, Sauermolke und Caseinmolke unterschieden, welche in der Zusammensetzungen variieren (siehe Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Zusammensetzung der unterschiedlichen Molkentypen [2].

	Süßmolke	Sauermolke	Caseinmolke
Nebenprodukt der Herstellung von	Käse	Frischkäse & Quark	Casein
Anteil am Molkenaufkommen	80%	20%	< 1%
Trockenmasse [% (w/v)]	6,20	5,70	6,10
Milchzucker [% (w/v)]	4,80	4,60	4,70
Proteine [% (w/v)]	0,75	0,30	0,50
Fette [% (w/v)]	0,05	< 0,01	< 0,01
Asche [% (w/v)]	0,60	0,08	0,90
pH-Wert	6,10	4,60	4,40

Die Entsorgung von Molke stellt wegen ihres hohen organischen Anteils ein Problem für die Umwelt dar. Bei der Käseherstellung beispielweise fallen pro kg Käse etwa 9 kg Süßmolke an [3]. Die Süßmolke enthält etwa 50% (w/v) des Milchzuckers, etwa 20% der Proteine (w/v) und etwa 55% (w/v) der Salze der Milch [4, 5]. Dieser hohe Anteil an organischem Material und der hohe Anteil an Salzen, wie Stickstoff- und Phosphatverbindungen, tragen stark zu einer Eutrophierung von Gewässern bei [6].

Eine Einleitung in das kommunale Abwassernetz ist nicht erlaubt. Bis heute wird die Molke zum größten Anteil (ca. 60%) als Dünger auf Felder ausgebracht oder in getrockneter Form als Tierfutter und Nahrungszusatz eingesetzt (siehe Schema in Abbildung 3-1) [6-10].

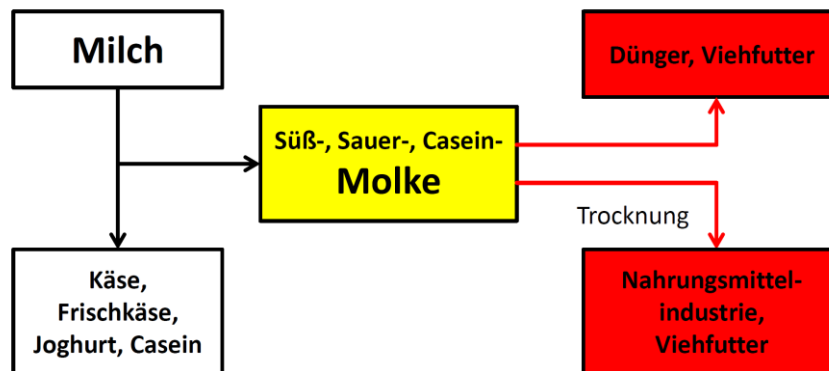


Abbildung 3-1: Molkenproduktion und deren ursprüngliche Verwertung (rot) [3].

Seit Beginn der 70er Jahre wurden die Verarbeitungsverfahren in der Molkereiindustrie mit dem Ziel, die Abwasserlast zu verringern, weiterentwickelt. Der gegenwärtige Stand der Technik (Abschnitt 3.1.2) reicht von der Rückgewinnung ernährungsphysiologisch relevanter Substanzen (wie Proteine und Milchzucker) bis hin zur energetischen Verwertung der anfallenden Abwässer. Die Abwasserlast nachhaltig zu vermindern bleibt dennoch eine aktuelle Herausforderung [2-5, 7, 9-12].

3.1.2 Technische Verarbeitung

Molke enthält mit Milchzucker und Molkenproteinen ernährungsphysiologisch wertvolle Substanzen. Milchzucker (Laktose), das Disaccharid aus β -1-4-glykosidisch gebundener D-Galaktose und D-Glukose, wird vor allem in der Nahrungsmittelproduktion (u.a. für Baby- und Kindernahrung, Schokoladen- und Fleischproduktion) sowie in der Arzneimittelproduktion (Trägersubstanz in Tabletten) verwendet [13]. Molkenproteine (verschiedene Albumine und Globuline), bzw. Molkenproteinkonzentrate werden ebenfalls hauptsächlich in der Nahrungsmittelproduktion (Molkereiprodukte, Functional Food und Kindernahrung) eingesetzt [14].

Für die technische Weiterverarbeitung wird die Rohmolke auf einen Feststoffanteil von 20 – 30% eingedickt (Verdampfer oder reverse Osmose), wodurch Molkenkonzentrate entstehen. Sowohl aus Rohmolke, als auch aus den Konzentraten werden die Molkenproteinkonzentrate gewonnen. Heute werden dafür vorrangig Membranverfahren wie die Ultrafiltration eingesetzt. Im Retentat sind die Molkenproteine angereichert, sodass sich Konzentrate mit variierendem Proteingehalt abtrennen lassen [3, 12].

Als zweite Fraktion bleibt das Molkenpermeat zurück, welches den Großteil des Milchzuckers, aber nur noch geringe Mengen an Protein enthält. Aus diesem Molkenpermeat lässt sich ein Teil des Milchzuckers gewinnen. Dazu wird das Permeat weiter eingedickt (Verdampfer oder reverse Osmose), wodurch sich ein Teil des Milchzuckers, nach Auskristallisation, abtrennen lässt [3, 12]. Der kristalline Milchzucker wird über weitere Prozessschritte gereinigt, sodass verschiedene Reinheitsgrade erreicht werden können. Zurück bleibt als Nebenprodukt der technischen Molkenverarbeitung die sog. Mutterlauge, ein teilenzuckertes Molkenkonzentrat. Dabei handelt es sich um eine übersättigte Milchzuckersuspension, aus der eine weitere Gewinnung von Milchzucker gegenwärtig zu unwirtschaftlich ist. Ein Schema zur technischen Verarbeitung von Molke zeigt Abbildung 3-2.

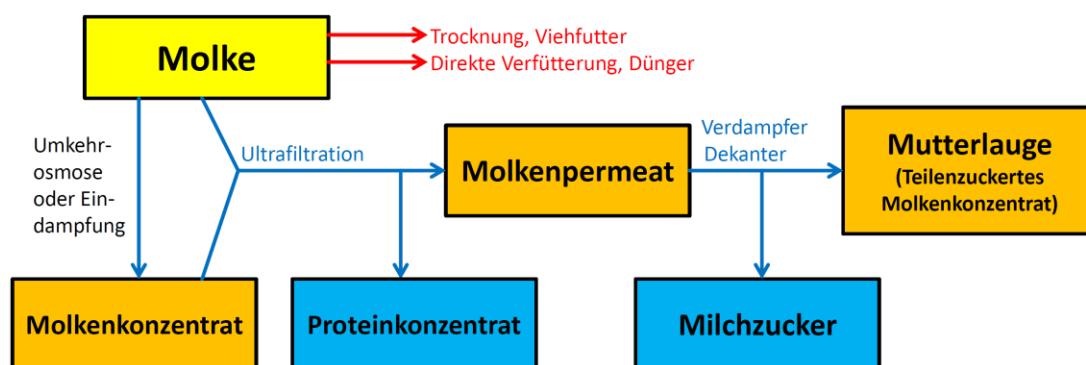


Abbildung 3-2: Stand der heutigen technischen Verarbeitung von Molke unter Rückgewinnung von Molkeproteinen und Milchzucker (blau), neben der klassischen Verwertung (rot).

Durch die technische Verarbeitung wird die Abwassermenge der Molkereien verringert. Eine kommunale Entsorgung der entstehenden Abwässer ist allerdings nicht möglich, da die organische Belastung trotz der erläuterten Verarbeitung zu hoch ist.

Die Abwässer müssen durch eine aufwändige Behandlung, bei der der organische Anteil gesenkt wird, aufbereitet werden. Da hierdurch kein weiterer Nutzen entsteht, gilt es alternative Verwertungsstrategien zu finden, um aus der anfallenden Mutterlauge die optimale Wertschöpfung zu erzielen. Dies kann durch eine biotechnologische Verwertung erfolgen, durch die beispielsweise eine Umsetzung der organischen Substanzen zu diversen nützlichen Produkten erfolgen kann (Abschnitt 3.1.3). So könnte die Abwasserbelastung bei gleichzeitiger Wertschöpfung gesenkt werden [2, 4, 6, 10-12, 15-18].

3.1.3 Biotechnologische Verwertung von Molke und Molkenkonzentraten

Generell lassen sich aus Molke zahlreiche biotechnologische Produkte gewinnen. Diese lassen sich grob in die Produktklassen Energieträger, organische Säuren, Enzyme, Lösemittel und Nährstoffe unterteilen [3, 5, 10, 11, 17-28]. Als Rohstoff für einen biotechnologischen Prozess können dabei verschiedene auf Molke basierende Medien eingesetzt werden. Ein generelles Schema ist in Abbildung 3-3 gezeigt.

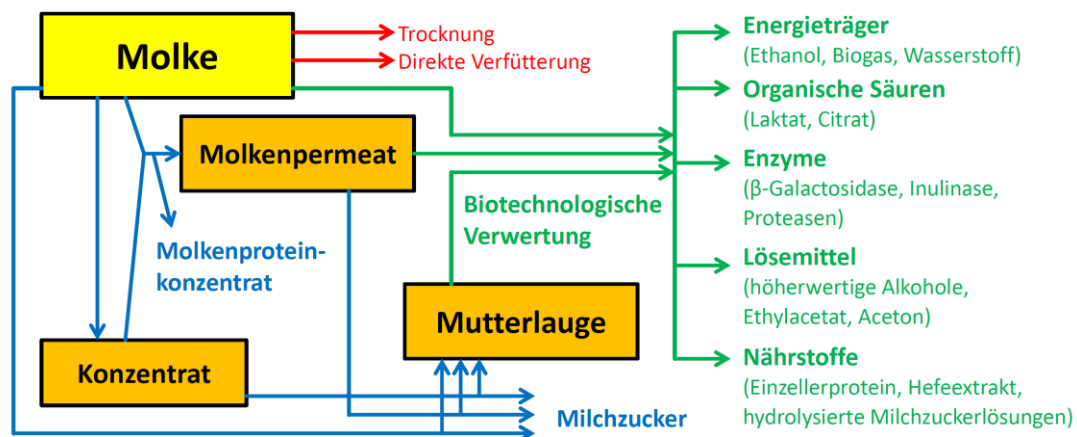


Abbildung 3-3: Biotechnologische Verfahren zur Verwertung von Molke und milchzuckerhaltigen Restlösungen (grün), neben der klassischen (rot) und technischen Verarbeitung (blau) [3, 22, 27].

Die im Verlauf der Molkenverarbeitung (Abschnitt 3.1.2) anfallenden Prozessfraktionen (Rohmolke, Molkenkonzentrat, Mutterlauge) unterscheiden sich vor allem im Feststoff-, im Zucker- und im Salzgehalt. Die Fraktionen eignen sich daher unterschiedlich gut für eine biotechnologische Umsetzung. Wertvolle, aus Molke herstell-

bare biotechnologische Produkte sind beispielsweise Ethylacetat [29-34] und Enzyme (β -Galactosidase, Inulinase) [17, 22, 35-37]. Produkte mit geringerem Wert sind u.a. Energieträger (siehe Abschnitt 3.1.3.1) oder organische Säuren. Milch und Molke bzw. deren Konzentrate weisen einen hohen Salzanteil auf. Technische Verfahren, die zu einer Teilentmineralisierung führen, können die anschließenden Prozesse der Milchzuckergewinnung und der biotechnologischen Verwertung hinsichtlich der Ausbeute und der Effektivität verbessern [6, 27, 38-43]. Eine maximale Wertschöpfung erreicht man in einer Verarbeitungskette, die zunächst über die technische und anschließend über die biotechnologische Verwertung geführt wird [27]. Im Rahmen der experimentellen Arbeiten (Abschnitt 4) soll ein Konzept für eine entsprechende Verwertungsstrategie entwickelt werden. Auf die zugrunde liegende Prozesskette wird in Abschnitt 3.2 näher eingegangen.

3.1.3.1 Biotechnologische Gewinnung von Energieträgern aus Molke

Die energetische Nutzung ist die geläufigste biotechnologische Verwertung von Molke und Molkenkonzentraten. Die bekanntesten fermentativen Verfahren im Bereich der Bioenergiegewinnung sind die Biogasproduktion und die Fermentation zu Ethanol. [2, 3, 5, 17, 18, 22, 44]. Des Weiteren wird auch die Gewinnung von Biowasserstoff und höherwertiger Alkohole aus Molke durchgeführt [45]. Die Bereitstellung von Biokraftstoffen aus regenerativen Rohstoffquellen und agrarischen Reststoffen ist Gegenstand der Forschung der letzten beiden Jahrzehnte, um fossile Rohstoffe einzusparen und die CO₂-neutrale Energieerzeugung zu erhöhen [46].

3.1.3.2 Ethanolgewinnung aus Molke

Das Substrat für die Ethanolgewinnung ist der in Molke enthaltenen Milchzucker. Milchzucker kann nur von bestimmten Mikroorganismen aufgenommen und zu Ethanol verstoffwechselt werden. Dazu zählen vor allem Hefen der Gattung *Kluyveromyces*, *Candida* und *Brettanomyces* [2, 7, 10, 15, 17, 26, 47-57]. Die beste Prozesseignung zeigen Hefen der Spezies *Kluyveromyces marxianus*, die auch industriell eingesetzt werden. Industriell etablierte Gärhefen wie *Saccharomyces cerevisiae*

oder *Schizosaccharomyces pombe*, sowie das Bakterium *Zymomonas mobilis* können Milchzucker hingegen nicht metabolisieren.

Grundsätzlich kann für die Ethanolgewinnung jede in der Molkenverarbeitung anfallende Prozessfraktion eingesetzt werden. Der Zuckergehalt von etwa 5% (w/v) in Rohmolke lässt allerdings nur geringe Ethanolgehalte zu (bis zu 3,4 vol%). Für die Fermentation besser geeignet sind deshalb Molkenkonzentrate mit Zuckergehalten von über 20% (w/v). Bei der Vergärung von Medien auf der Basis von Molkenpulver mit einem Milchzuckergehalt von etwa 20% werden Ethanolkonzentrationen von 10–12 vol% erreicht [15, 17, 58]. Je höher die finale Ethanolkonzentration ist, desto geringer ist der Aufwand und somit die Kosten für die destillative Rückgewinnung [15, 17, 58]. Die biotechnologische Ethanolgewinnung sollte daher erst nach der technischen Verarbeitung (siehe. 3.1.2) erfolgen, da Ethanol als Basischemikalie einen geringeren Marktpreis als Milchzucker erzielt, und auf diese Weise eine optimierte Wertschöpfungskette aufgestellt wird [9, 27].

Die industrielle Bioethanolgewinnung (Hauptrohstoffe dafür sind Futtergetreide und Zuckerrüben, > 99%) erfolgt grundsätzlich über folgende Schritte [59]:

- 1.) Rohstoffaufbereitung
- 2.) Fermentation
- 3.) Destillation (unter Abtrennung von Schlempe und ggf. Hefe)

In Deutschland gibt es bisher lediglich eine Firma, die großtechnisch Bioethanol aus Molkenkonzentraten herstellt (Firma Sachsenmilch Leppersdorf GmbH, Leppersdorf). Das angewendete Verfahren unterliegt aufgrund einer Prozessspezifität durch eine vorgeschaltete Kalziumphosphatabtrennung dem Patentschutz [9]. Die Produktionskapazität der Anlage (pro Jahr) beträgt ca. 8.000 Tonnen Bioethanol [60]. Andere Ländern, u.a. Irland, Neuseeland und die Schweiz, nutzen ebenfalls Molke und Molkenkonzentrate zur Ethanolherstellung [10, 17].

Die Wildtyp-Hefen der Gattung *Kluyveromyces* sind bedingt tolerant gegenüber hohen Ethanolkonzentrationen und hohem osmotischem Druck [4, 51, 53, 55, 56]. Daher werden verschiedene Ansatzpunkte verfolgt, um den Prozess zu verbessern. Etablierte Gärhefen können eingesetzt werden, wenn der Milchzucker in der Molke bzw. den

Molkenkonzentraten zuvor enzymatisch zu Glukose und Galaktose hydrolysiert wurde [61, 62]. Dazu muss das notwendige Enzym (β -Galactosidase bzw. Laktase) zugegeben werden, beispielsweise durch extrazelluläre Expression oder lysierte Hefezellen einer *Kluyveromyces*-Spezies [28, 63-66]. Eine Alternative zum Einsatz von Wildtyp-Hefen der Gattung *Kluyveromyces*, die den Milchzucker direkt verwerten können, ist der Einsatz rekombinanter Hefen. Dazu werden die fehlenden Gene zur Milchzucker-Verwertung in etablierte Hefen wie *S. cerevisiae* eingebracht oder Hybride aus *Kluyveromyces* und *Saccharomyces* erzeugt [4, 10, 15, 17, 50, 51, 57, 64, 67-70].

Die Ethanolbildung aus Milchzucker erfolgt über die Glykolyse, dem zentralen Prozess beim Abbau aller Kohlenhydrate bei Eukaryoten und zahlreichen Bakterien, und die alkoholische Gärung (vgl. Abschnitt 3.3.1). Dabei ergibt sich folgende Stöchiometrie:



Aus 1 Mol Milchzucker werden 4 Mol Ethanol und 4 Mol CO_2 gebildet. Bezogen auf die eingesetzte Masse können aus 1 g Milchzucker theoretisch maximal 0,538 g Ethanol gebildet werden. Der maximale Ausbeutekoeffizient beträgt dementsprechend $0,54 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \text{ g}^{-1}_{\text{Milchzucker}}$. Die in der Molke bzw. in den Molkenkonzentraten (5 - 20% (w/v)) enthaltene Zuckermenge ist somit ausschlaggebend für die erreichbare Ethanolmenge. In der Praxis sind Ethanolausbeuten von 85 - 90% der theoretisch möglichen Ausbeute erreichbar. Durch die Umsetzung der Kohlenhydrate und Abtrennung des Ethanols ist eine Verringerung der organischen Belastung um bis zu 65% erreichbar.

3.1.3.3 Biogaserzeugung aus Molke

Zur Biogaserzeugung wird ein Gemisch aus verschiedenen Bakterien eingesetzt, wodurch sich ein breites Verwertungsspektrum ergibt. Es können sämtliche organische Verbindungen samt Stickstoffkomponenten umgesetzt werden. Je nach Rohstoffquelle enthält Biogas bis zu 75% Methan, 25% CO_2 , sowie u.a. Wasserdampf, Stickstoff, Ammoniak und Wasserstoff [71]. Die Biogaserzeugung verläuft grundsätzlich über drei Teilschritte:

- 1.) Hydrolyse der Makromoleküle und Bildung von Gärprodukten wie Ethanol, höherwertige Carbonsäuren und Gasen;
- 2.) Bildung von Essigsäure;
- 3.) Umwandlung der Essigsäure in Methan durch *Archaeobakterien* [71].

Biogasanlagen sind hinsichtlich der Prozessführung bis zu einer bestimmten organischen Belastung ausgelegt, die kontinuierlich gehalten wird. Eine zu hohe Belastung führt zu einer Übersäuerung der Anlage. Insbesondere die essentiell wichtigen *Archaeobakterien* sind sensibel gegenüber hohen Säure- und Salzkonzentrationen. Daher sind der organische Anteil und die Salzkonzentration des Prozessmediums auf Molkenbasis die entscheidenden Prozessvariablen. Aus diesem Grund eignet sich vor allem Rohmolke zur Biogasgewinnung [2, 3, 18, 22, 26, 72, 73]. Des Weiteren ist auch eine Kofermentation von Molke mit anderen Rohstoffen (wie Gülle) möglich [72, 74, 75]. Bei der Umsetzung von Molke bzw. Molkenkonzentraten ist eine Verminderung der organischen Belastung erreichbar [17]. Nach heutigem Stand der Technik werden auch Destillationsrückstände aus der Ethanolherstellung (siehe Abschnitt 3.1.3.2) als Substrate in Biogasanlagen eingesetzt. Die Ethanol- und Biogasproduktion erfolgt auf diese Weise nacheinander in Reihe. Dadurch wird aktuell die nachhaltigste, maximal mögliche Wertschöpfung erzielt [2, 17, 18, 22, 28, 44].

3.2 Bestehende und angestrebte Prozesskette

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Rohstoff TEM 30 (Teil-Entzuckertes Molkenkonzentrat mit 30% Feststoffanteil, vgl. 6.1) zur Gewinnung von Biomasse (als Starterkultur) und von Bioethanol fällt nach technischer Verarbeitung als Nebenprodukt bei dem Molkenverarbeiter Biolac GmbH & Co. KG (Harbansen) jährlich mit über 50.000 t an [76]. Das TEM 30 wird bisher regional in Form von Dünger (Feldversprühung) oder als Silage für Tierfutter verbraucht. Eine weitere biotechnologische und/oder energetische Nutzung wird zurzeit nicht betrieben. Die experimentellen Arbeiten (Abschnitt 4) sind essenziell für die Erstellung eines Verwertungskonzeptes des Nebenproduktes hinsichtlich einer Verbesserung der Wertschöpfungskette.

Ein Schema der Wertschöpfungskette, aus dem das in dieser Arbeit verwendete TEM 30 hervorgeht, ist in Abbildung 3-4 dargestellt.

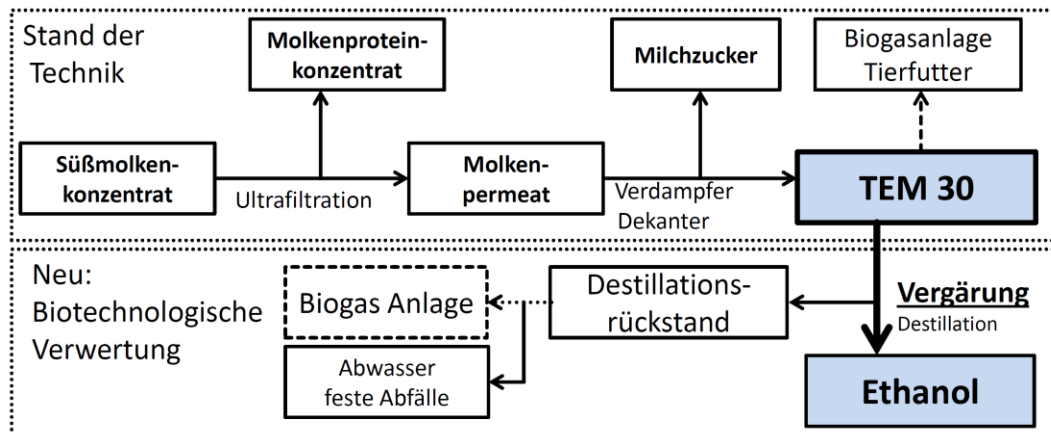


Abbildung 3-4: Schema zur Prozesskette von Süßmolkenpermeat unter Verwertung des entstehenden Nebenproduktes zur Gewinnung von Bioenergieträgern. Blau hervorgehoben: Die in dieser Arbeit thematisierte Vergärung von TEM 30 zu Ethanol.

3.3 Biochemie von Hefen - Atmung und Gärung

3.3.1 Milchzuckerstoffwechsel

Jeder Organismus ist darauf ausgerichtet, Energie zu erzeugen. Das erfolgt bei aeroben Organismen über die Atmungskette, in der Sauerstoff als Oxidationsmittel genutzt wird, um Kohlenhydrate wie beispielsweise den in der Molke enthaltenen Milchzucker zu metabolisieren. Aus den Kohlenhydraten entstehen dabei H_2O und CO_2 . Steht kein Sauerstoff zur Verfügung, werden die Reduktionsäquivalente auf anderen Wegen regeneriert, wobei Gärprodukte (z.B. Laktat oder Ethanol) entstehen. Die Metabolisierung von Milchzucker ist schematisch in Abbildung 3-5 dargestellt.

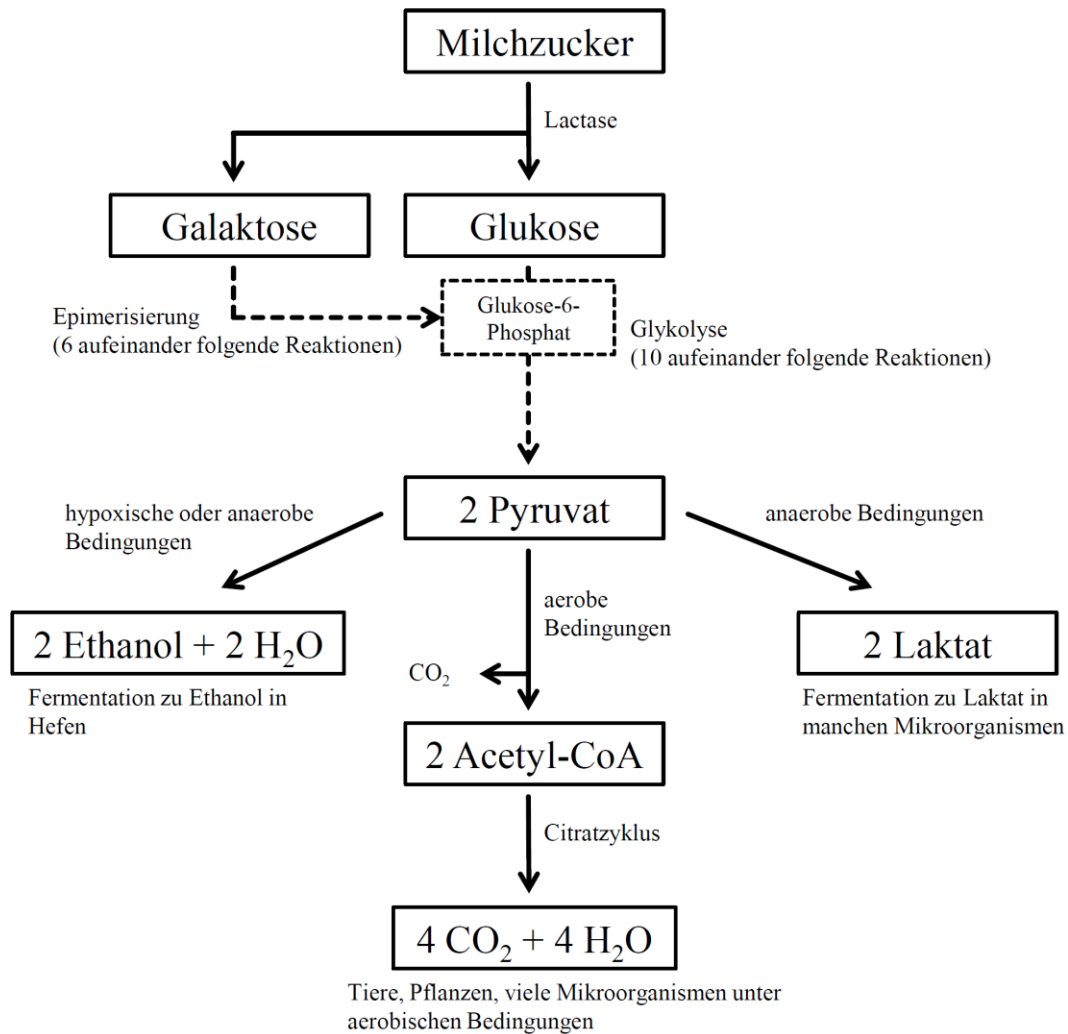


Abbildung 3-5: Schematischer Verlauf der Milchzuckerverstoffwechslung [77].

Nachdem der Milchzucker in die Zelle transportiert wurde, wird dieser durch das Enzym β -Galactosidase (Lactase) in Glukose und Galaktose gespalten. Über die Glykolyse wird Glukose und Galaktose, welche zuvor enzymatisch zu Glukose epimerisiert wird, zu Pyruvat umgesetzt. Pro Molekül Milchzucker fallen vier Moleküle Pyruvat an.

Verläuft die weitere Stoffwechslung unter aeroben Bedingungen, wird Pyruvat oxidativ decarboxyliert, wobei pro Pyruvat ein Acetyl-CoA durch Abspaltung von CO₂ entsteht. Im Citratzyklus wird das Acetyl-CoA zu H₂O und CO₂ umgesetzt. Dabei wird pro gebildetem CO₂ genau ein Molekül O₂ verbraucht. Durch die Stoffwechslung über die Glykolyse, den Citratzyklus und die Atmungskette kann die Zelle bzw. der Organismus die meiste Energie in Form von ATP gewinnen. Eine

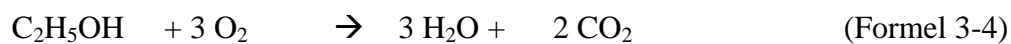
adäquate Sauerstoffversorgung ist für aerob wachsende Organismen die Voraussetzung für einen optimalen Biomassezuwachs. Bezogen auf ein Molekül Glukose ergibt sich dadurch folgende Summenformel:



Ist kein Sauerstoff verfügbar oder liegen hypoxische Bedingungen vor, wird Pyruvat über die Gärung verstoffwechselt. Dabei entsteht eine geringere Menge an Energie in Form von ATP als bei der aeroben Verstoffwechslung. Bezogen auf ein Molekül Glukose ergibt sich folgende Summenformel:



Wird hingegen Ethanol verstoffwechselt, werden pro gebildetem CO_2 Molekül stöchiometrisch 1,5 O_2 Moleküle verbraucht [25, 67, 78]. Dafür ergibt sich folgende Summenformel:



Die Summenformeln (Formel 3-2 bis 3-5) verdeutlichen das Verhältnis von O_2 -Verbrauch und CO_2 -Bildung bei jeder Art der Verstoffwechslung bzw. Reaktion. Dieses Verhältnis aus O_2 -Verbrauch und CO_2 -Bildung wird als respiratorischer Quotient (RQ) bezeichnet:

$$RQ = \frac{\text{CO}_2\text{-Bildungsrate (CPR)}}{\text{O}_2\text{-Verbrauchsrate (OTR)}} \quad (\text{Formel 3-5})$$

wobei $RQ < 1 \rightarrow$ Zellatmung;

$RQ > 1 \rightarrow$ Gärung.

In der Bioprozesstechnik, aber auch in der Medizin, hat sich diese Größe etabliert, um eine Aussage über den Zustand eines Bioprozesses, einer Zellpopulation oder eines ganzen Organismus zu treffen. Durch den RQ lässt sich beschreiben, ob der Stoff-

wechsel über die Atmung oder über die Gärung verläuft. Die O_2 -Verbrauchsrate und die CO_2 -Bildungsrate kann über die kontinuierliche Analyse der Abgaszusammensetzung des Bioprozesses gemessen werden. Der daraus berechnete RQ enthält notwendige Information über ablaufende Reaktionen im Bioprozess [25, 79, 80].

Organismen bzw. Zellen (u.a. auch Hefen) verhalten sich in gegebenen Bedingungen nicht immer gleich. So wird die Art des Stoffwechsels noch von weiteren Effekten bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.2).

3.3.2 Metabolische Effekte von Hefen

L. Pasteur beobachtete Mitte des 19. Jahrhunderts, dass der Zuckerverbrauch von *S. cerevisiae* unter anaeroben Bedingungen schneller verläuft als unter aeroben Bedingungen. Die beobachtete Stoffwechselcharakteristik ist eine der heute bekannten metabolischen Effekte, die für Hefen beschrieben sind. Tatsächlich beruht der Pasteur-Effekt darauf, dass der Stoffwechsel über den Citratzyklus ohne Sauerstoff inaktiv ist. Der hohe Bedarf an ATP muss somit anderweitig gedeckt werden. Das geschieht, indem die Glykolyse unter anaeroben Bedingungen verstärkt wird und schneller abläuft. Es wird sehr viel NADH gebildet. Das dadurch entstehende Pyruvat wird anschließend in Gärprodukte wie beispielsweise Ethanol oder Laktat umgewandelt (siehe oben, Formeln 3-4 und 3-5), wodurch NADH zu NAD^+ regeneriert wird (vgl. Abbildung 3-6) [25, 81-84].

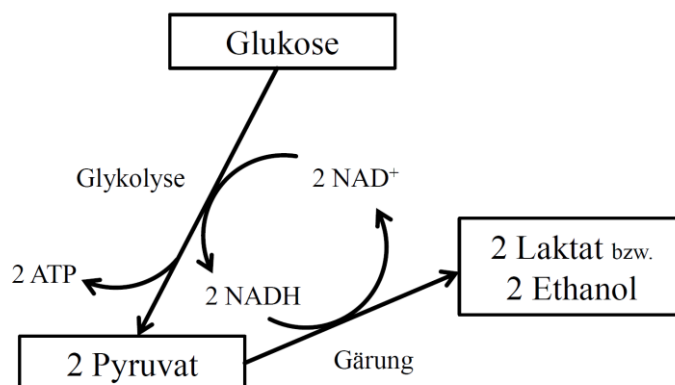


Abbildung 3-6: Bildung und Regeneration von $NAD^+/NADH$ [77].

Ein weiteres regulatorisches Phänomen ist die Glukose-Repression, die bei diversen Hefe-Spezies auftritt. Oft wird das Phänomen auch als Crabtree-Effekt bezeichnet, wobei sich die Effekte gleichen, die Ursachen aber andere sind. Der Effekt zeigt sich durch eine Hemmung der Zellatmung bei hohen Zuckerkonzentrationen. Die Glukose-Repression in Hefen unterliegt einer Repression der Gene für die Enzyme der Atmungskette. Der Effekt tritt beispielsweise bei *S. cerevisiae* bereits bei einer Glukosekonzentration von $0,1 \text{ g L}^{-1}$ auf, was dazu führt, dass ein Wachstum nur verlangsamt möglich ist. Der Crabtree-Effekt (beschrieben für menschliche Tumorzellen) hat als Auslöser eine niedrige ADP-Konzentration in den Mitochondrien, wodurch die Enzyme der Atmungskette gehemmt werden. [67, 78, 79, 81, 85-88].

Die Art des Stoffwechsels hat maßgeblichen Einfluss auf die Entwicklung der Hefepopulation, die Wachstumscharakteristik oder die Bildung von Metaboliten. Die Wachstumscharakteristik ändert sich mit Veränderung der Prozessbedingungen. Das lässt sich anhand verschiedener Vergleichsgrößen festmachen (siehe Abschnitt 3.4).

3.4 Bewertungskriterien und Wachstumscharakteristika von Bioprosessen

Die Variation von Prozessvariablen hat maßgeblichen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit bzw. -dauer sowie die finale Biomassekonzentration und -ausbeute. Zur Bewertung der Experimente wurden in dieser Arbeit die spezifische Wachstumsrate μ , der spezifische Biomasseausbeutefaktor $Y_{X/S}$ und der spezifische Ethanolausbeutefaktor $Y_{P/S}$ als Vergleichsgrößen herangezogen, die folgendermaßen definiert sind [80, 89]:

$$\mu = \frac{\ln(X_t) - \ln(X_0)}{t} \quad (\text{Formel 3-6})$$

mit μ = spezifische Wachstumsrate
 X_t = Biomassekonzentration zum Zeitpunkt t
 X_0 = Anfangsbiomassekonzentration
 t = Zeit

$$Y_{X/S} = - \frac{dX}{dS} \quad (\text{Formel 3-7})$$

mit $Y_{X/S}$ = spezifischer Biomasseausbeutefaktor
 dX = Änderung der Biomassekonzentration
 dS = Änderung der Substratkonzentration

$$Y_{P/S} = - \frac{dP}{dS} \quad (\text{Formel 3-8})$$

mit $Y_{P/S}$ = spezifischer Ethanolausbeutefaktor
 dP = Änderung der Ethanolkonzentration
 dS = Änderung der Substratkonzentration

Als Bewertungskriterium für die Ethanolgewinnung wird die Ethanolausbeute herangezogen, die sich folgendermaßen ergibt:

$$\text{Ethanolausbeute} = \frac{c_{\text{Ethanol}}}{0,54 * c_{0,\text{Milchzucker}}} * 100\% \quad (\text{Formel 3-9})$$

mit c_{Ethanol} = Ethanolkonzentration [g L⁻¹]
 $c_{0,\text{Milchzucker}}$ = Anfangsmilchzuckerkonzentration [g L⁻¹].

Die dargestellten Größen bilden werden für die Bewertung und den Vergleich der experimentell getesteten Prozessbedingungen verwendet (Abschnitt 4).

4 Experimenteller Teil

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die biotechnologische Verwertung von teilentzuckertem Molkenkonzentrat (TEM 30) evaluiert. Der in TEM 30 enthaltene Milchzucker sollte auf der einen Seite in Biomasse und auf der anderen Seite in Ethanol umgewandelt werden. Die Prozesse wurden jeweils im Labormaßstab optimiert und im Kubikmetermaßstab reproduziert. Die Überwachung der Prozesse erfolgte durch die Bestimmung der Biomasse, der Milchzuckerkonzentration, der Ethanolkonzentration, sowie durch Überwachung der Abgaszusammensetzung.

Im ersten Teil dieser Dissertation soll gezeigt werden, dass eine schnelle Prozessführung zur Biomassegewinnung möglich ist. Dabei werden zunächst die grundlegenden optimalen Prozessgrößen durch Variation der TEM 30-Konzentration, der Temperatur, des pH-Wertes, der initialen Biomassekonzentration und des Sauerstoffeintrags ermittelt. Durch den Einsatz wachstumsfördernder Substanzen wird das Prozessmedium optimiert. Anschließend werden die Experimente aus dem Schüttelkolbenmaßstab in den Reaktormaßstab (bis 1.700 L) übertragen. Durch die Biomassegewinnung wird das Inokulum für die Fermentation bereitgestellt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird die Ethanolgewinnung aus TEM 30 optimiert. Dazu wird zunächst eine mögliche Salzabreicherung zur Verminderung des osmotischen Drucks getestet. Die Teilentsalzung des TEM 30 wird mittels Ionenaustauschern, mittels Nanofiltration und mittels Elektrodialyse durchgeführt. Des Weiteren werden die Prozessgrößen für die Vergärung von verdünntem TEM 30 durch Variation des pH-Wertes, der Temperatur und der Biomassekonzentration optimiert. Durch Zusatz komplexer Nährstoffe sollte ein schnellerer Prozess ermöglicht werden. Die Prozessführung wird im batch-Ansatz, im fed batch-Ansatz und im repeated batch-Ansatz getestet. Unter optimierten Prozessbedingungen werden die durchgeführten Experimente als Pilotversuch bis in den Kubikmetermaßstab (bis 2.000 L) übertragen.

4.1 Stoffliche Nutzung – Gewinnung von Biomasse aus TEM 30

In diesem Teil soll gezeigt werden, welchen Bedingungen zu einer schnellen Biomassegewinnung führen.

4.1.1 Ausgangsbedingungen

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass TEM 30 sowohl als Rohstoff für die Biomassegewinnung als auch für die Ethanolgewinnung (siehe 4.2.1) eingesetzt werden kann [7]. TEM 30 enthält neben ca. 18% (w/v) Milchzucker einen hohen Anteil an Salz, welcher eine biotechnologische Verwertung zu Biomasse und Ethanol maßgeblich beeinflusst. Für die biotechnologische Verwertung von TEM 30 wurden ausgewählte *K. marxianus*-Stämme bereits getestet und bezüglich ihrer Prozesseignung charakterisiert [7]. TEM 30 konnte als Anzuchtmedium in einer Konzentration von bis zu 40% eingesetzt werden (entspricht 80 g L^{-1} Milchzucker). Die Zugabe von Diammoniumhydrogenphosphat, insbesondere bei hohen Substratkonzentrationen, erwies sich als wachstumsfördernd, wohingegen hohe Ethanolkonzentrationen (ab 8 vol%) wachstumshemmend sind. Grundlegend konnte gezeigt werden, dass sich TEM 30 als Rohstoff zur Biomasse- und Ethanolgewinnung eignet. Die Biomassegewinnung erfolgte dabei in verdünntem TEM 30 ohne jegliche Zusätze wie Substrat, Mineral- und Nährstoffe sowie ohne pH-Korrekturmittel.

Für die Anzucht der *K. marxianus*-Stämme DSM 5422 und DSM 70073 in TEM 30 wurden folgende Prozessbedingungen vorgegeben [7]:

- Kulturmedium: 10% (v/v) TEM 30 in Wasser
- Kultivierungstemperatur: 30 °C
- Belüftung: mindestens 0,5 vvm Luft, besser 1 vvm
- Kultivierungsdauer: 20 h
- Zusätze: Antischaummittel

4.1.2 Optimierung der Prozessbedingungen zur Biomassegewinnung

Im Rahmen der experimentellen Arbeiten wurden verschiedene *K. marxianus*-Stämme (6.2) getestet. Dabei konnte herausgestellt werden, dass die Stämme hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften und der Biomasseausbeuten nahezu identisch sind (Daten im Anhang unter 6.10.1). Im Rahmen dieser Arbeit wird daher ausschließlich

die Optimierung der Anzuchtbedingungen des *K. marxianus*-Stamms DSM 5422 gezeigt.

Als Grundmedium für die Optimierung wurde TEM 30 (Zusammensetzung siehe 6.1) verdünnt mit deionisiertem Wasser verwendet, wobei die Experimente im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt wurden. Zur Eindämmung von Fremdkeimen wurde eine Pasteurisation (Erwärmung auf 100 °C) durchgeführt. Die für die Optimierung ausgewählten Prozessvariablen und deren erwarteten Effekte auf den Prozess sind in Tabelle 4-1 gezeigt.

Tabelle 4-1: Übersicht über die ausgewählten Prozessvariablen zur Optimierung der Anzuchtbedingungen.

Prozessvariable	Erwartete Effekte
Anfangssubstratkonzentration / Verdünnung (iTEM)	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhung der finalen Biotrockenmasse (BTM)
pH-Wert (pH)	<ul style="list-style-type: none"> • Beschleunigter Prozess • Verhinderung einer Ethanolbildung
Anzuchttemperatur (T)	<ul style="list-style-type: none"> • Beschleunigter Prozess
Anfangsbiomassekonzentration (iBTM)	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhung der finalen BTM • Beschleunigter Prozess
Sauerstoffversorgung (O ₂ -Supply)	<ul style="list-style-type: none"> • Verhinderung einer Ethanolbildung (Verhinderung einer Sauerstofflimitierung)
Additive / wachstumsfördernde Substanzen (Ad)	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhung der finalen BTM • Erhöhung des Biomasseausbeutefaktors $Y_{X/S}$ • Beschleunigter Prozess

Unter den ursprünglich aufgestellten Bedingungen (10% TEM 30, 30 °C, 20 h) [7] ergaben sich nach 24 h folgende Vergleichsgrößen (Daten siehe Abbildung 4-1):

$$\begin{aligned} \text{BTM} &= 4,2 \text{ g L}^{-1} \\ \mu &= 0,35 \text{ h}^{-1} \text{ (nach 12 h)} \\ \mu &= 0,18 \text{ h}^{-1} \text{ (nach 24 h)} \\ Y_{X/S} &= 0,22 \text{ g}_{\text{Biomasse}} \text{ g}^{-1} \text{ Milchzucker} \end{aligned}$$

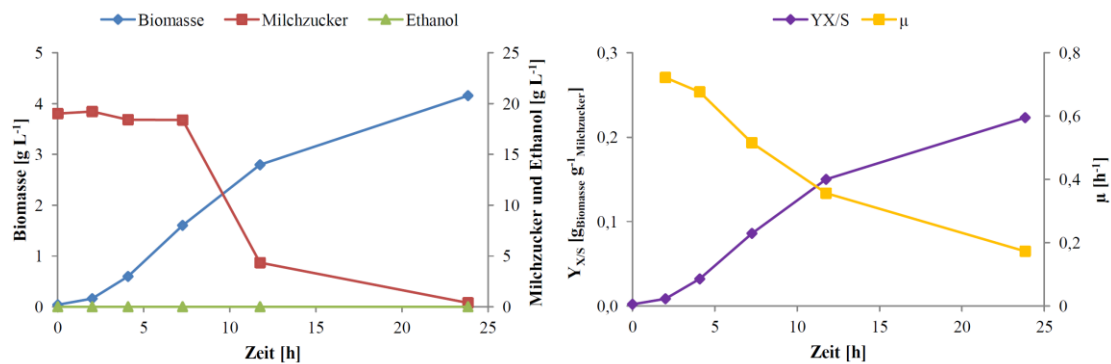


Abbildung 4-1: Hefeanzucht unter den ursprünglich aufgestellten Bedingungen (Schüttelkolben, TEM 30 (10% (v/v)), 100 mL Medium, 30 °C, pH 5,7, 150 rpm).

Bei der optimierten Biomassegewinnung wird eine schnelle Anzucht (< 15 h) unter hohen finalen Biomassekonzentrationen (> 8 g L⁻¹) angestrebt. Dazu wurden eine Vielzahl an Experimenten zur Optimierung der Anzuchtbedingungen durchgeführt (Daten befinden sich unter 6.10.2). Daraus lassen sich folgende Aussagen treffen:

- Nach 24 h ist kein starker Biomassezuwachs mehr zu verzeichnen, auch wenn sich noch Reste an Milchzucker im Medium befanden;
- Die exponentielle Phase des Hefewachstums ist in Abhängigkeit der Prozessführung nach spätestens 12 h abgeschlossen;
- Bei dem getesteten *K. marxianus*-Stamm DSM 5422 (ebenso wie bei DSM 70073) ist bei höheren TEM 30-Konzentrationen eine auffällig starke Ethanolbildung parallel zur Anzucht zu verzeichnen, die in einer optimierten Prozessführung verhindert werden sollte.

Eine Übersicht über die Ausgangsbedingungen, den Variationsbereich der Experimente und die optimierten Bedingungen ist in Tabelle 4-2 dargestellt.

Tabelle 4-2: Optimierung der Anzuchtbedingungen: Übersicht über die ausgewählten Prozessvariablen und deren Effekte.

Prozessvariable	Ausgangsbedingungen	Variationsbereich	Optimierte Bedingungen	Effekte
iTEM	10 % TEM 30 (~18 g L ⁻¹ Milchzucker)	5 – 100% TEM 30	20% TEM 30 (~36 g L ⁻¹ Milchzucker)	<ul style="list-style-type: none"> Anzucht nur in TEM 30 Konzentrationen < 50% möglich Erhöhte finale BTM: > 4 g L⁻¹ Aber: $Y_{X/S} < 0,13 \text{ g}_{\text{Biomasse}} \text{ g}^{-1} \text{ Milchzucker}$
pH	pH 5,7 (unverändert)	pH 4,5 – 7,0	pH 4,5	<ul style="list-style-type: none"> Keine parallele Bildung von Ethanol bei pH < 4,5 μ und $Y_{X/S}$ nahezu unabhängig vom pH
T	30 °C	28 – 42 °C	37°C	<ul style="list-style-type: none"> schnelleres Wachstum (μ) $Y_{X/S}$ unabhängig von T Aber: stärkere parallele Ethanolbildung
iBTM	ca. 0,1 g L ⁻¹	0,1 – 0,8 g L ⁻¹	> 0,4 g L⁻¹	<ul style="list-style-type: none"> verkürzte Anzuchtdauer Erhöhte finale BTM: > 5,5 g L⁻¹ Höherer $Y_{X/S} > 0,15 \text{ g}_{\text{Biomasse}} \text{ g}^{-1} \text{ Milchzucker}$
O₂-Supply	100 rpm	50 – 150 rpm	150 rpm	<ul style="list-style-type: none"> Adäquater O₂-Supply vermindert parallele Ethanolbildung Höhere T und guter O₂-Supply führen zu höherem $Y_{X/S}$
Ad	keine	Hefeextrakt (0,1%)	Hefeextrakt (0,1%)	<ul style="list-style-type: none"> Erhöhte finale BTM: > 9,0 g L⁻¹ Höherer $Y_{X/S} > 0,24 \text{ g}_{\text{Biomasse}} \text{ g}^{-1} \text{ Milchzucker}$ Kürzere Anzuchtdauer: < 15 h

Um die finale Biomasse zu erhöhen, muss TEM 30 stärker konzentriert eingesetzt werden, damit mehr Substrat vorliegt. Deshalb wird TEM 30 für die Optimierung in einer Konzentration von 20% eingesetzt. Nach 12 h ergeben sich dabei folgende Vergleichsgrößen:

$$\begin{aligned}
 \text{BTM} &= 3,2 - 3,7 \text{ g L}^{-1}, \\
 \mu &= 0,31 - 0,36 \text{ h}^{-1}, \\
 Y_{X/S} &= 0,12 - 0,13 \text{ g}_{\text{Biomasse}} \text{ g}^{-1} \text{ Milchzucker}.
 \end{aligned}$$

Bei der Anzucht in höher konzentriertem TEM 30 (> 40%) sanken μ und $Y_{X/S}$ ab. Bei der Anzucht in weniger konzentriertem TEM 30 (< 20%) wurden ähnliche Werte für μ (0,36 h⁻¹) und höhere Werte für $Y_{X/S}$ (> 0,22 g_{Biomasse} g⁻¹ Milchzucker) erreicht. Allerdings wurde nach 12 h aufgrund der geringen Anfangssubstratkonzentration

(< 20 g L⁻¹) eine geringere finale Biomassekonzentration (< 2,8 g L⁻¹ BTM) erreicht (vgl. Tabelle 4-3). Weitere Daten zur Variation der TEM 30-Konzentration befinden sich im Anhang (Seite 105, Abbildung 6-7).

Tabelle 4-3: Übersicht über die Vergleichsgrößen (BTM, μ und $Y_{X/S}$) für die Biomassegewinnung in unterschiedlich verdünntem TEM 30.

TEM 30 Konz. (v/v)	BTM (nach 12 h) [g L ⁻¹]	μ (nach 12 h) [h ⁻¹]	$Y_{X/S}$ (nach 12 h) [g _{Biomasse} g ⁻¹ _{Milchzucker}]
5%	2,6	0,36	0,28
10%	2,8	0,36	0,15
20%	3,7	0,36	0,13
30%	3,3	0,31	0,12
40%	2,9	0,33	0,11
50%	2,4	0,29	-

Durch eine Veränderung des pH-Wertes konnte im Rahmen der Experimente kein verbessertes Wachstum verzeichnet werden, sodass der natürliche pH-Wert von TEM 30 (pH 5,4 – 5,8) für die weitere Optimierung unverändert bleibt. Auffällig ist jedoch, dass bei einem pH-Wert von 4,5 nahezu kein Ethanol gebildet wird, während bei pH 5,7 im Maximum etwa 7 g L⁻¹ gebildet wurden. Durch eine Absenkung des pH-Wertes kann somit eine parallele Ethanolbildung verhindert werden. Die Biomasseentwicklung wird dabei von der parallelen Ethanolbildung nur sehr gering beeinflusst (vgl. Abbildung 4-2, weitere Daten zur Variation des pH-Wertes befinden sich im Anhang, Seite 106, Abbildung 6-8).

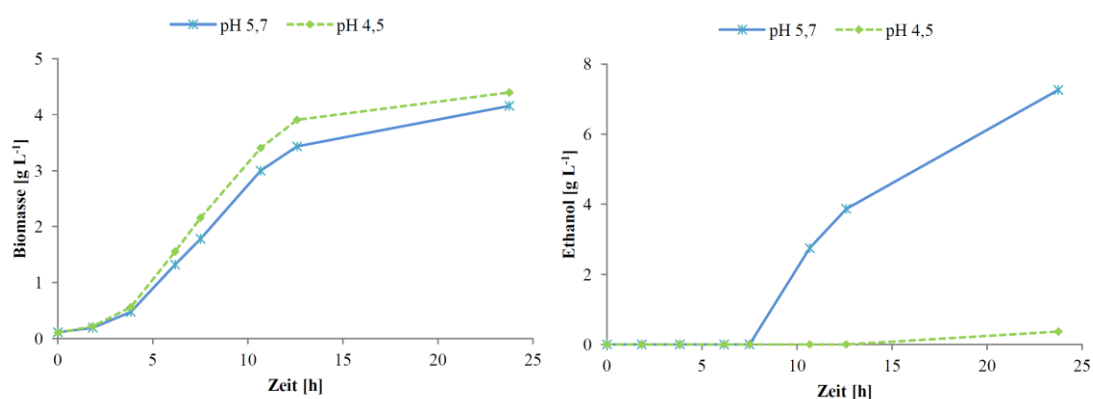


Abbildung 4-2: Wachstumscharakteristika der Hefe in verdünntem TEM 30 unter Variation des pH-Wertes (Schüttelkolben, 100 mL Medium 20% (v/v) TEM 30, 30°C, 150 rpm).

Eine geringe Steigerung des Wachstums, insbesondere in der Anfangsphase (0 - 7 h) konnte durch Erhöhung der Temperatur auf 37 °C erreicht werden. Nach 12 h ergeben sich dabei folgende Vergleichsgrößen:

$$\begin{aligned} \text{BTM} &= 3,9 \text{ g L}^{-1}, \\ \mu &= > 0,31 \text{ h}^{-1}, \\ Y_{X/S} &= 0,12 - 0,13 \text{ g}_{\text{Biomasse}} \text{ g}^{-1} \text{ Milchzucker}. \end{aligned}$$

Bei steigender Temperatur wird die parallele Ethanolbildung ebenfalls stärker bzw. sie setzt früher ein. Daraus lässt sich schließen, dass es bei höheren Temperaturen, zum Einen durch die verminderte Sauerstofflöslichkeit im Medium und zum Anderen durch den schneller laufenden Stoffwechsel, früher zu einer Sauerstofflimitierung kommt (vgl. Abbildung 4-3, weitere Daten zur Variation der Temperatur befinden sich im Anhang, Seite 106, Abbildung 6-9, bzw. Seite 107, Abbildung 6-10.).

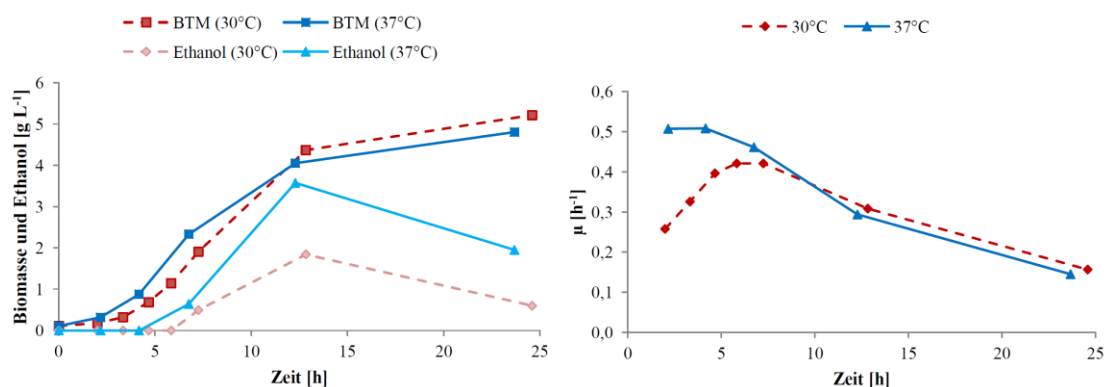


Abbildung 4-3: Wachstumscharakteristika der Hefe in verdünntem TEM 30 unter Variation der Temperatur (Schüttelkolben, 100 mL Medium 20% (v/v) TEM 30, pH 5,7, 150 rpm).

Eine adäquate Sauerstoffversorgung führte zu einer Erhöhung der finalen Biomassekonzentration und zu einer Verminderung der parallelen Ethanolbildung. In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine gute Sauerstoffversorgung insbesondere bei höheren Temperaturen (37 °C) zu einer höheren Biomasse (> 4,5 g L⁻¹ BTM) und dadurch zu einem höherem $Y_{X/S}$ (0,24 g_{Biomasse} g⁻¹ Milchzucker) führte (vgl. Abbildung 4-4, weitere Daten befinden sich im Anhang, Seite 107, Abbildung 6-11, bzw. Seite 108, Abbildung 6-12, bzw. 108, Tabelle 6-9).

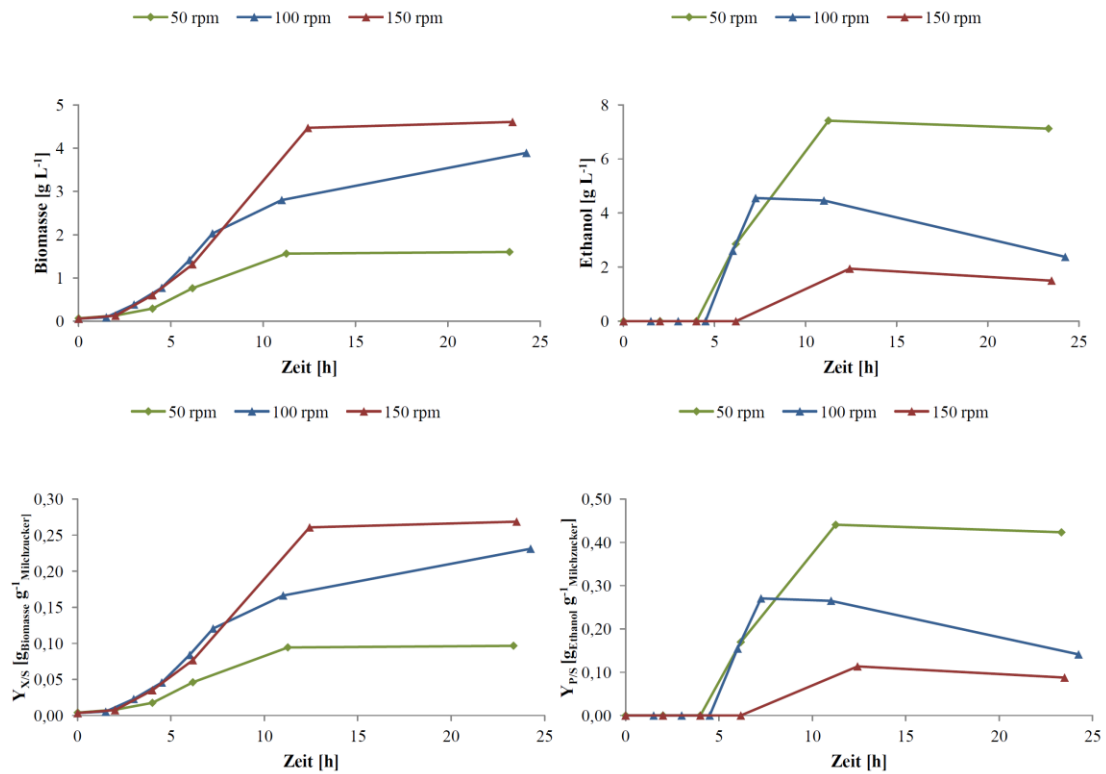


Abbildung 4-4: Wachstumscharakteristika der Hefe in verdünntem TEM 30 unter Variation der Schüttelgeschwindigkeit und der Temperatur (Schüttelkolben, 100 mL Medium 10% (v/v) TEM 30, pH 5,7).

Eine Verkürzung der Prozessdauer sowie eine Steigerung der finalen Biomassekonzentration konnten durch Erhöhung der Anfangsbiomassekonzentration erreicht werden. Dabei ergaben sich folgende Vergleichsgrößen:

$$\begin{aligned}
 \text{BTM} &= > 5,0 \text{ g L}^{-1} \\
 \mu &= 0,20 \text{ h}^{-1} \\
 Y_{X/S} &= 0,15 \text{ g}_{\text{Biomasse}} \text{ g}^{-1}_{\text{Milchzucker}}
 \end{aligned}$$

Bei einer Anfangsbiomassekonzentration von über 0,4 g L⁻¹ war der Milchzucker bereits nach weniger als 15 h vollständig aufgebraucht, was bei den bisher dargestellten Experimenten mit geringeren Anfangsbiomassekonzentrationen erst nach über 20 h geschah. Als weitere Effekte der höheren Anfangsbiomassekonzentrationen sind ein Abfall von μ und ein schnelleres Einsetzen der Ethanolbildung festzustellen.

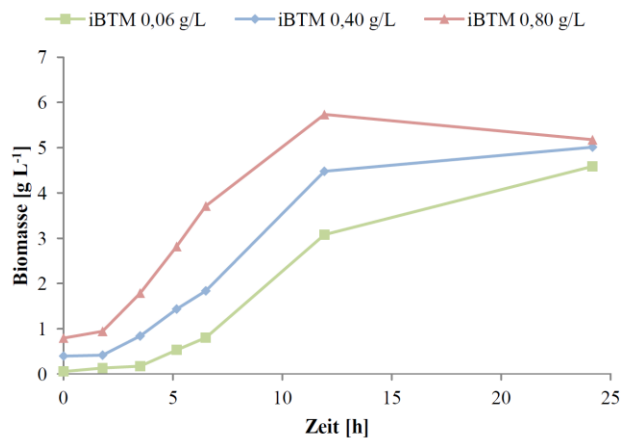


Abbildung 4-5: Wachstumscharakteristika der Hefe in verdünntem TEM 30 unter Variation der Anfangsbiomasse (Schüttelkolben, 100 mL Medium 20% (v/v) TEM 30, pH 5,7, 30 °C, 150 rpm).

Durch den Zusatz von Hefeextrakt (0,1% (w/v)) zu verdünntem TEM 30, einer höheren Temperatur (37 °C) und guter Sauerstoffversorgung konnte der Prozess zur Biomassegewinnung noch weiter optimiert werden. In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Hefen in anderen komplexen Medien mit Nährstoffquellen wie Hefeextrakt oder Pepton besser wachsen. Eine Supplementierung von TEM 30 mit Hefeextrakt führte zu einer Aufwertung des Mediums, was zu einem verbessertem Wachstum führte (Daten siehe Anhang, Seite 110, Abbildung 6-14). Als wachstumsfördernd erwiesen sich ebenfalls Soja-Pepton (0,3% (w/v)), Magnesiumsulfat (0,5% (w/v)) und Malzextrakt (0,3% (w/v)). Keine fördernde Wirkung zeigte dagegen der Zusatz von Ammoniumchlorid (0,1% (w/v)) und CaCl₂ (0,5% (w/v)).

Die optimierten Prozessbedingungen bilden die Grundlage für die Übertragung des Prozesses in den Großmaßstab. Dabei wurden im Reaktormaßstab (10 L Rührkessel) in weniger als 12 h folgende Vergleichsgrößen erreicht (Daten siehe Anhang, Seite 111, Abbildung 6-15):

$$\begin{aligned}
 \text{BTM} &= > 9,0 \text{ g L}^{-1}, \\
 \mu &= 0,33 \text{ h}^{-1}, \\
 Y_{X/S} &= 0,24 \text{ g}_{\text{Biomasse}} \text{ g}^{-1}_{\text{Milchzucker}}.
 \end{aligned}$$

4.1.2.1 Zwischenfazit

Die experimentell ermittelten optimierten Prozessvariablen führen in Kombination zu einer deutlichen Verkürzung der Anzuchtdauer mit höheren finalen Biomassekonzentrationen. Die Kombination aus Erhöhung der Temperatur (37 °C), Erhöhung der Anfangsbiomassekonzentration (0,4 g L⁻¹) und der Zusatz von Hefeextrakt (0,1% (w/v)) ist Voraussetzung für eine schnelle Anzucht und hohe Hefekonzentrationen. Eine Absenkung des pH-Wertes auf pH 4,5 führte zu minimaler Beschleunigung des Wachstums bei Verminderung der parallelen Ethanolbildung. Unter optimierten Bedingungen (20% TEM 30, 37 °C, 0,1% (w/v) Hefeextrakt, adäquate Sauerstoffversorgung) sind folgende Vergleichsgrößen als Benchmark im Vergleich mit den ursprünglichen Bewertungskriterien erreicht worden:

Bedingungen:	ursprünglich	optimiert
μ_{\max} [h ⁻¹]:	~ 0,60	> 0,56
μ (nach 12 h) [h ⁻¹]:	0,36	> 0,33
erreichte Biomasse [g L ⁻¹]:	ca. 2,5	> 9,0
$Y_{X/S}$ [g _{Biomasse} g ⁻¹ _{Milchzucker}]:	0,22 (nach 24 h)	> 0,24 (nach 12 h)
Anzuchtdauer:	> 20 h	< 15 h

4.1.3 Aufskalierung

Der im Labormaßstab entwickelte und optimierte Prozess zur Biomassegewinnung dient als Grundlage für eine großtechnische Prozessführung. Der Prozess sollte daher einfach handhabbar und schnell sein. Die Biomassegewinnung wurde dazu im Rahmen dieser Arbeit im Großmaßstab getestet. Die Anzucht wurde in einem Seed-Train durchgeführt. Die in den vorherigen Untersuchungen optimierten Prozessbedingungen wurden bis in den Kubikmetermaßstab aufskaliert. Die Hefe wurde von der Stammlagerung auf Agarplatten bis in den Kubikmetermaßstab (1.700 L) angezogen. Die Anzuchtstufen verliefen über Schüttelkolben (200 mL bzw. 100 mL), Rührkesselreaktor (10 L bzw. 2 L und 10 L), Blasensäulenreaktor (50 L) bis in den 1.700 L Blasensäulenreaktor bzw. alternativ bis in den 1.200 L Rührkesselreaktor (vgl. Abbildung 4-6).

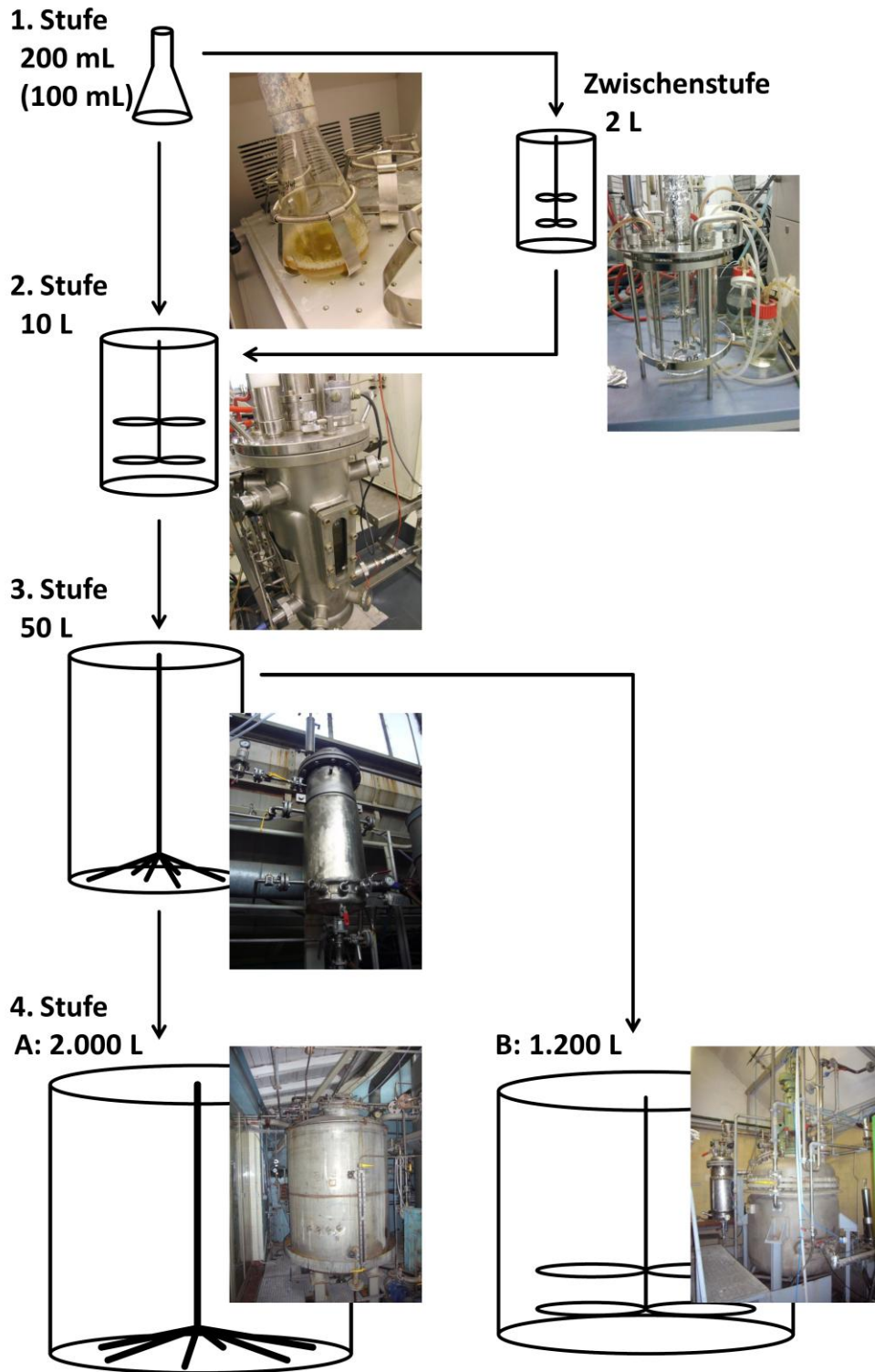


Abbildung 4-6: Übersicht über die Teilstufen des Seed-Trains.

4.1.3.1 Prozessüberwachung im Bioreaktor

Im Reaktormaßstab ergeben sich andere Herausforderungen als im Labormaßstab:

- online und offline Prozessüberwachung
- Sauerstoffversorgung
- Schaumbildung

Im Gegensatz zum Schüttelkolbenmaßstab hat man im Bioreaktor mehr Möglichkeiten, den Prozess zu überwachen. Wichtig ist die Analytik der gelösten Sauerstoffmenge (Sauerstoffsättigung). Dadurch werden beispielsweise eine Sauerstofflimitierung, eine Umstellung des Stoffwechsels oder die Erschöpfung der Substratquelle ersichtlich. Eine zweite wichtige Überwachungsmethode ist die kontinuierliche Analyse des Abgases, mittels welcher eine Aussage über den Zustand des Stoffwechsels der Hefen getroffen werden kann. Die Abgaszusammensetzung gibt Aufschluss darüber, welche Mengen an O_2 verbraucht und die Menge an CO_2 gebildet werden. Daraus lässt sich der Respiratorische Quotient (RQ) berechnen (vgl. 3.3.1, Formel 3-5). Aus dem Abgasverlauf und dem RQ ist eine Unterscheidung zwischen Atmung und Gärung und eine Umstellung des Stoffwechsels oder die Erschöpfung der Substratquelle direkt ablesbar. Sobald aufgrund der Substraterschöpfung kein Sauerstoff mehr verbraucht wird, steigt die Sauerstoffsättigung im Medium wieder an. Analog steigt der Sauerstoffanteil im Abgas wieder auf seinen Ausgangswert. Wird der Stoffwechsel hingegen auf ein anderes Substrat umgestellt, sodass ein diauxisches Wachstum entsteht, wird weiterhin Sauerstoff verbraucht. Der Übergang vom einen auf das andere Substrat ist somit im Verlauf zu erkennen. Beispielsweise wird bei der Metabolisierung von Ethanol mehr O_2 verbraucht als CO_2 entsteht (vgl. Formel 3-4, Seite 15):

$$OTR > CPR; RQ < 1.$$

4.1.3.2 Sauerstoffversorgung im Reaktormaßstab

Anhand der beschriebenen Analyse-Methoden lässt sich der Prozess leicht überwachen und bewerten. Analog zu den Experimenten im Schüttelkolbenmaßstab erfolgte eine Biomassegewinnung im labortechnischen Maßstab (10 L Rührkesselreak-

tor Biostat C, Sartorius, Göttingen). Dabei wurde die Rührerdrehzahl variiert, um den Einfluss der Sauerstoffversorgung zu evaluieren. Der Prozess wurde in TEM 30 (20% (v/v)) bei 37°C und einer Begasungsrate von 1 vvm Druckluft durchgeführt. Die wachsende Kultur wurde mittels eines pO₂-Sensor (Visiform™ DO, Hamilton, Höchst) und der Abgasanalytik (AO2020, ABB, Hamburg) überwacht. Die Rührerdrehzahl betrug 300 rpm und 500 rpm. Die Verläufe der Biomassekonzentration, des Milchzuckers, der parallelen Ethanolbildung und der Gelöstsauerstoffmenge sind in Abbildung 4-7 dargestellt.

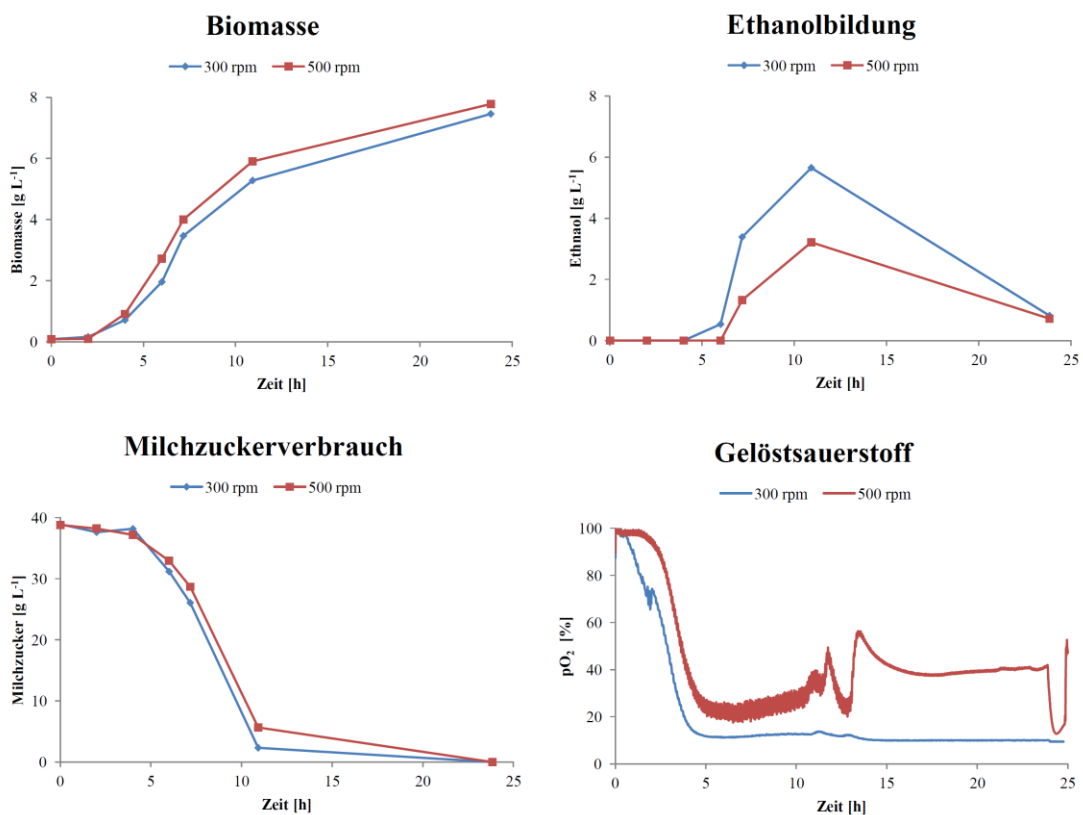


Abbildung 4-7: Wachstumscharakteristika der Hefe in TEM 30 (20% (v/v)) mit 0,1% (w/v) Hefeextrakt unter Variation der Rührerdrehzahl (Bioreaktor, 10 L Medium, pH 5,7, 37 °C).

Analog zu den in Abschnitt 4.1.2 dargestellten Ergebnissen wirkt sich die Sauerstoffversorgung nur gering auf die Biomasseentwicklung aus. Die Verläufe der Anzucht bei 300 rpm und 500 rpm sind somit sehr ähnlich. Bei einer Rührerdrehzahl von 300 rpm wurde allerdings mehr Ethanol gebildet. Die Gelöstsauerstoffmenge sank bei Anzucht unter einer Rührerdrehzahl von 300 rpm schneller als bei 500 rpm. Das be-

deutet, die Hefen unterliegen nach etwa 4 h bzw. 6 h einer Sauerstofflimitierung. Zudem erkennt man an einem Ausschlag im Verlauf des pO_2 -Wertes die Erschöpfung des Milchzuckers nach etwa 12 h. Es erfolgt eine Umstellung des Substrates auf Ethanol, wodurch ein diauxisches Wachstum entsteht (aufgrund geringer offline Datendichte aus Daten nicht ersichtlich). Nach 24 h ist kein Substrat mehr vorhanden. Die Umstellung des Stoffwechsels ist ebenfalls im Abgasverlauf wiederzufinden. Der Verlauf der Abgaszusammensetzung und der daraus berechnete RQ ist exemplarisch in Abbildung 4-8 dargestellt.

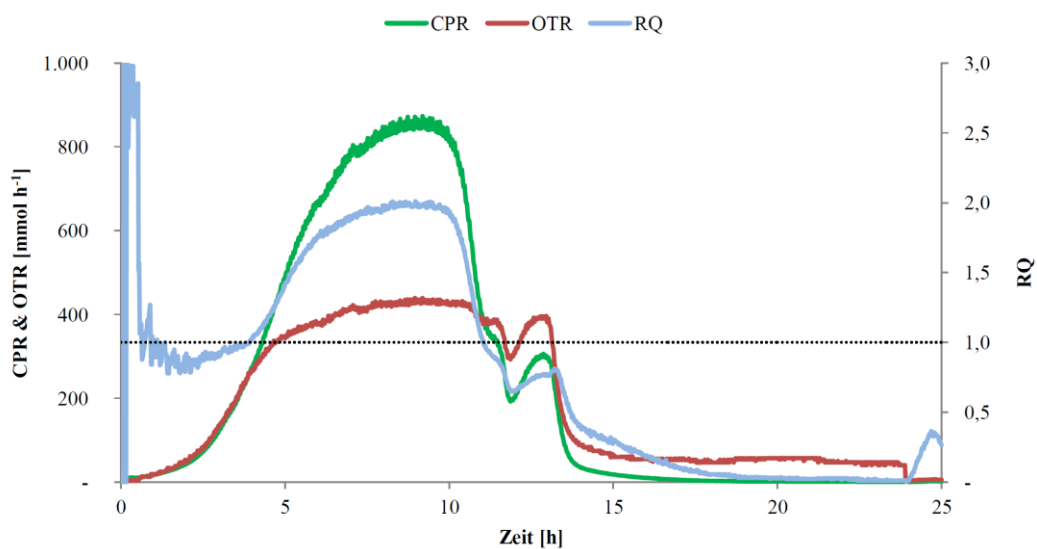


Abbildung 4-8: Abgascharakteristika: CO_2 -Produktionsrate (CPR), O_2 -Transferrate (OTR) und respiratorischer Quotient (RQ).

Mit Erreichen der Sauerstofflimitierung nach 4 h bzw. 6 h steigt der RQ über den Wert 1. Daran lässt sich erkennen, dass mehr CO_2 gebildet als O_2 verbraucht wird.

$RQ > 1$; $CPR > OTR \rightarrow$ Die Gärung ist stärker als die Atmung.

Durch eine weitere Erhöhung des Sauerstoffeintrags über die Rührerdrehzahl ließe sich die Sauerstofflimitierung verzögern. Des Weiteren lässt sich auch direkt anhand der Abgaszusammensetzung erkennen, wann das Substrat aufgebraucht ist. Nach 12 h fällt die OTR ab, steigt wieder kurz an (1,5 h) und fällt dann weiter ab. In der Senke

ist der Milchzucker aufgebraucht und das Substrat wird von Milchzucker auf Ethanol umgestellt.

Die Verläufe der Biomassekonzentration waren bei den gewählten Rührgeschwindigkeiten über die Prozessdauer nahezu gleich. Daraus lässt sich schließen, dass eine Sauerstoffunterversorgung nicht zu Einbußen bei der Biomassebildung führt, was die Ergebnisse im Schüttelkolbenmaßstab bestätigt (vgl. 4.1.2).

Der Sauerstoffeintrag ist in erster Linie von der Art bzw. der Architektur des Reaktors abhängig. So ist der Sauerstoffübergang von der Gasphase in die Flüssigphase, quantifizierbar mittels K_{La} -Wert, die entscheidende Größe. Der K_{La} -Wert ergibt sich aus dem Stoffübergangskoeffizient K_L (stoffspezifisch, nicht bestimmbar) und der Übergangsfläche der Gasphase, also der Gasblasen a (schwierig zu bestimmen). Die Übergangsfläche der Gasphase ist abhängig von der Größe der Gasblasen. Bei einem identischem Gasvolumen führen viele kleine Blasen zu größeren K_{La} -Werten als wenige große Blasen. Der K_{La} -Wert der Rührkesselreaktoren ist deutlich größer als der der einfachen Blasensäulen [80, 89, 90]. Das beruht darauf, dass die Blasen durch die Rührblätter zerschlagen, also verkleinert werden und durch die starke Durchmischung und Rückvermischung sehr lange im Medium gehalten werden. Kleinere Blasen haben zudem einen langsameren Auftrieb als größere Blasen [91].

In Rührkesselreaktoren, die hohe Drehzahlen erreichen können, ist eine gute Sauerstoffversorgung unproblematisch. Kritische Punkte dieser Reaktortypen sind Scherstress (unproblematisch für die verwendeten Hefen) und eine stärkere Schaumbildung. Durch Zusatz von Antischaummittel kann einer Schaumbildung vorgebeugt werden. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das verwendete Mittel nicht toxisch für die Hefen ist oder in einer zu hohen Konzentration eingesetzt wird, da das den K_{La} -Wert drastisch senken würde [80].

In Reaktoren ohne Rührwerk gestaltet sich der Sauerstoffeintrag etwas schwieriger. Entscheidend ist die Durchströmungsfläche, die wiederum vom Reaktordurchmesser abhängt. Je dünner und höher der Reaktor ist, desto größer ist der K_{La} -Wert [80].

Um eine adäquate Sauerstoffversorgung in den verwendeten Blasensäulenreaktoren im Großmaßstab (50 L und 1.700 L) zu gewährleisten, wurden zwei Lösungsansätze verfolgt:

- 1.) Erhöhung des Lufteintrags.
Problem: Mit steigendem Reaktorvolumen werden sehr große Gebläseleistungen notwendig
- 2.) Modifikation der Begasungseinheit: Installation einer Begasungseinheiten (Gasspargern) aus Sintermetall.
Problem: Möglicher Druckverlust im Reaktor und stärkere Schaumbildung.

4.1.3.3 Biomassegewinnung vom Labormaßstab bis in den Kubikmetermaßstab

Die Aufskalierung erfolgte in einem Seed-Train vom Schüttelkolben (200 mL), Rührkesselreaktor (10 L), Blasensäulenreaktor (50 L) bis in den 1.700 L Blasensäulenreaktor bzw. in den 1.200 L Rührkesselreaktor (vgl. Abbildung 4-6, Seite 29). Ziel dabei ist eine Hefeproduktion von über 10 g L^{-1} im Kubikmetermaßstab in einer möglichst kurzen Prozessdauer. Eine Bereitstellung möglichst hoher Hefekonzentrationen im Kubikmetermaßstab ist Voraussetzung für eine großtechnische Vergärung von TEM 30 (Abschnitt 4.2.4).

Um die bestmögliche Prozessführung und hohe Biomassekonzentrationen in jeder Stufe zu erreichen, werden in jeder Stufe folgende Bedingungen gewählt:

TEM 30 Konzentration:	20% (v/v) ($\sim 40 \text{ g L}^{-1}$ Milchzucker)
pH-Wert:	unverändert (pH 5,7)
Temperatur:	30 °C bzw. 37 °C
Initiale Biomasse:	$> 0,5 \text{ g L}^{-1}$ (hohe Biomasse in Vorstufe)
Additiv:	0,1% (w/v) Hefeextrakt (HE)
Sauerstoffversorgung:	Schüttelkolben: hohe Schüttelgeschwindigkeit Rührkesselreaktor: $> 1 \text{ vvm}$ Druckluft, $> 300 \text{ rpm}$ Blasensäulenreaktor: $> 1,5 \text{ vvm}$ Rührkesselreaktor (Großmaßstab): 130 rpm
Antischaummittel:	$0,1 \text{ mL L}^{-1}$ Tego KS 911 (nicht im Schüttelkolben)
Rohstoffaufbereitung:	Teilentkeimung (1 min $> 100 \text{ °C}$ bzw. 5 min $> 85 \text{ °C}$)
Inokulation:	Sterilisierung durch Oberflächendesinfektion und Flammenkegel

4.1.3.4 Zweistufige Anzucht im Labormaßstab

Als Starterkultur für die Reaktorkaskade diente eine im Schüttelkolben (200 mL) angezogene Hefekultur. In dieser Stufe wurde aufgrund der Anfälligkeit für Kontaminationen autoklaviertes Medium (YMPL 20, siehe 6.4.2) verwendet. Die Inokulation erfolgte aus einer Lebendkultur von einer Agarplatte (siehe. 6.4.1). Die Kultur wurde über Nacht bei 30 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 150 rpm angezogen. Nach etwa 17 h wurde eine Biomasse zwischen 4 – 6 g L⁻¹ erreicht. (Der Verlauf ist analog zu den in Abbildung 6-14, Abschnitt 6.10.2, dargestellten Experimenten).

In der 2. Stufe wurde die frische Hefekultur (200 mL) in einen 10 L Rührkesselreaktor (Sartorius, Göttingen) als Inokulum eingebracht. Die Anzucht erfolgte bei 37 °C in TEM 30 (20% (v/v)) unter Supplementierung von Hefeextrakt (0,1% (w/v)). Die Sauerstoffversorgung erfolgte (in diesem Fall) durch 2 vvm Druckluft und durch eine Rührerdrehzahl von 300 rpm. Die wachsende Kultur wurde mittels pO₂-Sensor (Visiferm™ DO, Hamilton, Höchst) und Abgasanalytik (S 710, Sick, Hamburg) überwacht. Durch Zusetzen von Antischaummittel (1 mL) sollte einer Schaumbildung vorgebeugt werden. Die Prozesscharakteristik ist in Abbildung 4-9 dargestellt.

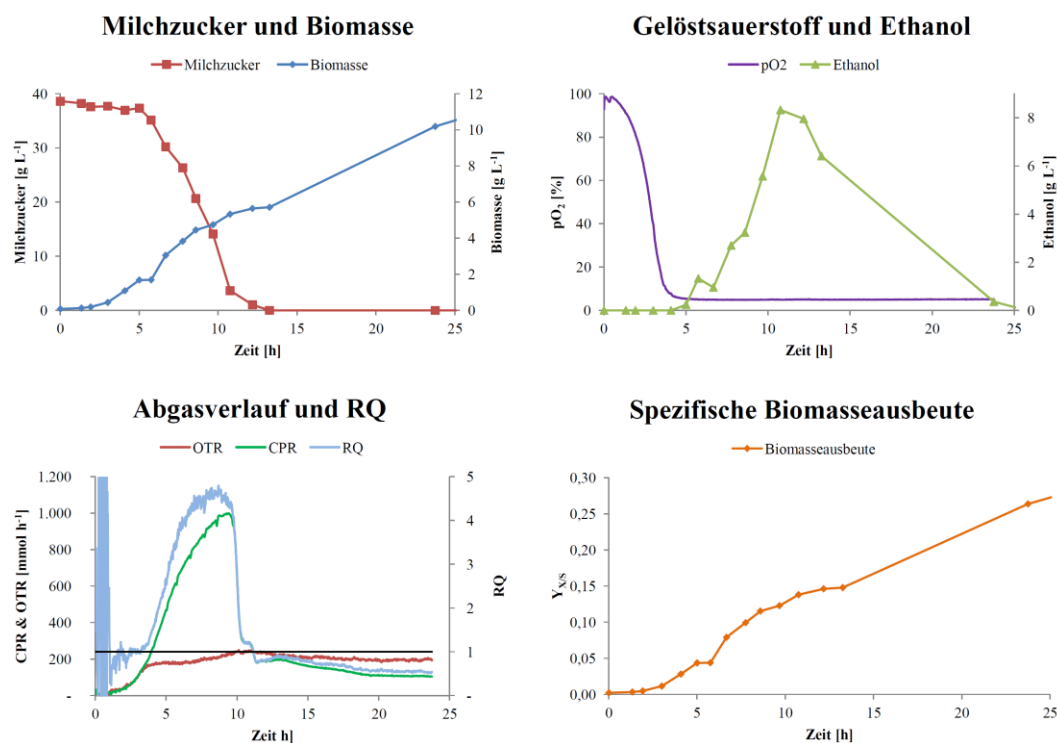


Abbildung 4-9: Prozesscharakteristika der Hefeanzucht im 10 L Rührkesselreaktor (20% (v/v) TEM 30, 0,1% (w/v) Hefeextrakt, 2 vvm, 300 rpm).

Es wurden folgende Vergleichsgrößen erreicht:

$$\text{BTM} = \text{ca. } 6 \text{ g L}^{-1} \text{ (nach 12 h)}$$

$$\text{BTM} = > 10 \text{ g L}^{-1} \text{ (nach 24 h)}$$

$$Y_{X/S} = 0,15 \text{ g}_{\text{Biomasse}} \text{ g}^{-1}_{\text{Milchzucker}} \text{ (nach 12 h)}$$

$$Y_{X/S} = 0,26 \text{ g}_{\text{Biomasse}} \text{ g}^{-1}_{\text{Milchzucker}} \text{ (nach 24 h)}$$

Unter den gewählten Bedingungen verlief der Prozess langsam, was in erster Linie von der geringen Animpfdichte abhing, da weniger als $0,1 \text{ g L}^{-1}$ Biomasse in den Prozess eingebracht wurde. Bei einer hohen Animpfdichte würde der Prozess deutlich schneller ablaufen, sodass Biomassekonzentrationen von über 8 g L^{-1} in 12 h Prozessdauer durchaus realisierbar sind.

Zudem zeigt sich, dass die Sauerstoffversorgung in Rührkesselreaktoren bei Rührergeschwindigkeiten von 300 rpm nicht gewährleistet werden kann. Trotz einer Begasungsrate von 2 vvm setzt bereits nach etwa 4 h eine parallele Ethanolbildung ein. Die Sauerstoffsättigung sinkt dabei auf nahezu Null. Die Sauerstofflimitierung lässt sich auch anhand der Abgaszusammensetzung feststellen. Der RQ steigt nach 4 h deutlich über 1, bis das Substrat nach etwa 10 h erschöpft ist.

4.1.3.5 Dreistufige Anzucht im Labormaßstab

Um in kürzerer Zeit eine höhere Biomassekonzentration zu erreichen, wurde zwischen dem Schüttelkolbenmaßstab und dem 10 L Reaktor eine weitere Stufe eingefügt. Verwendet wird dafür ein Rührkesselreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 2 L. Die Prozesse im 2 L und 10 L Reaktor verlaufen analog. Der Prozessverlauf wird an dieser Stelle aufgrund der gegebenen Prozessstabilität nicht mehr ausführlich dargestellt. Eine Übersicht über die anfänglichen und finalen Biomassen jeder Stufe befindet sich in Tabelle 4-4.

Tabelle 4-4: Kaskade zur Biomasseproduktion im Labormaßstab bis 10 L.

Stufe	Volumen [L]	Dauer [h]	Initiale Biomasse [g L ⁻¹]	Finale Biomasse [g L ⁻¹]
1*	0,1	12	~0,2	4 – 6
2 **	2	8	0,2 – 0,3	6 – 8
3 ***	10	8	0,6 – 0,8	8 - 10

* YMPL20, 150 rpm

** 20% (v/v) TEM 30, 0,1% (w/v) Hefeextrakt, 1 vvm, 1.000 rpm, 100 mL Inokulum;

*** 20% (v/v) TEM 30, 0,1% (w/v) Hefeextrakt, 1 vvm, 700 rpm, 1 L Inokulum.

Durch die Zwischenstufe ergeben sich zwei sehr schnelle Anzuchtstufen (2 L bzw. 10 L), die zu einer kürzeren Gesamtprozessdauer (28 h) und höherer Biomassekonzentration (10 g L⁻¹) führen.

4.1.3.6 Anzucht im Pilotmaßstab

Die Durchführung der 4. und 5. Stufe erfordert einen 30-minütigen Transport der angezogenen Hefekulturen. Dafür wurde von der frisch geernteten Kultur ein Volumen von 5 L Kulturbrühe bei 6 °C kühl gestellt. Die im Folgenden dargestellten Prozesse im Großmaßstab wurden jeweils mit frischen Vorkulturen gestartet. Die Vorkulturen wurden analog zu der oben dargestellten Prozessführung im 10 L-Reaktor hergestellt. Die erreichten Biomassekonzentrationen lagen dabei im Bereich bis maximal 10 g L⁻¹. In der 4. Stufe (50 L) wurden in mehreren Experimenten vergleichbare Ergebnisse wie in den kleineren Volumina (10 L) erreicht.

Anzucht im 50 L Blasensäulenreaktor

Die 4. Stufe wurde mit einer Hefesuspension (5 L, Biomassekonzentration ca. 9 g L⁻¹) aus der 3. Stufe (10 L-Reaktor) angeimpft. Der Prozess erfolgte in 50 L TEM 30 (20% (v/v), verdünnt mit Leitungswasser) unter Zusatz von 15 mL Antischaummittel (Tego KS 911, Evonik). Es wurden unterschiedliche Bedingungen getestet. Zum Vergleich werden zwei Verläufe dargestellt, wobei einer unter optimierten (1) und einer unter nicht optimalen Bedingungen (2) geführt wurde. Die Ansätze unterschieden sich folgendermaßen:

Ansatz:	(1)	(2)
Begasungsrate:	2 vvm	3 vvm
Temperatur	37 °C	30 °C
Hefeextrakt:	0,1% (w/v)	ohne Hefeextrakt

Die Begasung erfolgte in beiden Fällen durch einen eigens entwickelten Gasverteiler aus Sintermetallstäben mit Porengößen von 100 µm (siehe Anhang, Abschnitt 6.8.1, Abbildung 6-2). Die Versuche wurden neben einer regelmäßigen Probenentnahme auch mittels Abgassensor (BlueInOne, BlueSens, Herten) verfolgt. Die Charakteristika der beiden Ansätze sind in Abbildung 4-10 dargestellt.

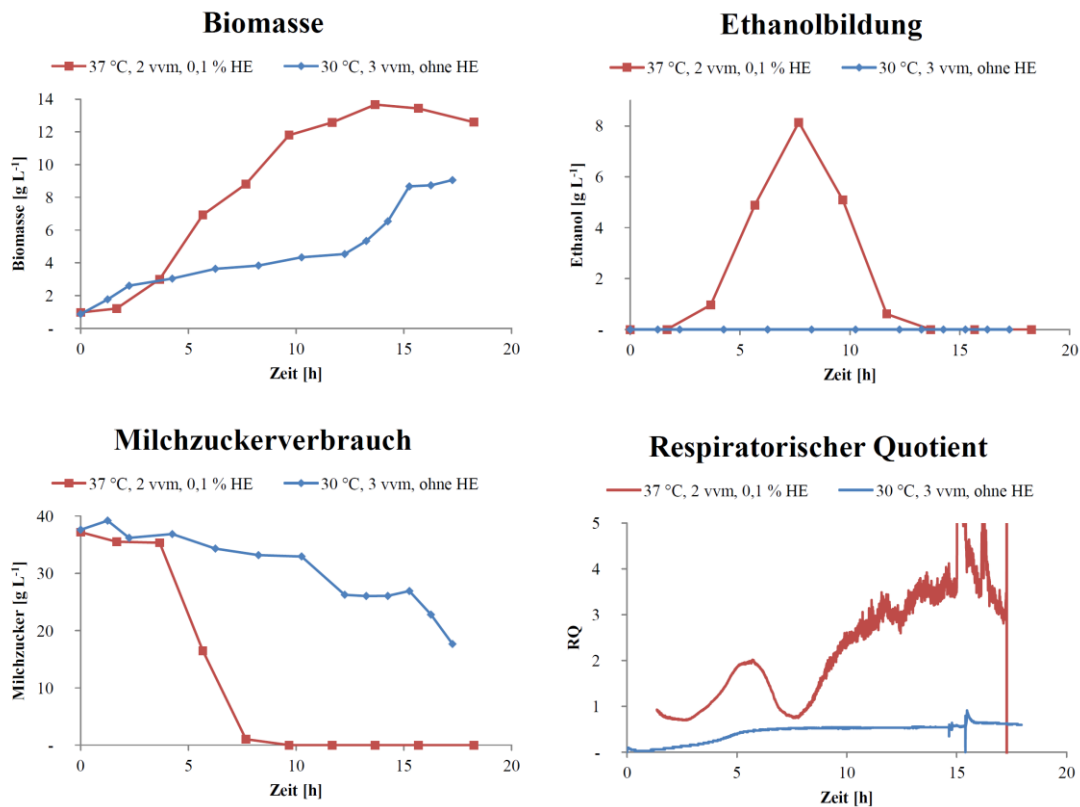


Abbildung 4-10: Charakteristika zweier ausgewählter Prozesse zur Hefeanzucht im 50 L-Maßstab in 20% (v/v) TEM 30. Unter Zusatz von Hefeextrakt (HE).

Es wurden folgende Vergleichsgrößen erreicht:

	(1)	(2)
BTM:	ca. 13	ca. 9 g L ⁻¹
Y _{X/S} :	0,32	0,25 g _{Biomasse} g ⁻¹ Milchzucker
Ethanol:	8	0 g L ⁻¹
Anzuchtdauer: (bis BTM > 8 g L ⁻¹)	< 10	15 h

Der Prozess unter optimierten Bedingungen (1) läuft deutlich schneller als der Prozess unter den nicht optimalen Bedingungen (2). Unter optimierten Bedingungen wurden trotz einer Sauerstofflimitierung bereits nach 10 h über 12 g L⁻¹ Biomasse erreicht, was einer spezifischen Ausbeute von über 0,32 g_{Biomasse} g⁻¹ Substrat entspricht. Unter nicht optimalen Bedingungen (2) wurde ebenfalls eine hohe finale Biomasse von über 9 g L⁻¹ erreicht, allerdings dauert der Prozess deutlich länger (> 15 h). Die hohe Begasungsrate sorgte dafür, dass über die gesamte Prozessdauer keine Sauerstofflimitierung auftrat (RQ < 1). Durch die niedrige Temperatur und den hohen Sauerstoffeintrag tritt keine Ethanolbildung auf, wodurch das Substrat auch nach 18 h noch nicht verbraucht war.

Durch eine ausreichende Begasung von über 2 vvm, eine hohe Temperatur von 37 °C, den Zusatz von 0,1% (w/v) Hefeextrakt und die hohe Anfangsbiomasse von über 1 g L⁻¹ konnte ein sehr schneller Prozess unter sehr hohen Biomassekonzentrationen auch im Großmaßstab erreicht werden. Dabei lässt sich der Prozessverlauf durch eine Abgasanalytik überwachen. Durch das Abfallen des respiratorischen Quotienten ist zu erkennen, wann das Substrat verbraucht ist. Zudem wird auch eine Ethanolbildung sichtbar, da das Ethanol nach Erschöpfung von Milchzucker, der primären Substratquelle, verstoffwechselt wird.

Anzucht im Kubikmetermaßstab: Blasensäule und Rührkessel

In der 5. Stufe wurden zwei unterschiedliche Reaktortypen für die Hefeanzucht getestet. Der Prozess erfolgte in TEM 30 (20% (v/v) verdünnt mit Leitungswasser der Stadt Hannover) mit Zusatz von 0,2 mL L⁻¹ Antischaummittel (Tego KS 911, Evonik). Die Ansätze wurden jeweils mit einer Hefesuspension (50 L, Biomassekonzentration

> 10 g L⁻¹) aus der 4. Stufe angeimpft. Die Ansätze unterschieden sich folgendermaßen:

Ansatz:	(1)	(2)
Reaktorarchitektur:	Blasensäule	Rührkessel
Begasungsrate:	2 vvm	2 vvm
Rührerdrehzahl:	-	130 rpm
Temperatur	30 °C	37 °C
Hefeextrakt:	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)

Der Prozess im Rührkessel (Ansatz 2) wurde neben der Probenentnahme zudem mittels Abgassensor (BlueInOne, BlueSens, Herten) verfolgt. Die Charakteristika der beiden Ansätze sind in Abbildung 4-11 dargestellt.

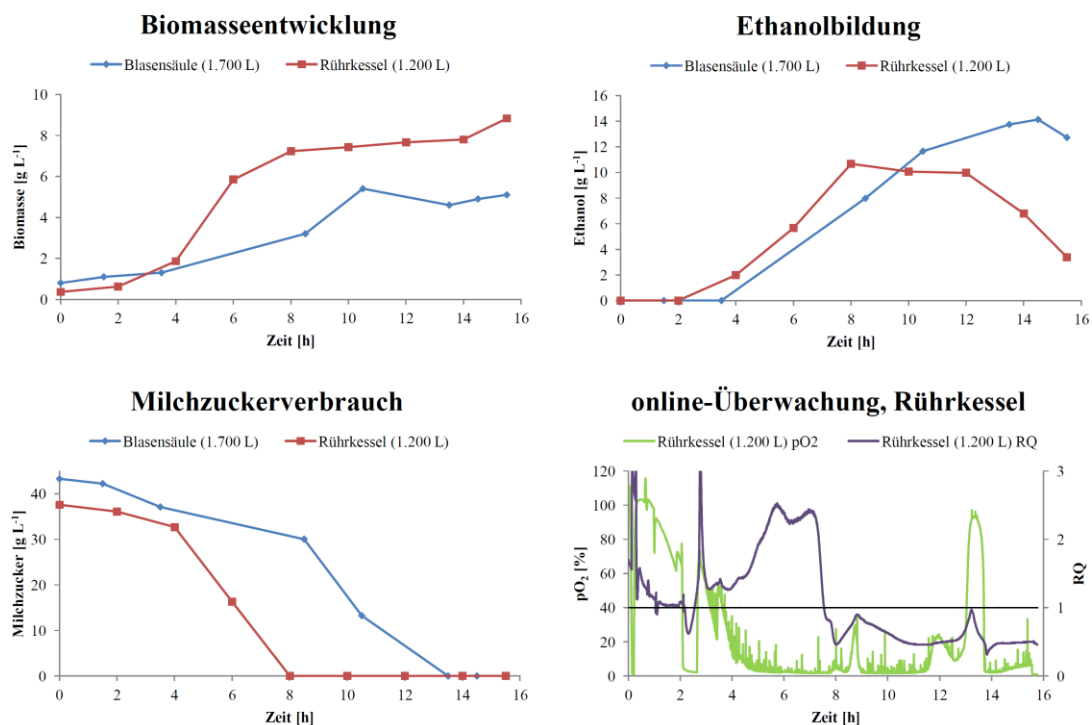


Abbildung 4-11: Charakteristika der Hefeanzucht im Kubikmetermaßstab in unterschiedlichen Reaktorarchitekturen: Rührkessel und Blasensäule.

Es wurden folgende Vergleichsgrößen erreicht:

	(1)	(2)
BTM:	ca. 8	ca. 6 g L ⁻¹
Ethanol:	10	15 g L ⁻¹
Anzuchtdauer: (bis BTM > 8 g L ⁻¹)	< 10	- h

Beim Vergleich zwischen Rührkesselreaktor und Blasensäule wird deutlich, dass die Sauerstoffversorgung mit zunehmender Reaktorskalierung schwieriger wird. Eine bessere Prozessführung war im Rührkessel erreichbar. Insbesondere an der parallelen Ethanolbildung wird ersichtlich, dass sich die Architektur der verwendeten Blasensäule (vgl. 6.7) nicht für die Biomassegewinnung für diesen Prozess eignet. Es wurden ca. 15 g L⁻¹ Ethanol gebildet, was einer in diesem Fall ungewollten Ethanolausbeute von über 60% entspricht. Die Hefezellen unterlagen einer Sauerstofflimitierung. Der Prozess wurde bei 30 °C durchgeführt und es ist anzunehmen, dass die Ethanolbildung bei einer höheren Prozesstemperatur noch schneller wäre. Eine Anzucht der Hefe in dem verwendeten Blasensäulenreaktor sollte daher nicht angestrebt werden.

Dahingegen war im Rührkessel eine gute Biomassebildung möglich. Durch einen adäquaten Sauerstoffeintrag und die hohe Temperatur lief der Prozess schnell und der Milchzucker ist bereits nach 8 h aufgebraucht. Die starke parallele Ethanolbildung bedeutet, dass auch in den Rührkessel zu wenig Sauerstoff eingetragen wird, was sich anhand der verwendeten online-Analytik verfolgen und feststellen lässt. Der RQ lag oberhalb von 1, bis der Milchzucker nach 8 h aufgebraucht war. Durch die anschließende Verstoffwechslung des Ethanols fiel der RQ-Wert unter 1. Die Sauerstoffsättigung im Medium sank rapide ab und lag bereits nach 5 h nahe Null, wodurch schon frühzeitig eine parallele Ethanolbildung einsetzte. Da der Rührer am Maximum der Leistungsfähigkeit von 130 rpm war, lässt sich der Sauerstoffeintrag nur über eine Erhöhung der Begasungsrate verbessern. Der Prozess läuft auch in dieser Skalierungsstufe stabil und führt zu hohen Biomassekonzentrationen von über 8 g L⁻¹. Eine mögliche Weiterentwicklung des Prozesses hinsichtlich der Aufskalierung (> 10 m³)

wird in Abschnitt 4.3.1 diskutiert. Des Weiteren könnte die angezogene Biomasse auch als Inokulum für eine Fermentation im Großmaßstab dienen (Abschnitt 4.2.4).

4.1.3.7 Zwischenfazit

Die Biomassegewinnung in TEM 30 konnte bis in den Kubikmetermaßstab (1.700 L) reproduziert werden. Eine Hefeanzucht zur Bereitstellung eines Inokulums für großtechnische Prozesse (weitere Aufskalierung, großtechnische Fermentation) ist möglich. Die Übertragung der im Labormaßstab optimierten Bedingungen führte auch im Großmaßstab zu Biomassekonzentrationen von über 8 g L^{-1} bei spezifischen Biomasseausbeutefaktoren von über $0,25 \text{ g}_{\text{Biomasse}} \text{ g}^{-1}_{\text{Substrat}}$. Essentiell für einen schnellen Prozess sind: eine hohe Temperatur von 37 °C , die Supplementierung mit Hefeextrakt und eine adäquate Sauerstoffversorgung. Eine zur Biomasseproduktion parallele Ethanolbildung kann im Großmaßstab nur schwer verhindert werden, ist für die Biomassegewinnung allerdings nicht hemmend. Generell verlief die Anzucht in Rührkesselreaktoren besser als in Blasensäulen. Als geeignete Analytik zur online-Überwachung erwiesen sich die Messung der Abgaszusammensetzung und die Messung der Sauerstoffsättigung.

4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Gewinnung von Biomasse aus TEM 30

Im Labormaßstab konnten optimierte Prozessvariablen für die Biomassegewinnung in TEM 30 herausgestellt werden. Diese führten zu einer deutlichen Verkürzung der Anzuchtdauer bei höheren finalen Biomassekonzentrationen. Die Ansatzpunkte dafür waren eine Erhöhung der TEM 30-Konzentration (20% (v/v)), eine Erhöhung der Temperatur (37 °C), eine Erhöhung der Anfangsbiomassekonzentration ($0,4 \text{ g L}^{-1}$) und der Zusatz von Hefeextrakt (0,1% (w/v)). Dabei sind unter den optimierten Bedingungen (20% TEM 30, 37 °C , 0,1% (w/v) Hefeextrakt, adäquate Sauerstoffversorgung) folgende Vergleichsgrößen als Benchmark im Vergleich mit den ursprünglichen Bewertungskriterien erreicht worden:

Bedingungen:	ursprünglich	optimiert
μ_{\max} [h^{-1}]:	~ 0,60	> 0,56
μ (nach 12 h) [h^{-1}]:	0,36	> 0,33
erreichte Biomasse [g L^{-1}]:	ca. 2,5	> 8,0
$Y_{X/S}$ [$\text{g}_{\text{Biomasse}} \text{g}^{-1}_{\text{Milchzucker}}$]:	0,22 (nach 24 h)	> 0,24 (nach 12 h)
Anzuchtdauer:	> 20 h	< 15 h

Die Biomassegewinnung in TEM 30 konnte bis in den Kubikmetermaßstab (1.700 L) reproduziert werden. Dabei wurden Biomassekonzentrationen von über 8 g L^{-1} bei spezifischen Biomasseausbeutefaktoren von über $0,25 \text{ g}_{\text{Biomasse}} \text{ g}^{-1}_{\text{Substrat}}$ erreicht. Wichtig ist eine gute Sauerstoffversorgung, die trotz paralleler Ethanolbildung ein gutes Wachstum begünstigt. Generell verlief die Anzucht in Rührkesselreaktoren aufgrund besserer Sauerstoffversorgung besser als in Blasensäulenreaktoren. Als geeignete Analytik zur online-Überwachung erwiesen sich die Messung der Abgaszusammensetzung und die Messung der Sauerstoffsättigung.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass in verdünntem TEM 30 (20% (v/v)) eine Gewinnung von über 8 g L^{-1} Biomasse in weniger als 12 h reproduzierbar und aufskalierbar möglich ist. Auf diese Weise konnte ausreichend Hefe in einer schnellen Anzuchtkaskade bis im Kubikmetermaßstab produziert werden. Eine Hefeanzucht zur Bereitstellung eines Inokulums für großtechnische Prozesse (weitere Aufskalierung, großtechnische Fermentation) wurde auf diese Weise nachgewiesen.

4.2 Energetische Nutzung – Gewinnung von Ethanol aus TEM 30

In diesem Teil soll die Ethanolgewinnung aus TEM 30 optimiert werden. Dazu wird zunächst eine mögliche Salzabreicherung zur Verminderung des osmotischen Drucks getestet. Die Teilentsalzung des TEM 30 wird mittels Ionenaustauschern, mittels Nanofiltration und mittels Elektrodialyse durchgeführt. Des Weiteren werden die Prozessgrößen für die Vergärung von verdünntem TEM 30 durch Variation des pH-Wertes, der Temperatur und der Biomassekonzentration optimiert. Durch den Zusatz komplexer Nährstoffe sollte ein schnellerer Prozess ermöglicht werden. Unter optimierten Prozessbedingungen werden die durchgeführten Experimente bis in den Kubikmetermaßstab (bis 2.000 L) übertragen. Die Prozessführung wird im batch-Ansatz, im fed batch-Ansatz und im repeated batch-Ansatz getestet.

4.2.1 Ausgangsbedingungen

TEM 30 enthält etwa 18% (w/v) Milchzucker als Kohlenstoffquelle. Aus dieser Menge wäre theoretisch die Gewinnung von über 12,5 vol% Ethanol möglich (vgl. Abschnitt 3.3.1). Der Prozess wird maßgeblich von der hohen Aschefracht von bis zu 15% (w/v) beeinflusst. In reinem TEM 30 ist der osmotische Druck so hoch, dass ein Hefewachstum (vgl. 4.1.2) und auch eine Vergärung des Milchzuckers zu Ethanol nicht möglich ist.

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich der Milchzucker in verdünntem TEM 30 unter anaeroben bzw. mikroaeroben Bedingungen sehr schnell zu Ethanol umsetzen lässt. Als optimal für eine sehr schnelle Prozessführung wurde eine TEM 30-Konzentration von 40% (v/v) herausgestellt, wobei eine gute Prozessführung noch bis zu einer Konzentration von 50% (v/v) erreicht werden konnte. Auf diese Weise konnten im Labormaßstab in 30 h 6 vol% Ethanol erzeugt werden, was einer Ausbeute von 90% entspricht. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Heferückführung für eine mehrmalige Verwertung möglich ist.

Generell wird der Bioprozess durch hohe Salzkonzentrationen behindert. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Teilentmineralisierung mittels Nanofiltration eine Verbesserung des Bioprozesses erreicht werden konnte. Im Diafiltrationsmodus war es möglich, die Konzentration an einwertigen Ionen um nahezu 50% zu mindern, wo-

bei der Substratgehalt im TEM 30 konstant blieb. Die Ethanolgewinnung in TEM 30 mit verringerter Salzkonzentration verlief deutlich schneller. Eine selektive Abreicherung von Kalziumphosphat durch Fällung führte hingegen nicht zu einer Prozessverbesserung.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Prozess weiterentwickelt werden. Das Ziel dabei ist es, die finale Ethanolmenge bei möglichst kurzer Prozessdauer zu erhöhen. So soll in unter 80 h eine Ethanolmenge von über 55 g L^{-1} (7 vol%) erreicht werden. Dafür muss Milchzucker in einer Konzentration von über 110 g L^{-1} vorliegen. Das bedeutet, der Rohstoff TEM 30 muss stärker konzentriert eingesetzt werden als in den bisher beschriebenen Ansätzen. Da die hohe Salzfracht den Prozess hinsichtlich Dauer und Ausbeute maßgeblich beeinflusst, soll eine Verminderung der Salzfracht durch eine gezielte, vorgeschaltete Entsalzung getestet werden (Abschnitt 4.2.2). Grundsätzlich dafür geeignet sind die bereits erwähnte Nanofiltration und eine Fällung, außerdem die Elektrodialyse und der Ionenaustausch.

Die Herausforderung dabei ist, die hohe osmotische Belastung zu senken, da die verwendeten Hefen der Spezies *K. marxianus* nur bedingt tolerant gegenüber hohem osmotischem Druck sind. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass der *K. marxianus*-Stamm DSM 5422 eine gute Prozesseignung zeigt. Dabei konnte bei diesem Stamm keine Substrat- und Produkthemmung (bis 200 g L^{-1} Milchzucker bzw. bis 12,5 vol%) festgestellt werden (vgl. Anhang 6.10.3). Der *K. marxianus*-Stamm CBS 6556 erwies sich als nicht prozesstauglich, da dieser bei der Vergärung von verdünntem TEM 30 den Stoffwechsel bereits bei einer Ethanolkonzentration von 1 vol% einstellte (vgl. 6.10.4).

Der Prozess zur Ethanolgewinnung wird hinsichtlich einer industriellen Anwendbarkeit entwickelt. Daher müssen die im Labormaßstab durchgeführten Methoden und gewonnenen Prozessvariablen auch in den Großmaßstab übertragbar und vor allem leicht anwendbar sein. Die Prozessgrößen für die Ethanolgewinnung aus TEM 30 werden im Labormaßstab optimiert und im Anschluss bis in den Kubikmetermaßstab evaluiert.

4.2.2 Entsalzungsstrategien für TEM 30 und deren Auswirkung auf die alkoholische Gärung

Eine biotechnologische Verwertung von TEM 30 kann nur nach einer Verminderung der Salzkonzentration erfolgen. Diese kann zum Einen durch eine (aufwändige) technische Entsalzung und zum Anderen durch eine Verdünnung erfolgen. Die Verdünnung birgt zwei Probleme:

- 1.) Es wird neues Wasser in den Prozess eingebracht, wodurch die Abwassermenge nach der biotechnologischen Verwertung steigt. Dadurch wird das Volumen an Medium größer, wodurch der Energiebedarf steigt, da das Medium sowohl für den Bioprozess als auch für die destillative Rückgewinnung des Ethanol's nochmals aufgeheizt werden muss.
- 2.) Durch die Verdünnung vermindert sich nicht nur die Salzfracht, sondern auch der Substratgehalt. Das führt letztendlich dazu, dass zu wenig Substrat im Prozessmedium enthalten ist, um die gewünschte Menge an Produkt zu produzieren. Dieser Punkt ist sogar der ausschlaggebende, da er über die Wirtschaftlichkeit des Prozesses entscheidet.

Die Alternative zur Verdünnung sind technische Verfahren zur Salzabreicherung. Diese Verfahren sollen der Fermentation vorgeschaltet werden, um eine Teilentsalzung des Prozessmediums zu erreichen, ohne dass Substrat verloren geht. Dabei muss beachtet werden, dass diese Verfahren oft teuer und unwirtschaftlich sind, insbesondere vor dem Hintergrund, dass Ethanol einen geringen Marktpreis erzielt. Deshalb sollen diese Methoden im Rahmen dieser Arbeit nicht nur auf ihre Eignung zur Entsalzung von TEM 30, sondern auch auf eine einfache Implementierung als Vorverarbeitung evaluiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Teilentsalzung von TEM 30 mittels Nanofiltration, mittels Elektrodialyse und mittels Ionenaustauschern getestet und bewertet.

4.2.2.1 Entsalzung mittels Nanofiltration

Die Nanofiltration ist als Membranverfahren eine sehr einfach implementierbare Entsalzungsmethode und bereits für die Anwendung in der Molkereiindustrie beschrieben [3, 5, 41, 92]. Eine Eignung für die Entsalzung von TEM 30 wurde in früheren Arbeiten bereits beschrieben und als praktikabel bewertet. Deshalb soll der Ansatz im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelt werden. In den Experimenten erwies sich die Nanofiltration als anfällig für Verschmutzungen und Verblockungen, da die Permeationsrate während der Filtration leicht abfiel. TEM 30 konnte aber dennoch als Suspension eingesetzt werden. Die eigentliche Entsalzung erfolgt durch Permeation von Wasser durch die Membran. Durch engmaschige Poren wandern Ionen mit dem Wasser durch die Membran und im Retentat bleibt eine verminderte Ionenkonzentration zurück. Für die Anwendung zur Entsalzung von TEM 30 wird eine Membran eingesetzt, deren Poren für Milchzucker nicht durchlässig, für Ionen einschließlich ihrer Hydrathülle allerdings durchlässig sein sollen. Auf diese Weise wird die Salzkonzentration gemindert und die Milchzuckerkonzentration bleibt gleich. Ein gravierender Nachteil der Nanofiltration ist, dass es sich um ein druckbetriebenes Verfahren handelt und für eine Permeation von Wasser und Ionen durch die Membran ein sehr hoher Druck von über 30 bar angelegt werden muss. Das ist im Hinblick auf eine Aufskalierung ein bedeutender Faktor.

Für eine direkte Entsalzung liegt im TEM 30 eine zu große Salzfracht vor. Eine Verarbeitung ist nur im Diafiltrationsmodus möglich. Das bedeutet, dass TEM 30 1:1 mit Wasser verdünnt und anschließend im Kreuzstrombetrieb nanofiltriert wird. Durch eine Aufkonzentrierung auf das ursprüngliche Volumen sollen bis zu 50% der Ionen mit dem permeierten Wasser aus dem TEM 30 entfernt werden. Als Nanofiltrationsanlage wird eine Pilotanlage Labcell-1 mit SR-3-Membranen (KMS, Aachen) mit einer Membranfläche von 28 cm² verwendet. Die Membranen haben laut Herstellerangaben einen Milchzuckerrückhalt von über 95% [93]. Dabei können aufgrund der kleinen Poren nur monovalente Ionen passieren, da Milchzucker und divalente Ionen zu ähnliche Molekül- bzw. Ionengrößen aufweisen. Zur Bewertung der Entsalzungsmethode dienen der eigentliche Entsalzungsprozess und die Fermentation des auf diese Weise gewonnenen TEM 30 mit verminderter Salzkonzentration. Der notwendige Druck wird durch gasförmigen Stickstoff (Linde AG, Hannover) erreicht.

Der Entsalzungsprozess soll nach Möglichkeit einfach und schnell durchgeführt werden können und ist in folgendem Schema (Abbildung 4-12) dargestellt.

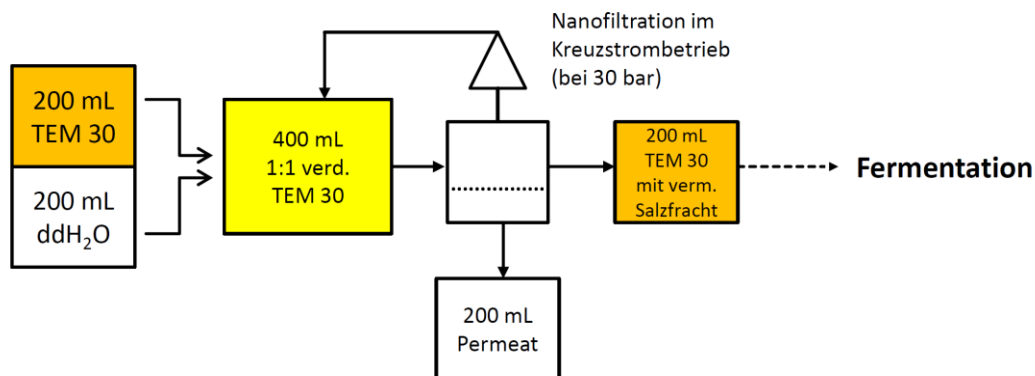


Abbildung 4-12: Schema der Entsalzung von TEM 30 mittels Nano-Diafiltration im Kreuzstrombetrieb.

Problematisch bei der Filtration sind zwei Punkte: die Permeationsrate fällt während der Verarbeitung ab, wodurch sich als zweites Problem eine sehr lange Filtrationsdauer ergibt. Eine Aufkonzentrierung auf das ursprüngliche Volumen (400 mL → 200 mL, vgl. Abbildung 4-12) dauert sehr lange, weshalb der Prozess nach 5 h abgebrochen wurde. Zu diesem Zeitpunkt lag das Volumen des Retentats bei 230 mL, was einer Aufkonzentrierung auf 57% entspricht. Die ursprüngliche Milchzuckerkonzentration des TEM 30 von $189,4 \text{ g L}^{-1}$ wird nicht erreicht. Nach der Filtration weist es mit $157,2 \text{ g L}^{-1}$ eine um 17% geminderte Milchzuckerkonzentration auf. Im Permeat hingegen ist allerdings nur eine Milchzuckerkonzentration von $2,2 \text{ g L}^{-1}$ nachzuweisen, was bedeutet, dass die Membranen einen Milchzuckerrückhalt von über 96% haben. Es wird angenommen, dass sich der restliche Milchzucker auf den Membranen oder im Filtrationssystem abgelagert haben könnte.

Um die Effektivität der Entsalzung zu bewerten, wurde die Kationenkonzentration spektrometrisch bestimmt (vgl. 6.4.11). Die Entsalzung erfolgt gleichermaßen durch Verminderung von monovalenten Kationen und Anionen, daher ist die Quantifizierung über die Kationenkonzentration für eine Bewertung ausreichend. Eine Übersicht über die Konzentrationen ausgewählter Kationen ist in Abbildung 4-13 gezeigt.

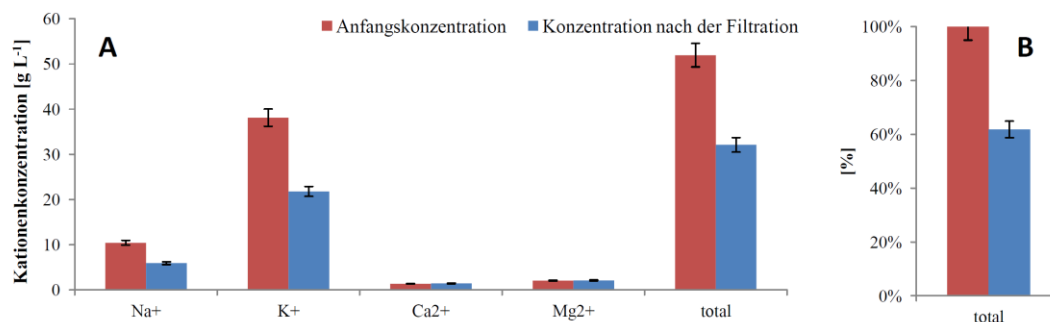


Abbildung 4-13: Übersicht über die Kationenkonzentration von TEM 30 vor und nach der Nanofiltration, A: Kationenkonzentrationen, B: prozentuale Verminderung der Kationenkonzentrationen.

TEM 30 weist eine Kationenkonzentration von fast 52 g L^{-1} auf. Dabei entfallen $10,4 \text{ g L}^{-1}$ auf Na^+ , $38,1 \text{ g L}^{-1}$ auf K^+ , $2,0 \text{ g L}^{-1}$ auf Mg^{2+} und $1,4 \text{ g L}^{-1}$ auf Ca^{2+} . Durch die oben beschriebene Nano-Diafiltration lassen sich die Konzentration der monovalenten Kationen vermindern, wohingegen die Konzentration der divalenten Kationen konstant bleibt. Sowohl die Na^+ - als auch die K^+ -Konzentration vermindert sich um 43%. Bezogen auf die Gesamtkationenkonzentration, unter Berücksichtigung, dass Anionen im selben Maße abgereichert werden wie Kationen, wird eine Verminderung der Salzfracht um 38% erreicht. Dieser Wert ist vergleichbar mit der Salzfracht einer TEM 30-Konzentration von etwa 65% (v/v), wobei der Substratgehalt mit 157 g L^{-1} über dem von 65% (v/v) TEM 30, der etwa 120 g L^{-1} beträgt, liegt. Das bietet einen Vorteil hinsichtlich der in der Fermentation erreichbaren Ethanolmenge.

Die Fermentation des nanofiltrierten TEM 30 erfolgte mit einem Volumen von 180 mL im Schüttelkolben. Als Referenz diente zum Einen eine Fermentation von purem 100% TEM 30 und zum Anderen von 65% unentsalztem (v/v) TEM 30. Die Ansätze wurden je mit 20 mL einer Hefesuspension versetzt, sodass eine anfängliche Biomassekonzentration von $0,8 \text{ g L}^{-1}$ vorlag. Die Fermentation wurde bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die Verläufe des Milchzuckerabbaus, der Ethanolbildung und der Ethanolausbeute sind in Abbildung 4-14 dargestellt.

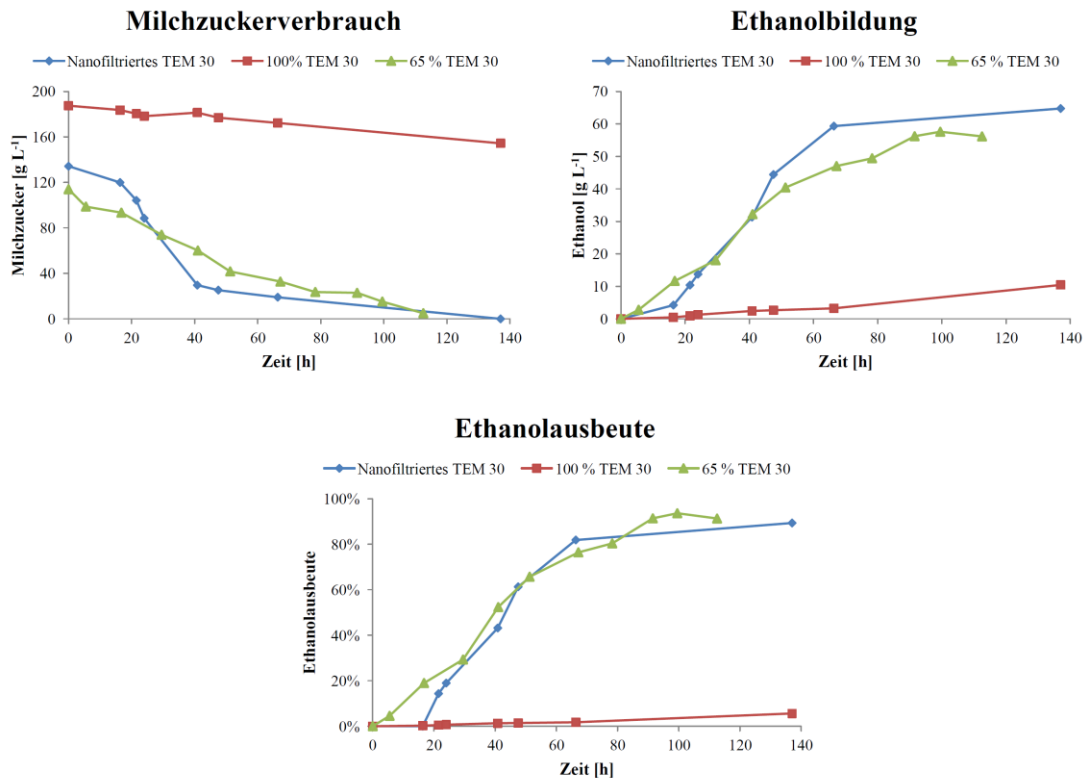


Abbildung 4-14: Vergärung von nanofiltriertem TEM 30, 100% TEM 30 und 65% (v/v) TEM 30 (Schüttelkolben, 200 mL Medium, 110 rpm, 30 °C, 0,8 g L⁻¹ iBTM).

Die Fermentation von nanofiltriertem TEM 30 verläuft deutlich besser als die von TEM 30 in seiner unbehandelten Form. Nach 66 h Fermentationszeit sind bereits 86% des Substrates umgesetzt, woraus 59,6 g L⁻¹ (7,5 vol%) Ethanol entstehen, was einer Ethanolausbeute von 82% entspricht. Die Fermentation des Ausgangsrohstoffs TEM 30 hingegen ist, wie bereits in den vorherigen Abschnitten ausführlich dargestellt wurde, nicht möglich. Die aufwändige Teilentsalzung führt letztendlich zu einer guten biotechnologischen Verwertbarkeit. Da der apparative Aufwand aber sehr aufwändig ist und zudem noch zusätzliches Prozesswasser für die Diafiltration hinzugefügt wird, verliert diese Entsalzungsmethode, zumindest für den vorliegenden Anwendungsfall, seine Bedeutung. Entscheidend für die Bewertung ist im Weiteren auch die Reinigung der Membranen, auf denen sich mit der Zeit Ablagerungen und Fouling-Effekte festsetzen. Wie schon in vorangegangenen Arbeiten geschildert, könnte diese Methode durchaus in die Molkenverarbeitung integriert werden, allerdings nicht für die Entsalzung von TEM 30 sondern als Ersatz für einen Konzentrierungsschritt in der Verarbeitungskette [7]. Auf die Optimierung der Verarbeitungskette wird in Abschnitt 4.3.3 noch eingegangen.

Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass sich die Nanofiltration für eine Anwendung im Bereich der Molkenverarbeitung eignet und dass durch die Teilentsalzung eine sehr viel schnellere Fermentation bei höheren Ethanolgehalten erreicht werden kann.

4.2.2.2 Entsalzung mittels Elektrodialyse

Die Elektrodialyse ist in der Molkereiindustrie ein seit langem eingesetztes Verfahren zur Entsalzung [3, 5, 40, 42]. Der apparative Aufbau besteht aus ionenselektiven, in Schichten aufeinanderliegenden Membranen. Prinzipiell werden die Ionen durch das Anlegen einer Spannung aus dem Diluat durch die Membranen in das Konzentrat getrieben. Im Diluat verringert sich somit die Ionenkonzentration und im Konzentrat erhöht sie sich. Die Membranen sind äußerst anfällig für Ablagerungen und Fouling-Effekte. Aus diesem Grund kann TEM 30 in dem verwendeten Elektrodialyse-Modell verwendet werden als Suspension nicht, sondern nur die Klarphase nach 10 minütiger Zentrifugation bei 8.000 x g verarbeitet werden. Das zu entsalzende Diluat (hier: TEM 30-Klarphase) wird im Kreuzstrombetrieb durch den Schichtaufbau gepumpt. Dabei wird dieser Raum auf der einen Seite von einer Anionenaustauscher- und auf der anderen Seite von einer Kationenaustauschermembran begrenzt. Die benachbarten Räume werden mit Konzentrat (hier: deionisiertes Wasser), in welchem die ausgetragenen Ionen aufgenommen werden, durchströmt. Zwischen den Konzentrat-Räumen befinden sich ionenundurchlässige Membranen zur Abgrenzung der Schichten, zwischen denen wiederum ein Elektrolyt (hier: 2,5% Na_2SO_4 -Lösung) im Kreis gepumpt wird, welcher lediglich der Stromleitung dient. Dieser Schichtaufbau kann beliebig oft übereinander geschichtet werden, wodurch sich der Widerstand erhöht und die Stromstärke entsprechend sinkt. Ähnlich zu einer herkömmlichen Dialyse erfolgt die Ionenwanderung durch Osmose. Das bedeutet, dass die Ionenkonzentrationen in Diluat und Konzentrat sich im Verlauf des Prozesses angleichen. Bei der Elektrodialyse gibt es durch die Spannung eine zusätzliche treibende Kraft, die den Prozess deutlich beschleunigt. Dennoch ist die Ionenwanderung bei einem starken Konzentrationsgefälle zwischen Diluat und Konzentrat am effektivsten. Aus diesem Grund wird das Konzentrat nach einer gewissen Zeit, wenn sich die Ionenkonzentrationen nahezu gleichen, durch frisches deionisiertes Wasser ersetzt. Die Entsalzung erfolgt also schritt-

weise mit jeder Erneuerung des Konzentrates. Da mit den Ionen auch etwas Wasser durch die Membranen diffundiert, kommt es zu einer leichten Aufkonzentrierung des Diluates.

Für die Elektrodialyse wird als Diluat die TEM 30-Klarphase eingesetzt. Nach der Zentrifugation ist die Osmolarität bereits leicht vermindert (vgl. Abbildung 4-15).

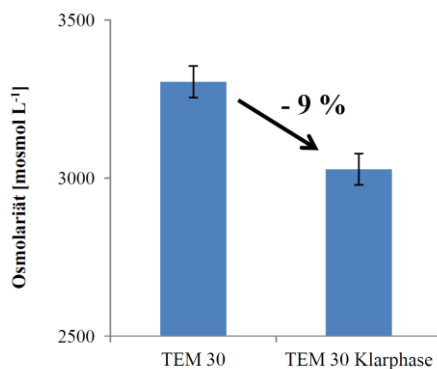


Abbildung 4-15: Osmolarität von TEM 30 und der TEM 30-Klarphase nach Zentrifugation (8.000 x g), gemessen mittels Osmometer (K-7000, Knauer, Berlin).

Durch mehrfache Erneuerung des Konzentrates (deionisiertes Wasser) wird die Ionenkonzentration in der TEM 30-Klarphase schrittweise vermindert. Für den Prozess wird die Elektrodialyse ED L02 (Hescon, Engstingen) verwendet. Diese Membranen mit einer Fläche von 57 cm² sind selektiv für Ionen, weshalb kein Milchzuckerverlust zu verzeichnen sein sollte. Die Angleichung der Ionenkonzentration während der Prozessführung wird mittels Leitfähigkeitsmessung überwacht. Der Schichtaufbau liegt dabei zweifach gestapelt vor. Die anfängliche Spannung beträgt 12,81 V, wobei diese mit Fortschreiten der Deionisierung absinkt. Ein Schema des apparativen Aufbaus und der Anordnung der Membranen ist in Abbildung 4-16 gezeigt.

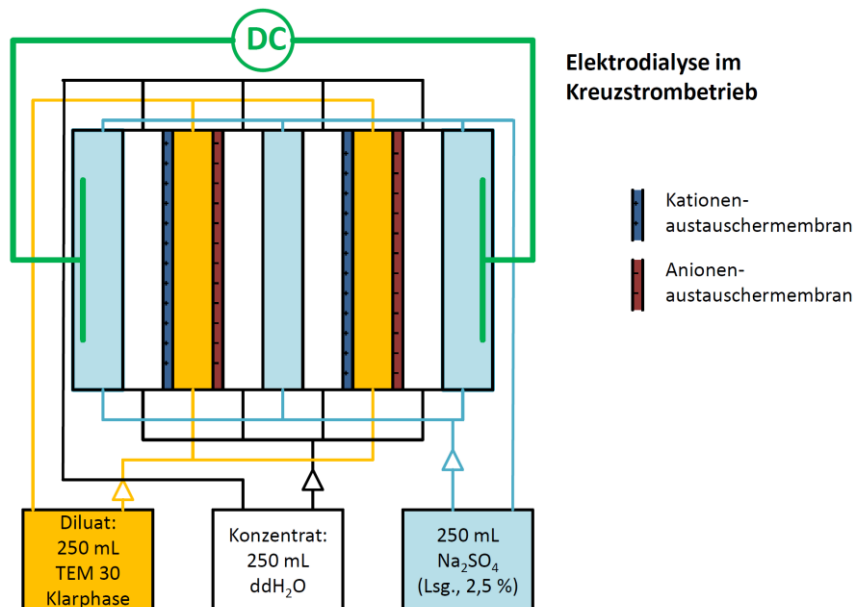


Abbildung 4-16: Schema der Entsalzung der TEM 30-Klarphase mittels Elektrodialyse im Kreuzstrombetrieb.

Die Elektrodialyse hat den Vorteil, dass man die Länge des Prozesses und den Entsalzungsgrad selber bestimmen kann. Je öfter das Konzentrat erneuert wird, desto höher wird der Entsalzungsgrad, was allerdings die Prozessdauer verlängert. In diesem Prozess wird bis zu einer Auswechslung des Konzentrates von einer Dauer von 45 - 60 min pro Entsalzungsschritt ausgegangen. Ein weiterer Vorteil ist die auftretende Volumenreduktion, die den Zuckergehalt sogar leicht ansteigen lässt. Ein Übergang von Milchzucker in das Konzentrat ist während des Prozesses nicht feststellbar. Die Verwendung der TEM 30-Klarphase hat zudem den Vorteil, dass ein Abfallen der Permeationsrate nicht auftritt. Dagegen steht natürlich, dass die TEM 30-Klarphase nicht dieselbe Fermentationscharakteristik aufweist, wie TEM 30 als Suspension.

Um die Effektivität der Entsalzung zu bewerten, wurde die Kationenkonzentration spektrometrisch bestimmt (vgl. 6.4.11). Die Entsalzung erfolgt gleichermaßen durch Verminderung von Kationen und Anionen, daher ist die Quantifizierung über die Kationenkonzentration für eine Evaluierung an dieser Stelle ausreichend. Eine Übersicht über die Konzentrationen ausgewählter Kationen ist in Abbildung 4-17 gezeigt.

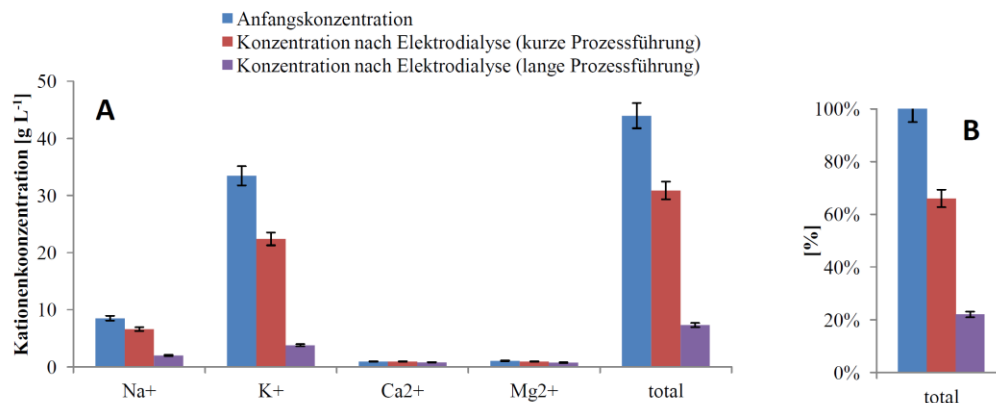


Abbildung 4-17: Übersicht über die Kationenkonzentration der TEM 30-Klarphase vor und nach der Elektrodialyse (durchgeführt in zwei unterschiedlich langen Entsalzungsprozessen), A: Kationenkonzentrationen, B: prozentuale Verminderung der Kationenkonzentrationen.

Die TEM 30-Klarphase weist eine Kationenkonzentration von etwa 44 g L^{-1} auf. Damit liegt der Kationengehalt etwa 15% niedriger als in TEM 30. Durch die oben beschriebene Elektrodialyse lassen sich die Konzentration der monovalenten und der divalenten Kationen vermindern. Dabei lässt sich durch eine lange Prozessführung, unter 6-facher Erneuerung des Konzentrats, eine Verminderung der Kationenkonzentration um 78% und bei einer schnelleren Prozessführung, unter 3-facher Erneuerung des Konzentrats, eine Verminderung um 34% erreichen, wobei zusätzlich bereits eine Verminderung der Osmolarität um etwa 9% durch die Zentrifugation erreicht wurde. Insgesamt wird somit eine Verminderung der Salzfracht um 40% erreicht. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem Salzgehalt einer TEM 30-Konzentration von etwa 60% (v/v). Dabei liegt der Substratgehalt nach der Entsalzung mit 173 g L^{-1} deutlich über dem von 60% (v/v) TEM 30 mit etwa 115 g L^{-1} . Bei der langen Prozessführung wird nahezu eine Vollentsalzung (> 80%) bei leicht gesteigerter Substratkonzentration erreicht. Beide Ansätze bilden damit gute Voraussetzungen für eine schnelle Vergärung unter hohen Ethanolgehalten.

Die Fermentation der elektrodialysierten TEM 30 Medien erfolgte im Schüttelkolben mit einem Volumen von 180 mL. Als Referenz dient eine Fermentation von TEM 30-Klarphase. Die Ansätze werden je mit 20 mL einer Hefesuspension versetzt, sodass eine anfängliche Biomassekonzentration von $0,8 \text{ g L}^{-1}$ vorliegt. Die Fermentation wird bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die Verläufe des Milchzuckerabbaus, der Ethanolbildung und der Ethanolausbeute sind in Abbildung 4-18 dargestellt.

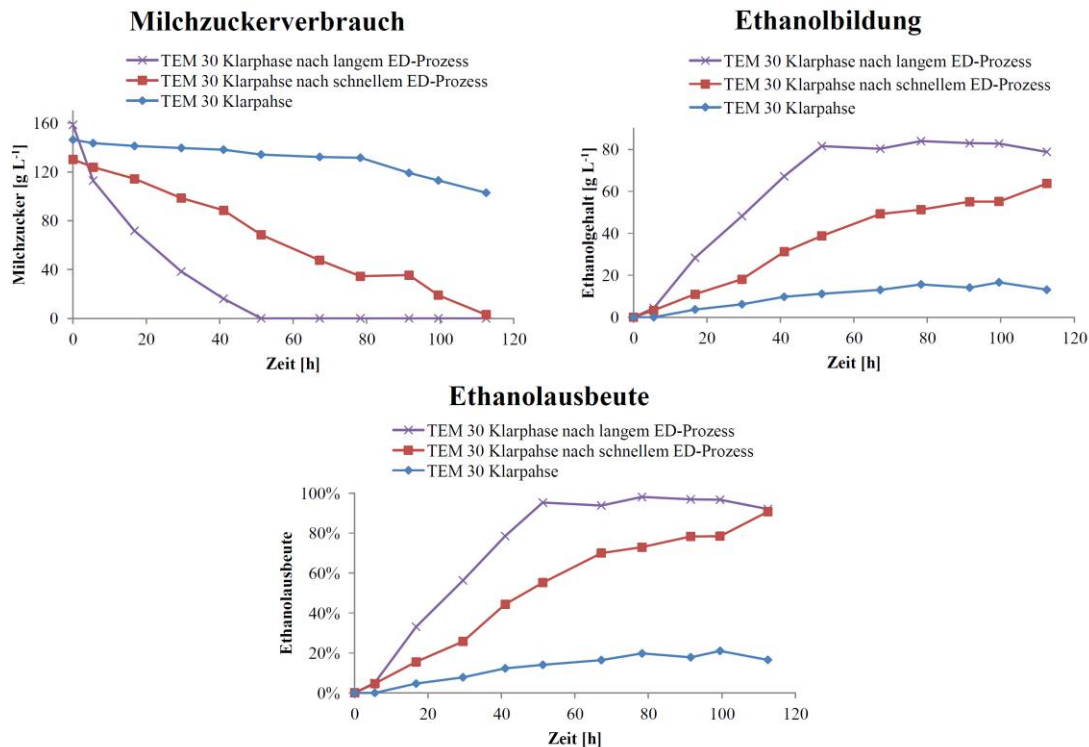


Abbildung 4-18: Vergärung von elektrodialysierten TEM 30-Medien und der TEM 30-Klarphase (Schüttelkolben, 200 mL Medium, 110 rpm, 30 °C, 0,8 g L⁻¹ iBTM).

Durch die Teilentsalzung mittels Elektrodialyse wird das Fermentationsverhalten massiv verbessert. Eine Verminderung der Salzkonzentration um 34% bei einem kurzen Elektrodialyseprozess führt zu einer schnellen Fermentation, die zu Ethanolgehalten von über 60 g L⁻¹ führen. Wird die Entsalzung bis zu einem Entsalzungsgrad von fast 80% betrieben, läuft der Prozess noch schneller. Das Substrat ist bereits nach 52 h verbraucht und es wird ein Ethanolgehalt von über 80 g L⁻¹ (10,1 vol%) erreicht. Gegen diese Vorteile steht der enorme apparative Aufwand. Durch die Erneuerung des Konzentrates wird sehr viel frisches deionisiertes Wasser benötigt, welches zu Abwasser wird und ein hoher Entsalzungsgrad wird nur durch eine lange Prozessführung erreicht. Außerdem muss auch bei dieser Technologie eine aufwändige Reinigung der Membranen erfolgen und es können nur klare Flüssigkeiten verwendet werden, weshalb TEM 30 auch hier nicht die geeignete Prozessfraktion für diesen Entsalzungsschritt ist. Auf die Optimierung der Verarbeitungskette wird in Abschnitt 4.3.3 eingegangen.

In den dargestellten Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich die Elektrodialyse für eine Anwendung im Bereich der Molkenverarbeitung aufgrund des hohen appa-

rativen Aufwands nur bedingt eignet. Eine Entsalzung kann aber nahezu bis zu einer Vollentsalzung erfolgen. Die Teilentsalzung führt zu einer sehr viel schnelleren Fermentation bei höheren Ethanolgehalten.

4.2.2.3 Weitere Entsalzungsmethoden

Eine weit verbreitete Methode zur Voll- und Teilentsalzung sind Ionenaustauscher, deren Anwendung auch in der Molkereiindustrie betrieben wird [3, 5, 42]. Ionenaustauscher bieten den Vorteil, dass theoretisch eine Vollentsalzung bei Anwendung von Kationen- sowie Anionenaustauschern erreicht werden kann. Bei der Anwendung können nur klare Lösungen verarbeitet werden, da ungelöste Partikel schnell zu einer Verblockung des Materials in den Säulen führen. TEM 30 als milchige Suspension kann nicht mittels Ionenaustauschern verarbeitet werden. Ionenaustauscher haben zudem eine begrenzte Kapazität und müssen regeneriert werden. Bezogen auf die sehr hohe Ionendichte von TEM 30 von über $1,2 \text{ mol L}^{-1}$, kann abhängig von der Austauscherkapazität nur sehr wenig Material in einer Charge durchgesetzt werden (Daten siehe Anhang, Abschnitt 6.10.6). Eine Regeneration bedeutet lange Rüstzeiten und einen hohen Aufwand an Regenerationsmitteln, wie konzentrierten Säuren und Laugen. Außerdem eignen sich nicht alle Austauschermaterialien für einen Einsatz im Lebensmittelbereich, da ein Ausbluten erfolgen kann.

Eine weitere, industriell angewendete Methode zur Entsalzung ist die Fällung von Kalziumphosphat. Durch Anheben des pH-Wertes auf pH 10 und Erwärmung lässt sich gezielt Kalziumphosphat ausfällen und abtrennen. Diese Methode ist patentrechtlich für eine ganz ähnliche Anwendung geschützt [9]. Der Hintergrund des Patentes ist die Rückgewinnung von Milchzucker aus Molkenpermeat mit anschließender energetischer Verwertung des Abbauproduktes. Dabei wird im ersten Schritt genau diese Methode verwendet. In vorangegangenen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass eine Abreicherung von Kalziumphosphat mit dieser Methode keinen Effekt auf die Fermentation hat [7]. Kalziumphosphate führen oft zu Ablagerungen und Fouling-Effekten bei weiteren Membrananwendungen. In der Hinsicht bietet eine Abreicherung schwerlöslicher Kalziumphosphate sicherlich Vorteile. Es konnte aber zudem auch nachgewiesen werden, dass bei dieser Methode Milchzuckerverluste von bis zu 10% auftreten [94].

4.2.2.4 Zwischenfazit

Eine Entsalzung kann mit verschiedenen Methoden erreicht werden. Dabei ist TEM 30 für eine Entsalzung als Suspension eher ungeeignet. Eine Teilentsalzung von TEM 30 konnte mittels Nanofiltration und Elektrodialyse wirksam auf die Fermentation aus. Dabei gilt: Je höher die Teilentsalzung, desto besser die Fermentierbarkeit. Durch keine der beiden Methoden wird die Milchsäurekonzentration vermindert. Auf diese Weise wird ein schnellerer Bioprozess mit höheren Ethanolgehalten erreicht. Mittels Elektrodialyse konnte die Salzkonzentration in TEM 30 um 80% vermindert werden. In der Fermentation konnten aus dem entsalzten TEM 30 in 52 h über 10 vol% Ethanol erzeugt werden. Der Aufwand für eine technische Entsalzung von TEM 30 ist sehr hoch. Daher steht die Optimierung der direkten biotechnologischen Verwertung im weiteren Verlauf dieser Arbeit im Vordergrund. Eine Entsalzung sollte prozesstechnisch gesehen besser bei einer Vorfraktion (beispielsweise Molkenpermeat) angewendet werden als bei TEM 30 (vgl. 4.3.3).

4.2.3 Optimierung der Prozessbedingungen zur Ethanolgewinnung

Im Rahmen der experimentellen Arbeiten wurden verschiedene *K. marxianus*-Stämme (6.2) für die Ethanolgewinnung getestet. Die beste Prozesseignung zeigte der Stamm DSM 5422 (vgl. 6.10.4). Im Rahmen dieser Arbeit wird daher ausschließlich die Optimierung der Anzuchtbedingungen dieses *K. marxianus*-Stamms gezeigt.

Als Grundmedium für die Optimierung wurde TEM 30 (Zusammensetzung siehe 6.1) verdünnt mit deionisiertem Wasser verwendet, wobei die Experimente im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt wurden. Zur Eindämmung von Fremdkeimen wurde eine Pasteurisation (Erwärmung auf 100 °C) durchgeführt. Die für die Optimierung ausgewählten Prozessvariablen und deren erwarteten Effekte auf den Prozess sind in Tabelle 4-5 gezeigt.

Tabelle 4-5: Übersicht über die ausgewählten Prozessvariablen zur Optimierung der Anzuchtbedingungen.

Prozessvariable	Erwartete Effekte
Anfangssubstratkonzentration / Verdünnung (iTEM)	<ul style="list-style-type: none"> • Einfluss auf die Prozessdauer • Einfluss auf die finale Ethanolmenge
pH-Wert (pH)	<ul style="list-style-type: none"> • Einfluss auf die Prozessdauer
Anzuchttemperatur (T)	<ul style="list-style-type: none"> • Beschleunigter Prozess
Anfangsbiomassekonzentration (iBTM)	<ul style="list-style-type: none"> • Beschleunigter Prozess
Additive / wachstumsfördernde Substanzen (Ad)	<ul style="list-style-type: none"> • Beschleunigter Prozess

In vorangegangenen Arbeiten konnten bei der Vergärung von TEM 30 (40% (v/v)) im Labormaßstab in 30 h 6 vol% Ethanol erzeugt werden. Ziel dieser Arbeit ist es, die finale Ethanolmenge zu erhöhen. Mit steigender Verdünnung sinkt sowohl die osmotische Belastung als auch der Substratgehalt. Da eine Ethanolkonzentration von über 55 g L^{-1} (7 vol%) erreicht werden soll, muss das Fermentationsmedium eine Milchzuckerkonzentration von mindestens 115 g L^{-1} aufweisen, was einer TEM 30-Konzentration von 60 – 65% (v/v) entspricht. Die Fermentationsdauer verlängert sich dabei mit steigender TEM 30-Konzentration (vgl. Abbildung 4-19).

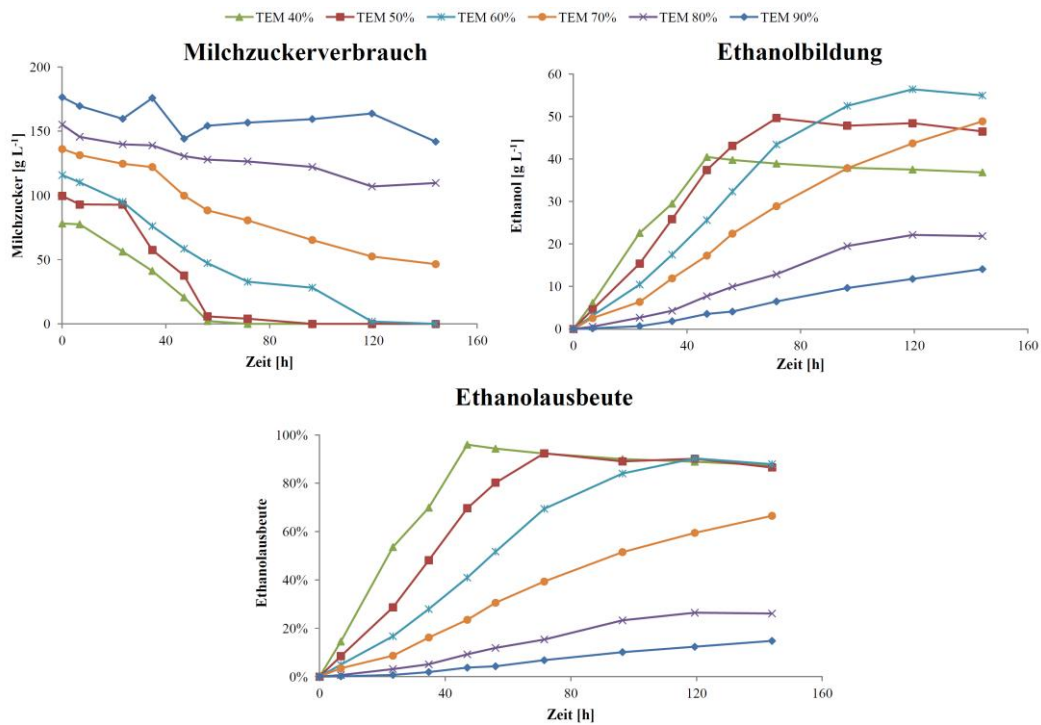


Abbildung 4-19: Vergärung von TEM 30 in unterschiedlichen Konzentrationen (Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, 30 °C, pH 5,7, 0,8 g L⁻¹ iBTM).

In Abhängigkeit der TEM 30-Konzentration wurden folgende Vergleichsgrößen erreicht (Aufgrund der niedrigen Anfangsbiomassekonzentration (iBTM) liefen die Prozesse insgesamt sehr langsam):

TEM 30-Konzentration:	40%	50%	60%	70%	80%
Ethanolgehalt [g L ⁻¹]:	40,5	49,6	56,4	48,8	22,1
Prozessdauer [h]:	47	73	120	> 120	> 120

(weitere Prozessbedingungen: 30 °C, pH 5,7, 0,8 g L⁻¹ iBTM)

Um eine Ethanolkonzentration von über 55 g L⁻¹ (7 vol%) zu erreichen muss das TEM 30 für die Vergärung in einer Konzentration von mindestens 60% (v/v), was einer Milchzuckerkonzentration von 110 g L⁻¹ entspricht, eingesetzt werden (ausgehend von einer Ausbeute > 90%). Im Folgenden soll durch eine Optimierung der weiteren, o.g. Prozessvariablen (vgl. Tabelle 4-5) eine Beschleunigung des Prozesses erreicht werden. Eine Übersicht über die Ausgangsbedingungen, den Variationsbereich der Experimente und die optimierten Bedingungen ist in Tabelle 4-6 dargestellt.

Tabelle 4-6: Optimierung der Ethanolgewinnung: Übersicht über die ausgewählten Prozessvariablen und deren Effekte.

Prozessvariable	Ausgangsbedingungen	Variationsbereich	Optimierte Bedingungen	Effekte
iTEM	40 % TEM 30 (~75 g L ⁻¹ Milchsucker)	40 – 90% TEM 30	60% TEM 30 (~115 g L ⁻¹ Milchsucker)	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhung der finalen Ethanolkonzentration • Aber: längere Prozessdauer
pH	pH 5,7 (unverändert)	pH 4,5 – 8,0	unverändert	<ul style="list-style-type: none"> • (Kürzere Prozessdauer)
T	30 °C	30 – 40 °C	37°C	<ul style="list-style-type: none"> • Kürzere Prozessdauer (- 20%)
iBTM	-	1,1 – 4,2 g L ⁻¹	so viel wie möglich	<ul style="list-style-type: none"> • Kürzere Prozessdauer (- 45%)
Ad	-	Hefeextrakt (0,1 – 1,0%)	Hefeextrakt (0,1%)	<ul style="list-style-type: none"> • Kürzere Prozessdauer (- 48%)

Der natürliche pH-Wert von TEM 30 liegt bei pH 5,4 – 5,8. TEM 30 ist zwischen pH 5 und pH 6 sehr gut gepuffert, da es viel Phosphat, Laktat und Citrat enthält, deren pK_S-Werte alle im Bereich von 3,86 (Laktat) bis 7,2 (Hydrogenphosphat) liegen [95]. Durch die Änderung des pH-Wertes lässt sich die Löslichkeit der verschiedenen Ionen verschieben. Das kann anhand der Osmolarität, die ausschließlich von der Anzahl an gelösten Teilchen abhängt, abgelesen werden. Durch Anheben des pH-Wertes assoziieren Ionen (Osmolarität sinkt), während Ionen bei einer Absenkung des pH-Wertes dissoziieren (Osmolarität steigt, vgl. Abbildung 4-20).

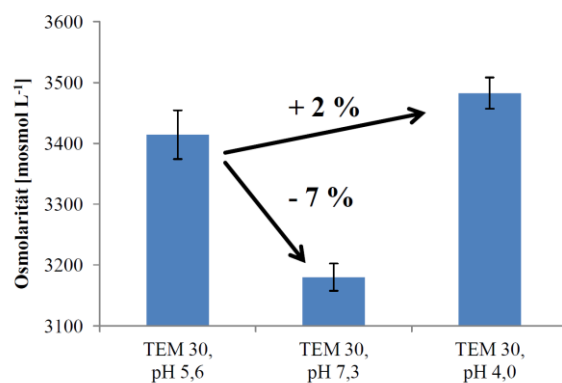


Abbildung 4-20: Einfluss des pH-Wertes auf die Osmolarität von TEM 30.

In den Experimenten zeigte eine Änderung des pH-Wertes keinen großen Effekt auf die Fermentationsdauer. Das beste Ergebnis wurde bei einer leichten Anhebung des pH-Wertes auf pH 6 erzielt, während starke Änderungen (nach oben und unten) zu massiven Verschlechterungen führten (Daten siehe Anhang unter 6.10.6, Abbildung 6-20). Da der Einfluss marginal ist, wird auf eine pH-Korrektur im weiteren Verlauf der Optimierung verzichtet.

Eine deutliche Verkürzung der Prozessdauer konnte durch eine Erhöhung der Temperatur erreicht werden. Bei 30 °C dauerte es etwa 81 h, bis eine Ausbeute > 90% erreicht wurde, während diese bei 37 °C bereits nach etwa 55 h erreicht war (vgl. Abbildung 4-21). Die Prozessdauer verkürzt sich dadurch um über 20% (minus 26 h). Dieser Effekt ist nicht auf eine zusätzliche Biomassebildung zurückzuführen, da die Biomassezuwächse analog verlaufen. Es ist anzunehmen, dass der Stoffwechsel bei höherer Temperatur generell schneller ist und die Umsetzung von Milchzucker zu Ethanol beschleunigt wird. (Weitere Daten befinden sich im Anhang unter 6.10.6, Abbildung 6-21).

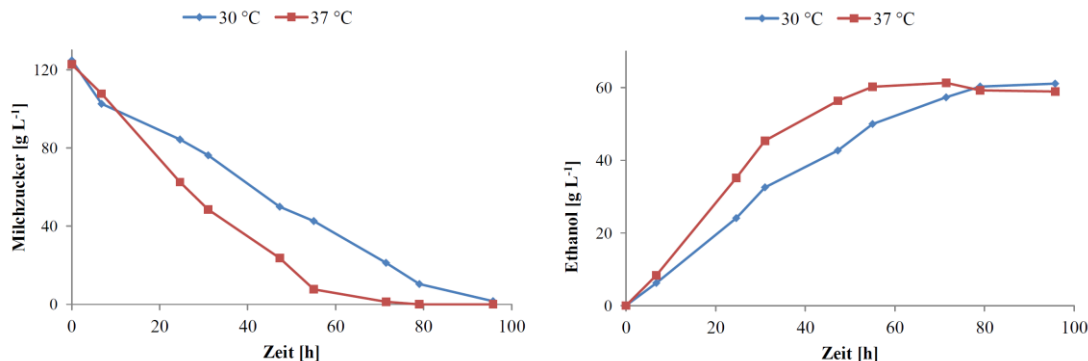


Abbildung 4-21: Vergärung von 60% (v/v) TEM 30 bei Variation der Temperatur (*K. marxianus* DSM 5422, Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, pH 5,7, 1,1 g L⁻¹ iBTM).

Eine Verkürzung der Prozessdauer konnte ebenfalls durch eine Erhöhung der Anfangsbiomassekonzentration erreicht werden (vgl. Abbildung 4-22). Bis eine Ausbeute > 90%, dauert es bei 1,1 g L⁻¹ BTM über 100 h, bei 2,0 g L⁻¹ BTM ca. 79 h (minus 21%) und bei 4,2 g L⁻¹ BTM ca. 55 h (minus 45%).

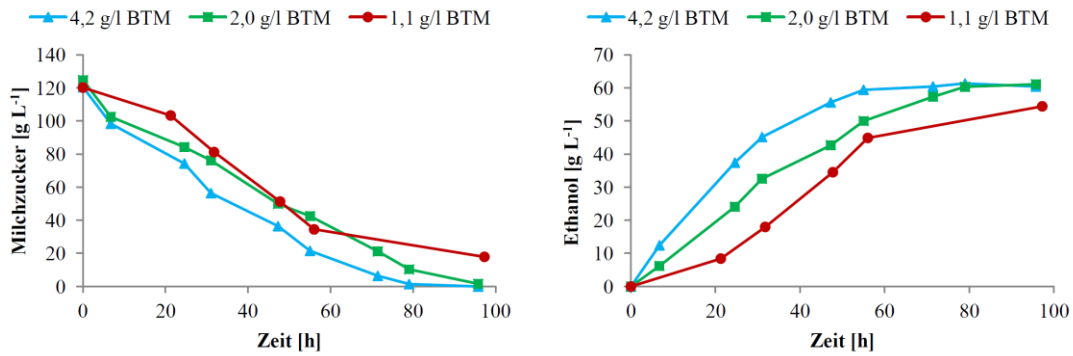


Abbildung 4-22: Vergärung von TEM 30 (60% (v/v)) unter Variation der initialen Biomassekonzentration (*K. marxianus* DSM 5422, Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, pH 5,7, 30 °C).

Tendenziell wurden diese Ergebnisse auch bei anderen TEM 30-Konzentrationen erreicht (50% (v/v), 70% (v/v)). Allerdings verlief der Prozess in 70% TEM 30 auch bei höherer BTM generell zu langsam, während bei einer TEM 30 Konzentration von 50% ein finaler Ethanolgehalt von > 7 vol% nicht erreicht werden kann.

Eine weitere Optimierung des Prozesses konnte durch die Aufwertung des Mediums (TEM 30, 60%) mit Hefeextrakt erreicht werden. Die Prozessdauer verkürzte sich mit steigender Hefeextraktkonzentration (vgl. Abbildung 4-23).

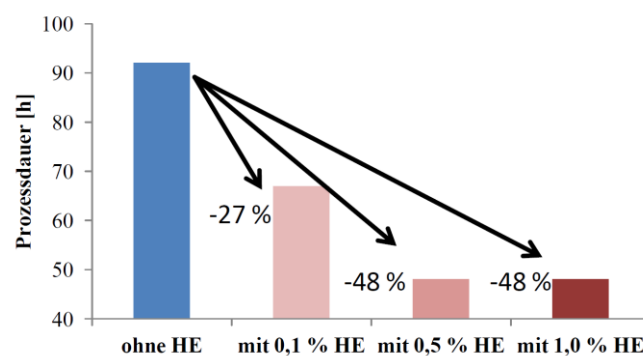


Abbildung 4-23: Prozessdauer in Abhängigkeit von der Konzentration an zugesetztem Hefeextrakt (HE) bei der Vergärung von TEM 30 (60% (v/v)) (*K. marxianus* DSM 5422, Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, pH 5,7, 37 °C, 1,5 g L⁻¹ iBTM).

Der Zusatz von Hefeextrakt zu TEM 30 zeigt eine deutliche Verbesserung der Fermentation und die Prozessdauer kann deutlich verringert werden. Bei einer Hefeextraktkonzentration von 0,1% verringert sich die Prozessdauer um etwa 27% auf eine

Prozessdauer von 67 h und beim Zusetzen von 0,5% sogar um fast 50% auf eine Prozessdauer von 48 h. Ab einer Hefeextraktkonzentration von 0,5% lässt sich der Prozess nicht mehr verbessern (Die zugrunde liegenden Daten befinden sich im Anhang unter 6.10.6, Abbildung 6-23).

In vorherigen Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass auch andere Additive wie Magnesiumsalze und Ammoniumsulfat zu einem verbesserten Prozess führen [4]. Hefeextrakt zeigte allerdings die besten Ergebnisse. In weiterführenden Experimenten im Rahmen einer Bachelorarbeit [96] wurde evaluiert, ob sich die Prozessdauer durch Additive, wie Hefeextrakt, Ammoniumchlorid, Glycerin, Nikotinsäure, Leinöl und Magnesiumsulfat bei höheren TEM 30-Konzentrationen von 70% (v/v) verkürzen lässt. Dies erfolgte allerdings nicht im zufriedenstellenden Ausmaß. Die Obergrenze der maximal einsetzbaren TEM 30-Konzentration liegt damit bei 60 – 65% (v/v).

4.2.3.1 Zwischenfazit

Die Fermentation von verdünntem TEM 30 (60% (v/v)) lässt sich durch optimierte Prozessvariablen beschleunigen. Dabei lassen sich folgende Verkürzungen der Fermentationsdauer bis zu einer Ethanolausbeute von > 90% erreichen:

Verkürzung um

30 °C, pH 5,7, 1,1 g L⁻¹ BTM:	(Dauer: 80 – 90 h)
37 °C:	20%
30 °C, 2,0 g L⁻¹ BTM:	21%
30 °C, 4,2 g L⁻¹ BTM:	45%
37 °C, 1,6 g L⁻¹ BTM, 0,1% Hefeextrakt:	27%
37 °C, 1,6 g L⁻¹ BTM, 0,5% Hefeextrakt:	49%

Die Kombination aus Erhöhung der Temperatur, Erhöhung der Biomasse und Zusatz von Hefeextrakt (> 0,1% (m/v)) führt zu einem deutlich beschleunigtem Prozess. Auf diese Weise lassen sich in verdünntem TEM 30 (60% (v/v)) > 55 g L⁻¹ (7 vol%) Ethanol in < 50 h produzieren.

4.2.4 Aufskalierung

Um die Ethanolgewinnung aus TEM 30 unabhängig von der Skalierung hinsichtlich einer industriellen Anwendung zu evaluieren, wurde der Prozess in unterschiedlichen Skalierungen durchgeführt (300 mL, 2 L, 10 L, 30 L, 2.000 L). Der Prozess wurde dabei so einfach wie möglich aufgebaut. Die Fermentation im Großmaßstab erfordert eine aufwändige vorherige Produktion eines Inokulums (Abschnitt 4.1.3). Für die Versuche in den verschiedenen Skalierungsstufen konnten daher nur Biomassekonzentrationen $< 1 \text{ g L}^{-1}$ eingesetzt werden, um die Vergleichbarkeit zu wahren. Die gewählten Prozessgrößen lauten wie folgt:

TEM 30-Konzentration:	60 - 65% (v/v)
pH-Wert:	5,6 - 5,8
Temperatur:	30 °C
Additive:	Hefeextrakt, 0,1% (w/v)
Initiale Biomasse:	$\sim 1 \text{ g L}^{-1}$ (*)

(* im 2.000 L-Maßstab betrug die Biomasse nur etwa $0,7 \text{ g L}^{-1}$)

Die Prozesse verlaufen dabei mikroaerob, also nicht unter komplettem Ausschluss von Umgebungsluft. Die Durchmischung erfolgt durch Rotation (Schüttelkolben), durch Rühren (2 L, 10 L und 30 L Bioreaktoren) und durch leichten Lufteintrag und Umwälzpumpen (2.000 L). Eine Übersicht der verwendeten Reaktoren und weitere Informationen befinden sich in Abschnitt 4.1.3 und im Anhang (siehe 6.7). Die Verläufe der Milchzuckerkonzentration, der Ethanolbildung und der Ethanolausbeute sind in Abbildung 4-24 dargestellt.

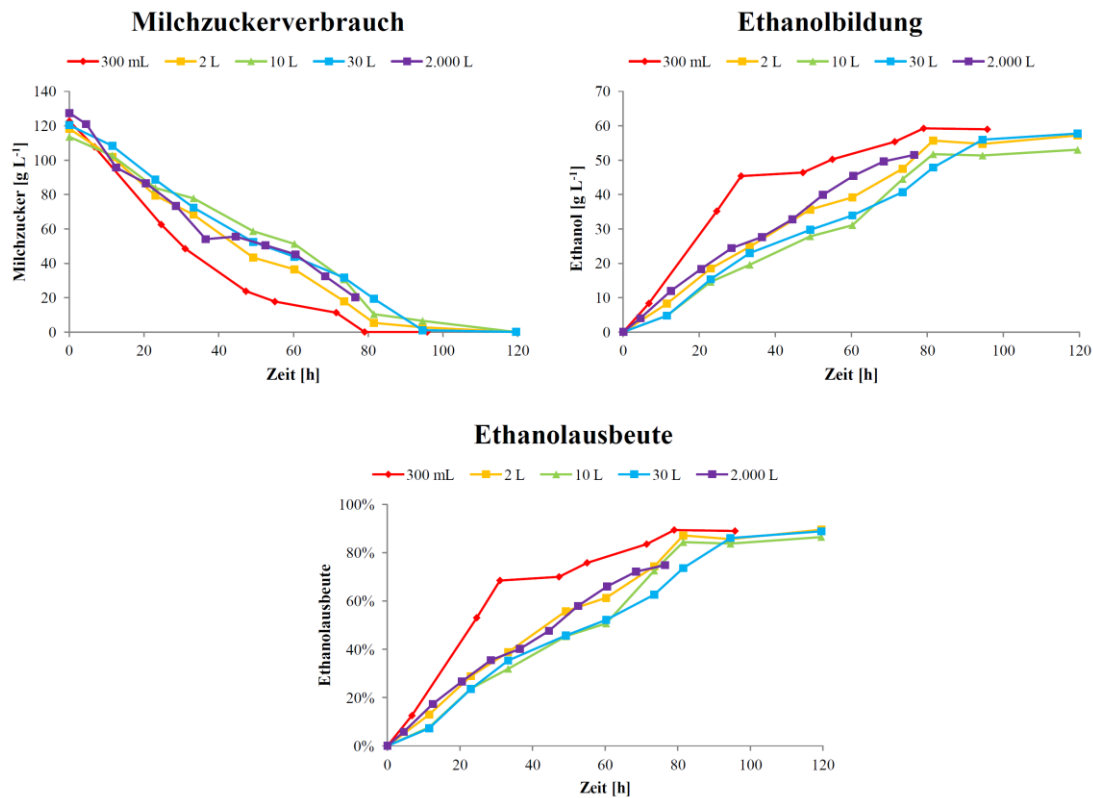


Abbildung 4-24: Vergärung von TEM 30 (60 - 65%, v/v) in verschiedenen Skalierungsstufen (*K. marxianus* DSM 5422, pH 5,7, 30 °C, 1 g L⁻¹ iBTM).

Der Prozess lässt sich bis in ein Arbeitsvolumen von 2.000 L gut übertragen und reproduzieren. Dabei ist ein gering schnellerer Prozess im Schüttelkolbenmaßstab festzustellen. In allen Stufen werden Ausbeuten von nahezu 90% und Ethanolgehalte zwischen 53 und 59 g L⁻¹ (6,7 – 7,5 vol%) erreicht. Ausnahme hierbei bildet der 2.000 L-Maßstab, da hier die Prozessführung nach 80 h abgebrochen wurde. Da hier aber Restsubstrat von etwa 20 g L⁻¹ vorhanden ist, wäre die Ethanolkonzentration im weiteren Verlauf noch von 51 g L⁻¹ auf etwa 60 g L⁻¹ (7,6 vol %) angestiegen.

In dem durchgeführten Vergleich sind nicht die optimierten Bedingungen angewendet worden. Eine Erhöhung der initialen Biomassekonzentration und eine Erhöhung der Temperatur würden den Prozess beschleunigen (vgl. Abschnitt 4.2.3). Die großtechnische Produktion hoher Biomassekonzentrationen (> 10 g L⁻¹) ist ein langwieriger Prozess (vgl. Abschnitt 4.1). Eine deutliche Erleichterung ist beispielsweise durch eine Heferückführung erreichbar (Abschnitt 4.2.5). Die in diesen Versuchen erreichte Prozessdauer von etwa 80 - 90 h kann aber durchaus noch gesenkt werden.

4.2.4.1 Zwischenfazit

Die biotechnologische Gewinnung von Ethanol in TEM 30 ist stabil übertragbar bis in den 2.000 L-Maßstab. Dabei wurden reproduzierbare Prozessverläufe vom Schüttelkolbenmaßstab, über den Laborreaktormaßstab bis in den Kubikmetermaßstab erhalten. In 80 – 90 h konnten mit einer initialen Biomassekonzentration von $1,0 \text{ g L}^{-1}$ aus $115 - 125 \text{ g L}^{-1}$ Milchzucker etwa $53 - 59 \text{ g L}^{-1}$ (6,7 – 7,5 vol%) Ethanol produziert werden.

4.2.5 Heferückführung: Das repeated batch-Verfahren

Voraussetzung für eine Fermentation im Großmaßstab ist die Bereitstellung von ausreichend Biomasse (Abschnitt 4.1.3). Je nach Skalierungsgröße bzw. Verarbeitungsvolumen dauert die Produktion des Inokulums für die Fermentationsstufe bis zu 2 Tage. Vereinfachen lässt sich die Prozessführung durch die Rückgewinnung und Rückführung der Hefe nach abgeschlossener Fermentation. Dadurch wird der Aufwand minimiert und Ressourcen eingespart. Das bedeutet, die Hefe wird nach erfolgter Fermentation durch ein geeignetes Trennverfahren, wie kontinuierlicher Zentrifugation oder einem Separator, vom Medium abgetrennt und in einer nächsten Fermentation direkt wieder eingesetzt. Das ermöglicht eine halbkontinuierliche Prozessführung. Das Prinzip wurde in vorangegangenen Arbeiten bereits getestet [7]. Dabei konnten die Hefen ohne Aktivitätseinbußen bei der Prozessdauer bis zu dreimal erfolgreich wieder verwertet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde getestet, ob sich der repeated batch-Modus weiter ausdehnen lässt, ohne dass die Hefe an Aktivität verliert, und ob sich das Verfahren auch bei höheren TEM 30 Konzentrationen eignet. Bei einer TEM 30-Konzentration von 50 % konnte die Hefe 5-malig ohne Aktivitätsverlust wieder eingesetzt werden. Bei einer TEM 30-Konzentration von 60 % behielt die Hefe ihre Aktivität bei 4-maliger Wiederverwertung ebenfalls, allerdings konnten die jeweiligen Prozesse aufgrund zu niedriger Anfangsbiomasse nicht abgeschlossen werden (siehe Abbildung 4-25).

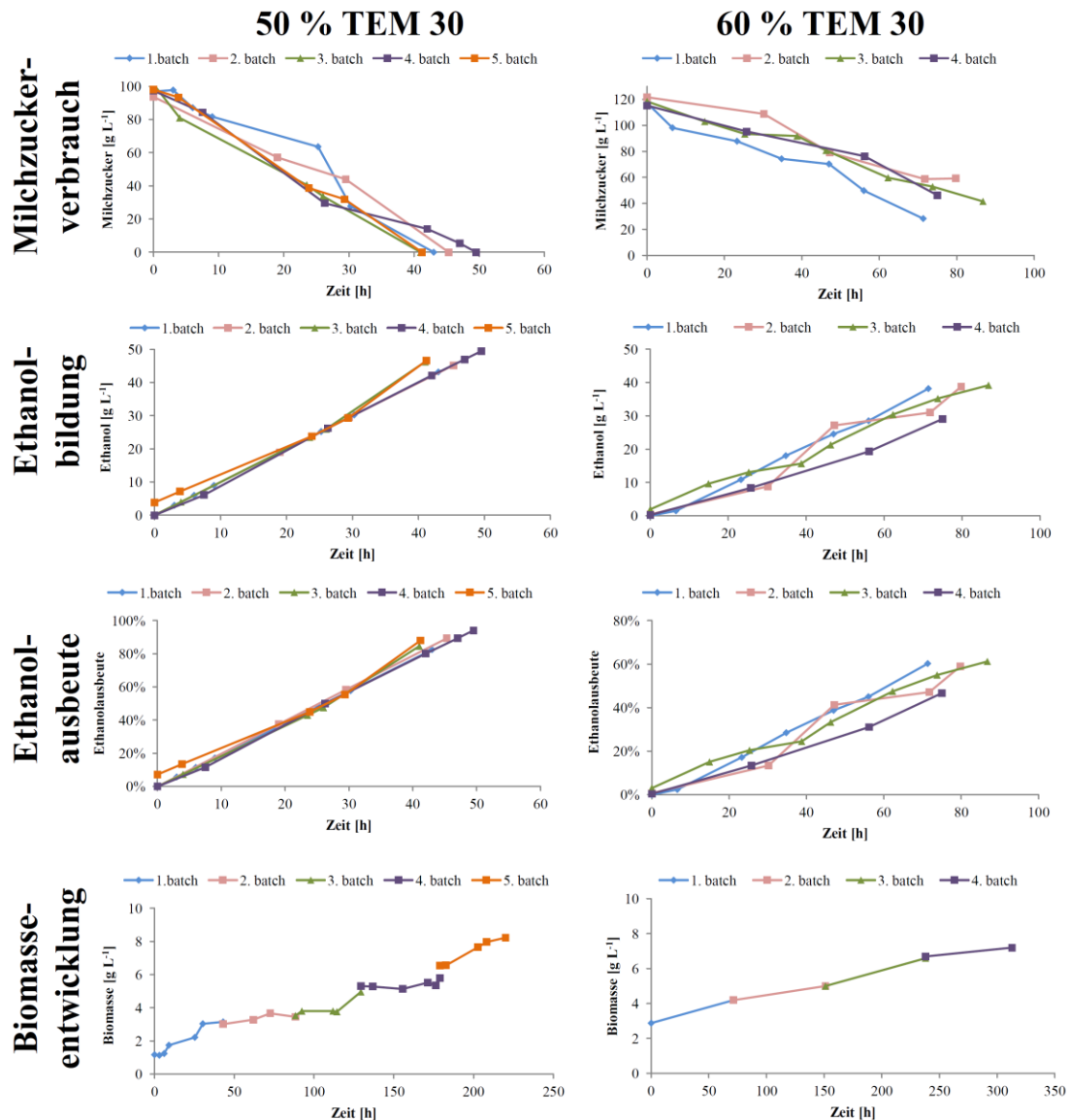


Abbildung 4-25: Vergärung von 50% (v/v) und 60% (v/v) TEM 30 im repeated batch-Modus (*K. marxianus* DSM 5422, 300 mL Schüttelkolben, 110 rpm, pH 5,7, 30 °C, 1,1 g L⁻¹ iBTM im 1. batch, bzw. 2 L Bioreaktor, 200 rpm, pH 5,7, 37 °C, 2,9 g L⁻¹ iBTM im 1. batch).

Bei einer TEM 30-Konzentration von 50% (v/v) verlaufen der Milchzuckerverbrauch, die Ethanolbildung und die Ausbeute bei den Ansätzen nahezu gleich. Die Hefe verliert durch einen Mehrfacheinsatz nicht an Aktivität. Während der repeated batch-Kaskade steigt die gemessene Biomasse mit jedem batch-Ansatz an. Diese ist zum Einen auf einen Biomassezuwachs und zum Anderen durch Akkumulation ungelöster Teilchen (Salz, Protein) zurückzuführen. Eine höhere Biomasse könnte zu einem schnelleren Prozess führen. Die Akkumulation an ungelösten Teilchen könnte den Prozess allerdings auch verlangsamen. Diese Problematik wird bei steigender TEM 30-Konzentration verstärkt.

Bei einer TEM 30-Konzentration von 60% (v/v) verlaufen der Milchzuckerverbrauch, die Ethanolbildung und die Ausbeute ebenfalls sehr ähnlich, aber unvollständig. Die Prozesse wurden zu früh beendet. Anhand der Verläufe lässt sich aber die Problematik der Akkumulation an ungelösten Teilchen beobachten. Bereits im 2. Ansatz wird der Prozess langsamer und mit jedem weiteren Prozess verliert die Hefe weiter an Aktivität, da die Verläufe zunehmend schlechter werden.

4.2.5.1 Zwischenfazit

Im Schüttelkolbenmaßstab konnte gezeigt werden, dass die mehrfache Wiederverwertung der Hefe nach abgeschlossener Fermentation von 50% (v/v) TEM 30 problemlos bis zu 5-mal möglich ist. Die Prozesse verlaufen dabei analog. Bei der Fermentation von TEM 30-Konzentration $>50\%$ ist der Verlauf des ersten batch-Ansatzes entscheidend für die folgenden Prozesse. Mit Abtrennung der Hefe mittels Zentrifugation wird zudem die unlösliche Fraktion des TEM 30 in den folgenden batch-Ansätzen angereichert. Dies erschwert den Prozess besonders bei höheren TEM 30-Konzentrationen zusätzlich.

4.2.6 Fed batch-Strategie zur Vergärung von TEM 30

Generell verlaufen Hefewachstum und Gärung aufgrund der geringen osmotischen Belastung besser in stärker verdünntem Medium. Daher soll evaluiert werden, ob sich eine fed batch-Strategie zur Fermentation besser eignet als die normale batch-Fermentation. Der Hintergrund der fed batch-Strategie ist, dass sich eine ansteigende osmotische Belastung durch Substrat und Salz über den Prozesszeitraum ergibt. Die Hefen haben mehr Zeit sich an das Medium zu adaptieren. In Vorversuchen im Schüttelkolbenmaßstab wurden die besten Bedingungen für die fed batch-Strategie herausgearbeitet. Variiert wurden die initiale TEM 30-Konzentration (zwischen 30 – 50% (v/v)), die Zugabezeitpunkte des Feeds, sowie die Feed-Strategie (1 oder 2 Feeds). Am schnellsten verlief die Fermentation bei einer geringen initialen TEM 30-Konzentration (30% (v/v)) und zwei weiteren Substratzugaben. Diese Strategie wurde in den Reaktormaßstab (10 L, siehe Abbildung 4-26) übertragen und im Vergleich mit

einer batch-Strategie (60% TEM 30) unter gleichen Bedingungen erneut durchgeführt (siehe Abbildung 4-27).

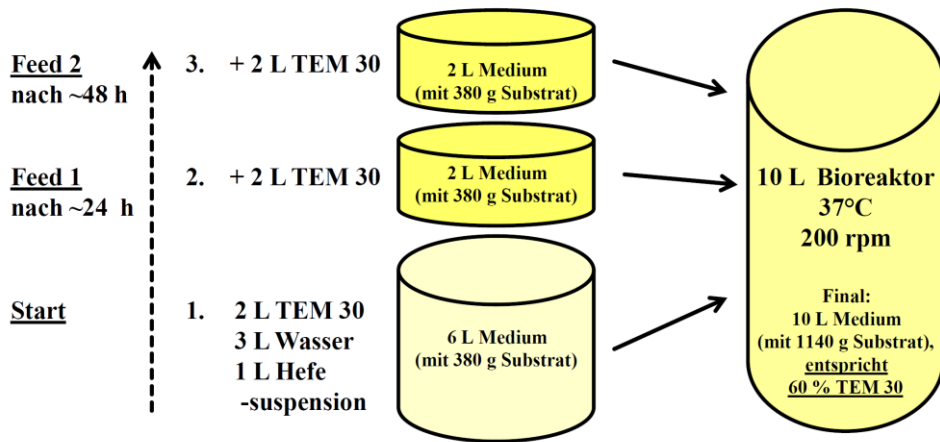


Abbildung 4-26: Schema zur durchgeführten fed batch-Strategie.

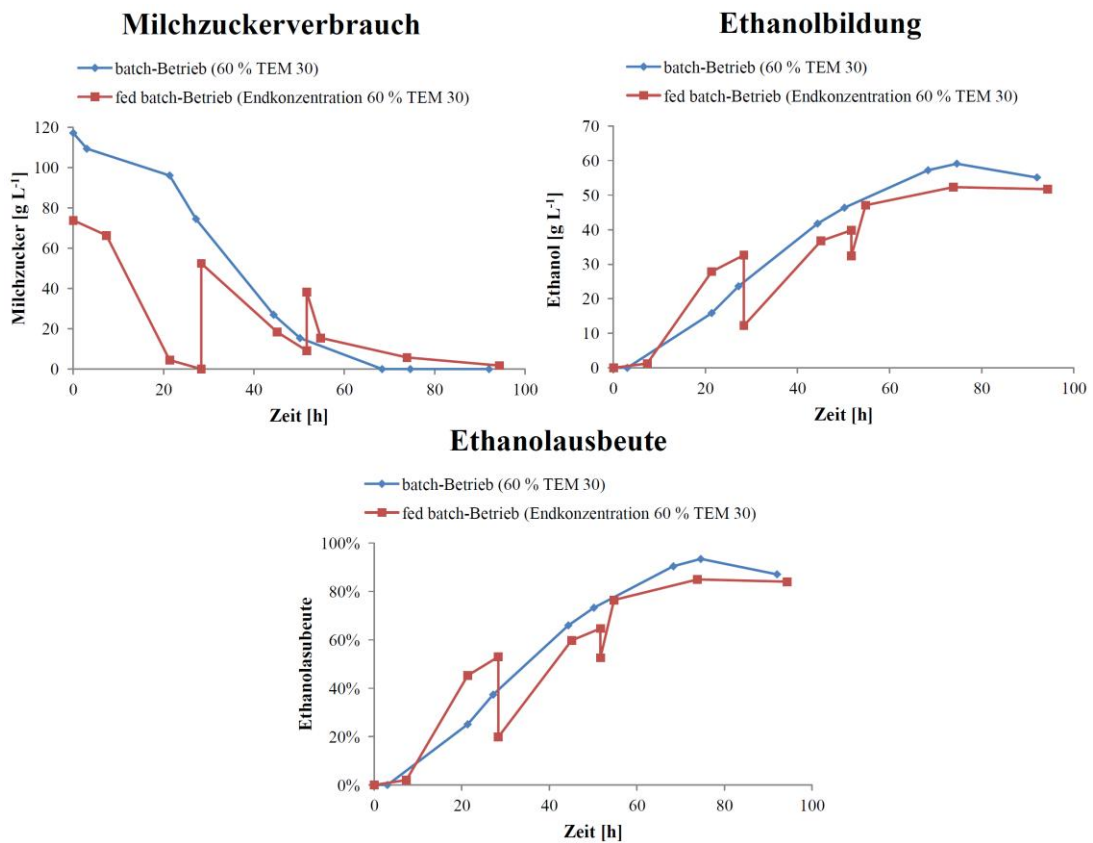


Abbildung 4-27: Vergleich von batch- und fed batch-Strategie zur Vergärung von TEM 30 (*K. marxianus* DSM 5422, 10 L-Bioreaktor, 200 rpm, pH 5,7, 37 °C, 1,2 g L⁻¹ iBTM).

Im direkten Vergleich sind die auf verschiedene Arten geführten Prozesse im Ethanolgehalt, in der Ausbeute und in der Prozessdauer nahezu gleich. Der batch-Prozess ist nach etwa 65 h beendet und der fed batch-Ansatz nach 75 h. Der anfängliche Vorteil der geringeren initialen TEM 30-Konzentration und der dadurch geringeren osmotischen Belastung im fed batch-Ansatz egalisiert sich im Verlauf der Prozesse. Dabei wird im batch-Prozess mit 59 g L^{-1} ein etwas höherer Ethanolgehalt erreicht als bei dem fed batch-Ansatz mit 52 g L^{-1} . In beiden Ansätzen werden dabei Ethanolausbeuten von über 85% erreicht. Es konnte somit gezeigt werden, dass eine fed batch-Strategie keinen Vorteil gegenüber einer batch-Strategie hat. Aufgrund der einfacheren Handhabung sollte der Prozess im batch-Betrieb geführt werden.

Zwischenfazit

Eine fed batch-Strategie zur Fermentation von TEM 30 bringt keine Vorteile hinsichtlich der Fermentationsdauer im Gegensatz zu einer normalen batch-Strategie. Aufgrund der einfacheren Prozessführung sollte die batch-Strategie die Methode der Wahl sein.

4.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Ethanolgewinnung aus TEM 30

Im zweiten Teil wurde die Ethanolgewinnung aus TEM 30 optimiert. Die hohe Salzfracht in TEM 30 hemmt die Fermentation. Eine Entsalzung von TEM 30 konnte mit hohem apparativem Aufwand erreicht werden. TEM 30 eignete sich als Suspension allerdings nur bedingt für eine technische Entsalzung. Eine aufwändige Teilentsalzung mittels Nanofiltration und Elektrodialyse führte aber zu einer verkürzten Prozessdauer und zu höheren finalen Ethanolkonzentrationen. Für eine industrielle Anwendbarkeit eignete sich keines der getesteten Verfahren, sodass eine Salzverminderung durch Verdünnung die Methode der Wahl bleibt.

Bei der Optimierung der Fermentationsbedingungen von verdünntem TEM 30 im Schüttelkolbenmaßstab zeigte sich, dass sich der Fermentationsprozess bei einer TEM 30-Konzentration von 60% (v/v) durch Erhöhung der Temperatur ($37 \text{ }^\circ\text{C}$), durch hohe Biomassekonzentrationen ($> 4 \text{ g L}^{-1}$) und den Zusatz von Hefeextrakt be-

schleunigen lässt. So konnten in weniger als 60 h mehr als 58 g L^{-1} (7,3 vol%) bei Ausbeuten von $> 90\%$ Ethanol produziert werden.

Ein Vergleich verschiedener Prozessführungen ergab, dass eine fed batch-Strategie zur Fermentation von TEM 30 keine Vorteile hinsichtlich Fermentationsdauer im Gegensatz zu einer normalen batch-Strategie bringt. Im repeated batch-Verfahren konnte gezeigt werden, dass der Mehrfacheinsatz der Hefe nach erfolgter Vergärung von 50% (v/v) TEM 30 bis zu 5-mal möglich ist. Bei der Fermentation höherer TEM 30-Konzentrationen ($> 60\%$ (v/v)) erwies sich die Prozessführung im repeated batch-Verfahren als schwieriger, sodass dieses repeated batch-Verfahren weiterer Optimierungen bedarf.

Der Prozess zur energetischen Verwertung von TEM 30 konnte stabil bis im Kubikmetermaßstab reproduziert werden. Dabei wurden unabhängig von der Skalierungsstufe vom Schüttelkolbenmaßstab über den Laborreaktormaßstab bis in den 2.000 L-Maßstab identische Prozessverläufe erhalten. In 80 – 90 h konnten mit einer initialen Biomassekonzentration von ca. $1,0 \text{ g L}^{-1}$ aus $115 - 125 \text{ g L}^{-1}$ Milchzucker etwa $53 - 59 \text{ g L}^{-1}$ (6,7 – 7,5 vol%) Ethanol produziert werden.

4.3 Aufstellung eines Gesamtkonzeptes

TEM 30 fällt jährlich bei der Firma Biolac GmbH & Co.KG (Harbarnsen) im industriellen Maßstab von über 50.000 t an. Die industrielle Verwertung, sei es stofflich oder energetisch, birgt folgende Herausforderungen, die beachtet werden müssen:

- Evaluierung eines stabilen und reproduzierbaren Prozesses.
- Einfachheit des Prozesses (Eine Prozessführung sollte in jeder Stufe auch für minderqualifiziertes Personal möglich sein).
- Etablierung einer einfach implementierbaren Prozessüberwachung.

Zu diesen Punkten wurde im Rahmen der praktischen Arbeiten (siehe 4.1 und 4.2) Stellung genommen. Die Aufstellung eines Gesamtkonzeptes zur Verwertung von TEM 30 konnte im Rahmen der Arbeiten jedoch nicht abgeschlossen werden. Im Folgenden sollen noch einige Aspekte dargestellt werden.

4.3.1 Übersicht

Ein Gesamtkonzept sollte neben dem experimentell entwickelten und optimierten Prozess folgende Punkte enthalten:

- Rohstofflagerung und Aufbereitung.
- Stammhaltung und Lagerung.
- Auslegung der Verarbeitungsvolumina bzw. –skalierung.
- Abwasserverwertung bzw. –entsorgung.

Im Folgenden wird zu jedem der genannten Punkte kurz Stellung genommen.

4.3.1.1 Rohstofflagerung und –aufbereitung

Im Verlauf der Molkenverarbeitung durchlaufen die erhaltenen Konzentrate, wie TEM 30, diverse Erwärmungsschritte. Insbesondere im Verdampfer werden hohe Temperaturen erreicht. Nach der Verarbeitung liegt das TEM 30 nahezu keimfrei vor. Für eine schnelle biotechnologische Weiterverwertung ist nicht zwingend eine Aufbe-

reitung durch Pasteurisation erforderlich. Das konnte auch durch Experimente bestätigt werden, in denen unsteriles TEM 30 verwendet wurde. Zudem ist auch die sterile Prozessführung bei hohen TEM 30-Konzentrationen (> 50%) und hohen initialen Hefekonzentrationen nicht notwendig. Die Hefe ist unter den gezeigten Prozessbedingungen stabiler als andere konkurrierende Mikroorganismen.

Ein weiterer Punkt ist die Lagerung des Rohstoffes. Sowohl bei kühler (6 °C) als auch bei raumtemperierter Lagerung konnte keine Änderung des pH-Wertes oder der Substratkonzentration von unverdünntem TEM 30 festgestellt werden. Da Sterilkontrollen von unbehandeltem TEM 30 bei 30 °C allerdings überwuchsen, ist eine frische Verarbeitung oder eine Keimreduktion stets der sichere Weg.

4.3.1.2 Stammhaltung und Lagerung

Generell lassen sich die verwendeten Hefen längerfristig sicher und als Reinzucht lagern. Dafür ist weder großer apparatischer Aufwand noch Erfahrung notwendig. Geeignet sind Gefrierkulturen, die mehrere Jahre haltbar sind oder Agarplatten. Die dafür notwendigen Arbeiten sind nach Einweisung auch von unqualifiziertem Personal durchführbar. Die Stammlagerung ist der Grundstein für die Hefeanzucht, aus der im weiteren Verlauf jeweils die Aufskalierung hervorgeht. Neben dieser Möglichkeit, ist auch die Lagerung einer Kultur über mehrere Tage bei 4°C für eine spätere Weiterverarbeitung möglich. Die Hefen werden in der Kühlung in ihrem derzeitigen Wachstumsstadium angehalten. Der Unterschied zwischen einer frisch angezogenen Kultur und einer Lagerkultur ist marginal und für eine weitere Anzucht irrelevant. Sobald die Hefe mit Substrat und Sauerstoff versorgt werden, setzt ein erneutes Wachstum ein. Ebenso kann die Hefe aus ihrem aktuellen Stadium auch in ein anderes Stadium wechseln. Sollte eine Hefe aus einem Gärprozess kommen, so tritt sie bei Sauerstoffzufuhr wieder in die Atmung also in das Wachstum ein. Genauso wird die Hefe bei Sauerstoffmangel umgehend mit der alkoholischen Gärung beginnen. Das vereinfacht den Start eines neuen Prozesses enorm.

Ein wichtiger Punkt ist die Prozessführung im repeated batch-Modus. Gelingt die Rückgewinnung und Wiederverwertung der Hefe nach abgeschlossener Fermentation, ist eine Art halbkontinuierliche Prozessführung möglich. Da die Anzucht über einen

längeren Zeitraum weggefällt, vereinfacht sich die Prozessüberwachung langfristig. Dies ist ein entscheidender Punkt hinsichtlich der Effektivität und Rentabilität des Gesamtkonzeptes.

4.3.1.3 Auslegung der Verarbeitungsskalierung

Der Prozess wurde bis in den Kubikmetermaßstab erfolgreich evaluiert (vgl. 4.1.3 und 4.2.4). Eine industrielle Verwertung erfordert allerdings weitaus größere Arbeitsvolumina. Die dargestellten Ergebnisse lassen einen positiven Ausblick auf eine mögliche weitere Aufskalierung zu. Die Prozesskette (vgl. Abbildung 4-6) sollte somit noch um zwei Stufen erweitert werden, sodass die industrielle Verarbeitung evaluiert und realisiert werden kann. Dafür sind natürlich geeignete Reaktorsysteme erforderlich, um mögliche, in dieser Arbeit aufgezeigte Probleme umgehen zu können. Besonders die Sauerstoffversorgung für die Biomassegewinnung ist dabei eine interessante Herausforderung.

4.3.1.4 Abwasserverwertung und Entsorgung

Auch nach biotechnologischer Verwertung des Reststoffes TEM 30 bleibt nach Destillation wiederum ein Reststoff zurück; der in erster Linie in seinem organischen Anteil verringert wurde. In weiteren Experimenten wurde die Abwasserbelastung von TEM 30 und des Destillationsrückstands (nach abgeschlossenem Bioprozess und Abtrennung des Ethanol) bestimmt. Dabei wurde eine Verminderung der organischen Belastung, bestimmt über den chemischen Sauerstoffbedarf (CSB), um über 60% erreicht [23]. Denkbar ist zudem eine anschließende sekundäre Verwertung des Destillationsrückstands in der Biogasanlage. Die Verwertung von Molke zur Biogasproduktion ist beschrieben und steht auch in Konkurrenz zu der in dieser Arbeit angestrebten Verwertung zu Bioethanol. Die nachgeschaltete Verwertung in der Biogasanlage hätte den Vorteil, dass die organische Belastung noch weiter gesenkt würde. Eine Einleitung in das kommunale Abwasser ist aufgrund der hohen organischen und anorganischen Belastung nicht möglich.

4.3.2 Bewertung und Bilanzierung der energetischen Nutzung von TEM 30

Biochemisch kann man aus 1 g Zucker 0,538 g Ethanol produzieren. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist praktisch eine Ausbeute von 85 - 90% erreichbar. Das bedeutet, dass aus 1 g Zucker maximal 0,48 g Ethanol produziert werden können. Eine Fermentation unter den angestrebten Bedingungen von TEM 30 in einer Konzentration von 60 - 65% (v/v) dauert 70 – 80 h. Dazu kommen die Rüstzeit des Reaktorsystems sowie eine eventuelle Hefeseperation. Zusammen sind das etwa 100 h, was bedeutet, dass man im Jahr etwa 90 Prozesse - unabhängig von der Skalierung - fahren könnte.

Setzt man ein Arbeitsvolumen von 150 m³ an, von dem 60% bzw. 65% (v/v) auf TEM 30 fällt, so könnten jährlich in einem Reaktor 8.100 t bzw. 8.800 t TEM 30 biotechnologisch verarbeitet werden. Die Menge TEM 30 enthält etwa 1.500 t bzw. 1.700 t Milchzucker, welches zu Bioethanol umgesetzt werden könnte. Daraus entstünden nach den o.g. Ausbeuten etwa 730 t bzw. 830 t Bioethanol.

Die Jahresproduktion an Bioethanol in Deutschland lag in 2012 bei über 600.000 t, die zu 66% aus Getreide, zu 31% aus Rüben bzw. Melasse und nur zu 1% aus anderen Rohstoffen hergestellt wurden [1]. Deutschlandweit gesehen bietet die biotechnologische Wertschöpfung von Molke nicht die Möglichkeit, dem Kraftstoffmarkt große Mengen an Bioethanol beizusteuern. Bezogen auf die Molkereiindustrie bietet diese Art der Reststoffverwertung aber die Möglichkeiten, die Ökobilanz der Unternehmen zu verbessern und die Abwasserbelastung zu senken. Dabei spart jeder Liter Biokraftstoff zusätzlich die Förderung von fossilen Rohstoffen ein – was ganz im Zeichen der heutigen Zeit steht.

4.3.3 Alternative Prozessführungen - Erweiterung der bestehenden Verarbeitungskette von Molkenpermeat

TEM 30 eignet sich nur bedingt für die in Abschnitt 4.2.2 beschriebenen Entsalzungsstrategien. Stattdessen würde sich eine Anwendung beispielsweise besser als Vorstufe bei der Verarbeitung des Molkenpermeates anbieten. In dieser Fraktion ist der größte Teil an Proteinen bereits abgetrennt. Die Verarbeitung mit einer Membrananwendung

wie Elektrodialyse, Nanofiltration wäre somit möglich. Zudem handelt es sich bei Molkenpermeat um eine klare Lösung, die – zumindest frisch verarbeitet - keine ungelösten Teilchen enthält. Dazu käme der Vorteil, dass sich die verminderte Salzkonzentration auch auf die Auskristallisierung des Milchzuckers auswirken könnte [41, 43, 97, 98]. Dies erfordert eine Neu- bzw. Umstrukturierung der Verarbeitungskette (Abbildung 4-28).

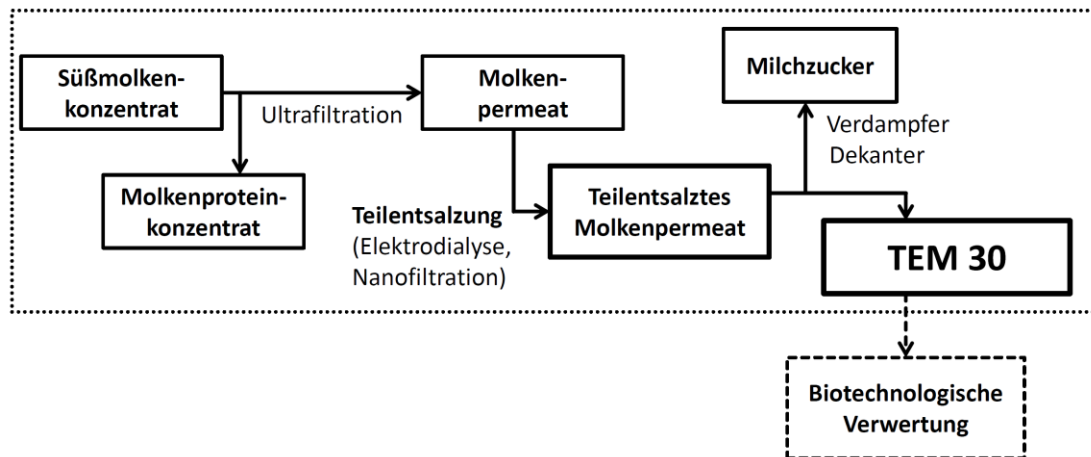


Abbildung 4-28: Neustrukturierte Verarbeitungskette von Süßmolkenpermeat mit zwischengeschaltetem Entsalzungsschritt in Anlehnung an Abbildung 3-4.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der Molkereiindustrie fallen große Mengen an organisch belastetem Abwasser an. Nach heutigem Stand der Technik lassen sich aus der Molke ein Teil der Proteine und des Milchzuckers zurückgewinnen. Die Herausforderung ist die Verminderung der hohen Abwasserlast der entstehenden Reststoffströme. Eine Verminderung der organischen Abwasserbelastung kann durch eine biotechnologische Behandlung erfolgen. Eine wertschöpfende und nachhaltige Nutzung der anfallenden Molkenkonzentrate ist im großtechnischen und industriellen Maßstab in erster Linie durch die Verwertung zu Bioethanol und Biogas zu erreichen. Auf diese Weise lassen sich Bioenergieträger gewinnen und die Umweltbelastung senken.

Das als Abwasser zurückbleibende teilentzuckerte Molkenkonzentrat (TEM 30) enthält etwa 18% (w/v) Milchzucker und geringe Mengen an Protein (1%, w/v). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die biotechnologische Verwertung hinsichtlich einer stofflichen und energetischen Nutzung von TEM 30 evaluiert. Die biotechnologische Nutzung erfolgte in zwei Stufen: Das TEM 30 wurde sowohl für die Hefeanzucht als auch zur Fermentation eingesetzt. Für die Prozesse wurden Hefen der Spezies *Kluyveromyces marxianus* ausgewählt. Dabei konnte gezeigt werden, dass mit den aufgestellten optimalen Prozessgrößen und -bedingungen eine reproduzierbare Prozessführung vom Labormaßstab bis in den Kubikmetermaßstab bis 2.000 L Arbeitsvolumen erfolgen kann.

In dem ersten Teil dieser Dissertation wurde die Hefeanzucht in TEM 30 dargestellt. Im Labormaßstab konnten optimierte Prozessvariablen für die Biomassegewinnung herausgestellt werden. Diese führten zu einer deutlichen Verkürzung der Anzuchtdauer bei höheren finalen Hefekonzentrationen. Die Ansatzpunkte dafür waren eine Erhöhung der TEM 30-Konzentration (20% (v/v)), eine Erhöhung der Temperatur (37 °C), eine Erhöhung der Anfangshefekonzentration (0,4 g L⁻¹) und der Zusatz von Hefeextrakt (0,1% (w/v)). Danach ist eine optimierte Anzucht in 20% TEM 30, bei 37 °C, unter Zusatz von 0,1% (w/v) Hefeextrakt und bei einer adäquaten Sauerstoffversorgung möglich.

Die Biomassegewinnung in TEM 30 konnte in einem Seed-Train bis in den Kubikmetermaßstab (1.700 L) reproduziert werden. Dabei wurden Hefekonzentrationen

nen von über 8 g L^{-1} (bei $Y_{X/S} > 0,25 \text{ g}_{\text{Biomasse}} \text{ g}^{-1}_{\text{Substrat}}$) erreicht. Wichtig für die Biomassegewinnung ist eine gute Sauerstoffversorgung, die trotz paralleler Ethanolbildung ein gutes Hefewachstum begünstigt. Generell verlief die Anzucht in Rührkesselreaktoren aufgrund besserer Sauerstoffversorgung besser als in Blasensäulenreaktoren. Die auf diese Weise gebildete Hefe kann als Inokulum für eine weitere Aufskalierung oder eine Fermentation zur Ethanolproduktion eingesetzt werden. Als geeignete Analytik zur online-Prozessüberwachung im Reaktormaßstab erwiesen sich die Messung der Abgaszusammensetzung und die Messung der Sauerstoffsättigung.

Im zweiten Teil wurde die Ethanolgewinnung aus TEM 30 mittels Hefen evaluiert und weiterentwickelt. Die hohe Salzfracht in TEM 30 hemmt eine Fermentation. Eine Verminderung der Salzkonzentration kann mit verschiedenen Methoden erreicht werden. Dabei ist TEM 30 für eine Entsalzung als suspensive Prozessfraktion eher ungeeignet. Zur Verminderung der Salzkonzentration wurden verschiedene technische Verfahren zur Teilentsalzung getestet. Insbesondere mittels Nanofiltration und Elektrodialyse konnte eine Teilentsalzung bis zu 80% erreicht werden, die die Prozessdauer verkürzte und zu höheren finalen Ethanolkonzentrationen führte. Für eine industrielle Anwendbarkeit eignete sich keines der getesteten Verfahren, sodass eine Salzverminderung durch Verdünnung die Methode der Wahl bleibt.

Bei der Optimierung der Fermentationsbedingungen von verdünntem TEM 30 im Schüttelkolbenmaßstab zeigte sich, dass sich der Fermentationsprozess bei einer TEM 30-Konzentration von 60% (v/v) durch Erhöhung der Temperatur ($37 \text{ }^\circ\text{C}$), durch hohe Biomassekonzentrationen ($> 4 \text{ g L}^{-1}$) und den Zusatz von Hefeextrakt beschleunigen lässt. So konnten in weniger als 60 h über 58 g L^{-1} (7,3 vol%) Ethanol bei Ausbeuten über 90% produziert werden. Eine fed batch-Strategie zur Fermentation von TEM 30 bringt keine Vorteile hinsichtlich Fermentationsdauer im Gegensatz zu einer normalen batch-Strategie.

Der Prozess zur energetischen Verwertung von TEM 30 konnte stabil bis im Kubikmetermaßstab reproduziert werden. Dabei wurden unabhängig von der Skalierungsstufe vom Schüttelkolbenmaßstab über den Laborreaktormaßstab bis in den 2.000 L-Maßstab sehr ähnliche Prozessverläufe erhalten. In 80 – 90 h konnten mit einer initialen Biomassekonzentration von ca. $1,0 \text{ g L}^{-1}$ aus $115 - 125 \text{ g L}^{-1}$ Milchzucker etwa $53 - 59 \text{ g L}^{-1}$ (6,7 – 7,5 vol%) Ethanol produziert werden.

Eine Heferückführung führt zu einer erleichterten Prozessführung, da eine erneute Hefeanzucht nicht für jede Fermentation erfolgen muss. Im repeated batch-Verfahren konnte gezeigt werden, dass der Mehrfacheinsatz der Hefe nach erfolgter Vergärung von 50% (v/v) TEM 30 bis zu 5-mal möglich ist. Bei der Fermentation höherer TEM 30-Konzentrationen (> 60% (v/v)) erwies sich die Prozessführung im repeated batch-Verfahren als schwieriger, sodass das repeated batch-Verfahren weiterer Optimierung bedarf.

Für die Verwertung von TEM 30 wird eine biotechnologische Nutzung im industriellen Maßstab angestrebt. Aus den durchgeführten Versuchen zur Biomasse- und Ethanolgewinnung insbesondere im Kubikmetermaßstab lassen sich wichtige Schlüsse ziehen, auf der eine weitere Vergrößerung des Verarbeitungsmaßstabs aufbauen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Grundstein für ein Verwertungskonzept gelegt.

Durch die Fermentation von TEM 30 zu Ethanol lässt sich die organische Belastung um etwa 60% senken. Eine weitere Verwertung des anfallenden Prozessabwassers nach der Fermentation und Destillation zur Gewinnung von Biogas würde die Wertschöpfungskette weiter ergänzen. Dadurch ließe sich die organische Belastung noch weiter minimieren. Letztendlich bleiben in dem Restprodukt nur Salze zurück, die sich wiederum abscheiden bzw. gewinnen lassen. Auf diese Weise wäre eine nachhaltige und vollständige Verwertung der Abwasserbelastung der Molkereiindustrie möglich.

6 Anhang

6.1 Teilentzuckertes Molkenkonzentrat (TEM 30)

TEM 30 fällt als Restprodukt der Molkenverarbeitung bei der Firma Biolac GmbH & Co.KG (Harbarnsen) an. Die Analysedaten sind in Tabelle 6-1 und Tabelle 6-2 aufgelistet.

Tabelle 6-1: Datenblatt zu TEM 30

Chemische Daten:		Menge:	Physikalische Daten:	
Milchzucker (Monohydrat):		18,0% ± 2% (w/v)	pH:	5,0 - 6,0
Trockenmasse:		30,0% ± 2%		
Proteine (N*6,38):		(N*6,38) 3,0% ± 1% (w/v)		
Asche:		max. 16% (w/v)		
Energie (pro kg):		4,4 MJ=1051,6 kcal		
Salze:		Menge:	Mikrobiol. Daten:	Menge:
Kalium:	K ⁺	ca. 4,0%	Gesamtkeimzahl:	<50.000 /mL
Natrium:	Na ⁺	ca. 2,0%	Coliforme Keime:	negativ in 1 mL
Chlorid:	Cl ⁻	ca. 4,0%	Hefen/Schimmel:	<2.000 /mL
Phosphor:	PO ₄ ³⁻	ca. 0,4%	Salmonellen:	negativ in 1 mL
Kalzium:	Ca ²⁺	ca. 4,0%		
Magnesium:	Mg ²⁺	ca. 0,1%		

Tabelle 6-2: Übersicht des Aminosäurespektrum in TEM 30

Aminosäure (je 100 g)	Menge:	Aminosäure (je 100 g)	Menge:
L-Arginin:	206 mg	L-Tryptophan:	18 mg
L-Cystin:	22 mg	L-Tyrosin:	27 mg
L-Histin:	23 mg	L-Valin:	79 mg
L-Isoleucin:	70 mg	L-Alanin:	89 mg
L-Leucin:	111 mg	L-Asparaginsäure:	151 mg
L-Lysin:	95 mg	L-Glutaminsäure:	272 mg
L-Methionin:	31 mg	L-Glycin:	52 mg
L-Phenylalanin:	56 mg	L-Prolin:	80 mg
L-Threonin:	83 mg	L-Serin:	71 mg

6.2 Verwendete Zellen

Kluyveromyces marxianus DSM 5422, Isolat aus Joghurt [99];

Kluyveromyces marxianus DSM 70073, Isolat aus Buttermilch [99];

Bezogen vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig);

Kluyveromyces marxianus CBS 6556, Isolat aus fermentiertem Maisbrei [100];

Bezogen vom Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Niederlande).

6.3 Verwendete Medien

Medium	Substanz	Quelle	Menge [g L⁻¹]
YMPL:	Hefeextrakt	Fluka	3,0
	Malzextrakt	Roth	3,0
	Soja-Pepton	Sigma-Aldrich	5,0
	Milchzucker	Fluka	20,0
YMPL \$\$\$	wie YMPL, nur mit:		
YMPL 100	Milchzucker	Fluka	100,0
YMPL 150	Milchzucker	Fluka	150,0
YMPL 200	Milchzucker	Fluka	200,0
YMPL-Agar	Hefeextrakt	Fluka	3,0
	Malzextrakt	Roth	3,0
	Soja-Pepton	Sigma-Aldrich	5,0
	Agar	Fluka	
	Milchzucker	Fluka	10,0

Die Medien wurden für 20 min bei 2 bar autoklaviert, wobei der Milchzucker gesondert autoklaviert und anschließend zugesetzt wurde.

Lösung	Quelle	Menge [g L⁻¹]
2,5% Na₂SO₄	Fluka	25,0
0,9% NaCl	Fluka	9,0

Alle verwendeten Medien und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (Arium, Sartorius, Göttingen) hergestellt, welches in dieser Arbeit als dd H₂O bezeichnet wurde.

6.4 Methoden

6.4.1 Lagerung der Hefestämme

Zur langfristigen Lagerung von bis zu 3 Jahren dienten Gefrierkulturen. Dafür wurde 1 mL einer wachsenden Hefekultur mit 50% (v/v) Glycerin gemischt und bei – 80 °C eingefroren.

Zur mittelfristigen und kurzfristigen Lagerung von bis zu 8 Wochen dienten Lebendkulturen auf Agarplatten mit YMPL-Agar. Die Platten wurden mit einer Hefesuspension einer wachsenden Reinkultur aus Flüssigmedium oder von Agarplatten beimpft und 24 - 48 h bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurden die Agarplatten bei 4 °C gelagert. Alle 4 – 8 Wochen wurden die Kulturen auf frische Agarplatten überimpft.

6.4.2 Anzucht der Hefe

Die Anzucht der Hefe in den Vorkulturen erfolgte in YMPL-Flüssigmedium. Dazu wurde steriles Medium in einen sterilen Schüttelkolben mit Schikanen überführt (1/5 des Kolbenvolumens) und mit Hefe versetzt. Die Hefe wurde mit einer Impföse von einer Agarplatte entnommen und im Kolben resuspendiert. Die Kulturen wurden anschließend für 17 – 18 h bei 30 °C und 150 rpm inkubiert.

Die Anzucht der Hauptkulturen für die Biomassegewinnung (vgl. 4.1) erfolgte in verschiedenen Skalierungsstufen.

6.4.2.1 Anzucht im Schüttelkoben mit Schikanen

Die jeweilige TEM 30-Konzentration wurde hergestellt, auf der Kochplatte bis zum Sieden erhitzt und dann abkühlen lassen. Das Medium wurde mit 3 mL einer Hefe-

suspension (vgl. 4.2) aus einer wachsenden Vorkultur inokuliert. Die Kulturen wurden bei unterschiedlichen Prozessbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Schüttelgeschwindigkeit) für 24 – 48 h inkubiert, wobei unter sterilen Bedingungen regelmäßig Proben entnommen wurden.

6.4.2.2 Anzucht im 2 L Bioreaktor

Die jeweilige TEM 30-Konzentration wurde angesetzt, auf der Kochplatte bis zum Sieden erhitzt, heiß in den Reaktorkessel gefüllt und dann heruntergekühlt. Das Medium wurde mit 100 mL einer Hefesuspension (vgl. 4.1.3) aus einer wachsenden Vorkultur inokuliert. Die Reaktorkultur wurde bei 37 °C, 1.000 rpm und 1 vvm Druckluft inkubiert. Eine Probenentnahme erfolgte nicht.

6.4.2.3 Anzucht im 10 L Bioreaktor

Die jeweilige TEM 30-Konzentration wurde im Reaktorkessel angesetzt, auf 100 °C erhitzt und abkühlen lassen. Das Medium wurde mit 200 mL (Vorkultur aus dem Schüttelkolben) bzw. 1 L (Vorkultur aus dem 2 L Bioreaktor) einer Hefesuspension aus einer wachsenden Vorkultur inokuliert. Die Reaktorkulturen wurden bei unterschiedlichen Prozessbedingungen (Temperatur, Rührergeschwindigkeit) für 8 -24 h inkubiert. Die jeweiligen Prozessbedingungen sind in Abschnitt 4.1.3 dargestellt. Die Überwachung der Reaktorkulturen erfolgte durch regelmäßige Probenentnahme unter sterilen Bedingungen. Im 10 L Rührkesselreaktor wurde zudem der pH-Wert, die Sauerstoffsättigung und die Abgaszusammensetzung (BlueInOne, BlueSens, Herten bzw. S 710, Sick, Hamburg, bzw. AO2020, ABB, Hamburg) gemessen. Die Sensoren wurden jeweils laut Herstellerangaben vor dem Einsatz kalibriert.

6.4.2.4 Anzucht im 50 L, 1.200 L und 1.700 L Bioreaktor

Die jeweilige TEM 30-Konzentration wurde im Reaktorkessel angesetzt, auf 85 °C erhitzt und abkühlen lassen. Das Medium im 50 L Reaktor wurde mit 5 L (Vorkultur aus dem 10 L Bioreaktor), das Medium in 1.200 L bzw. im 1.700 L Reaktor wurde

jeweils mit 50 L (Vorkultur aus dem 50 L Bioreaktor) einer Hefesuspension aus einer wachsenden Vorkultur inokuliert. Die Reaktorkulturen wurden bei unterschiedlichen Prozessbedingungen (Temperatur, Begasungsrate, Rührergeschwindigkeit) für 12 -17 h inkubiert. Die jeweiligen Prozessbedingungen sind in Abschnitt 4.1.3 dargestellt. Die Überwachung der Reaktorkulturen erfolgte durch regelmäßige Probenentnahme. Teilweise wurden zudem die Sauerstoffsättigung und die Abgaszusammensetzung (BlueInOne, BlueSens) gemessen; die jeweiligen Überwachungsprozesse sind in Abschnitt 4.1.3 dargestellt. Die Sensoren wurden jeweils laut Herstellerangaben vor dem Einsatz kalibriert.

6.4.3 Bestimmung der Biomassekonzentration

Die Biotrockenmasse (BTM, auch Biomasse) wurde mittels Korrelation aus der gemessenen optischen Dichte berechnet. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm. Dazu wurde das Gerät vorher mit einer 0,9%-igen (w/v) NaCl-Lösung kalibriert. Die Messung erfolgte in Plastik-Einwegküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die Proben wurden ggf. mit 0,9%-iger (w/v) NaCl-Lösung verdünnt, so dass die Extinktion stets unter 0,8 lag.

Für die Messung wurden folgende Photometer und Umrechnungswerte verwendet:

Photometer:	Korrelation (OD600 / BTM [g L^{-1}]):
Uvikon 922:	4,3
Multiscan Go:	2,1

Die Korrelation zwischen Biomasse und Extinktion ist in Abbildung 6-1 gezeigt.

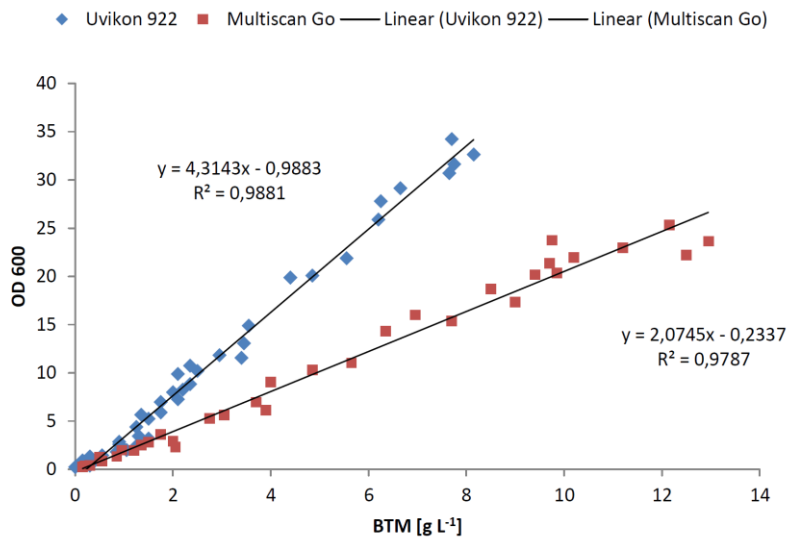


Abbildung 6-1: Korrelation zwischen der optischen Dichten und der Biotrockenmasse (BTM).

Für die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) wurde 1 mL Kulturbrühe in getrocknete 2 mL-Reaktionsgefäße, von denen das Leergewicht bestimmt wurde, gefüllt. Die Kulturbrühe wurde abzentrifugiert (16.060 x g, 5 min, Heraeus Pico, Thermo, Bonn) und der Zellüberstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde 48 h lang bei 85 °C im Ofen getrocknet. Anschließend wurde das Zellpellet ausgewogen. Aus der Differenz des Gefäßes mit trockenem Pellet und des leeren Gefäßes ergibt sich die BTM [g L^{-1}]. Je Probe erfolgte die Bestimmung der BTM zweifach.

6.4.4 Bestimmung des Milchzuckergehalts

Die Bestimmung der Milchzuckerkonzentration erfolgte mittels HPLC. Die aus den Bioprocessen entnommenen Proben wurden abzentrifugiert (16.060 x g, 5 min, Heraeus Pico, Thermo, Bonn) und der Überstand geeignet verdünnt. Die Verdünnung erfolgte mit 50% (v/v) Acetonitril in dd H₂O, sodass in den Messproben eine Milchzuckerkonzentration unterhalb von 4 g L⁻¹ vorlag.

Zur Kalibrierung dienen 5 Standards mit den Konzentrationen 0,1 g L⁻¹; 0,5 g L⁻¹; 1,0 g L⁻¹; 2,5 g L⁻¹ und 5 g L⁻¹. Die technischen Daten der HPLC sind Tabelle 6-3 zu entnehmen.

Tabelle 6-3: Technische Daten der HPLC.

Technische Kenngrößen	Bezeichnung/Einstellung
Säule	Shodex Asahipak NA2P-50 G 2 A
Vorsäule	Shodex Asahipak NA2P-50 2 D
Detektor	ESA, Corona CAD Detector
HPLC-Pumpe	Agilent 1200 Binary
Säulentemperatur	40 °C
Elutionsmittel	Acetonitril (75%, v/v)
Flussrate	0,4 mL min ⁻¹
Laufzeit pro Probe	8 min

6.4.5 Bestimmung des Ethanolgehalts

Die Bestimmung der Ethanolkonzentration der Fermentationsproben erfolgte durch Gaschromatographie. Die aus den Bioprozessen entnommen Proben wurden abzentrifugiert (16.060 x g, 5 min, Heraeus Pico, Thermo, Bonn). Der Überstand wurde dem mit internen Standard *n*-Propanol (Endkonzentration 8 g L⁻¹) versetzt und 1:10 mit Wasser verdünnt. Die Kalibrierung wurde als 3-Punkt-Kalibration mit Ethanolkonzentrationen von 10 g L⁻¹, 5 g L⁻¹ und 1,0 g L⁻¹ durchgeführt. Die technischen Daten der verwendeten Gaschromatographen sind Tabelle 6-4 und Tabelle 6-5 zu entnehmen.

Tabelle 6-4: Technische Daten des Gaschromatographen GC-2010 plus

Technische Kenngrößen	Bezeichnung/Einstellung
Gaschromatograph	GC-2010 plus (Shimadzu, Kyōto, Japan)
Säule	Supelcowax 10 (30 x 0,32 mm)
Injektortemperatur	180 °C
Säulentemperaturen	50 - 100 °C
Detektortemperatur	280 °C
Detektor	FID
Laufzeit pro Probe	11 min
Injektionsvolumen	0,2 µL
Interner Standard	<i>n</i> -Propanol (8 g L ⁻¹)
Träger	N ₂ 30 mL min ⁻¹

Tabelle 6-5: Technische Daten des Gaschromatographen GC-14 b

Technische Kenngrößen	Bezeichnung/Einstellung
Gaschromatograph	GC-14 b ((Shimadzu, Kyōto, Japan)
Säule	Chromosorb 101,80/100 6' · 18
Injektortemperatur	180 °C
Säulentemperaturen	160 °C
Detektortemperatur	220 °C
Detektor	FID
Laufzeit pro Probe	3,5 min
Injektionsvolumen	0,5 µL
Interner Standard	n-Propanol (8 g/L)
Trägergas	N ₂

6.4.6 Aufkonzentrierung der Hefen

Eine hohe Biomasse wurde durch Aufkonzentrierung der Hefe erreicht. Dazu wurden Zentrifugenröhrchen mit 50 mL Kulturbrühe gefüllt und 10 min bei 3.345 x g (Metafuge 1.0 RS, Heraeus, Osterode) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 mL 0,9%-iger (w/v) NaCL-Lösung resuspendiert und als Inokulum für die Vergärung eingesetzt. Bei größeren Volumina aus dem 2 L und 10 L Bioreaktor wurde die geerntete Zellbrühe, bis sich die Hefezellen abgesetzt haben, bei 6 °C für 18 h gelagert. Ein Teil des Überstandes wurde abdekantiert und verworfen. Die Zellen wurden in dem Rest wieder aufgeschlämmt und die Suspension wurde für weitere Fermentationsprozesse eingesetzt.

6.4.7 Vergärung von TEM 30 und anderen Lösungen

Die Vergärung des TEM 30 wurde in verschiedenen Skalierungsstufen durchgeführt.

6.4.7.1 Vergärung im Schüttelkolben ohne Schikanen

Die jeweilige TEM 30-Konzentration wurde angesetzt, auf der Kochplatte bis zum Sieden erhitzt und abkühlen lassen. Das Medium wurde mit einer Hefesuspension unterschiedlicher Biomassekonzentrationen (vgl. 4.2) inokuliert. Dabei betrug das Volumen 10% des Gesamtvolumens. Die Kolben wurden im Inkubator bei 110 rpm bei verschiedenen Prozessbedingungen für 80 - 150 h inkubiert. Die jeweiligen Prozessbedingungen sind in Abschnitt 4.1.3 dargestellt. Dabei wurden unter unsterilen Bedingungen regelmäßig Proben gezogen.

6.4.7.2 Vergärung im 2 L, 10 L und 30 L Bioreaktor

Die jeweilige TEM 30-Konzentrationen wurden im Reaktorkessel angesetzt und temperiert. Das Medium wurde mit einer Hefesuspension unterschiedlicher Biomassekonzentrationen (vgl. 4.2 und 6.4.6) inokuliert. Dabei betrug das Volumen 10% des Gesamtvolumens. Die Reaktorkulturen wurden bei 200 rpm und bei verschiedenen Prozessbedingungen für 80 – 150 h inkubiert. Die jeweiligen Prozessbedingungen sind in den jeweiligen Abschnitten (4.2.6, 4.2.5 und 4.2.4) dargestellt. Dabei wurden zur Prozessüberwachung regelmäßig Proben entnommen.

6.4.7.3 Vergärung im 2.000 L Bioreaktor

Die Vergärung erfolgte anschließend an die Anzucht im 1.700 L Maßstab (vgl. 4.1.3). Dazu wurde die Kulturbrühe aus der Anzucht bis auf 300 L abgelassen und mit Wasser und TEM 30 auf 2.000 L aufgefüllt, so dass sich eine TEM 30-Konzentration von 65% (v/v) ergab. Anschließend wurde der Reaktor auf 30 °C temperiert. Die Durchmischung wurde durch eine leichte Begasung und einen Umwufbetrieb gewährleistet. Dabei wurden zur Prozessüberwachung regelmäßig Proben gezogen.

6.4.8 Entsalzung von TEM 30 mittels Kationenaustauschern

Die Entsalzung mittels Kationenaustauschern wurde in einer Säule der Marke Omnifit (Diba Industries Ltd., Danbury, USA) durchgeführt. Der Innendurchmesser betrug 25 mm, wodurch sich eine Querschnittsfläche von $4,91 \text{ cm}^2$ ergab. Die Länge der Säule ist 150 mm. Begrenzt ist die Säule von einem festen und einem verstellbaren Endstück, sodass eine Begrenzung des Volumens bzw. ein direkter Abschluss des Füllmaterials nach oben und unten möglich war und kein totes Kopfraumvolumen entstand. Die eingesetzten Fritten bestehen aus Polyethylen und haben eine Porengröße von $25 \text{ }\mu\text{m}$. Bevor die Kationenaustauscher des Typs Amberlite FPC 23H (Dow chemicals, USA) in der Säule eingesetzt wurden, wurde das Material in deionisiertem Wasser quellen gelassen und gewaschen. In der Säule wurden dann 50 mL des Materials eingesetzt, was einem Bettvolumen (BV) entspricht. Da Suspensionen zur Verblockung des Materials führen würden, wurde die TEM 30-Klarphase nach Zentrifugation ($8.000 \times g$, 10 min, Contifuge stratos, Heraeus, Osterode) verwendet. Die TEM 30-Klarphase wurde dann aufströmend mit einer Flussrate von 6 BV h^{-1} durch die Säule gepumpt (Scilog, USA). Der Durchfluss wurde in 15 mL Fraktionen gesammelt, von denen jeweils der pH-Wert gemessen wurde. Anhand des pH-Wertes wurde eine Durchbruchcharakteristik erstellt.

6.4.9 Entsalzung von TEM 30 mittels Nanofiltration

Die Entsalzung mittels Nanofiltration erfolgte im Diafiltrationsmodus im Kreuzstrombetrieb. Der generelle Versuchsaufbau ist in Abbildung 4-12 dargestellt. Für die Entsalzung wurden 200 mL TEM 30 1:1 mit 200 mL deionisiertem Wasser verdünnt. Die Nanofiltrationseinheit war vom Typ Lab Cell CF1-Instrument (KMS, Aachen). Die eingesetzten Membranen des Typs TFC-SR3 (KMS, Aachen) wiesen eine Fläche von 28 cm^2 auf. Der notwendige Druck von 30 bar wurde durch gasförmigen Stickstoff (Linde AG, Hannover) angelegt. Über die Prozessdauer von 5 h wurde eine durchschnittliche Flussrate von $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ erreicht. Das eingesetzte Volumen von 400 mL wurde dabei auf 230 mL eingengt.

6.4.10 Entsalzung von TEM 30 mittels Elektrodialyse

Im Allgemeinen können nur klare Lösungen elektrodialysiert werden. Dafür wurde das TEM 30 bei 8.000 x g für 10 min zentrifugiert (Contifuge stratos, Heraeus, Osterode), wobei für den Entsalzungsprozess die Klarphase, also der Zentrifugationsüberstand eingesetzt wurde. Der generelle Versuchsaufbau ist in Abbildung 4-16 dargestellt. Als Elektrodialyse wurde eine ED L02 (Hescon GmbH, Engstingen) mit den Membranen Neosepta AMX und CMX (Astom Corporation, Japan) mit einer Fläche von 57 cm² verwendet. Als Diluat wurden 250 mL TEM 30-Klarphase und als Konzentrat 250 mL deionisiertes Wasser eingesetzt. Als Elektrolyt dienten 250 mL 2,5%-ige Na₂SO₄-Lösung. Durch Messung der Leitfähigkeit des Konzentrates und des Diluates wurde der Entsalzungsfortschritt überwacht. Dabei glichen sich die Leitfähigkeiten des Konzentrates und des Diluates nach etwa 30 - 45 min an. Sobald die Leitfähigkeiten nahezu gleich waren, wurde das Konzentrat durch frisches deionisiertes Wasser ersetzt. Um die Effektivität der Entsalzung zu evaluieren wurde das Konzentrat zum Einen 3-mal erneuert (kurze Prozessführung) und zum Anderen 6-mal erneuert (lange Prozessführung). Der Prozess wurde mit einer Spannung von 12,82 V (0,31 A) gestartet. Während der Entsalzung fiel die Leitfähigkeit von 44,7 mS cm⁻¹ (28,4 °C) auf 33,7 mS cm⁻¹ (28,2 °C) bei kurzer Prozessführung (s.o.) und auf 8,6 mS cm⁻¹ (29,2°C) bei langer Prozessführung (s.o.).

6.4.11 Bestimmung der Kationenkonzentration mittels optischer Emissionsspektrometrie

Die Bewertung des Entsalzungsprozesses erfolgte mittels optischer Emissionsspektrometrie (OES). Dabei wurden die Kationenkonzentrationen von Na⁺, K⁺, Ca²⁺ und Mg²⁺ bestimmt. Von jeder Probe wurden dazu 0,5 ml in einer Säurelösung aus 5 ml HNO₃ (konz.), 1,5 ml H₂O und 0,5 ml H₂SO₄ (konz.) aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte über eine temperaturgesteuerte Reaktion (maximale Temperatur 180 °C) bei hohem Druck in der Mikrowelle (Start 1500, MLS, Leutkirch). Die technischen Einstellung des OES und die Wellenlängen, bei denen die einzelnen Kationen quantifiziert wurden, sind in Tabelle 6-6 und Tabelle 6-7 aufgeführt.

Tabelle 6-6: Technische Daten des OES.

Technische Kenngrößen	Bezeichnung/Einstellung
OES	Arcos (Spectro, Kleve)
Plasmaleistung	1.400 W
Messposition	radial
Kühlgasfluss	12,1 L min ⁻¹
Hilfsgasfluss	1,1 L min ⁻¹
Atomisationsgasfluss	0,79 L min ⁻¹

Tabelle 6-7: Übersicht der Detektionswellenlängen der einzelnen Kationen im OES.

Kationspezies	Wellenlänge(n) [nm]
Na ⁺	589,592; 588,995
K ⁺	766,491
Ca ²⁺	279,553; 280,270; 285,213
Mg ²⁺	396,847; 393,366; 317,933

Die Quantifizierung erfolgte mittel 3 Standards, deren Zusammensetzungen und Konzentrationen in Tabelle 6-8 gezeigt sind.

Tabelle 6-8: Übersicht zu den verwendeten Standards zur Quantifizierung der Kationenkonzentrationen im OES

Kationenspezies	Konzentrationen [g g ⁻¹]		
	Standard 1	Standard 2	Standard 3
Na ⁺	3,837 10 ⁻⁴	2,070 10 ⁻⁴	3,988 10 ⁻⁵
K ⁺	3,821 10 ⁻⁴	2,061 10 ⁻⁴	3,971 10 ⁻⁵
Ca ²⁺	2,331 10 ⁻³	1,257 10 ⁻³	2,422 10 ⁻⁴
Mg ²⁺	5,775 10 ⁻³	3,114 10 ⁻³	6,001 10 ⁻⁴

Zur Quantifizierung wurden die Proben mit 2% HNO₃ zu geeigneten Konzentrationen verdünnt.

6.4.12 Rückgewinnung der Biomasse

Im repeated batch-Modus wurde die Biomasse nach der Fermentation aus der Brühe abgetrennt. Dazu wurde die komplette Fermentationsbrühe nach der Ernte bei $3.345 \times g$ für 10 min zentrifugiert (Metafuge 1.0 RS, Heraeus, Osterode) und das Zellpellet in 0,9%-iger NaCl-Lösung resuspendiert. Bei dem Ansatz im 300 mL-Maßstab wurde die Biomasse in 30 mL resuspendiert, beim Ansatz im 2 L-Maßstab wurde die Biomasse in 300 mL resuspendiert. Die resuspendierte Biomasse wurde anschließend zu dem frisch angesetzten folgenden batch hinzugegeben. Die Schritte zur Rückgewinnung erfolgten im unsterilen Raum.

6.5 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
<	kleiner als
>	größer als
°C	Grad Celcius
μ	spezifische Wachstumsrate micro, 10 ⁻⁶
μ _{max}	maximale Wachstumsrate
abv	alcohol by volume Volumenprozent Alkohol (vol%)
Ad	Additive
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BTM	Biotrockenmasse
BV	Bettvolumen
bzw.	beziehungsweise
c	centi, 10 ⁻²
C ₂ H ₅ OH	Ethanol, Summenformel
C ₃ H ₆ O ₃	Pyruvat, Summenformel
C ₆ H ₁₂ O ₆	C ₆ -Zucker: Glukose, Summenformel
Ca ²⁺	Calcium
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPR	CO ₂ -Produktionsrate
CSB	chemischer Sauerstoffbedarf
dd	doppelt deionisiert
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
eq	Äquivalent
evtl.	eventuell
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
g	Gramm
GC	Gaschromatographie

h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HE	Hefeextrakt
HPLC	High-performance liquid chromatography Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
iBTM	initiale Biotrockenmasse, Anfangsbiomasse
iTEM	Initiale TEM 30-Konzentration, Anfangssubstratkonzentration
IEX	Ion exchange chromatography, Ionenaustauschchromatographie
<i>K. marxianus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , Hefestamm
<i>K. fragilis</i>	<i>Kluyveromyces fragilis</i> , Hefestamm
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i> , Hefestamm
K ⁺	Kalium
kcal	Kilokalorien
kg	Kilogramm
K _L a	volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient
konz.	Konzentriert
L	Liter
m	Milli, 10 ⁻³
M	molar; mol L ⁻¹
m ³	Kubikmeter
max.	maximal
mikrobiol.	mikrobiologisch
min	Minuten
Mio.	Millionen
MJ	Megajoule
mm	Millimeter
mol	Teilchenanzahl: 6,022 10 ²³ mol ⁻¹
MPa	10 ⁶ Pascal
N ₂	Stickstoff
Na ⁺	Natrium

NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Reduzierte Form von NAD ⁺
NaOH	Natronlauge
o.g.	oben genannt
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
OES	optische Emissionsspektrometrie optisches Emissionsspektrometer
osmol	osmotisch aktive Teilchen (in mol)
OTR	O ₂ -Transferrate
pH	pH-Wert, negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
pKs	Säurestärke
pO ₂	Sauerstoffsättigung
rpm	revolutions per minute Umdrehungen pro Minute
RQ	respiratorischer Quotient
S	Siemens, Einheit der Leitfähigkeit
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Bäckerhefe
t	Tonne, 10 ³ kg
T	Temperatur, Anzuchttemperatur
TEM 30	teilentzuckertes Molkenkonzentrat
u.	und
u.a.	unter anderem
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	Vergleiche
vol %	Volumenprozent
vvm	Begasungsrate: $\text{Volumen}_{\text{Begasung}} \text{Volumen}_{\text{Medium}}^{-1} \text{min}^{-1}$
W	Watt
w/v	weight by volume Masse pro Volumen

w/w	weight by weight Gewicht pro Gewicht
x g	Zentrifugalbeschleunigung als vielfaches der Erdbeschleunigung: $9,80665 \text{ m s}^{-2}$
YMPL	Medium aus Y east extrakt, M alt extract, P ep- tone, L actose
$Y_{P/S}$	spezifische Ethanolausbeute
$Y_{X/S}$	spezifische Biomasseausbeute
ggf.	gegebenenfalls
FID	flame ionization detector Flammenionisationsdetektor

Für Längen-, Massen-, Stoffmengen- und Zeitangaben wurden SI-Einheiten verwendet sowie Vorsilben für dezimale Vielfache und Teile der SI-Einheiten nach DIN 1301.

6.6 Geräte und Laborausstattung

10 L Rührkesselreaktor:	Biostat C, B. Braun Biotech Intern. GmbH, Melsungen
2 L Rührkesselreaktor:	Biostat A plus, B. Braun Biotech Intern. GmbH, Melsungen
30 L Rührkesselreaktor:	Biostat UD, B. Braun Biotech Intern. GmbH, Melsungen
Automatische Pipette:	HandyStep, Brandt GmbH & Co. KG, Wertheim
Brutschrank:	BE 200, Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach
Eismaschine:	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Elektrodialyseeinheit:	ED L02, Hescon GmbH, Engstingen

Elektrodialysemembranen:	Neosepta AMX und CMX, Astom Corp., Tokyo, Japan
GC:	GC-2010plus, Shimadzu, Kyōto, Japan GC 14B, Shimadzu, Kyōto, Japan
Glasgeräte:	Schott AG, Mainz
Glassäule:	Omnifit, Diba Industries Ltd., Danbury, USA
HPLC-Detektor:	Corona CAD Detector, ESA Biosciences, Inc., USA
HPLC-Pumpe:	Agilent 1200 Binary, Agilent Technologies Inc., USA
Inkubatoren:	Certomat HK B, Braun Biotech Intern. GmbH, Melsungen Certomat BS-1, B. Braun Biotech Intern. GmbH, Melsungen Certomat BS-1, Sartorius Stedim Biotech S.A., Göttingen
Kleinvolumenspritzen	Knauer GmbH, Berlin
Kontinuierliche Gasanalysatoren:	S 710 (Oxor, Unor), Sick Maihak AG, Hamburg AO2020 (Uras 14, Magos 106), ABB AG, Hamburg BlueInOne, BlueSens gas sensor GmbH, Herten
Laborautoklav:	V-150, Systek GmbH, Wettengel
Laborpipetten (1000, 200, 100, 20 µL):	Transpipette, Brandt GmbH & Co. KG, Wertheim Research, Eppendorf AG, Hamburg
Laborwaagen:	Laborwaage AT621 Delta Range, Mettler AG, Greifensee CP 8201, Sartorius AG, Göttingen
Leitfähigkeitsmesser:	Cond 315i, WTW GmbH, Weilheim
Mikrovolumenspritze:	Hamilton Company, USA
Mikrowelle:	START 1500, MLS GmbH, Leutkirch
Nanofiltrationseinheit:	Labcell-1, Koch Membrane Systems GmbH, Aachen
Nanofiltrationsmembranen:	SR 3, Koch Membrane Systems GmbH, Aachen

Optisches Emissionsspektrometer:	Arcos, Spectro Analytical Instruments GmbH, Kleve
Osmometer:	K-7000, Knauer GmbH, Berlin
Peristaltik-Pumpe:	SciLog Inc., USA
Phasenkontrastmikroskop:	BX41, Olympus GmbH, Hamburg
pH-Elektrode, inline:	Polyclave, Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst Easyferm plus, Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
pH-Meter:	605, Deutsche Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt
Photometer:	Uvikon 922, Kontron Instruments GmbH, Düsseldorf Multiscan Go, Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn.
pO ₂ -Elektrode, inline:	Visiform DO, Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
Reinstwasseranlage:	Arium® 661 Ultrapure water system, Sartorius Stedim Biotech S. A, Göttingen
Schüttelkolben:	Schott AG, Mainz
Sterilbank:	Herasafe, Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn
Zentrifugen	Heraeus Pico, Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn Metafuge 1.0 RS, Heraeus Instruments GmbH, Osterode Contifuge stratos, Heraeus Instruments GmbH, Osterode

6.7 Verwendete Chemikalien

Acetonitril (HPLC-grade)	Chromasolv Plus, Sigma Aldrich
Agar-Agar	AppliChem
Amberlite FPC 22 H	Dow chemicals
Antischaum Tego KS 911	Evonik

CaCl ₂ · 2H ₂ O	Fluka
H ₂	Linde AG
H ₂ SO ₄ (konz.)	Merck
HCl (konz.)	Merck
Hefeextrakt	AppliChem, Roth
HNO ₃ (konz.)	Merck
KCl	Fluka
Malzextrakt	Fluka
MgSO ₄	AppliChem
Milchzucker (Lactose monohydrate)	Fluka
N ₂	Linde AG
Na ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich
NaCl	VWR
NaOH	Roth
NH ₄ Cl	Fluka
Pepton (aus Sojabohne)	Sigma-Aldrich
Synthetische Luft	Linde AG

6.8 Verwendete großtechnische Reaktoren

Die verwendeten großtechnischen Reaktoren sind Bestandteil des Fermentationssystems für einen industriellen Biostil[®]-Prozess (Alfa-Laval Industrietechnik GmbH, Hamburg) der Firma Kraul u. Wilkening & Stelling GmbH (Hannover-Misburg). Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Reaktoren verwendet:

- zwei baugleiche 50 L Blasensäulenreaktoren,
- ein 2.000 L Blasensäulenreaktor,
- ein 1.200 L Rührkesselreaktor.

Zur Versorgung standen verschiedene Gebläsegrößen zur Verfügung, mit denen Leistungen von bis zu 20 m³ h⁻¹ erreicht werden konnten.

6.8.1 50 L Blasensäulenreaktoren

Die zwei baugleichen 50 L-Reaktoren aus Edelstahl haben einen Doppelmantel zur Temperierung. Der Durchmesser der Kessel beträgt 300 mm und die Höhe 90 mm. Die Luftversorgung wurde über einen Gasverteiler aus Sintermetallröhren mit Porengrößen von 100 μm gewährleistet. Dieser Gasverteiler wurde als Optimierung des alten Begasungsringes mit simplen Bohrungen eingesetzt. Die Reaktoren und das Begasungssystem sind in Abbildung 6-2 gezeigt.

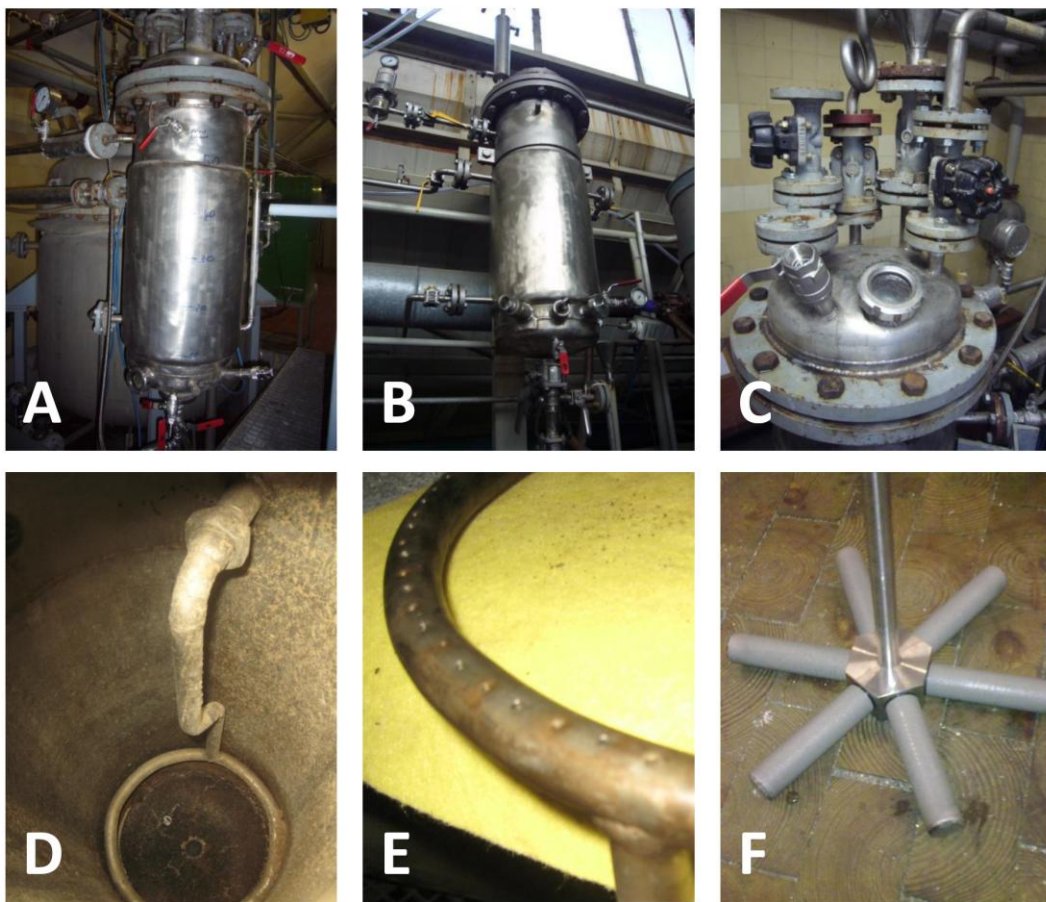


Abbildung 6-2: 50 L Blasensäulenreaktor; A & B: baugleiche Reaktoren, C: Deckel mit Sichtfenster und Versorgungsports, D & E: alter Begasungsring mit Bohrungen, F: neues Begasungssystem aus Sintermetallrohren.

6.8.2 2.000 L Blasensäulenreaktor

Der Durchmesser und die Höhe des verwendeten 2.000 L Blasensäulenreaktors aus Edelstahl sind nicht bekannt. Der Reaktor verfügt über einen Doppelmantel und einen Umwälzkreislauf, über den die Temperatursteuerung erfolgt. Die Leistung der Pumpe ist nicht bekannt. Die Begasung wird durch sternförmige Begasungsröhren mit Bohrungen gewährleistet. Der Reaktor ist in Abbildung 6-3 gezeigt.



Abbildung 6-3: 2.000 L Reaktor.

6.8.3 1.200 L Rührkesselreaktor

Der Durchmesser und die Höhe des 1.200 L Rührkesselreaktors aus Edelstahl sind nicht bekannt. Die Temperierung erfolgt über einen Doppelmantel. Zur Begasung ist ein Begasungsring mit Bohrungen installiert. Als Rührer sind 6 übereinander angeordnete Schrägblattrührer installiert, die eine radiale und axiale Vermischung ermöglichen. Die maximale Rührgeschwindigkeit beträgt 130 rpm. Der Reaktor und die Rührblattarchitektur sind in Abbildung 6-4 gezeigt.

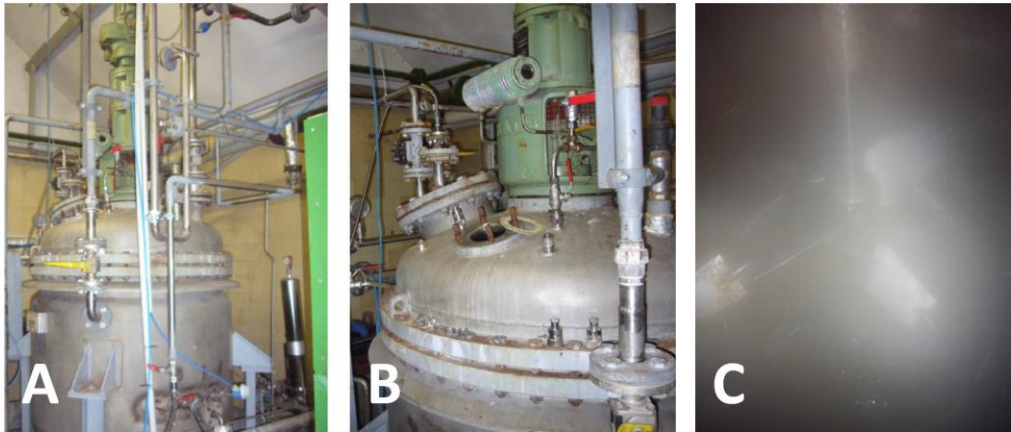


Abbildung 6-4: 1.200 L Rührkesselreaktor; A: Reaktor mit Rohrleitungen, B: Deckel und Rührwerk, C: Schrägblattrührer.

6.9 Verbrauchsmaterialien

Einweg-Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einweg-Pipettenspitzen	Brandt GmbH & Co. KG, Wertheim
Einweg-Spritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einweg-Handschuhe	AMPri GmbH, Hohenstein-Ernstthal
Einweg-Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
GC Probengefäße + Deckel	VWR International GmbH, Darmstadt
HPLC-Probengefäße + Deckel	VWR International GmbH, Darmstadt
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,5; 2 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Schläuche	VWR International GmbH, Darmstadt
Schlauchverbindungen	VWR International GmbH, Darmstadt
Spritzenvorfilter	Sartorius Stedim Biotech S. A, Göttingen
Sterilfilter, 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech S. A, Göttingen
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

6.10 Weitere Daten

6.10.1 Vergleich der Anzucht verschiedener *K. marxianus*-Stämme in TEM 30

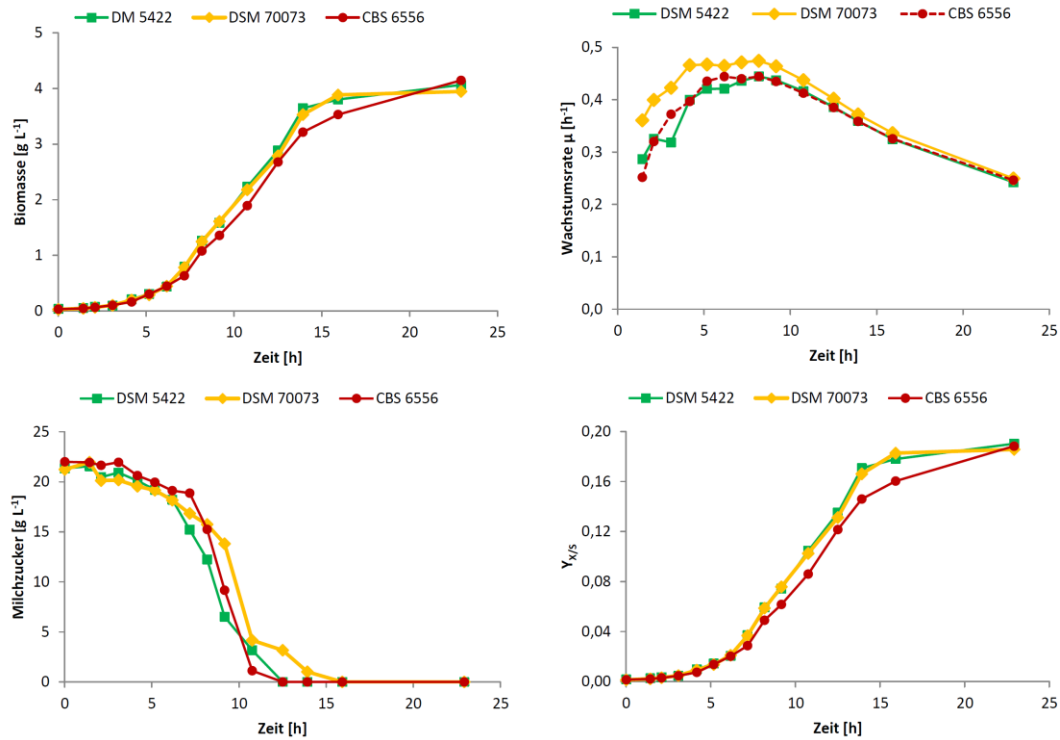


Abbildung 6-5: Wachstumscharakteristika der getesteten *K. marxianus*-Stämme (DSM 5422, DSM 70073 und CBS 6556) in TEM 30 (10% (v/v)) (Schüttelkolben, 200 mL Medium, 30 °C, 130 rpm, Zusatz: 0,1% (w/v) Hefeextrakt).

6.10.2 Optimierung der Biomassegewinnung

Variation der initialen Substratkonzentration

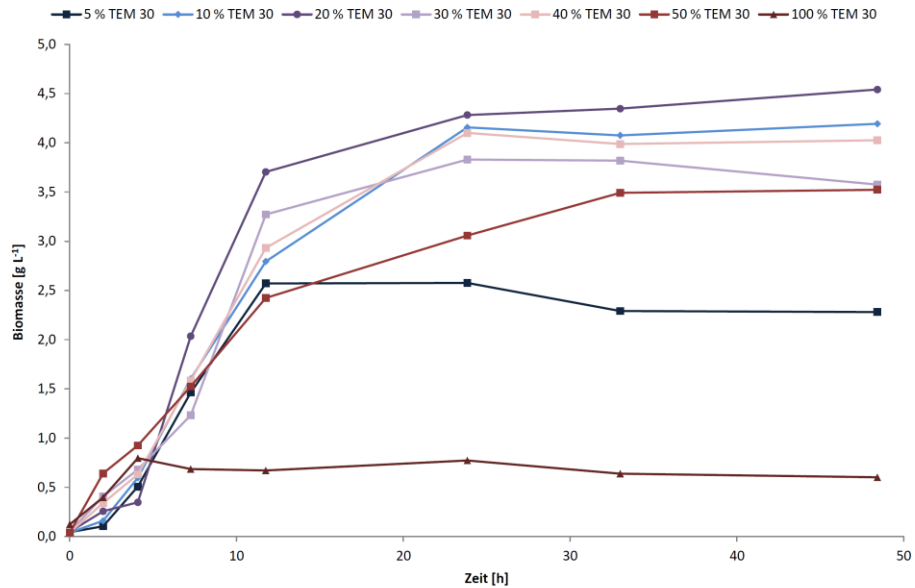


Abbildung 6-6: Biomassentwicklung in unterschiedlichen TEM 30-Konzentrationen (Schüttelkolben, 100 mL Medium, 30°C, 150 rpm).

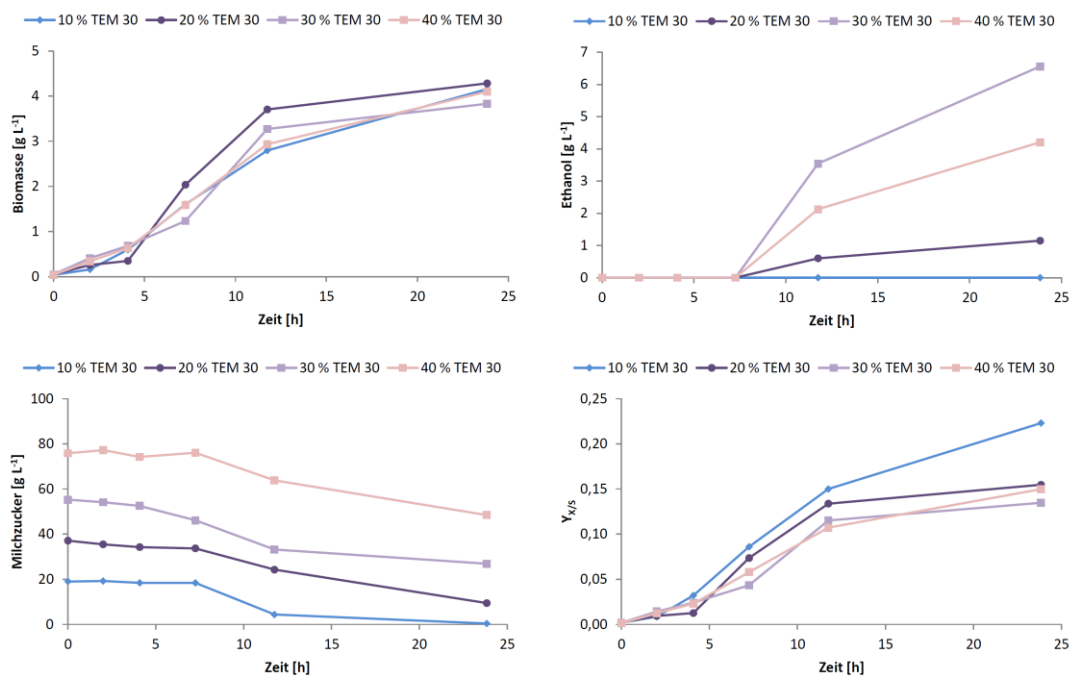


Abbildung 6-7: Wachstumscharakteristika der Hefe in unterschiedlichen TEM 30-Konzentrationen (Schüttelkolben, 100 mL Medium, 30°C, pH 5,7, 150 rpm).

Variation des pH-Wertes

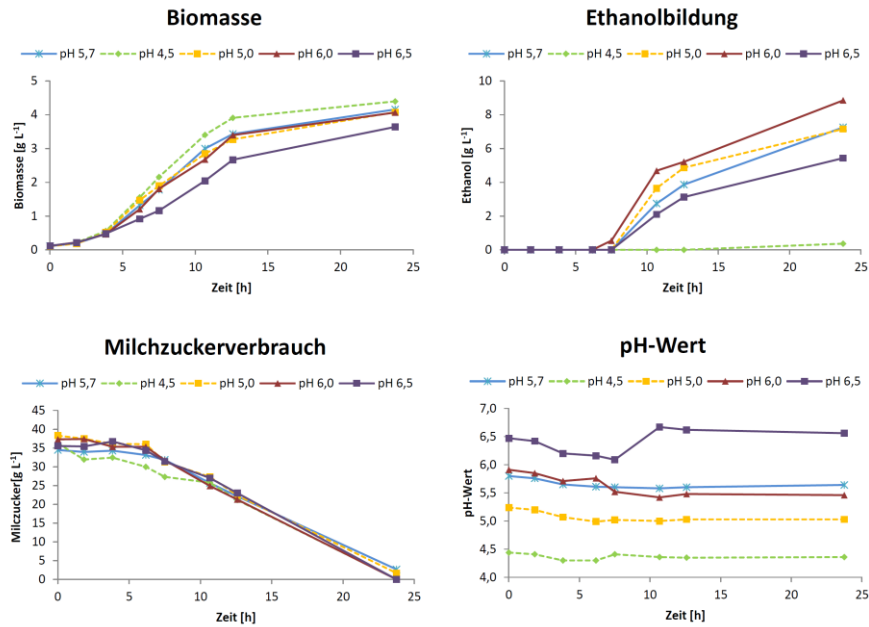


Abbildung 6-8: Wachstumscharakteristika der Hefe in verdünntem TEM 30 unter Variation des pH-Wertes (Schüttelkolben, 100 mL Medium TEM 30 (20% (v/v)), 30°C, 150 rpm).

Variation der Temperatur

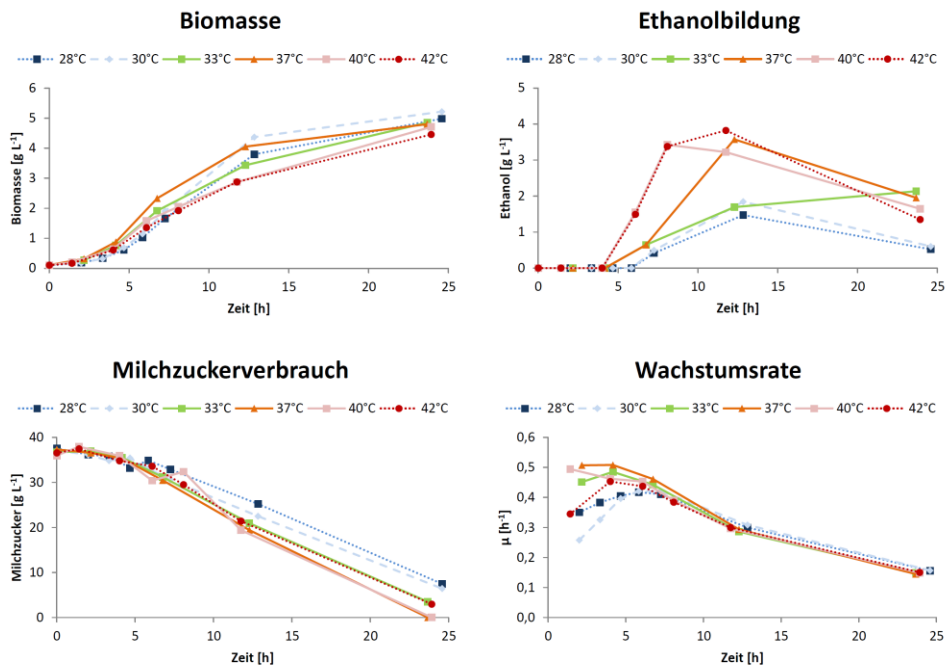


Abbildung 6-9: Wachstumscharakteristika der Hefe in verdünntem TEM 30 unter Variation der Temperatur (Schüttelkolben, 100 mL Medium TEM 30 (20% (v/v)), pH 5,7, 150 rpm).

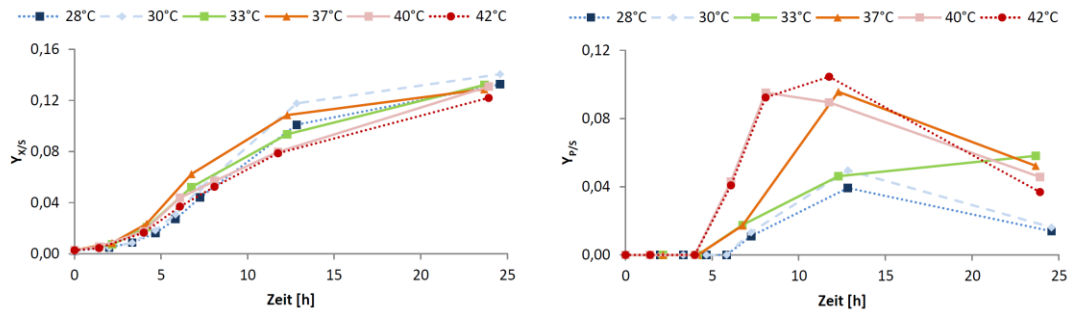


Abbildung 6-10: Vergleich des Einflusses der Temperatur auf $Y_{X/S}$ und $Y_{P/S}$.

Variation der Schüttelgeschwindigkeit

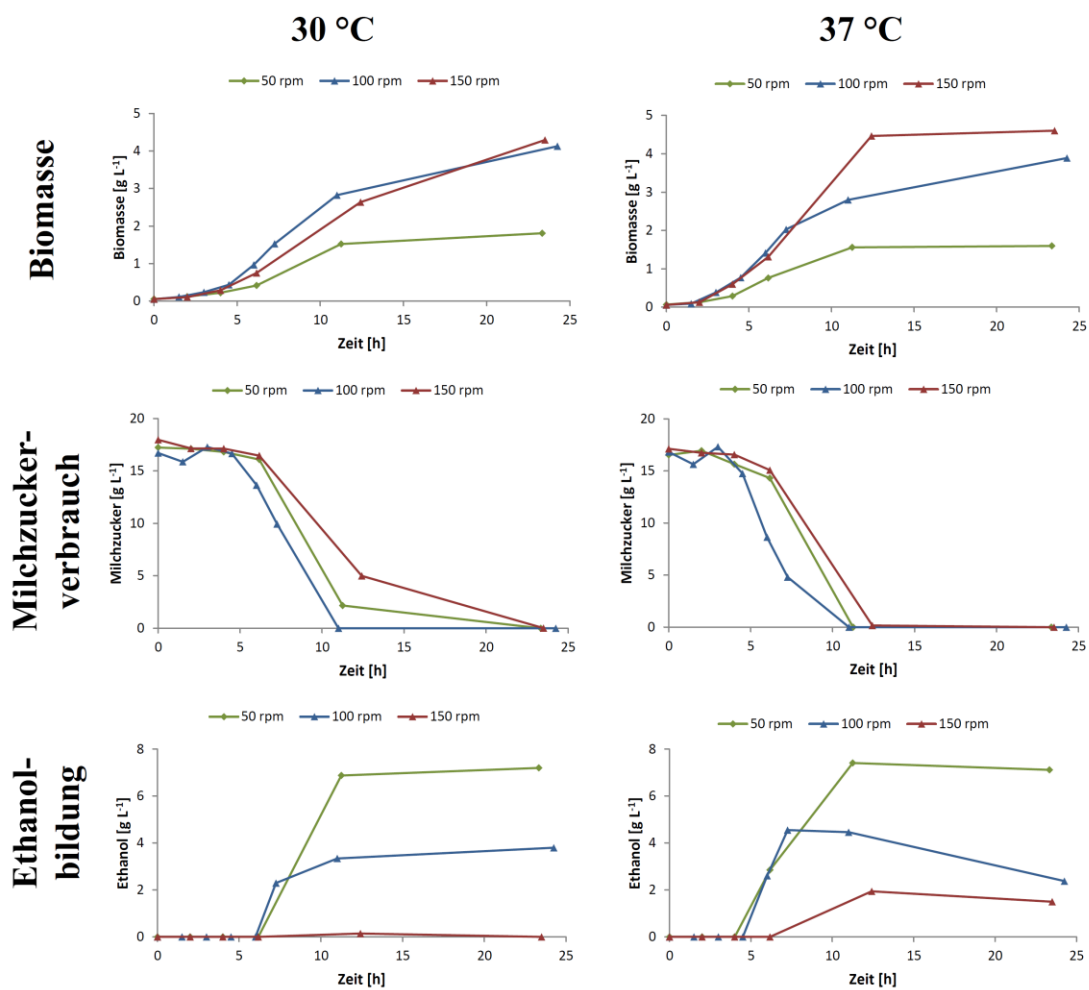


Abbildung 6-11: Wachstumscharakteristika der Hefe in verdünntem TEM 30 unter Variation der Schüttelgeschwindigkeit und der Temperatur (Schüttelkolben, 100 mL Medium TEM 30 (10% (v/v)), pH 5,7).

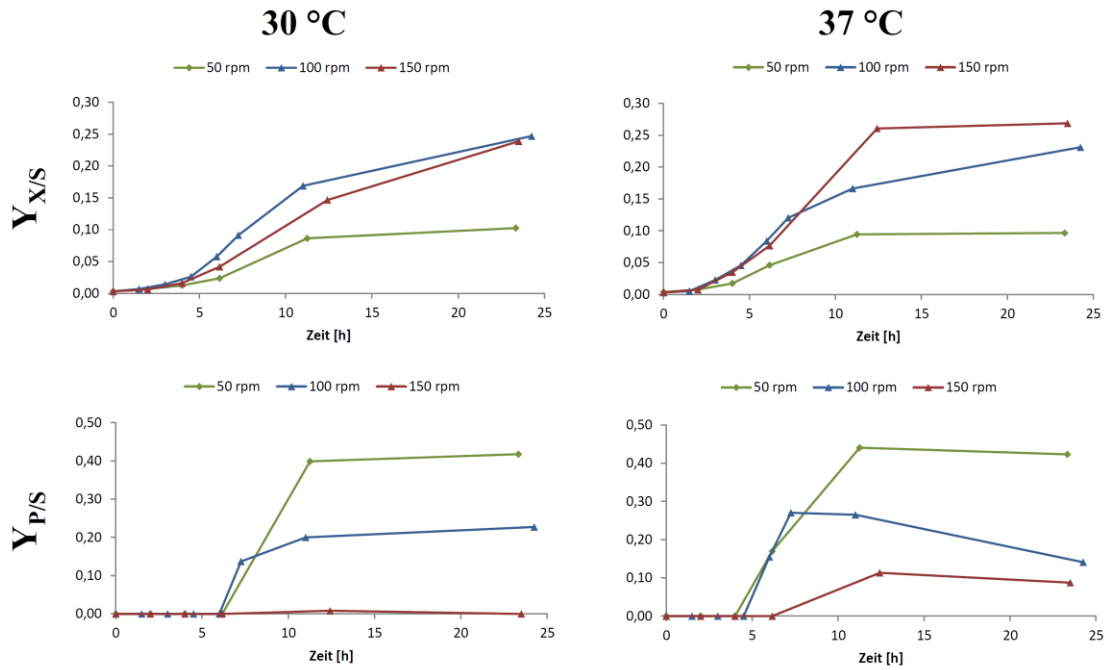


Abbildung 6-12: Spezifische Biomasse- und Ethanolproduktionsfaktoren in verdünntem TEM 30 unter Variation der Schüttelgeschwindigkeit und der Temperatur (Schüttelkolben, 100 mL Medium TEM 30 (10% (v/v)), pH 5,7).

Tabelle 6-9: Übersicht der Bewertungskriterien (Biomasse, $Y_{X/S}$, Ethanol, $Y_{P/S}$) nach 11 h bzw. 12 h für die Biomassegewinnung in verdünntem TEM 30 bei variierender Schüttelgeschwindigkeit und Temperatur.

Temp. [°C]	Schüttelgeschw. [rpm]	Biomasse [g L ⁻¹]	$Y_{X/S}$	Ethanol [g L ⁻¹]	$Y_{P/S}$
30	50	2,82	0,17	3,34	0,20
	100	1,52	0,09	6,88	0,40
	150	2,64	0,15	0,14	0,01
37	50	2,80	0,17	4,46	0,27
	100	1,56	0,09	7,41	0,44
	150	4,47	0,26	1,94	0,11

Variation der initialen Biomassekonzentration

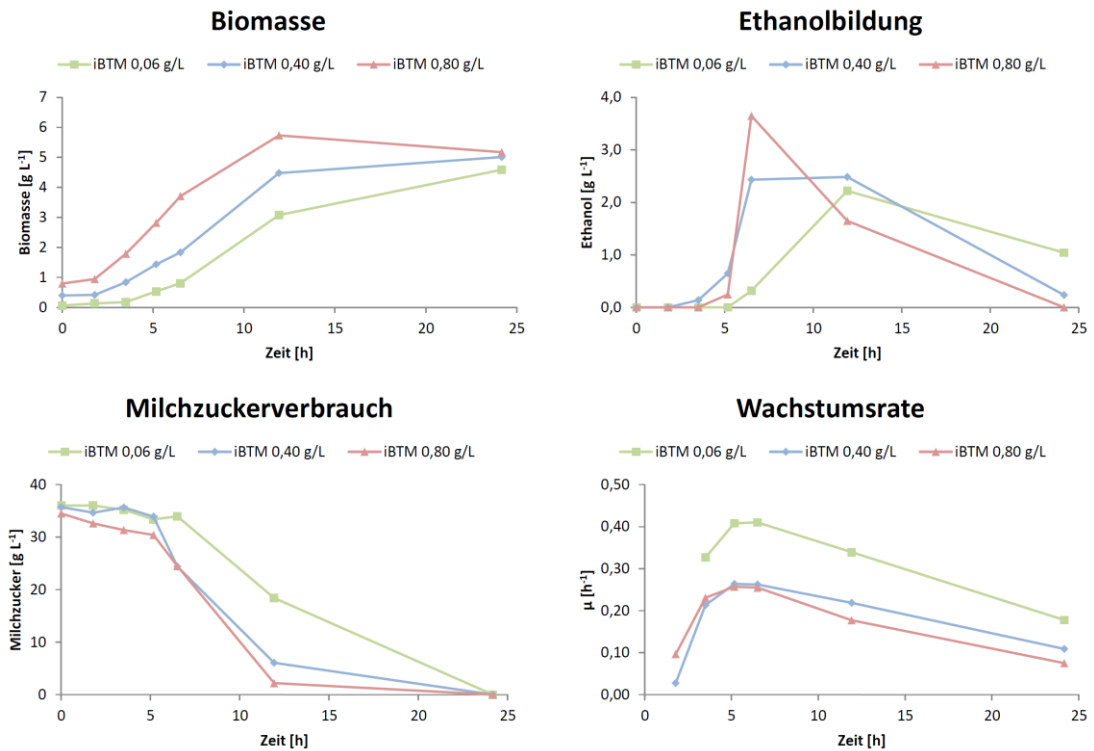


Abbildung 6-13: Wachstumscharakteristika der Hefe in verdünntem TEM 30 unter Variation der initialen Biomasse (Schüttelkolben, 100 mL Medium TEM 30 (20% (v/v)), pH 5,7, 30 °C, 150 rpm).

Zusatz von Hefeextrakt

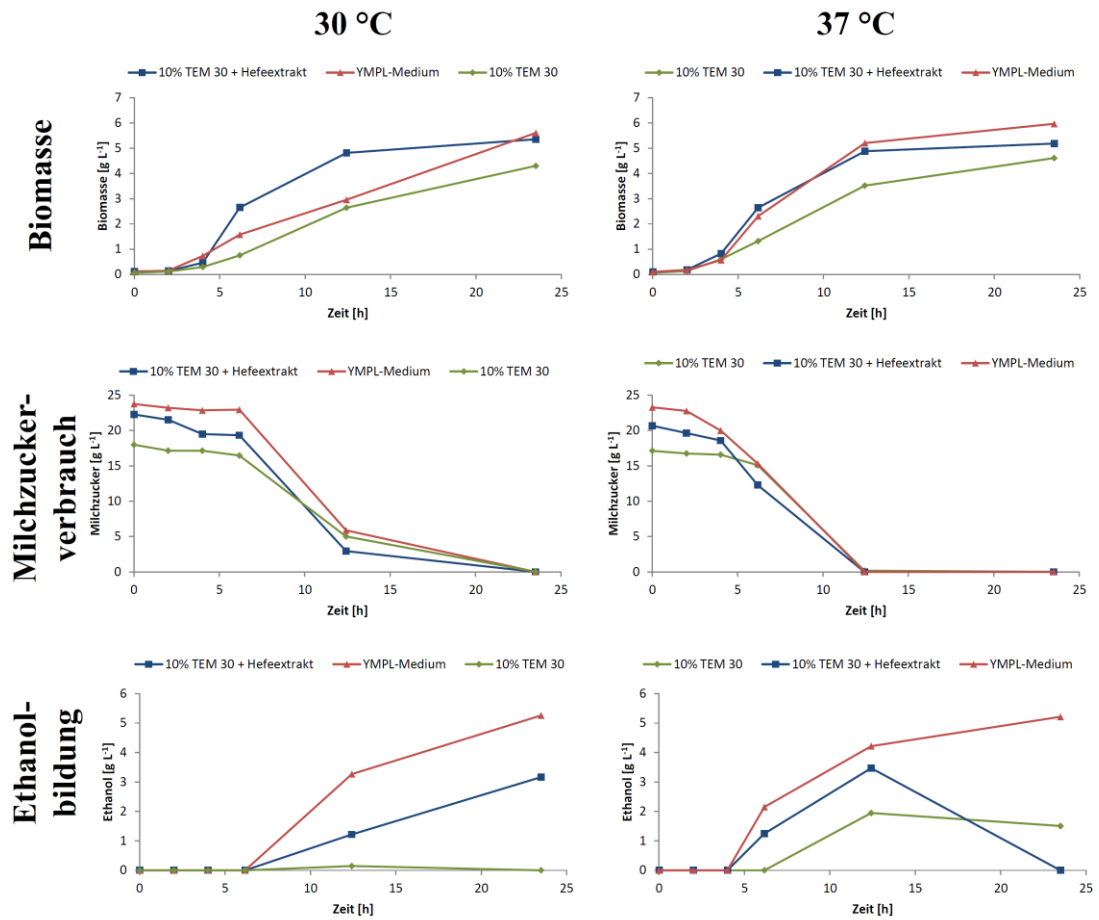


Abbildung 6-14: Wachstumscharakteristika der Hefe in verschiedenen Medien unter Variation der Temperatur (Schüttelkolben, 100 mL Medium, 150 rpm).

Tabelle 6-10: Übersicht der Bewertungskriterien (Wachstumsrate μ nach 12 h, μ_{\max} , Biomassekonzentration nach 12 h, $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$) für die Biomassegewinnung in verschiedenen Medien bei variierender Temperatur.

Temp. [°C]	Medium	μ [h ⁻¹]	μ_{\max} [h ⁻¹]	Bio-masse [g L ⁻¹]	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$
30	10% (v/v) TEM 30	0,31	0,43	4,30	0,15	0,01
	10% (v/v) TEM 30 + Hefeextrakt	0,33	0,52	5,35	0,22	0,05
	YMPL	0,28	0,51	5,60	(0,12)	0,14
37	10% (v/v) TEM 30	0,33	0,53	4,60	0,20	0,11
	10% (v/v) TEM 30 + Hefeextrakt	0,33	0,56	5,18	0,24	0,17
	YMPL	0,34	0,53	5,96	0,22	0,18

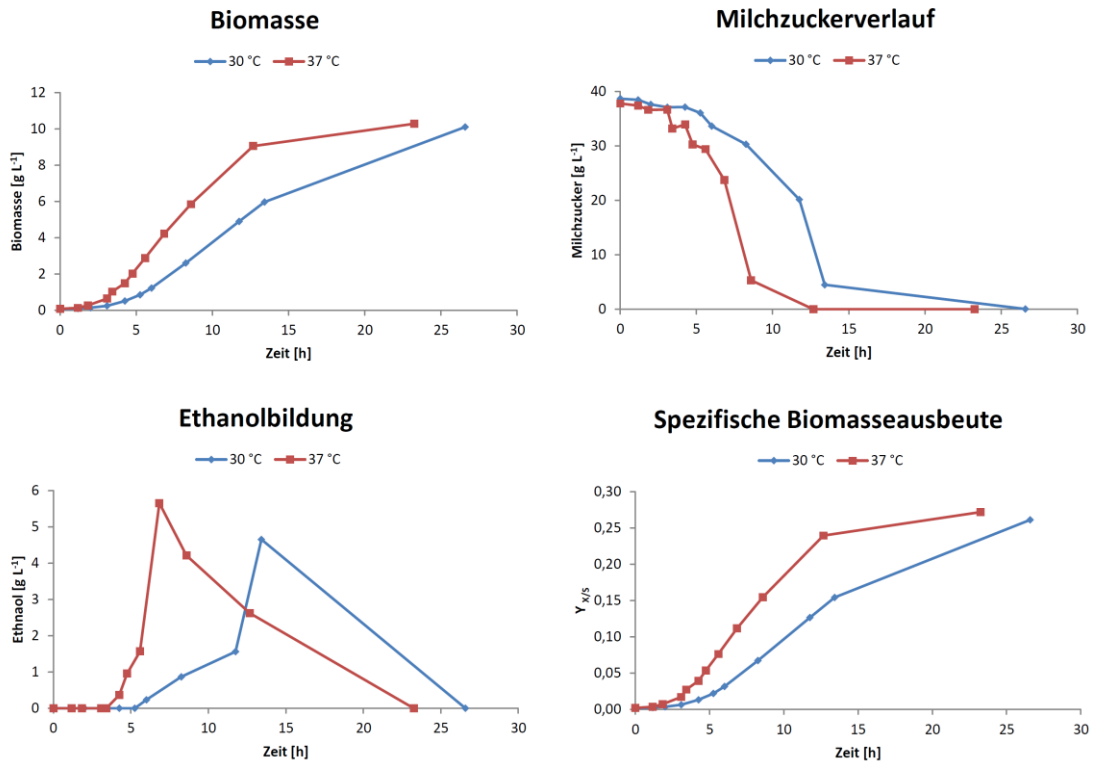


Abbildung 6-15: Wachstumscharakteristika der Hefe in TEM 30 (20% (v/v)) unter Supplementierung von 0,1% (w/v) Hefeextrakt bei 30 °C und 37 °C (Rührkesselreaktor, 10 L Medium, pH 5,7, 300 rpm).

6.10.3 Substrat- und Produkthemmung bei *K. marxianus* DSM 5422

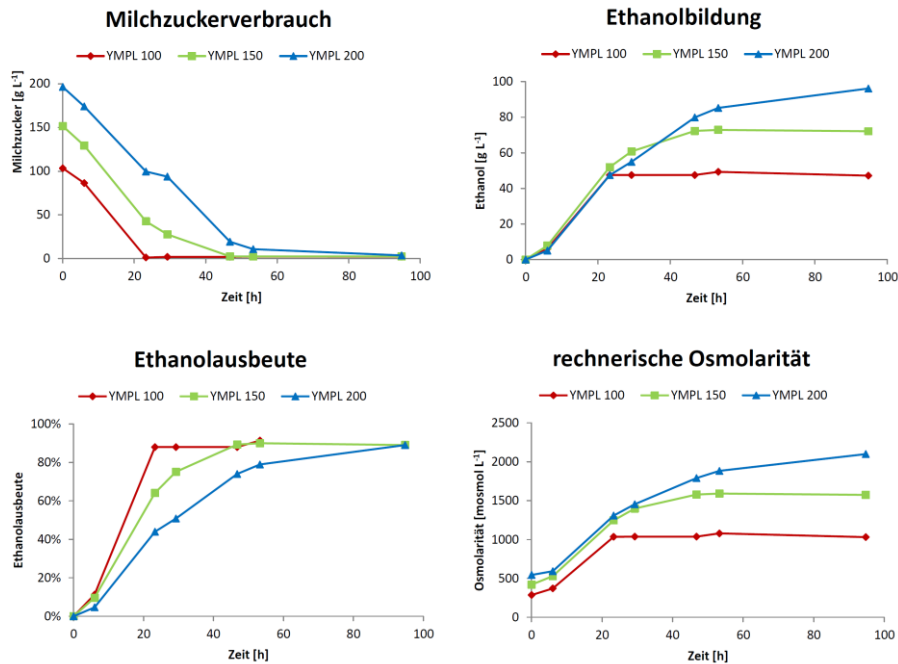


Abbildung 6-16: Vergärung von Komplexmedien mit unterschiedlichen Milchzuckerkonzentrationen: YMPL 100: 100 g L⁻¹ (0,28 mol L⁻¹); YMPL 150: 150 g L⁻¹ (0,42 mol L⁻¹); YMPL 200: 200 g L⁻¹ (0,56 mol L⁻¹); (Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, 30 °C, 0,35 g L⁻¹ iBTM).

6.10.4 Ethanolgewinnung in TEM 30 – Vergleich verschiedener *K. marxianus*-Stämme

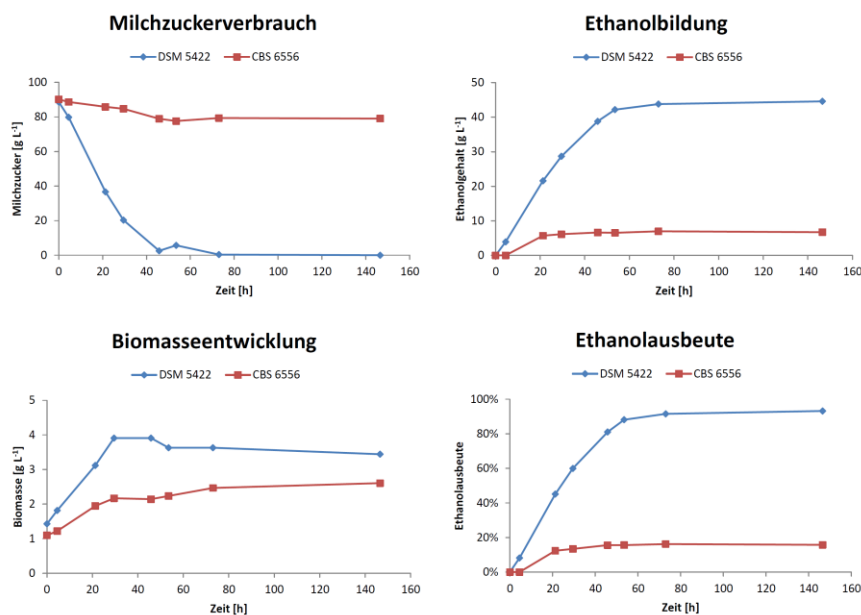


Abbildung 6-17: Fermentationscharakteristika unterschiedlicher *K. marxianus*-Stämme bei der Vergärung von TEM 30 (50% (v/v)) (Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, 30 °C, pH 5,7, 1,1 bzw. 1,4 g L⁻¹ iBTM).

6.10.5 Osmolarität verschiedener TEM 30-Verdünnungen

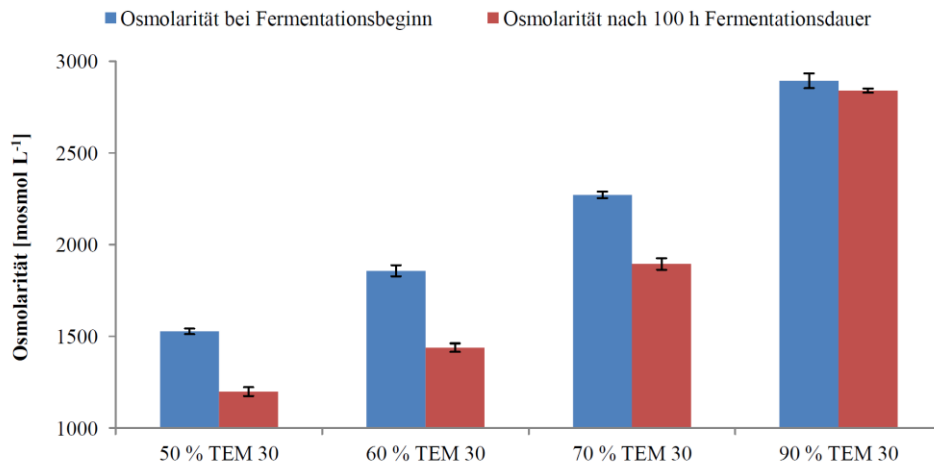


Abbildung 6-18: Osmolarität verschiedener TEM 30-Konzentrationen vor und nach einer 100 h dauernden Fermentation.

6.10.6 Teilentsalzung von TEM 30 mittels Ionenaustauschern

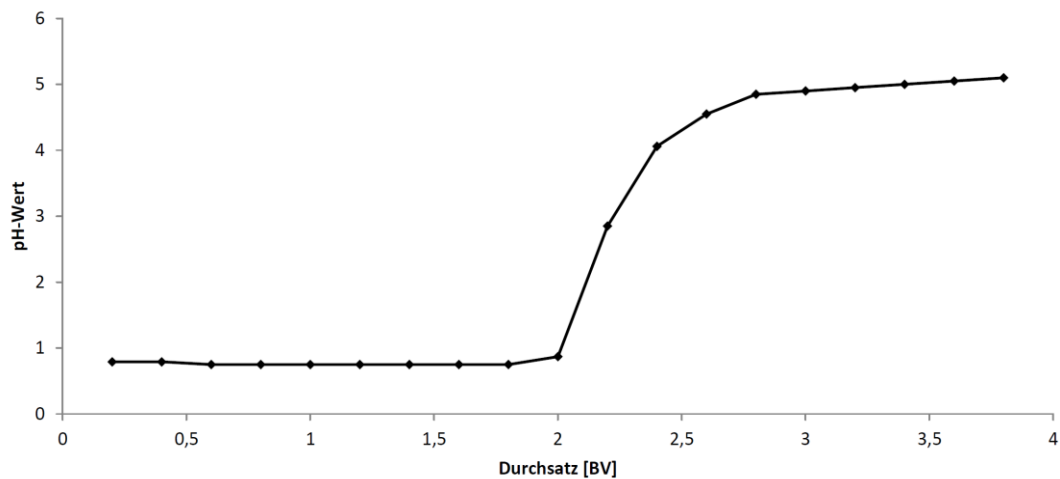


Abbildung 6-19: Teilentsalzung von TEM 30 mittels Kationenaustauscher: Durchbruchskurve der TEM 30-Klarphase (nach Zentrifugation, 10 min bei 8.000 x g), Austauschermaterial: Amberlite FPC 23 H (Dow Chemicals, Schwalbach).

6.10.7 Optimierung der Ethanolgewinnung

Variation des pH-Wertes

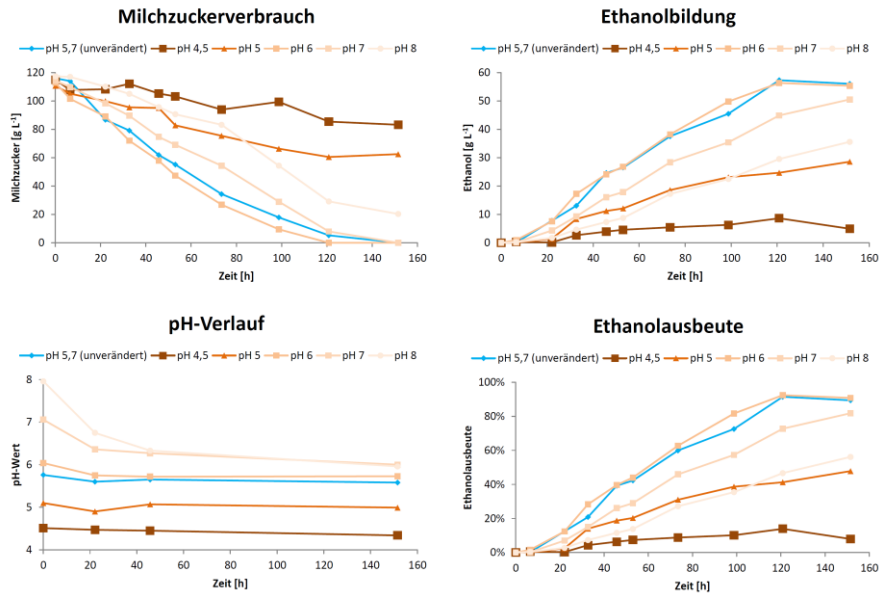


Abbildung 6-20: Vergärung von TEM 30 (60% (v/v)) bei Variation des pH-Wertes (*K. marxianus* DSM 5422, Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, 30 °C, 0,8 g L⁻¹ iBTM).

Variation der Temperatur

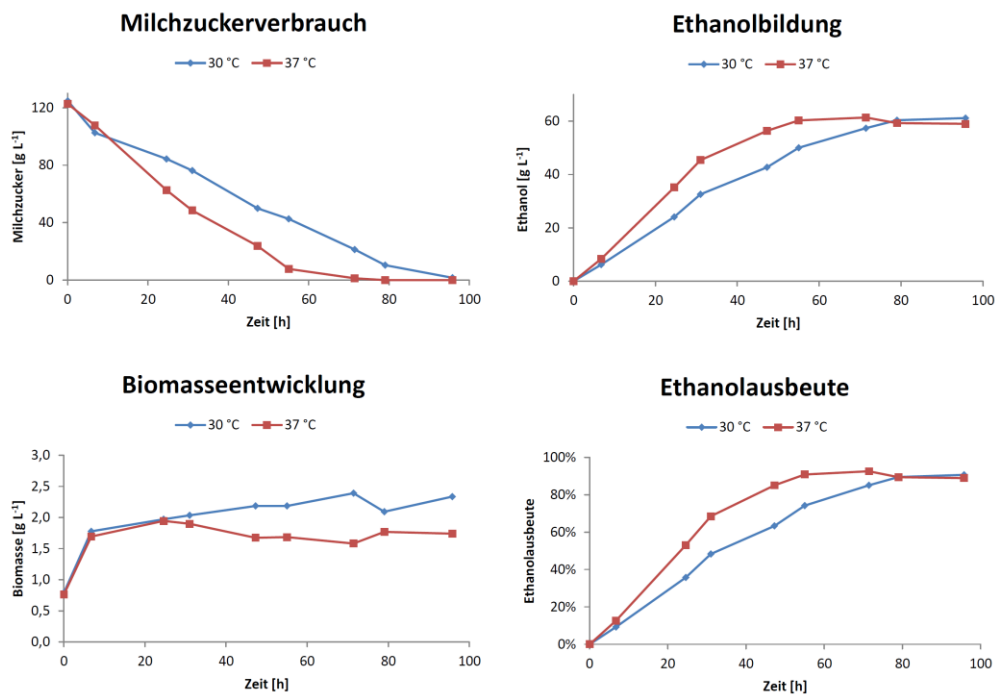


Abbildung 6-21: Vergärung von TEM 30 (60% (v/v)) bei Variation der Temperatur (*K. marxianus* DSM 5422, Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, pH 5,7, 1,1 g L⁻¹ iBTM).

Variation der Biomassekonzentration

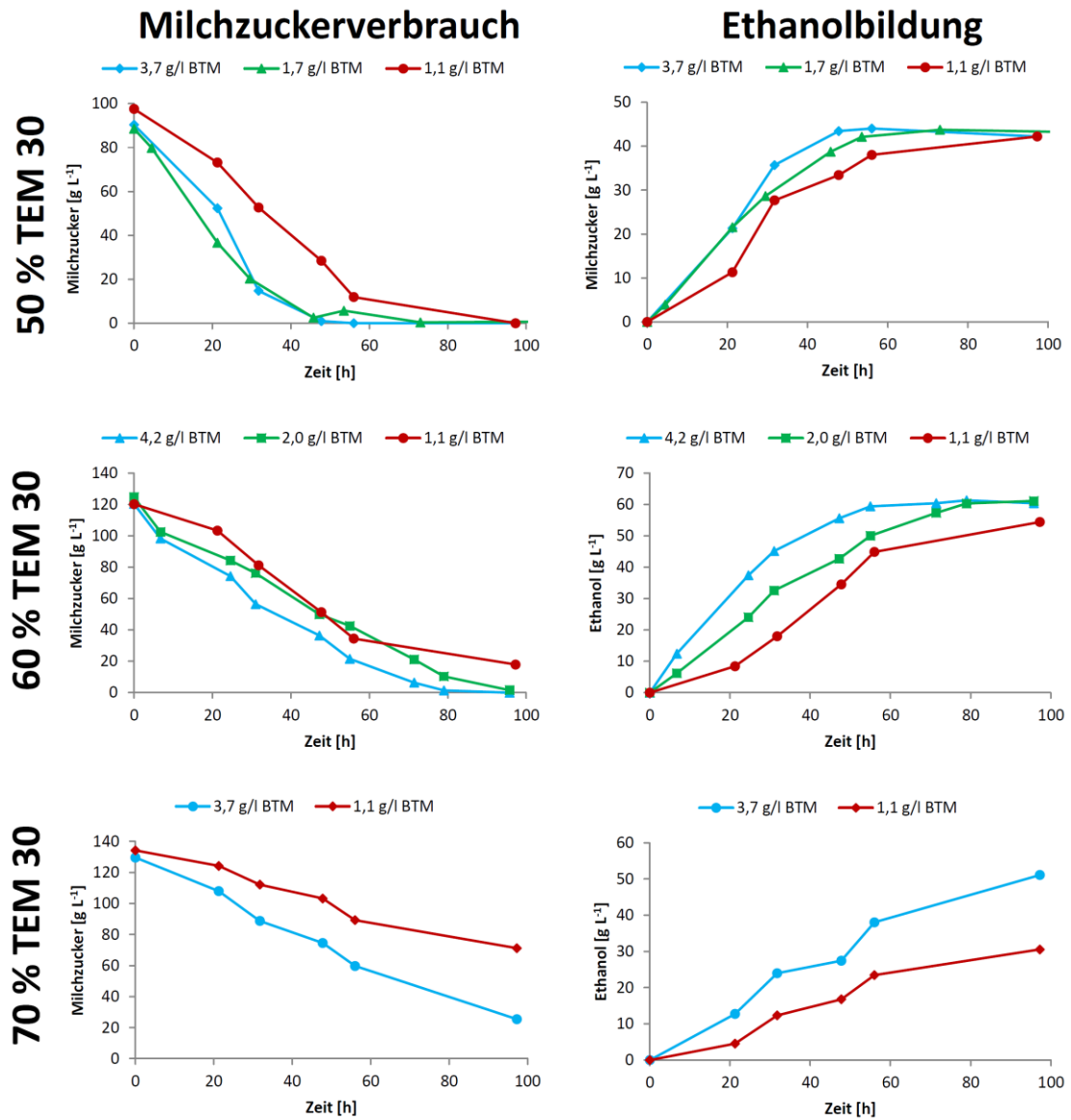


Abbildung 6-22: Vergärung von TEM 30 in unterschiedlichen Konzentrationen unter Variation der initialen Biomassekonzentration (*K. marxianus* DSM 5422, Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, pH 5,7, 30 °C).

Additive zur Förderung der Ethanolbildung

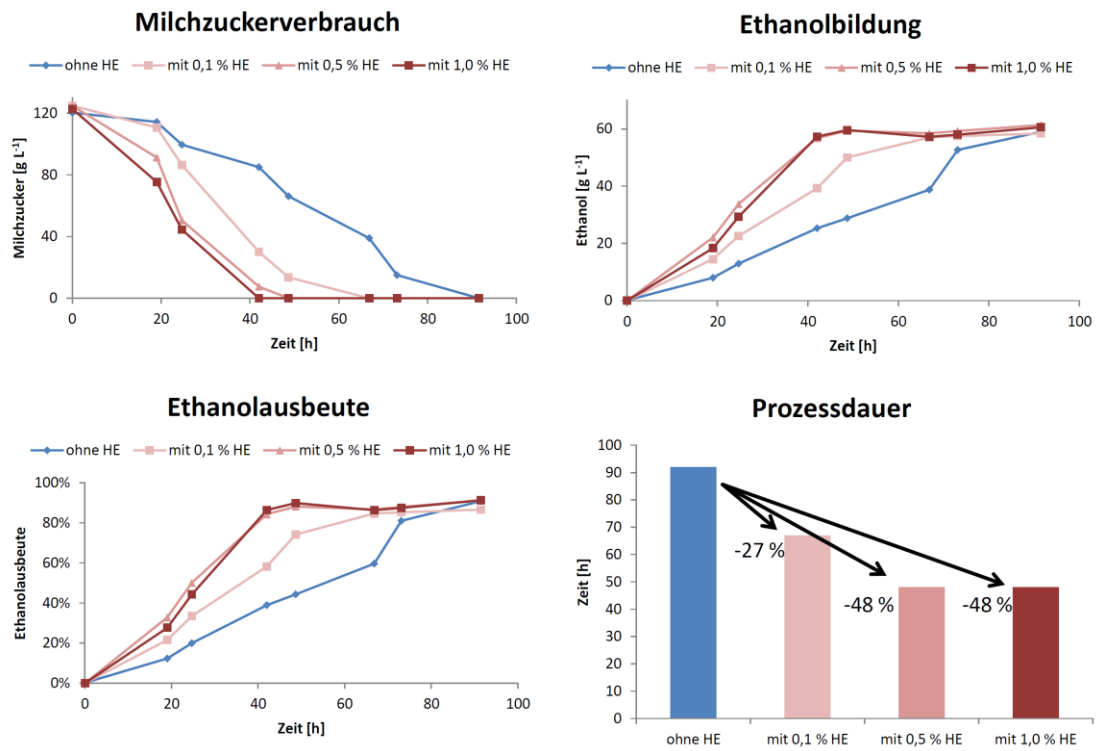


Abbildung 6-23: Vergärung von TEM 30 (60% (v/v)) unter Zusatz von Hefeextrakt in unterschiedlichen Konzentrationen (*K. marxianus* DSM 5422, Schüttelkolben, 300 mL Medium, 110 rpm, pH 5,7, 37 °C, 1,5 g L⁻¹ iBTM).

7 Literaturverzeichnis

1. [<http://www.bmelv.de/>], 13.05.2013
2. Oreopoulou V, Russ W: Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry. New York: Springer; 2007.
3. Sienkiewicz T, Riedel C: Molke und Molkeverwertung: Verwertungsmöglichkeiten in der Landwirtschaft und der Lebensmittelproduktion, 1 edn. Leipzig: Fachbuchverlag; 1986.
4. Siso MIG: The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology* 1996, 57:1–11.
5. Zadow JG: Whey and lactose processing. London ;, New York; New York, NY; USA: Elsevier Applied Science Sole distributor in the USA and Canada, Elsevier Science Pub. Co.; 1992.
6. Coldewey I: Umweltverträglichkeit und Nachhaltigkeit in der Milchwirtschaft. Techn. Univ; 2005.
7. Benecke C: Nachhaltige Verwertung von Wertstoffströmen: Gewinnung von Ethanol aus einem Reststoff der Molkeverarbeitung. *Dissertation*. Hannover: Technische Informationsbibliothek und Universitätsbibliothek Hannover (TIB); 2011.
8. Carić M: Concentrated and dried dairy products, 1 edn. New York, NY; Weinheim; Cambridge; United Kingdom: VCH; 1994.
9. Cloidt R, Lehmann, H., Jansen M: Verfahren zur Herstellung von Ethanol aus Molke, EP 1918381B1, In.: Molkerei Alois Müller GmbH & Co. KG, Aretsried.
10. Ling KC: Whey to ethanol: A biofuel role for dairy cooperatives? Washington; D.C: USDA, Rural Development, Rural Business and Cooperative Programs; 2008.
11. Fischbach GR: Molke als Rohstoff, insbesondere für Ethanol; 1987.
12. O. M, Teuber M: Verfahren zur Vergärung von Molke und Ultrafiltrationspermeaten. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 1986, 38(2):119–130.
13. Market developments and industry challenges for lactose and derivatives. In: *IDF Symposium Lactose and its Derivatives*. Moskau: 3A Business Consulting; [http://lactose.ru/present/1Tage_Affertsholt-Allen.pdf], 06.08.2013; 2007.
14. Whey Protein Ingredient Market (Ubic consulting, USA); [<http://www.ubic-consulting.com/template/fs/documents/Dairy-Ingredients/Milk-whey-protein-ingredient-market.pdf>], 06.08.2013; 2013.

15. Guimaraes PMR, Teixeira JA, Domingues L: Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol Adv* 2010, 28:375–384.
16. Vertes AA, Inui M, Yukawa H: Technological Options for Biological Fuel Ethanol. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2008.
17. Prazeres AR, Carvalho F, Rivas J: Cheese whey management: A review. *J Environ Manage* 2012, 110:48-68.
18. Demirel B, Yenigun O, Onay TT: Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review. *Process Biochem* 2005, 40(8):2583-2595.
19. Revillion JPPd, Brandelli A, Ayub MAZ: Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Brazilian archives of biology and technology* 2003, 46(1):121-128.
20. Schultz N, Chang L, Hauck A, Reuss M, Syldatk C: Microbial production of single-cell protein from deproteinized whey concentrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, 69(5):515-520.
21. Mahmoud MM, Kosikowski FV: Alcohol and Single Cell Protein-Production by *Kluyveromyces* in Concentrated Whey Permeates with Reduced Ash. *J DAIRY SCI* 1982, 65(11):2082-2087.
22. Panesar PS, Kennedy JF: Biotechnological approaches for the value addition of whey. *Crit Rev Biotechnol* 2012, 32(4):327-348.
23. Menze M: Ethanolgewinnung aus TEM 30. *Schwerpunktarbeit*. Hannover: Leibniz Universität Hannover; 2010.
24. Lee T-c, Bravo-Ureta BE, Ling KC: Technical efficiency of dairy production in New England: Co-op members versus nonmembers. Washington; D.C: U.S. Dept. of Agriculture, Agricultural Cooperative Service; 1986.
25. Löffler G, Petrides PE, Löffler-Petrides: Biochemie und Pathobiochemie: Mit 218 Tabellen; 7 edn. Berlin: Springer; 2003.
26. Marwaha SS, Kennedy JF: Whey - Pollution Problem and Potential Utilization. *Int J Food Sci Tech* 1988, 23(4):323-336.
27. Moebus O, Teuber M: Verfahren zur Vergärung von Molke und Ultrafiltrationspermeaten. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 1986, 38(2):119–130.
28. Siso M: The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technol* 1996, 57(1):1-11.
29. Loeser C, Urit T, Nehl F, Bley T: Screening of *Kluyveromyces* strains for the production of ethyl acetate: Design and evaluation of a cultivation system. *Eng Life Sci* 2011, 11(4):369–381.

30. Loser C, Urit T, Forster S, Stukert A, Bley T: Formation of ethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* on whey during aerobic batch and chemostat cultivation at iron limitation. *Appl Microbiol Biot* 2012, 96(3):685-696.
31. Loser C, Urit T, Nehl F, Bley T: Screening of *Kluyveromyces* strains for the production of ethyl acetate: Design and evaluation of a cultivation system. *Eng Life Sci* 2011, 11(4):369-381.
32. Loser C, Urit T, Stukert A, Bley T: Formation of ethyl acetate from whey by *Kluyveromyces marxianus* on a pilot scale. *J Biotechnol* 2013, 163(1):17-23.
33. Urit T, Loeser C, Wunderlich M, Bley T: Formation of ethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* on whey: studies of the ester stripping. *Bioproc Biosys Eng* 2011, 34(5):547-559.
34. Urit T, Stukert A, Bley T, Loser C: Formation of ethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* on whey during aerobic batch cultivation at specific trace element limitation. *Appl Microbiol Biot* 2012, 96(5):1313-1323.
35. Rech R, Cassini C, Secchi A, Ayub M: Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of beta-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1999, 23(2):91-96.
36. Debales SA, Castillo FJ: Production of Lactase by *Candida-Pseudotropicalis* Grown in Whey. *Appl Environ Microb* 1979, 37(6):1201-1205.
37. Gawel J, Kosikowski FV: Application of acid lactase to wine making from Cottage cheese whey concentrates. *Journal of Food Science* 1978, 43:1031-1032.
38. Atra R, Vatai G, Bekassy-Molnar E, Balint A: Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *J Food Eng* 2005, 67(3):325-332.
39. Durham RJ, Hourigan JA, Sleigh RW, Johnson RL: Whey fractionation: wheying up the consequences. *Food Aust* 1997, 49:460-465.
40. Greiter M, Novalin S, Wendland M, Kulbe KD, Fischer J: Desalination of whey by electrodialysis and ion exchange resins: analysis of both processes with regard to sustainability by calculating their cumulative energy demand. *Journal of Membrane Science* 2002, 210(1):91-102.
41. Guu YK, Zall RR: Nanofiltration Concentration Effect on the Efficacy of Lactose Crystallization. *Journal of Food Science* 1992, 57(3):735-739.
42. Houldsworth DW: Demineralization of whey by means of ion exchange and electrodialysis. *International Journal of Dairy Technology* 1980, 33(2):45-51.
43. Ibach A, Kind M: Crystallization kinetics of amorphous lactose, whey-permeate and whey powders. *Carbohydr Res* 2007, 342(10):1357-1365.
44. Chatzipaschali AA, Stamatis, A.G.: Biotechnological Utilization with a Focus on Anaerobic Treatment of Cheese Whey: Current Status and Prospects. *energies* 2012, 5:3492-3525.

45. Yang PZR, McGarvey, J. A. Benemann; J. R.: Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy* 2007, 32(18):4761-4771.
46. Antoni D, Zverlov VV, Schwarz WH: Biofuels from microbes. *Appl Microbiol Biot* 2007, 77(1):23-35.
47. Aktas N, Boyaci IH, Mutlu M, Tanyolac A: Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM). *Bioresource Technol* 2006, 97(18):2252-2259.
48. Bothast RJ, Kurtzman CP, Saltarelli MD, Slininger PJ: Ethanol-Production by 107 Strains of Yeasts on 5-Percent, 10-Percent, and 20-Percent Lactose. *Biotechnol Lett* 1986, 8(8):593-596.
49. Castrillo JI, Ugalde UO: Patterns of Energy-Metabolism and Growth-Kinetics of *Kluyveromyces-Marxianus* in Whey Chemostat Culture. *Appl Microbiol Biot* 1993, 40(2-3):386-393.
50. Domingues L, Lima N, Teixeira JA: Alcohol production from cheese whey permeate using genetically modified flocculent yeast cells. *Biotechnol Bioeng* 2001, 72(5):507-514.
51. Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK: The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biot* 2008, 79:339–354.
52. Grba S, Stehlik-Tomas V, Stanzer D, Vahcic N, Skrlin A: Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 2002, 16(1):13-16.
53. Grubb CF, Mawson AJ: Effects of elevated solute concentrations on the fermentation of lactose by *Kluyveromyces marxianus* Y-113. *Biotechnol Lett* 1993, 15:621–626.
54. Kargi F, Ozmihci S: Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters. *Enzyme Microb Tech* 2006, 38(5):711-718.
55. Parrondo J, Garcia LA, Diaz M: Nutrient Balance and Metabolic Analysis in a *Kluyveromyces marxianus* Fermentation with Lactose-added Whey. *Braz J Chem Eng* 2009, 26:445–456.
56. Rocha SN, Abrahao-Neto J, Gombert AK: Physiological diversity within the *kluyveromyces marxianus* species. *Anton Leew Int J G* 2011, 100:619–630.
57. Zakrzewski E, Zmarlicki S: Ethanolic Fermentation in Whey and Whey-Molasses Mixtures .2. 2-Stage Fermentation Process of Ethanol-Production from Whey and Beet Molasses. *Milchwissenschaft* 1988, 43(8):492-496.
58. Dragonea G, Mussatto, S.I., Almeida e Silva, J., Teixeiraa, J.A.: Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by

- Kluyveromyces fragilis from cheese whey powder. *Biomass and Bioenergy* 2011, 35(5):1977-1982.
59. [http://www.bdbe.de/bioethanol/herstellung_biosprit/], 15.07.2013
60. Bioethanol – mehr als ein Biokraftstoff
[http://www.bdbe.de/index.php/download_file/view/317/108/], 05.08.2013
61. Cote A, Brown WA, Cameron D, van Walsum GP: Hydrolysis of lactose in whey permeate for subsequent fermentation to ethanol. *J Dairy Sci* 2004, 87(6):1608-1620.
62. Oleary VS, Sutton C, Bencivengo M, Sullivan B, Holsinger VH: Influence of Lactose Hydrolysis and Solids Concentration on Alcohol Production by Yeast in Acid Whey Ultrafiltrate. *Biotechnol Bioeng* 1977, 19(11):1689-1702.
63. Guo X, Zhou J, Xiao D: Improved ethanol production by mixed immobilized cells of Kluyveromyces marxianus and Saccharomyces cerevisiae from cheese whey powder solution fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 2010, 160(2):532-538.
64. Oda Y, Nakamura K: Production of ethanol from the mixture of beet molasses and cheese whey by a 2-deoxyglucose-resistant mutant of Kluyveromyces marxianus. *Fems Yeast Res* 2009, 9(5):742-748.
65. Jianming W, G. L, Z. G: Whey Alcohol Fermentation with Mixed Yeast Cultures. *Bioinformatics and Biomedical Engineering* 2009.
66. Magalhães-Guedes KT, Rodrigues, A.K., Gervasio, I., Gervasio, I., Peraro do Nascimento, A., Schwann R.F.: Ethanol production from deproteinized cheese whey fermentations by co-cultures of Kluyveromyces marxianus and Saccharomyces cerevisiae. *African Journal of Microbiology Research* 2013, 7(13):1121-1127.
67. Rose AH, Harrison JS: Yeast technology. In: *The yeasts*. 2 edn. London: Academic Press; 1993: XL, 620 S.
68. Rubio-Teixeira M, Arevalo-Rodriguez M, Lequerica JL, Polaina J: Lactose utilization by Saccharomyces cerevisiae strains expressing Kluyveromyces lactis LAC genes. *J Biotechnol* 2000, 84:97–106.
69. Zou J, Guo XW, Shen T, Dong J, Zhang CY, Xiao DG: Construction of lactose-consuming Saccharomyces cerevisiae for lactose fermentation into ethanol fuel. *J Ind Microbiol Biot* 2013, 40(3-4):353-363.
70. Guimaraes PMR, Teixeira JA, Domingues L: Fermentation of high concentrations of lactose to ethanol by engineered flocculent Saccharomyces cerevisiae. *Biotechnol Lett* 2008, 30:1953–1958.
71. Leitfaden Biogas: Von der Gewinnung zur Nutzung, 5., vollst. überarb. Aufl edn. Gülzow: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe; 2010.
72. Zhang C, Xiao G, Peng L, Su H, Tan T: The anaerobic co-digestion of food waste and cattle manure. *Bioresour Technol* 2013, 129:170–176.

73. Saddoud A, Hassaïri I, Sayadi S: Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. *Bioresource Technol* 2007, 98(11):2102–2108.
74. Luste S, Luostarinen S: Enhanced methane production from ultrasound pre-treated and hygienized dairy cattle slurry. *Waste management (New York, NY)* 2011, 31(9-10):2174–2179.
75. Shilton A, Powell N, Broughton A, Pratt C, Pratt S, Pepper C: Enhanced biogas production using cow manure to stabilize co-digestion of whey and primary sludge. *Environ Technol* 2013:1–6.
76. [<http://www.biolac.com/>], 13.06.2012
77. Lehninger DL, Nelson, MC,: Principles of biochemistry, vol. 4. ed., 2. print. New York: Freeman; 2005.
78. Deák T: Handbook of food spoilage yeasts, 2. ed edn. Boca Raton, Fla: CRC Press; 2008.
79. Rose AH, Harrison JS: Biology of yeasts. In: *The yeasts*. 2 edn. London: Academic Press; 1987: XI, 423 S.
80. Doran PM: Bioprocess engineering principles. London: Academic Press; 1995.
81. Lagunas R: Misconceptions About the Energy-Metabolism of *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Yeast* 1986, 2(4):221-228.
82. Rosa C: Biodiversity and ecophysiology of yeasts. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* 2006, [1].
83. Barnett JA, Entian Karl-Dieter: A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast* 2005, 22:835–894.
84. Barnett JA, Sims AP: The Requirement of Oxygen for the Active-Transport of Sugars into Yeasts. *Journal of General Microbiology* 1982, 128(Oct):2303-2312.
85. Siso MIG, Ramil E, Cerdan ME, FreirePicos MA: Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Ethanol production and the Crabtree effect. *Enzyme Microb Tech* 1996, 18(8):585-591.
86. Crabtree HG: Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J* 1929, 23(3):536-545.
87. Rose AH, Harrison JS: Physiology and biochemistry of yeasts; 1971.
88. De Deken RH: The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J Gen Microbiol* 1966, 44(2):149-156.
89. Chmiel H: Bioprozesstechnik, 3., neu bearb. Aufl edn. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl; 2011.
90. Mutzall K: Einführung in die Fermentationstechnik. Hamburg: Behr; 1993.

91. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, 6th, completely rev. ed edn. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2003.
92. Andras R, Wang JM, Jozsef C, Cecilia H, Gyula V: Experimental Investigation of the Sweet Whey Concentration by Nanofiltration. *Food Bioprocess Tech* 2011, 4(5):702-709.
93. [<http://www.kochmembrane.com/PDFs/KMS-SR3D-2012.aspx>], 23.05.2013
94. Wagner C: Adaption und Evaluierung von Entsalzungsverfahren für Molkenpermeat. Hannover: Leibniz Universität Hannover; 2010.
95. Mortimer CE, Schilling G, Schweizer HJ: Chemie: Das Basiswissen der Chemie in Schwerpunkten; mit Übungsaufgaben ; anorganische Chemie, organische Chemie, Theorie der chemischen Bindung, physikalische Chemie, Radio-Chemie ; 232 zweifarbige Abbildungen, 118 Tabellen, 4., neubearb. Aufl edn. Stuttgart: Thieme; 1983.
96. Quaas B: Einflussfaktoren auf die Fermentation von TEM 30. *Bachelor-Arbeit*. Hannover: Leibniz Universotät Hannover; 2012.
97. Guu MYK, Zall RR: Lactose Crystallization - Effects of Minerals and Seeding. *Process Biochem* 1991, 26(3):167-172.
98. Lifran EV, Vu TTL, Durham RJ, Hourigan JA, Sleigh RW: Crystallisation kinetics of lactose in the presence of lactose phosphate. *Powder Technol* 2007, 179(1-2):43-54.
99. [<http://www.dsmz.de>], 23.05.2013
100. [<http://www.straininfo.net/>], 23.05.2013

Publikationen, Poster und Vorträge

- C. Wagner , S. Beutel , H. Buchholz, T. Scheper (9/2011): Ethanol production from concentrated whey permeate (Posterbeitrag, 8th European Congress of Chemical Engineering together with ProcessNet-Annual Meeting; Berlin)
- C. Wagner, S. Beutel, H. Buchholz, T. Scheper (03/2012): Einfluss der Nanofiltration auf die Fermentation von teilzuckertem Molkenkonzentrat (Posterbeitrag, Informationstag Membrantechnik, DECHEMA, Frankfurt am Main)
- C. Wagner, S. Beutel, H. Buchholz, R. Finke, L. Wilkening, T. Scheper (09/2012): Ethanol production from deproteinized whey concentrate in lab and industrial scale (Vortrag, ProcessNet-Jahrestagung und 30. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen; Karlsruhe)
- C. Wagner, S. Beutel, H. Buchholz, R. Finke, L. Wilkening, T. Scheper (08/2012): Ethanolherstellung aus teilzuckertem Molkenkonzentrat im Labor- und Industriemaßstab. CIT-Journal 2012, 84, Nr. 8, S. 1296–1297.
- C. Wagner, S. Beutel, H. Buchholz, R. Finke, L. Wilkening, T. Scheper (03/2013): Neue Energieträger: Bioethanol aus teilzuckertem Molkenkonzentrat (Posterbeitrag, Frühjahrstagung der Biotechnologen 2013)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christopher Wagner

Geburtstag: 22.07.1983

Geburtsort: Bad Pyrmont

Nationalität: Deutsch

Schulbildung:

1990 – 1994 Grundschule Aerzen

1994 – 1996 Hermannschule, Orientierungsstufe, Hameln

1996 – 2003 Viktoria-Luise-Schule, Gymnasium, Hameln

Abschluss: Abitur

Studium:

2005 – 2008 Life Science, Bachelor

Abschluss: B.Sc.

2008 – 2010 Life Science, Master

Abschluss: M.Sc.

2010 – 2013 Technische Chemie, Promotion

Abschluss: Dr. rer. nat.