

Nachhaltige Verwertung von Wertstoffströmen: Gewinnung von Ethanol aus einem Reststoff der Molkeverarbeitung

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Christian Benecke

geboren am 31.10.1977 in Hannover

2011

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 12.08.2011

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Christian Benecke

Hannover, im August 2011

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper erstellt. Bei ihm bedanke ich mich für die interessante Aufgabenstellung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen im Institut, sowie die sehr gute Betreuung während der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Korreferats dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jürgen Caro für die Bereitschaft zur Übernahme des Prüfungsvorsitzes sowie zur Prüfung im Nebenfach.

Ich danke Herrn Dr. Heinrich Buchholz von der Fa. Biolac GmbH & Co. KG für die Möglichkeit, eine aktuelle Fragestellung des produzierenden Gewerbes bearbeiten zu können, für den ermöglichten Einblick in die Milchwirtschaft sowie die fachliche Unterstützung bei der Arbeit.

Herrn Dr. Sascha Beutel danke ich für die fortwährende Unterstützung meiner Arbeiten, sowohl durch die kompetente Beratung, durch neue Denkanstöße und durch die Ermöglichung der einen oder anderen Neuanschaffung!

Herrn Dipl.-Ing. Reinhard Finke von der Fa. Kraul Wilkening und Stelling GmbH danke ich für den interessanten Erfahrungsaustausch, die Einblicke in die Ethanolproduktion und die kooperative Zusammenarbeit. Ich hoffe, dass ich durch meine Arbeiten eine Grundlage für eine erfolgreiche, geschäftliche Beziehung bereiten konnte.

Besonders danken möchte ich Frau Martina Weiss, die es neben einer hervorragenden technischen Unterstützung auch noch schafft, dass das TCI nicht endgültig im Chaos der Doktoranden versinkt.

Ich danke Herrn Dipl.-Ing. Thorleif Hentrop und seiner Elektronik-Werkstatt für die Unterstützung bei der Umsetzung mancher abstruser Wünsche.

Der mechanischen Werkstatt unter der damaligen Leitung von Herrn Wilhelm Behnsen danke ich für die Abarbeitung von zahlreichen großen und kleinen Baustellen und Reparaturen.

Danksagung

Ich danke den Studierenden/innen Joanna Schellenberg, Muge Yilmaz, Henrik Neubacher, Daniel Schaper, Christian Ude, Ferdinand Rüdinger, Mathias Flüggen, Steffen Henkel, Patrick Jonczyk und Mathias Krätzig, die mit ihren Arbeiten unterschiedlichen Umfangs zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei all denen, die mich während der meiner Zeit am Institut begleitet und unterstützt haben. Besonders danken möchte ich hierbei Anne Glindkamp, Tim Höpfner, Arne Bluma, Alain Graf und Christian Endres. Wir waren sicherlich nicht immer einer Meinung, aber wir hatten eine Menge Spaß!

Ich danke Herrn Marius Seglias und Herrn Udo Kelker von der Fa. Holcim (Deutschland) AG für das in meine Person gesetzte Vertrauen, die mir eröffneten Perspektiven, sowie die fortwährende Motivation und Unterstützung um diese Arbeit abzuschließen.

Meinen Eltern gebührt unermesslicher Dank für die stetige und vorbehaltlose Unterstützung während Schule, Studium und Promotion, sowie die Geduld, mich auch in schwierigen Phasen zu ertragen.

Kurzzusammenfassung

Nachhaltige Verwertung von Wertstoffströmen: Gewinnung von Ethanol aus einem Reststoff der Molkeverarbeitung

Dipl.-Chem. Christian Benecke

Eine weltweit steigende Nachfrage nach Käse und anderen Milchprodukten hat einen stetigen Anstieg der Molkenproduktion zur Folge. Molke wird nicht mehr nur als Abfall betrachtet, sondern dient als Quelle für Wertstoffe wie Lactose und Proteine. Bei deren Produktion fällt als Abfall ein deproteiniertes, teilzuckertes Molkenkonzentrat an, welches noch signifikante Lactosemengen enthält. Diese Lactose lässt sich jedoch nicht mehr wirtschaftlich in der benötigten Qualität gewinnen.

Diese Arbeit beschreibt eine Methode, um die Wertschöpfung aus dem Verarbeitungsprozess von Molke zu steigern. Dazu wurden Methoden evaluiert, die in dem Molkenkonzentrat enthaltene Lactose als Substrat für die Vergärung zu Ethanol zu nutzen. Dazu wurden Hefen vom Stamm *Kluyveromyces marxianus* auf ihre Eignung für diesen Prozess getestet. Dabei waren besonders die Abbauraten für das Substrat sowie ein maximierter Umsatz ausschlaggebend.

Zur Anzucht der Hefe wurde eine Verfahrensweise entwickelt, welche auf den ausschließlichen Einsatz des Molkenkonzentrates als Nährstoffquelle basiert und den kostenaufwändigen Einsatz von Nährstoffen überflüssig macht. Hierbei wurde das Verfahren hinsichtlich anfänglicher Substratkonzentration und –abbauraten optimiert.

Im Blick auf die hohe Salzbelastung des Molkenkonzentrates wurden Untersuchungen zur inhibierenden oder proliferierenden Wirkung einzelner Anionen und Kationen auf die Hefezellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass eine Entsalzung des Molkenkonzentrates zwingend erforderlich ist. Hierzu wurde die Nanofiltration als mögliches Verfahren erfolgreich angewendet.

Bei der Verwendung von nicht entsalztem Molkenkonzentrat konnten durch Vergärung des verdünnten Substrates relative Ethanolausbeuten von ca. 90 % erzielt werden. Durch Erhöhung der Biomassekonzentration konnte zudem die Gärungsdauer auf ca. 25 h halbiert werden.

Schlagnvorte: *Kluyveromyces*, Lactose, Molke, Ethanol, Nanofiltration,

Abstract

Sustainable utilization of resources: Production of ethanol from Dairy waste streams

Dipl.-Chem. Christian Benecke

The worldwide increasing demand for cheese and dairy products leads to a steady increase of whey production. Today, whey is no more considered as waste, but serves as source for materials like lactose and proteins. At the end of this process a whey concentrate is released, which contains still a significant content of lactose. This lactose could not be obtained in the desired quality.

This thesis describes a method to increase added value from the utilization-process of whey. To achieve this intent, methods were evaluated, to use the remaining lactose as a substrate for the fermentation to ethanol. Yeasts of the strain *Kluyveromyces marxianus* were evaluated for the use in this process. The degradation rate of the substrate and a maximized conversion were the main objectives.

For the growth of the yeast cells, a method was developed, which uses only whey concentrate as substrate and avoids the usage of other materials for nutrition. The method was optimized in consideration of initial substrate concentration and degradation rate.

The high content of salts in the whey concentrate leads to the further investigations of inhabiting or proliferating effects of different anions and cations on the used yeast cells. It becomes obvious, that a desalting or dilution of the used whey concentrate is mandatory. For that purpose, the nanofiltration was applied successfully to this process,

The usage of not desalted whey concentrate is also possible. With an adequate dilution of the whey concentrate, relative yields of ca. 90 % could be achieved. With a significant increase of the initial biomass, the duration of the fermentation process could be halved to ca. 25 h.

Keywords: Kluyveromyces, lactose, whey, ethanol, nanofiltration

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	5
2	Theoretischer Teil	7
2.1	Molke	7
2.1.1	Zusammensetzung von Molke	7
2.1.2	Molke in Zahlen	11
2.1.3	Umweltproblematik	14
2.1.4	Verwendung von Molke	15
2.2	Gewinnung von Ethanol aus TEM mit 30 % Trockenmasse	17
2.3	Entsalzung von TEM 30 oder Molke	21
2.3.1	Druckgetriebene Membranverfahren	21
2.3.2	Elektrochemische und auf Ionenaustausch basierende Membranverfahren ...	22
2.3.3	Fällung von Salzen	25
3	Experimenteller Teil.....	27
3.1	Teilenzuckertes Molkenkonzentrat als Rohstoff.....	27
3.2	Mikrobiologische Verwertung von TEM	29
3.2.1	Auswahl eines geeigneten Hefestammes	30
3.2.2	Wachstumstests	30
3.3	Aerobe Kultivierung zur Biomasseproduktion	36
3.3.1	Bestimmung der optimalen initialen Substratkonzentration	36
3.4	Untersuchung zum Stoffwechsel von <i>K. marxianus</i> DSM 5422	38
3.4.1	Wachstum von <i>K. marxianus</i> DSM 5422 auf unterschiedlichen Substraten	38
3.4.2	Einfluss von zusätzlichem Stickstoff auf <i>K. marxianus</i> DSM 5422	40
3.4.3	Das Fermentationsverhalten bei hohen Zuckerkonzentrationen	43
3.4.4	Inhibierung des Zellwachstums durch Ethanol	45
3.4.5	Hefezucht auf der Basis von TEM 30.....	48

Inhaltsverzeichnis

3.4.6	Veränderung der Zellmorphologie bei Kultivierung und Gärung	50
3.5	Ethanolproduktion durch alkoholische Gärung.....	52
3.5.1	Maximierung der Ethanolausbeute	52
3.5.2	Vergärung mit hohen Biomassekonzentrationen/Biomasserückgewinnung	56
3.6	Einfluss der Salzfracht im Molkenkonzentrat.....	59
3.6.1	Einfluss bestimmter Kationen	59
3.6.2	Einfluss von Chlorid	63
3.6.3	Selektive Fällung von Calciumphosphat.....	66
3.6.4	Einfluss der Salzfracht bei hoher Lactosekonzentration	67
3.7	Demineralisierung von Molkeprodukten	72
3.7.1	Anlage zur Nanofiltration	72
3.7.2	Nanofiltration von TEM 30	73
3.7.3	Beurteilung der Entsalzungstechnologien unter bei der Ethanolproduktion	77
3.7.4	Druckgetriebene Membranverfahren.....	77
3.7.5	Kombinationen aus Elektrodialyse und Ionenaustauscher.....	80
3.7.6	Wirtschaftlichkeit der Produkte aus deproteiniertem Molkenkonzentrat.....	80
3.7.7	Einsatz von NF-Anlagen für molkeverarbeitende Betriebe	81
4	Zusammenfassung und Ausblick	84
5	Literaturverzeichnis	87
6	Anhang	92
7	Abkürzungsverzeichnis	4
8	Abbildungsverzeichnis	102
9	Tabellenverzeichnis	104
10	Lebenslauf	105

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

AAH	Anionenaustauscherharz
AbwV	Abwasserverordnung
AAM	Anionenaustauschermembran
bidest.	doppelt destilliert (<i>bidestillatus</i>)
BSB ₅	Biochemischer Sauerstoffbedarf (innerhalb 5 Tagen)
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
ED	Elektrodialyse
EDI	Elektrodeionisation
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IE	Ionenaustausch (engl. ionic exchange)
KAH	Kationenaustauscherharz
KAM	Kationenaustauschermembran
MBV	Mechanische Brüdenverdichtung
MF	Mikrofiltration
NF	Nanofiltration
OD	Optische Dichte
pH	pH-Wert (<i>potentia hydrogenii</i>)
RO	Umkehrosmose (engl. reverse osmose)
TBV	Thermische Brüdenverdichtung
TEM 30	Teilenzuckertes Molkenkonzentrat (Trockenmasse 30 %); Melasse
UF	Ultrafiltration
VE	voll entsalzt (VE-Wasser)
WPC	Molkenproteinkonzentrat (engl. whey protein concentrate)

Einleitung und Zielsetzung

1 Einleitung und Zielsetzung

Jedes Jahr fallen bei der Produktion von Käse und anderen Milchprodukten alleine in der Bundesrepublik Deutschland über 14 Mio. t Molke an [1]. Molke ist auf der einen Seite ein werthaltiger Rohstoff, auf der anderen Seite aber auch ein aus Umweltsicht durchaus problematischer Abfallstoff. Lange Zeit wurde Molke ohne Rücksicht auf die folgende Eutrophierung unbehandelt in offene Gewässer eingeleitet. Mit dem gewachsenen Umweltbewusstsein wurde diese Art der Entsorgung gesetzlich untersagt. Der hohe Anteil an oxidierbaren organischen Substanzen in der Molke, belastet die biologischen Klärstufen kommunaler Klärwerke extrem. Daher unternahmen die Molkereien verstärkte Anstrengungen weitere Verwendungsmöglichkeiten für Molke zu finden [2].

Die Mengen, die zu Konsumprodukten wie Molkendrinks oder –pulver verarbeitet werden, stehen allerdings in keinem Verhältnis zu der produzierten Menge. Eine endgültige, nachhaltige Lösung dieses Problems ist bislang nicht gefunden worden.

Um die Wertschöpfung aus dem gesamten Herstellungsprozess zu optimieren und die Abfalllast zu minimieren, wird aus der anfallenden Molke das darin enthaltene Restprotein gewonnen und als Molkenproteinkonzentrat vermarktet. In weiteren Prozessschritten wird die Lactose aus dem verbleibenden Permeat abgetrennt und wiederum vermarktet. Das verbleibende Molkenkonzentrat stellt zwar nur noch einen Bruchteil des ursprünglichen Molkenvolumens dar, enthält jedoch nahezu die gesamte ursprüngliche Salzfracht und immer noch ungefähr 10 % der anfänglichen Lactosemenge, welche sich bislang nicht mehr wirtschaftlich abtrennen lässt. Die momentanen Entsorgungswege sind die Verbringung auf landwirtschaftliche Flächen oder der zuzahlungspflichtige Einsatz als Co-Substrat in Biogasanlagen [3].

Eine Umsetzung der gesamten, im Molkenkonzentrat verbliebenen Lactose zu Ethanol könnte zum einen zusätzliche Deckungsbeiträge aus einem bestehenden Prozess generieren, zum anderen würde sich bei Erfolg eine neue Rohstoffquelle erschließen. Bei einer angenommenen Molkenproduktion von 14 Mio. t pro Jahr alleine in Deutschland mit einem Lactosegehalt von 4,8 % [4], entspricht der bisher nicht verwertbare Rest ca. 67.000 t

Einleitung und Zielsetzung

Lactose. Daraus ließen sich rechnerisch ca. 36.000 t Ethanol gewinnen. Mit dieser Menge Ethanol könnten ca. 23.500 t herkömmlicher Ottokraftstoff eingespart werden [5]. Dadurch würde sich außerdem die Emission von CO₂ fossilen Ursprungs um ca. 51.000 t verringern [6]!

Das Ziel dieser Arbeit war es, die gesamte Wertschöpfung aus dem Prozess der Molkeverarbeitung zu steigern. Dazu sollte versucht werden, aus der in dem Molkenkonzentrat enthaltenen Lactose Ethanol durch alkoholische Gärung zu gewinnen. Dazu war es zunächst erforderlich, geeignete Hefen zu finden die in der Lage sind, Lactose direkt als Substrat zu nutzen.

Im Anschluss galt es, geeignete Bedingungen zu erarbeiten, unter denen die gewählten Hefestämme kultiviert werden können, um die Grundlagen für den Aufbau einer eigenen Biomassenproduktion zu kennen. Dieses wird unterstützt durch Untersuchungen zum Stoffwechsel der verwendeten Hefen. Aus den gewonnenen Daten sollten Rückschlüsse gezogen werden, um sowohl den Prozess der Biomassenproduktion als auch den der Alkoholgewinnung positiv zu beeinflussen.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollten die Möglichkeiten der Vergärung des Molkenkonzentrates evaluiert werden. Wichtig waren hierbei die Maximierung der Ethanolausbeute sowie eine möglichst einfache und ökonomische Prozessführung.

In dem abschließenden Teil der Arbeit wurde die Thematik der Salzfracht bzw. der Verringerung eben dieser Salzbelastung durch verschiedene Methoden und die daraus resultierenden Auswirkungen beleuchtet.

2 Theoretischer Teil

2.1 Molke

Unter dem Oberbegriff Molke werden die flüssigen Rückstände aus der Käse- und Caseinherstellung sowie der Sojaverarbeitung verstanden. Dabei werden drei Arten von Molke unterschieden, die aufgrund unterschiedlicher Verarbeitungsprozesse entstehen [1].

1. Süßmolke: Die Süßmolke, welche ca. 80 % des gesamten Molkenanfalls darstellt, entsteht bei der Herstellung von Käse mit Lab-Enzymen. Nach der Fällung des Caseins durch die Enzyme wird es durch Mikrofiltration (MF) von den löslichen Bestandteilen der Milch abgetrennt [3].
2. Durch den Zusatz von milchsäurebildenden Bakterien, die für die Frischkäse- und Quarkproduktion Verwendung finden, entsteht Sauermolke. Der Anteil der Sauermolke am gesamten Molkenanfall beträgt ca. 20 % [7].
3. Technische Molke oder Caseinmolke: Diese Molke, deren Menge zu vernachlässigen ist, fällt durch direkte Zugabe von Mineralsäuren zur Milch bei der Herstellung von technischem Casein an [8].

2.1.1 Zusammensetzung von Molke

Die Zusammensetzung der Molke variiert aufgrund der unterschiedlichen technischen Verfahren, sowie der tierartsspezifischen Herkunft der Milch und der Jahreszeit [7],[9]. Die Zusammensetzungen der verschiedenen Molkentypen sind in Tabelle 1 dargestellt. Der Trockenmasseanteil der Süßmolke beträgt etwa 6 %. Der Feststoff besteht aus 75 % Lactose, 14 % Proteinen, 8 % anorganischen Salzen (Asche) und zu 3 % aus Fetten. Die Salze bestehen hauptsächlich aus den Kationen Natrium, Kalium und Calcium, sowie aus den Anionen Chlorid und Citrat. Desweiteren enthält Molke Vitamin B₁, B₂ und Vitamin C [3].

Theoretischer Teil

Tabelle 1: Zusammensetzung der unterschiedlichen Mol Kentypen [3]

Parameter	Süßmolke	Sauermolke	Caseinmolke
Trockenmasse [%]	6,20	5,70	6,10
Lactose [%]	4,80	4,60	4,70
Proteine [%]	0,75	0,30	0,50
Fette [%]	0,05	< 0,01	< 0,01
Asche [%]	0,60	0,08	0,90
pH-Wert	6,10	4,60	4,40

2.1.1.1 Lactose

Die umweltbelastende Wirkung von Molke ist hauptsächlich auf den hohen Lactosegehalt zurückzuführen. Lactose, nach IUPAC als [4-(β -D-Galactopyranosyl)-D-glucopyranose] bezeichnet, ist ein Disaccharid. Sie besteht aus den Monosacchariden Glucose und Galactose, welche über eine β -1,4-glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Lactose kommt natürlich ausschließlich in Milch von Säugetieren und Menschen vor, wo sie die wichtigste Energiequelle darstellt.

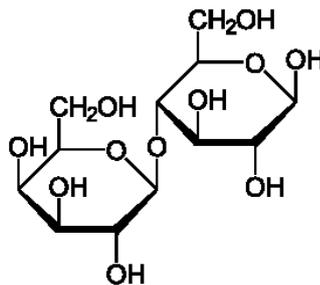


Abbildung 1: Strukturformel von α -Lactose

Die stabilste Form der Lactose ist das α -Lactose-Monohydrat. In dieser Form kristallisiert Lactose aus übersättigten Lösungen bei $T < 93,5^\circ\text{C}$ aus. Eine Kristallisation von Lactose aus wässrigen Lösungen bei $T > 93,5^\circ\text{C}$ führt zur Bildung von wasserfreier β -Lactose. Bei einer

Theoretischer Teil

schnellen Trocknung, wie z.B. bei der Herstellung von Milchpulver durch Sprühtrocknung entsteht ein amorphes Gleichgewichtsgemisch aus α - und β -Lactose [16].

Prinzipiell ist Lactose in Wasser bis zu einer Sättigungskonzentration von $216 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ löslich. Bemerkenswert dabei ist jedoch, dass sich die Löslichkeit der Anomere α - und β -Lactose deutlich unterscheiden. Die Löslichkeit reiner α -Lactose beträgt nur $50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, die von β -Lactose liegt dagegen deutlich über $450 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Im Lösungsgleichgewicht beträgt das Verhältnis von α - und β -Lactose 1:1,8 [16].

Diese Eigenschaft hat entscheidende Auswirkungen auf den Gewinnungsprozess von Lactose durch Kristallisation, da zunächst die schlechter lösliche α -Lactose auskristallisiert. Die gut lösliche β -Lactose kristallisiert nicht in dieser Form aus, sondern wandelt sich zunächst in die α -Lactose um und kristallisiert dann aus.

Lactose findet heutzutage vor allem bei der Herstellung von Backwaren, Süßwaren sowie Milchprodukten Anwendung. Während die Süßkraft gegenüber Saccharose oder Glucose vergleichsweise gering ist, wirkt Lactose als Emulgator oder Trägersubstanz für Aromen. In der Pharmaindustrie dient Lactose als Trägermaterial für Wirkstoffe [16].

Neben kristalliner Lactose sind auch verschiedene Hydrolysate wie z.B. Glucose- oder Galactosesirup am Markt erhältlich. Lactose lässt sich auch als Substrat zur Xanthangewinnung einsetzen. Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Produktion von D-Tagatose, die als kalorienarmes Süßungsmittel verwendet wird [17].

Ein vielversprechender Ansatz ist die enzymatische Isomerisierung von Lactose zu Lactulose [*4-O-(β -D-Galactopyranosyl)-D-fructofuranose*] in Gegenwart von Fructose. Lactulose ist ein präbiotischer Zucker, welcher etwas süßer als Lactose ist. Im Gegensatz zu Lactose wird Lactulose nicht vom menschlichen Körper aufgenommen und wirkt daher abführend. Diese abführende Wirkung wird auch zur Therapie von Darmerkrankungen genutzt, da das Wachstum von milchsäurebildenden Darmbakterien begünstigt wird, während ammoniakbildende Bakterien gehemmt werden [22].

Durch zunehmendes Interesse an Biopolymeren und deren Anwendungen in der Industrie und in der Medizin eröffnet sich auch eine weitere Verwendungsmöglichkeit für Lactose. Als

Theoretischer Teil

Ausgangssubstanz für die Milchsäureherstellung bildet sie die Grundlage für die Produktion von biologisch abbaubaren Kunststoffen [23]:

- **Polylactide** (PLA engl. *polylactic acid*) werden aus natürlichen, rein pflanzlichen Rohstoffen wie Lactose, Stärke oder Dextrin nach Umwandlung zu Milchsäure über Polykondensationsreaktionen erzeugt. Sie sind neutral, biokompatibel und unschädlich bei Verbrennung und Deponierung. Sie werden als Verpackungen in der Lebensmittelindustrie benutzt und finden auch Anwendung als Implantate oder Wirkstoffträger in der Medizintechnik. Eine weitere Verwendungsmöglichkeit ist die Herstellung von Textilien [24].
- **Polylactidcoglycolide** (PLGA) bestehen aus Milchsäuremolekülen, die an Glycolsäure gebunden sind. Sie können ähnlich wie Polylactide verwendet werden und dienen z.B. als resorbierbares chirurgisches Nähmaterial. Nanopartikel aus PLGA können auch als Träger für Arzneistoffe verwendet werden [23].

2.1.1.2 Molkenproteine

Neben einem hohen Gehalt an Lactose befinden sich in Molke vor allem noch wertvolle Molkenproteine, welche nach der Fällung des Caseins in der Lösung verbleiben. Man unterscheidet die Molkenproteine entsprechend ihres Anteils in majore und minore Molkenproteine.

Eine Übersicht über die Molkenproteine ist in Tabelle 2 dargestellt.

Theoretischer Teil

Tabelle 2: Zusammensetzung des Molkenproteins [19]

	Konzentration in Molke [g·l ⁻¹]	Größe [kDa]	Anzahl Aminosäuren	pI	
β-Lactoglobulin	2-4	18	162	5,2	majores Molkenprotein
α-Lactalbumin	0,6-1,7	14	123	4,2 - 4,5	
BSA	0,4	66	582	4,7 - 4,9	
Immunoglobuline	0,4-1,0	>146	k.A.	5,5 - 8,3	
Lactoferrin	0,1	82,8	708	8,8	minores Molkenprotein
Transferrin	0,1	76	704	6,7	
Lactoperoxidase	0,025	80,642	712	8,6	
B2-Macroglobulin	0,004	11,636	98	5,6	
Butyrophilin	k.A.	60	526	5,1	
Ceruloplasmin	k.A.	121,404	1.062	5,4	

Aufgrund der Aminosäurezusammensetzung von Molkenproteinen zählen diese zu den hochwertigsten Proteinen für die menschliche Ernährung. Der hohe Gehalt essentieller Aminosäuren macht Molkenprotein dazu geeignet, pflanzliche Proteine durch gezielten Zusatz aufzuwerten [20]. Zusätzlich zu den ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Molkenproteinen ermöglichen die emulgatorischen Eigenschaften ihren Einsatz in vielen pharmazeutischen und technischen Anwendungen, beispielsweise als Mittel zur Nahrungsergänzung oder als Stabilisator von Lebensmitteln [18][19].

2.1.2 Molke in Zahlen

2.1.2.1 Deutschland

Mit dem seit einigen Jahren andauernden Anstieg der Käseproduktion steigt auch die Menge an Molke, die industriell verarbeitet werden kann. Im Jahr 2008 wurden in Deutschland fast $1,5 \cdot 10^7$ t Molke erzeugt. Damit hat sich die anfallende Molkenmenge in Deutschland binnen 15 Jahren mehr als verdoppelt [1]. Abbildung 2 zeigt die Entwicklung der Molkenproduktion in Deutschland von 1991 - 2008:

Theoretischer Teil

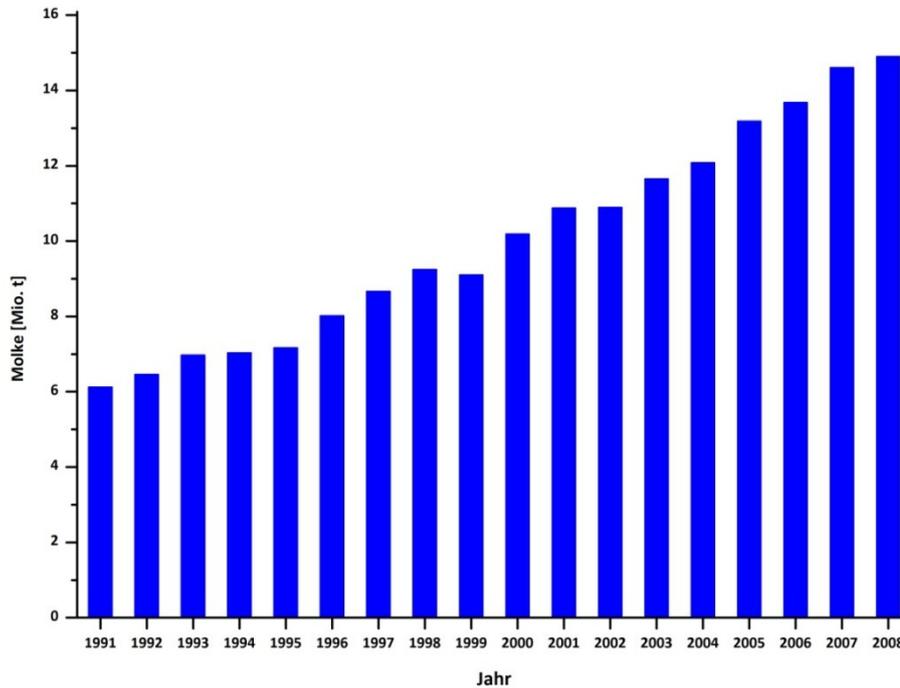


Abbildung 2: Molkenanfall in Deutschland von 1991 – 2008 [1]

Auch der Gesamtumsatz der Molkerei- und Milchindustrie, deren Umsatz 2002 bei 19,2 Mrd. Euro lag, steigt weiter an. Im Jahre 2008 wurde ein Umsatz von insgesamt 22,9 Mrd. Euro erreicht. Die milchverarbeitende Industrie bildet damit den größten Zweig der deutschen Ernährungswirtschaft und stellt außerdem mit etwa 36.500 Beschäftigten einen wesentlichen Wirtschaftsfaktor in Deutschland dar [25].

2.1.2.2 Weltweit

Auch in der globalen Betrachtung lässt sich ein deutlicher Anstieg der Käseproduktion verzeichnen. Da die anfallende Molkenmenge unmittelbar mit der produzierten Menge Käse zusammenhängt und Daten über den tatsächlichen Molkenanfall nicht verfügbar waren, soll die jeweilige Käseproduktion als Anhaltspunkt dienen.

Theoretischer Teil

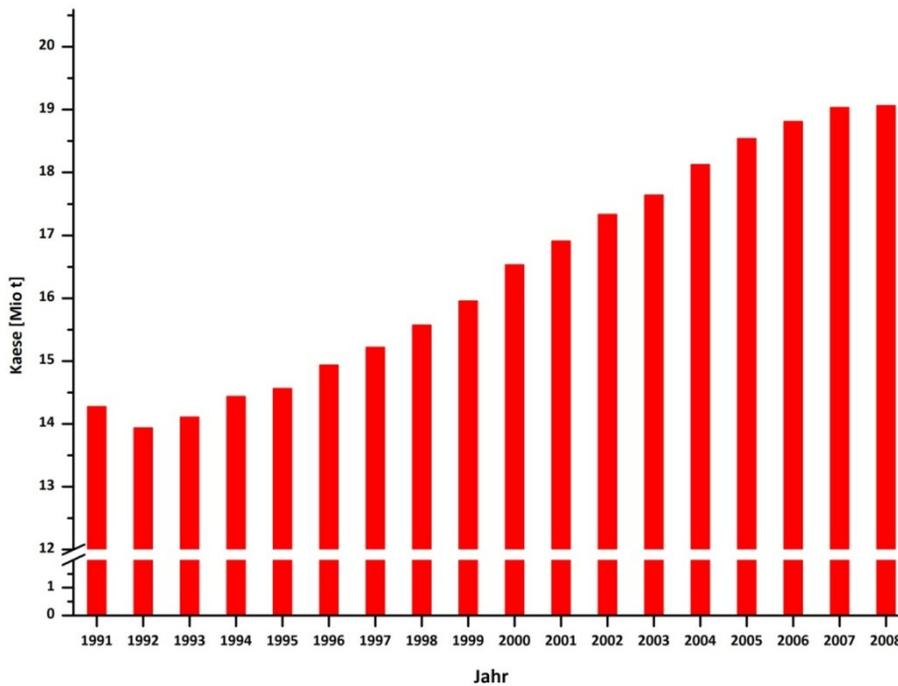


Abbildung 3: Weltweite Käseproduktion von 1991 – 2008 [15]

Wie sich aus Abbildung 3 entnehmen lässt, ist die weltweite Käseproduktion von 1991 bis 2008 um 33 % angestiegen. Dieser Anstieg ist nicht homogen über die Kontinente verteilt sondern resultiert hauptsächlich aus der wachsenden Käseproduktion in Europa, sowie Nord- und Südamerika. Die vielfach für starke Preisanstiege im Bereich von Milch und Milchprodukten verantwortlich gemachten asiatischen Länder spielen bei der Käseproduktion keine Rolle, wie aus Abbildung 4 hervorgeht:

Theoretischer Teil

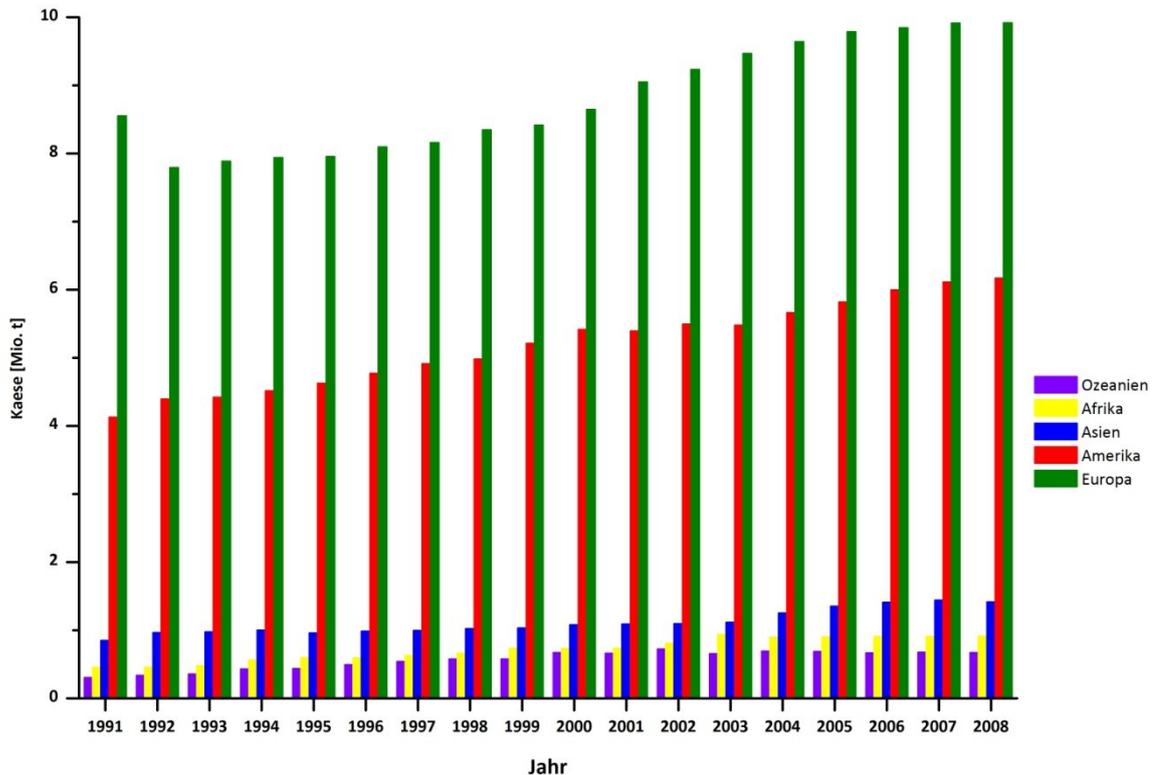


Abbildung 4: Weltweite Käseproduktion - nach Regionen aufgeschlüsselt [15]

Auch wenn die Käseproduktion in den asiatischen Ländern in dem betrachteten Zeitraum um 75 % gestiegen ist, beträgt der Anteil an der gesamten Käseproduktion lediglich 7 %. Bei einem angenommenem Molkenanfall von 9 t Molke pro t Käse (je nach Käsesorte zwischen 8,8 und 9,2 t Molke pro t Käse) fallen weltweit bei der Käseproduktion ca. $1,7 \cdot 10^8$ t bzw. $1,75 \cdot 10^8 \text{ m}^3$ Molke an [11][14].

2.1.3 Umweltproblematik

Zum Einen die bereits in 2.1.1 gezeigte Zusammensetzung und zum Anderen alleine die in 2.1.2 aufgezeigten anfallenden Mengen des Reststoffes Molke machen eine nachhaltige und effiziente Strategie zur Verwertung und Entsorgung notwendig.

Theoretischer Teil

Mit einem chemischen Sauerstoffbedarf (CSB) von $60.000 - 80.000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ und einem biologischen Sauerstoffbedarf (BSB₅) von $30.000 - 50.000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ stellt die anfallende Molke eine enorme Umweltbelastung dar. Ein anschaulicher Vergleich: Es wird geschätzt, dass in einer Molkerei, welche täglich 100 t Milch zu Käse verarbeitet, etwa die gleiche Menge an organischem Abfall anfällt, wie es in einer Stadt mit 55.000 Einwohnern der Fall wäre [35], wobei Käsereien mit einer Verarbeitungskapazität von 1000 t/d Milch keine Seltenheit sind [26].

Eine direkte Einleitung von Molke in das kommunale Abwassersystem würde die biologischen Klärstufen der Kläranlagen sehr stark belasten, so dass die Einleitung solcher Abwässer in nahezu allen Kommunen verboten ist. Der Grenzwert beim CSB zur Einleitung in das Abwasser beträgt beispielsweise $2.000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ und könnte insofern nur durch eine sehr starke Verdünnung mit hohem Wassereinsatz erreicht werden [27].

Die in 2.1.4 gezeigte Verarbeitung von Molke mindert das Entsorgungsproblem zwar beträchtlich, letztendlich bleiben aber immer noch große Mengen belastender Abfallstoff, welcher momentan bestenfalls kostenneutral als Viehfutterzusatz oder mit Kostenaufwand als Co-Substrat in Biogasanlagen verwertet wird.

2.1.4 Verwendung von Molke

Molke wird hauptsächlich zu Tierfutter und zu Produkten verarbeitet, die in der Lebensmittelindustrie verwendet werden.

Molke besteht zu ca. 93 % aus Wasser. Um ökonomisch und ökologisch zu produzieren, wird den molkeverarbeitenden Betrieben Molke als Molkenkonzentrat mit einem Trockenmasseanteil von ca. 30 % angeliefert [2]. Molkenkonzentrat wird durch ein Eindampfsystem oder mittels Umkehrosmose (RO) durch Entfernen von Wasser unter hohem Druck hergestellt [10].

Im weiteren Verarbeitungsprozess werden durch Ultrafiltration (UF) Molkenproteine abgetrennt, die weiter zu Molkenproteinkonzentrat (WPC) aufbereitet werden. Diese Serumproteinlösung hat eine Trockenmasse von ca. 18 % und wird als Proteinprodukt

Theoretischer Teil

vermarktet. Durch eine weitere Trocknung erfolgt häufig noch eine weitere Veredelung zu verschiedenen Molkenproteinprodukten [15].

Das Permeat der Ultrafiltration (deproteinierte Molke) stellt die Grundlage zur Gewinnung von Lactose dar. Molkenpermeat enthält überwiegend Lactose, mineralische Salze und Restprotein. Das Permeat wird zunächst durch weitere Entwässerung unter Vakuum aufkonzentriert. Anschließend erfolgt die Kristallisation der Lactose in Kristallisationsreaktoren durch Anwendung geeigneter Temperatur- und Rührprofile. Die kristallisierte Lactose wird abgetrennt und anschließend getrocknet. Durch weitere Prozessschritte kann die Lactose zu unterschiedlichen Qualitätsstufen aufgereinigt werden, welche dann der Nahrungsmittel- und Pharmaindustrie angeboten werden [29].

Nach Entfernen der Lactose bleibt ein teilentzuckertes und deproteiniertes Molkenkonzentrat (TEM 30) zurück, das auch als Melasse bezeichnet wird. Dessen genaue Eigenschaften sind in 3.1 näher beschrieben. Die anfallende Melasse enthält je nach Verarbeitungsverfahren und nachgeschalteter Eindickung 30-50 % Trockenmasse. Davon entfallen 60–75 % auf Lactose, 15–25 % auf anorganische Salze und 5–15 % auf Proteine. Über alle Prozessschritte der Molkeverarbeitung erfolgt eine Konzentrierung auf ca. 3 % des ursprünglichen Molkevolumens [3][32].

Einen Überblick über die herkömmliche Aufarbeitung von Molke und deren Produkte gibt Abbildung 5:

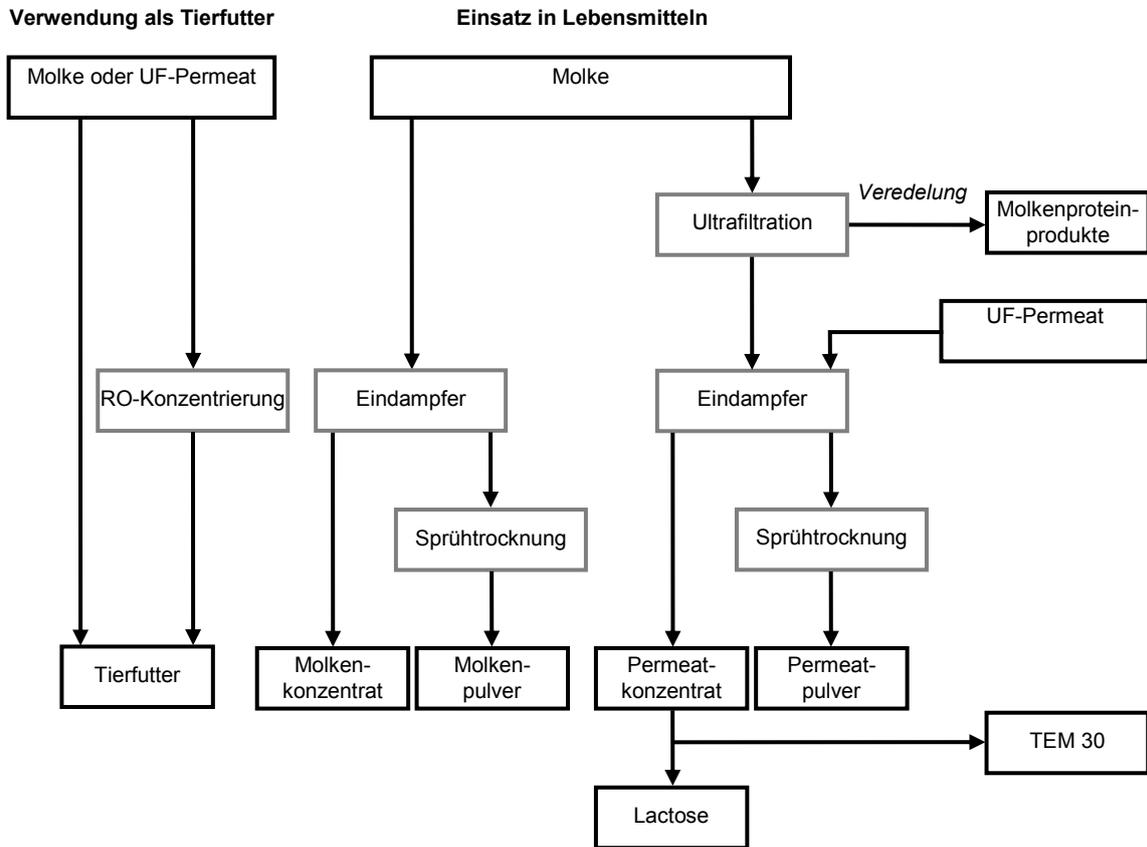


Abbildung 5: Traditionelle Verfahren und Prozesse der Molken- und Permeatverwertung (Darstellung nach [33] und [44])

Die Restmenge der in der Melasse enthaltenen Lactose entspricht ca. 10 % der ursprünglich in der Molke vorhandenen Lactose [50]. Diese Lactose lässt sich allerdings nicht mehr wirtschaftlich in der geforderten Qualität gewinnen. Diese verbleibenden 10 % Rohstoff zu einem vermarktungsfähigen Wertstoff zu machen, ist die Kernaufgabe der vorliegenden Arbeit.

2.2 Gewinnung von Ethanol aus TEM mit 30 % Trockenmasse

Die Gewinnung von Ethanol durch mikrobiologische Vergärung mit geeigneten Mikroorganismen aus TEM 30 ist im Vergleich mit der Produktion anderer Wertstoffe wie

Theoretischer Teil

Biogas oder Proteinprodukten auf der Basis von mikrobiologischer Biomasse (Single-Cell Protein, SCP) die erfolgversprechendste und profitabelste Möglichkeit [3].

Viele Mikroorganismen sind jedoch nicht in der Lage, Lactose direkt zu Ethanol umzusetzen, da ihnen häufig entscheidende Enzyme fehlen, um das Disaccharid zu spalten bzw. um im vorliegenden Fall das Monosaccharid Galactose in das verwertbare Diastereomer Glucose zu epimerisieren. Um die Lactose hydrolytisch spalten zu können, wäre der Einsatz immobilisierter β -Galactosidase eine Option.

Fermentativ gelingt dieser Schritt mit bestimmten Mikroorganismen. *Aspergillus niger* besitzt bei pH 3,5 und 4,5 ausreichend hydrolytische Aktivität, um Lactose quantitativ zu spalten. Bei höheren pH-Werten von pH 6–7 ist der Einsatz der Hefe *Saccharomyces lactis* denkbar [36]. Die gebildeten Monosaccharide Glucose und Galactose können anschließend von verschiedenen, ethanolbildenden Mikroorganismen umgewandelt werden. Bekannte Mikroorganismen sind z. B. die klassische Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* oder Bakterien wie *Zymomonas mobilis*. Allerdings zeigen die Mikroorganismen einen diauxischen Verlauf, d. h. sie verstoffwechseln zunächst Glucose, also das Substrat, das leichter abgebaut werden kann. Galactose wird hingegen erst dann verstoffwechselt, wenn keine Glucose mehr vorhanden ist und der Stoffwechsel der Mikroorganismen an das neue Substrat adaptiert ist. Daraus kann resultieren, dass aufgrund verschiedener Hemmungen nicht das gesamte als Lactose vorliegende Substrat umgesetzt wird und sich die Ausbeute dabei stark reduziert [3].

Eine andere Möglichkeit stellt die Verwendung rekombinanter Techniken dar, mit denen es möglich ist, die Gene die das Lactosepermease-System (*LAC 12*) und die β -Galactosidase (*LAC 4*) codieren aus der halophoben Hefe *Kluyveromyces lactis* in einen halotoleranten Hefestamm wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae* zu exprimieren. Der optimierte Hefestamm könnte Molke oder Melasse direkt zu Ethanol umsetzen. Eine aufwändige Entsalzung der Melasse wäre somit überflüssig. Leider wird diese Möglichkeit durch langsames Wachstum der Mikroorganismen sowie deren geringe Stabilität begrenzt [13][37].

Eine relativ einfache Möglichkeit stellt die Ethanolproduktion durch lactoseverwertende Hefen dar. Die formale Gleichung für die Produktbildung ist in Abbildung 6 gezeigt. Hefen

Theoretischer Teil

produzieren im Gegenteil zu Bakterien kaum Nebenprodukte, was dazu führt, dass bei der Vergärung von Lactose nahezu ausschließlich Ethanol und Kohlendioxid gebildet wird.

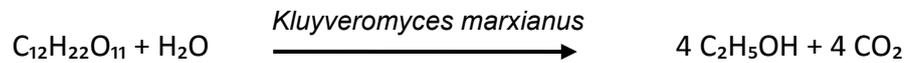


Abbildung 6: Formale Reaktionsgleichung zur Bildung von Ethanol aus Lactose

Die formale Bilanzgleichung in Abbildung 6 beschreibt die Summe der zwei bedeutenden Stoffwechselwege für diesen Prozess:

- Die Glykolyse, welche den Abbau der Glucose beschreibt (Embden-Meyerhof-Parnas-Weg). Auch bei Lactose als Substrat stellt die Glykolyse den zentralen Vorgang im Energiestoffwechsel dar.
- Die Epimerisierung der Galactose zu Glucose über den Leloirpfad. Dieser Stoffwechselweg ist für den gewünschten Prozess essentiell, da hierüber zusätzliches Substrat aus der sonst nicht verwertbaren Galactose gebildet wird. Dieser Pfad ist in Abbildung 7 dargestellt:

Theoretischer Teil

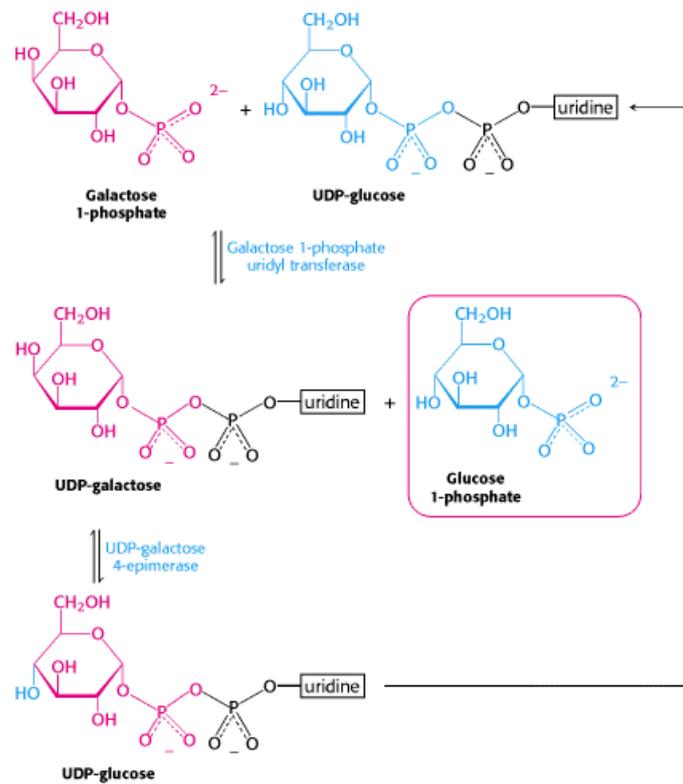


Abbildung 7: Leloir-Pfad zur Umwandlung von Galactose zu Glucose [31]

Es wird deutlich, dass je Molekül Lactose 4 Moleküle Ethanol und 4 Moleküle Kohlendioxid produziert werden. Das bedeutet, dass bei einer idealen Verwertung pro g Lactose max. 0,538 g Ethanol gewonnen werden können und die verbleibenden 0,462 g als Kohlendioxid unweigerlich verloren gehen.

Hefen der Gattung *Kluyveromyces*, insbesondere *K. marxianus*, sind äußerst gut geeignete Stämme für die Ethanolproduktion aus Lactose, da sie verfügbare Kohlenhydrate sehr schnell und effektiver als andere Hefen umsetzen [35].

Das Hauptproblem bei der Vergärung mit Hefen der Gattung *Kluyveromyces* ist wahrscheinlich die hohe Salzfracht des teilzuckerten Molkenkonzentrats, da ein hoher Salzgehalt, die Aktivität der Hefe inhibiert. Bei einem verringerten Salzgehalt ist die Hemmung geringer und die Umsetzung der Lactose zu Ethanol demnach effizienter. Zur Reduktion des Salzgehaltes sind mehrere technische Möglichkeiten denkbar, deren Potential im folgenden Abschnitt beschrieben wird:

2.3 Entsalzung von TEM 30 oder Molke

2.3.1 Druckgetriebene Membranverfahren

Die Gewinnung von Trinkwasser und Salz aus Meerwasser wird weltweit mit großtechnischen Umkehrosmoseanlagen (RO) betrieben. Dabei wird Wasser unter hohem Druck durch eine semipermeable Membran gepresst, wobei sich die im Wasser gelösten Ionen entgegen ihrer natürlichen osmotischen Richtung bewegen und sich auf der anderen Seite der Membran anreichern. Zur Demineralisierung von TEM eignet sich die Umkehrosmose aufgrund der Beschaffenheit des TEM nicht. Hohe Konzentration von Salz und Lactose sowie Schwebstoffe würden zu einem verstärkten Membranfouling führen. Im Bereich der Milchwirtschaft wird die Umkehrosmose allerdings zum Aufkonzentrieren der Molke zum Molkenkonzentrat verwendet [38].

Ein relativ neues druckgetriebenes Membrantrennverfahren zur Aufbereitung wässriger Lösungen ist die Nanofiltration (NF), die sich allmählich in der Milchwirtschaft etabliert. Das Verfahren ermöglicht gleichzeitig eine Aufkonzentrierung der Molke oder des UF-Permeats und eine teilweise Demineralisierung. Während höherwertige Ionen wie z.B. Ca^{2+} und PO_4^{3-} und der Wertstoff Lactose zurückgehalten werden, können monovalente Ionen wie Natrium- und Kaliumkationen und Chloridanionen durch diese Membran abgetrennt werden und die Salzfracht somit deutlich verringert werden. Dadurch gestaltet sich die Nanofiltration als interessante Alternative für die Industrie [3][39][40].

Um die Gefahr des Membranfoulings möglichst gering zu halten, sollten hierbei immer Cross-Flow-Filtrationsverfahren eingesetzt werden, bei denen der Feed im Gegensatz zur Dead-End-Verfahren tangential an der Oberfläche der Membran vorbeigeführt wird. Dadurch wird ein sich bildender Filterkuchen auf der Membranoberfläche durch die permanente Strömung wieder entfernt [39][40]. Untersuchungen zur Nanofiltration von Molke zeigten, dass hier bis zu 80 % der monovalenten Ionen abgetrennt und bis zu 95 % der enthaltenen Lactose zurückgehalten werden können [41][42].

Mit der Ultrafiltration (UF) und der Mikrofiltration (MF) gibt es zwei weitere druckgetriebene Membrantrennverfahren, die im Bereich der Molkereiwirtschaft angewendet werden. Ihr Trennbereich liegt zwischen den molekularen Größenordnungen der Nanofiltration und den

Theoretischer Teil

makroskopischen Größenordnungen der herkömmlichen Filtration. In der Milchindustrie werden sie vor allem zur Gewinnung von Molkenprotein und Molkenproteinkonzentrat (WPC) eingesetzt [43].

In Abbildung 8 sind die verschiedenen druckgetriebenen Membrantrennverfahren sowie deren Einsatz in der Milchindustrie noch einmal dargestellt.

	Ionenbereich	Molekularbereich	Makromolekularbereich	Mikropartikelbereich	Makropartikelbereich				
Mikrometer (log-Skala)	0,001	0,01	0,1	1,0	10	100			
Molekulargewicht (Da)	200	20 000	200 000	2 000 000					
Relative Größe der typischen Bestandteile	Ionen	Salze	Lactose	β -Lactoglobulin	α -Lactalbumin	Caseinmizellen	Fettkügelchen	Hefen, Schimmelpilze	Bakterien
Trennverfahren	Umkehrosmose	Nanofiltration	Ultrafiltration	Mikrofiltration		Herkömmliche Filtration			

Abbildung 8: Größe und Art der Milchpartikel, die bei den verschiedenen Trennverfahren zurückgehalten werden (Daten nach [43], entnommen aus [44])

2.3.2 Elektrochemische und auf Ionenaustausch basierende Membranverfahren

Die Elektrodialyse (ED) ist ein elektrochemischer Prozess, der die Abreicherung von Milchsäuren aus Nebenprodukten der Molke ermöglicht. Durch Anlegen einer elektrischen Potentialdifferenz werden die in der Molke gelösten Salzionen durch Membranen in höher konzentrierte Lösungen (Konzentrat) überführt. Dazu wandern gelöste Kationen z.B. K^+ , Na^+ , Ca^{2+} in Richtung der negativ geladenen Kathode und Anionen wie Cl^- , PO_4^{3-} entsprechend

Theoretischer Teil

zur positiv geladenen Anode. Die Ionenwanderung wird durch ionenselektive Membranen kontrolliert. Kationenaustauschermembranen (KAM) sind permeabel für Kationen, wobei Anionen zurückgehalten werden. Entsprechend umgekehrtes Verhalten zeigen Anionenaustauschermembranen (AAM). Alternierend angeordnete Kationen- und Anionenaustauschermembranen trennen Diluat- und Konzentratzellen, die einen Elektrodialysemembranstapel bilden [7][44].

Das Prinzip eines Elektrodialyse-Systems ist in Abbildung 9 dargestellt.

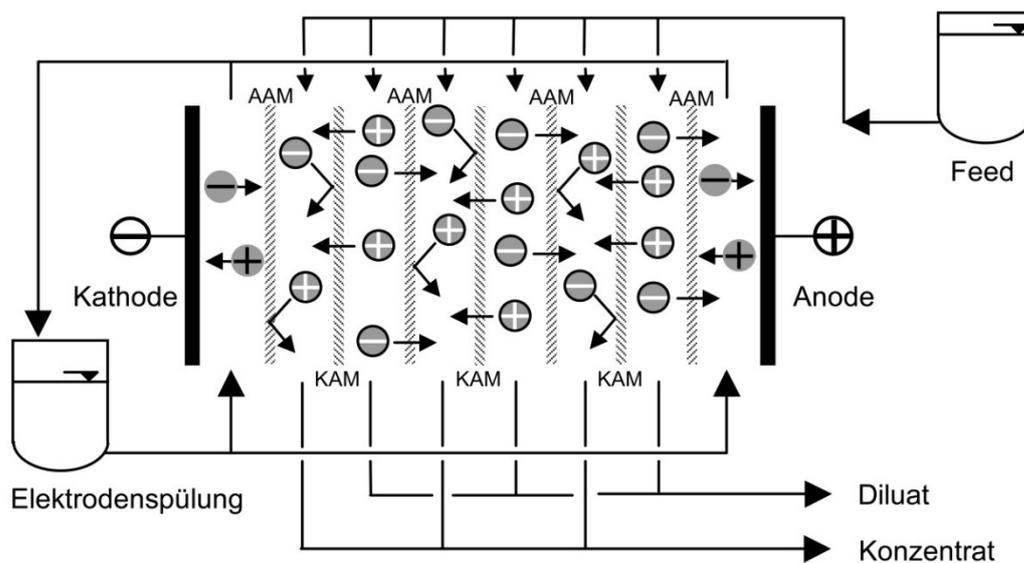


Abbildung 9: Prinzip der Elektrodialyse [38]

Kationen können durch das Anlegen eines elektrischen Feldes auf ihrem Weg zur Kathode zwar eine KAM durchdringen. Dort werden sie dann allerdings an der darauf folgenden AAM selektiv zurückgehalten. Aus diesem Prozess resultieren eine Anreicherung des Salzes in den Konzentratzellen, wo es als Konzentrat entfernt wird, sowie eine Abreicherung über das Diluat [21].

Bei der Verminderung der Salzfracht durch die ED konnten, wie bei der NF, hauptsächlich monovalente Ionen eliminiert werden. Polyvalente Ionen liegen möglicherweise als

Theoretischer Teil

Der Feed wird dabei durch Diluatzellen des Elektrodialysemodus geleitet, die mit kationischem und anionischem Austauschermaterial gefüllt sind. Dabei nimmt hauptsächlich das Ionenaustauschermaterial die gelösten Salzionen aus dem Feed auf. Nur ein geringer Teil der Ionen strömt sofort in die Konzentrationskammern. Aufgrund der relativ hohen Salzkonzentration am Eintritt der Diluatkammer kann ein Ionentransport der an die Membran angrenzenden Ionen in die Konzentrationszellen erfolgen. Mit abnehmender Salzkonzentration sinkt auch der Ionentransport. D. h. ab der Mitte und vor allem am Ende der Diluatkammer tritt wegen unterschiedlicher Festladungspolarität an den Berührungspunkten der Harzkügelchen verstärkt Wasserdissoziation auf. Die entstandenen Wasserstoff- und Hydroxylionen regenerieren das Austauschermaterial, indem sie die an das Harz gebundenen Ionen freisetzen [38][44].

2.3.3 Fällung von Salzen

Eine Alternative zu mechanischen oder elektrochemischen Methoden bieten die Fällung von gelösten Stoffen durch Temperaturänderung, Fällungsreagenzien oder Änderung des pH-Wertes. Im vorliegenden Fall stellen Calcium- und Phosphationen ca. 16 % des gesamten Salzgehaltes der Molke dar[3]. Die Reduzierung des Gehalts an Calciumphosphat steigert die Verwertbarkeit von Molke, da Calcium bereits bei der Weiterverarbeitung zu Molkenproteinkonzentrat störend wirkt. So ist eine deutliche Steigerung des Leistungsvermögens einer nachgeschalteten UF-Anlage möglich. Außerdem lässt sich eine höhere Endkonzentration des WPC erzielen und durch geringeres Membranfouling können längere Laufzeiten der UF-Anlage erreicht werden. Ebenso können durch die Reduktion von Calciumphosphat die Verdampferanlagen des UF-Permeats entlastet werden, was längere Standzeiten der Anlagen zur Folge hat [48]. Andererseits wird Calciumphosphat bei entsprechender Reinheit durch verschiedene Firmen (DMV International, Niederlande und Valio, Finnland) vertrieben und findet so als Ernährungspräparat und bei der Bekämpfung von Osteoporose Anwendung [3].

Die Fällung von Calciumphosphat wird durch eine Änderung des pH-Wertes ausgelöst, bei der das Molkenkonzentrat durch Zugabe von Natronlauge im alkalischen Bereich eingestellt

Theoretischer Teil

wird. Da Calciumphosphat sehr langsam ausfällt, muss der Prozess mehrmals hintereinander durchgeführt werden, um eine möglichst hohe Salzfracht aus dem Molkenkonzentrat zu eliminieren. Um die Ausfällung zu beschleunigen, wird die Lösung zusätzlich erhitzt und konstant temperiert. Der Niederschlag kann anschließend mechanisch abgetrennt und aufgereinigt werden [32].

Experimenteller Teil

3 Experimenteller Teil

3.1 Teilentzuckertes Molkenkonzentrat als Rohstoff zur mikrobiologischen Umsetzung

Zusätzlich zu den normalerweise für die Ethanolproduktion verwendeten Rohstoffen, wie überwiegend zucker- und stärkehaltige Materialien rücken verschiedene Reststoffströme und Verarbeitungsprodukte aus industriellen Prozessen näher in den Focus. Wie bereits in Abschnitt 2.1.4 erwähnt, stellt das teilentzuckerte Molkenkonzentrat aus der Molkeverarbeitung einen solchen Reststoffstrom dar, den es zu erschließen gilt. Dieses Molkenkonzentrat, auch bekannt als Mutterlauge oder Melasse, ist eine nahezu eiweißfreie, wässrige, leicht gelbliche Flüssigkeit mit pH 5 - 6. Zurzeit wird es nur als Tierfutter verwendet auf Feldern entsorgt oder als Co-Substrat für Biogasanlagen verwendet. Diese Art der Verwendung stellt jedoch keinerlei Wertschöpfung dar, sondern ist z.T. sogar noch mit Kosten verbunden.

Einen Überblick über die Zusammensetzung des TEM 30 stellt Tabelle 3 dar:

Tabelle 3: Auszug aus der Zusammensetzung von TEM 30 [50]

Parameter		Wert
pH-Wert		5,0–6,0
Trockenmasse		30,0 % ± 2 % (m/v)
Lactosemonohydrat		18,0 % ± 2 % (m/v)
Proteine (N · 6,38)		3,0 % ± 1 % (m/v)
Asche		max. 15,0 % (m/v)
Energie (pro kg)		4,4 MJ = 1051,6 kcal
Kalium	K ⁺	ca. 4,0 % (m/v)
Calcium	Ca ²⁺	ca. 4,0 % (m/v)
Natrium	Na ⁺	ca. 2,0 % (m/v)
Chlorid	Cl ⁻	ca. 2,0 % (m/v)
Phosphor	PO ₄ ³⁻	ca. 0,4 % (m/v)
Magnesium	Mg ²⁺	ca. 0,1 % (m/v)
Gesamtkeimzahl pro ml		< 50.000
Hefen & Schimmel pro ml		< 2000
Salmonellen		Negativ in 50 ml

Experimenteller Teil

Aus der Zusammensetzung des Substrates lassen sich bereits einige einschränkende Faktoren für die Gewinnung von Ethanol ableiten:

Der hohe Salzgehalt in Kombination mit einer hohen Substratkonzentration und dem daraus resultierenden osmotischem Druck schränkt den Einsatz von vielen potentiell geeigneten Mikroorganismen weiter ein (siehe auch Abschnitt 2.2). Hier ist eine deutliche Hemmung der Mikroorganismen zu erwarten, so das eine Demineralisierung oder Verdünnung erforderlich sein könnte.

Der durch die geringe Löslichkeit von Lactose vergleichsweise geringe Gehalt an Substrat im Medium führt dazu, dass die absolute Ethanolausbeute bereits im Vorfeld beschränkt ist. Aus Lösungen mit einem Gehalt von $180 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Lactose lassen sich selbst bei optimaler Prozessführung Lösungen mit maximal $96,8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Ethanol erzeugen, wodurch sich der Aufwand bei der Destillation des Alkohols erhöht und damit die Herstellungskosten steigen.

Das TEM 30 liegt nicht als homogene, klare Lösung vor, sondern fällt als Suspension mit einem Anteil von ca. 10 % (m/m) ungelöstem Feststoff an. Der Bodensatz wurde anhand von Leitfähigkeitsmessungen (siehe Anhang 6.1) untersucht um auszuschließen, dass er größere Mengen Salze enthält, welche die Fermentation zusätzlich behindern könnten.

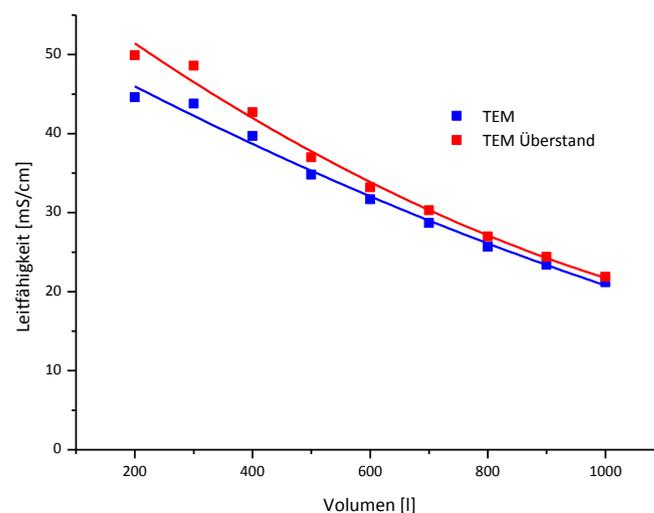


Abbildung 11: Leitfähigkeitsmessung zur Untersuchung des Bodensatzes in TEM 30 [44]

Experimenteller Teil

Abbildung 11 zeigt den Verlauf der Leitfähigkeit mit zunehmender Verdünnung von TEM mit Bodensatz und von reinem TEM-Überstand mit VE-Wasser. Bei einem signifikantem Salzgehalt im Feststoff wäre eine gewisse Konstanz der Leitfähigkeit über eine zunehmende Verdünnung gegenüber des TEM-Überstandes zu erwarten. Dies ist hier aber nicht der Fall. Daher ist davon auszugehen, dass der Feststoff weitestgehend aus ungelöster Lactose besteht. Eine Abtrennung dieses Feststoffes würde daher keinen Vorteil bei einer Fermentation bringen, sondern im Gegenteil eine Verringerung der absoluten Ausbeute bedeuten.

3.2 Mikrobiologische Verwertung von TEM

Ein Mikroorganismus, der für die biotechnologische Umsetzung von Lactose zu Ethanol in Frage kommt, muss in der Lage sein, Lactose direkt zu Ethanol umzusetzen. Dadurch schränkt sich die Auswahl deutlich ein und schließt die für die Alkoholherstellung bewährten Kulturen, wie z.B. klassische Brauhefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, im Vorfeld aus.

Als geeigneter Mikroorganismus wurde die Hefe *Kluyveromyces marxianus* ausgewählt und ihre Eignung zur Verstoffwechslung von Lactose untersucht. *K. marxianus* kommt natürlich in Joghurt und Kefir vor. In den Kefirknollen verwendet der Mensch diese Kultur in Kombination mit Milchsäurebakterien mehr oder weniger unbewusst seit über tausend Jahren, um aus Milch ein leicht alkoholisches Getränk herzustellen [51].

Der Nachteil bei der Verwendung von Hefen der Gattung *Kluyveromyces* ist, dass ihr Metabolismus respiratorisch orientiert ist. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* handelt es sich bei *K. marxianus* um eine Crabtree-negative Hefe. Das bedeutet, dass bei einem ausreichenden Sauerstoffgehalt der Fermentationsbrühe die fermentativen Stoffwechselwege inhibiert sind. Dadurch ist *K. marxianus* normalerweise besser zur aeroben Biomasseproduktion als zur Produktion von anaeroben Gärungsprodukten wie Ethanol geeignet [51].

Die regulatorischen Unterschiede zwischen Crabtree-negativen und Crabtree-positiven Hefen sind noch ein aktuelles Forschungsthema. Es wird jedoch vermutet, dass die Ursache, weshalb *S. cerevisiae* eine Crabtree-positive Hefe und *K. marxianus* eine Crabtree-negative

Experimenteller Teil

Hefe ist, mit der Zuckerumsatzgeschwindigkeit zusammenhängt. Ob *S. cerevisiae* den Zucker respiratorisch oder fermentativ verwertet, hänge hauptsächlich von der Zuckerkonzentration ab, da eine hohe Zuckerkonzentration zu einer Repression des Zuckermetabolismus führe. *S. cerevisiae* nimmt den Zucker so schnell auf, dass der respiratorische Stoffwechselweg in der Zelle überlastet wird und deshalb die Fermentation parallel abläuft. Der Zuckermetabolismus in *K. marxianus* wird nicht durch zu hohe Zuckerkonzentrationen gehemmt bzw. die Aufnahme von Zucker in die Zelle erfolgt langsamer, weshalb es nicht zu einer Überlastung des respiratorischen Zweigs kommt [52].

3.2.1 Auswahl eines geeigneten Hefestammes

Es wurde der Einsatz von drei verschiedenen Hefestämmen zur Ethanolgewinnung aus TEM 30 untersucht:

- *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422
- *Kluyveromyces marxianus* DSM 70073
- *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066

Die Stämme der Hefen *Kluyveromyces marxianus* wurden von der „Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen“ (DSMZ) in Braunschweig bezogen. Die Kultur der *Saccharomyces cerevisiae* stammt vom „Centraalbureau voor Schimmelcultures“ in Utrecht (NL). Der letzte Stamm wurde ausgewählt, da er in der Lage sein sollte, Galactose und Glucose umzusetzen.

3.2.2 Wachstumstests

Um einen ersten Eindruck zu gewinnen, welcher der ausgewählten Stämme sich am besten zur Umsetzung von Lactose eignet, wurden Wachstumstests auf Nährböden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden Zellsuspensionen gleicher Konzentration auf Nährböden vereinzelt und inkubiert (siehe Anhang).

Nach 95 Stunden wurden die gebildeten Kolonien beurteilt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen dargestellt:

Experimenteller Teil



Abbildung 12: Koloniebildung von *K.marxianus* 70073 auf verschiedenen Substraten [30]



Abbildung 13: Koloniebildung von *K.marxianus* 5422 auf verschiedenen Substraten [30]

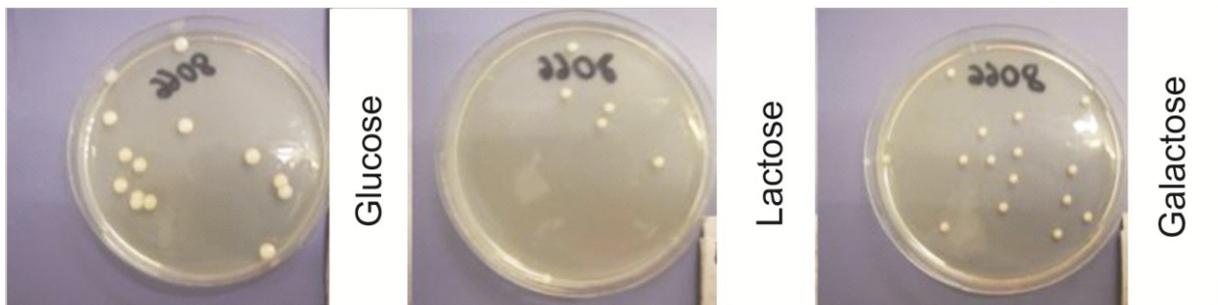


Abbildung 14: Koloniebildung von *S. cerev.* 8066 auf verschiedenen Substraten [30]

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Hefen der Gattung *K. marxianus* auf den Substraten Galactose und Lactose besser wachsen, als die Hefe der Gattung *S. cerevisiae*.

Bei Glucose als Substrat ist das Wachstum bei allen Hefen nahezu ähnlich. Die unterschiedliche Anzahl der Kolonien stammt von Verdünnungsfehlern und lässt keine Aussage über das Wachstum zu. Es ist anzunehmen, dass die verwendete Hefe *S. cerevisiae* nicht in der Lage ist, Lactose bzw. Galactose umzusetzen. Daher ist die Hefe zur Produktion

Experimenteller Teil

von Ethanol aus Lactose nicht geeignet. Bei den beiden Stämmen der Hefe *K. marxianus* zeigen sich leichte Unterschiede bei den Substraten Lactose und Galactose. Hier scheint die Hefe des Stamms DSM 70073 einen leichten Vorteil zu haben.

Diese Vermutung wurde durch Versuche im Schüttelkolbenmaßstab überprüft. Das Ziel war es hauptsächlich, zu erkennen, inwiefern sich beide Stämme hinsichtlich ihrer Abbauraten von Glucose und Lactose unterscheiden. Folgende Abbildungen zeigen den Substratabbau durch die Hefezellen im 500 ml-Schikanekolben (siehe Anhang 6.9). Die Lactoseanalytik erfolgte durch HPLC-Bestimmung (siehe Anhang 6.4):

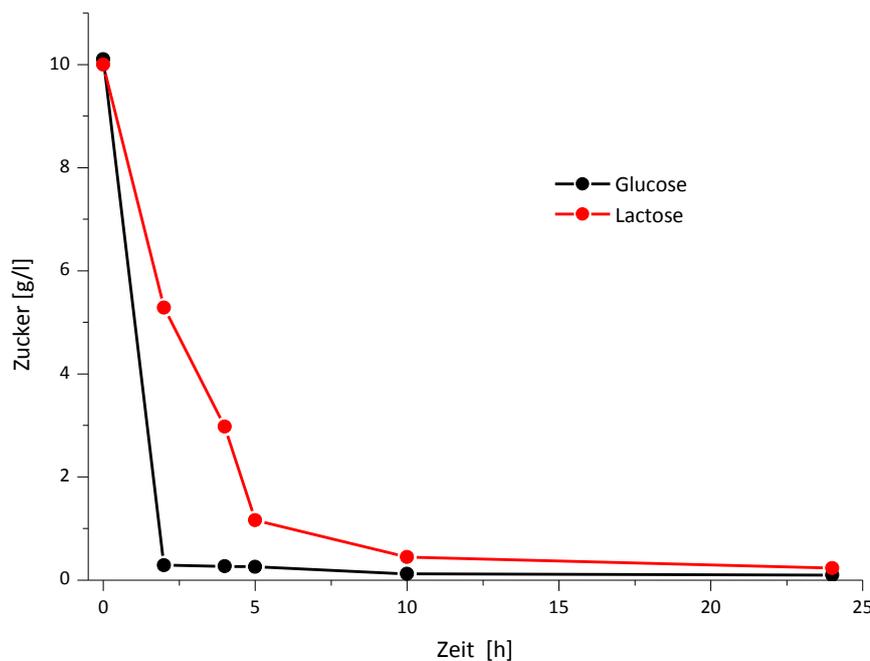


Abbildung 15: Vergleich des Substratabbaus bei der Verwendung von Glucose und Lactose
(*K. marxianus* DSM 70073. 30°C, 130 min⁻¹)

Abbildung 15 zeigt den Abbau von Glucose bzw. Lactose durch *K. marxianus* DSM 70073 unter aeroben Bedingungen. Es zeigt sich, dass der anfängliche Substratabbau bei Glucose mit einer Abbaurate von $4,90 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ sehr viel schneller verläuft, als bei der Verwendung von Lactose mit $2,36 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Hier lässt sich ableiten, dass die Aufnahme von Lactose in die Zelle langsamer abläuft, als die von Glucose.

Experimenteller Teil

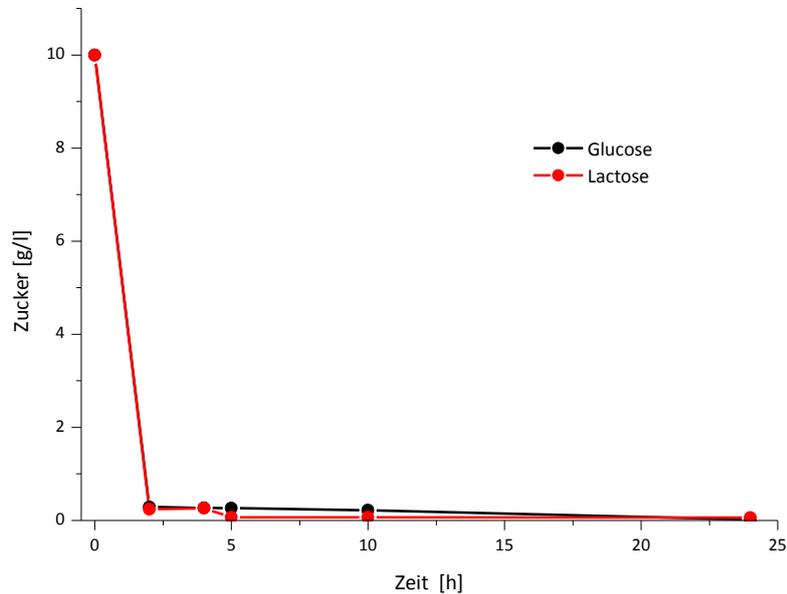


Abbildung 16: Vergleich des Substratabbaus bei der Verwendung von Glucose und Lactose

(*K. marxianus* DSM 5422. 30°C, 130 min⁻¹)

Für Glucose zeigt sich beim Stamm *K. marxianus* DSM 5422 ein ähnliches Abbauverhalten. Auch hier wird die Glucose sehr schnell in die Zelle transportiert und abgebaut. Bemerkenswerterweise gilt dieses analog auch für die Lactose. Die Abbauraten für Glucose und Lactose sind mit $4,85 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ bzw. $4,88 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ nahezu identisch. Daraus lässt sich schließen, dass das bereits in Abschnitt 2.2 erwähnte Lactopermease-System in diesem Stamm stärker ausgeprägt ist, was einen deutlichen Vorteil für die Verwendung in dem angestrebten Prozess bedeutet.

In Abbildung 17 ist der Lactoseabbau durch *K. marxianus* DSM 5422 noch einmal dargestellt. Hier wurden aber die Konzentrationen aller beteiligten Zucker, also neben Lactose auch die Monosaccharide Glucose und Galactose dargestellt.

Experimenteller Teil

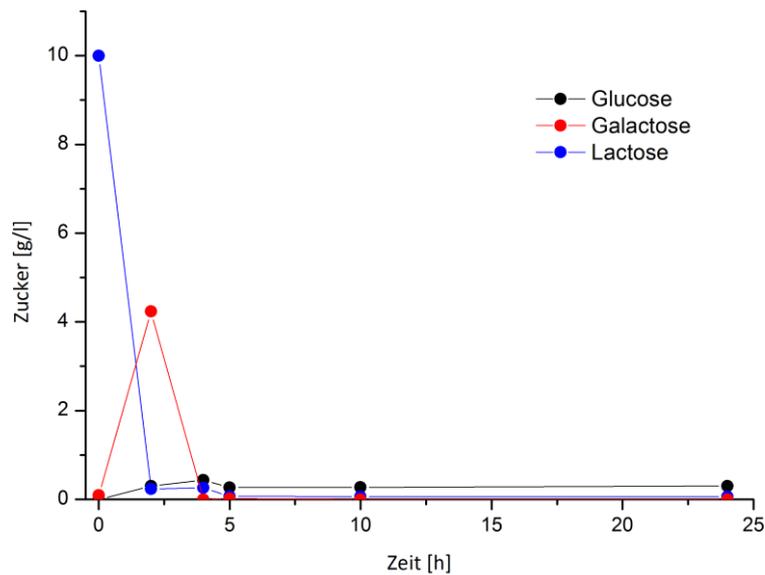


Abbildung 17: Substratabbau bei Lactose (*K. marxianus* DSM 5422, 30°C, 130 min⁻¹)

Interessanterweise lässt sich hier beobachten, dass Galactose während des Abbaus der Lactose zunächst ausgeschieden, im weiteren Verlauf der Kultivierung jedoch wieder aufgenommen und verstoffwechselt worden ist. Möglicherweise versucht die Hefezelle so, den osmotischen Druck innerhalb der Zelle zu senken. Durch die Spaltung der Lactose in Glucose und Galactose erhöhen sich die Gesamtzuckerkonzentration und somit auch der osmotische Druck. Durch Ausschleusung eines Zuckers, könnte diesem entgegengewirkt werden.

Der Vergleich der Entwicklung der Biomassekonzentrationen bei beiden Hefestämmen auf Lactose als Substrat in einem Kulturmedium (siehe Anhang 6.9) ist in folgender Abbildung dargestellt. Die Bestimmung der optischen Dichte ist in Anhang 6.5 beschrieben.

Experimenteller Teil

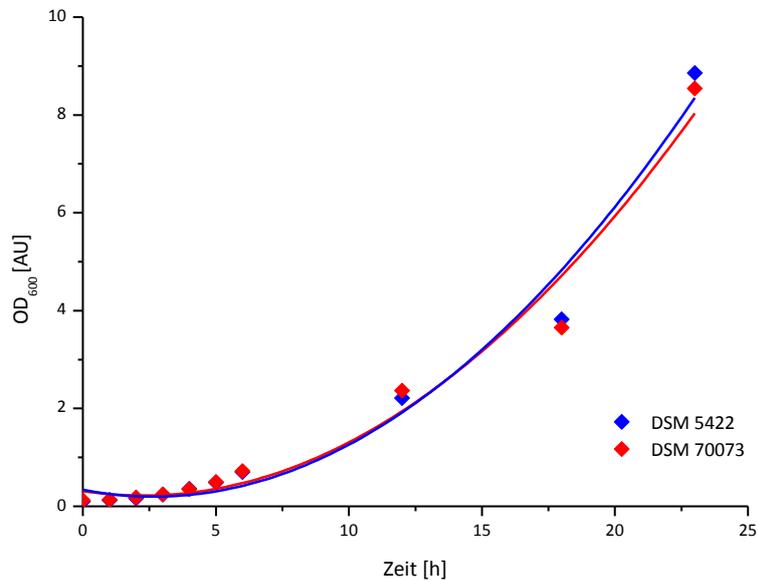


Abbildung 18: Vergleich der Entwicklung der OD₆₀₀ bei Kultivierungen von *K. marxianus* DSM 5422 und DSM 70073 (10 g·l⁻¹ Lactose, 30°C, 130 min⁻¹)

Wie aus Abbildung 18 zu entnehmen ist, unterscheiden sich die beiden Stämme in ihrem Wachstum unter aeroben Bedingungen nicht. Nach ca. 24 h war das Ende der exponentiellen Wachstumsphase erreicht und es fand keine weitere Bildung von Biomasse mehr statt.

Insbesondere die hohen Abbauraten für Lactose von *K. marxianus* DSM 5422 (siehe auch Tabelle 4) führten zu dem Entschluss, für folgende Arbeiten nur noch diesem Stamm zu verwenden.

Tabelle 4: Übersicht der Abbauraten der verwendeten Hefen

Stamm	Abbauraten [g·l ⁻¹ ·h ⁻¹]	
	Lactose	Glucose
<i>K. marxianus</i> DSM 5422	4,88	4,85
<i>K. marxianus</i> DSM 70073	2,36	4,90

Experimenteller Teil

Die Produktion von Ethanol aus einem Substrat, in diesem Fall Lactose, lässt sich generell in 3 Schritte einteilen:

1. Aerobe Kultivierung zur Biomassegewinnung
2. Anaerobe Fermentation, auch als Gärung bezeichnet, zur Ethanolgewinnung
3. Abtrennung des Alkohols durch Destillation

Die Destillation von Alkohol ist hinreichend in der Literatur beschrieben und weicht auch bei einem veränderten Substrat grundsätzlich nicht von gängigen Standardverfahren ab. Aus diesem Grund wird der dritte Punkt in dieser Arbeit nur am Rande behandelt. Die folgenden Abschnitte beinhalten zunächst die aerobe Biomasseproduktion und schließlich die eigentliche anaerobe Gärung zur Gewinnung von Ethanol.

3.3 Aerobe Kultivierung zur Biomasseproduktion

In Anbetracht von Marktpreisen bei Ethanol von lediglich 0,45 – 0,47 €/l [53] liegt es nahe, den gesamten Produktionsprozess von Ethanol so einfach und günstig wie möglich zu gestalten. Für die Biomasseproduktion bieten folgende Punkte ein entscheidendes Einsparungspotential:

1. Verwendung von TEM 30 als Grundlage zur Biomassenproduktion ohne den Einsatz von zusätzlichem Substrat,
2. Vermeidung der Zugabe von Säuren und Laugen zur pH-Korrektur,
3. Vermeidung der Zugabe von Nährstoffen,
4. Vermeidung oder Minimierung des Aufwands zur Sterilisierung,
5. Kurze Kultivierungszeiten

3.3.1 Bestimmung der optimalen initialen Substratkonzentration

Entscheidend für die optimale initiale Substratkonzentration ist zum einen, dass diese hoch genug ist, um ausreichend Biomasse in kurzer Zeit bilden. Zum anderen ist es wichtig, dass die Substratkonzentration nicht zu hoch ist, um eine Hemmung des Wachstums der Hefen zu vermeiden.

Experimenteller Teil

Zunächst wurden Untersuchungen in Schüttelkolben mit einem Komplexmedium (siehe 6) und unterschiedlichen Lactosekonzentrationen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt:

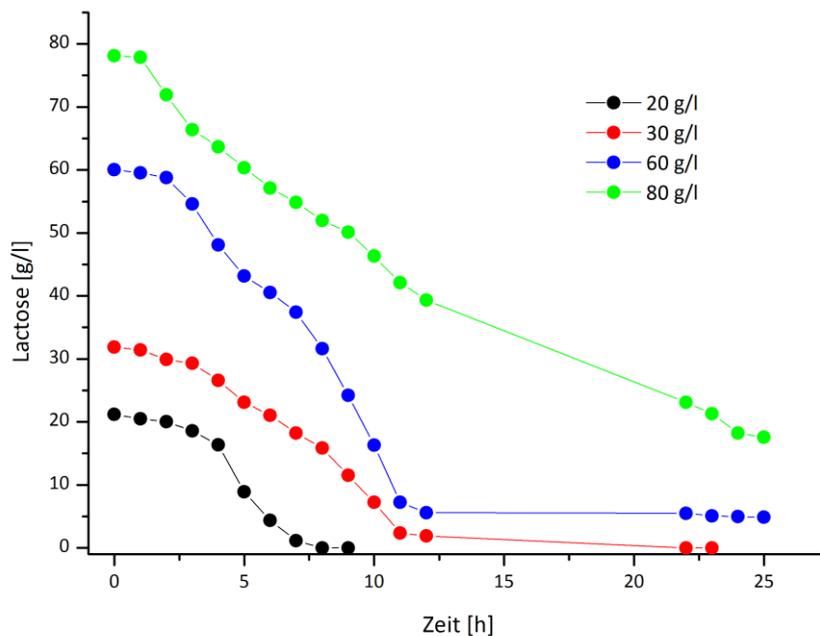


Abbildung 19: Zeitliche Entwicklung der Lactosekonzentration bei der Kultivierung von *K. marxianus* DSM 5422 im bei unterschiedlichen Lactoseausgangskonzentrationen (30° , 130 min^{-1}) [46]

Es ist zu erkennen, dass der Lactoseabbau bis zu einer Startkonzentration von $60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ relativ gleichmäßig verläuft und die Abbauraten, bedingt durch das exponentielle Wachstum, ständig zunehmen. Bei einer Konzentration von $80 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Lactose dagegen verläuft der Lactoseabbau eher linear. Nach 25 h verbleiben bei dieser Kultivierung auch immer noch signifikante Mengen Lactose in der Fermentationsbrühe, welche auch nach längerer Kultivierungszeit nicht abgebaut werden. Bei einer Anfangskonzentration von $60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ist das ebenfalls der Fall, jedoch in wesentlich geringerem Ausmaß.

Eine Übersicht der Abbauraten ist in folgender Tabelle dargestellt:

Experimenteller Teil

Tabelle 5: Lactoseabbauraten bei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen

Anfangskonzentration Lactose [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	Abbauraten [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]	
	nach 5 h	nach 10 h
20	2,45	2,51
30	1,75	2,46
60	2,89	3,34
80	2,66	2,79

Der Vergleich der Abbauraten bestätigt den subjektiven Eindruck, dass bei einer anfänglichen Lactosekonzentration über $60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ eine gewisse Hemmung einzusetzen scheint, da die Abbauraten bei höheren Konzentrationen wieder sinken. Die Kultur mit $80 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Lactose hat nach ca. 7 h noch einen Lactosegehalt von $60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, allerdings verläuft der Abbau in der folgenden Zeit trotzdem deutlich langsamer, als bei der Kultur mit $60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Lactose. Daraus lässt sich schließen, dass die Hefen ihren Stoffwechsel auf die initiale Substratkonzentration einstellen und diesen nicht zwangsläufig an veränderte Bedingungen anpassen. Eine optimale initiale Substratkonzentration ist also im Bereich von $30 - 60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ zu erwarten.

3.4 Untersuchung zum Stoffwechsel von *K. marxianus* DSM 5422

Um einen biotechnologischen Prozess in die gewünschte Richtung steuern zu können, ist es wichtig, grundlegende Eigenschaften sowie Besonderheiten in dem verwendeten System zu kennen. Um Ansätze zu erkennen, die eine weitere Optimierung des Prozesses ermöglichen, wurden in dem Abschnitt einige Untersuchungen zum Stoffwechsel der verwendeten Hefe durchgeführt.

3.4.1 Wachstum von *K. marxianus* DSM 5422 auf unterschiedlichen Substraten

Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Zucker Galactose, Glucose und Lactose einen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit von *K. marxianus* haben, wurden drei Ansätze mit Galactose, Glucose und Lactose mit *K. marxianus* angeimpft und durch Messen der OD_{600}

Experimenteller Teil

Wachstumskurven aufgezeichnet. Durch dieses Vorgehen sollte überprüft werden, ob bereits bei dem Zuckertransport in die Zelle und bei den, der Glykolyse vorgeschalteten, Stoffwechselvorgängen wesentliche Geschwindigkeitsunterschiede beim Abbau der Zucker auftreten.

Alle Kulturen wurden mit einer Zuckerkonzentration von $60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ angesetzt. Deshalb wird angenommen, dass sich die optische Dichte in allen Ansätzen dem gleichen Maximalwert annähern wird, nachdem das gesamte Substrat aufgebraucht worden ist. Die Kultivierungen wurden wie im Anhang 6.9 dargestellt durchgeführt. Die Entwicklung von Biomasse und Zuckergehalt ist in den folgenden Abbildungen dargestellt:

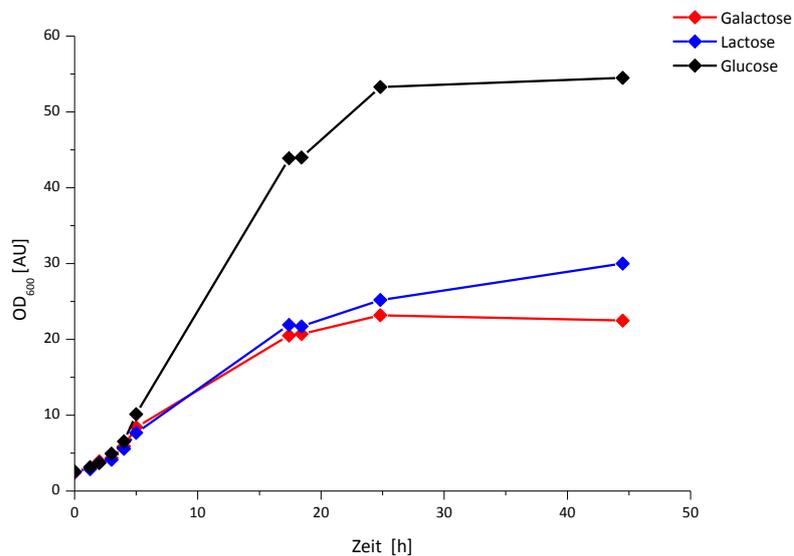


Abbildung 20: Wachstumskurven von *K. marxianus* auf Galactose, Glucose und Lactose ($60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, 30°C , 130 min^{-1})

Wie zu erkennen ist, beginnt die exponentielle Phase nach ca. 2,5 h Inkubationszeit. Anders als erwartet, lag die optische Dichte, und damit die Biomassekonzentration, für den Ansatz mit Glucose doppelt so hoch wie beim den Ansätzen mit Lactose bzw. Galactose. Die Entwicklungen der Zuckerkonzentrationen sind in Abbildung 21 dargestellt.

Experimenteller Teil

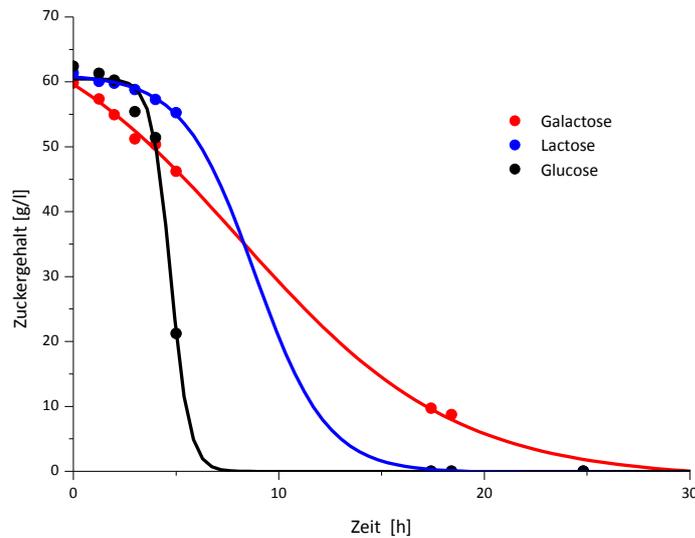


Abbildung 21: Abnahme der Zuckerkonzentration mit der Zeit ($60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, 30°C , 130 min^{-1})

Aus Abbildung 21 ist zu entnehmen, dass bereits nach circa 17 h die gesamte Lactose und Glucose verstoffwechselt worden sind. Die Verstoffwechslung von Galactose scheint etwas mehr Zeit in Anspruch zu nehmen.

Unklar ist, warum in der Probe mit Glucose doppelt so viele Zellen gewachsen sind, wie in den Ansätzen mit Galactose und Lactose. Da alle Zucker komplett aufgenommen wurden, bedeutet dies, dass Glucose zu mehr Zellwachstum als Galactose und Lactose führt. Da aber weder Galactose noch Lactose nach ca. 17 h nachzuweisen waren, bedeutet das, dass die Zucker zumindest komplett von den Zellen aufgenommen und somit aus der Kultivierungslösung entfernt worden sind.

3.4.2 Einfluss von zusätzlichem Stickstoff auf das Wachstumsverhalten von *K. marxianus* DSM 5422

In diesem Abschnitt wurde untersucht, ob der Stickstoffgehalt einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *K. marxianus* hat bzw. ob sich etwaige Auswirkungen auf die Ethanolproduktion erkennen lassen. Dazu wurde das Wachstum und die Ethanolproduktion von *K. marxianus* bei Diammoniumhydrogenphosphatkonzentrationen von $0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ und

Experimenteller Teil

5 g·l⁻¹ auf TEM 30 unter anaeroben Bedingungen untersucht. Die anaerobe Versuchsdurchführung wurde bewusst gewählt, da Diammoniumhydrogenphosphat bereits seit langer Zeit bei der Weinherstellung als sogenannter Aktivator eingesetzt wird und dieser Effekt auch hier erwartet wurde [49]. Daher wurde das TEM 30 auch konzentrierter, als für die aerobe Kultivierung ideal, eingesetzt. Es wurde mit Wasser so verdünnt, dass die Lactosekonzentration ca. 133 g·l⁻¹ betrug. Der Verlauf der Biomassenentwicklung und der Ethanolproduktion ist in folgenden Abbildungen dargestellt. Die Ethanolbestimmung durch Gaschromatographie ist in Anhang 6.3 erläutert.

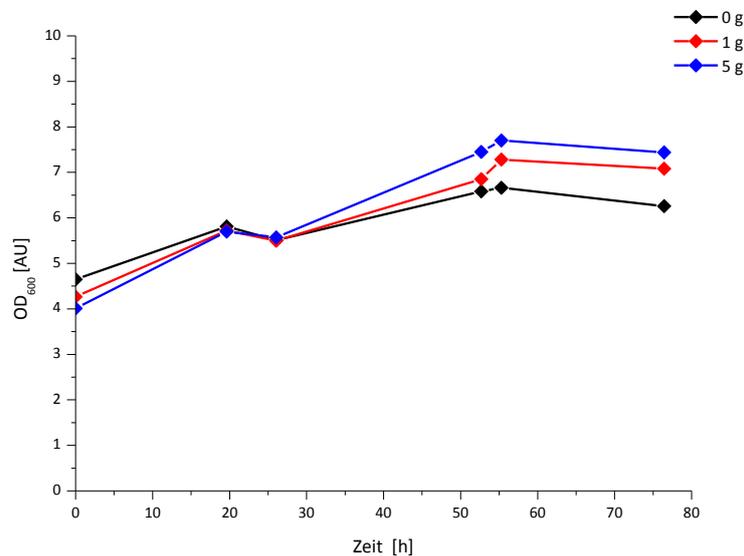


Abbildung 22: Wachstum von *K. marxianus* DSM 5422 abhängig von der Ammoniumphosphatkonzentration (Lactoseausgangskonzentration: 133 g·l⁻¹, 30°C, 80 min⁻¹, anaerob)

Wie durch den nur moderaten Anstieg der OD₆₀₀ zu erkennen ist, erfolgt das Zellwachstum unter anaeroben Bedingungen viel langsamer als unter aeroben Bedingungen. Abbildung 22 zufolge hat die Diammoniumhydrogenphosphatkonzentration einen leicht proliferierenden Einfluss auf die Entwicklung der Biomasse. So fiel die Zunahme der Biomassekonzentration ohne Zusatz von Diammoniumhydrogenphosphat von ca. 1 g·l⁻¹ auf 1,4 g·l⁻¹ deutlich geringer aus als bei Zugabe von 5 g Diammoniumhydrogenphosphat. Hier fiel die Zunahme von 0,9 g·l⁻¹ auf 1,7 g·l⁻¹ nahezu doppelt so hoch aus. Aber selbst geringe Mengen von 1 g·l⁻¹ dieser Stickstoffquelle zeigen diesen proliferierenden Effekt.

Experimenteller Teil

Ferner geht aus der Wachstumskurve bei einer Diammoniumhydrogenphosphatkonzentration von $0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ hervor, dass TEM 30 genug Stickstoffquellen für *K. marxianus* aufzuweisen scheint, die die Hefe zum Wachsen benötigt. Die Vergärung einer reinen Lactoselösung zum Vergleich ist in Abbildung 48 dargestellt.

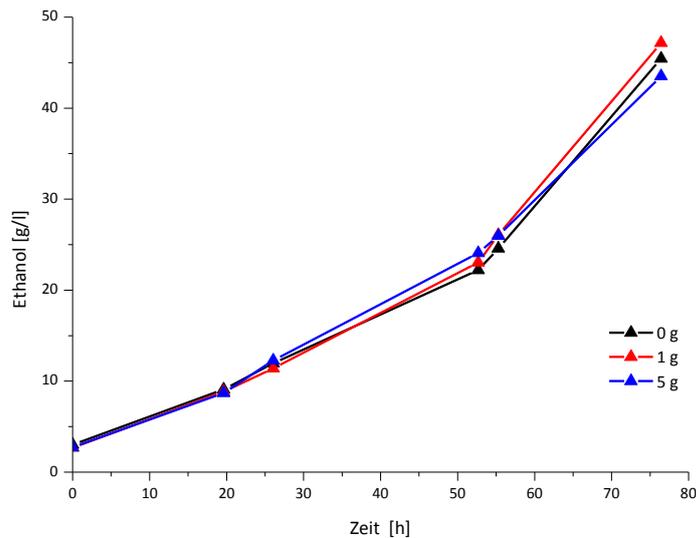


Abbildung 23: Ethanolbildung bei unterschiedlichen Diammoniumhydrogenphosphatkonzentrationen

(Lactoseausgangskonzentration: $133 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, 30°C , 80 min^{-1} , anaerob)

Abbildung 23 zeigt sehr deutlich, dass die Diammoniumhydrogenphosphatkonzentration einen geringen Einfluss auf die Ethanolproduktion von *K. marxianus* hat. Die Beobachtung, dass höhere Diammoniumhydrogenphosphatkonzentrationen zu etwas verringerter Ethanolausbeute führen deckt sich mit der Beobachtung der höheren Biomassenproduktion.

Ein direkter Vergleich von Abbildung 22 und Abbildung 23 demonstriert, dass unter den gewählten anaeroben Bedingungen Ethanol anstelle von Biomasse produziert wird. Das ist daran zu erkennen, dass sich die optische Dichte und damit die Biomassekonzentration über den Beobachtungszeitraum kaum geändert haben, während die Ethanolkonzentration aber stark zugenommen hat.

Die Ausbeute der Umsetzung von Lactose zu Ethanol liegt hier bei ca. 70 %. Das lässt den Schluss zu, dass die komplette Umsetzung von Lactose zu Ethanol noch nicht abgeschlossen

Experimenteller Teil

war. Weiterhin wird durch die Versuchsdurchführung aber auch gezeigt, wie wenig Aufwand es Bedarf, um aus diesem Substrat eine Ethanolausbeute von 70 % in Bezug auf die eingesetzte Lactose zu erhalten.

3.4.3 Das Fermentationsverhalten von *K. marxianus* bei hohen Zuckerkonzentrationen

In diesem Abschnitt sollte untersucht werden, ob die sehr hohe Lactosekonzentration in TEM 30 einen negativen Einfluss auf das Wachstum von *K. marxianus* sowie die Produktion von Ethanol hat. Zur Überprüfung, ob dieser Einfluss substratspezifisch ist, wurde gleichzeitig Glucose und Galactose in Vergleichskulturen als Substrat eingesetzt.

Dazu wurden drei Kulturen mit einer Lactosekonzentration von $200 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ und einer Glucose- und Galactosekonzentration von $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ angesetzt und angeimpft (siehe Anhang 6.9 und 6.5). Diese wurden anschließend unter anaeroben Bedingungen für 150 h inkubiert.

Die Konzentration für Glucose und Galactose wurde bewusst zu $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ gewählt, damit die Zellen unter den gleichen osmotischen Bedingungen wachsen.

Die Messergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

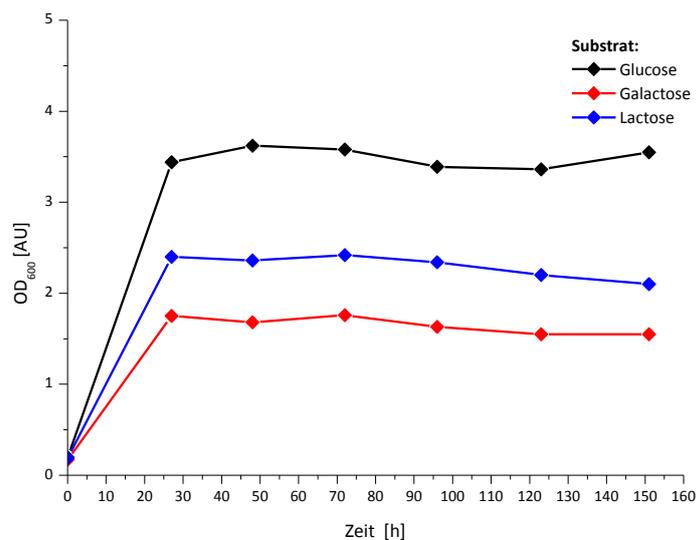


Abbildung 24: Zellwachstum von *K. marxianus* DSM 5422 verschiedenen Substraten

($200 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Lactose, $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose und $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Galactose, 30°C , 80 min^{-1})

Experimenteller Teil

In Abbildung 24 wurde die optische Dichte gegen die Zeit aufgetragen. Wie zu erkennen ist, nahm die optische Dichte innerhalb der ersten 24 h ihren maximalen Wert an und blieb von da an konstant.

Die Abbildung zeigt auch, dass die hohe Zuckerkonzentration an sich das Wachstum nicht wesentlich negativ beeinflusst. Wie bereits in Abschnitt 3.4.1 aufgefallen ist, ist auch hier die Biomasseentwicklung im Ansatz mit Glucose mit einem Endwert von $0,8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ nahezu doppelt so hoch wie in den beiden anderen Ansätzen (Galactose: $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, Lactose: $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). In Tabelle 6 sind die per Gaschromatographie gemessenen maximalen Ethanolkonzentrationen dargestellt. Weitere Messwerte zeigten, dass die Ethanolkonzentration nach 24 h weitestgehend konstant bleibt. Da auch die optische Dichte nicht weiter zunimmt, bedeutet das, dass das Zellwachstum beendet ist. Es ist daher anzunehmen, dass in den ersten 24 h der gesamte Zucker in den Ansätzen verstoffwechselt worden ist.

Tabelle 6: Max. Ethanolkonzentrationen der unterschiedlichen Substrate

Substrat	EtOH [g/l]	Ausbeute [%]
Glucose	36,5	71
Galactose	37,1	73
Lactose	71,7	67

Wie die berechneten Ausbeuten in Tabelle 6 zeigen, wurden 67 – 73 % des Zuckers zu Ethanol umgewandelt. Da Glucose auch in diesem Ansatz wieder zu doppelt so viel Biomasse geführt hat wie Galactose, beide Ansätze aber trotzdem die annähernd gleiche Menge Ethanol aufweisen, kann dies nur bedeuten, dass ein bestimmter Anteil an Galactose noch als Zwischenprodukt in den Zellen gespeichert worden sein muss oder dass *K. marxianus* bei der entsprechenden Ethanolkonzentration durch eine mögliche Hemmung des Leloir-Pfades (siehe Abbildung 7) die Galactose nicht mehr verstoffwechseln kann.

An dieser Stelle bleibt unklar, warum nicht mehr Wachstum im Lactoseansatz erfolgt ist. Im Lactoseansatz war die doppelte Masse an Zucker vorhanden wie in den beiden anderen Ansätzen. Trotzdem wächst die Hefe nur halb so stark wie im Glucoseansatz. Die gemessene

Experimenteller Teil

Ethanolkonzentration im Lactoseansatz ist aber nach den 27 h ungefähr doppelt so hoch wie in den anderen beiden Ansätzen. Demnach scheint die hohe Lactosekonzentration einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum zu haben, gleichzeitig aber einen positiven Einfluss auf die Fermentation auszuüben. Der Grund, warum die Biomassekonzentration im Lactoseansatz unerwartet gering ist, könnte an der doppelt so hohen Ethanolkonzentration liegen, die das Zellwachstum zu hemmen scheint. Eine Messung der Zuckerkonzentration in den Ansätzen könnte Auskunft darüber geben, ob die geringe optische Dichte tatsächlich auf die Ethanolkonzentration zurückzuführen ist. Sollte noch Lactose im Ansatz vorhanden sein, würde das dafür sprechen.

Der Grund, weshalb der Maximalwert für die Biomasse im Glucoseansatz weit unterhalb des in Abbildung 20 dargestellten liegt, ist die anaerobe Verfahrensweise, bei der ab einer bestimmte Grenzkonzentration des gelösten Sauerstoffs nur noch eine sehr geringe Biomasseproduktion, zu Gunsten der Ethanolproduktion, stattfindet.

3.4.4 Inhibierung des Zellwachstums durch Ethanol

Ethanol kann das Wachstum von Organismen und den Stoffwechsel und damit auch die Fermentation hemmen. Die maximale Ethanolkonzentration, bei der Zellen noch lebensfähig sind, liegt bei ca. $170 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (z.B. für *Lactobacillus heterohiochi*), sie hängt jedoch stark von der Art des Mikroorganismus und dessen Ethanoltoleranz ab [64]. Für den Stamm *K. marxianus* wird in der Literatur eine kritische Ethanolkonzentration in einer Kultur von $85 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ genannt. Liegt der tatsächliche Ethanolgehalt höher, wird die Entwicklung dieser Mikroorganismen gehemmt [65].

Um die Wirkung des Ethanols auf die Hefe zu untersuchen und die Toleranzgrenzen von Alkohol für den Stamm *K. marxianus* DSM 5422 zu bestimmen, wurden in einer Hefekultur aus verdünntem TEM 30 mit ca. $25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Lactose verschiedene Ethanolkonzentrationen eingestellt (25, 45, 70, 90, 105 und $130 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, entsprechend 3 - 17 %-Vol. des Alkohol in der Kultur) und kultiviert (siehe auch Tabelle 17 im Anhang). Während des Versuchs wurden Proben für die Messung von Alkohol und Lactose genommen und die optische Dichte zur Bestimmung der Biomasse gemessen. Die Ethanolkonzentration hat sich im Laufe des

Experimenteller Teil

Versuchs nicht geändert. Wichtig war hierbei die Beobachtung des Lactoseabbaus und der Biomasseproduktion. Die Ergebnisse sind im Folgenden und im Anhang 6.13 dargestellt.

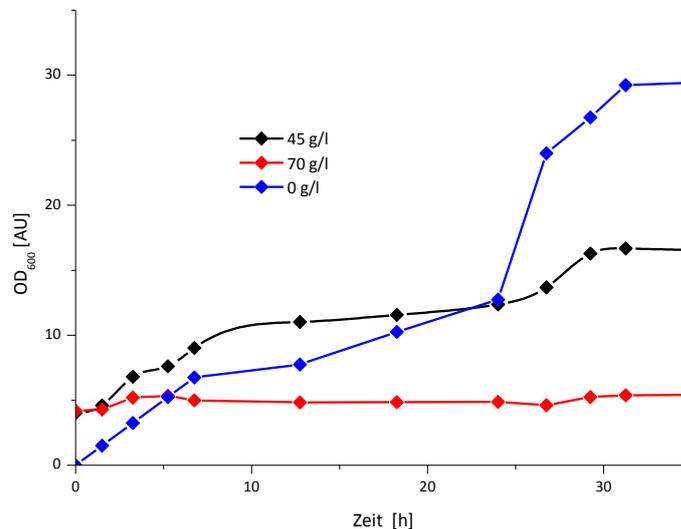


Abbildung 25: Entwicklung der Biomassekonzentration bei verschiedenen Ethanolkonzentrationen (Auszug)

($25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Lactose, 30°C , 130 min^{-1})

Die Entwicklung der OD_{600} in Abbildung 25 zeigt die deutlich negative Auswirkung des Ethanols auf die Biomasseentwicklung. Das Wachstum der Hefekulturen wird bereits ab einem Ethanolgehalt von $25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ beeinträchtigt. Die Hemmung nimmt mit zunehmender Ethanolkonzentration zu. Ab einem Ethanolgehalt von $70 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ist praktisch kein Wachstum mehr zu beobachten.

Interessant ist hierbei die deutlich sichtbare Diauxie nach ca. 24 h, welche mit zunehmender Ethanolkonzentration abnimmt. Bei der Kultur ohne Ethanol führt die Umstellung des Stoffwechsels auf ein anderes Substrat zu einer zweiten exponentiellen Wachstumsphase. Bereits bei $25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Ethanol ist diese zweite exponentielle Wachstumsphase zwar auch noch erkennbar, jedoch deutlich weniger ausgeprägt und auch nur von kurzer Dauer. Hier überwiegt die Hemmung des Ethanol die Fähigkeit zur Stoffwechselumstellung.

Bemerkenswert ist die Zeit, die die Hefezellen benötigen, den Stoffwechsel auf das veränderte Nahrungsangebot umzustellen. So dauert es ca. 15 h nach dem Verbrauch des

Experimenteller Teil

ursprünglichen Substrates, bis sich die Zellen auf den neuen Stoffwechselweg eingestellt haben. Der Substratabbau ist in folgender Abbildung dargestellt:

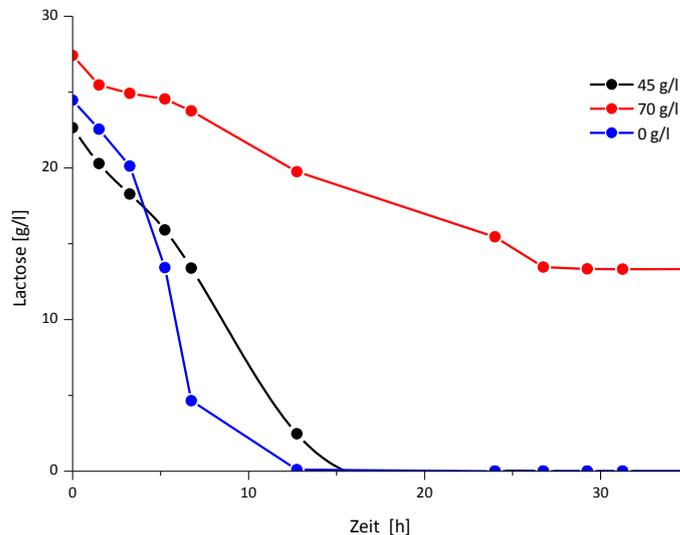


Abbildung 26: Entwicklung des Lactoseabbaus bei unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen

($25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Lactose, 30°C , 130 min^{-1})

Der Abbau von Lactose, welcher in Abbildung 26 und im Anhang 6.13 dargestellt ist, zeigt ein korrespondierendes Bild. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen dabei wichtige Grenzen auf, die für den Prozess gelten. So muss zum einen darauf geachtet werden, dass bei der Hefezucht für eine ausreichende Begasung zu sorgen ist, da bei einigen Versuchen aufgefallen ist, dass die verwendete Hefe sehr empfindlich auf Sauerstoffmangel reagiert und den Stoffwechsel schnell von respiratorisch auf fermentativ umschaltet.

Das hat zur Folge, dass die bei der Gärung gewünschte Ethanolproduktion die Produktivität der Biomassenproduktion senkt. Auf der anderen Seite schränkt die Inhibierung der verwendeten Hefe durch gebildetes Produkt den gesamten Prozess ein, da die absolute Ethanolausbeute nach oben beschränkt ist. Für den vorliegenden Prozess, bei dem eine Substratkonzentration von ca. $200 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ vorliegt, ist dieses insofern kritisch, da die erwartete Ethanolkonzentration bei optimalem Umsatz bei ca. $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ und damit deutlich über der hier ermittelten Grenzkonzentration liegt.

Experimenteller Teil

3.4.5 Hefezucht auf der Basis von TEM 30

Die Empfehlung der DSMZ Braunschweig für die Kultivierung von *K. marxianus* DSM 5422 ist ein Komplexmedium mit folgender Zusammensetzung:

Tabelle 7: Empfohlene Zusammensetzung des Komplexmediums zur Kultivierung von *K. marxianus* DSM 5422

Substanz	Konzentration [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
Hefeextrakt	3,0
Malzextrakt	3,0
Pepton	5,0
Glucose	10,0

Dieses Medium erwies sich in der Laborpraxis auch durchaus geeignet, um die Hefezellen erfolgreich zu vermehren. Hauptbestandteile dieses Mediums sind hydrolysierte Proteine und Zucker. Im verwendeten TEM 30 ist das Protein zwar weitestgehend in den vorgeschalteten Prozessschritten entfernt worden, jedoch sind immer noch ca. $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Protein bzw. Peptide enthalten, welches als Nahrung für die Hefezellen dienen könnte. Zucker ist in dem Substrat auch in großen Mengen vorhanden, so dass es sich anbietet, auch die Hefezucht auf Basis von TEM 30 durchzuführen. Das einzige Hindernis hierbei stellt die Keimbelastung des TEM 30 dar, welche zu einem unkontrollierbaren Wachstum unter aeroben Hefezuchtbedingungen führen könnte. Eine richtige Sterilisation des TEM 30 durch z.B. autoklavieren ist nicht möglich, da unter diesen Bedingungen die Maillard-Reaktion einsetzt und somit Proteine und Zucker zerstört werden. Um dieses zu verhindern, wurde das TEM 30 nach entsprechender Verdünnung einmal für 30 s aufgekocht („pasteurisiert“), um die enthaltenen Keime weitestgehend abzutöten. Bei dieser Methode wurden keine Verfärbungen und kein Verlust des Lactosegehaltes beobachtet.

Es wurden zahlreiche Versuche im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt um eine geeignetes Verhältnis von TEM 30 und Wasser zu finden. Als geeigneter Kompromiss zwischen ausreichender Substratmenge und minimierter Hemmung durch Salze erwies sich eine Verdünnung von 1:10. Die Ergebnisse aus den Schüttelkolbenversuchen konnten durch den

Experimenteller Teil

Einsatz eines 2 l-Bioreaktors (Biostat A+, Sartorius Stedim Biotech, *Göttingen*) noch deutlich gesteigert werden, da hier durch eine Zwangsbelüftung die in Abschnitt 3.4.4 beschriebene, schnell einsetzende Gärung verhindert werden kann. Ein beispielhaftes Ergebnis dieser Versuche ist in Abbildung 27 dargestellt:

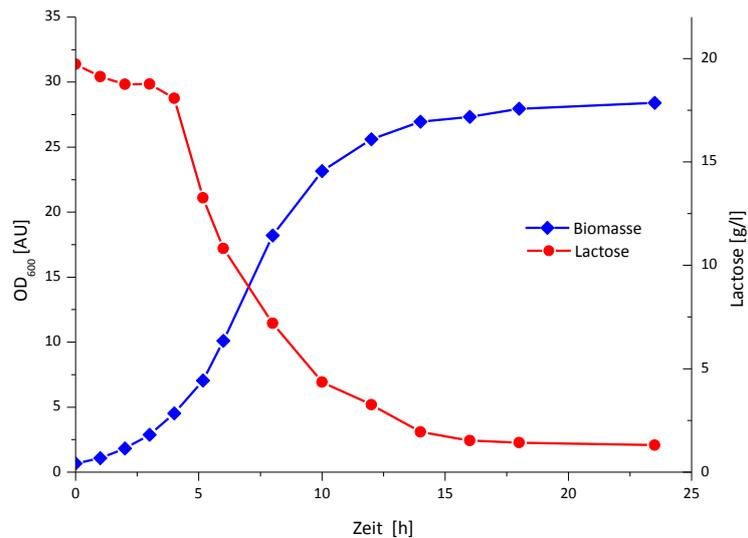


Abbildung 27: Entwicklung von Biomassen- und Lactosekonzentration im 2 l-Bioreaktor

(10 % TEM 30, 85 % VE-Wasser, 5 % Inoculum, 1 vvm Luft, keine pH-Regulierung,)

Es wird deutlich, dass das verwendete TEM 30 als Substrat zur Hefezucht verwendet werden kann und nicht auf teure Komplex- oder synthetische Medien zurückgegriffen werden muss. Insbesondere im industriellen Maßstab im Bezug auf die Wirtschaftlichkeit, stellt dies einen großen Vorteil dar.

Experimenteller Teil

3.4.6 Veränderung der Zellmorphologie bei Kultivierung und Gärung

Bei der Kultivierung und anschließenden Vergärung mit der verwendeten Hefe wurden interessante Beobachtungen gemacht. So veränderte sich die Zellmorphologie der Hefezellen während des Prozesses deutlich. Diese Veränderung ist in Abbildung 28 und Abbildung 29 dargestellt.

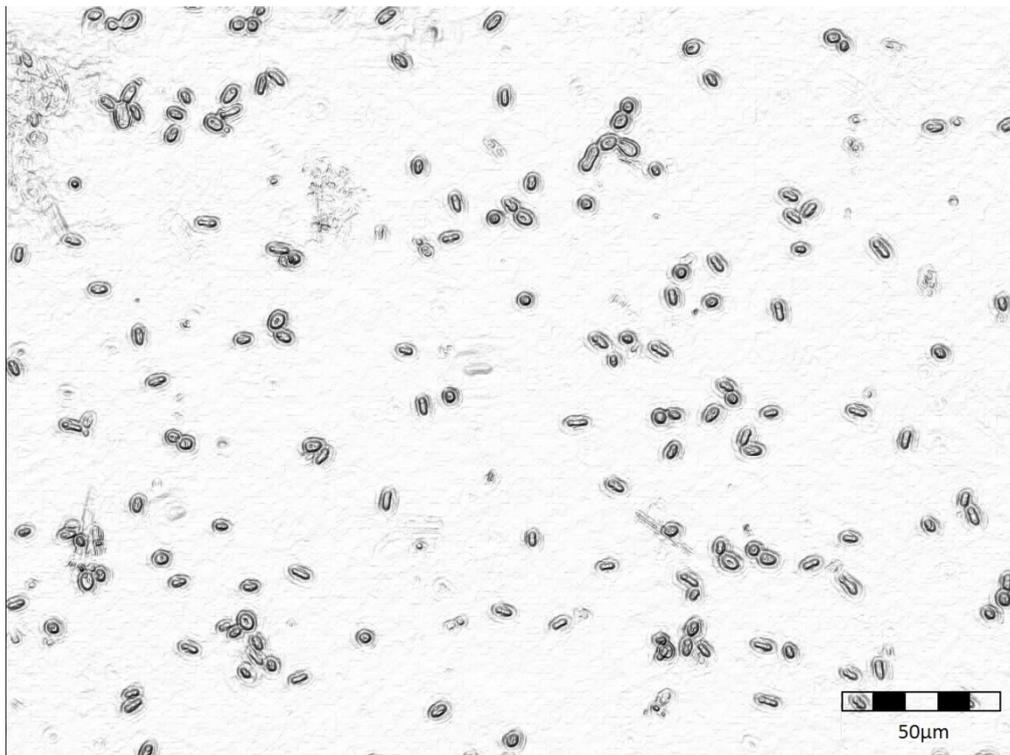
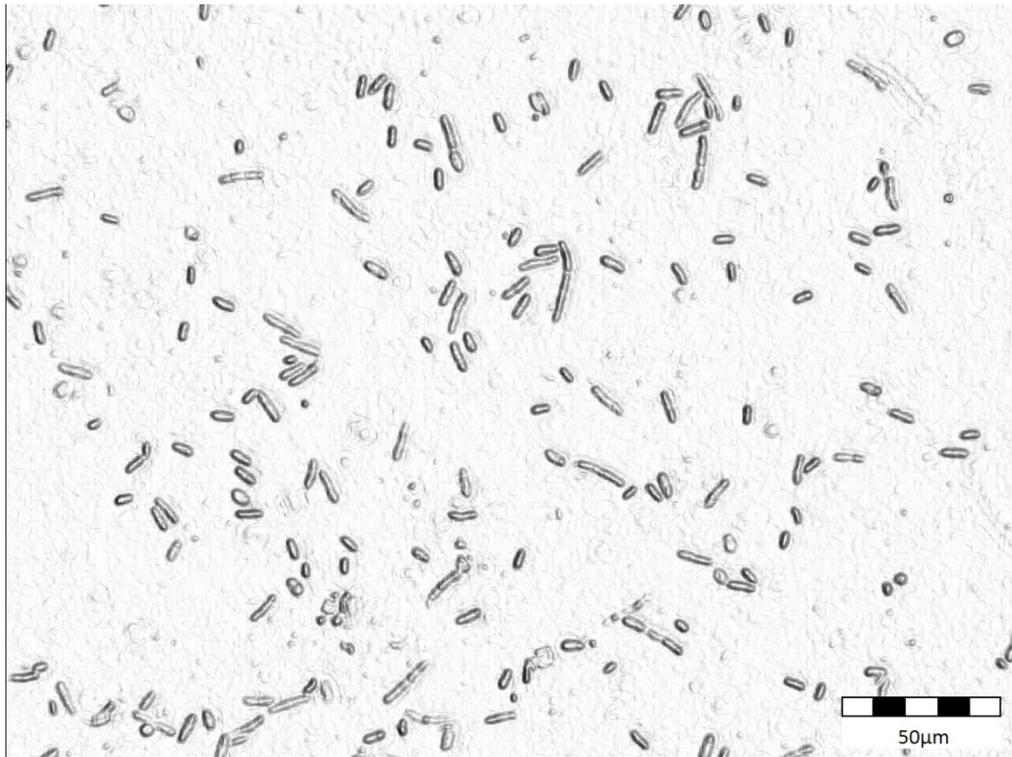


Abbildung 28: Hefezellen *K. marxianus* DSM 5422 während der aeroben Kultivierung

(Phasenkontrastmikroskopie und Relieftransformation) [45]

Die Zellen in der Abbildung 28 zeigen die für Hefezellen typische ovale Form bei einer Größe von 5 – 10 µm. Teilweise sind Knospungen zu erkennen. Die Morphologie war über nahezu alle Zellen gleichförmig.

Experimenteller Teil



**Abbildung 29: Hefezellen *K. marxianus* DSM 5422 während der anaeroben Gärung
(Phasenkontrastmikroskopie und Relieftransformation) [45]**

Bei der alkoholischen Gärung verändert sich die Morphologie der Hefezellen, wie sich aus Abbildung 29 entnehmen lässt. Die Zellen sind nun eher stäbchenförmig und stellenweise lassen sich aneinandergedehnte Zellen ausmachen. Die Größe der Zellen steigt durch die Veränderung der Morphologie auf über 15 μm. Die Ursache für diese Strukturveränderung wird nicht im Einfluss von Ethanol oder dem gesteigerten osmotischen Druck vermutet, sondern deutet vielmehr auf einen Mangel an Nährstoffen hin. Die Stäbchenform ist eine Schutzfunktion, die es den Zellen ermöglichen soll, filamentös in neues Substrat einzudringen um es zu abbauen zu können. Eine gesteigerte Flocculin-Produktion verursacht die Anhaftung der Zellen aneinander. Diese mannose-spezifischen Lectine interagieren dann mit der Glycokalix von Nachbarzellen [67][68][69].

Experimenteller Teil

Abschließend lassen sich für eine optimale Anzucht von *K. marxianus* DSM 5422 folgende Konditionen festlegen:

- Kulturmedium: 10 % TEM 30 in Wasser
- Kultivierungstemperatur: 30°C
- Belüftung: mindestens 0,5 vvm Luft, besser 1 vvm
- Kultivierungsdauer: 20 h
- Zusätze: Antischaummittel und $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Diammoniumhydrogenphosphat

3.5 Ethanolproduktion durch alkoholische Gärung

Während bei der Biomasseproduktion ein schnelles Wachstum und eine maximale Biomassenausbeute das erklärte Ziel ist, liegen die Schwerpunkte bei der eigentlichen Ethanolproduktion durch alkoholische Gärung im Wesentlichen auf einen maximalen Umsatz zum Zielprodukt bei gleichzeitig einfacher und daher wirtschaftlicher Prozessführung. Zunächst soll eine einfache und reproduzierbare Verfahrensweise evaluiert werden, die eine Ethanolgewinnung aus TEM 30 ermöglicht.

3.5.1 Maximierung der Ethanolausbeute

Die absolute Ethanolausbeute in diesem Prozess ist durch die Löslichkeit der Lactose limitiert. Wie vorstehend beschrieben, lassen sich aus dem TEM 30 bei optimaler Umsetzung von unverdünnten TEM 30 Ethanolkonzentrationen von max. $115 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ erreichen. Umgekehrt bedeutet dies, dass sich die Ethanolausbeute prinzipiell nur durch geringere oder stärkere Verdünnung des Ausgangsstoffes steuern lässt.

Die einfachste Möglichkeit, das TEM 30 zu vergären ist die direkte Umsetzung des unbehandelten Stoffes durch die Hefe, ohne zusätzliche Hilfsstoffe oder Zusätze. Zunächst wurden verschiedene Konzentrationen TEM 30 eingestellt und mit einer entsprechende

Experimenteller Teil

Menge Hefe versetzt. Das Ergebnis der Fermentationen (siehe auch Anhang 6.14) ist in Abbildung 30 dargestellt:

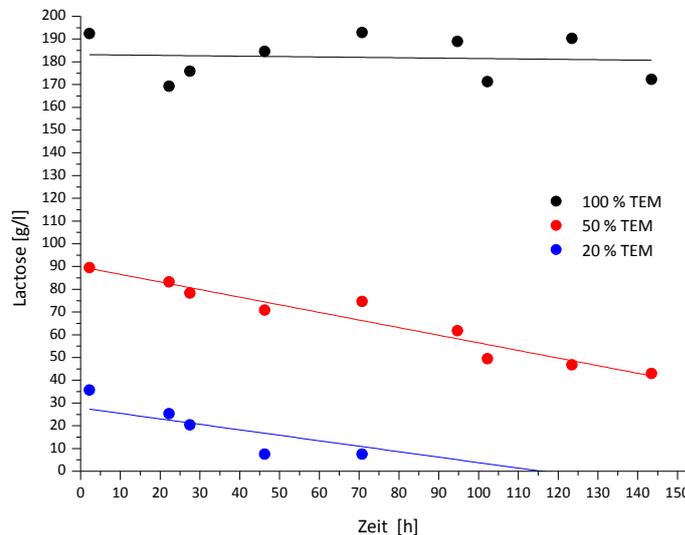


Abbildung 30: Verlauf der Lactosekonzentration bei der Vergärung von TEM 30 in unterschiedlichen Verdünnungen mit *K. marxianus* DSM 5422 (30°C, 60 min⁻¹, anaerob)

Die Untersuchungen haben ergeben, dass der Einsatz von unverdünnter Melasse nicht ohne weiteres möglich ist, da die Hemmung der verwendeten Mikroorganismen zu groß ist. Auch nach einer Fermentationsdauer von 140 h hatte sich die Lactosekonzentration nicht signifikant verändert, die Schwankungen befinden sich noch innerhalb der Fehlertoleranz der verwendeten Messmethode (siehe auch Anhang 6.4). Es ist demnach zwingend notwendig die Melasse zu verdünnen bzw. anderweitig zu behandeln.

Schon bei einer 1:1 Verdünnung der Melasse mit Wasser lässt sich eine deutliche Verbesserung des Gärverhaltens feststellen. Die Lactosekonzentration nimmt hier kontinuierlich ab. Bei einer weiteren Verdünnung auf 20 % der Ursprungskonzentration ist die Steigung der Regressionsgerade und damit die Abbaugeschwindigkeit mit ca. 0,26 g·l⁻¹·h⁻¹ etwa genauso wie bei der 1:1 Verdünnung. Das bedeutet, dass die Umsetzung des Substrates durch andere Faktoren limitiert wird, als durch die Konzentration an sich. Wie sich aus folgender Abbildung entnehmen lässt, findet während der Gärung erwartungsgemäß nur eine unwesentliche Zunahme der Biomasse statt:

Experimenteller Teil

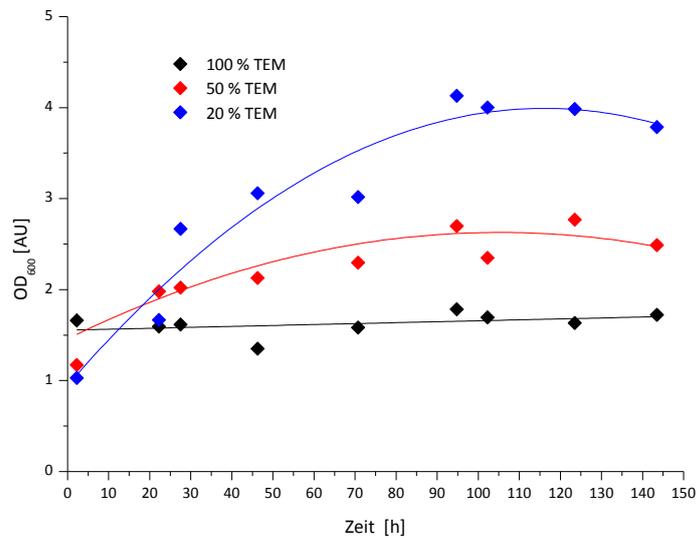


Abbildung 31: Entwicklung der OD_{600} bei der Vergärung von TEM 30 in unterschiedlichen Verdünnungen mit *K. marxianus* DSM 5422 (30°C, 60 min⁻¹, anaerob)

Auch hier zeigt sich sehr stark die Hemmung der Hefe durch das unverdünnte TEM 30, da bei dem Ansatz quasi überhaupt kein Wachstum stattfindet. Die Wachstumsraten der verdünnten Kulturen sind erwartungsgemäß sehr gering, aber unterscheiden sich doch signifikant. So beträgt die Wachstumsrate bei der Kultur mit 20 % TEM 30 ca. 152 mg·l⁻¹·d⁻¹, während das Wachstum bei 50 % TEM 30 mit 68 mg·l⁻¹·d⁻¹ deutlich verlangsamt ist. Das ist in diesem Fall aber unkritisch, wenn nicht sogar gewünscht, da die Biomassenproduktion in Konkurrenz zur Ethanolproduktion steht.

Es wurden zahlreiche Versuche im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt, um die optimale Verdünnung für das TEM 30 zu ermitteln. Die vielversprechendsten Ergebnisse zeigte eine Verdünnung des TEM 30 auf 40 % der ursprünglichen Konzentration. Die Verdünnung erfolgt mit 50 % VE-Wasser und 10 % Hefesuspension auf der Basis von TEM 30. Diese Zusammensetzung der Gärungskultur stellt einen Kompromiss zwischen Substratmaximierung und Minimierung der Salzbelastung dar.

Diese Verfahrensweise wurde in verschiedenen Größenordnungen bis hin zum 2 l-Maßstab im Bioreaktor durchgeführt und führte zu reproduzierbaren Ergebnissen. Ein typischer Verlauf ist in Abbildung 32 dargestellt:

Experimenteller Teil

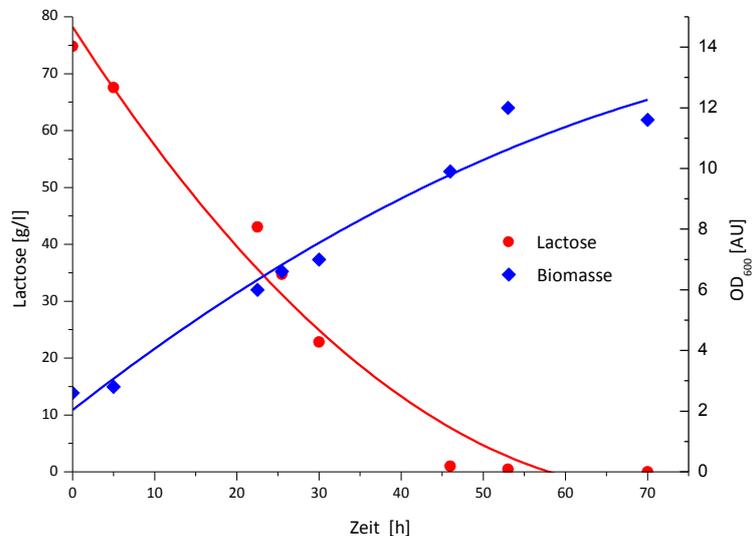


Abbildung 32: Lactoseabbau in verdünntem TEM 30 (2 l-Bioreaktor, 40 % TEM 30, 30°C, BTM_0 =ca. 0,7 g/l, 120 min^{-1})

Es ist deutlich zu erkennen, dass die enthaltene Lactose nach ca. 48 h abgebaut und die Umsetzung praktisch abgeschlossen ist. Wie zu erwarten, ist bei der anaeroben Verfahrensweise nur eine moderate Biomassenproduktion zu beobachten, welche zu Lasten der Ethanolproduktion geht. Die Betriebsbedingungen zur Vergärung sind recht einfach. Eine vorherige Einstellung und Regulierung des pH-Wertes ist nicht notwendig. Das TEM 30 wird lediglich verdünnt, eine aufwändige Sterilisation wurde nicht vorgenommen. Die verwendete Hefe scheint gegenüber Kontaminationen recht robust, so dass mögliche Infektionen schnell überwachsen werden. Hinzu kommt in diesem Fall, dass anaerob gearbeitet wird, was bei den meisten Mikroorganismen zu stark vermindertem Wachstum führt und die Gefahr von Produktverlust durch andere Mikroorganismen deutlich einschränkt.

In Abbildung 33 ist der Verlauf der gemessenen Ethanolkonzentration im Vergleich mit der anhand des gemessenen Lactoseverbrauchs errechneten Ethanolkonzentration dargestellt:

Experimenteller Teil

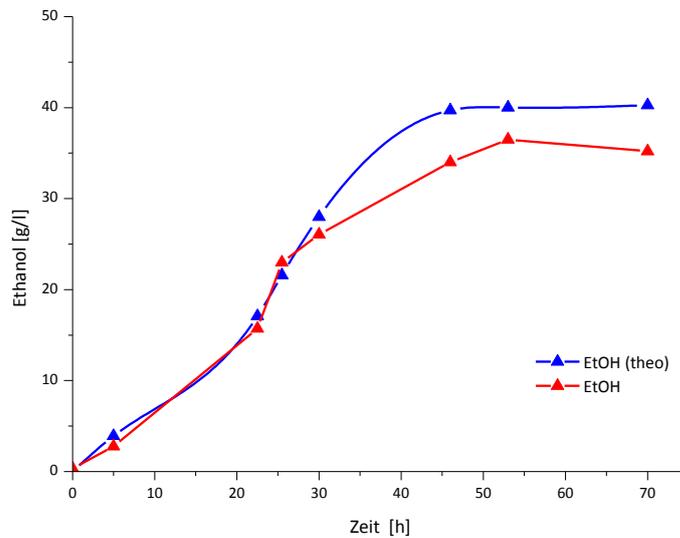


Abbildung 33: Ethanolproduktion gemessen und theoretisch (2 l-Bioreaktor, 40 %, 30°C, $BTM_0 = \text{ca. } 0,7 \text{ g/l}$, 120 min^{-1})

Die Berechnung der theoretischen Ethanolkonzentration bezieht sich auf die theoretische Maximalausbeute von 0,538 g Ethanol pro 1 g umgesetzter Lactose. Es wird deutlich, dass nahezu die gesamte Lactose zu Ethanol umgesetzt wird, während die Differenz zwischen erwarteter und gemessener Konzentration mit zunehmender Fermentationsdauer größer wird. Diese Differenz kann zum einen dadurch verursacht werden, dass Ethanol aufgrund des hohen Dampfdrucks durch den Rührer oder die CO_2 -Bläschen ausgetrieben wird. Eine andere Möglichkeit wäre die Verstoffwechslung von Ethanol durch die Hefezellen, wenn die Lactose als Hauptsubstrat verbraucht ist. Die relative Ausbeute am Ende der Vergärung betrug ca. 90 %.

3.5.2 Vergärung mit hohen Biomassekonzentrationen/Biomasserückgewinnung

Das im vorherigen Abschnitt beschriebene Verfahren zeigt, dass es möglich ist, aus TEM 30 Ethanol zu gewinnen. Dieses Verfahren könnte durch kürzere Prozesszeiten noch verbessert werden. Weiterhin wäre es wünschenswert, die Biomasse zurückzugewinnen, um nicht für jeden Ansatz eine neue Hefeaufzucht betreiben zu müssen.

Experimenteller Teil

Eine Verkürzung der Prozesszeit lässt sich am einfachsten durch Erhöhung der Biomassekonzentration erreichen. Zu diesem Zweck wurde die zum Animpfen verwendete Hefemenge verzehnfacht, in dem die gesamte Biomasse einer 2 l-Kultivierung aus einem Bioreaktorversuch durch Zentrifugation bei $3.300 \cdot g$ abgetrennt wurde (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau) und das zu vergärende, entsprechend verdünnte TEM 30 damit beimpft wurden. Die anschließende Vergärung zeigte zum einen, dass sich der Lactoseabbau dramatisch beschleunigt. Zum anderen zeigte sich, dass das der Anteil vom TEM 30 um 25 % gesteigert werden kann, was zu einer deutlichen Erhöhung der Wirtschaftlichkeit des Verfahrens führen kann. Das Ergebnis dieser Vergärung (siehe auch Anhang 6.15) ist in Abbildung 34 dargestellt:

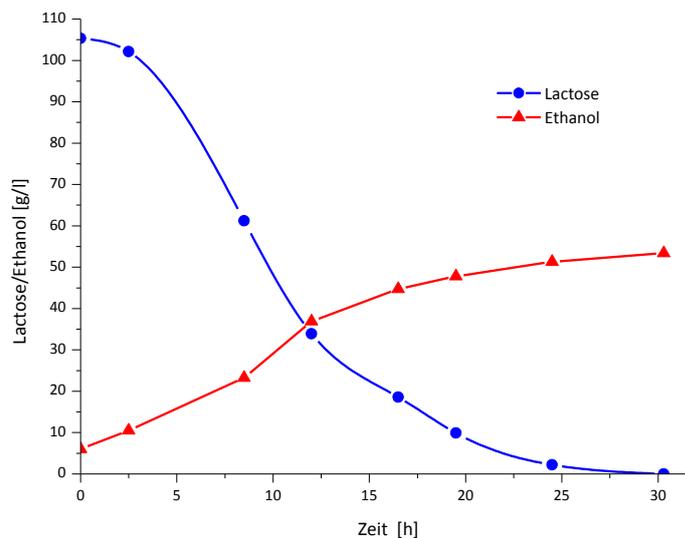


Abbildung 34: Verlauf der Vergärung von TEM 30 mit hohem Biomasseinsatz

(2 l Bioreaktor, 50 % TEM 30, $BTM_0 = \text{ca. } 7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 30°C , 120 min^{-1})

Es zeigt sich, dass die Umsetzung von Lactose zu Ethanol ca. doppelt so schnell abläuft, als beim Einsatz geringerer Biomassekonzentrationen (Faktor 10), während die relative Ausbeute mit ca. 90 % auf einem gleichbleibend hohem Niveau liegt. Dem gegenüber steht allerdings ein erhöhter Aufwand, da zum Einen wesentlich mehr Biomasse produziert werden muss, d.h. es ist der Einsatz von größeren Fermentern zur Hefezucht notwendig, um die gewünschten Mengen zu erzielen. Zum Anderen steigt das Volumen an zu

Experimenteller Teil

pasteurisierendem TEM-Medium (siehe auch 3.4.5) und damit auch der Energieverbrauch um das 10fache.

Dieser Effekt ließe sich kompensieren, wenn es möglich wäre, die Biomasse am Ende der Gärung zurückzugewinnen und erneut einsetzen zu können. Um dieses zu untersuchen, wurde die Hefe eines Gäransatzes (siehe Anhang 6.11.1) nach 24 h durch Zentrifugation abgetrennt, in isotonischer NaCl-Lösung (0,9 % (m/v)) aufgenommen und umgehend einem neuen Ansatz zugeführt.

Um identische Ansatzbedingungen zu erhalten, wurde vorher ein größeres Volumen TEM 30 verdünnt und für die einzelnen Ansätze jeweils Aliquote davon verwendet. Der Lactoseabbau der 3 aufeinander folgenden Versuche ist in folgender Abbildung dargestellt:

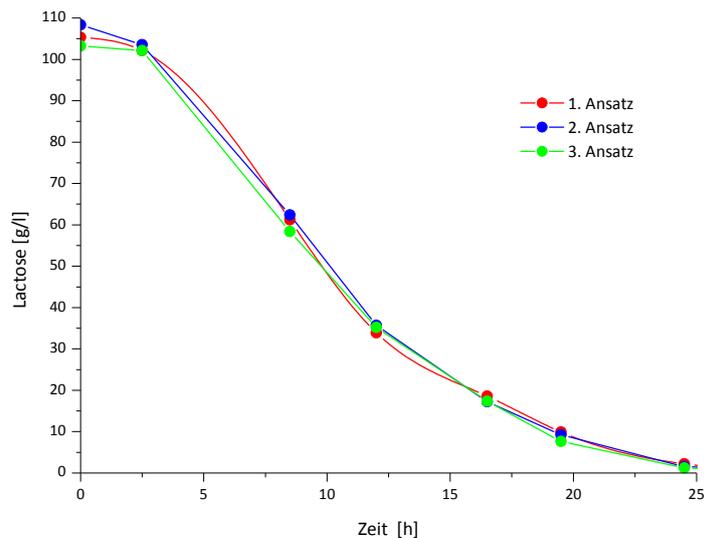


Abbildung 35: Vergärung von TEM 30 mit zurückgewonnener Biomasse (2 l Bioreaktor, 50 % TEM 30, $BTM_0 = \text{ca. } 7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 30°C , 120 min^{-1})

Die Versuche zeigten, dass es offensichtlich kein Problem darstellt, die eingesetzte Hefe mehrfach abzutrennen und wieder zu verwenden. Die Ethanolausbeuten betragen auch in den wiederholten Gärungen ca. 90 %. Eine zwischenzeitliche Wäsche der Hefezellen scheint zum momentanen Zeitpunkt nicht notwendig zu sein. Wie oft dieser Vorgang wiederholt werden kann, gilt es in weiterführenden Arbeiten zu klären.

Experimenteller Teil

3.6 Einfluss der Salzfracht im Molkenkonzentrat

Wie die Ergebnisse der vorherigen Abschnitte gezeigt haben, spielt der Einfluss der im TEM 30 gelösten Stoffe, insbesondere der gelösten anorganischen Salze, eine entscheidende Rolle bei dessen biotechnologischer Verwertbarkeit. Daher soll der Einfluss der Salzfracht in diesem Abschnitt näher untersucht werden.

3.6.1 Einfluss bestimmter Kationen

In diesem Abschnitt wird zunächst der Einfluss bestimmter Kationen auf die Kultivierung der Hefe *K. marxianus* DSM 5422 untersucht.

Zur Untersuchung wurden die im TEM 30 in höheren Konzentrationen vorhandenen Kationen K^+ , Na^+ und Ca^{2+} ausgewählt. Dieses Vorgehen sollte als Ergebnis einen Hinweis auf eine mögliche Demineralisierungsstrategie liefern. Die Medien wurden jeweils mit 10 ml Vorkultur (siehe Anhang 6.9) angeimpft und bei $30^\circ C$ und 130 min^{-1} in Schikanekolben inkubiert. Mehrfach täglich wurde die Biomasseentwicklung anhand der OD_{600} gemessen und der Lactosegehalt bestimmt (siehe auch Anhang 6.9).

Anders als bei den vorhergehenden Darstellungen wird hier jeweils der Umsatz betrachtet, da die Bestimmung der absoluten Lactosewerte durch die teilweise hohen Salzkonzentrationen beeinträchtigt war und ein Vergleich schwierig wäre. Der Lactoseumsatz ist wie folgt definiert:

$$\text{Lactoseumsatz} = \frac{[\text{Lactose}]_{t=0} - [\text{Lactose}]_t}{[\text{Lactose}]_{t=0}}$$

Abbildung 36: Definition des Lactoseumsatz

Um Anioneneffekte einzuschränken, wurden jeweils zwei unterschiedliche Salze verwendet.

In Abbildung 37 und Abbildung 38 sind die Ergebnisse einer Vergleichskultivierung Lactoselösungen mit definiertem Kaliumzusatz dargestellt.

Experimenteller Teil

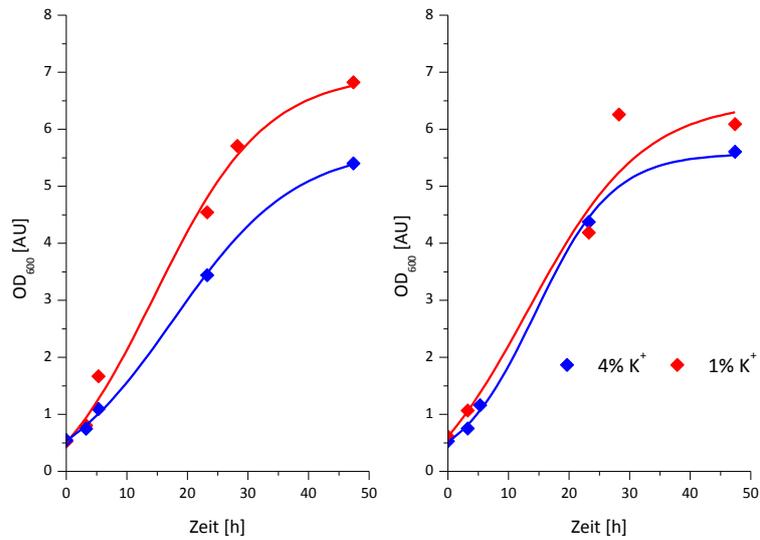


Abbildung 37: Entwicklung der OD₆₀₀ im Verlauf der Kultivierung mit 15 g·l⁻¹ Lactose mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen (4 % = blau 1 % = rot) eingesetzt als Kaliumchlorid (links) und Kaliumsulfat (rechts).

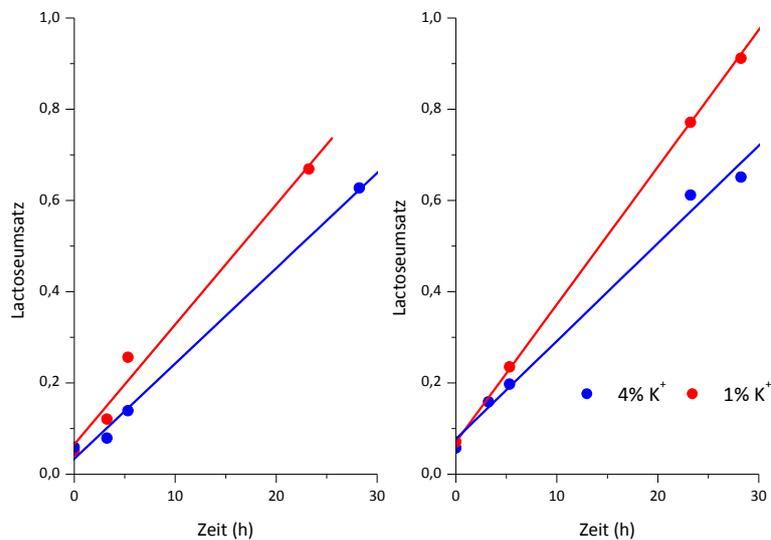


Abbildung 38: Umsatz der Lactose im Verlauf der Kultivierung mit 15 g·l⁻¹ Lactose mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen (4 % = blau 1 % = rot) eingesetzt als Kaliumchlorid (links) und Kaliumsulfat (rechts).

Aus den vorstehenden Abbildungen wird ersichtlich, dass mit sinkendem Salzgehalt in der Lactoselösung sowohl der Umsatz, als auch die Biomasse deutlich schneller ansteigen. Es hat

Experimenteller Teil

den Anschein als wäre die Inhibierung der Hefe durch den Chloridanteil stärker als die Inhibierung durch Sulfat.

Die folgenden Abbildungen veranschaulichen die Ergebnisse einer Vergleichsfermentation zweier natriumhaltiger Lactoselösungen.

Bei der Kultivierung mit Natriumsalzen ist die Tendenz zu erkennen, dass ein gewisser Gehalt an Natrium eine bessere Entwicklung der Biomassekonzentration verspricht. Der Unterschied der Inhibierung durch Chlorid und Sulfat ist hier nur sehr gering. Die Daten sind in Abbildung 39 dargestellt:

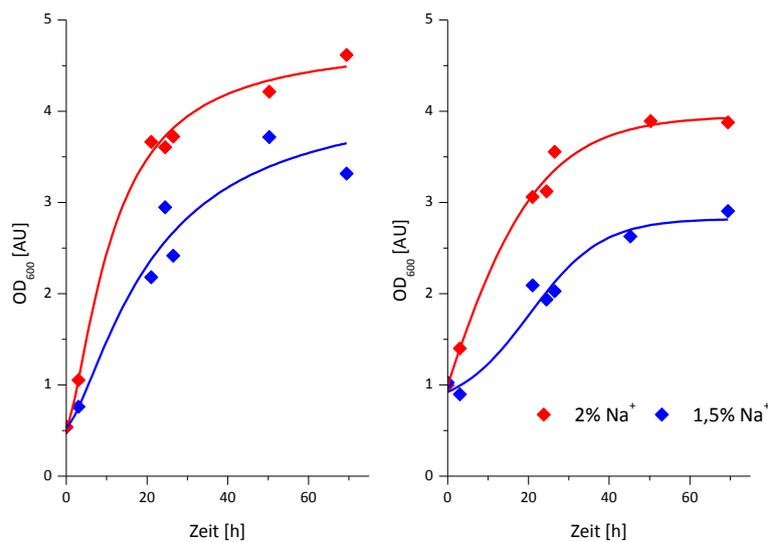


Abbildung 39: Entwicklung der OD_{600} im Verlauf der Kultivierung mit $15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Lactose mit unterschiedlichen Natriumkonzentrationen (1,5 % = blau 2 % = rot). Eingesetzt wurden Natriumchlorid (links) und Natriumsulfat (rechts).

Beim Lactoseumsatz hingegen lässt sich keine Hemmung durch einen höheren Salzgehalt feststellen. Diese Daten sind in Abbildung 40 dargestellt.

Experimenteller Teil

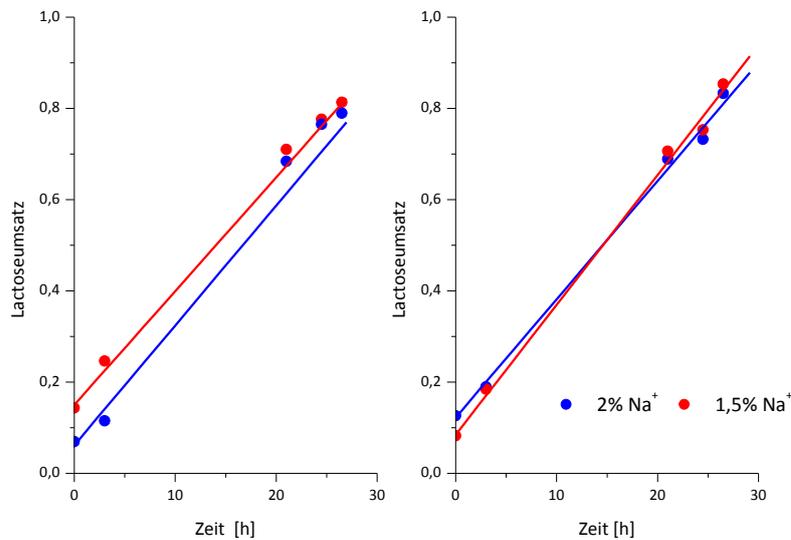


Abbildung 40: Einfluss verschiedener Natriumkonzentrationen (1,5 % = blau 2 % = rot) auf den Lactoseumsatz im Verlauf einer Kultivierung mit 15 g^{-1} Lactose. Eingesetzt wurden Natriumchlorid (links) und Natriumsulfat (rechts).

In Abbildung 41 und Abbildung 42 werden im Folgenden die Ergebnisse für eine Vergleichskultivierung zweier Lactoselösungen mit Calciumzusatz veranschaulicht. Bedingt durch die schlechte Löslichkeit von Calciumsulfat wurde Calciumnitrat verwendet.

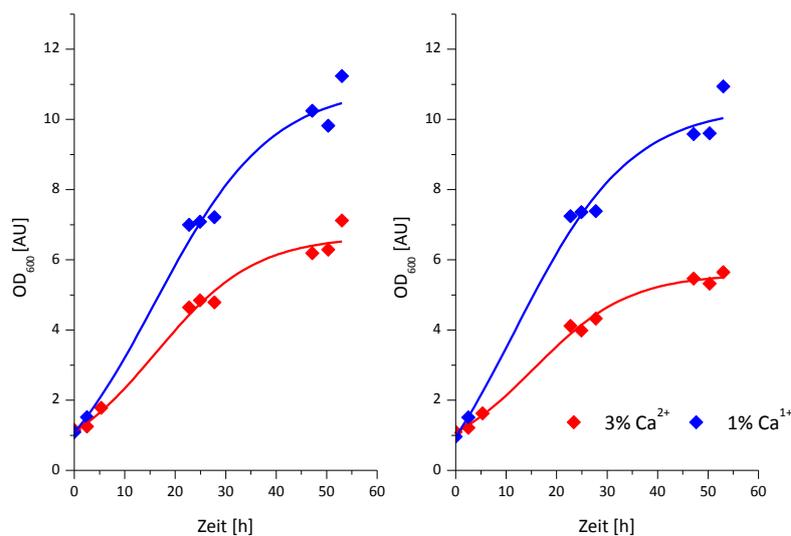


Abbildung 41: Entwicklung der OD_{600} im Verlauf der Kultivierung mit 15 g^{-1} Lactose mit unterschiedlichen Calciumkonzentrationen (1 % = blau 3 % = rot) auf. Eingesetzt wurden Calciumchlorid (links) und Calciumnitrat (rechts).

Experimenteller Teil

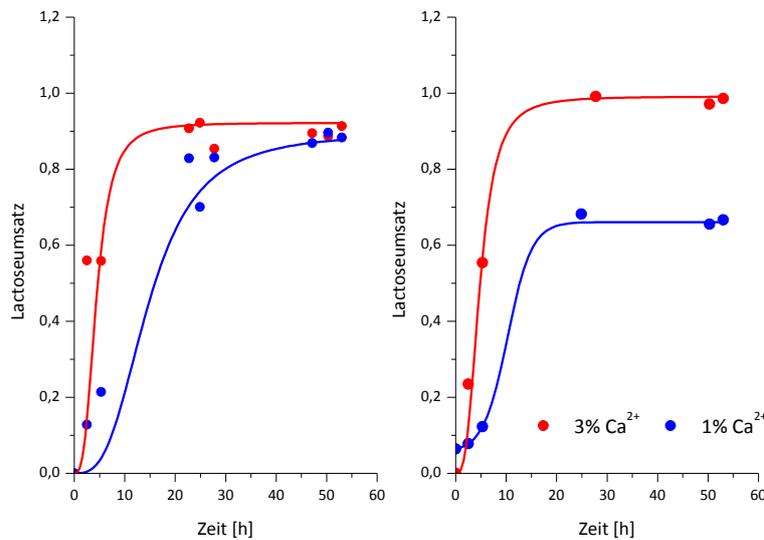


Abbildung 42: Einfluss verschiedener Calciumkonzentrationen (1 % = blau 3 % = rot) auf den Lactoseumsatz im Verlauf einer Kultivierung einer Lactoselösung ($15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). Eingesetzt wurden Calciumchlorid (links) und Calciumnitrat (rechts).

Bei der Verwendung von Calciumsalzen stellt sich ein differenziertes Bild dar. Bei der Biomassenentwicklung ist eine deutliche Hemmung durch Calciumchlorid und Calciumnitrat zu beobachten. Auf den Lactoseumsatz hingegen scheint Calciumchlorid keinen Einfluss zu haben, während Calciumnitrat den Abbau von Lactose zu beschleunigen scheint. Diese Beobachtung deckt sich mit der beobachteten proliferierenden Wirkung von Diammoniumhydrogenphosphat in Abschnitt 3.4.2. Bei niedrigen Konzentrationen scheint keinerlei Inhibierung mehr vorzuliegen.

3.6.2 Einfluss von Chlorid

Analog zu 3.6.1 wird im folgenden Abschnitt der Einfluss von Chlorid-Ionen, die in hoher Konzentration im TEM 30 zu finden sind, auf die Kultivierung der Hefe *K. marxianus* DSM 5422 untersucht.

Aufgrund der Tatsache, dass weitere Anionen in dem verwendeten Molkenkonzentrat nur in geringeren Mengen vorhanden sind, wurde diese im Rahmen dieser Untersuchung nicht weiter berücksichtigt [50].

Experimenteller Teil

Die eingewogenen Salze wurden anschließend einer Lactoselösung der Konzentration $15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ zugesetzt. Die Vorgehensweise erfolgte hierbei analog zu den Schüttelkolbenversuchen in 3.6.1 unter Variation des korrespondierenden Kations. Die Ergebnisse sind in Abbildung 43 und Abbildung 44 dargestellt.

Auch die Chloridkonzentration hat einen gewissen Einfluss auf das Ergebnis der Kultivierung. Hohe Konzentrationen scheinen sich entgegen den Erwartungen unabhängig vom Kation proliferierend auf die Kultivierung auszuwirken. Bei genauerer Betrachtung der Entwicklung der Biomassekonzentration fällt der ähnliche Verlauf bei der Kultivierung mit den unterschiedlichen eingesetzten Chloriden ins Auge, wobei die Hemmung beim Natrium etwas stärker zu sein scheint.

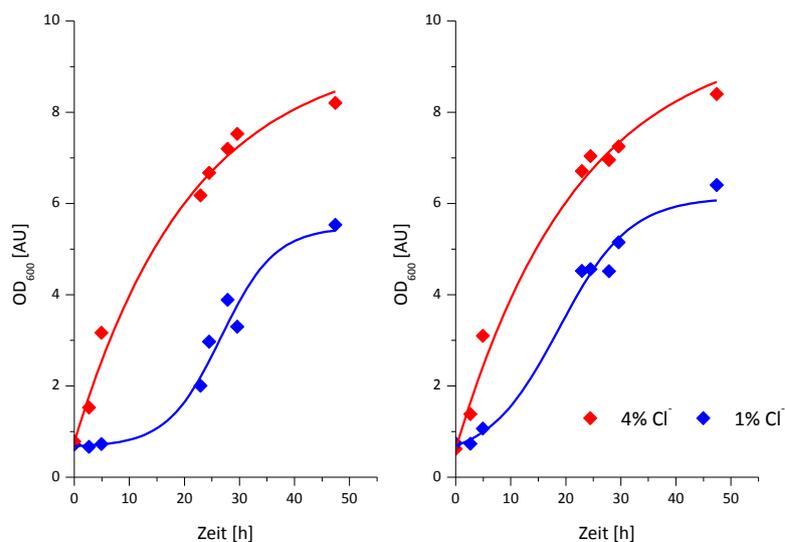


Abbildung 43: Entwicklung der OD_{600} im Verlauf der Kultivierung mit $15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Lactose mit unterschiedlichen Chloridkonzentrationen (1 % = blau 4 % = rot). Eingesetzt wurden Natriumchlorid (links) und Kaliumchlorid (rechts).

Beim Lactoseumsatz ist der Einfluss des Chlorids noch deutlicher. Wie Abbildung 44 zeigt, wirkt sich Chlorid äußerst positiv auf den Lactoseabbau aus. Bemerkenswert ist hierbei der anscheinende Einfluss des Kations. So ist der Umsatz bei der Verwendung von Kaliumchlorid deutlich höher als bei Natriumchlorid.

Experimenteller Teil

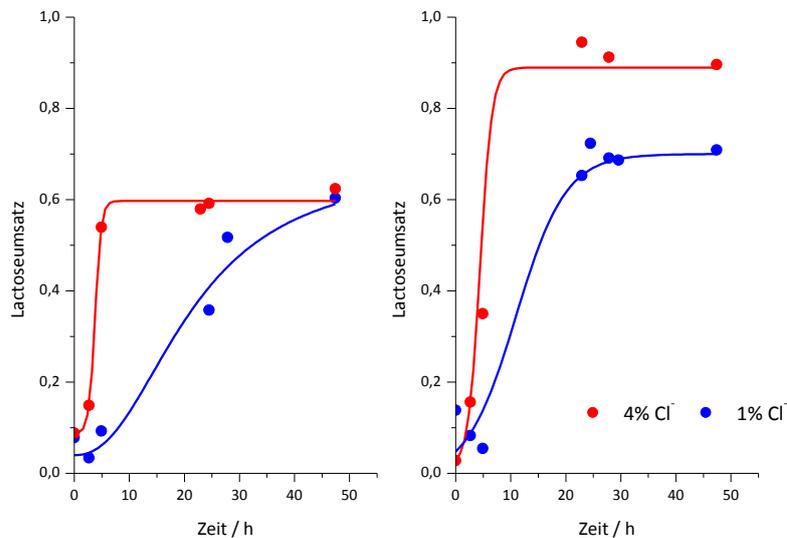


Abbildung 44: Einfluss verschiedener Chloridkonzentrationen (1 % = blau 4 % = rot) auf den Lactoseumsatz im Verlauf einer Kultivierung mit 15 g⁻¹ Lactose. Eingesetzt wurden Natriumchlorid (links) und Kaliumchlorid (rechts).

Es lässt sich feststellen, dass die untersuchten Salze in den eingesetzten Konzentrationen zum Teil einen positiven Einfluss, zum Teil aber auch einen negativen Einfluss auf die Entwicklung von *K. marxianus* DSM 5422 haben. Überraschend ist der positive Einfluss des Chlorids auf den Lactoseumsatz.

Die beobachtete Hemmung der Hefen durch TEM 30 ist vielmehr in der Gesamtkonzentration gelöster Salze begründet als in der inhibierenden Wirkung einzelner Anionen.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass es sinnvoll wäre, eine zumindest teilweise Demineralisierung des TEM 30 zu erreichen, um die Produktion von Biomasse und Ethanol in den jeweiligen Prozessen zu begünstigen.

Eine einfache Art der Demineralisierung stellt die Entfernung von Salzen durch Fällung dar. Die Fällung von Calciumphosphat und anschließende Kultivierung ist Gegenstand des folgenden Abschnitts.

Experimenteller Teil

3.6.3 Selektive Fällung von Calciumphosphat

Es ist bekannt, dass sich eine Fällung von Calciumphosphat während der Verarbeitung von Molke zu den Folgeprodukten positiv auswirkt [32]. Die Fällung ist vergleichsweise einfach, da das Calciumphosphat durch eine Veränderung des pH-Wertes und nicht durch Zugabe eines Fällungsreagenz gefällt wird. Obgleich dieser Verfahrensschritt recht einfach ist und Vorteile mit sich bringt, wird er nicht bei allen Betrieben angewandt, welche Molke verarbeiten. Das ist bei dem in dieser Arbeit verwendeten TEM 30 der Fall. Daher soll der Effekt der Entfernung von Calciumphosphat aus diesem Rohstoff gezielt untersucht werden.

Zur Ausfällung des Calciumphosphats aus dem TEM 30 wurde der pH-Wert mit konzentrierter Natronlauge auf pH 10 angehoben und die Lösung bei 30°C für 16 h inkubiert. Anschließend wurde der Feststoff durch Zentrifugation bei $3.300 \cdot g$ abgetrennt (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau) und der klare Überstand dekantiert. Mit konzentrierter Salzsäure wurde abschließend der pH-Wert wieder auf den Ursprungswert von pH 5,6 eingestellt. Die Ergebnisse der Untersuchungen (siehe Anhang 6.9) sind in Abbildung 45 und Abbildung 46 dargestellt.

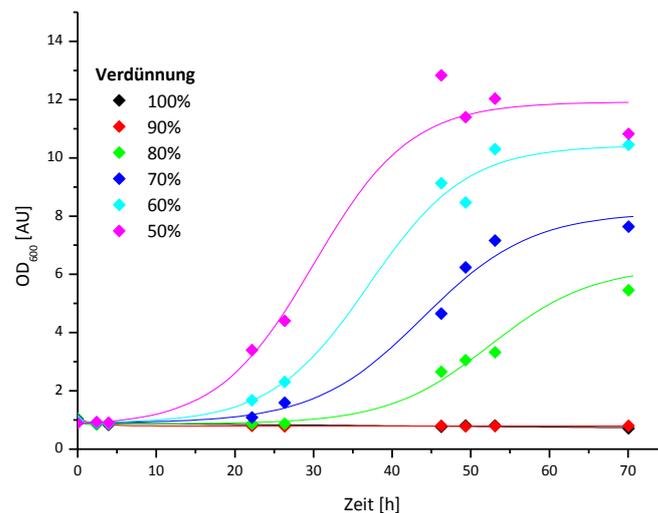


Abbildung 45: Zeitliche Entwicklung der optischen Dichte im Verlauf einer Vergleichsfermentation von phosphatreduziertem Molkenkonzentrat (30°C, 60 min⁻¹, anaerob) [44]

Experimenteller Teil

Die Darstellung in Abbildung 45 lässt erkennen, dass nach Durchführung einer Calciumphosphatfällung die verbliebene Salzfracht weiterhin einen starken Einfluss auf das Wachstum der Hefe aufweist.

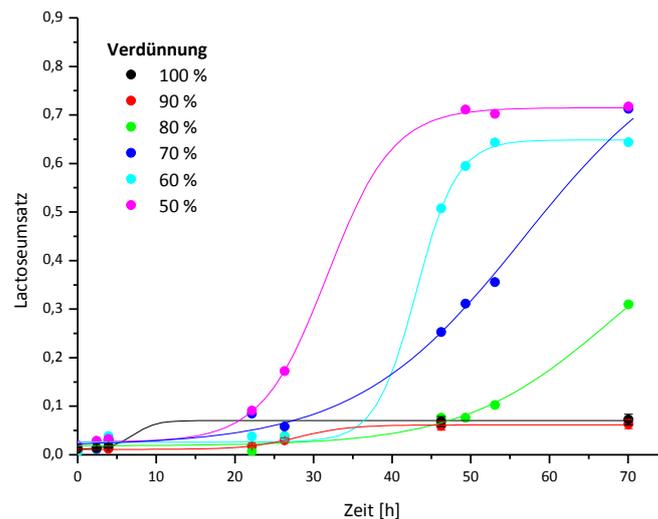


Abbildung 46: Zeitlicher Verlauf des Lactoseumsatzes während einer Vergleichsfermentation von phosphatreduziertem Molkenkonzentrat (30°C, 60 min⁻¹, anaerob) [44]

Ein ähnliches Bild zeigt die Entwicklung des Lactoseumsatzes in Abbildung 46. Zum Einen ist der Umsatz der Lactose von unverdünntem TEM 30 auch bei gefällttem Calciumphosphat sehr schlecht bzw. kaum messbar.

Auf der anderen Seite findet selbst bei Verdünnung des calciumreduzierten TEM 30 zwar Lactoseumsatz statt, jedoch ist dieser nicht vollständig. Durch die damit verbundene Reduzierung der Ausbeute sinkt auch die Rentabilität des Prozesses.

3.6.4 Einfluss der Salzfracht bei hoher Lactosekonzentration

In diesem Abschnitt sollen die Erkenntnisse aus dem vorherigen Abschnitt vertieft werden, und der Einfluss der Konzentration gelöster, anorganischer Salze in Anwesenheit großer Mengen gelöster Lactose untersucht werden. Da kein einzelnes Salz als bestimmender Inhibitor erkannt wurde, erschienen weitere Versuche mit Komplexmedien mit definierten Salzgehalten als nicht sinnvoll.

Experimenteller Teil

Aus diesem Grund, wurde statt einer künstlichen Kultivierungslösung das Molkenkonzentrat TEM 30 verwendet. Um den Salzeffekt zu ergründen, wurde das TEM 30 mit konzentrierter Lactoselösung (ca. 200 g·l⁻¹) von 0 – 100 % (v/v) verdünnt. Die Versuche erfolgten daher unter der Annahme konstanter Lactosekonzentration bei variierenden Salzgehalten. Das Verdünnungsschema ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Verdünnungsschema für Schüttelkolbenkultivierung [44]

Kultur:	1	2	3	4	5	6
Salzkonzentration						
TEM 30 [ml]	200	150	100	60	20	0
Lactoselösung [ml]	0	50	100	140	180	200

Der Einfluss der verschiedenen Salzkonzentrationen auf die Hefe ist durch die Biomasse, Ethanol- und Lactosekonzentration nach 75,5 h Fermentationszeit in Tabelle 9 gezeigt. Die Daten zeigen, dass die Salzkonzentration der Medien das Wachstum der Hefen deutlich beeinflusst.

Tabelle 9: Biomassenproduktion, Ethanol- und Lactosegehalt der TEM 30-Lactose-Verdünnungen bei 30 °C nach 75,5 h [44]

Kultur	1	2	3	4	5	6
Salzkonzentration						
Biomasse OD₆₀₀ [AU]	2,1	3,7	8,6	12,5	13,5	5,1
Ethanol [g/l]	2,0	7,9	39,0	58,2	65,5	18,2
Lactose [g/l]	129,1	105,8	74,7	44,0	25,2	89,4

Kultur 1, bei der reines TEM 30 als Medium verwendet wurde, weist keinen nennenswerten Anstieg der optischen Dichte und damit der Biomasse auf. Der Grund hierfür ist die hohe Salzbelastung im TEM 30, welche das Hefewachstum inhibiert. Bei den Kulturen 2 – 5, bei denen die Salzkonzentration durch Verdünnung mit Lactoselösungen reduziert wurde, ist festzustellen, dass das Wachstum der Hefe mit sinkendem Salzgehalt ansteigt.

Experimenteller Teil

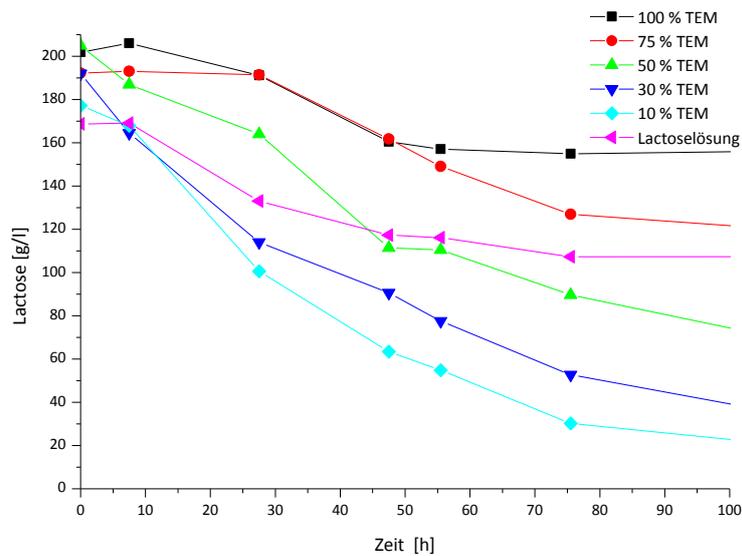


Abbildung 47: Vergleich der unterschiedlich verdünnten TEM 30-Fermentationen (anaerob, 30°C, 80 min⁻¹)

Wie unter anderem aus Abbildung 47 zu entnehmen, zeigt die Fermentation mit der niedrigsten Salzkonzentration (Kultur 5, 10 % TEM 30) das stärkste Wachstum. Bei der Verwendung von reiner Lactoselösung mit einer Konzentration von ca. 200 g·l⁻¹ als Medium (Kultur 6) war im Vergleich der Kulturen 2-5 ein deutlich vermindertes Hefewachstum festzustellen. Hier zeigt sich, dass ein gewisser Salzgehalt als Nährstoff und zur Aufrechterhaltung der Zellfunktionen benötigt wird.

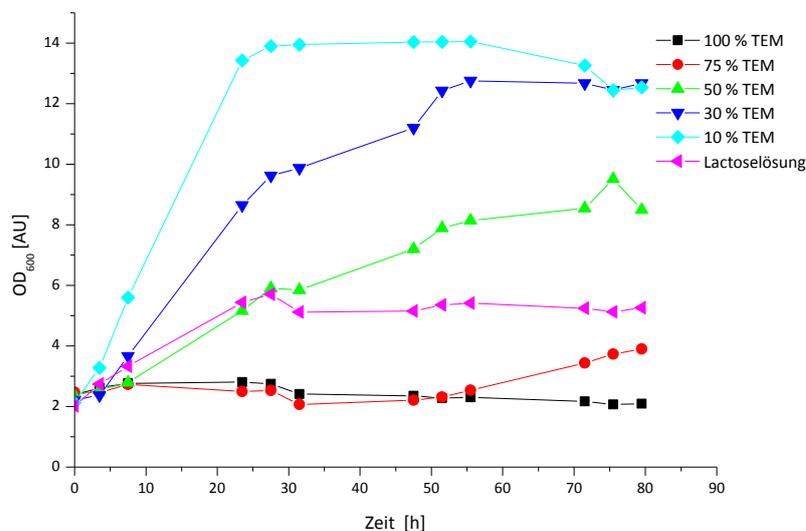


Abbildung 48: Vergleich der Entwicklung der OD₆₀₀ bei unterschiedlichen Verdünnungen (anaerob, 30°C, 80 min⁻¹)

Experimenteller Teil

Wie in Abbildung 48 gezeigt, ist auch die Entwicklung der Biomassekonzentration in den verschiedenen Fermentationen unterschiedlich. Die Unterschiede folgen aber dem gleichen Muster, wie die Unterschiede bei der Lactoseumsetzung. So steigt die Bildungsgeschwindigkeit der Biomasse mit abnehmender Salzkonzentration und ist am größten bei der Fermentation 5 mit 10 % TEM 30. Hier zeigt sich, dass eine Biomassenentwicklung in Abwesenheit von Salzen und Nährstoffen nur bedingt möglich ist.

Analog zur Biomasse ist bei der Ethanolproduktion (siehe Abbildung 49) festzustellen, dass die Ethanolkonzentration mit sinkendem Salzgehalt im Medium ansteigt. Fermentation 5 wies nach 75,5 h eine Ethanolkonzentration von $65,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ auf. Da diese Ethanolkonzentration, wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben inhibierend wirkt, war von keinem weiteren Anstieg der Biomasse auszugehen. Dies konnte durch eine Analyse der Proben nach 167,5 h Fermentationszeit bestätigt werden. Die Ethanolkonzentration stieg zwar auf $79,7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ an, weitere Biomasse wurde aber nicht gebildet. Die größte Ethanolausbeute erzielt man folglich bei einer Fermentation von Melasse mit geringem Salzgehalt. Die Unterschiede bei der Ethanolproduktion sind in Abbildung 49 dargestellt.

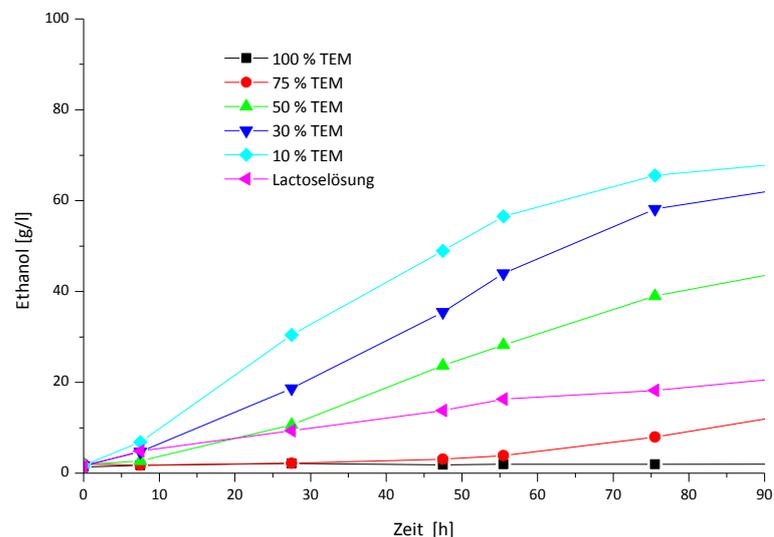


Abbildung 49: Entwicklung des Ethanolgehaltes bei der Vergärung von unterschiedlich verdünntem TEM 30 (anaerob, 30°C , 80 min^{-1})

Experimenteller Teil

Bei allen Kulturen wurde beobachtet, dass Lactose umgesetzt wurde und der Gehalt am Ende der Gärung deutlich unter den Werten der Anfangskonzentrationen lag (siehe auch Abbildung 47). Es sind allerdings deutliche Unterschiede bei der Lactoseverwertung zu verzeichnen. Wie in Tabelle 10 dargestellt ist, wurde bei purem TEM 30 als Medium (Fermentation 1) nach 75,5 h Gärung lediglich 23,3 % Lactose umgesetzt. Auch die Fermentation mit reiner Lactoselösung erzielte keine gute Lactoseverwertung (36,4 %). Bemerkenswert hierbei ist aber die relative Ethanolausbeute. Die Tatsache, dass nahezu die gesamte verbrauchte Lactose auch zu Ethanol umgesetzt wurde, untermauert die Beobachtung der schwachen Biomassenentwicklung. In Abwesenheit von Nährstoffen scheint die Hefe nur noch den Energiestoffwechsel zu betreiben und keine Reproduktion findet mehr statt. Bei den Fermentationen 2-5, bei denen ein verminderter Salzgehalt vorlag, konnte die Lactose am besten umgesetzt werden. Auch hier zeigte die Fermentation mit der niedrigsten Salzfracht (Fermentation 5, 10 % TEM 30) die beste Umsetzung von Lactose. Nach 75,5 h Fermentationszeit wurden fast 83 % Lactose umgesetzt. Nach 167,5 h wurden bei den Kulturen 4 und 5 sogar nahezu 99 % Lactose verstoffwechselt. In Gegenwart einer höheren Salzkonzentration konnte die Lactose auch nach 167,5 h nicht vollständig umgesetzt werden. Dies führte letztendlich zu einer geringeren Ethanolausbeute.

Tabelle 10: Lactoseumsatz und Ethanolausbeute bei der Vergärung von unterschiedlich verdünntem TEM 30

	1	2	3	4	5	6
Lactoseumsatz nach 75,5 h	0,23	0,66	0,56	0,72	0,83	0,36
Lactoseumsatz nach 167,5 h	0,21	0,56	0,84	0,99	0,99	0,36
Ethanolausbeute [%]	9,2	72,4	72,8	80,3	84,7	99,8

Die Versuche zeigten, dass eine Umsetzung von reinem TEM 30 zu Ethanol mit den momentan vorhandenen und bekannten Hefen nicht möglich ist. Eine vollständige bzw. teilweise Demineralisierung des Rohstoffs ist daher zwingend notwendig.

Experimenteller Teil

3.7 Demineralisierung von Molkeprodukten

In diesem Abschnitt wird zunächst der Effekt einer Demineralisierung durch Nanofiltration von TEM 30 auf die Ethanolproduktion untersucht. Eine Untersuchung der Auswirkung auf die Biomassenproduktion durch aerobe Kultivierung wurde als nicht sinnvoll erachtet, da hier ohnehin starke Verdünnungen verwendet werden, die eine Entsalzung prinzipiell überflüssig machen. In einem folgenden Abschnitt sollen im Anschluss die Verfahren unter ökonomischen Gesichtspunkten beurteilt werden.

3.7.1 Anlage zur Nanofiltration

Die Nanofiltration des verwendeten TEM 30 wurde mit einer Labcell CF-1 Anlage (Koch Membrane Systems, Aachen) durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Anlage zur Prüfung verschiedener Membranmaterialien im Labormaßstab.



Abbildung 50: Laboratory Cell CF-1 [59]

Die gewünschten Membranen sind als ungeschnittene Bulk-Ware erhältlich und können, den Anforderungen entsprechend, zugeschnitten werden. Es wurden zwei Membrantypen von der Fa. Koch verwendet, welche bereits erfolgreich in der Molkereiwirtschaft zur Nanofiltration von UF-Permeat eingesetzt werden:

Experimenteller Teil

Tabelle 11: Verwendete Membrantypen

Membrantyp	Material	MWCO [Da]	Lactoserückhalt [%]	Literatur
KMS SR [®] 2	TFC [®] Polyamid	400	> 95	[57]
KMS SR [®] 3	TFC [®] Polyamid	200	99,9	[58]

Wie die geringen Ausschlussgrenzen von weit unter 1 kDa schon vermuten lassen, sind sehr hohe Transmembrandrücke von bis zu 4 MPa zur Filtration erforderlich. Dieses wird zum einen durch eine leistungsfähige Kolbenpumpe in der Anlage, zum anderen durch eine Kopfdruckbegasung mit technischem Stickstoff erreicht (*Linde*, Hannover). Die Permeationsrate mit reinem Wasser wurde zu 13,2 ml·min⁻¹ (KMS SR[®] 2) und 8,0 ml·min⁻¹ (KMS SR[®] 3) bestimmt

3.7.2 Nanofiltration von TEM 30

Um den Demineralisierungseffekt durch Nanofiltration zu evaluieren, wurde eine Charge TEM 30 zuerst zentrifugiert, um sämtliche Feststoffe aus der Suspension zu entfernen, da diese zum einen zur Verblockung der NF-Membran führen können und zum anderen die Pumpe in der verwendeten Laboranlage beschädigen können.

Die Nanofiltration kann für diesen Prozess in zwei Betriebsweisen sinnvoll eingesetzt werden

- **Crossflow-Filtration:** Durch diese Betriebsweise lässt sich mit den verwendeten Membranen theoretisch die Lactosekonzentration erhöhen, wobei die Konzentration einiger Salze, die die Membran permeieren können, gleich bleibt. Durch eine erhöhte Lactosekonzentration ließe sich die absolute Ethanolausbeute und damit die Wirtschaftlichkeit nachgeschalteter Destillationsprozesse und damit auch des gesamten Prozesses steigern

Experimenteller Teil

- **Crossflow-Diafiltration:** Bei dieser Methode wird das TEM 30 zunächst mit VE-Wasser verdünnt und anschließend wieder auf das ursprüngliche Volumen durch Nanofiltration eingengt. Dabei bleibt die Lactosekonzentration konstant, die Salzkonzentration sinkt dagegen und macht u.U. eine direkte Umsetzung des TEM 30 ohne weitere Verdünnung möglich.

Aufgrund der dickflüssigen Konsistenz des TEM 30 war eine direkte Filtration nicht möglich. Es gelang mit der verwendeten Laboranlage nicht, einen kontinuierlichen Permeatstrom zu erzeugen. Eine Erhöhung des Kopfraumdrucks könnte dieses Problem möglicherweise beheben, allerdings steht der technische Aufwand dann in keinem Verhältnis mehr zum erzielten Effekt.

Die Diafiltration des vorher 1:1 verdünnten TEM 30 war dagegen erfolgreich. Hierfür wurden 200 ml TEM 30 mit 200 ml VE-Wasser verdünnt und anschließend mittels der Nanofiltrationsanlage wieder auf das ursprüngliche Volumen aufkonzentriert. Für die Filtration wurden die KMS SR[®] 2 (400 Da) und die KMS SR[®] 3 (200 Da) bei einem Druck von 30 bar eingesetzt.

Die Filtration an sich war mit einer Dauer von 3 – 5 h allerdings sehr zeitaufwändig, da bei einem Gesamtvolumen von 400 ml lediglich ein Fluss von $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ erreicht werden konnte. Eine Steigerung wäre durch Erhöhung des Druckes in der Anlage möglich gewesen, allerdings wäre dann der zulässige Gesamtdruck überschritten worden. Das so gewonnene Permeat wurde anschließend mit der verwendeten Hefe angeimpft (siehe auch Anhang 6.9). Es wurden die Permeate durch 2 verschiedene Membranen verwendet und mit einem Kontrollansatz aus 100 % TEM 30 verglichen (siehe auch Anhang 6.9). Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 und Abbildung 52 dargestellt:

Experimenteller Teil

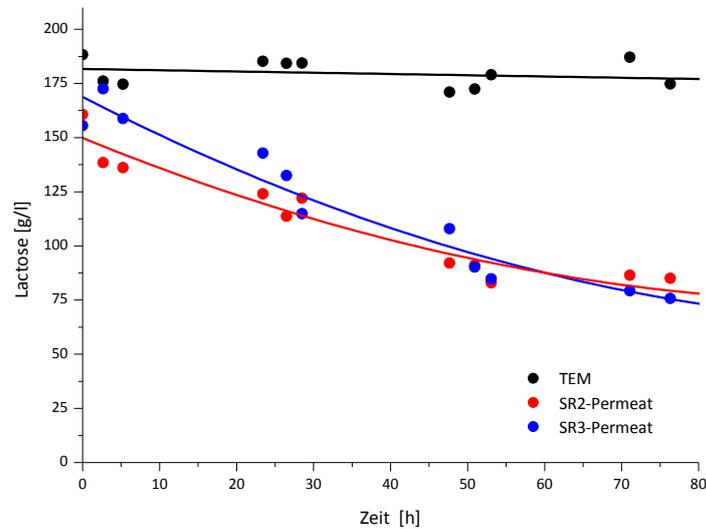


Abbildung 51: Vergleichsfermentation von zwei verschiedenen TEM 30-Permeaten mit reinem TEM 30 (200 ml, 30°C, 80 min⁻¹)

Der positive Effekt der Demineralisierung durch Nanofiltration wird in Abbildung 51 deutlich. Während der Lactosegehalt des unbehandelten TEM 30 nahezu konstant bleibt, findet in den Ansätzen mit nanofiltriertem TEM 30 ein deutlicher Lactoseabbau statt. Seltsamerweise ist die Lactosekonzentration in den Permeaten, insbesondere im SR2-Permeat, deutlich geringer, als im verwendeten TEM 30. Daraus lässt sich schließen, dass dieses Membranmaterial für diese Anwendung nur bedingt geeignet ist, da die Durchlässigkeit für Lactose deutlich über den Herstellerangaben von 5 % liegt. Außerdem ist hier bemerkenswert, dass bei beiden Permeaten kein vollständiger Abbau der Lactose stattfand. Die Ansätze wurden insgesamt über 150 h inkubiert, aber nach 80 h fand in keinem Ansatz noch ein weiterer Abbau von Lactose statt. Es ist wahrscheinlich, dass sich an diesem Punkt bereits die in Abschnitt 3.4.4 gezeigte Hemmung der Hefe durch gebildetes Ethanol auswirkt.

Die Entwicklung des Ethanolgehaltes in den Ansätzen wird in Abbildung 52 dargestellt:

Experimenteller Teil

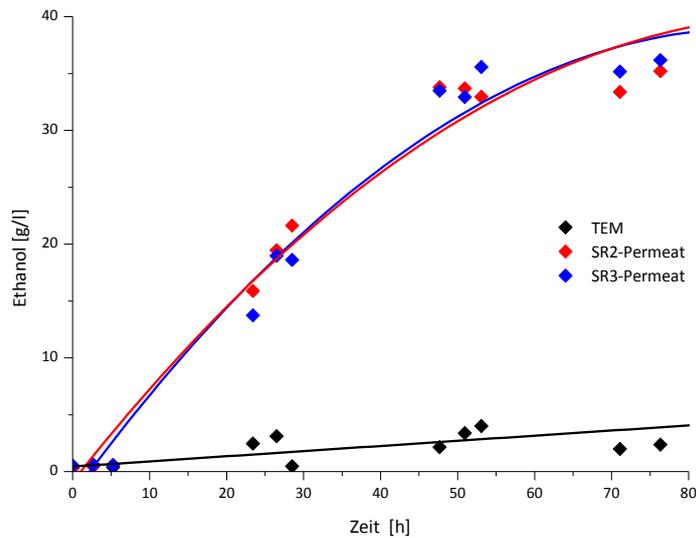


Abbildung 52: Entwicklung der Ethanolgehalte in verschiedenen TEM 30-Permeaten und reinem TEM 30 (200 ml, 30°C, 80 min⁻¹)

Auch die Entwicklung der Ethanolgehalte zeigt das erwartete Verhalten. Während der Ethanolgehalt in reinem TEM 30 nicht oder nur sehr gering ansteigt, wird in den Permeaten deutlich mehr Lactose zu Ethanol umgesetzt, bis es zur beobachteten Hemmung kommt.

Die Nanofiltration an sich scheint durchaus für die Demineralisierung von TEM 30 geeignet zu sein. Dabei gilt es aber zunächst, die Ursache für den bislang ungeklärten Lactoseverlust zu finden und zu beheben. Eine Ursache dafür könnten Verblockungen (Fouling) der Membran sein, an denen Lactose gebunden und somit aus der Lösung entfernt wird. Eine andere Möglichkeit wäre der sehr hohe Transmembrandruck, der mit 4 MPa im Bereich des zulässigen Betriebsüberdruckes der Membranen liegt. Durch mechanische Beschädigungen durch den hohen Druck können evtl. Kanäle in den Membranen gebildet werden, die dann Lactose permeieren lassen könnten.

Des Weiteren bleibt zu prüfen, ob der Einsatz der Nanofiltration an dieser Stelle, d.h. zur Demineralisierung von TEM 30, im Prozess sinnvoll ist oder ob die Nanofiltration ein vorhergehenden, bereits bestehenden Prozessschritt ersetzt und somit die Entsalzung als

Experimenteller Teil

zusätzlichen Effekt in den Prozess einbringt, der am Ende einen Stoffstrom hervorbringt, welcher sich dann einfach mit *K. marxianus* DSM 5422 zu Ethanol verarbeiten lässt.

Diese Möglichkeit bietet den Einsatz der Nanofiltration zur Konzentrierung des Permeats nach der Ultrafiltration zur Abtrennung der Molkenproteine. Das Molkenpermeat ist an dieser Stelle im Prozess klar und frei von Störstoffen, die eine Nanofiltration erschweren. Aktuell werden in diesem Prozessschritt noch Verdampfer eingesetzt, um das Wasser zu entfernen. Man erreicht dadurch eine Konzentrierung der Lactose zur Kristallisation, allerdings werden dadurch auch alle Salze aufkonzentriert und mit durch den Prozess geführt.

3.7.3 Beurteilung der Entsalzungstechnologien unter ökonomischen Aspekten bei der Ethanolproduktion

Wie bereits in Abschnitt 2.3 erläutert, gibt es einige Entsalzungstechnologien, wobei sich aber nur wenige zur Demineralisierung von Molke bzw. deproteinierter Molke sowie von Folgeprodukten eignen.

Außerdem ist es essentiell, die benannten Verfahren auch unter wirtschaftlichen Aspekten zu betrachten, um eine Anwendung des Verfahrens in einer großtechnischen Anlage zu beurteilen. Dabei stellen Parameter wie Rohstoffkosten, Betriebskosten, Investition- und Kapitalkosten wichtige Faktoren da. Die Rentabilität einer Anlage kann durch Gegenüberstellung der oben genannten Kosten und der Umsatzerlöse der Produkte abgeschätzt werden.

3.7.4 Druckgetriebene Membranverfahren

Die Nanofiltration ist das geeignetste druckgetriebene Membranverfahren zur Entsalzung von Molke und Molkenderivaten. In wirtschaftlicher Hinsicht hat die Anwendung der NF zwei bedeutende Vorteile. Molke kann durch die NF konzentriert und zeitgleich demineralisiert werden. Dies führt zu einer beachtlichen Reduzierung der Kosten für die Abwasserbeseitigung, die Energie und den allgemeinen Betrieb [21].

Experimenteller Teil

Wird Molke durch eine NF-Anlage anstelle einer RO-Anlage aufkonzentriert, so hat dieses den Vorteil, dass das Molkenkonzentrat bereits teildemineralisiert vorliegt. So ist es möglich, aus diesem Molkenkonzentrat teilsalzte Molkenproteine zu produzieren, die aufgrund ihres reduzierten Mineralstoffgehalts einen größeren Absatzmarkt in der Babynahrungs- und Futtermittelindustrie haben. Daher wurden bereits einige RO- und Verdampfer-Anlagen durch NF-Anlagen ersetzt [28][39].

In Bezug auf die Ethanolgewinnung stellt die Demineralisierung von Molke eine Verbesserung des gesamten Vergärungsprozesses dar, da die in den vorherigen Abschnitten beobachteten Hemmungen vermindert werden würden.

Viele Molke verarbeitende Betriebe gewinnen aus dem deproteinierten Molkenkonzentrat (UF-Permeat) den Wertstoff Lactose. Auch hier stellt der Einsatz einer NF-Anlage zur Aufkonzentrierung wirtschaftlich bedeutende Vorteile dar. Salzbestandteile der Molke, welche eine Lactosekristallisation stören, können durch den Einsatz einer NF-Anlage reduziert werden. Außerdem ist die NF-Technologie für die Erhöhung der Lactosekonzentration im UF-Permeat von ca. 5,5 (m/v) auf 22 % (m/v) wirtschaftlicher und ermöglicht gleichzeitig eine gezielte Demineralisierung der Endprodukte [43]. Da sich die Lactose erst ab einer Konzentration von 27 % quantitativ kristallisieren lässt, muss die Lösung durch Verdampfung weiter konzentriert werden [28]. Eine NF-Anlage kann die Verdampferanlage daher nicht vollständig ersetzen und muss zusätzlich betrieben werden. Durch die Demineralisierung kann die Lactoseausbeute jedoch um ca. 10 % gesteigert werden. Dabei wird das UF-Permeat um den Faktor 3–4 aufkonzentriert, wobei ein Entsalzungsgrad des NF-Retentats bis zu 35 % erreicht werden kann. Die Wirtschaftlichkeit des Produktes steigt somit insgesamt um ca. 25 % an [54][55].

Um den Salzgehalt des verwendeten TEM 30 um mehr als 35 % zu reduzieren kann dem Feed kontinuierlich VE-Wasser zugegeben werden. Bei einer sukzessiven Diafiltration mit dem 4-fachen Volumen an Wasser kann durch die NF eine Demineralisierung von über 60 % erreicht werden. Durch das dadurch vergrößerte Volumen benötigt diese Prozessführung eine längere Anlagenszeit bzw. eine größere Membranfläche. Diese Parameter werden jedoch durch die Betriebskosten begrenzt. Durch eine NF-Anlage kann TEM 30 mit geringer

Experimenteller Teil

Salzfracht erzeugt werden, die letztendlich aufgrund des reduzierten Mineralstoffgehaltes effizienter zu Ethanol vergoren werden kann [56].

Für Betriebe der Milchindustrie, die aus deproteiniertem Molkenkonzentrat Lactose gewinnen, ist die zusätzliche Anschaffung einer Nanofiltrationsanlage unter der Annahme einer Anlagenleistung von $50.400 \text{ t} \cdot \text{a}^{-1}$ UF-Permeat im Vergleich zu einer reinen Verdampferanlage rentabel [43]. Eine Übersicht der Kostenkalkulation wird in Tabelle 12 aufgeführt.

Das aus der NF verbleibende Permeat enthält ungefähr 0,3–0,5 % des Feststoffes, die mittels RO in reines Wasser und Salzkonzentrat umgesetzt werden können. Die Salze könnten zusätzlich als Ergänzung für Sport- und Wellnessgetränke vermarktet werden [3]. Das Rückhaltevermögen für Lactose wird von einem Hersteller von Membranmaterialien auf über 95 % beziffert [57][58].

Tabelle 12: Vergleich der Rohstoff- und Betriebskosten von NF, TBV- und MBV-Verdampfung für eine Demineralisierung des UF-Permeats von bis zu 35 % [43]

Parameter	Geschätzte Rohstoff- und Betriebskosten [€/1.000 kg UF-Permeat]		
	Nanofiltration	Verdampfung	Verdampfung
	Industrieller Betrieb	Fallstromverdampfer TBV mehrstufig	Fallstromverdampfer MBV einstufig
Rohstoff (UF-Permeat)	0	0	0
Reinigungswasser	0,05–0,09	0,03–0,04	0,02–0,03
Ersatzteile/Verbrauchsmaterial	0,23–0,33	0,08–0,27	0,05–0,18
elektrisch Energieverbrauch	0,11–0,21	0,10–0,19	0,60–1,20
thermisch Energieverbrauch	0,03–0,04	2,54–2,86	0,37–0,42
Reinigungsmittel	0,01–0,03	ca. 0,05	0,03–0,04
Arbeit (Bedienung und Reinigung)	0,33–0,66	0,30–0,40	0,21–0,27
Wartungsarbeit	ca. 0,05	ca. 0,03	ca. 0,02
Abwassergebühren	0,55–1,17	0,12–0,17	0,09–0,11
Platzbedarf	0,03–0,17	0,24–0,85	0,24–0,85
Total Rohstoff- und Betriebskosten	1,40–2,75	3,47–4,86	1,63–3,13

Experimenteller Teil

3.7.5 Kombinationen aus Elektrodialyse und Ionenaustauscher sowie Elektrodeionisation

In Abschnitt 2.3.2 wurde bereits erwähnt, dass sich das Elektrodialyse- und Ionenaustauscher-Verfahren ebenfalls für die Entsalzung von Molke eignet. Insbesondere eine Kombination dieser beiden Technologien ist von ökonomischer Bedeutung.

Durch eine Elektrodialyse kann eine Demineralisierung der Molke von etwa 50–60 % realisiert werden. Aus Gründen der Produktivität ist es jedoch vorteilhafter, dieses Verfahren mit einem Ionenaustausch zu kombinieren. Durch mehrstufigen Ionenaustausch mit nacheinander folgendem stark kationischem und schwach kationischem Harz kann eine endgültige Entmineralisierung von bis zu 95 % erfolgen [57].

Nachteilig wirkt sich der hohe Bedarf an chemischen Regenerationsmitteln und Wasser für den Ionenaustausch aus. Ebenfalls muss beachtet werden, dass die Elektrodialyse über einem Entsalzungsgrad von über 60 % nicht mehr wirtschaftlich ist, da das Verfahren viel elektrische Energie erfordert. Pro Kilogramm demineralisiertem Molkenpulver werden 10–28 kWh verbraucht [61].

Beim Vergleich des Verfahrens mit dem EDI-Verfahren, zeigen sich einige ökonomische Vorteile seitens der EDI. Durch das Kombinieren der zwei Technologien in einem Modul wird wesentlich weniger Energie und Wasser verbraucht. Außerdem werden keine Chemikalien für die Regeneration der Harze benötigt. Somit kann letztendlich auch der Kostenanteil des Verfahrens, insbesondere die laufenden Betriebskosten, drastisch reduziert werden. Die EDI-Technologie zur Entsalzung von Molke und Molkenderivaten wurde bereits 1997 von der Firma Nestlé S. A. beim Patentamt eingereicht [62][63].

3.7.6 Wirtschaftlichkeit der Produkte aus deproteiniertem Molkenkonzentrat

Von großer Bedeutung ist es, auch die Wirtschaftlichkeit der Produkte abzuschätzen, die aus deproteiniertem Molkenkonzentrat hergestellt werden können. Zum einen ist es möglich aus der gesamten aufkonzentrierten Molke Ethanol herzustellen. Dabei könnten aus 100 kg Trockenmasse deproteiniertes Molke ca. 54 kg Ethanol hergestellt werden. Dies entspricht einem Marktwert von ca. 32 €. Eine höhere Wertschöpfung lässt sich jedoch erzielen, wenn aus deproteiniertem Molkenkonzentrat Lactose gewonnen wird. Aus 100 kg Trockenmasse könnten ca. 58 kg Lactosepulver hergestellt werden, das einem aktuellen Marktwert von

Experimenteller Teil

etwa 40 € entspricht. Da nicht die gesamte Lactose aus dem deproteinierten Molkenkonzentrat gewonnen werden kann, bleibt teilentzuckertes Molkenkonzentrat zurück, das immer noch einen hohen Lactosegehalt aufweist. Die höchste Wertschöpfung kann daher erzielt werden, wenn TEM 30 zu Ethanol umgesetzt wird. Zusätzlich zu den 58 kg Lactosepulver könnten so weitere 17 l Ethanol gewonnen werden. Insgesamt entspricht dies einem Marktwert von 50 € [32]. Die Bilanzierung ist grafisch in Abbildung 53 dargestellt:

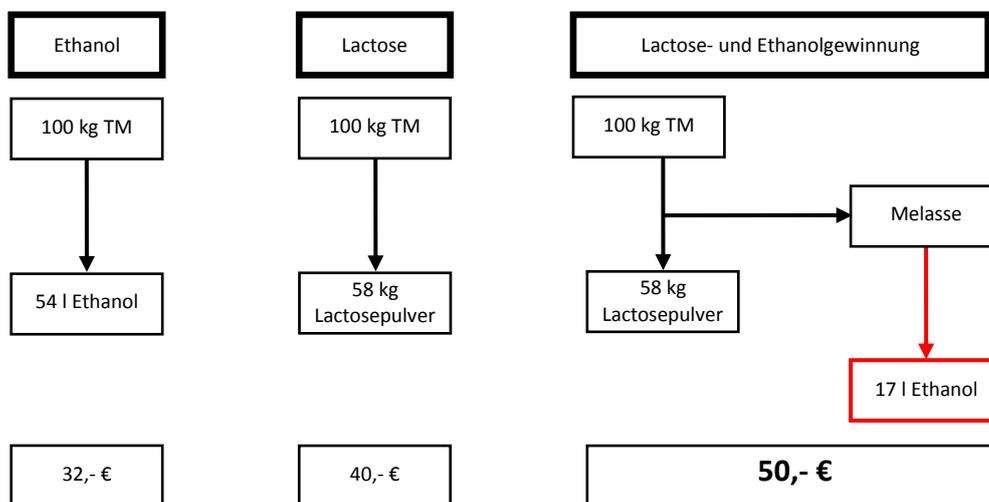


Abbildung 53: Möglichkeiten der Wertschöpfung aus deproteiniertem Molkenkonzentrat [32].

Das aus der NF verbleibende Permeat enthält ungefähr 0,3–0,5 % des Feststoffes, die mittels RO in reines Wasser und Salzkonzentrat umgesetzt werden können. Die Salze könnten zusätzlich als Ergänzung für Sport- und Wellnessgetränke vermarktet werden [3]. Das Rückhaltevermögen für Lactose wird von einem Hersteller von Membranmaterialien zu über 95 % beziffert [57][58].

3.7.7 Einsatz von NF-Anlagen für molkeverarbeitende Betriebe

Membrantrennverfahren werden seit über 25 Jahren vor allem in der Lebensmittel- und Getränkeindustrie angewendet und haben sich aufgrund der relativ niedrigen Betriebskosten und hervorragenden Produktausbeuten behauptet.

Experimenteller Teil

Die NF stellt als hochselektives Trennverfahren ein großes neuartiges Forschungsgebiet dar, dessen Einsatzmöglichkeiten weit über die Milchverarbeitung reichen und so auch in anderen Sektoren der Lebensmittelbranche und darüber hinaus Anwendung finden. Membrantrennverfahren haben immer noch ein hohes Entwicklungspotential. Durch die ständige Entwicklung neuer und innovativer Verfahren wird dem großen Absatzmarkt entgegengewirkt. Dennoch hat sich die NF bisher in der milch- und molkeverarbeitenden Industrie noch nicht vollständig etabliert. Allerdings weist eine Vielzahl von Patentanmeldungen die sich mit der NF und im speziellen mit NF-Anlagen zur Demineralisierung und Aufkonzentrierung von Molke beschäftigen, auf das große Potential für neue wettbewerbsfähige Verfahrenswege hin. Eine mögliche Prozessführung zur Gewinnung von Lactose und Ethanol aus Molke mittels NF-Anlage ist in Abbildung 54 dargestellt.

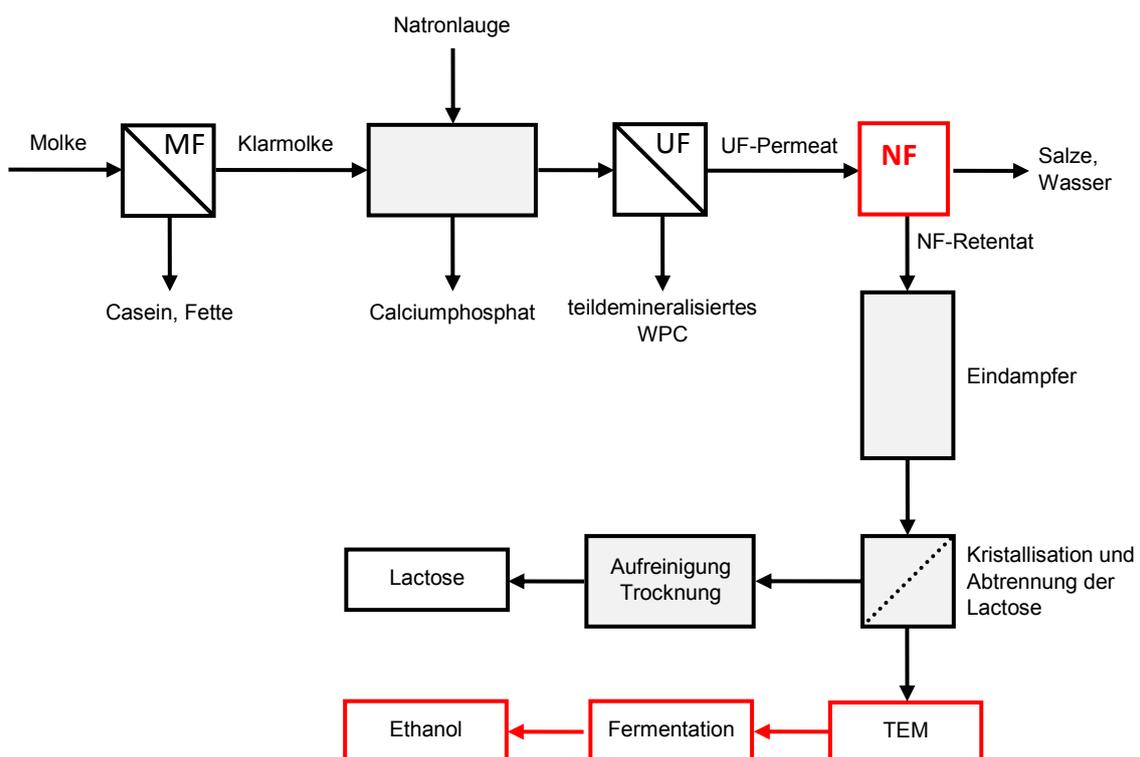


Abbildung 54: Mögliches Verfahrensschema zur optimalen Verwertung von Molke mit neu integrierten Prozessschritten [44]

Die NF weist eine große Anzahl von betriebswirtschaftlichen Vorteilen auf. So sind beispielsweise geringere Energie-, Transport- und Abwasserentsorgungskosten zu verzeichnen. Vor

Experimenteller Teil

allem sind die guten Qualitätsausbeuten und die reduzierte Anlagenstillstandzeit durch schnelles Auswechseln der Membranen entscheidend. Damit könnte die Nanofiltration einen festen Platz zur Demineralisierung und Aufkonzentrierung von Molke und UF-Permeat erreichen.

Um festzustellen, ob der NF im Vergleich zu anderen Demineralisierungsverfahren (EDI-Verfahren) aus ökonomischer Sicht der Vorzug zu geben ist, müssten der kumulierte Energieaufwand über die gesamten Prozesskette bilanziert, sowie der Kostenaufwand der einzelnen Methoden gegenübergestellt und analysiert werden. Dieses ist jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit, sondern sollte in den Folgeprojekten bearbeitet werden.

Zusammenfassung und Ausblick

4 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das verwendete Molkenkonzentrat TEM 30 eine attraktive Wertstoffquelle darstellt, deren Verwertung durchaus lohnenswert erscheint. Das TEM 30 kann sowohl als Grundlage zur Produktion von Biomasse dienen als auch als Substrat zur Produktion von Ethanol.

Die Produktion von Biomasse mit einem Kultivierungsmedium auf Basis von TEM 30 gelingt recht einfach und ist ohne Zusatz von weiteren Nährstoffen möglich. Begünstigt durch kurze Anzuchtzeiten von max. 24 h und des Hefestammes *K. marxianus* DSM 5422 kann auf die totale Sterilisation des Mediums verzichtet werden und damit ein wichtiger Beitrag zur Energieeinsparung im gesamten Prozess geleistet werden.

Im Rahmen der Untersuchungen zum Stoffwechsel der verwendeten Hefen konnten leider keine entscheidenden Ansatzpunkte gefunden werden, mit denen sich die Biomasseproduktion oder die Ethanolgewinnung wesentlich beeinflussen lassen.

Ein kritischer Punkt dieses Verfahrens ist die relativ geringe Ethanoltoleranz der Hefe. Das hat zur Folge, dass bei der Biomasseproduktion besonders auf den Sauerstoffgehalt des Mediums zu achten ist, da bei zu geringer Sauerstoffkonzentration der Stoffwechsel schnell von respiratorisch auf fermentativ umstellt und Ethanol produziert wird, wodurch die Vermehrung der Hefezellen zusätzlich inhibiert wird.

Die beschriebene geringe Ethanoltoleranz schränkt auch die Optimierung des Verfahrens hinsichtlich maximaler Ethanolausbeuten deutlich ein. Selbst wenn es gelänge, TEM 30 unverdünnt zu vergären, würden die Ethanolkonzentrationen in der Fermentationsbrühe so hoch ansteigen, dass sie zu totaler Inhibierung bzw. Abtötung der Hefezellen führen könnte. Das bedeutet, dass eine Erhöhung der Ausbeute durch Substratkonzentrierung nicht ohne weiteres möglich ist.

Es könnte ein einfaches Verfahren zur Vergärung von TEM 30 zu Ethanol erarbeitet werden, welches auf der konsequenten Nutzung des Reststoffes TEM 30 basiert und ohne den Einsatz von Zusatzstoffen auskommt. Bei der Verwendung von 40 % TEM 30 lassen sich Ethanolausbeuten von über 90 % bezogen auf einen idealen Umsatz (siehe Abschnitt 2.2)

Zusammenfassung und Ausblick

erzielen. Bei den erreichten absoluten Ethanolkonzentrationen von $> 5 \%$ (v/v) ist bereits eine wirtschaftliche Destillation sinnvoll [66], so dass auch tatsächlich ein positiver energetischer Effekt aus diesem Verfahren zu erwarten ist.

Durch eine Erhöhung der eingesetzten Biomasse zur Vergärung des Substrates kann zum einen die Abbaugeschwindigkeit der Lactose deutlich gesteigert und zum anderen auch die Verdünnung des TEM 30 von 40 % auf 50 % reduziert und damit ein großer Teil des benötigten Wassers reduziert werden.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Nanofiltration als Mittel zur Demineralisierung des Molkenkonzentrats geeignet ist und das sich durch diese Demineralisierung auch positiv auf die Vergärung durch die Hefen auswirkt. Allerdings wird der positive Effekt der verringerten Salzbelastung im Molkenkonzentrat durch einen deutlichen Lactoseverlust nach der Nanofiltration geschmälert. Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Ursache für diesen Verlust ausgemacht werden, so dass dies eine Aufgabe weiterführender Arbeiten sein muss. Weiterhin muss geprüft werden, ob der Einsatz der Nanofiltration zur Demineralisierung an dieser Stelle im Prozess sinnvoll ist oder ob man dadurch etwaige Konzentrierungsschritte, welche momentan durch Eindampfen abgearbeitet werden, ersetzt werden können. Dabei würde das Volumen wie beim Eindampfen entsprechend verringert werden, gleichzeitig würde man aber eine Anreicherung der meisten Salze verhindern und diese bereits in früheren Prozessschritten ausschleusen.

Diese Arbeit konnte einige Grundlagen legen, um aus dem verwendeten Molkenkonzentrat TEM 30 der Fa. Biolac GmbH & Co. KG (*Harbarnsen*) Ethanol zu produzieren. Die nächsten zu bewältigenden Aufgaben sind eher ökonomischer Natur. Es gilt zu prüfen, ob es wirtschaftlich sinnvoll ist, für die bei der Fa. Biolac anfallende Menge eigens Anlagen zur Biomassenproduktion, Vergärung und Destillation aufzustellen oder einen entsprechend ausgestatteten Partner für eine Kooperation zu finden. Dieser müsste in der näheren Umgebung angesiedelt sein, um die Transportkosten entsprechend gering zu halten.

Eine weitere interessante Option ist die Verwendung von anderen Materialien als Co-Substrate. Denkbar wäre die Mischung von salzarmer Zuckerrübenmelasse, einem Rückstand aus der Zuckergewinnung aus Zuckerrüben, mit dem salzreichen Molkenkonzentrat. Diese

Zusammenfassung und Ausblick

Melasse hat einen Zuckergehalt von etwa 48 % [70]. Der Verdünnungseffekt würde in diesem Fall nur die anorganischen Salze betreffen, während die Konzentration des Gesamtzuckers ansteigt. Lässt sich diese Mischung auch entsprechend vergären, würden höhere Ethanolkonzentrationen bei vergleichbarem Aufwand die Wirtschaftlichkeit dieses Verfahrens deutlich erhöhen. Zur Erreichung von höheren Ethanolkonzentrationen durch Verwendung von Co-Substraten müsste dann allerdings, bedingt durch die beschriebene Produktinhibierung auf tolerantere Hefestämme ausgewichen werden.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Bundesanstalt für Ernährung und Landwirtschaft, Referat 22. www.ble.de Geladen am 06.04.2010
- [2] KOSIKOWSKI F. V Whey utilization and whey products. *J. Dairy Sci.* 62, 1149-1160. **1979**
- [3] PESTA G. *et al.* Utilization of Whey. In: *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*, 2006, Springer Verlag, New York.
- [4] MIV, Milchindustrie-Verband e. V., Fachgruppe Molke und Molkenerzeugnisse, Broschüre: Mehr Erfolg mit Molke, **2009**, Bonn.
- [5] http://www.ethanol-statt-benzin.de/mid368_Kraftstoffverbrauch.html, abgerufen am 22.04.2011
- [6] <http://www.aral.de/aral/sectiongenericarticle.do?categoryId=9019689&contentId=7035652> abgerufen am 22.04.2011
- [7] ZADOW J. G., *Whey and Lactose Processing*. Elsevier Science Publishers LTD, **1992**, Essex
- [8] SCHNITZMEIER D., Nitratabreicherung in Molke und Molkenkonzentrat zum wertgesteigerten Einsatz der Molkenprodukte. Dissertation **2003**, Universität Hannover.
- [9] ULBER R., Effizientere Nutzung landwirtschaftlicher Rohstoffe durch biotechnologische Verfahren. In: *Biotechnologische Methoden zur effizienteren Rohstoffnutzung*. Habilitationsschrift, **2002**, Universität Hannover.
- [10] MAWSON A. J.. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Tech.* **1994**, 47, 195-203.
- [11] MARWAHA, S.S. und Kennedy J.F., Review: Whey – pollution problem and potential utilization, *Intern. J. Food Sci. Tech.* **1988**, 23, 323-336.
- [12] GONZÁLEZ SISO M. I., Cheese whey as a resource: whey utilization. *Bioresource-Technol.*, **1996**, 57 (1), 1–11.
- [13] GUIMARÃES P. M. R. *et al.*, Alcoholic Fermentation of Lactose by Engineered Flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioenergy: Challenges and Opportunities*, **2008**, Portugal.
- [14] BMJ, Bundesministerium der Justiz. Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer, AbwV, Anhang 3 (Abgerufen am 22.03.2010). <http://bundesrecht.juris.de/abwv/index.html>.
- [15] FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/site/603/DesktopDefault.aspx?PageID=603#ancor>, Daten vom 07.04.2010

Literaturverzeichnis

- [16] TÖPEL, A.: Chemie und Physik der Milch: Naturstoff - Rohstoff - Lebensmittel; 3. überarb. Auflage, Behr's Verlag, **2004**
- [17] http://www.suesswarentechnik.de/index.php?option=com_content&task=view&id=2367&Itemid=27, abgerufen am 22.04.2011
- [18] http://www.suesswarentechnik.de/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=2474 abgerufen am 22.04.2011
- [19] SCHLIMME E., Buchheim, W.: Milch und ihre Inhaltsstoffe, Chemische und physikalische Grundlagen, Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen, **1995**
- [20] MIV, Milchindustrie-Verband e. V., Die deutsche Milchindustrie – Zahlen und Fakten, Informationsbroschüre, **2005**, Bonn.
- [21] GREITER M., Novalin S., Wendland M. et al. Desalination of whey by electro dialysis and ion exchange resins: analysis of both processes with regard to sustainability by calculating their cumulative energy demand. Journal of Membrane Science, **2002**, 210, 91-102.
- [22] JAINDL, K., Schuster-Wolff-Bühning, R., Fischer, L., Hinrichs, J.: Enzymatische Synthese von Lactulose in Milch- und Molkeprodukten. **2009**, Deutsche Molkerei Zeitung 15
- [23] JACOBSEN, S.: Polylactide. Wechselwirkungen, Jahrbuch **2000**
- [24] HÜSING et al., Biotechnologische Herstellung von Wertstoffen unter besonderer Berücksichtigung von Energieträgern und Biopolymeren. **2003**, Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Forschungsbericht 200 66 301, UBA-FB 000388, 67-76,
- [25] Milch & Markt,
http://www.milchindustrie.de/de/milch/brancheninformationen/spitzenstellung_milchwirtschaft.html, abgerufen am 06.04.2010
- [26] Molkereigenossenschaft Bad Bibra e.G. <http://www.molkerei-bad-bibra.de> vom 21.02.2011
- [27] Abwassersatzung für die Landeshauptstadt Hannover vom 07.12.2000
- [28] AMREIN, R., Fragnière C. und Thomet A.. Molkeverwertung. ALP forum 29 d. Agroscope Liebefeld-Posieux, **2006**, Bern.
- [29] <http://www.biolac.de/C1256CF70034B819/O/B6A804603092A40AC1256CDF0038945D>, abgerufen am 01.04.2011
- [30] SCHAPER, D., Bioethanol aus Molkenkonzentrat, Schwerpunktarbeit, **2008**, Universität Hannover

Literaturverzeichnis

- [31] BERG, Jeremy M., Tymoczko, John L. und Stryer, Lubert. Biochemistry. [Hrsg.] Sara Tenny. 6. Edition. New York : W. H. freeman and Company, **2007**
- [32] CLOIDT R., Lehmann H., Jansen M., Verfahren zur Herstellung von Ethanol aus Molke. Molkerei Alois Müller GmbH & Co. KG, Aretsried, Deutschland, **2008**, EP 1918381 A1.
- [33] GALLMANN P., Zehntner U., Eberhard P., Rehberger B., Wechsler D.. Fortschritt in der milchwirtschaftlichen Forschung. *ALP science*, **2004**, 467, 6-7.
- [34] SIENKIEWICZ, T., Riedel, C. L., Whey and Whey Utilization: Possibilities for Utilization in agriculture and foodstuff productions, **1990**, Th. Mann Verlag, Gelsenkirchen.
- [35] GONZÁLEZ Siso, M. I., The Biotechnological Utilization of Cheese Whey: A Review, **1996**, Bioresource Technology, 57, 1-11.
- [36] FISCHBACH G. Molke als Rohstoff. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, **1987**
- [37] TAHOUN M. K., El-Nemr T. M., Shata O. H. A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain for efficient conversion of lactose in salted and unsalted cheese whey into ethanol. *Nahrung/Food* 46 (5), 321-326. **2002**
- [38] MELIN T., Rautenbach, R. Membranverfahren – Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung, 3. Auflage, **2007**, Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- [39] SUÁREZ E., Lobo A. et al. Partial demineralization of whey and milk ultrafiltration permeate by nanofiltration at pilot-plant scale. *Desalination*, **2005**, 198, 274-281.
- [40] CUARTAS B., Alcaina M. I., Soriano E.. Separation of Mineral Salts and Lactose Solutions Through Nanofiltration Membranes. *Food Sci. Tech. Int.*, **2004**, 10 (4), 255-262.
- [41] CUARTAS-URIBE B., Alcaina-Miranda M. I., Soriano-Costa E., Bes-Piá A. Comparison of two nanofiltration membranes NF200 and Ds-5 DL to demineralize whey. *Desalination*, **2006**, 199, 43-45.
- [42] CUARTAS-URIBE B., Alcaina-Miranda M. I., Soriano-Costa E., Bes-Piá A. Comparison of the Behavior of Two Nanofiltration Membranes for Sweet Whey Demineralization. *American Dairy Sci. Association*, **2007**, 90, 1094-1101.
- [43] REHBERGER B., Thomet A. et al. Nanofiltration – Schlüsseltechnologie zur Verwertung von Nebenprodukten. *Deutsche Milchwirtschaft*, **2003**, 18, 765-770.
- [44] RÜDINGER F., Einfluss der Salzfracht bei der Ethanolgewinnung durch *Kluyveromyces marxianus* aus deproteiniertem Molkenkonzentrat. Bachelorarbeit Universität Hannover, **2009**
- [45] UDE, C., Mikrobiologische Herstellung von Ethanol aus Reststoffen der Molkeverarbeitung, Bachelorarbeit, **2010**, Universität Hannover

Literaturverzeichnis

- [46] SCHELLENBERG, J., Optimierung ausgewählter Kultivierungsparameter bei der *Kluyveromyces marxianus* Fermentation, Masterarbeit, **2008**, Universität Hannover
- [47] MAHMOUD M. M. Ultrafiltration in the manufacture of soft pickled cheese and production of ethanol and single cell protein from whey. Diss. Abstr. Int., **1980**, 41 (3), 878.
- [48] LEHMANN H.-R., Zettler K.-H. (1988). Prozesslinien zur Verarbeitung von Molke. Westfalia Separator AG, Oelde.
- [49] <http://www.martinvalatte.com/Aktivatoren-der-alkoholischen> abgerufen am 12.04.2011
- [50] BIOLAC GmbH & Co. KG Harbarnsen, Datenblatt: Teilenzuckertes Molkenkonzentrat TEM-30., **2005**
- [51] SEMIH, O., Ozlem, C., Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects, Pakistan Journal of Nutrition 2 (2): 54-59, **2003**
- [52] BREUNIG K. D., et al. Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. Enzyme and Microbial Technology. **2000**, 26, S. 771-780.
- [53] https://www.fh-muenster.de/fb4/fue/fue_gebiete/bioethanol/machbarkeit_absolutierung_bioethanol.php vom 02.03.2011
- [54] GUU Y. K., Zall R. R. Nanofiltration Concentration Effect on the Efficacy of Lactose Crystallization. J. Food Sci., **1992**, 57 (3), 735-739.
- [55] RICE G., Barber A., O'Connor A., Stevens G., Kentish S. Fouling of NF membranes by dairy ultrafiltration permeates. J. Membrane Sci., **2009**, 330, 117-126.
- [56] SAMHABER W. M. Anwendungen und Aufgabenstellungen der Nanofiltration in der Lebensmittelindustrie. Chemie Ingenieur Technik 77 (5), 583-588.
- [57] KOCH MEMBRANE SYSTEMS, Datenblatt: KMS SR®2 Food & Dairy NF Elements, Koch Chemical Technology Group, LLC company, Wilmington, **2007**.
- [58] KOCH MEMBRANE SYSTEMS, Datenblatt: KMS SR®3 Food & Dairy NF Elements, Koch Chemical Technology Group, LLC company, Wilmington, **2007**.
- [59] KOCH MEMBRANE SYSTEMS, Handbuch: KMS Laboratory Cell CF-1, Koch Chemical Technology Group, LLC company, Wilmington, **2005**.
- [60] CHAVERON M., Neumann F., Process for treating dairy by-products. Nestec S. A., Vevey, Schweiz, US 4803089, **1989**
- [61] DURHAM R. J., Hourigan J. A. et al.). Whey fractionation: wheying up the consequences. Food Aust., **1997**, 49 (10), 460-465.

Literaturverzeichnis

- [62] BERROCAL R., Chaveron M., Demineralization of sweet whey by electrodeionization. Nestec S.A., Vevey, Schweiz, US 5980961, **1999**.
- [63] BERROCAL R., Chaveron M., Entmineralisierung von Milchprodukten oder Milch-derivaten. Société des Produits Nestlé S. A., Vevey, Schweiz, DE 69731862 T2, **2005**
- [64] UCHIDA, K., Mogi, K., Cellular fatty acid spectra of hiochi bacteria, alcohol tolerant lactobacilli and their group separation. **1973**, J. Gen. Microbiol., 19, 233-249
- [65] KAMINI, N.R., Gunasekaran, P., Ethanol production from lactose by coculture of *Kluyveromyces fragilis* and *Zymomonas mobilis*. Journal of Fermentation and Bioengineering, **1989**, Vol. 68, No. 5 305-309
- [66] GALBE, M., Sassner, P., Wingren, A. Process Engineering Economics of Bioethanol Production. Adv Biochem Engin/Biotechnol, **2007**, 108, 303-327
- [67] FELDMANN, H., Yeast molecular biology – a short compendium on basic features and novel aspects, Kompendium. Adolf-Butenandt-Institute, **2005**, University of Munich.
- [68] O`SHEA, D.G., Walsh, P.K., The effect of culture conditions on the morphology of the dimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415: a study incorporating image analysis. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2000**, 53, 316–322.
- [69] SPEERS, R.A. et al., Effects of Fermentation Parameters and Cell Wall Properties on Yeast Flocculation. Journal of the Institute of Brewing, **2006**, 112(3), 246–254.
- [70] <http://www.deutsche-melasse.de/Zuckerruebenmelasse-Herstellung.108.0.html>, abgerufen am 25.04.2011

Anhang

6 Anhang

6.1 Standard-Medium zur Hefekultivierung

Als Nährmedium für die Kultivierung von *K. marxianus* und *S. cerevisiae* wird ein von der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“ empfohlenes Medium verwendet. Je nach Bedarf wird die Glucose durch die Zucker Lactose oder Galactose ersetzt.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Nährmediums der Vorkultur

Substanz	Bezeichnung	Menge [g·l ⁻¹]
Hefeextrakt	Yeast Extract (Fluka 70161)	3,0
Malzextrakt	Malt Extract (Roth X976.2)	3,0
Soja-Pepton	Soy Peptone (Biotech. International Cat. 103)	5,0
Lactose	Lactose Monohydrat (Fluka)	10,0

Bei einem Ansatz für einen Liter Nährmedium werden zunächst 3 g Hefeextrakt, 3 g Malzextrakt und 5 g Sojapeptone in 900 ml bidest. Wasser gelöst. Zur Sterilisierung wird die Lösung ca. 30 min autoklaviert. Der Zucker kann erst nach der Sterilisierung hinzugefügt werden, da es sonst im Autoklaven zu einer Maillard-Reaktion kommt. Es werden entsprechende Mengen des gewünschten Zuckers bidest. Wasser unter leichtem Erhitzen gelöst und anschließend über einen Sterilfilter mit in die Nährlösung gegeben.

Zur Bereitung von Agar-Nährböden wurde dem Medium vor dem autoklavieren noch 15 g·l⁻¹ Agar Agar zugegeben.

6.2 Leitfähigkeitsmessung

Zur Untersuchung der Leitfähigkeit wurden 200 ml TEM 30 mit Bodensatz und der Überstand von zentrifugiertem TEM 30 mit jeweils 100 ml bidest. Wasser Schritt für Schritt vermengt. Zwischen den Verdünnungsschritten wurde die Lösung für ca. 30 min gerührt um Salze, die möglicherweise im Bodensatz enthalten sind zu lösen. Die Leitfähigkeit wurde bei einer Lösungstemperatur von etwa 25 °C gemessen. Die Messung der Leitfähigkeit erfolgte mit einem Handgerät Konduktometer Cond 315i (WTW, Weilheim).

Anhang

6.3 Bestimmung der Ethanolkonzentration

Die Bestimmung der Ethanolkonzentration der Fermentationsproben erfolgte durch Gaschromatographie. Die Kalibrierung wurde als zwei-Punkt-Kalibration mit Ethanolkonzentrationen von $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ und $1,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ durchgeführt. Zur Messung der Proben wurde diese zunächst für 5 min bei $13000 \cdot \text{g}$ zentrifugiert und anschließend wie folgt verdünnt. $800 \mu\text{l}$ H_2O bidest., $100 \mu\text{l}$ n-Propanol ($8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) als interner Standard und $100 \mu\text{l}$ Probe. Die Proben wurden anschließend manuell injiziert. Die technischen Daten des GC sowie weitere Parameter sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Technische Daten des Gaschromatographen

Technische Parameter	Bezeichnung/Einstellung
Gaschromatograph	Shimadzu, GC-14b (Japan)
Säule	Chromosorb 101,80/100 $6' \cdot 18$
Säulentemperaturen	$160 \text{ }^\circ\text{C}$
Detektor	FID
Laufzeit pro Probe	2,5 min
Injektionsvolumen	$0,5 \mu\text{l}$
Interner Standard	n-Propanol (8 g/l)

6.4 Bestimmung der Lactosekonzentration

Die Lactosekonzentration der Proben wurde durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen. Zur Kalibrierung wurden ausgehend von einer Lactosestammlösung von $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ insgesamt fünf Lactoselösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen ($10, 5, 2,5, 1, 0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) hergestellt. Die Verdünnung erfolgte jeweils mit zweifach deionisiertem Wasser (Arium 600, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen). Die zu untersuchenden Proben wurden, analog zur Ethanolbestimmung (Anhang 6.3), zentrifugiert und vor der Messung 1:20 mit zweifach deionisiertem Wasser verdünnt. Die technischen Daten und Einstellungen der HPLC-Hardware sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Anhang

Tabelle 15: Technische Daten der HPLC

Technische Parameter	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 %)
Flussrate	0,4 ml/min
Laufzeit pro Probe	8 min
Injektionsvolumen	2 µl

Die Identifizierung der Lactose erfolgte anhand der Retentionszeit des Standards.

Die Bestimmung der anderen Zucker Glucose und Galactose wurden analog durchgeführt.

6.5 Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD) wurde mit einem Fotometer (Uvikon, Kontron Instruments) bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt. Hierbei wurde jeweils eine 3-fach Bestimmung durchgeführt. Die Messung erfolgte in Plastik-Einwegküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Kalibriert wurde das Fotometer mit einer 0,9 prozentigen NaCl-Lösung, die auch zur Verdünnung der Proben verwendet wurde. Die Verdünnungsstufen wurden so gewählt, dass die Extinktion unter 0,5 lag. Die optische Dichte errechnet sich durch Multiplikation der gemessenen Extinktion mit dem Verdünnungsfaktor.

6.6 Bestimmung der Trockenmasse

Zur Bestimmung der Trockenmasse des ausgefallenen Calciumphosphat wurde die Lösung in mittels Lyophylle getrocknet und anschließend gewogen. Die technischen Daten der Lyophylle sind in folgender Tabelle aufgeführt. Die Proben wurden vor der Gefriertrocknung zunächst bei -80 °C eingefroren.

Anhang

Tabelle 16: Technische Daten der Lyophylle

Technische Parameter	Bezeichnung/Einstellung
Typ	Christ, Alpha 1–4 LSC
Druck	0,63 mbar
Eiskondensator-Temperatur	–55 °C

6.7 Wachstumstests

Die Zellzahl wird mittels einer Petroff-Hauser Kammer bestimmt. Dazu wird aus den Vorkulturen eine Probe entnommen und 1:200 verdünnt. Dann wird die Petroff-Hauser Kammer mit einem Tropfen der verdünnten Zellsuspension befüllt. Nun werden die Zellen in den vier Quadraten ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Danach wird die Verdünnung herausgerechnet und die Zellzahl auf Zellzahl pro ml hochgerechnet. Bei den benutzten Quadraten der Petroff-Hauser Kammer muss zur Hochrechnung mit 10^4 multipliziert werden. Um die Hefezellen auf den Agarplatten vereinzeln zu können, müssen die Zellsuspensionen 1:200.000 verdünnt werden. Die Platten mit *K. marxianus* werden bei 30 °C und die Platten mit *S. cerevisiae* bei 25 °C inkubiert. Nach 19,5 h und nach 95 h werden die Platten auf Kolonienwachstum überprüft und nach den 95 h ebenfalls die Anzahl der Kolonien ausgezählt.

6.8 Vorkulturen

Vorkulturen wurden in 50 ml-Schikanekolben unter Verwendung des Standardmediums nach Abschnitt 6.1 angesetzt. Dazu wurde das Medium aseptisch mit entsprechender Substratlösung auf eine Substratkonzentration von $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Lactose eingestellt und anschließend aseptisch mit einer geglähten Impföse von einer Lagerkultur beimpft.

6.9 Standardkultivierung im Schüttelkolben

Für die aeroben Standardkultivierungen in Schüttelkolben wurde Medium nach 6.1 in einem 500 ml Schikanekolben autoklaviert (120°C, 2 bar, 20 min, Autoklav: Systec V-Serie, Systec, *Wettenberg*) und anschließend aseptisch mit entsprechendem Substrat versehen. Die Kolben wurden je nach Versuch mit einem definierten Volumen einer frisch angewachsenen

Anhang

Vorkultur beimpft. Die Temperatur betrug 30°C bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 130 min⁻¹ (aerob) bzw. 80 min⁻¹ (anaerob).

6.10 Umrechnung: OD – Biotrockenmasse – Zellzahl

OD600	1	4,41	0,37
Biotrockenmasse [g·l ⁻¹]	0,23	1	0,08
Zellzahl [Zellen/ml]	2,69·10 ⁶	1,18·10 ⁷	1·10 ⁶

6.11 Reaktorkultivierung

Verwendeter Reaktortyp: Biostat A+ mit MO-Ausstattung

Hersteller: Sartorius Stedim Biotech GmbH, *Göttingen*

Volumen: 2 l

pO₂-Messung: Hamilton Oxyferm

pH-Messung: Hamilton Easyferm

Datenaufnahme über externen Computer

6.11.1 Aerobe Kultivierung:

Das Kulturmedium aus 6.1 wurde in den Reaktor eingefüllt. Der Reaktor wurde verschlossen, komplett montiert und anschließend autoklaviert (120°C, 2 bar, 20 min, Autoklav: Systec V-Serie, Systec, *Wettenberg*). Nach dem Abkühlen und der Montage der Steuereinheit wurde die Sauerstoffsonde kalibriert (0 % und 100 % pO₂). Nach Erreichen der Zieltemperatur wurde die Kultur über ein Septum aseptisch mit einer Vorkultur (200 ml) beimpft.

6.11.2 Anaerobe Kultivierung

Für die anaerobe Kultivierung wurde auf das Autoklavieren der Kulturbrühe verzichtet. Ansonsten gleicht die Durchführung Abschnitt 6.11.1.

Anhang

6.12 Fermentation mit Glucose, Galactose und Lactose

Die Fermentation wurde anaerob in Schüttelkolben ohne Schikanen durchgeführt. Als Medium wurde das Standardmedium aus Abschnitt 6.1 verwendet. Es wurden $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose, $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Galactose und $200 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Lactose als Substrat eingesetzt.

6.13 Inhibitorische Wirkung von Ethanol

Tabelle 17: Zusammensetzung zur Untersuchung der Ethanolwirkung

Ethanolkonzentration [g/l]	Ethanol [%]	Ethanol [ml]	Molke [ml]	Vorkultur [ml]	Medium [ml]
25	3,2	2,61	7	20	40,39
45	5,7	5,22	7	20	37,78
70	8,9	7,82	7	20	35,18
90	11,4	10,43	7	20	32,57
105	13,3	13,03	7	20	29,96
135	17,1	15,66	7	20	27,34
Ohne Ethanol	-	15,00*	7	20	28

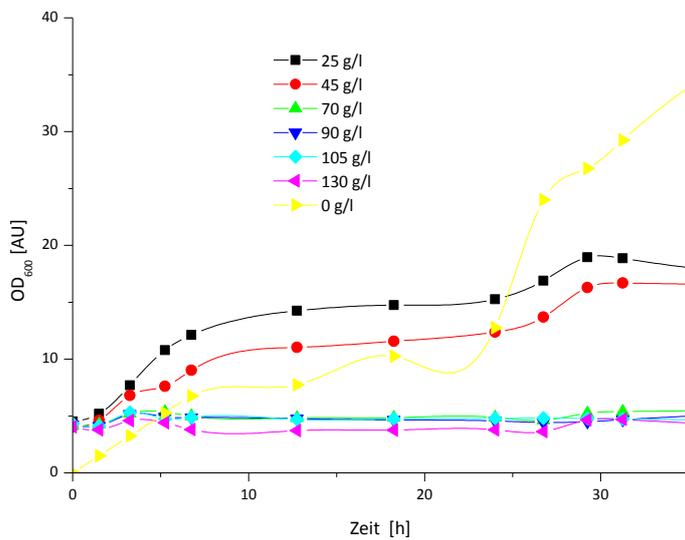


Abbildung 55: : Entwicklung der Biomassekonzentration bei verschiedenen Ethanolkonzentrationen (Auszug)

($25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Lactose, 30°C , 130 min^{-1})

Anhang

6.14 Vergärung von TEM 30

TEM 30 wurde in Verdünnungen von 20 %, 50 % und unverdünnt als Substrat eingesetzt und in 500 ml Schüttelkolben unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Das Kulturvolumen betrug 200 ml, welche mit 20 ml Vorkultur nach 6.8 beimpft wurden.

6.15 Biomasserückgewinnung/hohe Zelldichten

Diese Versuche wurden im 2l-Bioreaktor (siehe auch Anhang 6.11) durchgeführt. Bis auf die eingesetzte Menge an Biomasse entspricht die Durchführung der normalen anaeroben Kultivierung nach Abschnitt 6.11.2.

6.16 Datenblatt TEM 30

Teilentzuckertes Molkenkonzentrat TEM 30

Beschreibung:

TEM 30 ist ein flüssiges, teilentzuckertes Molkenkonzentrat

Chemische Daten:

Protein: (N*6,38):	3,0 % ±1%
Lactosemonohydrat:	18,0 % ±2%
Asche:	max. 16 %
Trockenmasse:	30,0 % ±2%
Energie (kg):	4,4 MJ=1051,6 kcal

Physikalische Daten:

pH:	5,0-6,0
-----	---------

Salze:

Kalium:	ca. 4,0 %
Natrium:	ca. 2,0 %
Chlorid:	ca. 4,0 %
Phosphor:	ca. 0,4 %
Calcium:	ca. 4,0 %
Magnesium:	ca. 0,1 %

Mikrobiologische Daten:

Gesamtkeimzahl:	<50.000/ml
Coliforme Keime:	negativ in 1 ml
Hefen/Schimmel:	<2000/ml
Salmonellen:	negativ in 1 ml

Anhang

Aminosäurespektrum je 100 g:

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

6.17 Weitere Daten: Ethanolproduktion bei hohen Zuckergehalten

Zeit [h]	Galactose EtOH [g/l]	Glucose EtOH [g/l]	Lactose EtOH [g/l]	Maximale Ausbeute [%]
0	2,36	1,89	170,78	0
3,5	2,55	—	—	—
7,5	2,79	2,67	155,76	8,79
23,5	5,16	—	—	—

6.18 Daten zu Abschnitt 3.5

Tabelle 18: Verdünnung TEM 30

Fermentation	Melasse [ml]	Wasser [ml]	Verdünnung
M1	300	000	1:0
M2	150	150	1:1
M3	060	240	1:5

Anhang

6.19 Chemikalien

- Acetonitril, CHROMASOLV Plus >99,9 %, Sigma Aldrich.
- Casein–Pepton Typ I, Biotechnica International.
- CaCl_2 , Fluka.
- Ethanol reinst, Sigma Aldrich.
- D(–)–Fructose · H_2O , Appli Chem.
- D(+)-Glucose · H_2O , Fluka.
- HCl 37 %, Sigma Aldrich.
- K_2SO_3 , Fluka.
- KCl, Merck.
- Lactose · H_2O , Fluka.
- Malt Extract, Fluka.
- $\text{MgCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, Merck.
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, Riedel de Haën.
- Na_2SO_3 , Riedel de Haën
- NaOH, Merck.
- NaCl, Fluka.
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Fluka
- n–Propanol, Sigma Aldrich.
- D(+)-Sucrose · H_2O , Fluka.
- TEM30, Biolac GmbH.
- Yeast Extract, Fluka.

6.20 Geräte

- HPLC-Röhrchen, Techlab GmbH, Erkerode.
- Laborwaage AT621 Delta Range, Mettler Instrumente AG, Greifensee.
- Mikroliterpipette Reference® & Research®, Eppendorf AG, Hamburg.
- Mikroliterspritze Mikroliter® 7001 1,0 l, Hamilton, Schweiz.
- Parafilm® M, American National Can Group, Chicago.
- Petrischalen 94 mm, Kunststoff, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen.
- Phasenkontrastmikroskop, BX41, Olympus, Hamburg.
- pH-Meter HI 211, Hanna Instruments, Kehl am Rhein.
- Photometerküvetten, 1000 l, 1 cm Dicke, Kunststoff, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht.
- Reaktionsgefäße, 1 ml/2 ml/10 ml und 50 ml, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht.
- Reaktor 2 l, Biostat® A plus, Sartorius Stedim Biotech S. A, Göttingen.
- Schüttelkolben 300 ml ohne Schikanen, Schott AG, Mainz.
- Schüttelkolben 500 ml mit zwei Schikanen, Schott AG, Mainz.
- Schüttelkolben 500 ml ohne Schikanen, Schott AG, Mainz.
- Schüttelschrank, Centromat® BS-1, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen.
- Spectrophotometer Uvikon 922, Kontron Instruments GmbH, Düsseldorf.
- Sterilbank, Herasafe®, Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn.
- Sterilfilter 0,2 µm, Sartorius Stedim Biotech S. A, Göttingen.
- Zentrifuge, Heraeus Pico, Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn.
- Zentrifuge, Metafuge 1.0 RS, Heraeus Instruments GmbH, Osterode.

Abbildungsverzeichnis

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von α -Lactose	8
Abbildung 2: Molkenanfall in Deutschland von 1991 – 2008 [1]	12
Abbildung 3: Weltweite Käseproduktion von 1991 – 2008 [15]	13
Abbildung 4: Weltweite Käseproduktion - nach Regionen aufgeschlüsselt [15]	14
Abbildung 5: Traditionelle Verfahren und Prozesse der Molken- und ..	17
Abbildung 7: Leloir-Pfad zur Umwandlung von Galactose zu Glucose [29]	20
Abbildung 6: Formale Reaktionsgleichung zur Bildung von Ethanol aus Lactose	19
Abbildung 8: Größe und Art der Milchpartikel, die bei den verschiedenen	22
Abbildung 9: Prinzip der Elektrodialyse [30]	23
Abbildung 10: Aufbau eines Elektrodeionisations-Moduls [30].	24
Abbildung 11: Leitfähigkeitsmessung zur Untersuchung des Bodensatzes in TEM 30	28
Abbildung 12: Koloniebildung von <i>K.marxianus</i> 70073 auf verschiedenen Substraten	31
Abbildung 13: Koloniebildung von <i>K.marxianus</i> 5422 auf verschiedenen Substraten	31
Abbildung 14: Koloniebildung von <i>S. cerev.</i> 8066 auf verschiedenen Substraten	31
Abbildung 15: Vergleich des Substratabbaus bei der Verwendung von Glucose	32
Abbildung 16: Vergleich des Substratabbaus bei der Verwendung von Glucose	33
Abbildung 17: Substratabbau bei Lactose (<i>K. marxianus</i> DSM 5422, 30°C, 130 min ⁻¹)	34
Abbildung 18: Vergleich des Zellwachstums von <i>K. marxianus</i> DSM 5422 und	35
Abbildung 19: Zeitliche Entwicklung der Lactosekonzentration bei der	37
Abbildung 20: Wachstumskurven von <i>K. marxianus</i> auf Galactose, Glucose und	39
Abbildung 21: Abnahme der Zuckerkonzentration mit der Zeit (60 g·l ⁻¹ , 30°C, 130 min ⁻¹)	40
Abbildung 22: Wachstum von <i>K. marxianus</i> DSM 5422 abhängig...	41
Abbildung 23: Ethanolbildung bei unterschiedlichen	42
Abbildung 24: Zellwachstum von <i>K. marxianus</i> DSM 5422 verschiedenen Substraten	43
Abbildung 25: Entwicklung der Biomassekonzentration bei	46
Abbildung 26: Entwicklung des Lactoseabbaus bei unterschiedlichen	47
Abbildung 27: Entwicklung von Biomassen- und Lactosekonzentration im 2 l-Bioreaktor	49
Abbildung 28: Hefezellen <i>K. marxianus</i> DSM 5422 während der aeroben Kultivierung	50
Abbildung 29: Hefezellen <i>K. marxianus</i> DSM 5422 während der anaeroben Gärung	51

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 30: Verlauf der Lactosekonzentration bei der Vergärung von	53
Abbildung 31: Entwicklung der Biomassekonzentration bei der Vergärung von	54
Abbildung 32: Lactoseabbau in verdünntem TEM 30	55
Abbildung 33: Ethanolproduktion gemessen und theoretisch	56
Abbildung 34: Verlauf der Vergärung von TEM 30 mit hohem Biomasseinsatz	57
Abbildung 35: Vergärung von TEM 30 mit zurückgewonnener Biomasse	58
Abbildung 36: Definition des Lactoseumsatz	59
Abbildung 37: Entwicklung der Biomasse im Verlauf der Kultivierung	60
Abbildung 38: Umsatz der Lactose im Verlauf der Kultivierung	60
Abbildung 39: Einfluss verschiedener Natriumkonzentrationen	61
Abbildung 40: Einfluss verschiedener Natriumkonzentrationen	62
Abbildung 41: Einfluss verschiedener Calciumkonzentrationen	62
Abbildung 42: Einfluss verschiedener Calciumkonzentrationen	63
Abbildung 43: Einfluss verschiedener Chloridkonzentrationen	64
Abbildung 44: Einfluss verschiedener Chloridkonzentrationen	65
Abbildung 45: Zeitliche Entwicklung der optischen Dichte im Verlauf	66
Abbildung 46: Zeitlicher Verlauf des Lactoseumsatzes während	67
Abbildung 47: Vergleich der unterschiedlich verdünnten TEM 30-Fermentationen	69
Abbildung 48: Vergleich der Biomassenentwicklung bei der Vergärung	69
Abbildung 49: Entwicklung des Ethanolgehaltes bei der Vergärung	70
Abbildung 50: Laboratory Cell CF-1 [55]	72
Abbildung 51: Vergleichsfermentation von zwei verschiedenen TEM 30-Permeaten	75
Abbildung 52: Entwicklung der Ethanolgehalte in verschiedenen TEM 30-Permeaten	76
Abbildung 53: Mögliche Wertschöpfungen aus deproteiniertem Molkenkonzentrat	81
Abbildung 54: Mögliches Verfahrensschema zur optimalen Verwertung von Molke	82
Abbildung 55: : Entwicklung der Biomassekonzentration	97

Tabellenverzeichnis

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der unterschiedlichen Molkentypen [3]	8
Tabelle 2: Zusammensetzung des Molkenproteins [19]	11
Tabelle 3: Auszug aus der Zusammensetzung von TEM 30 [50]	27
Tabelle 4: Übersicht der Abbauraten der verwendeten Hefen	35
Tabelle 5: Lactoseabbauraten bei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen	38
Tabelle 6: Max. Ethanolkonzentrationen der unterschiedlichen Substrate	44
Tabelle 7: Empfohlene Zusammensetzung des Komplexmediums zur Kultivierung	48
Tabelle 8: Verdünnungsschema für Schüttelkolbenkultivierung [44]	68
Tabelle 9: Biomassenproduktion, Ethanol- und Lactosegehalt.....	68
Tabelle 10: Lactoseumsatz und Ethanolausbeute bei der Vergärung	71
Tabelle 11: Verwendete Membrantypen	73
Tabelle 12: Vergleich der Rohstoff- und Betriebskosten	79
Tabelle 13: Zusammensetzung des Nährmediums der Vorkultur	92
Tabelle 14: Technische Daten des Gaschromatographen.....	93
Tabelle 15: Technische Daten der HPLC.....	94
Tabelle 16: Technische Daten der Lyophylle.....	95
Tabelle 17: Zusammensetzung zur Untersuchung der Ethanolwirkung	97
Tabelle 18: Verdünnung TEM 30.....	99

Lebenslauf

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Dipl.-Chem. Christian Benecke
Anschrift: Am Nordende 2, 31319 Sehnde
Telefon: 0172-5442906
E-Mail: cbenecke@htp-tel.de
Geburtsdatum: 31.10.1977
Geburtsort: Hannover
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

1984-1988 Wilhelm-Raabe Grundschule Ilten
1988-1990 Orientierungsstufe Sehnde
1990-1997 Gymnasium Lehrte
Abschluss: Abitur (Note: 3,0) mit den Prüfungsfächern
Chemie, Gemeinschaftskunde, Erdkunde und Deutsch

Wehrdienst:

01.07.1997-30.09.1998 Grundwehrdienst und freiwilliger Wehrdienst als
Militärkraftfahrer bei 2./ FschPzAbwBtl 272 in
Wildeshausen

Hochschulausbildung

01.10.1998-30.03.2007 Studium der Chemie an der Leibniz-Universität Hannover
Titel der Diplomarbeit: „Strategien zur Gewinnung
fettreduzierten Erbsenproteins auf der Basis eines
nasstechnischen Verfahrens zur Stärkegewinnung“
Gesamtnote: gut

Lebenslauf

Beruflicher Werdegang:

- 01.05.2007-30.04.2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover
Arbeitskreis: Prof. Dr. Thomas Scheper
Anfertigung der Dissertation mit dem Titel:
Nachhaltige Verwertung von Wertstoffströmen: Gewinnung von Ethanol aus einem Reststoff der Molkeverarbeitung
Tag der mündlichen Prüfung: 12.08.2011
Gesamtnote: gut
- Seit 01.05.2010: Leiter Betriebslabor
Holcim (Deutschland) AG
Werksgruppe Höver

Publikationsliste

Artikel:

- [1] C.Benecke, A.Graf, S.Beutel, M.Lotz, T.Scheper: Strategien zur Gewinnung fettreduzierten Erbsenproteins auf der Basis eines nasstechnischen Verfahrens zur Stärkeherstellung, *Chem. Ing. Tech.*, **2010**, 82, 5, 711-716

Vorträge

- [2] C. Benecke: Den Prozess immer unter Kontrolle: Vollautomatisierte XRF und XRD in der Praxis, Bruker-AXS Anwendertreffen, **2011**, Karlsruhe

Posterpräsentationen:

- [3] C.Benecke, A.Graf, S.Beutel, M.Lotz, T.Scheper: Gewinnung von fettreduziertem Erbsenprotein durch den Einsatz von Ionenaustauschermembranen, (Poster), DECHEMA-Veranstaltung: „Industrielle Nutzung nachwachsender Rohstoffe – Chemie, Biotechnologie, Verfahrenstechnik“ Februar **2008**, Frankfurt/Main
- [4] C.Benecke, S.Beutel, H.Buchholz, T.Scheper: Turning waste into fuel: The Microbial Production of Bioethanol from Deproteinized Whey Concentrate, Biorefinica **2009**, Osnabrück
- [5] C.Benecke, S.Beutel, H.Buchholz, T.Scheper: Molkenkonzentrat: Ein Abfall als Rohstoff zur Ethanolgewinnung, DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen **2009**, Mannheim