

**Produktion organischer Säuren aus
Biomassehydrolysaten mittels definierter
Mischkulturen und *in-situ* Produktentfernung**

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

von

Ludwig Selder

aus

Friedberg/Bay.

2023

Erster Gutachter: Prof. Dr. An-Ping Zeng
Zweiter Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Irina Smirnova
Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2022

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Formel- und Symbolzeichen	III
Abstract	V
Kurzzusammenfassung	VII
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung und Motivation	3
3 Theorie	5
3.1 Biologische Produktion organischer Säuren und deren Aufarbeitung	5
3.1.1 Industrielle Produktion organischer Säuren	5
3.1.2 Aufarbeitung von biotechnologisch gewonnenen organischen Säuren	6
3.2 Propionsäure	10
3.2.1 Biotechnologische Propionsäuregewinnung	12
3.3 Laktat als Plattformchemikalie	16
3.3.1 Laktatproduktion mit <i>Bacillus coagulans</i>	17
3.4 Spaltung von Lignocellulose	19
3.5 Organische Säuren mittels Mischkulturen	20
3.6 <i>In-situ</i> Produktentfernung (ISPR)	23
3.6.1 Elektrodialyse	25
3.6.2 Umgekehrte elektrounterstützte Dialyse (REED)	26
3.7 Theorie der Fermentation	28
3.7.1 Betriebsarten von Bioreaktoren	30
4 Material und Methoden	35
4.1 Mikroorganismen	35
4.2 Kultivierung	35
4.2.1 Stammhaltung	35
4.2.2 Vorkultur	35
4.2.3 Fermentation für mittelkettige organische Säuren	36

4.2.4	Medien	36
4.2.5	Biomassehydrolysate	39
4.2.6	Bioreaktoren	39
4.3	Betrieb der Elektrodialyse	40
4.4	Analytik	42
4.4.1	Probenvorbereitung	42
4.4.2	HPLC	42
4.4.3	Gaschromatographie	42
4.4.4	Bestimmung der optischen Dichte	42
4.4.5	Bestimmung der Biotrockenmasse	43
5	Ergebnisse und Diskussion	45
5.1	Elektrodialyse synthetischer Fermentationsbrühe	45
5.1.1	Fazit der Elektrodialyseuntersuchungen	51
5.2	Laktatproduktion mit <i>B. coagulans</i>	52
5.2.1	Fazit der Laktatproduktion mit <i>B. coagulans</i>	57
5.3	Propionsäureproduktion mit <i>V. criceti</i>	58
5.3.1	Fazit der Propionsäureproduktion mittels <i>V. criceti</i>	67
5.4	Propionsäureproduktion mittels definierter Mischkultur	70
5.4.1	Mischkultur von <i>B. coagulans</i> und <i>V. criceti</i>	70
5.4.2	Mischkultur von <i>B. coagulans</i> und <i>V. criceti</i> mit gekoppelter Elektrodialyse	71
5.4.3	Fazit der Produktion von Propionsäure mittels Mischkulturen	82
5.5	Verwendung von lignocellulosebasierten Hydrolysaten	83
5.5.1	Glucose- und xylosereiche Biomassehydrolysate	83
5.5.2	Simultane Verzuckerung und Fermentation	88
5.5.3	Fazit der Produktion von Milchsäure und Propionsäure aus Biomassehydrolysaten	92
5.6	Produktion mittelkettiger organischer Säuren	93
5.6.1	Fazit der Produktion mittelkettiger organischer Säuren	104
6	Zusammenfassung und Ausblick	107
	Literaturverzeichnis	122
	Abbildungsverzeichnis	127
	Tabellenverzeichnis	129

Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. An-Ping Zeng, Leiter des Instituts für Bioprozess- und Biosystemtechnik, danken für das Engagement, die Ratschläge und das Vertrauen, das mir entgegengebracht wurde.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich herzlich bei Prof. Irina Smirnova bedanken sowie Prof. Martin Kaltschmitt für den Vorsitz des Prüfungsausschusses.

Des Weiteren möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung durch das Ministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen der Projekte BIO-CHEM und ELBE-NH bedanken. Im Rahmen der Projekte gilt mein Dank den jeweiligen Projektpartnern für die fruchtbare Diskussion, die tolle Zusammenarbeit und Hilfestellungen bei Experimenten.

Zudem möchte ich mich bei meinen Studenten Tom, Nikolai, Jonathan, Razan, Aakashka, Alagappan, Belkis, Melisa und Gauri bedanken für die Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten. Weiterhin gilt mein Dank allen ehemaligen und aktuellen Arbeitskollegen, für die arbeitsrelevanten und nicht-arbeitsrelevanten Gespräche, die außerbetrieblichen Treffen und die abwechslungsreiche und spannende Zeit am Institut.

Zudem gilt ein großer Dank meinen Freunden, die für willkommene Abwechslung von der Forschung sorgten und mich den Laboralltag vergessen ließen.

Schlussendlich möchte ich mich bei meinen Eltern, Geschwistern, Großeltern und Nina für ihre uneingeschränkte Liebe, Zuneigung und Unterstützung bedanken. Auch in schwierigen Zeiten kann ich mich immer auf euch verlassen.

Formel- und Symbolzeichen

c_{end}	finale Konzentration	mol L^{-1}
c_{ini}	initiale Konzentration	mol L^{-1}
c_p	Konzentration des Produkts	g L^{-1}
c_s	Konzentration des Substrats	g L^{-1}
$c_{s,ein}$	Konzentration des zugeführten Substrats	g L^{-1}
c_x	Konzentration der Biomasse	g L^{-1}
I	Stromstärke	A
F	Faraday Konstante	$96485 \text{ A s mol}^{-1}$
F_{ein}	Feedvolumenstrom	L h^{-1}
K_S	Affinitätskonstante	g L^{-1}
$\dot{m}_{i,aus}$	abgeführter Massenstrom	kg h^{-1}
$\dot{m}_{i,ein}$	zugeführter Massenstrom	kg h^{-1}
N	Anzahl der Membranpaare	
Q_s	volumetrische Substrataufnahmerate	$\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$
Q_p	volumetrische Produktbildungsrate	$\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$
q_s	spezifische Substrataufnahmerate	$\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$
q_p	spezifische Produktbildungsrate	$\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$
r_i	Reaktionsrate der Komponente i	
t	Zeit	s
U	Spannung	V
V_R	Volumen des Reaktionsmediums	L
$Y_{X/S}$	Biomasseausbeutekoeffizient	g g^{-1}
z	Wert der Ladung	-

ξ	Stromausbeute	%
μ	Wachstumsrate	h^{-1}
μ_{max}	maximale Wachstumsrate	h^{-1}
Ω	Widerstand	Ω

Abstract

Organic acids serve as important building blocks in the chemical industry. They include, among others, propionic acid, which is used in several branches of the chemical industry such as pharmaceutical, plastics as well as food and feed. Up to date, there is no fermentation-based industrial production of propionic acid but only via petrochemical reactions. As fossil sources are declining, sustainable processes relying on regrowing substrates have to be explored and exploited. Therefore, a microbial fermentation was developed using a defined mixture of anaerobic bacteria. However, anaerobic fermentation for organic acid generation suffers from low titers, yields, byproduct formation and product inhibition by the generated organic acids. In order to prevent inhibiting concentrations of the produced acids, a modified electro dialysis was coupled with the fermentation in such a way that the organic acids were removed regularly from the bioreactor. The special feature about the electro dialysis are the membranes which can only be penetrated by monovalent ions and the possibility to change the polarity of the electrodes. Therefore, the direction of the ion flux inside the electro dialysis unit can be alternated. This results in anti-fouling mechanisms as deposits on the membranes can be removed by this polarity reversal.

For the transformation of the substrate to propionic acid, a route via lactic acid as an intermediate substrate was taken. As lactic acid fermentation is a well-established process, many bacteria and a resulting broad substrate spectrum are available, capable of producing lactic acid at high productivity and yield. As substrate carbohydrates such as glucose, xylose and fructose stemming from lignocellulosic or food residues were used. The process of the sugar transformation was executed by *Bacillus coagulans*, a bacteria which produces lactic acid from sugars via homofermentative pathway. The subsequent production of propionic acid from lactic acid was carried out by *Veillonella criceti* whereas acetic acid is created as a byproduct.

The combination of the electro dialysis unit with the fermentation showed an improvement in yield and productivity compared to a process without the application of the electro dialysis unit. In parallel, different substrates stemming from lignocellulosic residues were tested for their applicability. It was found that lignocellulosic hydrolysates can be very well used to generate propionic acid either from glucose or xylose.

Additionally, the lactic acid based production platform was expanded in order to

generate medium chain carboxylic acids such as valeric acid and hexanoic acid. For this purpose, *Bacillus coagulans* was combined with the bacteria *Megasthaera cerevisiae* which can generate these acids via the reversed *beta* oxidation starting from lactic acid. This process was coupled with the electro dialysis and scaled-up to pilot plant scale. For this purpose, as substrate hydrolyzed cabbage residues rich in glucose and fructose were used and subsequently transformed to valeric acid and hexanoic acid.

Kurzzusammenfassung

Organische Säuren sind in der chemischen Industrie wichtige Bausteine. Dazu zählt unter anderem die Propionsäure, welche im pharmazeutischen Bereich, in der Polymerproduktion sowie im Nahrungs- und Futtermittelsektor Anwendung findet. Bis heute existiert allerdings kein Herstellungsprozess für Propionsäure, der auf der Fermentation nachhaltiger Rohstoffe basiert. Stattdessen wird für die Produktion auf klassische Petrochemie zurückgegriffen, ausgehend von Öl und Gas. Da jedoch die Verfügbarkeit dieser fossilen Energieträger stetig abnimmt, müssen Wege gefunden werden, diese endlichen Substrate durch nachwachsende zu ersetzen. Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Fermentationsprozess zur Propionsäureproduktion, basierend auf einer definierten Mischkultur anaerober Bakterien, entwickelt. Allerdings zeichnen sich anaerobe Fermentationsprozesse zur Gewinnung organischer Säuren durch geringe Produktivitäten, geringe Produkttiter, Bildung von Nebenprodukten sowie geringe Ausbeuten aus. Zudem tritt aufgrund der Bildung der organischen Säuren eine Hemmung der Fermentation auf. Um der Inhibierung durch die Produkte vorzubeugen, wurde eine modifizierte Elektrodialyse mit der Fermentation gekoppelt, so dass die organischen Säuren regelmäßig aus dem Reaktionsmedium entfernt werden können. Das Besondere an der Elektrodialyse sind die darin verbauten Membranen, die ausschließlich von monovalenten Ionen passiert werden können, sowie die Fähigkeit der Elektroden, die Polarität zu wechseln. Aus dem Wechsel der Polarität folgt die Veränderung der Flussrichtung der Ionen innerhalb des Elektrodialysemoduls, wodurch etwaige Ablagerungen an den Membranen abgelöst werden können und Fouling vermieden werden kann.

Für die Umwandlung des Substrats zu Propionsäure wurde ein Prozess entwickelt, der auf Milchsäure als Zwischensubstrat aufbaut. Die Milchsäure Fermentation ist ein etablierter Prozess, so dass eine Vielzahl von Bakterien bekannt ist, die in der Lage sind, verschiedenste Ausgangssubstrate mit einer hohen Produktivität und Ausbeute zu Milchsäure umzuwandeln. Als Substrate werden hierbei Zuckermomere wie beispielsweise Fructose, Glucose und Xylose eingesetzt. Der Vorgang der Umwandlung der Zucker zu Milchsäure wird von dem Mikroorganismus *Bacillus coagulans* durchgeführt, der mittels homofermentativem Stoffwechselweg die Milchsäure generieren kann. Die daran anschließende Aufnahme der Milchsäure und deren Transformation zu Propionsäure wird durch das Bakterium *Veillonella criceti* erfüllt, wobei Essigsäure, bedingt durch

den Stoffwechsel, als Nebenprodukt erzeugt wird. Die Kombination aus Elektrodialyse und Fermentation zeigte, dass durch diesen Aufbau die Ausbeute an Propionsäure und die Produktivität gesteigert werden konnte.

Daran anschließend wurden für die Fermentation Zuckermonomere getestet, die aus Lignocellulose gewonnen werden konnten. Dabei stellte sich heraus, dass dies möglich ist und somit aus echten nachwachsenden Rohstoffen Propionsäure erzeugt werden kann. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk darauf gelegt, dass möglichst alle Bestandteile der Lignocellulose mikrobiell verwertet werden. Schlussendlich wurde diese Plattformtechnologie, basierend auf Milchsäure als Zwischensubstrat, auf mittelkettige organische Säuren, wie beispielsweise Valeriansäure und Hexansäure, übertragen. Dazu wurde das Bakterium *B. coagulans* mit dem anaeroben Bakterium *Megasphaera cerevisiae* kombiniert, welches mittels der umgekehrten *beta* Oxidation, ausgehend von Milchsäure, diese mittelkettigen Säuren herstellen kann. Dieser Prozess wurde final mit der Elektrodialyse gekoppelt und in den Pilotmaßstab vergrößert. Als Substrat diente dabei ein Hydrolysat aus Abfällen von Blumenkohl, reich an Fructose und Glucose.

1 Einleitung

Im Zuge der voranschreitenden Verknappung der fossilen Ressourcen ist es notwendig, Prozesskonzepte zu erforschen, die darauf abzielen, die chemische Industrie zu biologisieren. Dies bedeutet, dass Produkte der chemischen Industrie, die bis dato aus endlichen Rohstoffen, wie beispielsweise Erdöl und Erdgas produziert werden, möglichst nachhaltig und ökologisch generiert werden sollen. Dieses Konzept der Produktion von Gütern auf eine nachhaltige Art und Weise mit einem besonderen Augenmerk auf Umwelt- und Ressourcenschonung bezeichnet man als Bioökonomie. Im Jahr 2009 wurde deswegen der Bioökonomierat ins Leben gerufen, der sich mit den fünf zentralen Handlungsfeldern der Bioökonomie befasst [62]. Diese sind wie folgt definiert:

- Weltweite Ernährung sichern
- Agrarproduktion nachhaltig gestalten
- Gesunde und sichere Lebensmittel produzieren
- Nachwachsende Rohstoffe industriell nutzen
- Energieträger auf Basis von Biomasse ausbauen

Diese biologische Ökonomie eröffnet zudem die Möglichkeit der Kreislaufwirtschaft. Dabei wird nicht nur ausschließlich die Produktion betrachtet, sondern auch die Verwertung der erzeugten Produkte nach deren Lebensende und die Rückführung der darin enthaltenen Rohstoffe in den Materialkreislauf. Im Gegensatz dazu steht die lineare Wirtschaft, die auf endlichen fossilen Rohstoffen beruht, die zu Produkten umgewandelt werden und nach ihrer Lebensdauer als nicht verwendbarer Müll verbleiben.

Besonders die Wertschöpfung von Strömen, die üblicherweise als Abfall behandelt werden, kann durch Biotechnologie bewerkstelligt werden. Zu diesen Rohstoffen kann man in Europa insbesondere die Lignocellulose zählen, die in Form von Holz, Reststoffen der Agrarindustrie und verholzten Gräsern in großer Menge verfügbar ist. Diese Plattformtechnologie, basierend auf Lignocellulose, wird als Bioraffinerie der zweiten Generation bezeichnet [35]. Bereits jetzt existieren Verfahren, die die Lignocellulose in ihre Grundbausteine spalten können. Dabei entstehen Lignin, Hexosen und Pentosen. Ausgehend von diesen Stoffen kann

durch biologische oder chemische Katalyse eine Vielzahl von Grundchemikalien nachhaltig erzeugt werden [45]. Die Energiebehörde der USA veröffentlichte in diesem Rahmen eine Liste von 10 Plattformchemikalien, die aus Biomasse gewonnen werden können und als Intermediate für wertvollere Chemikalien dienen [11]. Dazu zählt beispielsweise Milchsäure, aus der durch chemische Katalyse Acrylsäure, Propylenglycol, Milchsäureester und Lactide gebildet werden können [83].

Die Umstellung etablierter industriell Prozesse auf nachhaltige und umweltverträgliche Prozesse gestaltet sich aber herausfordernd, da geeignete Mikroorganismen identifiziert und anschließend maßgeschneiderte Fermentations- und Reinigungsstrategien entwickelt und validiert werden müssen. So gilt es, Mikroorganismen zu finden, die kein Sicherheitsrisiko für den Menschen und für die Umwelt darstellen. Weiterhin ist darauf zu achten, dass möglichst günstige und in großer Menge vorhandene Substrate verwendet werden können, die in keiner Konkurrenz zur Nahrungsmittelgewinnung stehen. Darüber hinaus ist das Reinigungsprozedere der Zielsubstanz (*Downstream Processing*) der wichtigste Faktor im gesamten Produktionsprozess. Dieser Schritt stellt einen der größten Kostenfaktoren dar und muss für jedes Produkt individuell gestaltet werden. Hierfür ergeben sich somit auch verschiedene prozentuale Kostenanteile. Diese betragen für bulk Chemikalien ca. 20 - 40 % der Gesamtkosten [81]. Deswegen ist es notwendig, das gesamte Downstream Processing so einfach wie möglich zu halten und bereits bei der Fermentation mögliche Herausforderungen für den Reinigungsprozess im Auge zu behalten.

2 Zielsetzung und Motivation

Im Zuge der Biologisierung der chemischen Industrie wird es vonnöten sein, die Produktion von Grundchemikalien, wie zum Beispiel organische Säuren nachhaltig zu gestalten. Im Laufe der letzten Jahrzehnte ist dahingehend eine intensive Forschungstätigkeit zu verzeichnen, jedoch werden bislang nur Zitronensäure, D-Gluconsäure, Itaconsäure, 2-Keto-L-Gluconsäure und Milchsäure im großtechnischen Maßstab industriell hergestellt [49]. Deswegen soll mit dieser Arbeit ein Prozess etabliert werden, der darauf abzielt, die Produktion von Propionsäure zu bewerkstelligen. Bisher ist die fehlende Etablierung eines biotechnologischen Prozesses vor allem auf die Wirtschaftlichkeit zurückzuführen, so kostet die Produktion eines kg Propionsäure mit petrochemischen Verfahren einen US-Dollar, während es bei der biotechnologischen Produktion bereits zwei US-Dollar sind [47].

Die biotechnologische Produktion von Propionsäure unterliegt den typischen Herausforderungen bei der anaeroben Produktion organischer Säuren, die wie folgt lauten:

- Produktinhibierung durch Propionsäure
- Bildung unerwünschter Nebenprodukte
- geringe Produktkonzentration

In dieser Arbeit soll die Bewältigung dieser Herausforderung anhand der Kombination von *in-situ* product removal (ISPR) und definierten Mischkulturen gelingen. Hierzu sollte ein Prozesskonzept entwickelt werden, bei dem Milchsäure als Zwischensubstrat verwendet wird und die Milchsäure anschließend zu Propionsäure umgewandelt wird. Dafür wurden kommerzielle sowie reale Substrate untersucht. Zudem wurde ein besonderes Augenmerk auf die Nachhaltigkeit gelegt, so dass möglichst nur Substrate verwendet wurden, die in anderen Prozessen als Nebenströme generiert werden und bisher nur wenig Beachtung fanden. Zunächst wurden die dafür eingesetzten Mikroorganismen einzeln charakterisiert. Parallel dazu wurde die Elektrodialyse definiert und auf die Prozessbedingungen angepasst. Anschließend wurden die Bakterien in definierten Mischkultur fermentiert und mit der Elektrodialyse gekoppelt. Definierte Mischkulturen wurden deswegen gewählt und der Umweg über Milchsäure in Kauf genommen,

da die Mehrzahl der propionsäureproduzierenden Bakterien ein eingeschränktes Substratspektrum und vergleichsweise niedrige Wachstumsraten besitzen [73]. Demgegenüber gibt es eine Vielzahl von intensiv erforschten milchsäureproduzierenden Bakterien, die eine Vielzahl an Kohlenstoffquellen verstoffwechseln können. Abschließend wurde der entwickelte Prozess adaptiert, um auch mittelkettige organische Säuren durch dieses Verfahren zu generieren.

3 Theorie

3.1 Biologische Produktion organischer Säuren und deren Aufarbeitung

3.1.1 Industrielle Produktion organischer Säuren

Organische Säuren sind wichtige Grundchemikalien, die in fast allen Bereichen der chemischen Industrie benötigt werden. Allerdings wird bisher nur ein Bruchteil der benötigten organischen Säuren im industriellen Maßstab mittels Biotechnologie produziert. Diese sind Milchsäure, Essigsäure, Gluconsäure, Itaconsäure und Zitronensäure [76]. Jedoch sind nicht alle benötigten organischen Säuren mittels biotechnologischen Mitteln zu produzieren. Deswegen ist es notwendig, chemische Moleküle biotechnologisch zu erzeugen, die durch ihre Eigenschaften, beispielsweise durch funktionale Seitengruppen, zu anderen wertvollen Chemikalien umgewandelt werden können. Organische Säuren können diese Aufgabe erfüllen, und nicht zuletzt sind in der Liste des US Department of Energy 9 organische Säuren unter den insgesamt 12 Chemikalien, die aus einem zuckerähnlichen Substrat generiert werden können und als Plattformchemikalien Verwendung finden können [76].

Die Produktion der Zitronensäure ist ein lange etablierter Prozess, der auf der Fermentation des Pilzes *Aspergillus niger* basiert, wobei zuckerhaltige Reststoffe wie beispielsweise Molasse als Substrat verwendet werden können [9]. Dabei werden im industriellen Maßstab Konzentrationen von bis zu 140 g L^{-1} erreicht [74]. Ähnlich wie die Produktion von Zitronensäure erfolgt die Herstellung von Itaconsäure, welche durch den Mikroorganismus *Aspergillus terreus* synthetisiert wird, ausgehend von kohlenstoffreichen Substraten wie beispielsweise Melasse oder Stärkehydrolysate [74]. Dabei wird ein Produkttiter von bis zu 70 g L^{-1} erreicht. Beide biotechnologischen Prozesse werden industriell eingesetzt. Eine Produktion aus fossilen Rohstoffen wird nicht mehr durchgeführt [76].

Anders stellt sich dies bei der Bernsteinsäure (Butandisäure) dar. In den letzten 30 Jahren wurde viel Forschungsleistung in die Verfahrensentwicklung zur Bernsteinsäureproduktion investiert. Bernsteinsäure ist als Chemikalie interes-

sant, da durch die beiden endständigen Carboxylgruppen ein breites Spektrum für weitere chemische Modifikationen besteht. Dies ist insbesondere für die Herstellung von Kunststoffen vorteilhaft, da durch die funktionalen Gruppen eine Ketten- beziehungsweise Quervernetzung erfolgen kann. Obwohl ein Prozess Anfang der 2010er Jahre entwickelt wurde, mit dem Bernsteinsäure auf biotechnologischem Weg produziert und kommerzialisiert werden konnte, wurde dieses Unterfangen Ende der 2019 wieder beendet. Das Aufkommen von Schieferöl machte die petrochemische Herstellung von Bernsteinsäure wirtschaftlich deutlich günstiger durchführbar als die biotechnologische [52] [8].

Beispielhaft sind nachfolgend einige organische Säuren in Tabelle 3.1 aufgeführt, welche großtechnisch produziert werden können und das Stadium der Laborentwicklung verlassen haben.

Tabelle 3.1: Biotechnologische Produktion organischer Säuren im industriellen Maßstab

Säure	Organismus	Titer, g L ⁻¹	Substrat	Referenz
Milchsäure	<i>Lactobacillus</i> spp.	bis zu 180	Glucose	[74]
Bernsteinsäure	rekomb. <i>E. coli</i>	99	Glucose	[74]
Gluconsäure	<i>Aspergillus niger</i>	bis zu 250	Glucose	[86]
Zitronensäure	<i>Aspergillus niger</i>	150 - 200	Sucrose, Glucose	[86]

3.1.2 Aufarbeitung von biotechnologisch gewonnenen organischen Säuren

Ein biotechnologischer Prozess lässt sich in zwei Teile zerlegen. Dabei bezeichnet man die Umwandlung eines Substrates mittel Mikroorganismen als das *upstream processing* (USP). Den Teil, der die gesamten Prozessschritte beinhaltet, ein oder mehrere Zielprodukte aus der Fermentationslösung zu isolieren und konzentrieren, bezeichnet man als *downstream processing* (DSP). Grundsätzlich beinhaltet der gesamte DSP Prozess die folgenden übergeordneten Schritte:

- Abtrennung
- Isolierung
- Konzentration
- Formulierung

Zuerst werden feste Bestandteile aus der Fermentationsbrühe entfernt, beispielsweise Zellen, Zelltrümmer und nicht-lösliche Stoffe. Hierzu stehen Verfahren

wie Filtration, Zentrifugation, Sedimentation oder Flockung zur Verfügung. Anschließend erfolgt die gezielte Abtrennung der in der Fermentationsbrühe verbliebenen gelösten Substanzen, die sich physikalisch und chemisch von dem Zielprodukt unterscheiden. Dazu werden die Filtration (insbesondere Ultrafiltration), Fällung, Extraktion oder Adsorption verwendet. Anschließend erfolgt die Konzentrierung und die Reinigung des Zielprodukts. Hierfür müssen Verfahren verwendet werden, die speziell für die gewünschte Substanz geeignet sind, da in diesem Schritt die Zielsubstanz von Stoffen getrennt werden muss, die ähnliche chemische und physikalische Eigenschaften aufweisen. Angewandte Verfahren für diesen Schritt sind die partielle Fällung, Chromatographie und Kristallisation. Abschließend erfolgt die Formulierung des Zielprodukts, so dass das Produkt wünschenswerterweise als Feststoff vorliegt. Dies kann durch Trocknung oder Kristallisation erfolgen. Alle diese Verfahrensschritte müssen sorgsam ausgewählt werden und bedürfen experimenteller Verifikation. Ein Hauptaugenmerk bei der Auswahl sollte zudem darauf gelegt werden, dass von Schritt zu Schritt das zu verarbeitende Volumen reduziert und somit die Konzentration des Zielprodukts stetig zunimmt.

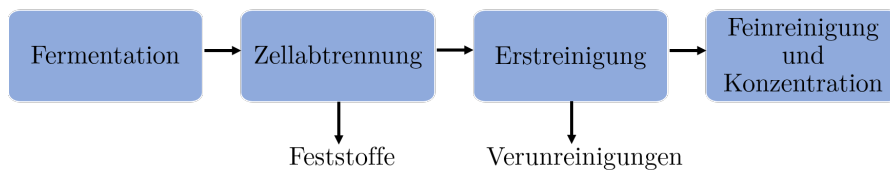


Abbildung 3.1: Allgemeines Schema für das *Downstream processing* zur Gewinnung von organischen Säuren aus Fermentationsbrühe

Im speziellen Fall von organischen Säuren verändert sich das DSP Schema dahingehend, dass zuerst die Fermentationsbrühe filtriert, die Färbung beseitigt, das Salz aufgebrochen und durch Verdampfung der Wassergehalt reduziert werden muss. Anschließend kommt eine Kombination weiterführender Reinigungstechniken zum Einsatz, wie beispielsweise die Chromatographie [49]. Das generelle Schema zur Abtrennung und Reinigung von organischen Säuren aus fermentativer Produktion ist in Abbildung 3.1 zu sehen. In der Literatur ist für die Abtrennung der organischen Säuren aus der partikelfreien Fermentationsbrühe die Extraktion am häufigsten beschrieben und generiert die vielversprechendsten Resultate. Die Extraktion ist ein Trennverfahren, bei dem unter Zuhilfenahme eines Extraktionsmittels aus einem Gemisch eine Substanz gezielt abgetrennt wird. Dabei wird die Phase, in der sich die Zielsubstanz befindet mit einer zweiten Phase in Kontakt gebracht. Im Fall von Fermentationsbrühe (wässrige Phase) wird diese mit einer organischen Phase vermischt. Nach Durchmischen und anschließender Zeit für die Phasentrennung bildet sich ein Zwei-Phasen-Gemisch

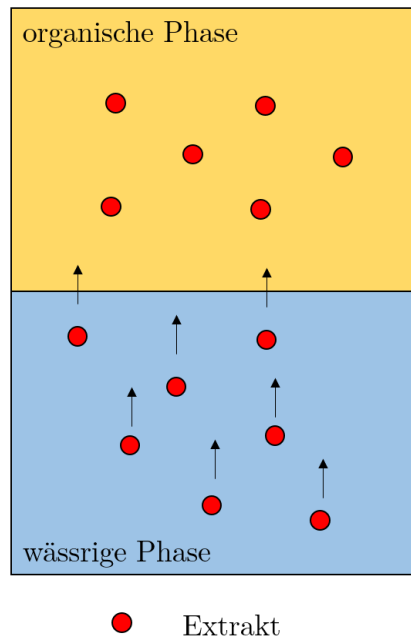


Abbildung 3.2: Schema der Extraktion

aus. Abhängig von den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Zielsubstanz und der organischen Phase geht die Zielsubstanz aus der wässrigen in die organische über. Der Vorgang der Extraktion ist in Abbildung 3.2 zu erkennen.

Als Extraktionsmittel der Wahl für organische Säuren haben sich verzweigte Amine, wie beispielsweise Trioctylamin (TOA) bewährt. TOA (Abbildung 3.3) ist ein tertiäres Amin und besitzt am zentralen Stickstoffatom ein freies Elektronenpaar. Durch dieses freie Elektronenpaar ist es TOA möglich, mit der protonierten Carboxylgruppe eine chemische Bindung einzugehen. Dies bedeutet, dass der pH der Fermentationsbrühe unter dem pK_s Wert der Säure liegen muss, so dass diese undissoziiert vorliegt. Allerdings muss das TOA mit einem langkettigen Alkohol gemischt werden wie beispielsweise Octanol, um die Viskosität herabzusetzen. Bei der Auswahl der Lösemittel ist auf die Toxizität der eingesetzten Substanzen zu achten, da ansonsten eine *in-situ* Extraktion die Fermentation zum Erliegen bringen würde.

Allerdings stellen die Reinigung und Abtrennung von organischen Säuren mittels Extraktion eine Herausforderung dar, da die Säuren, abhängig vom pH Wert in deprotonierter oder protonierter Form vorliegen. Hier wird näher auf Essigsäure sowie Propionsäure eingegangen, da diese beiden Säuren den Schwerpunkt der durchgeführten Untersuchungen bilden. So besitzt Essigsäure einen pK_s von

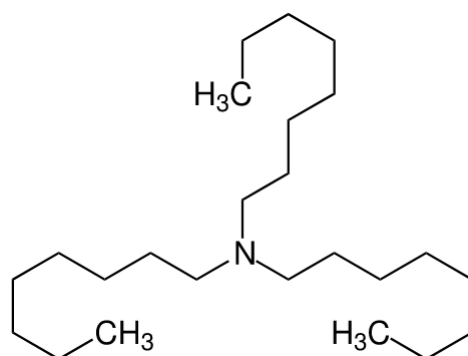


Abbildung 3.3: Struktur von TOA

4,76 und Propionsäure von 4,87. Da die Fermentation, aufgrund des pH Optimums der beteiligten Bakterien, normalerweise bei einem pH zwischen 6 und 7 vonstattengeht, liegen die organischen Säuren als Ion vor. Zudem bilden sich durch das Vorhandensein von Kalium und Natrium die entsprechenden Salze. Eine thermische Trennung bedingt deswegen das Ansäuern, so dass die protonierte Form entsteht, was jedoch mit der externen Zugabe von Säure verbunden ist. Die anschließende thermische Trennung ist allerdings durch die ähnlichen Siedepunkte von Essigsäure (118 °C) und Propionsäure (141,2 °C) nur mit hohem apparativem Aufwand und Energieeintrag durchführbar.

Die Extraktion ist aber nicht für alle organische Säuren die beste Technik, um die Säuren aus der Fermentationsbrühe abzutrennen. Hierin liegt auch die Schwierigkeit beim DSP von organischen Säuren, da für jede Säure individuell bestimmt werden muss, welche Technik die besten Resultate liefert. Ein Patentrezept für die Abtrennung und Reinigung von organischen Säuren besteht bisher nicht. So wird beispielsweise bei der Aufarbeitung von biotechnologisch erzeugter Bernsteinsäure die Kristallisation angewandt; allerdings existieren auch Prozesse, die auf der *simulated moving bed* (SMB) Technologie beruhen [43][42][49]. Die Kristallisation wird ebenso bei der Reinigung von Itaconsäure im industriellen Maßstab verwendet [57]. Für die großskalige Produktion von Gluconsäure wird ein starker Kationentauscher verwendet und die daraus erhaltene Säure durch Verdampfung des Wassers konzentriert [49].

Diese drei Beispiele zeigen, dass ein einheitlicher *downstream* Prozess für die Reinigung von organischen Säuren nicht existiert und je nach gewünschtem Zielprodukt das Schema und die Verknüpfung der einzelnen Technologien sorgsam ausgewählt werden müssen. Das Beispiel der Bernsteinsäure zeigt jedoch auch, dass im industriellen Umfeld bestehende Prozesse nur dann auf biotechnologische Verfahren umgestellt werden, wenn dadurch keine Kostensteigerung ent-

Tabelle 3.2: Aufarbeitung biotechnologisch erzeugter organischer Säuren

Säure	Verfahren	Referenz
Essigsäure	Direkte Verwendung als Speiseessig Extraktion	[61]
Propionsäure	Extraktion Ionentausch	[39] [38]
Buttersäure	Extraktion Adsorption	[16] [49]
Milchsäure	Fällung mit $Ca(OH)_2$ SMB Chromatographie	[21] [49] [86]
Bernsteinsäure	Kristallisation SMB Chromatographie Ionentausch	[49]
Gluconsäure	Kristallisation Ionentauschchromatographie	[74] [86]
Zitronensäure	Fällung mit $Ca(OH)_2$ SMB Chromatographie Extraktion mit Aminen	[49] [74]

steht. In Tabelle 3.2 sind ausgewählte organische Säuren aufgeführt, die biotechnologisch erzeugt werden. Darüber hinaus sind die am häufigsten verwendeten Verfahren zur Produktgewinnung vermerkt.

3.2 Propionsäure

Propionsäure (Propansäure) ist eine farblose, stechend riechende organische Säure mit der Summenformel $C_3H_6O_2$. Sie zählt zu den sogenannten flüchtigen Fettsäuren oder VFAs (volatile fatty acids) und ist ein typisches Produkt bei anaeroben Abbauprozessen. In Tabelle 3.3 sind die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Propionsäure zusammengefasst.

Tabelle 3.3: Eigenschaften von Propionsäure

Eigenschaft	Wert	Einheit
Molmasse	78,08	g mol ⁻¹
Aggregatzustand	flüssig	-
Schmelzpunkt	21	°C
Siedepunkt	141	°C
Dichte	0,99	g cm ⁻³
pK_S	4,87	-
Viskosität	10	mPa s

Die industrielle Darstellung der Propionsäure kann durch mehrere verschiedene Verfahren bewerkstelligt werden. Beispielsweise kann hierfür der Reppe-Prozess oder die Oxidation von Propionalaldehyd angewandt werden. Diese beiden Verfahren werden heutzutage großtechnisch eingesetzt und haben aufgrund der Effizienz andere, nun historische, Verfahren zur Gewinnung der Propionsäure verdrängt. Allerdings sind beide Prozesse wegen der benötigten Temperaturen und Drücke energieintensiv.

In Abbildung 3.4 ist die Gleichung des Reppe Prozesses zu sehen, mit dem beispielsweise die BASF Propionsäure generiert. Neben der Verwendung eines Nickelkatalysators sind Drücke zwischen 100 - 300 bar sowie eine Temperatur zwischen 250 °C und 300 °C notwendig [75].

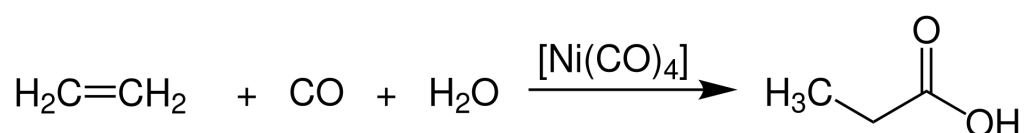


Abbildung 3.4: Reppe Prozess zur Gewinnung von Propionsäure

Bei der Oxidation von Propionalaldehyd (Propanal) ist ein metallbasierter Katalysator notwendig, wie in Abbildung 3.5 zu erkennen ist. Das Propanal entsteht dabei als Nebenprodukt bei der n-Propanol Gewinnung und steht deswegen kostengünstig zur Verfügung. Diese Reaktion verläuft zwar bei milden Temperaturen (40 °C - 50°C) und Umgebungsdruck, allerdings benötigt die Produktion von n-Propanol einen Druck zwischen 200 und 280 bar sowie eine Temperatur

zwischen 130 °C und 150 °C [75].

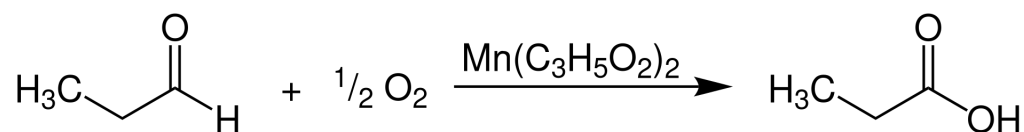


Abbildung 3.5: Oxidation von Propionalaldehyd zur Propionsäuregewinnung

3.2.1 Biotechnologische Propionsäuregewinnung

Propionsäure wird im Stoffwechsel von Bakterien über den Methyl-Malonyl-CoA (MMC) oder Acryloyl-CoA (AC) Syntheseweg produziert. Bakterien, die den MMC Stoffwechselweg nutzen, sind zum Beispiel *Propionibacterium spec.*, *Veillonella spec.* und *Selemonas ruminantium*. Der AC Stoffwechselweg wird beispielsweise von *Clostridium propionicum* genutzt [30]. Grundsätzlich ergibt sich für den MMC und den AC Stoffwechselweg die folgende Reaktionsgleichung:



Zuerst wird, wie in Abbildung 3.6 beim MMC Stoffwechselweg zu sehen, Laktat aufgenommen und mittels einer Laktatdehydrogenase zu Pyruvat transformiert. Pyruvat wird entweder über Acetyl-CoA zu Acetat abgebaut, wobei ATP (Adenosintriphosphat) und CO_2 gebildet werden, oder reagiert über eine Transcarboxylase zu Oxalacetat. Oxalacetat wird anschließend katalysiert durch eine Malatdehydrogenase zu Malat. Dieses wird dann über eine Fumarase in Fumarat umgewandelt. Fumarat reagiert dann mittels Fumaratreduktase zu Succinat, welches wiederum zu Succinyl-CoA reagiert. Succinyl-CoA wird nachfolgend durch eine Coenzym B12 abhängige Methylmalonyl-CoA-Mutase zu Methylmalonyl-CoA abgebaut, welches durch eine Transcarboxylase zu Propionyl-CoA reagiert. Schlussendlich wird Propionyl-CoA zu Propionsäure verstoffwechselt. Jedoch kann eine reversible Bildung von Succinyl-CoA aus Propionyl-CoA erfolgen, die durch eine CoA-Transferase katalysiert wird [26].

Im Fall des Acryloyl-CoA-Stoffwechselweges verläuft die Bildung von Acetat aus Laktat analog zum MMC Syntheseweg. Allerdings wird auf dem Weg der Propionatbildung Laktat zunächst zu Lactyl-CoA umgewandelt und dieses anschließend, katalysiert durch eine Lactyl-CoA Dehydrogenase, zu Acryloyl-CoA abgebaut. Das Acryloyl-CoA reagiert danach zu Propionyl-CoA mittels Acryloyl-CoA-Reduktase und weiter zu Propionat mittels CoA-Transferase. Das CoA, das im letzten Schritt von Propionyl-CoA abgespalten wird, dient danach als CoA-Donor für die Laktataktivierung [26].

Der AC Weg liefert für *Clostridium propionicum* 0,33 mol ATP pro mol Laktat. Die gleiche Ausbeute verzeichnet *Veillonella parvula*, das den MMC Stoffwechsel verwendet. Eine deutlich höhere Ausbeute an ATP pro mol Laktat erreicht *Propionibacterium freudenreichii* mit 0,78 mol ATP pro mol Laktat unter Anwendung des MMC Stoffwechsels. Propionibakterien erreichen deswegen die höchsten Biomasseausbeuten, allerdings haben andere Bakterien, die eine geringere ATP Ausbeute besitzen, höhere Wachstums- und Substratverbrauchsrate. So beträgt beispielsweise die Wachstumsrate von *Propionibacterium freudenreichii* $0,12 \text{ h}^{-1}$ mit einer Substrataufnahmerate an Laktat von $20 \mu\text{mol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Im Vergleich dazu erreicht *Veillonella parvula* eine Wachstumsrate von $0,33 \text{ h}^{-1}$ und eine Laktataufnahmerate von $127 \mu\text{mol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ [77].

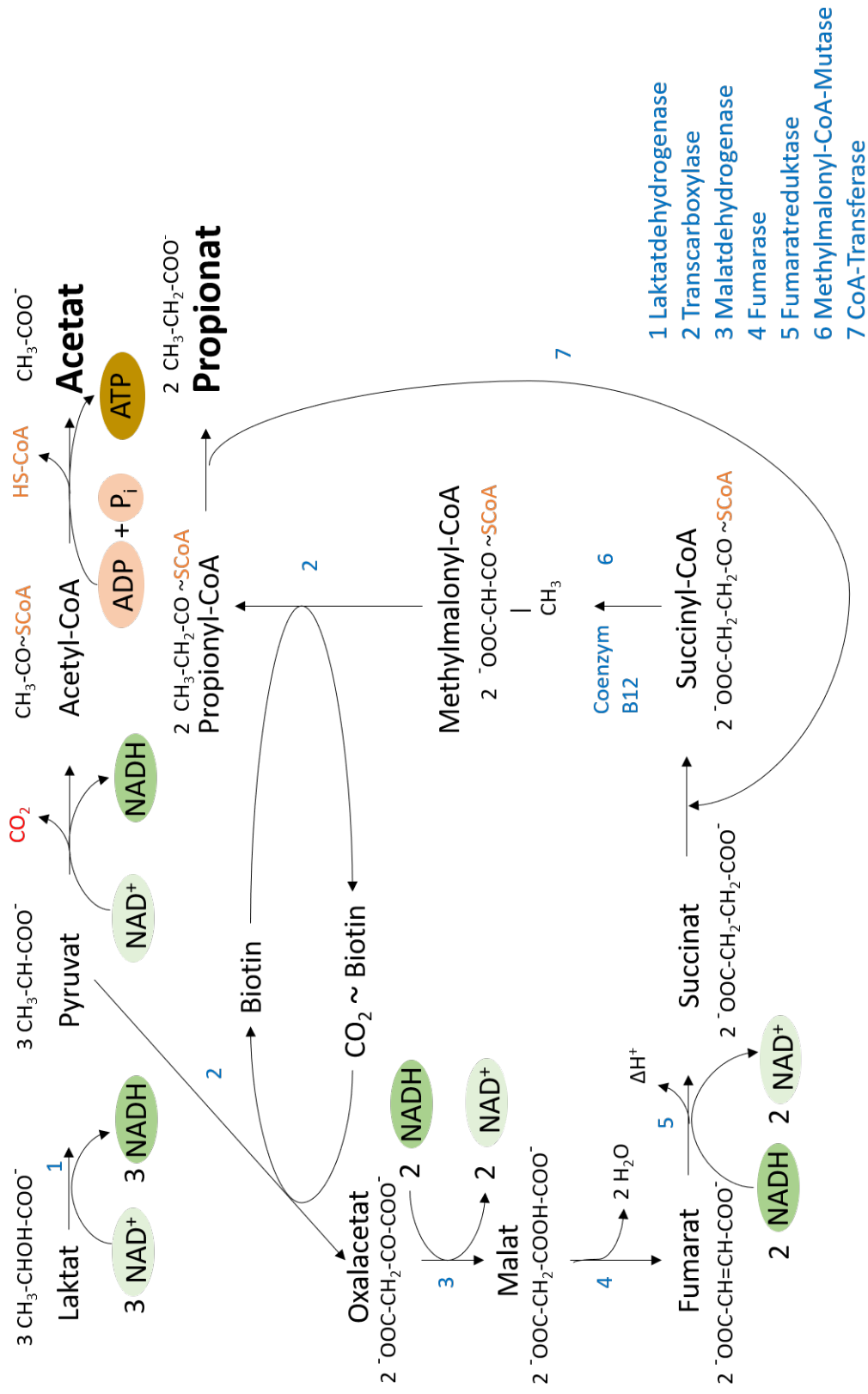


Abbildung 3.6: Methylmalonyl-Stoffwechselweg (adaptiert nach [26])

Bisher basiert der Großteil der Studien zur Untersuchung von propionsäureproduzierenden Bakterien auf Spezies der Gattung der Propionibakterien [2]. Das am häufigsten untersuchte Bakterium ist hierbei *Propionibacterium acidipropionici*. Der höchste Produkttiter von 106 g L^{-1} konnte in einem fed-batch Prozess mit Glycerol als Substrat über eine Dauer von 4 Monaten erreicht werden [91]. Jedoch ist eine Fermentationsdauer von 4 Monaten weder praktikabel noch wirtschaftlich. Im Fall einer batch Fermentation mit Laktat als Substrat wurde eine maximale Propionsäurekonzentration von 15 g L^{-1} und einer Produktivität von $0,11 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht [17]. Mit diesem Bakterium ist zudem die Verwendung eines Mischsubstrats aus Glucose und Glycerol möglich. Li *et al.* erreichten damit eine finale Produktkonzentration von $62,2 \text{ g L}^{-1}$ [44]. Der Reaktionsraum wurde dabei mit einer externen Adsorptionssäule gekoppelt, so dass eine kontinuierliche Entfernung der Propionsäure erfolgen konnte. Die erzielte Produktivität war hierbei $0,43 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Allerdings musste für die Erreichung dieser Konzentration die Fermentation für 170 h betrieben werden. Zudem sind Prozesse mit externen Säulen im Scale-Up hin zu einem industriellen Maßstab aufwendig. Ein weiteres untersuchtes Bakterium aus der Gattung der Propionibakterien ist *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. Dieses Bakterium kann Propionat direkt aus Glucose oder Glycerol produzieren, jedoch fallen hierbei Succinat und Acetat als Nebenprodukte an. Wang *et al.* untersuchten diesen Mikroorganismus und kamen zu dem Schluss, dass eine Fermentation mit den Co-Substraten Glucose und Glycerol die besten Resultate erzeugt. So wurde eine Propionatkonzentration von $19,4 \text{ g L}^{-1}$ bei einer Produktivität von $0,18 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht [85].

Eine erfolgreiche Anwendung einer Mischkultur zur Propionsäureproduktion zeigten Sabra *et al.*, die *Lactobacillus zaea* und *Veillonella criceti* mit hydrolysiertem Mehl als Substrat in einem fed-batch Verfahren kultivierten [73]. Dabei wurden ein Produkttiter und eine Produktivität von Propionsäure von 30 g L^{-1} beziehungsweise $0,33 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht. Außerdem wurde in dieser Studie festgestellt, dass es bereits mit der ersten Menge an gebildetem Propionat zu einer Inhibierungswirkung des Wachstums kommt und bei einer Propionatkonzentration von 20 g L^{-1} die Wachstumsrate von $0,3 \text{ h}^{-1}$ auf $0,2 \text{ h}^{-1}$ erniedrigt wurde. Die gleichen Mikroorganismen wurden zudem in einem Dialysereaktor untersucht, der eine räumliche Trennung der Bakterien ermöglicht, den Stoffaustausch über eine Membran aber trotzdem zulässt. Hierbei wurde, mit Glucose als Substrat, ein maximaler Propionattiter von 28 g L^{-1} bei einer Propionatproduktivität von $0,61 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt [20]. Diese Werte sind zwar höher als bei der Fermentation als Mischkultur, jedoch ist das Dialysesetup für eine großtechnische Produktion nicht geeignet. Grundsätzlich kann festgehalten werden, dass sich zwar mit *Propionibacterium* spp. höhere Produkttiter erreichen lassen,

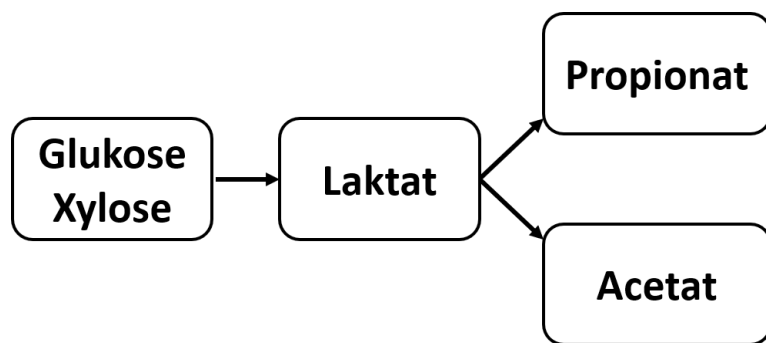


Abbildung 3.7: Fermentationsschema der Laktatplattform zur Produktion von Propionsäure

jedoch die Produktivität deutlich unter der von anderen Bakteriengattungen liegt.

3.3 Laktat als Plattformchemikalie

Laktat ist ein wichtiger Grundbaustein der chemischen Industrie. Es zählt mit einem prognostiziertem Marktvolumen von 8,8 Milliarden USD im Jahr 2025 zu den Chemikalien mit dem höchsten Volumen, die biotechnologisch hergestellt werden [31] [54]. Laktat ist attraktiv als Plattformchemikalie, da beginnend mit der Grundstruktur viele weitere Chemikalien entweder durch chemische oder biologische Synthese erzeugt werden können. Laktat kann beispielsweise zu Polylactid (PLA - poly lactic acid) und Brenztraubensäure durch Biokatalyse umgewandelt werden [23]. Des Weiteren können, ausgehend von Laktat, Oxalsäure, Acrylsäure, Acrylate, Propylenglycol oder Propylenoxide durch chemische Katalyse gewonnen werden [37]. Dies zeigt, dass bereits jetzt eine Vielzahl von chemischen Verbindungen aus biobasierter Milchsäure generiert werden kann. Neben der Verwendung als Zwischensubstrat ist Laktat auch als Endprodukt wertvoll, da es fast in der gesamten Bandbreite der chemischen Industrie, wie zum Beispiel in der Kosmetik, Pharmazie, Nahrungsmittelverarbeitung und Aromaproduktion Anwendung findet [63].

Vorteilhaft ist zudem bei der Verwendung von Laktat, dass das Verfahren zur Isolation der reinen Milchsäure aus der Fermentation vergleichsweise einfach ist. Dabei wird das Laktat in der Fermentation mit Calciumhydroxid gefällt und abfiltriert. Der erhaltene Feststoff wird anschließend mit Schwefelsäure behandelt, so dass sich die freie Milchsäure und Calciumsulfat (Gips) bilden [18]. Dieses Verfahren wird industriell angewandt, um die Milchsäure zu separieren und zu konzentrieren, allerdings entsteht dabei in äquimolarer Menge $Ca(SO_4)_2$, was

als Abfallstoff anfällt.

Hauptsächlich kommen bei der Fermentation für die Laktatgewinnung Milchsäurebakterien, wie zum Beispiel *Lactobacillus* zum Einsatz, die Hexosen zu Laktat umwandeln. Diese Bakterien sind aber in der Industrie, aufgrund der komplexen Anforderungen an die Nährstoffe und die erforderlichen milden pH Bedingungen nur schlecht anwendbar. So sollte der pH der Fermentation im Bereich von pH 5 bis 7 liegen. Dies führt aber dazu, dass Milchsäure in der dissoziierten Form vorliegt [76]. Deswegen wurden auch andere Mikroorganismen wie Pilze und Hefen untersucht. Bei der Verwendung des Pilzes *Rhizopus oryzae* konnte ein Produkttiter von 231 g L^{-1} bei einer Ausbeute von 0.92 g g^{-1} erreicht werden [88]. Allerdings ist in diesem Fall der erforderliche Eintrag von Sauerstoff ein Hindernis für den industriellen Gebrauch. Deswegen wurde von der Firma Cargill eine Hefe des Typus *Saccharomyces cerevisiae* so gentechnisch verändert, dass bei pH 3 135 g L^{-1} Laktat als freie Milchsäure gebildet wurde [54]. Die Toleranz gegenüber niedrigen pH Werten ist insofern von Vorteil, als die benötigte Menge zur Fällung des Laktats drastisch reduziert wird. Als Substrate kann zur Laktatproduktion außerdem ein breites Spektrum an Kohlenstoffquellen eingesetzt werden. Darunter fallen Reststoffe wie die organische Fraktion von Hausmüll, Maisstroh, Weizenstroh, Molke, Orangenschalen oder Reste der Holzverarbeitung [50] [51].

In Abbildung 3.7 ist das Schema für die Herstellung von Propionat zu erkennen, wie es in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde. Laktat steht dabei im Mittelpunkt des Prozesses. Zuerst wird dieses aus Kohlenhydraten, nämlich Zuckern, produziert und anschließend zu Propionat und Acetat umgewandelt. Der laktatbildende Schritt wird dabei von dem Mikroorganismus *Bacillus coagulans* ausgeführt. Der nachfolgende Schritt von *Veillonella criceti*. Das Bakterium *V. criceti* ist allerdings nicht in der Lage die Zucker aufzunehmen, sondern ausschließlich Laktat.

3.3.1 Laktatproduktion mit *Bacillus coagulans*

Bacillus coagulans zählt zu den am besten untersuchten milchsäurebildenden Bakterien. Die Eigenschaften, die *B. coagulans* für die Forschung so interessant machen, ist die Tatsache, dass das Bakterium Temperaturen bis zu $52 \text{ }^\circ\text{C}$ und in einem breiten pH Intervall zwischen 4 und 8 kultiviert werden kann, so dass die Möglichkeit der unsterilen Fermentation besteht [67]. Zudem kann das Bakterium eine Vielzahl an Zuckermolekülen, wie beispielsweise Glucose, Xylose, Arabinose und Ribulose verstoffwechseln. Hexosen sind dabei die präferierten Monomere, die über den Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) Stoffwechselweg zu

Laktat (> 97 % L-Laktat) abgebaut werden. In Abbildung 3.8 ist der Stoffwechselweg für den homofermentativen Abbau von Hexosen zu sehen. Pentosen werden über den Pentose Phosphat (PPP) und den Phosphoketolase (PKP) Stoffwechsel abgebaut [82]. Dabei werden Ausbeuten von mehr als 90 % für Xylose und Glucose erreicht [60]. So konnten beispielsweise in einer unsterilen Fermentation mit Glucose als Substrat eine Laktatkonzentration von 182 g L^{-1} bei einer Produktivität von $3,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und einer optischen Reinheit von 99,4 % (L-Laktat) erreicht werden [67]. Bei der Verwendung von Xylose als Substrat konnte eine Ausbeute von 98 % mit einer finalen Produktkonzentration von $80,8 \text{ g L}^{-1}$ erzielt werden [84]. Des weiteren konnte *B. coagulans* gentechnisch so modifiziert werden, dass anstatt L-Laktat ausschließlich D-Laktat gebildet wird. Dabei wurde Glucose mit einer Ausbeute von 98 % und bis zu einem Titer von 145 g L^{-1} verstoffwechselt, wobei eine optische Reinheit von 99,9 % erreicht wurde [92]. Darüber hinaus konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass sich die Milchsäureproduktion ausgehend von Biomasse leicht und effizient im Maßstab vergrößern lässt. Dies ist zudem auch mit Substraten möglich, die normalerweise als organische Abfallstoffe betrachtet werden. Ausgehend von der Pulpe der Kaffeebohne, die Schale der verzehrbaren Bohne, konnte mittels *B. coagulans* Laktat produziert werden. Dies konnte im 50 L Maßstab bei einer Produktivität von $4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und einer Ausbeute von $0,78 \text{ g Laktat pro g Zucker}$ bewerkstelligt werden. Neben der Fermentation zu Milchsäure wurde das Produkt gereinigt und konzentriert, was in einer Produktkonzentration von 937 g L^{-1} L-Laktat mit einer optischen Reinheit von 99,7 % resultierte [64]. Ein weiteres Substrat, das für die großskalige Produktion von Milchsäure untersucht wurde, ist die süße Hirse. Hierbei wurde ein Produkttiter von 73 g L^{-1} mit einer Produktivität von $1,47 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und einer Ausbeute von $0,70 \text{ g g}^{-1}$ im 50 L Maßstab erzielt. Nach Abtrennung und Reinigung des Zielprodukts ergab sich eine Konzentration von 906 g L^{-1} Laktat bei einer optischen Reinheit von 98,9 % [58]. Ein weiteres untersuchtes Substrat ist hydrolysiertes Buchenholz, das mittels *B. coagulans* Xylose und Glucose zu Laktat umgewandelt wurde. Hierbei wurde eine Ausbeute von 79,4 % bei einem Produkttiter von $80,8 \text{ g L}^{-1}$ erreicht [29]. Diese Beispiele zeigen zudem die Vielseitigkeit des Stammes *B. coagulans* in Hinsicht auf die Substrattoleranz und die Anwendung für die Laktatproduktion. So sind Hirse und Kaffeebohnen auf dem amerikanischen Kontinent und Holzreste in Europa in großer Menge als Reststoff verfügbar. Somit ist eine globale Nutzung des Stammes unter Ausnutzung von lokalen Reststoffen möglich.

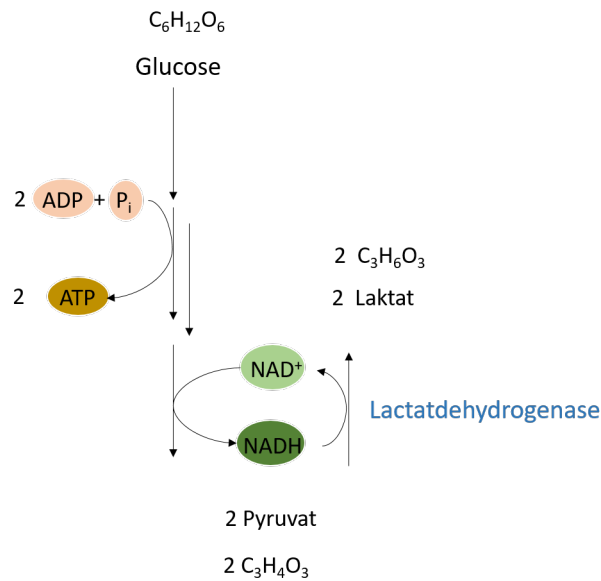


Abbildung 3.8: Homofermentativer Abbau von Hexosen zu Laktat (adaptiert nach [26])

3.4 Spaltung von Lignocellulose

Wie eingangs erwähnt, können als Ausgangssubstrat für eine Plattformchemikalie wie Laktat verschiedene Ausgangsstoffe verwendet werden. Allerdings variieren diese in ihrer jeweiligen Zusammensetzung und Verfügbarkeit. So sind in Europa in großem Maße Reststoffe der Holzwirtschaft verfügbar, die bisher thermisch verwertet wurden. Jedoch lässt sich Holz in seine Bestandteile Lignin, Cellulose und Hemicellulose separieren. Das zugrunde liegende Schema ist in Abbildung 3.9 zu sehen. Für diese Operation steht eine Vielzahl an Möglichkeiten zu Verfügung, wie zum Beispiel das *liquid hot water* (LHW) Verfahren, bei dem Holz unter Druck und überhitztem Wasser aufgespalten wird. Durch diese Behandlung verändert sich die Zusammensetzung des Holzes und Hemicellulose wird löslich, wobei Lignin und Cellulose in festem Zustand verbleiben. Anschließend werden die separierten Fraktionen enzymatisch behandelt, so dass die Oligomere aus der Cellulose und Hemicellulose in C6 Zucker (aus Cellulose) und C5 Zucker (aus Hemicellulose) umgewandelt werden. Der Großteil des Lignins verbleibt hierbei in der C5 Fraktion und muss von den C5 Monomeren getrennt werden. Ein besonderer Einfluss auf die Trennleistung hat die Zeitdauer sowie die Temperatur der LHW Behandlung, da toxische Nebenprodukte wie beispielsweise Furfural oder 5-Hydroxymethylfurfural entstehen können [71]. Neben der LHW Behandlungsmethode existiert noch eine Vielzahl Behand-

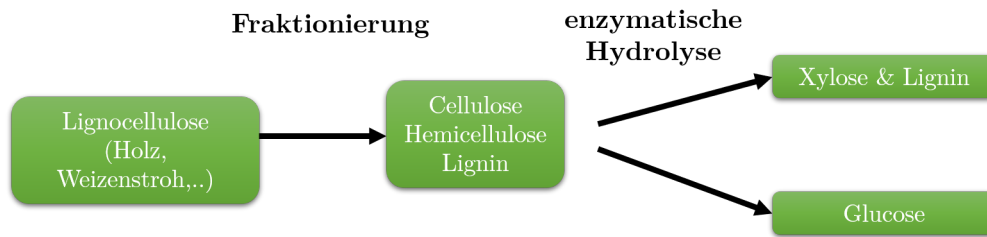


Abbildung 3.9: Schema der der Aufspaltung von Lignocellulose in die Grundbausteine

lungsmethoden, wie beispielsweise die säure- oder laugenkatalysierte Trennung der Lignocellulose [27][7][13]. Allerdings sind alle Verfahren mit Vor- aber auch Nachteilen behaftet.

3.5 Organische Säuren mittels Mischkulturen

Neben den VFAs sind organische Säuren mittlerer (5-8 Kohlenstoffatome) Kettenlänge (MCAA: *medium chain carboxylic acid*) von besonderem Interesse für die chemische Industrie. Dazu zählen Valeriansäure (Pentansäure), Capronsäure (Hexansäure), Önanthsäure (Heptansäure) und Caprylsäure (Octansäure). Auch hier existieren bis dato keine industriell etablierten Verfahren, die auf biotechnologischen Methoden basieren. Da diese MCCAs aber eine breite Anwendung finden, ist es auch hier nötig, nachhaltige Produktionsverfahren zu finden. So werden die darunter fallenden Säuren im Futter- und Nahrungsmittelsektor, im pharmazeutischen Sektor sowie in der Aromaindustrie verwendet [15] [4]. Für die Produktion dieser Säuren haben sich bisher Mischkulturen als geeignetste Variante der Herstellung herauskristallisiert [1]. Jedoch sind dies meist undefinierte Mischkulturen, was bedeutet, dass keine genaue Zusammensetzung bekannt ist und deswegen eine großtechnische Anwendung aufgrund von Reproduzierbarkeit und Sicherheitsauflagen nahezu unmöglich ist. Deswegen ist es notwendig, definierte Mischkulturen zu verwenden, die möglichst in Kooperation agieren, was bedeutet, dass die Anwesenheit des einen Bakteriums sich positiv auf das andere auswirkt [34]. Innerhalb dieser Mischkultur müssen dann mehrere nacheinander geschaltete Reaktionen ablaufen. So wird zunächst die Kohlenstoffquelle zu kurzkettigen organischen Säuren (Acetat, Laktat, Propionat und n-Butyrat) umgewandelt. Im Anschluss daran werden diese erzeugten Säuren als Substrate benützt und organische Säuren mittlerer Kettenlänge generiert. Dies geschieht über die umgekehrte β Oxidation [79]. Dabei wird an eine geradzahlige kurzkettige organische Säure ein Acetyl-CoA angehängt, das von Ethanol oder Laktat

stammt. Dabei wird beispielsweise Acetat zu Butyrat und Butyrat entsprechend zu Caproat. Dies kann dann weiter zu Caprylat verlängert werden. Beispielhaft ist der Stoffwechselweg, ausgehend von Laktat zu Caproat, in Abbildung 3.10 dargestellt. Dabei wird zunächst aus Laktat Acetyl-CoA gewonnen, das anschließend dem ersten Zyklus zugeführt wird und zusammen mit bereits vorhandenem Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA reagiert. Über die Folgereaktion entsteht Butyryl-CoA, von dem ein C2 Körper abgespalten und auf Acetat übertragen wird, so dass Butyrat entsteht. Dieses Butyrat wird in einem zweiten Zyklus analog zum ersten wiederum um einen C2 Körper zu Caproat verlängert. Theoretisch kann anschließend das gebildete Caproat nochmal um einen C2 Körper zu Caprylat verlängert werden. Analog zu den geradzahligen Ketten können, ausgehend von Propionat, ungeradzahlige Kettenlängen generiert werden. Dazu wird Propionat ebenfalls mit einem Acetyl-CoA zu Valerat verlängert und im Anschluss daran zu Heptanoat transformiert. Der Stoffwechselweg ist hierbei der gleiche wie oben beschrieben für geradzahlige Kettenlängen [1] [80] [33].

Shahab *et al.* konnten zeigen, dass mittels Laktat als Plattformsubstrat und einer definierten Mischkultur kurzkettige und mittelkettige organische Säuren gezielt produziert werden können [78]. Interessanterweise wurde für die Hydrolyse der Buchenholzreste kein Enzym extern zugegeben, sondern dies wurde durch den Pilz *Trichoderma reesei* bewerkstelligt. Dieser Pilz kann die Lignocellulose in die Zuckermomere spalten und diese dem Bakterium *Lactobacillus pentosus* für die Produktion von Milchsäure bereitstellen. Die generierte Milchsäure kann im Anschluss zu Propionat und Acetat mittels *V. criceti* und zu Butyrat mittels *C. tyrobutyricum* verstoffwechselt werden. Diese drei Säuren können abschließend von *M. elsdenii* aufgenommen werden und über die Kettenverlängerungsreaktion zu Valerat und Caproat umgewandelt werden oder wiederum selbst als Zielmolekül gewonnen werden. Dabei nimmt *M. elsdenii* Laktat ebenfalls als Substrat auf, um die Kettenverlängerung durchzuführen. Eine Kombination aus *Trichoderma reesei*, *L. pentosus* und *M. elsdenii* erzielte einen Produkttiter von 4,3 g L⁻¹ Acetat, 1,2 g L⁻¹ Propionat, 5,0 g L⁻¹ Butyrat, 1,5 g L⁻¹ und 1,3 g L⁻¹ Caproat. Insgesamt wurde dabei eine Ausbeute von 0,46 g g⁻¹ erzielt, bezogen auf die gesamte Menge der fermentierbaren Zucker. Bei Erweiterung der Kultur um *V. criceti* konnte die Menge an Valerat deutlich gesteigert werden, da vermehrt Propionat zur Verfügung steht, das zu Valerat verlängert werden kann. Dabei konnten 2,6 g L⁻¹ Acetat, 0,8 g L⁻¹ Propionat, 6,7 g L⁻¹ Butyrat, 3,5 g L⁻¹ Valerat und 2,1 g L⁻¹ Caproat erzielt werden. Die Valeratkonzentration konnte somit fast um das Dreifache gesteigert werden.

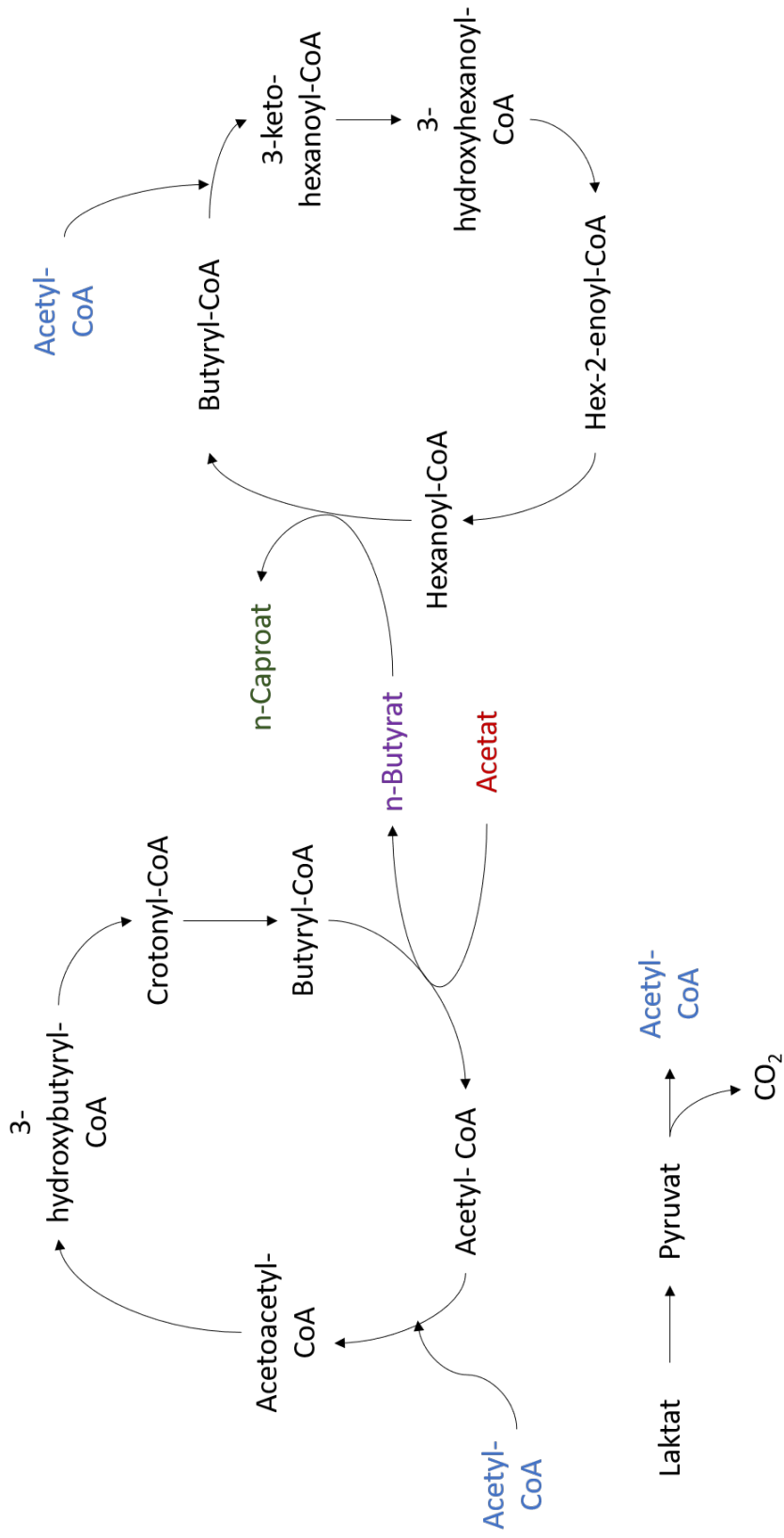


Abbildung 3.10: Mechanismus der Kettenverlängerung (vereinfacht nach [79])

Für die Produktion von mittelkettigen organischen Säuren kann auch auf organische Reststoffe zurückgegriffen werden. So konnte Caproat und Caprylat aus Weintrub produziert werden [41]. Die Verwendung von Weintrub ist deswegen von Vorteil, weil den Bakterien Ethanol zur Verfügung gestellt werden muss, um MCAAS zu produzieren, in dem kurzkettige organische Säuren wie Acetat und Butyrat mit Ethanol via der β Oxidation verlängert werden. Außerdem konnte mittels einer undefinierten Mischkultur aus der Schnapsproduktion, die Laktat zu Caproat umwandeln kann ein Produkttiter von $23,7 \text{ g L}^{-1}$ an Caproat bei einer Produktivität von $0,12 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht [94]. Neben Mischkulturen können aber auch Monokulturen eingesetzt werden, um längerkettige organische Säuren zu produzieren. Dazu müssen aber kurzkettige Säuren, wie Propionsäure und Essigsäure supplementiert werden. Der Stamm *Megasphaera hexanoica* konnte ausgehend von einem Medium, das mit $2,42 \text{ g L}^{-1}$ Natriumacetat und $18,91 \text{ g L}^{-1}$ versetzt war, insgesamt $9,48 \text{ g L}^{-1}$ Valerat, $2,48 \text{ g L}^{-1}$ Heptanoat und $0,12 \text{ g L}^{-1}$ Caproat erzeugen. Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Studie ^{13}C Tracerexperimente mit Propionat durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das zugegebene Propionat ausschließlich für die Kettenverlängerungsreaktion zu Valerat und Heptanoat verwendet wurde und an keinem anderen Stoffwechselweg beteiligt war.

Neben organischer Biomasse kann auch Syngas (Mix aus CO_2 , H_2 und CO) als Substrat eingesetzt werden. So konnte eine Mischkultur mit *C. ljungdahlii* und *C. kluyveri* Butyrat aus Caproat ausgehend von Syngas erzeugen [69]. Dabei wurde das Syngas durch *C. ljungdahlii* aufgenommen und zu Acetat und Ethanol verstoffwechselt. Diese beiden Produkte wurden nachfolgend von *C. kluyveri* als Substrat verwendet, so dass Butyrat und Caproat mit einer Produktivität von $129 \text{ mmol C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ beziehungsweise $70 \text{ mmol C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ gebildet wurden. Angetrieben durch die Reduktionsenergie des Syngases wandelte *C. ljungdahlii* die entstandenen Carboxylate anschließend zu den entsprechenden Alkoholen um, was darin mündete, dass letztlich ein Mix aus n-Butanol, n-Hexanol und n-Octanol vorlag.

3.6 *In-situ* Produktentfernung (ISPR)

ISPR bedeutet im Zusammenhang mit biotechnologischer Produktion mittels Fermentation das gezielte Entfernen eines oder mehrerer Produkte während der Kultivierung. Dabei kann durch das ISPR eine etwaige Fermentationsinhibition durch toxische Produkte sowie thermodynamische unvorteilhafte Reaktionen verhindert werden [87]. Dabei werden insgesamt vier verschiedene Operationsmöglichkeiten unterschieden. Diese sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Die

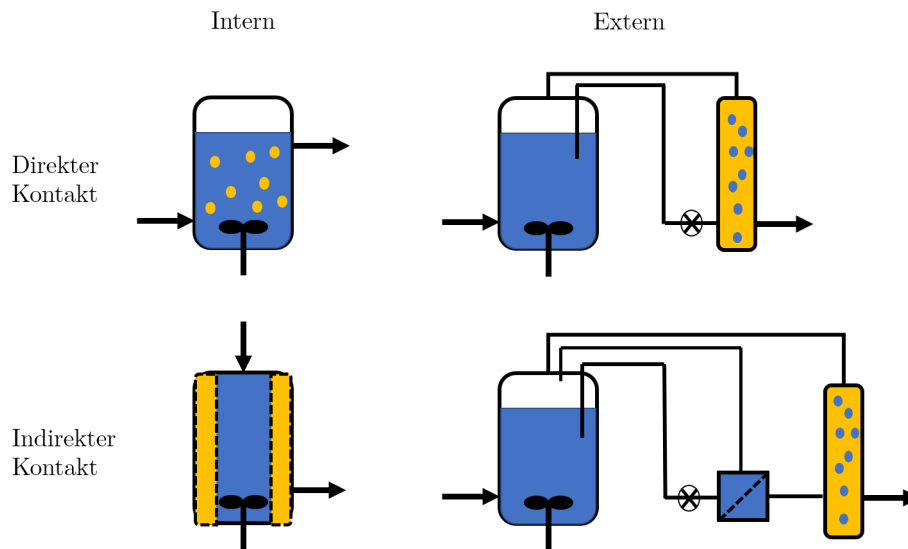


Abbildung 3.11: Operationsarten von ISPR (adaptiert nach [87])

Bezeichnung direkt und indirekt bezieht sich hierbei auf den Kontakt der Mikroorganismen mit der ISPR Installation. Beispielsweise wäre das gas-stripping eine interne Anwendung mit direktem Kontakt. Eine flüssig-flüssig Extraktion mittels Membran wäre eine interne, aber indirekte ISPR Technik [19]. Die räumliche Trennung von Fermentation und ISPR Umgebung ist in diesem Fall notwendig, da das benötigte Extraktionsmittel toxisch auf die Mikroorganismen wirkt. Diese Trennung von indirekt und direkt kann auch extern erfolgen, was vor allem in Sachen Wartung und Instandsetzung von Vorteil ist.

Die Anwendung einer ISPR Technik ist allerdings mit Herausforderungen verbunden. So ist die Regelung und Steuerung eines Prozesses ohne ISPR einfacher und auch robuster. Zudem können durch Ströme, wie zum Beispiel in Abbildung 3.11 zu sehen, die in den Bioreaktor zurückführen, ungeahnte Prozessschwankungen ausgelöst werden. Ein weiteres Problem stellt die Sterilität dar, die während eines Fermentationsprozesses aufrecht erhalten werden muss. Wegen der Zellrückführung und das dadurch steigende Prozessequipment erhöht sich auch das Risiko für Kontaminationen. Außerdem kann die Möglichkeit der Mutation nicht außer Acht gelassen werden, da die durch das ISPR verlängerte Fermentationsdauer eine höhere Wahrscheinlichkeit für Mutationen hervorgerufen wird [87]. Die Bandbreite der dafür sich eignenden Techniken umfasst nahezu die gesamten Grundoperationen der Verfahrenstechnik, wie zum Beispiel gas-stripping, Extraktion, Kristallisation oder die Elektrodialyse [32] [72] [12] [55]. Bei der Anwendung einer solchen ISPR Technik muss aber genau untersucht werden, ob die zusätzlichen Investitionskosten auch zu einer ökonomisch hin-

reichenden Steigerung in Hinblick auf die Ausbeute und Produktivität führen. Zudem sollte berechnet werden, ob die Verlängerung einer Fermentation durch ISPR sinnvoller ist, als eine Durchführung von batch Produktionen mit größerer Häufigkeit [19].

3.6.1 Elektrodialyse

Die Elektrodialyse ist ein Membranverfahren, bei dem die Triebkraft der Trennung durch das Anlegen eines elektrischen Feldes erreicht wird. Hierfür werden in alternierender Abfolge Kationentauscher- und Anionentauschermembranen angeordnet. Die Kationentauschermembranen sind nur für positiv geladene Ionen passierbar, umgekehrt Anionentauschermembranen nur für negativ geladene Ionen. Kathoden- und Anodenkammer werden mit einer Salzlösung gespült, um einerseits Ladungsträger für den Stromtransport bereitzustellen und andererseits die bei der Wasserelektrolyse entstehenden Gase, nämlich H_2 und O_2 , auszutragen. Zwischen den Membranen sind sogenannte Spacer verbaut, die als Abstandhalter zwischen den Membranen dienen und zudem zur gleichmäßigen Verteilung der Feedlösung beitragen. Der beispielhafte Aufbau einer solchen Elektrodialyseeinheit ist in Abbildung 3.12 zu sehen.

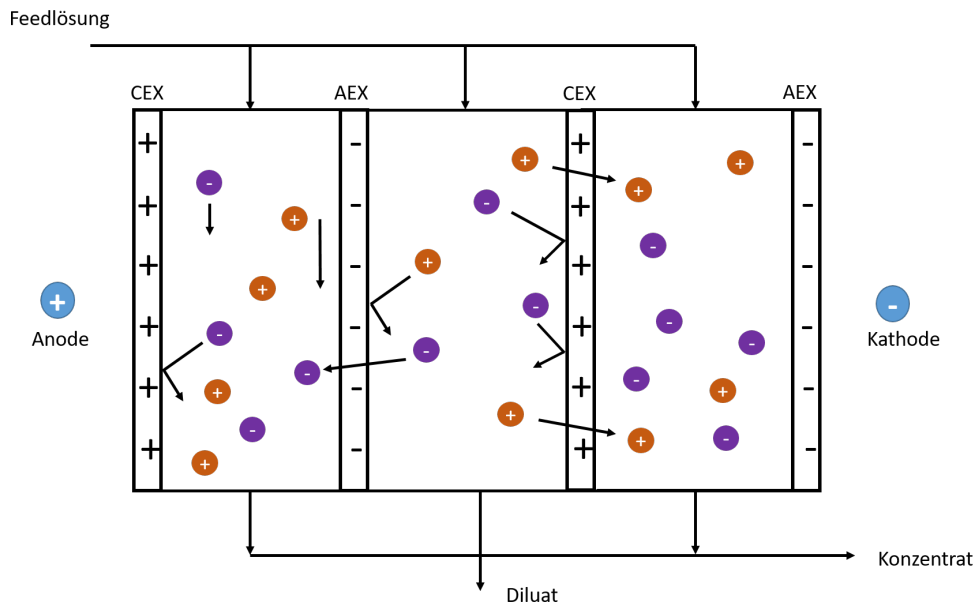


Abbildung 3.12: Schema der Entsalzung mittels Elektrodialyse (AEX: Anionentauschermembran, CEX: Kationentauschermembran)

Normalerweise ist die Feedlösung die salzreiche Lösung und wird entsalzt. Diese

Lösung wird als Diluat bezeichnet, die salzaufnehmende Lösung entsprechend als Konzentrat. Diluat und Konzentrat werden alternierend zwischen den Membranen zugeführt, und es kommt innerhalb des Membranstacks zum Entsalzungsvorgang. Die erzwungene Bewegungsrichtung der Ionen erfolgt durch das angelegte elektrische Feld, das so eingestellt wird, dass eine konstante Stromdichte aufrecht erhalten wird. Dafür ist es nötig, welche die Spannung über dem Membranstack anzupassen, da im Laufe der Entsalzung die Leitfähigkeit und somit auch der Ladungstransport im Diluat abnimmt, was bedeutet, dass der Widerstand innerhalb des Stacks zunimmt. Es müssten dann zum Betrieb der Elektrodialyse hohe Spannungen angelegt werden, die Investitions- und Betriebskosten ansteigen lassen. Beim Betrieb der Elektrodialyse mit gleichbleibender Spannung wird im Bereich der fast vollständigen Entsalzung die Grenzstromdichte erreicht, was bedeutet, dass ein Ladungstransport nur noch durch Wasserspaltung aufrecht erhalten werden kann. Dies äußert sich in einem starken Anstieg des Widerstandes. Ein wichtiger Parameter bei der Evaluation eines Elektrodialyseprozesses ist die Bestimmung der Stromausbeute. Dies gibt an, welcher Anteil der aufgegebenen Energie für die Abtrennung der Salzionen im Vergleich zur gesamten Energiemenge verwendet wurde. Diese errechnet sich mit folgender Gleichung:

$$\xi = \frac{z \cdot F \cdot (C_{end} - C_{ini})}{N \cdot I \cdot t} \quad (3.2)$$

Ein Wert von 1 würde bedeuten, dass die gesamte aufzugebene Energie in die Abtrennung der Zielsubstanzen fließt. Dies ist in der praktischen Anwendung allerdings nicht zu erreichen, da es durch Widerstände an den Membranen oder durch Wasserspaltung zu Verlusten kommt. Des weiteren kann die Rückdiffusion von Zielsubstanzen zu einer Minderung der Stromausbeute führen. Bei der konventionellen Elektrodialyse, die die Entsalzung einer Lösung zum Ziel hat, werden normalerweise Ausbeuten von 80 % benötigt, um die Elektrodialyse wirtschaftlich zu betreiben. Am häufigsten wird die Elektrodialyse bei der Entsalzung eingesetzt, wobei der optimale Bereich bei einer Salzkonzentration zwischen 1 g L^{-1} und 10 g L^{-1} liegt [53]. Außerhalb dieses Bereichs sind andere Verfahren besser geeignet. Für Konzentration unterhalb des Bereichs ist der Ionentausch und bei höheren Konzentrationen die Umkehrosmose am besten geeignet [53].

3.6.2 Umgekehrte elektrounterstützte Dialyse (REED)

Die in dieser Arbeit verwendete Elektrodialyse unterscheidet sich von der konventionellen Elektrodialyse durch zwei Merkmale. Erstens sind in der REED nur Anionentauschermembranen verbaut, und zwar nur solche, die lediglich einwertige Anionen passieren können. Zweitens ist die Polarität der Elektroden wechselbar. Dadurch ist es zwar nicht möglich, eine Lösung komplett zu entsalzen, allerdings

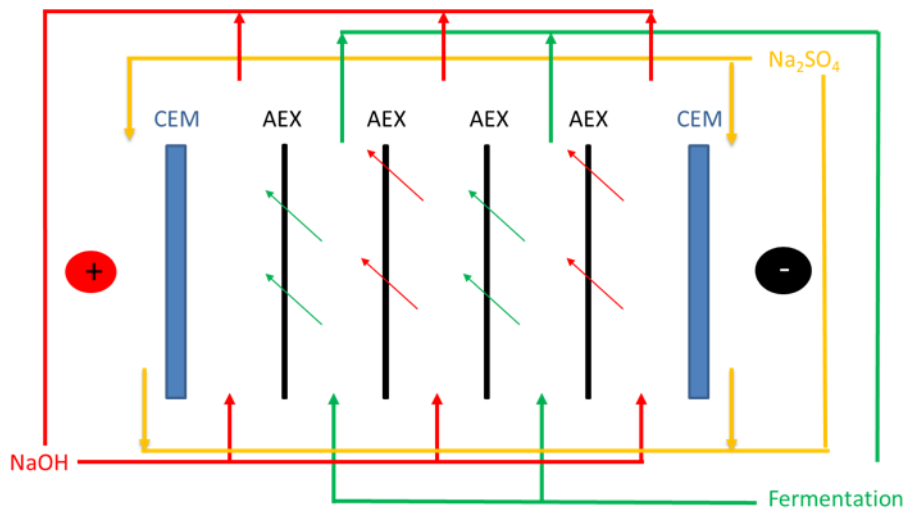


Abbildung 3.13: Aufbau der modifizierten Elektrodialyse (AEX: Anionentauschermembranen, CEM: Endständige Kationentauschermembran, Na_2SO_4 : Elektrodenspülung, NaOH: Natriumhydroxid)

selektiv einwertige Ionen zu entfernen. Als aufnehmende Lösung fungiert hierbei ein 0,3 M NaOH Lösung, die Hydroxyionen für den Ladungstransport zur Verfügung stellt. In Abbildung 3.13 ist der Aufbau einer solchen Elektrodialyse dargestellt.

Das Besondere des REED Aufbaus ist hierbei durch Polaritätswechsel Foulingbeläge auf den Membranen vermieden werden können. Dadurch, dass die Polarität der Elektroden gewechselt werden kann, ändert sich entsprechend die Flussrichtung der Ionen. So werden die Hydroxyionen von der Anode angezogen. Bei Wechsel der Polarität wird dann diese Richtung der Triebkraft umgekehrt. Etwaige Beläge auf den Membranen werden dann ähnlich wie in der Filtertechnik in einem sogenannten *backflush* von der Membran abgelöst. Dafür ist es nötig, in regelmäßigen Abständen diesen Polaritätswechsel durchzuführen. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass mit einer laktathaltigen Fermentationsbrühe mit jedem Polaritätswechsel wieder der Widerstand des Membranstacks im Ausgangszustand erreicht werden konnte, was darauf schließen lässt, dass das Fouling vollständig entfernt werden konnte [65].

Dieser REED Aufbau wurde bereits erfolgreich im Labormaßstab etabliert, um entweder Laktat oder Butyrat aus einer Fermentation abzutrennen [5] [66]. Die Anwendung der REED auf eine kontinuierliche Fermentation von Holzhydrolysat führte zu erhöhten Aufnahmeraten von Glucose und Xylose. Im Fall von Glucose wurde eine doppelte Aufnahmerate und im Fall von Xylose eine sechs-

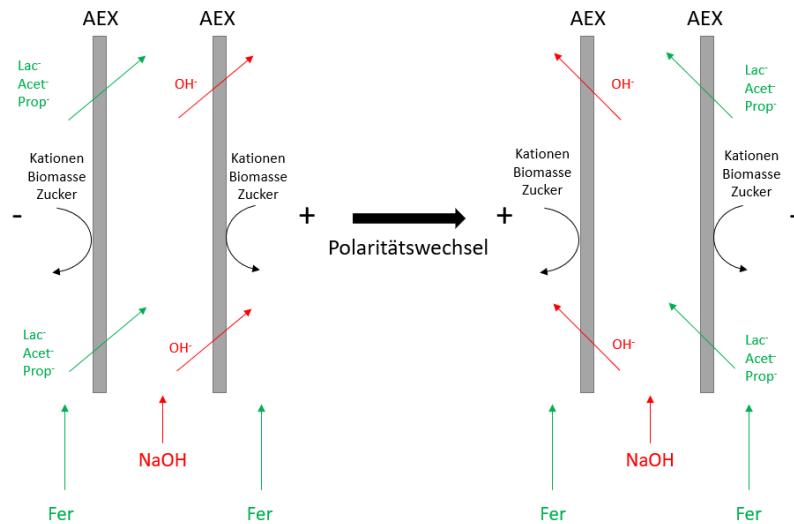


Abbildung 3.14: Änderung der Flussrichtung der einwertigen Ionen, induziert durch einen Polaritätswechsel (Fer: Fermentationsbrühe; NaOH: Natriumhydroxidlösung; AEX: Anionenaustauschermembran)

fache Aufnahmerate erreicht. Darüber hinaus ergab sich eine erhöhte Butyratproduktionsrate von $0,88 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ im Vergleich zu $0,55 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei keiner Verwendung der REED [6].

3.7 Theorie der Fermentation

Eine Kultivierung von Bakterien erfolgt meist in verschiedenen unterscheidbaren Phasen, die in Abbildung 3.15 dargestellt sind. Zunächst befinden sich die Bakterien in der Adaptions- oder lag-Phase (1), in der sich die Bakterien an das Fermentationsmedium und die Reaktionsbedingungen anpassen. In dieser Phase findet keine bis wenig Zellvermehrung -und wachstum statt, so dass die Konzentration der Biomasse nicht oder nur unmerklich ansteigt. Die Zeit, die von den Zellen benötigt wird, um sich den Gegebenheiten anzupassen, ist von Mikroorganismus zu Mikroorganismus verschieden und wird durch die Verfügbarkeit von Nährstoffen, den physiologische Zustand der Zellen und umgebenden Bedingungen bestimmt. Im Anschluss daran folgt die Übergangsphase (2), die die Transition zur exponentiellen Phase kennzeichnet und durch einen leichten Anstieg der Biomasse gekennzeichnet ist. Während der exponentiellen Phase (3) vermehren sich die Zellen exponentiell mit der größtmöglichen Rate. Danach

schließt sich die Verzögerungsphase (4) an, bei der das Wachstum nahezu stoppt. Dies liegt meist an der Bildung toxischer Nebenprodukte oder am Verbrauch der Nährstoffe. Als nächstes gehen die Zellen in die stationäre Phase (5) über, bei der kein Wachstum mehr feststellbar ist, sondern Wachstum und Zelltod ausbalanciert sind. Abschließend wird die Phase des Zelltods (6) erreicht, in der die Biomassekonzentration absinkt, ausgelöst durch die Autolyse der Zellen.

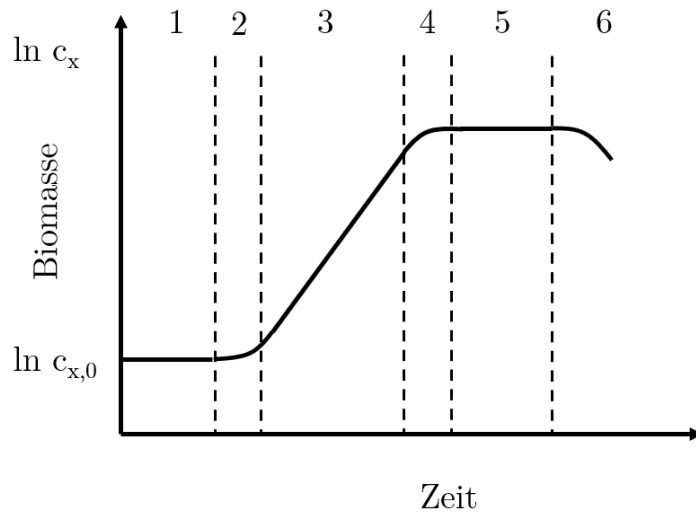


Abbildung 3.15: Phasen des bakteriellen Zellwachstums

Um Kultivierungen vergleichen zu können sind mathematische Beschreibungen der Vorgänge in Abbildung 3.15 sowie daraus ableitbare Parameter notwendig. Die grundlegende Beschreibung des Zellwachstums ist hierbei die spezifische Wachstumsrate h^{-1} :

$$\mu = \frac{1}{c_X} \frac{dc_X}{dt} \quad (3.3)$$

mit μ in h^{-1} , c_X der Biomassekonzentration in $g L^{-1}$ und t der Prozesszeit in h . Für ein definiertes Zeitintervall t_0 bis t_1 kann Gleichung 3.3 integriert werden und folgende Gleichung ergibt sich daraus:

$$c_x = c_{x,0} \cdot e^{\mu \cdot (t_1 - t_0)} \quad (3.4)$$

Hierbei bezeichnet $c_{X,0}$ die Konzentration der Biomasse zum Zeitpunkt t_0 und c_X die Konzentration der Biomasse zum Zeitpunkt t_1 . Allerdings spiegelt dies nur die Wachstumsrate zwischen zwei Zeitpunkten wider. Eine genauere Ermittlung der Wachstumsrate wird erhalten, indem die Gleichung 3.4 linearisiert wird und

mehrere Messpunkte aufgenommen werden. Aus der linearisierten Auftragung kann anschließend die Wachstumsrate als Steigung abgelesen werden.

Das bekannteste Modell für die Beschreibung des mikrobiellen Wachstums ist das Monod-Modell. Es basiert auf den Annahmen eines ausgeglichenen Wachstums und darauf dass die Wachstumsrate nur von der Konzentration des Substrats c_S abhängt. Deswegen beschränkt sich die Gültigkeit dieses Modells auf die exponentielle Wachstumsphase und ist für andere Wachstumsphasen nicht anwendbar. Die Kinetik folgt dem folgenden Zusammenhang:

$$\mu = \mu_{max} \frac{c_S}{c_S + K_S} \quad (3.5)$$

Dabei werden die maximale Wachstumsrate μ_{max} in h^{-1} und die Affinitätskonstante K_S in g L^{-1} angegeben. Je kleiner der Wert von K_S , desto größer ist die Affinität des Mikroorganismus zu dem vorliegenden Substrat. Diese bezeichnet die Substratkonzentration, die bei der Hälfte der maximalen Wachstumsrate vorliegt.

3.7.1 Betriebsarten von Bioreaktoren

Der Betrieb eines Bioreaktors kann auf verschiedene Arten erfolgen. Hier soll auf die unterschiedlichen Möglichkeiten eingegangen werden, den Mikroorganismen das Substrat zuzuführen. Dabei werden der Fall des Satzbetriebs und des fed-batch Betriebs näher erläutert. Der grundlegende Aufbau eines solchen Reaktorbetriebs ist in Abbildung 3.16 zu sehen. Bei einer Operation im Satzverfahren existieren keine Zu- oder Abläufe, sondern ausschließlich nur der Reaktionsraum, so dass das gesamte Volumen konstant bleibt. Im fed-batch Betrieb wird während der Kultivierung Substrat eingetragen (grüner Pfeil) allerdings kein Flüssigstrom abgezogen, so dass das Volumen des Fermentationsmediums zunimmt.

Für die mathematische Beschreibung des Systems wird zunächst die allgemeine Massenbilanz eines Bioreaktors betrachtet:

$$\frac{dm_i}{dt} = \dot{m}_{i,ein} - \dot{m}_{i,aus} \pm r_i \quad (3.6)$$

Hierbei bezeichnet $\dot{m}_{i,ein}$ die dem System zugeführte Masse der Komponente i und $\dot{m}_{i,aus}$ die dem System entnommene Masse der Komponente i . Die Reaktionsrate r bezeichnet dabei die Umwandlung der Komponente i in eine andere Komponente j .

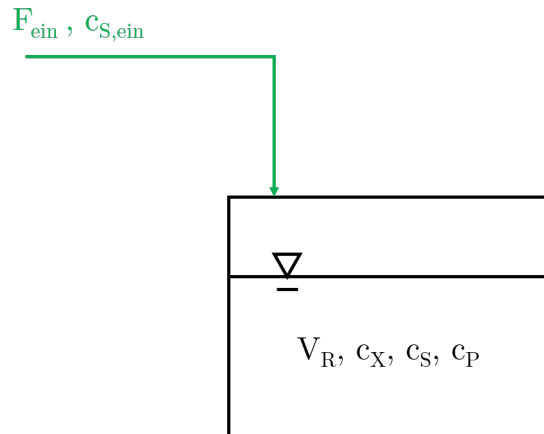


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung der Zu- und Abläufe einer Satz- oder fed-batch Kultur. (Die grün gefärbten Symbole sind nur bei einer fed-batch Fermentation gültig.)

Kultivierung im Satzverfahren

Bei Kultivierung von Mikroorganismen im Satzverfahren wird eine Konzentration an Substrat vorgelegt und es erfolgt keine weitere Zugabe von Substrat. Des Weiteren wird kein Volumen abgezogen oder hinzugefügt, so dass das gesamte Volumen des Reaktionsgemisches über die Fermentationsdauer konstant bleibt. Dies bedeutet, dass F_{ein} gleich 0 ist und somit auch keine Masse hinzugefügt wird. Somit kann die Konzentration der Biomasse aus Gleichung 3.4 bestimmt werden unter der Vorbedingung, dass die Wachstumsrate μ bekannt ist. Aus den Gleichungen 3.14 und 3.10 können dann der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ und die spezifische Substrataufnahmerate q_S bestimmt werden [14].

Kultivierung im Zulaufverfahren

Im Fall eines Zulaufverfahrens bleibt das Volumen des Reaktionsraumes nicht konstant, da dem System kontinuierlich Substrat zugeführt wird, aber kein Volumen- oder Massenabzug erfolgt. Für die Art der Zufütterung existieren verschiedene Arten. So kann das Substrat mit einer konstanten, linear ansteigenden oder exponentiell ansteigenden Rate zugegeben werden. Somit ergibt sich für die Massenbilanz:

$$\frac{dm_S}{dt} = \frac{d(c_S \cdot V_R)}{dt} = c_S \cdot F_{ein} + V_R \cdot \frac{dc_S}{dt} \quad (3.7)$$

Für die zeitliche Änderung der Substratkonzentration erhält man daraus den

folgenden Ausdruck:

$$\frac{dc_S}{dt} = \frac{F_{ein}}{V_R} \cdot (c_{S,ein} - c_S) - q_S \cdot c_X \quad (3.8)$$

Analog dazu kann die Änderung der Biomasse wie folgt formuliert werden:

$$\frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X - \frac{F_{ein}}{V_R} \cdot c_X \quad (3.9)$$

Parameter zur Charakterisierung von Bioprozessen

Für die Charakterisierung von Bioprozessen ist die Kenntnis über die Aufnahme des Substrats in Abhängigkeit von der Biomassekonzentration von Bedeutung. Der mathematische Zusammenhang lässt sich wie folgt formulieren:

$$q_S = \frac{1}{c_X} \frac{dc_S}{dt} \quad (3.10)$$

Das Formelzeichen q_S stellt die spezifische Substrataufnahmerate mit der Einheit $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ dar, also die Menge an Substrat die pro g Biomasse in einer definierten Zeit aufgenommen wird. Analog kann dieser Ausdruck für die Produktbildung verwendet werden:

$$q_P = \frac{1}{c_X} \frac{dc_P}{dt} \quad (3.11)$$

Hierbei bezeichnet c_P die Produktkonzentration.

Neben den massebezogenen Aufnahme- und Produktbildungsrate existieren die jeweiligen volumetrischen Raten, womit gemeint ist, dass nur die Differenz der Konzentrationen von Substrat oder Produkt in einem bestimmten Zeitintervall betrachtet werden und der Bezug auf die Biomasse entfällt. Diese werden durch die Zunahme des Produkts beziehungsweise Abnahme des Substrats innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls bestimmt. So erfolgt die Bestimmung der volumetrischen Produktbildungsrate nach folgender Gleichung:

$$Q_P = \frac{\Delta c_P}{\Delta t} \quad (3.12)$$

Analog hierzu wird die volumetrische Substrataufnahmerate durch die folgende Gleichung berechnet:

$$Q_S = \frac{\Delta c_s}{\Delta t} \quad (3.13)$$

Ein weitere wichtiger Parameter ist der Ausbeutekoeffizient, der angibt, welcher Anteil des aufgenommenen Substrates für welche zellspezifische Tätigkeit verwendet wurde. Der Biomasseausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ gibt somit an, welcher Anteil des Substrats für den Aufbau der Biomasse verwendet wurde. Die Einheit dieses Parameters wird typischerweise in g g^{-1} angegeben. Die dazugehörige Formel lautet wie folgt:

$$Y_{X/S} = \frac{dc_X}{dc_S} \frac{\mu}{q_S} \quad (3.14)$$

4 Material und Methoden

4.1 Mikroorganismen

Im Folgenden werden die in der Arbeit verwendeten Mikroorganismen aufgelistet, die für die Laktatproduktion (*B. coagulans* und *P. pentosaceus*) beziehungsweise Acetat und Propionat (*V. criceti*) sowie andere organische Säuren (*M. cerevisiae*) verwendet wurden .

- *Bacillus coagulans*
- *Veillonella criceti*
- *Pediococcus pentosaceus*
- *Megasphaera cerevisiae*

4.2 Kultivierung

4.2.1 Stammhaltung

Die Stämme *B. coagulans* und *V. criceti* wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) erworben. Die beiden Stämme *M. cerevisiae* und *P. pentosaceus* wurden von VTT Research (Helsinki, Finnland) zur Verfügung gestellt. Alle Stämme wurden von ihrem gefriergetrockneten Zustand nach Protokoll von DSMZ oder VTT in das jeweilige Kulturmedium eingebracht und inkubiert. Zur Lagerung der Kulturen wurden Kryokulturen angelegt, die mit sterilem Glycerin versetzt und bei - 80°C gelagert wurden.

4.2.2 Vorkultur

Für die jeweilige Vorkultur wurden 2 mL Kryokultur in 50 mL des jeweiligen Mediums überimpft. Das Medium wurde bei 80°C für 15 min mit reinem Stickstoff begast und in 50 mL Serumflaschen gefüllt, die mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossen wurden. Anschließend wurden die Serumflaschen bei 121°C

für 20 min autoklaviert. Ausgehend von der Vorkultur wurde eine zweite Vorkultur durch Überimpfen der ersten Vorkultur nach ca. 24 h hergestellt. Die Temperatur der Vorkulturrkultivierungen entsprach immer den Fermentationstemperaturen.

4.2.3 Fermentation für mittelkettige organische Säuren

Bei Verwendung des 30 L Reaktors wurde nach der Vorkultur in 50 mL Anaerobflaschen eine weitere Vorkultur im 2 L Maßstab durchgeführt und dieses Volumen zum Animpfen des 30 L Reaktors verwendet.

4.2.4 Medien

Tabelle 4.1: RCM Medium

Komponente	Menge	Einheit
Hefeextrakt	13	g L ⁻¹
Pepton	10	g L ⁻¹
Glucose	5	g L ⁻¹
Lösliche Stärke	1	g L ⁻¹
NaCl	5	g L ⁻¹
Natriumacetat	3	g L ⁻¹
Cystein Hydrochlorid	0,5	g L ⁻¹

Tabelle 4.2: *Veillonella* Medium

Komponente	Menge	Einheit
Hefeextrakt	2	g L ⁻¹
Pepton	2	g L ⁻¹
Laktat	10	g L ⁻¹
KH_2PO_4	15	g L ⁻¹
K_2HPO_4	5	g L ⁻¹
Cystein Hydrochlorid	0,5	g L ⁻¹
Vitaminlösung	1	mL L ⁻¹

Tabelle 4.3: *Veillonella* Vitaminlösung

Komponente	Menge	Einheit
Biotin	0,25	mg L ⁻¹
Folsäure	0,01	mg L ⁻¹
Pyridoxin HCl	2,5	mg L ⁻¹
Thiamin HCl	50	mg L ⁻¹
Riboflavin	50	mg L ⁻¹
Nikotinsäure	2,5	mg L ⁻¹
Calcium Pantothenate	2,5	mg L ⁻¹
Vitamin B12	0,05	mg L ⁻¹

Tabelle 4.4: Mischkultur Medium

Komponente	Menge	Einheit
Hefeextrakt	10	g L ⁻¹
Pepton	10	g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,7	g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5	g L ⁻¹
MgSO ₄ · H ₂ O	0,4	g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	15	g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	5	g L ⁻¹
Vitaminlösung	1,2	mL L ⁻¹

Tabelle 4.5: *Megasphaera* Medium

Komponente	Menge	Einheit
Hefeextrakt	13	g L ⁻¹
Pepton	10	g L ⁻¹
Glucose	5	g L ⁻¹
Fructose	10	g L ⁻¹
Lösliche Stärke	1	g L ⁻¹
NaCl	5	g L ⁻¹
Natriumacetat	3	g L ⁻¹
Cystein Hydrochlorid	0,5	g L ⁻¹

Tabelle 4.6: *Pediococcus* Medium

Komponente	Menge	Einheit
Hefeextrakt	13	g L ⁻¹
Pepton	10	g L ⁻¹
Glucose	15	g L ⁻¹
Fructose	10	g L ⁻¹
Lösliche Stärke	1	g L ⁻¹
NaCl	5	g L ⁻¹
Natriumacetat	3	g L ⁻¹
Cystein Hydrochlorid	0,5	g L ⁻¹

Tabelle 4.7: Scale-Up Medium

Komponente	Menge	Einheit
Hefeextrakt	0,6	g L ⁻¹
Acetat	5	g L ⁻¹
Hydrolysierter Blumenkohl	812,85	g L ⁻¹
Fructose	10	g L ⁻¹
Spurenelementelösung	80	mL L ⁻¹
<i>CaCl</i> ₂	0,1	g L ⁻¹
Vitaminlösung Scale-Up	1	mL L ⁻¹
Cystein Hydrochlorid	0,5	g L ⁻¹

Tabelle 4.8: Vitaminlösung Scale-Up

Komponente	Menge	Einheit
Biotin	0,5	mg L ⁻¹
Pyridoxin HCl	20	mg L ⁻¹
Calcium Pantothenate	20	mg L ⁻¹

Tabelle 4.9: Salzlösung

Komponente	Menge	Einheit
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,125	g L ⁻¹
K_2HPO_4	1	g L ⁻¹
KH_2PO_4	1	g L ⁻¹
$NaHCO_3$	5	g L ⁻¹
$NaCl$	2	g L ⁻¹
$(NH_4)_2SO_4$	2,5	g L ⁻¹
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05	g L ⁻¹
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05	g L ⁻¹
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05	g L ⁻¹
$CoSO_4 \cdot 6H_2O$	0,005	g L ⁻¹

4.2.5 Biomassehydrolysate

Biomassehydrolysate basierend auf Lignocellulose als Ausgangsmaterial und die in Kapitel 5.5.1 verwendeten Biomassehydrolysate wurden vom Institut für thermische Verfahrenstechnik der TU Hamburg (Prof. Irina Smirnova) zur Verfügung gestellt. Das Hydrolysat aus Blumenkohl wurde von VTT Research (Helsinki, Finnland) bereitgestellt. Der hierfür verwendete Blumenkohl war Abfallprodukt, das als untauglich für den menschlichen Verzehr deklariert wurde.

4.2.6 Bioreaktoren

Nachfolgend finden sich die verwendeten Typen von Bioreaktoren:

2 L Fermenter

Die Fermentationen im 2 L Maßstab erfolgten in einem Reaktor der Bioengineering AG (Wald, Schweiz). Dieser wurde mit zwei Sechs-Blatt-Scheibenrührern versehen. Die Messung des pH erfolgte durch eine Sonde von Mettler Toledo und einem pH Transmitter zur Pumpensteuerung für Lauge- oder Säurezugabe. Die Sterilisation des Reaktors erfolgte *in situ* bei 121°C für 20 min. Falls die Fermentation anaerob durchgeführt werden soll, wird Stickstoff (Reinheit 99,999 %) über einen Sterilfilter in den Reaktionsraum eingebracht. Dieser Vorgang wurde während des Abkühlens des Reaktors durchgeführt. Kurz vor dem Inokulieren wird die Stickstoffzufuhr abgestellt. Das Reaktionsmedium wird mittels

eines Heizstabes erwärmt und die Kühlung erfolgt über einen Kühlstab, der an einen Kühlkreislauf angeschlossen ist. Um Verdunstung von Medium zu vermeiden wird das Abgas vor dem Reaktoraustritt in einem Abluftkühler so gekühlt, dass die Menge an Verlust durch Verdunstung minimal gehalten wird. Die Temperaturregelung erfolgt über eine Steuereinheit, die mit einer Temperatursonde (Pt100) im Reaktor gekoppelt ist.

DASGIP

Für Experimente im Parallelbetrieb wurde das System DASGIP der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) verwendet. Der Betrieb der Reaktoren erfolgte pH kontrolliert mittels pH Elektroden der Firma Mettler Toledo und dem zugehörigen Pumpenmodul des DASGIP Systems. Die Rührwelle wurde jeweils mit zwei Sechs-Blatt-Scheibenrührern versehen. Die Sterilisation der Reaktoren erfolgte im Autoklaven bei 121°C für 20 min. Das Medium wurde während des Abkühlens nach der Entnahme aus dem Autoklaven mit reinem Stickstoff begast, um anaerobe Bedingungen innerhalb des Reaktionsmediums zu schaffen.

30 L Fermenter

Im Zuge des Scale-Up wurden Fermentationen im pH kontrollierten 30 L Reaktor der Bioengineering AG (Wald, Schweiz) durchgeführt. Die Rührwelle war mit drei Sechs-Blatt-Scheibenrührern versehen. Zur Messung von pH und Redox wurden jeweils Sonden der Marke Mettler Toledo verwendet. Die Sterilisation des Reaktors erfolgte *in-situ* mit Hilfe eines Dampferzeugers und des Doppelmantels des Reaktors für 20 min bei 121°C.

Kopplung von Bioreaktor und Elektrodialyse

In Abbildung 4.1 ist die Kombination von Bioreaktor und Elektrodialyse zu sehen. Hierfür wird ein Volumenstrom unten aus dem Reaktor abgeführt und durch die Elektrodialyse gepumpt. Anschließend wird dieser Strom zurückgeführt in den Reaktor. Die Natronlauge wird dabei ebenso im Kreislauf geführt und durch die jeweiligen Kompartments der Elektrodialyse gepumpt.

4.3 Betrieb der Elektrodialyse

Für die modifizierte Elektrodialyse (PCCell ED 64) wurden die Spacer und Membranen in alternierender Reihenfolge angeordnet. Anschließend wurde dieses Paket aus Spacern und Membranen in die Halterungen am Rahmen eingebracht und die Rahmenteile mit einander verschraubt, um die Membranen

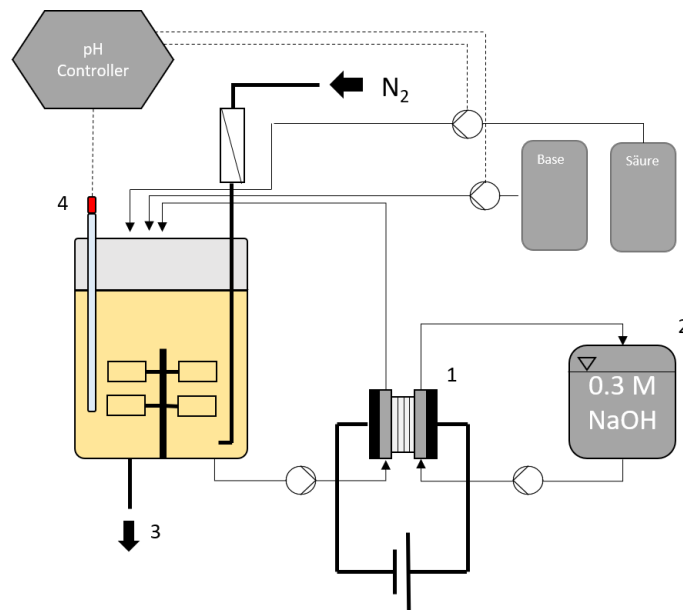


Abbildung 4.1: Kopplung von Bioreaktor und Elektrodialyse 1) Elektrodialyse Einheit 2) NaOH Reservoir 3) Probenahmeventil 4) pH Sensor

aneinander zu pressen. Im Anschluss daran wurde die Dichtigkeit überprüft, indem Wasser durch die Elektrodialyse gepumpt wurde. Falls kein Wasser an den Dichtungen der Membranen entwich, wurde das Wasser abgelassen und entweder die Verbindung zum Bioreaktor angeschlossen oder das Reservoir mit der definierten Salzlösung befüllt. Bei Kopplung mit einem Bioreaktor wurden zuvor alle Schlauchverbindungen sowie die Elektrodialyseeinheit für 30 min mit 70 % Ethanol gespült, um sterile Bedingungen zu schaffen. Eine Sterilisation durch Hitze war aufgrund der Temperaturunverträglichkeit (maximale Temperatur: 40 °C) der Membranen nicht möglich. Die Steuerung der Elektrodialyse erfolgte über die vom Hersteller mitgelieferte Software, die so programmiert wurde, dass die angestrebte Stromstärke durch Veränderung der Spannung konstant gehalten wurde. Der Transport der Lösungen erfolgte durch Kreiselpumpen. Bei synthetischen Salzlösungen wurden die Membranen dadurch gereinigt, dass vollentsalztes (VE) Wasser für 30 min zyklert wurde. Anschließend wurde der Membranstack geöffnet und die Membranen in einer Lösung mit 30 g L⁻¹ Propionat und 20 % (v/v) Ethanol gelagert. Bei Verwendung von Fermentationsbrühe wurde zunächst eine 0,5 M NaOH Lösung für 30 min zyklert, anschließend wurden die NaOH Reste mit VE Wasser ausgespült und danach mit 5 % (v/v) Salpetersäure im Kreislauf gespült. Im Anschluss daran wurde der Membranstack geöffnet und die Membranen in der oben beschriebenen Lösung gelagert. Falls auf der Membran Verschmutzungen zu erkennen waren, wurden diese mit einer

weichen Bürste entfernt.

4.4 Analytik

Im Folgenden wird die in der vorliegenden Arbeit verwendete Analytik näher beschrieben:

4.4.1 Probenvorbereitung

Zur Probenvorbereitung wurden die entnommenen Reaktorproben bei 13.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand gefiltert (0,22 μm) und die Proben soweit mit Reinstwasser (miliQ) Wasser verdünnt, dass diese im linearen Messbereich der HPLC lagen.

4.4.2 HPLC

Die Analyse von Essigsäure, Propionsäure und Milchsäure erfolgte mittels eines UV Detektors bei 210 nm. Die Xylose, Lactose und Glucose wurde mittels Brechungsindex gemessen. Hierfür wurde eine Aminex HPX-87H (300 X 7,8 mm) Säule verwendet. Als Laufmittel wurde hierfür 5 mM Schwefelsäure bei 60°C mit einer Flussrate von 0,6 mL min⁻¹ verwendet.

4.4.3 Gaschromatographie

Bei der Untersuchung der Produktion mittelkettiger Säuren aus Blumenkohlhdrolysat wurden die gebildeten organischen Säuren mittels Gaschromatographie (Agilent 7890A) und gekoppeltem massenselektivem Detektor (Agilent 5975C) analysiert. Es wurde eine Agilent 160-2625-10 Säule (25 μm x 200 μm x 0.3 und 1.6 x 150 μm x 0 μm) verwendet. Dabei wurde folgendes Temperaturprofil gefahren: 1) 40 °C bei einer Verweilzeit von 1,5 Minuten, 2) 160 °C bei einer Rate von 10 °C min⁻¹ und 3) 240 °C bei einer Rate von 25 °C min⁻¹ und Verweildauer von 3,3 Minuten. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1,2 mL min⁻¹ verwendet.

Bei den anderen Untersuchungen der Produktion mittelkettiger Säuren wurden die organischen Säuren durch das Zentrallabor der Technischen Universität Hamburg mittels Gaschromatographie gemessen.

4.4.4 Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD) wurde mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm für alle Bakterien untersucht. Falls der Wert größer als 0,5

war, wurde die Probe so verdünnt, dass sie im Bereich zwischen 0,1 und 0,5 lag. Die Verdünnung erfolgte mit vollentsalztem (VE) Wasser. Als Referenz wurde das Medium nach der Sterilisation und vor der Inokulation genommen. Für das Medium wurde zudem mit VE Wasser eine Verdünnungsreihe gemessen.

4.4.5 Bestimmung der Biotrockenmasse

Für die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) wurden 2 mL Reaktionsgefäße über Nacht bei 80 °C getrocknet und anschließend gewogen. Diese vorbereiteten Gefäße wurden mit 2 mL Fermentationsbrühe gefüllt und bei 13.000 min^{-1} für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit VE Wasser gewaschen und resuspendiert, um die Komplexbestandteile des Mediums auszuwaschen. Anschließend wurde das Gefäß wieder zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Gefäß bei 80 °C über Nacht getrocknet. Aus der Differenz zwischen gefülltem und leerem Gefäß wurde anschließend die zu der jeweiligen OD gehörende Trockenmasse bestimmt. Für jede gemessene OD wurde die BTM Bestimmung in dreifacher Ausführung gemessen.

5 Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Prozessentwicklung der Propionsäureproduktion unter Zuhilfenahme einer modifizierten Elektrodialyse erläutert. Dabei erfolgt die Darstellung in der chronologischen Reihenfolge der Durchführung der jeweiligen Experimente zur Entwicklung des Verfahrens. Daran schließen die Untersuchungen zur Produktion mittelkettiger organischer Säuren unter Ausnutzung der zuvor etablierten Elektrodialyse und Laktatplattform an.

5.1 Elektrodialyse synthetischer Fermentationsbrühe

Zu Beginn der Prozessentwicklung wurde die Abtrennung von organischen Säuren mittels modifizierter Elektrodialyse mit synthetischen Lösungen getestet. Dabei wurde zu Beginn der Schaltvorgang der Elektroden nicht vorgenommen, da zunächst Operationsparameter unabhängig vom Polaritätswechsel bestimmt wurden.

Dazu wurde untersucht, wie sich die Stromdichte auf den Energiebedarf und die Produktivität auswirkt. Hierfür wurde eine Lösung von 5 g L^{-1} Propionat entsalzt. Wie in Abbildung 5.1 zu sehen, stieg der spezifische Energiebedarf von $2,9 \text{ kWh kg}^{-1}$ Propionat bei 200 A m^{-2} auf $8,04 \text{ kWh kg}^{-1}$ bei 390 A m^{-2} an. Dies ist in der Einstellung der Elektrodialyse begründet. Da die zugehörige Stromquelle so eingestellt wurde, dass die gewünschte Stromstärke und folgernd daraus die Stromdichte konstant verbleiben, muss die Stromquelle die Spannung anpassen. Bei einer steigender Stromdichte muss somit die Spannung erhöht werden, um den Stromfluss konstant zu halten. Dadurch, dass die elektrische Leistung das Produkt aus Stromstärke und Spannung darstellt, steigt somit der Energiebedarf an.

Die Produktivitäten bei 200 , 315 und 390 A m^{-2} verzeichnen Werte, die sich zwischen $5,42 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $6,28 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bewegen. Eine Stromdichte von 200 A m^{-2} ist somit ausreichend, um eine zufriedenstellende Produktivität zu erreichen, was in diesem Zusammenhang bedeutet, dass die Säuren abgetrennt werden. Da die organischen Säuren mittels anaerober Fermentation hergestellt werden und die Produktivitäten von Propionat und Acetat mittels Fermentation

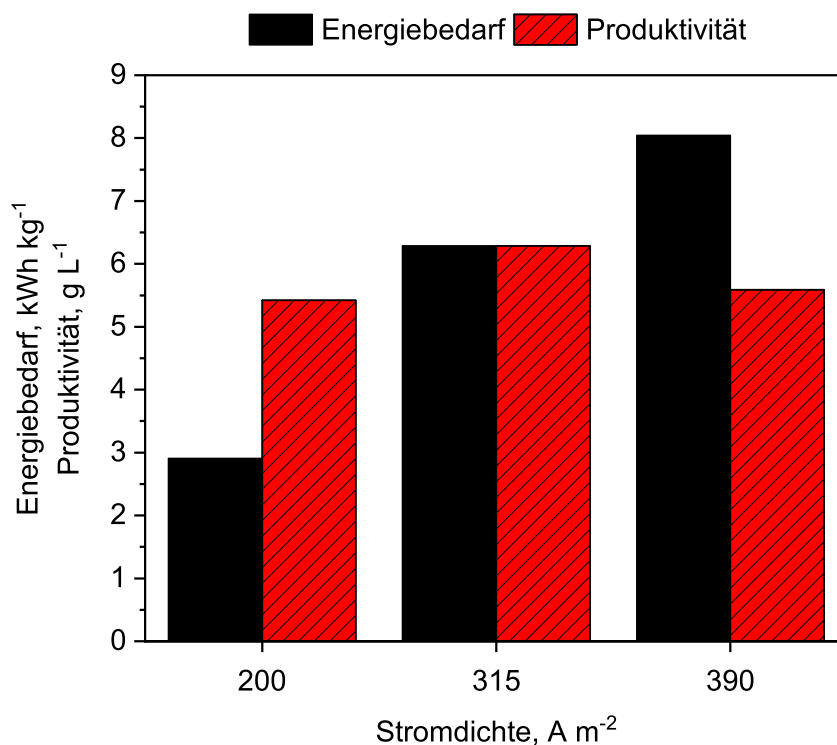


Abbildung 5.1: Produktivität und Energiebedarf einer synthetischen Lösung mit 5 g L⁻¹ Propionat

normalerweise kombiniert unter 2 g L⁻¹ h⁻¹ liegen, wurde diese Stromdichte als Operationsparameter gewählt.

In den Kammern der modifizierten Elektrodialyse, die nicht von der Fermentationsbrühe durchströmt werden, muss sich eine NaOH Lösung befinden, da Ladungsträger für den Stromtransport und Hydroxyionen für das Anti-Fouling benötigt werden. Vom Hersteller der Membranen wurde empfohlen, eine Konzentration von 0,3 M nicht zu überschreiten, da ansonsten die Membranen irreversibel beschädigt werden. Deswegen wurde untersucht, ob eine Reduktion der Konzentration dieser NaOH Lösung möglich wäre, um die Notwendigkeit von externen Chemikalien zu begrenzen. Dazu wurde jeweils eine Lösung mit 5 g L⁻¹ Propionat einmal mit 0,3 M und einmal mit 0,1 M NaOH entsalzt. In Abbildung 5.2 ist das Ergebnis dieser Entsalzung zu sehen. Die Produktivität der Entsalzung bei 0,1 M NaOH beträgt hierbei weniger als die Hälfte der Produktivität mit einer Konzentration an NaOH von 0,3 M NaOH. Dies könnte daran liegen, dass nicht genügend Ladungsträger vorhanden waren, um

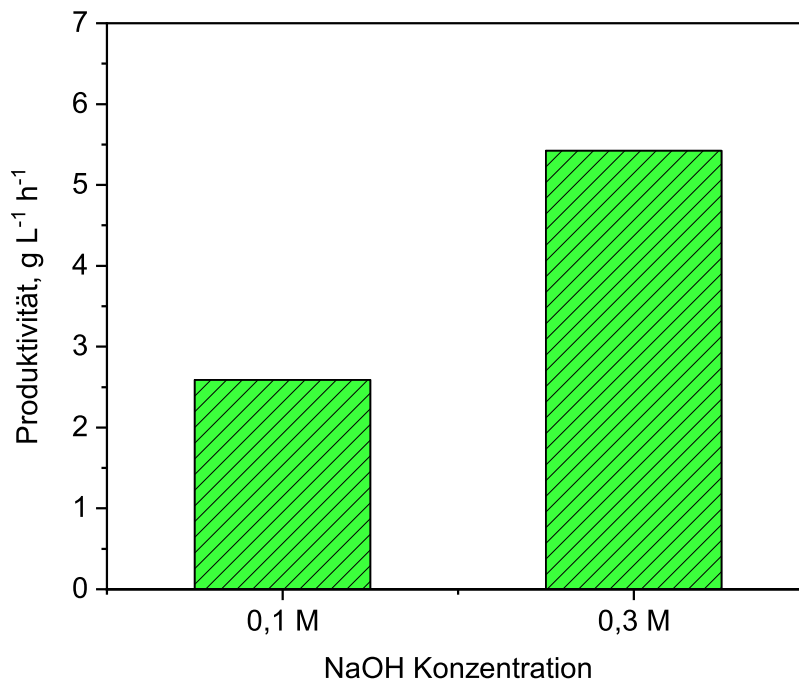


Abbildung 5.2: Auswirkung der NaOH Konzentration auf die Stromausbeute auf die Entsalzung einer synthetischen Lösung mit 5 g L⁻¹ Propionat

den Strom effizient zu transportieren. Dies wird untermauert durch die dabei erzielten Stromausbeuten. So wurde bei 0,1 M NaOH eine Stromausbeute von 20,0 % und 29,3 % bei 0,3 M NaOH erreicht.

Wie in Abbildung 5.3 zu erkennen, wurde die Differenz zwischen REED (200 A m⁻²) und der sogenannten Donnan Dialyse untersucht. Die Donnan Dialyse bezeichnet dabei den gleichen Aufbau wie bei der REED, nur mit dem Unterschied, dass kein Strom angelegt wird und somit keine zusätzliche Triebkraft der Entsalzung neben dem Konzentrationsgradienten über die Membran zur Verfügung steht. Dabei wurde für den Vergleich die Produktivität nach einer Laufzeit von 1 h untersucht. Dabei fällt auf, dass die Dialyse mit der zusätzlichen Triebkraft durch das elektrische Feld mit einer Produktivität von 5,35 g L⁻¹ h⁻¹ deutlich höher ausfällt als die der Donnan Dialyse mit 1,65 g L⁻¹ h⁻¹. Dieser Unterschied ist darin begründet, dass bei der Donnan Dialyse ausschließlich der Konzentrationsgradient über die Membran als Triebkraft dient. Dies ist bei der REED ebenso der Fall, allerdings wird hier zusätzlich noch eine Triebkraft durch die Anziehung der negativ geladenen Ionen durch die positiv polarisierte Elektrode erzeugt.

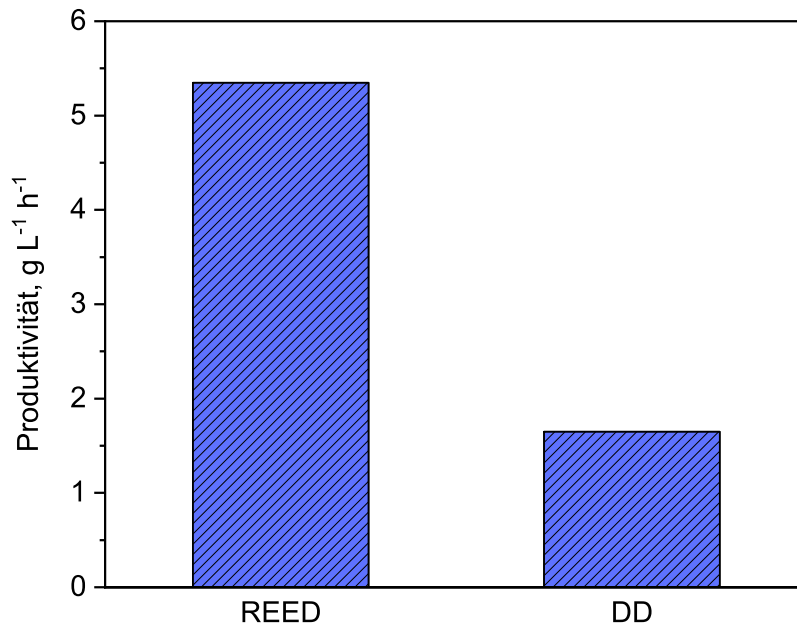


Abbildung 5.3: Vergleich zwischen Donnan Dialyse (DD) und reversed electro-enhanced dialysis (REED) mit synthetischer Propionatlösung

Neben Propionat können während der Fermentation noch andere organische Säuren vorliegen. Diese sind Laktat, das als Zwischensubstrat fungiert sowie Acetat. Butyrat wurde ebenso untersucht, um festzustellen, ob auch längerket-tige organische Säuren entfernt werden können. Deswegen wurde ein Gemisch dieser vier Säuren untersucht und mittels der Elektrodialyse entsalzt. Der Ver-lauf der Entfernung dieser 4 Säuren aus synthetischer Lösung ist in Abbildung 5.4 zu sehen. Für eine bessere Darstellung wurden die Konzentrationsverläufe normalisiert, da die Salze in den zu erwartenden Konzentrationen vorgelegt wur-den. Deutlich ist zu erkennen, dass Acetat und Propionat besser entfernt werden konnten, was bedeutet, dass eine größere Konzentration in geringerer Zeit ent-fernt wurde. Im Vergleich dazu dauerte die Entfernung von Laktat und Butyrat länger. Der Unterschied liegt in der längeren hydrophoben Kette der jeweiligen Carboxylsäure. So steigt mit zunehmender Kettenlänge die Zeit an, die die Ionen benötigen, um die Membranen zu passieren. Milchsäure besitzt wie Propionsäure ebenfalls 3 Kohlenstoffatome, durch die Hydroxylgruppe in β Stellung ist das

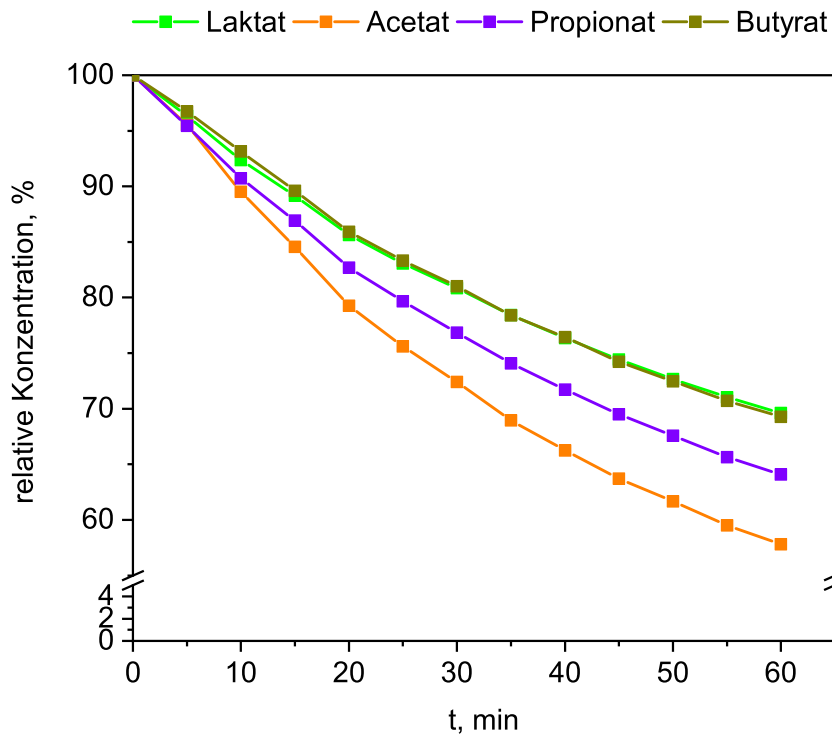


Abbildung 5.4: Vergleich zwischen vier organischen Säuren und deren Entfernung

Molekül allerdings größer als Propionsäure. Deswegen passiert Milchsäure die Membranen langsamer als Propionsäure und in etwa so schnell wie Buttersäure. Carboxylsäuren, die noch längere Ketten als die hier dargestellten aufweisen, besitzen deswegen aufgrund des verstärkten hydrophoben Charakters eine geringere Entfernungsraten als die hier aufgezeigten.

Für die Etablierung der Elektrodialyse, gekoppelt mit der Fermentation, wurde abschließend Fermentationsbrühe einer Laktatfermentation mit abgetöteten Zellen verwendet. Das Schaltintervall des Polaritätswechsels wurde auf 1 min eingestellt. Dies diente der Funktionsüberprüfung des angedachten Anti-Fouling Mechanismus der Elektrodialyse. Dies konnte anhand der Aufzeichnung des elektrischen Widerstandes erfolgen. Wie in Abbildung 5.5 dargestellt, steigt der Widerstand in einem Intervall von einer Minute jeweils an und sinkt danach wiederum schlagartig ab. Der Anstieg lässt sich durch die Ausbildung einer Deckschicht auf den Membranen begründen. Ausgelöst wird dies durch die Zellen und andere Feststoffe in der Fermentationsbrühe. Da der Potentiostat die Stromstärke konstant hält, muss die Spannung nach oben korrigiert werden, so

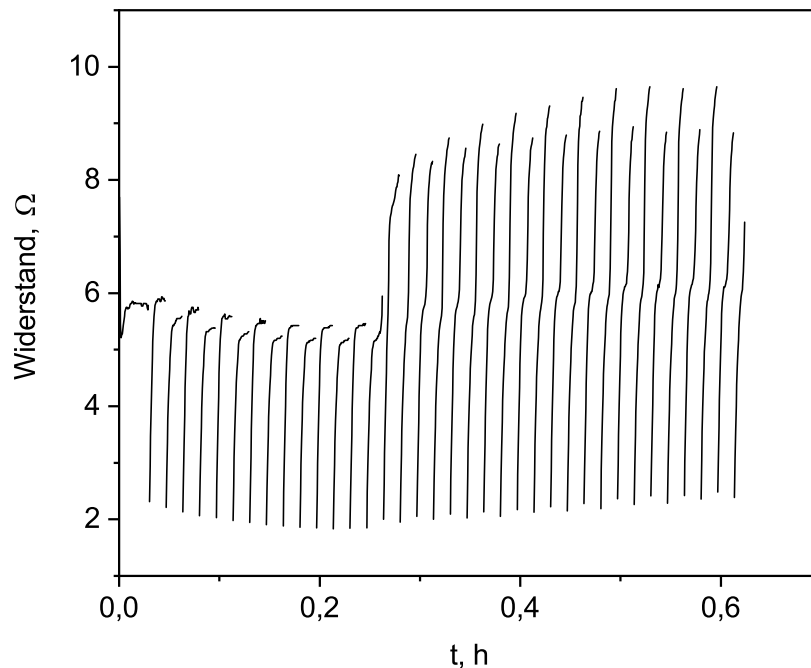


Abbildung 5.5: Entsalzung einer beendeten Laktatfermentation bei einer Stromdichte von 200 A m^{-2}

dass die gewünschte Stromstärke aufrecht erhalten blieb. Mit Fortschreiten der Entsalzung fällt allerdings auf, dass der jeweilige Widerstand am Ende eines Intervalls zunimmt. Dies ist wahrscheinlich auf eine irreversible Anlagerung an den Membranen zurückzuführen, so dass mit zunehmender Zeit nicht mehr die gesamte Deckschicht entfernt werden konnte. Die hierbei erzielte Rate der Entfernung des Laktats liegt bei $5,25 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. So liegt trotz der Ausbildung einer Deckschicht und des Polaritätswechsel die Entfernungsrates immer noch deutlich über den mikrobiellen Produktionsraten von Propionat und Acetat und darüber hinaus nur geringfügig unter den Entfernungsrates bei Verwendung von synthetischen Lösungen.

Im Anschluss an die Laktatfermentation wurde eine Mischkultur aus *B. coagulans* und *V. criceti* zur Untersuchung der Elektrodialyse verwendet. Nach der abgeschlossenen Fermentation wurde getestet, inwieweit die angedachte Mischkultur einen Einfluss auf die Durchführung der Entsalzung hat. Hierbei wurde wiederum ein Wechselintervall von 1 min gewählt. In Abbildung 5.6 ist der Widerstandsverlauf zu sehen, der sich während des Entsalzungsvorgangs einstellt.

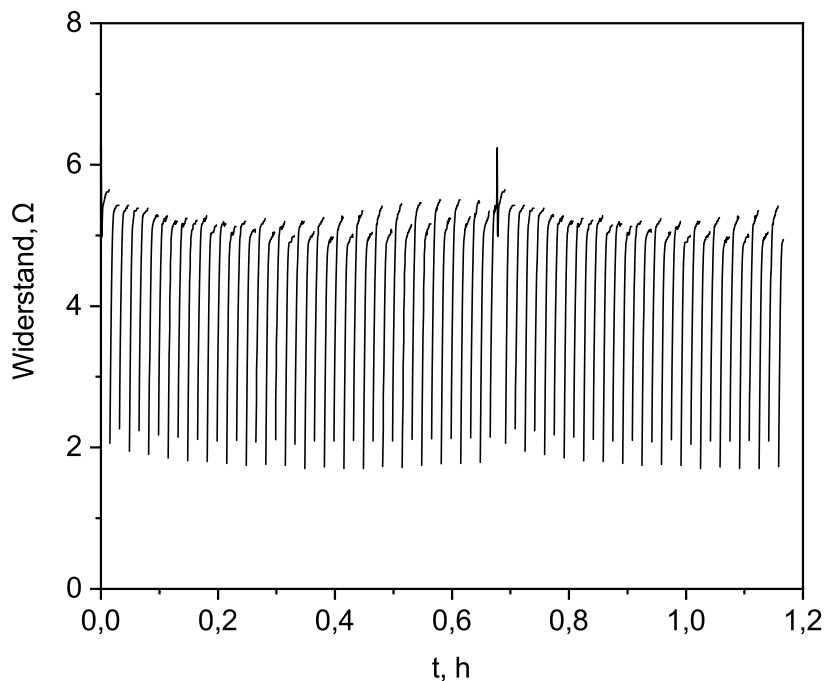


Abbildung 5.6: Entsalzung einer beendeten Mischkultur aus *B. coagulans* und *V. criceti* bei einer Stromdichte von 200 A m^{-2}

Dabei steigt der Widerstand innerhalb des einminütigen Intervalls an, bevor, bedingt durch den Polaritätswechsel, er wieder absinkt. Im Verlauf der gesamten Entsalzung ist zu erkennen, dass der Widerstand am Ende des jeweiligen Intervalls nicht mit zunehmender Dauer ansteigt. Außerdem sinkt der Widerstand immer wieder auf den initialen Wert von circa $2 \text{ } \Omega$ ab. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Deckschicht immer wieder abgetragen werden konnte und somit keine irreversible Verschmutzung der Membranoberfläche erfolgte. Die dabei erzielte Rate der Entfernung erzielte in Kombination der gebildeten Produkte Propionat und Acetat einen Wert von $4,4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

5.1.1 Fazit der Elektrodialyseuntersuchungen

Zusammenfassend kann man aus den vorangegangenen Experimenten schlussfolgern, dass die Anwendung der Elektrodialyse die angedachte Entfernung der organischen Ionen erfolgreich bewerkstelligen kann. Somit kann die Problematik der Inhibierung durch die gebildeten Produkte entgegen gewirkt werden.

Zudem zeigte sich, dass der aufgebrauchte Strom zusätzlich die Triebkraft der Entfernung der Ionen verstärkt und die jeweiligen Entfernungsraten der Ionen deutlich erhöhen kann. Jedoch kann damit keine gezielte Entfernung einzelner Säure erreicht werden, da die Trennung anhand der Wertigkeit der Ladung erfolgt. In diesem vorliegenden Fall können nur einwertige Ionen die Membranen passieren. Bei den verwendeten Säuren handelt es sich aber ausschließlich um einwertige Säuren, da diese auch bei der Fermentation entstehen. Deswegen ist lediglich eine unterschiedliche Rate der Entfernung der organischen Säuren feststellbar. Es zeigte sich, dass organische Säuren schneller entfernt werden, je kürzer die hydrophobe Kette der Carboxylsäure ist. Außerdem wurde festgestellt, dass eine verzweigte Hydroxylgruppe die Entfernung der Säure ebenfalls negativ beeinflusst und die Diffusion durch die Membranporen verlangsamt. Bei der Anwendung von realen Fermentationsbrühen wurde demonstriert, dass die angedachte Methode der Deckschichtablösung durch Wechsel der Polarität der Elektroden funktioniert. So konnte anhand des Verlaufs des elektrischen Widerstandes erläutert werden, dass der Widerstand innerhalb des Schaltintervalls zwar ansteigt, allerdings nach dem Schaltvorgang wieder auf den initialen Wert absinkt. Lediglich der Widerstand am Ende eines Intervalls kann über die Zeitdauer ansteigen, was an einem irreversiblen Fouling der Membranen liegt. Die Entfernung der Säuren wurde dabei aber nicht in einem Maße beeinflusst, dass die Kombination der Elektrodialyse und Fermentation dadurch gehindert wurde.

5.2 Laktatproduktion mit *B. coagulans*

Für die Untersuchungen des Wachstumsverhaltens von *B. coagulans* wurde zuerst reine Glucose als Substrat eingesetzt. Wie in Abbildung 5.7 zu sehen, wurde eine Glucosekonzentration von $52,6 \text{ g L}^{-1}$ vorgelegt, die nach einer kurzen Adaptionszeit von ca. 5 h kontinuierlich verbraucht wurde. Parallel dazu verblieb die optische Dichte bis 5 h nahezu unverändert und ging anschließend in ein exponentielles Wachstum über, das in einem finalen Wert von 16 mündete und anschließend konstant blieb. Die Wachstumsrate μ betrug während des exponentiellen Wachstums hierbei $0,43 \text{ h}^{-1}$. Der Verbrauch der Glucose ist gekoppelt mit der Bildung von Laktat, so dass mit Einsetzen des exponentiellen Wachstums Laktat gebildet wurde. Die Laktatbildung stoppte, als die Glucose komplett verbraucht war. Die Ausbeute beträgt hierbei $1,08 \text{ g Laktat pro g Glucose}$ mit einer Produktivität von $6,24 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ während des exponentiellen Wachstums. Die zu hohe Ausbeute, die den theoretischen Wert von $1 \text{ g Laktat pro g Glucose}$ übersteigt, liegt wahrscheinlich daran, dass in dem verwendeten Medium komplexe Bestandteile wie Hefeextrakt und Pepton vorhanden waren, die ebenfalls zur Laktatgewinnung genutzt werden können. Im Vergleich mit

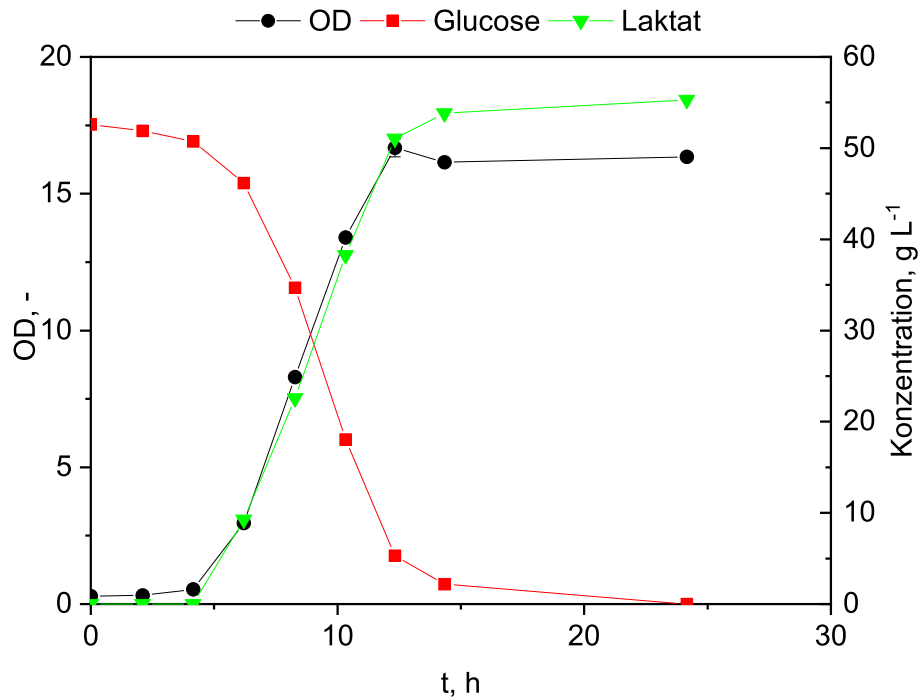


Abbildung 5.7: Fermentation zu Laktat aus Glucose mit *B. coagulans* im Satzverfahren

der in Kapitel 3 aufgeführten Werten aus der Literatur zeigt sich, dass die hier durchgeführte Untersuchung zu einer vergleichbaren Produktivität führte und dass die maximal mögliche Ausbeute erreicht wurde [29].

Im Anschluss an die Kultivierung im Satzverfahren sollte überprüft werden, ob auch bei einer Glucosezugabe während der Fermentation die Substratquelle verbraucht wird und ob sich daraus folgernd eine Substrat- oder Produktinhibition ergibt. Dazu wurde wie Abbildung 5.8 zeigt eine Kultivierung von *B. coagulans* mit Glucose als Substrat durchgeführt. Zunächst wurde Glucose im Reaktionsmedium vorgelegt und nach Verbrauch der initialen Glucose insgesamt noch drei weitere Male Glucose pulsartig in den Reaktor eingebracht. Zu Beginn wurden $33,7 \text{ g L}^{-1}$ Glucose vorgelegt, die in ca. 10 h nahezu vollständig verbraucht wurden. Parallel dazu wurde Laktat und Biomasse gebildet. Wie zu sehen, nimmt die Laktatkonzentration konstant zu und erreicht einen finalen Titer von $90,2 \text{ g L}^{-1}$ mit einer Produktivität von $3,60 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ während des exponentiellen Wachstums. Insgesamt beträgt die Ausbeute 101 %, was bedeutet, dass die gesamte Glucose in Laktat umgewandelt wurde. Im Vergleich zur

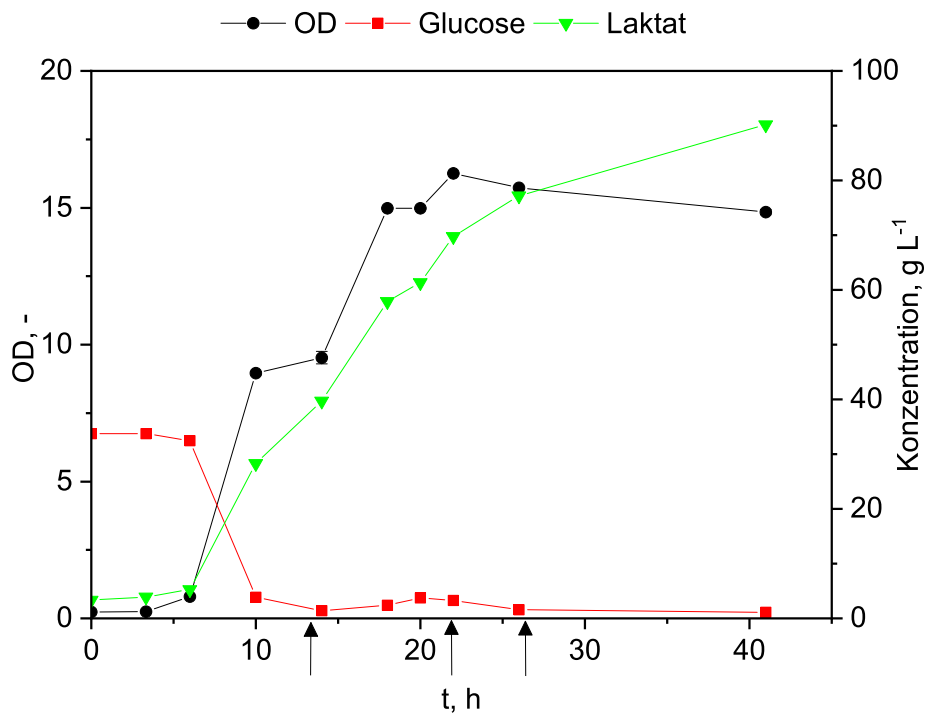


Abbildung 5.8: Laktatproduktion aus Glucose mittels *B. coagulans*. Zu den Zeitpunkten, die durch die schwarzen Pfeile markiert werden, wurde Glucose in den Reaktor eingebracht.

batch Kultur zeigt sich, dass der Produkttiter gesteigert werden konnte, jedoch die Produktivität einen deutlich geringeren Wert aufweist. Dies liegt wahrscheinlich ausschließlich darin begründet, dass mehr Glucose hätte zugegeben werden können als durchgeführt. So verbleibt die Glucosekonzentration trotz der Zugabe bei nahezu 0, was den Schluss zulässt, dass die zugegebene Glucose direkt verstoffwechselt wurde. Allerdings demonstriert dieses Ergebnis, dass sich durch die Glucose- beziehungsweise Kohlenstoffzufuhr die Freisetzung des Laktats steuern lässt. Dies ist wichtig, da der Partnermikroorganismus *V. criceti* durch eine Konzentration ab 10 g L^{-1} inhibiert wird und deswegen die Laktatkonzentration unter diesem Schwellenwert gehalten werden sollte.

In Abbildung 5.9 ist die Fermentation von *B. coagulans* mit Xylose als Substrat zu sehen. Zunächst wurden hierfür $25,1 \text{ g L}^{-1}$ Xylose vorgelegt. Wie sich erkennen lässt, war die Adaptionzeit von *B. coagulans* deutlich länger bei Xylose als Glucose. Hier beträgt die Adaptionzeit ungefähr 20 h, in denen nahezu kein Wachstum feststellbar war. Erst danach war ein Anstieg der optischen Dichte

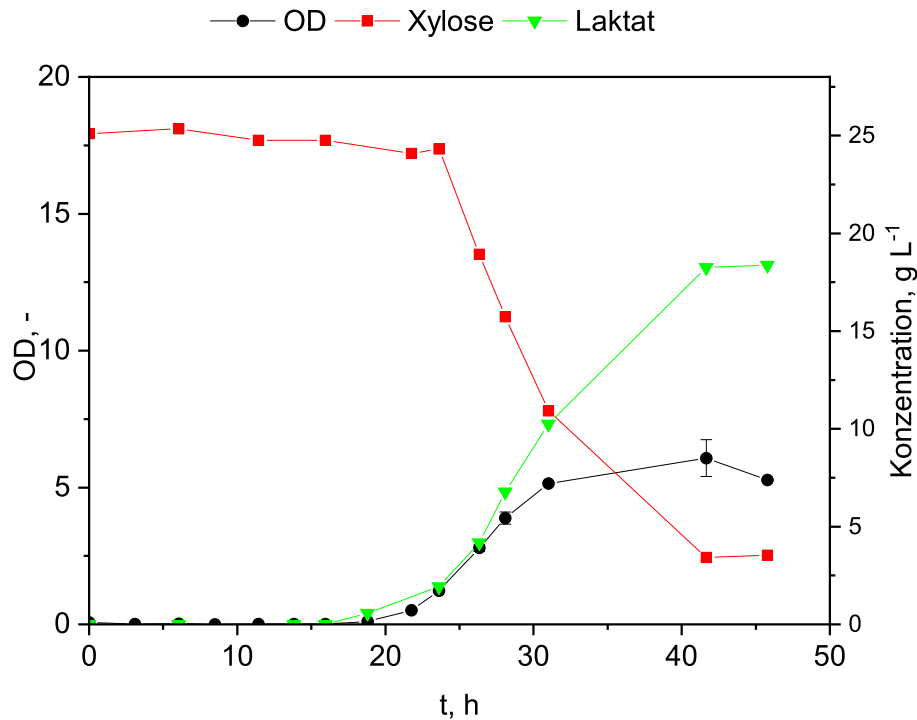


Abbildung 5.9: Laktatproduktion aus Xylose mittels *B. coagulans*.

feststellbar. Die Wachstumsrate beträgt hierbei $0,19 \text{ h}^{-1}$. Was zudem auffällt ist die Tatsache, dass die Xylose nicht komplett verbraucht wurde und eine Restkonzentration von $3,54 \text{ g L}^{-1}$ verblieb. Analog zum Verbrauch der Xylose wurde Laktat bis zu einer Konzentration von $18,25 \text{ g L}^{-1}$ gebildet und blieb danach konstant, obwohl noch Xylose vorhanden war. Insgesamt beträgt hierbei die Ausbeute an Laktat bezogen auf Xylose $0,85 \text{ g g}^{-1}$ mit einer Produktivität von $1,12 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die Wiederfindungsrate des Kohlenstoffes beträgt 96% , was sich im Rahmen der üblichen Abweichung bewegt, bedingt durch Fehler bei der Messung und Analytik.

Anschließend an die Kultivierung mit Xylose als Substrat wurde ein Mischsubstrat aus Glucose und Xylose als Kohlenstoffquelle verwendet. Während der Fermentation wurde zusätzlich nach 10 h und 20 h Glucose in das Reaktionsmedium gegeben. Wie in Abbildung 5.10 zu erkennen, begann die Laktatproduktion nach einer Adaptionszeit von ca. 6 h. Danach stieg die Laktatkonzentration sprunghaft an. Dies liegt vor allem an dem Verbrauch der zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Glucose. Zu zwei Zeitpunkten wurde Glucose zusätzlich in den Reaktor hinzugegeben, die jeweils sofort zu Laktat verstoffwechselt

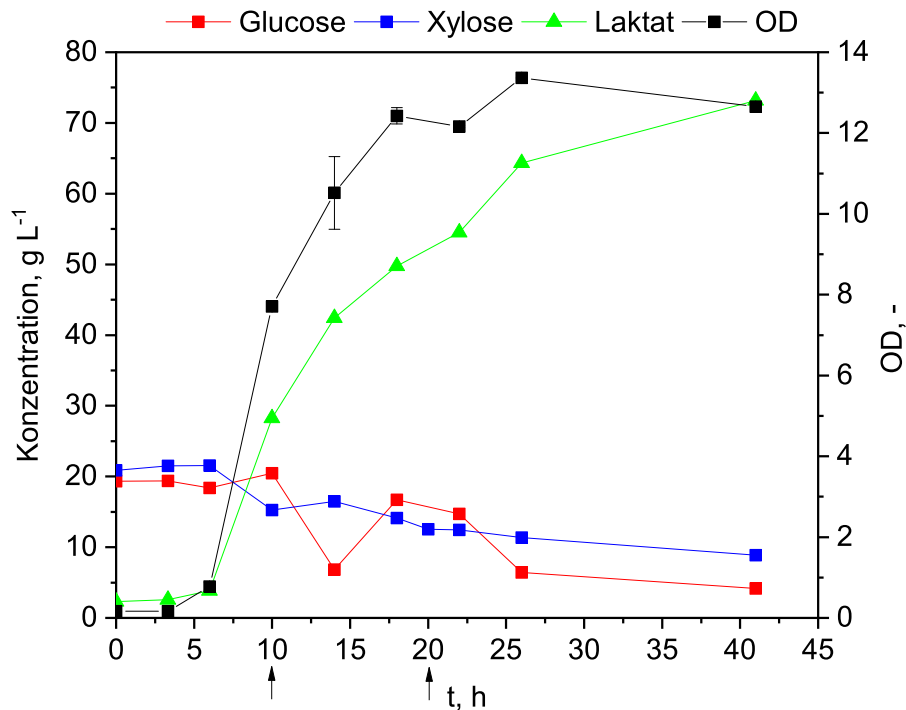


Abbildung 5.10: Laktatproduktion aus Xylose und Glucose mittels *B. coagulans*. Die schwarzen Pfeile symbolisieren die Zeitpunkte zu denen Glucose zusätzlich in den Reaktor eingebracht wurde.

wurde, da die Glucosekonzentration nach der Zugabe jeweils sogar abnahm und keine Akkumulation der Glucose im Reaktionsmedium feststellbar war. Die Xylosekonzentration nahm im Vergleich dazu nur langsam ab, so dass nur etwa die Hälfte der eingesetzten Xylose überhaupt verbraucht wurde und die Laktatbildung fast ausschließlich über die Aufnahme von Glucose bewerkstelligt wurde. Die Ausbeute erreicht einen Wert von $1,01 \text{ g g}^{-1}$, der dadurch hervorgerufen wird, dass fast ausschließlich Glucose konsumiert wird und nur Laktat als Produkt entsteht. Der finale Produkttiter beträgt schlussendlich $73,2 \text{ g L}^{-1}$ bei einer Produktivität von $3,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Die lange Zeitdauer bis zum Beginn des Xyloseverbrauchs lässt darauf schließen, dass Xylose im Vergleich zu Glucose als Substrat weniger präferiert wird. So konnte von Glaser *et al.*, Zhang *et al.* und Ye *et al.* gezeigt werden, dass bei einem Mischsubstrat aus Glucose und Xylose zuerst die Glucose so weit verbraucht wird, bis beide Zucker die in etwa gleiche Konzentration aufweisen und erst dann auch die Xylose verstoffwechselt wird [28] [89] [93]. Dies deutet darauf

hin, dass bei der Fermentation eines Mischsubstrates aus Glucose und Xylose Glucoserepression auftritt.

Tabelle 5.1: Ergebnisse der Laktatfermentation

Fermentation	Ausbeute g g ⁻¹	Produktivität g L ⁻¹ h ⁻¹	Konzentration g L ⁻¹
Glucose (batch)	1,08	6,24	56,8
Glucose (fed-batch)	1,01	3,60	90,2
Xylose	0,85	1,12	18,3
Glucose und Xylose	1,01	3,03	73,2

5.2.1 Fazit der Laktatproduktion mit *B. coagulans*

Schlussfolgernd kann man aus der batch und fed-batch Glucose Fermentation ableiten, dass sich *B. coagulans* sehr gut als Laktatproduzent eignet. Die Ergebnisse der Laktatfermentation mit Hilfe von *B. coagulans* sind in Tabelle 5.1 zu finden. Einerseits werden eine hohe Ausbeute und Produktivität erreicht und andererseits werden neben Laktat keine anderen Produkte gebildet. Des weiteren ist durch Laktat keine Inhibierung feststellbar, was bedeutet, dass das gebildete Laktat nicht das Wachstum des Bakteriums hemmt. Deswegen eignet sich *B. coagulans* besonders für die Bereitstellung des Laktats für die weitere Verwertung von anderen Mikroorganismen, die das Laktat als Substrat nutzen. Im Fall von Xylose ist deutlich ersichtlich, dass Xylose im Vergleich zu Glucose das weniger präferierte Substrat ist. Allerdings kann auch in Fällen in denen keine Glucose zur Verfügung steht, Xylose als Kohlenstoffquelle verwendet werden. Dafür müssen aber geringere Ausbeuten und Produktivitäten in Kauf genommen werden. Besonders im Hinblick auf die Verwertung von lignocellulosehaltigen Restströmen ist diese Tatsache wichtig, da Lignocellulose zu großen Teilen aus Glucose und Xylose besteht und deswegen eine Totalverwertung solcher Substrate möglich ist. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Mischsubstrat aus Glucose und Xylose eingesetzt werden kann. Dies ermöglicht die Verwendung von Hydrolysaten aus Biomasse, bei denen ansonsten eine aufwändige Trennung der C5 und C6 Zucker vonnöten wäre. Außerdem zeigte sich für die angedachte Produktion des Laktats als Zwischensubstrat für eine mikrobielle Verwertung hin zu kurz- und mittelkettigen Ketten, dass sich durch die Zugabe der Kohlenstoffquelle die Freisetzung des Laktats steuern lässt, so dass eine inhibierende Konzentration an Laktat für den zweiten mikrobiellen Partner in der angedachten Mischkultur vermieden werden kann.

5.3 Propionsäureproduktion mit *V. criceti*

Wie eingangs erwähnt wird der Mikroorganismus *V. criceti* durch das Substrat Laktat inhibiert. Deswegen wurden zunächst in 50 mL Anaerobflaschen Vorversuche durchgeführt um zu untersuchen, ab welcher Substratkonzentration eine Hemmung des Wachstums einsetzt. Darauf aufbauend wurde die Fütterungsstrategie entwickelt, um möglichst hohe Konzentrationen an Propionsäure zu generieren.

In Abbildung 5.11 ist zu sehen, dass die Wachstumsrate von *V. criceti* durch vorhandenes Laktat beeinflusst wird. Bereits ab einer Konzentration an Laktat von 20 g L^{-1} tritt totale Inhibierung ein, was bedeutet, dass kein Wachstum mehr feststellbar ist. Schlussfolgernd sollte deswegen die Laktatkonzentration einen Schwellenwert von 20 g L^{-1} nicht überschreiten, da ansonsten kein Propionat mehr gebildet wird. Dies bedingt, dass Glucose oder Xylose, welche zu Laktat verstoffwechselt werden, nur dosiert zugegeben werden, um ein Überschreiten des Schwellenwertes zu vermeiden. Deswegen wurde versucht, die Laktatkonzentration im Reaktor möglichst bei Werten zu halten, die 10 g L^{-1} nicht überschreiten. Bei dieser Konzentration ist das Wachstum zwar bereits gehemmt, allerdings sollte auch genügend Substrat zur Verfügung stehen, damit die Mikroorganismen nicht in einen Bereich der Substratinsuffizienz geraten.

Für die Untersuchung der Propionsäureproduktion mittels *V. criceti* wurde zunächst eine batch Kultur durchgeführt. Wie in Abbildung 5.12 zu sehen, wurde eine Substratkonzentration von $9,5 \text{ g L}^{-1}$ Kaliumlaktat vorgelegt. Nahezu ohne Adaptionsphase wurde das Laktat sofort verbraucht und daraus Propionat und Acetat gebildet. Dies lässt sich ebenfalls am Verlauf der OD feststellen, da diese sofort mit Beginn der Fermentation bis auf einen Maximalwert von 1,6 anstieg und anschließend bis auf einen Endwert von 1,2 abnahm. Die Wachstumsrate wurde hier mit $0,21 \text{ h}^{-1}$ bestimmt. Dadurch, dass nach dem Erreichen der maximalen OD kein Substrat mehr vorhanden war, könnte es zur Auflösung der Zellen kommen, so dass die Abnahme der OD eintrat. Im Fall von Propionat stellt sich ein Endwert von $7,13 \text{ g L}^{-1}$ und im Fall von Acetat von $2,28 \text{ g L}^{-1}$ ein. Das finale Verhältnis von Propionat zu Acetat beträgt zum Schluss $2,54 \text{ mol mol}^{-1}$. Während der Phase des stärksten Anstiegs der OD und somit auch der Phase des größten Wachstums beträgt die Produktivität von Propionat $0,46 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und die von Acetat $0,17 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die Ausbeute an Propionat und Acetat beträgt hierbei $0,75 \text{ g g}^{-1}$ beziehungsweise $0,24 \text{ g g}^{-1}$.

Um zu erforschen, inwieweit sich mit einer mehrfachen Zugabe von Laktat die Produkttiter und Ausbeuten steigern lassen können, wurde eine Fermentation

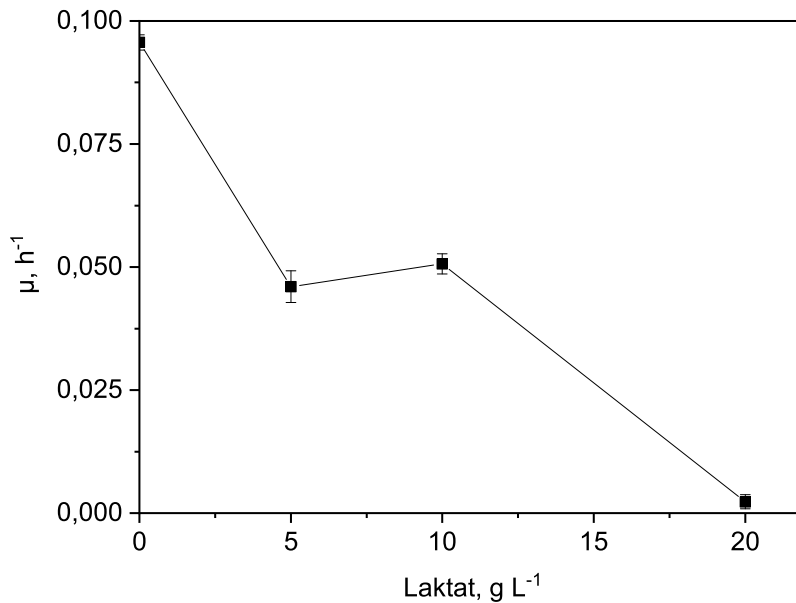


Abbildung 5.11: Inhibierung von *V. criceti* durch Laktat

von *V. criceti* durchgeführt, bei der Laktat im Laufe der Fermentation zugegeben wurde. Diese Zeitpunkte sind in 5.13 als schwarze Pfeile kenntlich gemacht. Wie in diesem Diagramm zu erkennen, erfolgte eine zweimalige Zugabe von Laktat. In beiden Fällen wurde danach das Laktat verbraucht. Propionat und Acetat wurden weiterhin kontinuierlich gebildet. Im Hinblick auf den Verlauf der OD fällt auf, dass hier ebenfalls keine Adaptionszeit vorlag. So steigt die OD direkt auf einen Wert von 1,5, bleibt konstant und sinkt dann ab auf einen Wert von 0,9. Hierbei fällt auf, dass, obwohl noch Laktat vorhanden war, eine Abnahme der OD eintrat. Vermutlich erfolgte eine Lyse der Zellen aufgrund der gebildeten organischen Säuren. Auffallend ist zudem die kleinere Substratverbrauchsrate, die nach der zweiten Zugabe von Laktat nach 18 h messbar ist. Diese beträgt beim Verbrauch des vorgelegten Substrats $0,72 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, nach der ersten Zugabe $0,77 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und nach der zweiten Zugabe $0,31 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Der Grund hierfür liegt vermutlich in der Zunahme der Menge an Propionat und Acetat, die inhibierend auf das Wachstum und den Stoffwechsel von *V. criceti* wirken. Die Inhibierung durch die gebildeten Säuren ist wahrscheinlich auch der Grund für den nicht vollständigen Umsatz des verfügbaren Laktats, das abschließend mit einer Konzentration von $6,5 \text{ g L}^{-1}$ im Reaktor verbleibt. Die finalen Produkttiter von Propionat und Acetat, die nach 36 h erreicht werden, betragen $11,86 \text{ g}$

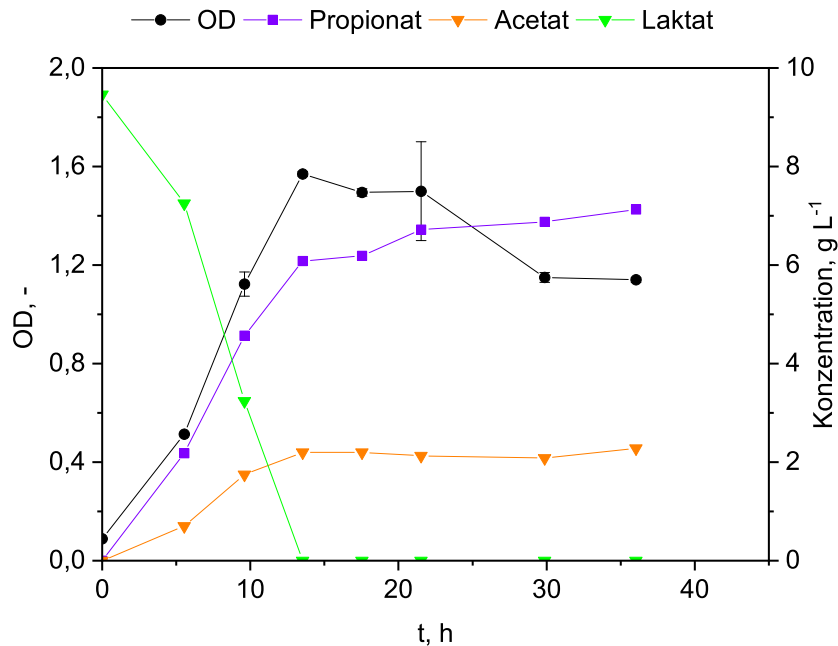


Abbildung 5.12: Propionatproduktion ausgehend von Laktat im Satzverfahren mit *V. criceti*

L^{-1} und $4,5 \text{ g L}^{-1}$. Die Produktionsraten von Propionat und Acetat betragen hierbei $0,47 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $0,13 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ mit der jeweiligen Ausbeute von $0,69 \text{ g g}^{-1}$ und $0,26 \text{ g g}^{-1}$. Das molare Verhältnis der beiden Produkte beträgt nach 36 h Fermentationszeit 2,13 mol Propionat pro mol Acetat. Ausgehend von den Ergebnissen dieses Experiments kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine Zugabe von Laktat zu einer Steigerung der Konzentration des Zielprodukts Propionat führt, im Vergleich zu dem vorherigen batch Experiment (vgl. Abbildung 5.12). Zudem ist auch nach externer Substratzugabe ein weiteres Wachstum möglich, jedoch wird dies mit zunehmender Konzentration an Propionat verlangsamt. Des weiteren sollte die Laktatkonzentration zu Beginn niedrig gehalten werden und nach und nach eine Laktatzugabe erfolgen, da eine zu hohe initiale Laktatkonzentration zu einer Substratinhibierung führt. Im Vergleich mit der batch Kultur wird hier ein geringeres molares Verhältnis der Produkte erreicht, das näher an dem theoretischen Wert von 2 liegt. Dadurch, dass bei mehrmaliger Zugabe im Vergleich mehr Acetat gebildet wird, so dass sich das Verhältnis verringert, wurde auch mehr ATP gebildet, das von den Mikroorganismen benötigt wird. Dies ist in Abbildung 3.6 dargestellt, da nur der Stoffwechselweg zu Acetat der Generierung von ATP dient.

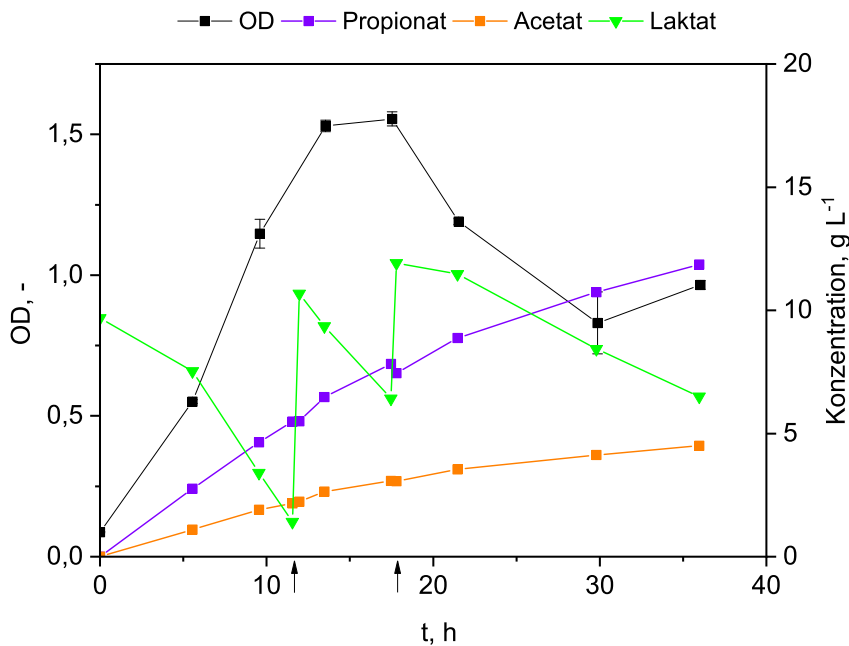


Abbildung 5.13: Propionatproduktion aus Laktat mit *V. criceti*. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Zugabe von zusätzlichem Laktat

Neben der händischen Zugabe von Laktat wurde auch die automatisierte Zugabe, das heißt mit einer Pumpe, untersucht. Hierbei wurde eine konstante Rate des Feeds eingestellt, so dass immer die gleiche Menge an Laktat pro Zeiteinheit in den Reaktor eingebracht wurde. Wie in 5.14 zu sehen, war es möglich, die Laktatkonzentration unter 4 g L^{-1} zu halten, so dass nur eine geringe Inhibierungswirkung durch das Substrat eintrat. Nachdem zuerst Laktat mittels Pumpe vorgelegt wurde, erfolgte eine ebenfalls pulsartige Zugabe nach 10 h, um den Zellen Substrat zur Verfügung zu stellen. Anschließend erfolgte nach 14 h die konstante Zugabe von Laktat mittels der Pumpe. Dies ist in Abbildung 5.14 im unteren Diagramm zu erkennen. Da bereits zu Beginn mittels der Feedpumpe die initiale Laktatkonzentration bereitgestellt wurde, war dieser Wert zu Beginn nicht 0. Im Anschluss erfolgte die pulsartige Zugabe von weiterem Substrat, gekennzeichnet durch die stufenartige Darstellung bei ca. 10 h Fermentationszeit. Kurz danach wurde die kontinuierliche Zufuhr des Feeds gestartet, was an dem abruptem Anstieg der Pumprate ersichtlich wird, die anschließend auf einem konstanten Wert gehalten wurde. Wie zu sehen, stieg zunächst bis 20 h die Laktatkonzentration an, was bedeutet, dass mehr Substrat zur Verfügung stand als verbraucht wurde. Anschließend wurde dieses Laktat verbraucht und war nahezu 0 bis zum Ende der Fermentation. Gleichzeitig stiegen die Acetat- und Propio-

natkonzentrationen jedoch weiter, was im Umkehrschluss die Folgerung zulässt, dass die konstante Feedrate gerade so viel Laktat in den Reaktor einbrachte, wie anschließend verbraucht wurde. Anhand des Verlaufs der OD ist in diesem Fall feststellbar, dass es nicht zu einer Lyse der Zellen kommt. So erreicht die OD einen Endwert von 2,0, was zugleich auch dem globalen Maximum entspricht. Möglicherweise ist der Grund hierfür, dass Laktat in nur geringen Konzentrationen im Reaktionsraum vorhanden war und nicht pulsartig zugegeben wurde. Die erreichte OD ist im Vergleich mit den beiden vorangegangenen Experimenten die höchste erreichte OD, womit folglich auch die höchste Biomassekonzentration erreicht wurde. Zudem fällt bei diesem Vergleich auf, dass es nur zu einem Zeitpunkt zu einem geringen Abfall der OD bei 20 h Fermentationszeit kommt, allerdings diese danach wieder ansteigt. Obwohl höhere Konzentrationen an Propionat und Acetat erreicht werden, tritt augenscheinlich keine Lyse der Zellen und die damit verbundenen Abnahme der OD ein.

Schlussendlich werden Titer von $15,13 \text{ g L}^{-1}$ für Propionat und $5,18 \text{ g L}^{-1}$ für Acetat erreicht, mit der jeweiligen Produktivität von $0,46 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $0,16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die Ausbeute beträgt hier für Propionat $0,72 \text{ g g}^{-1}$ und $0,25 \text{ g g}^{-1}$ für Acetat. Hierbei wird ein molares Verhältnis von 2,37 mol Propionat pro mol Acetat erreicht. Im Vergleich mit der batch beziehungsweise der manuellen Zugabe des Laktats konnte der Produkttiter durch die kontinuierliche Zugabe des Substrats deutlich gesteigert werden.

Im Anschluss daran wurde die Verwendung von Fermentationsbrühe untersucht. Dazu wurde eine Fermentationsbrühe einer batch Kultur von *B. coagulans* zentrifugiert, so dass Feststoffe wie beispielsweise Zellen oder Zelltrümmer entfernt wurden. Diese Fermentationsbrühe, die nur Laktat und die bereits vorhandenen Medienbestandteile enthielt, wurde ebenfalls mittels einer Pumpe in den Reaktionsraum eingebracht. Dies ist in Abbildung 5.15 dargestellt. Im unteren Diagramm ist das Volumen der Zugabe sowie die Pumprate der Fermentationsbrühe zu sehen. Dabei wurde zu Beginn das Substrat in Form der Fermentationsbrühe vorgelegt und nach ca. 11 h, nachdem das initiale Laktat verbraucht war, eine pulsartige Zugabe weiteren Substrats mittels Feedpumpe bewerkstelligt. Deswegen ist in dem unteren Diagramm ein plötzlicher Anstieg der Pumprate zu verzeichnen. Im weiteren Verlauf der Pumprate ist zu erkennen, dass diese linear zunimmt, wobei insgesamt zwei Mal eine manuelle Anpassung der Rate vorgenommen wurde, so dass zwei Sprünge in den Pumpraten sichtbar sind. Im Fall des Volumens ist nach dem Sprung zu Beginn bei 10 h ein daran anschließender nahezu exponentieller Verlauf auszumachen, bedingt durch die linear ansteigende Feedrate und manuelle Korrektur deren. Im Vergleich zu der zuvor dargestellten fedbatch Kultivierung ist hier das hinzugefügte Volumen beträchtlich

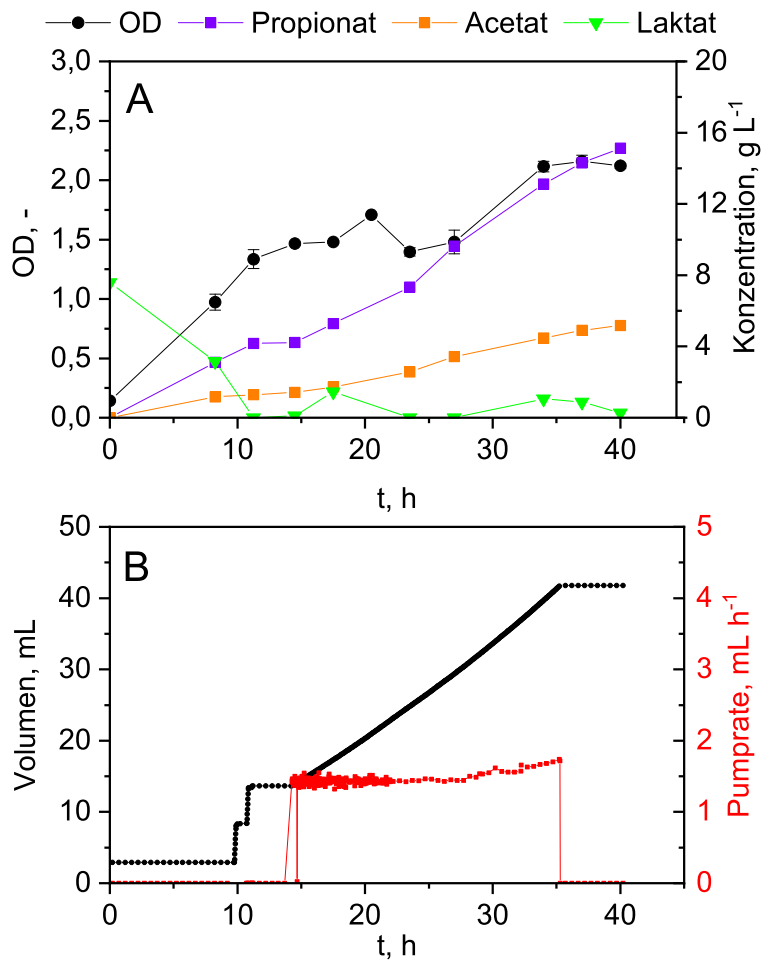


Abbildung 5.14: **A**: Fed-Batch Fermentation mit Kaliumlaktat als Feedlösung
B: zugegebenes Volumen an Kaliumlaktat mit der korrespondierenden Pumprate

höher. Da die verwendete Fermentationsbrühe eine Laktatkonzentration von 50 g L^{-1} aufwies, musste dementsprechend mehr Volumen in den Reaktor gepumpt werden als bei der Verwendung des Kaliumlaktatfeeds mit einer Konzentration von 500 g L^{-1} .

Bei Betrachtung des Verlauf der OD fällt auf, dass eine finale OD von 5,4 erreicht wurde, was den höchsten Wert aller durchgeführten Experimente mit *V. criceti* in Monokultur darstellt. Außerdem stieg die optische Dichte kontinuierlich an, so dass auch kein zwischenzeitliches Abfallen der OD zu verzeichnen war. Bei den vorangegangenen Fermentationen von *V. criceti* Monokulturen wurde entweder ein Abfallen der OD zum Ende der Fermentation hin festgestellt, oder während der Fermentation, bedingt durch die herrschenden Konzentrationen der gebildeten organischen Säuren. Zudem ist hier zu erkennen, dass keine Adaptionsphase von *V. criceti* vonnöten war, sondern das Zellwachstum direkt einsetzte. Wie anhand des Verlaufs der Laktatkonzentration zu sehen ist, konnte diese nach dem Verbrauch des vorgelegten Laktats bei 0 gehalten werden, so dass sämtliches Laktat, das zugegeben wurde, sofort in Propionat und Acetat verstoffwechselt wurde. Es ergibt sich dabei eine Propionatkonzentration von $21,52 \text{ g L}^{-1}$ und eine Acetatkonzentration von $8,70 \text{ g L}^{-1}$. Daraus folgt ein finales molares Verhältnis von 2,00 mol Propionat pro mol Acetat, was gleichzeitig auch den theoretischen Wert darstellt. Die jeweiligen Ausbeuten von Propionat und Acetat bezogen auf Laktat sind $0,63 \text{ g g}^{-1}$ und $0,26 \text{ g g}^{-1}$. Die Produktivität für Propionat beträgt $0,54 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $0,22 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für Acetat. Die Propionatkonzentration, die hier erzielt wurde, stellt die höchste dar, die in einer der hier durchgeführten Monokulturfermentationen von *V. criceti* erreicht wurde. Dies könnte daran liegen, dass in der Fermentationsbrühe neben dem Laktat noch komplexe Bestandteile, nämlich Hefeextrakt und Pepton in Konzentrationen von je 10 g L^{-1} vorliegen. Beide Bestandteile wirken sich förderlich auf mikrobielles Wachstum aus und könnten somit zur Steigerung des Produkttiters beitragen. Dies könnte auch der Grund sein für den Wert der finalen OD von 5,4 im Vergleich zu der fedbatch Fermentation mit Kaliumlaktat, bei der ein finaler Wert von 2,0 erreicht wurde. Jedoch muss für diese Vorgehensweise bei der Fermentation zuerst die Laktatproduktion in einem separaten Reaktor erfolgen, sowie etwaige verbleibende Partikel und Feststoffe abgetrennt werden, bevor diese Fermentationsbrühe weiterführend als Substratlösung verwendet werden könnte.

Abschließend wurde eine Monokultur von *V. criceti* mit der Elektrodialyse gekoppelt. Dafür wurde Laktat als Substrat verwendet und 10 g L^{-1} vorgelegt sowie pulsartig nach jedem Elektrodialyseintervall, bis auf das letzte Intervall, in den Reaktor gegeben. Darin begründet ist der sprunghafte Anstieg der Laktatkonzentration nach Beendigung des jeweiligen Durchlaufs der Elektrodialyse.

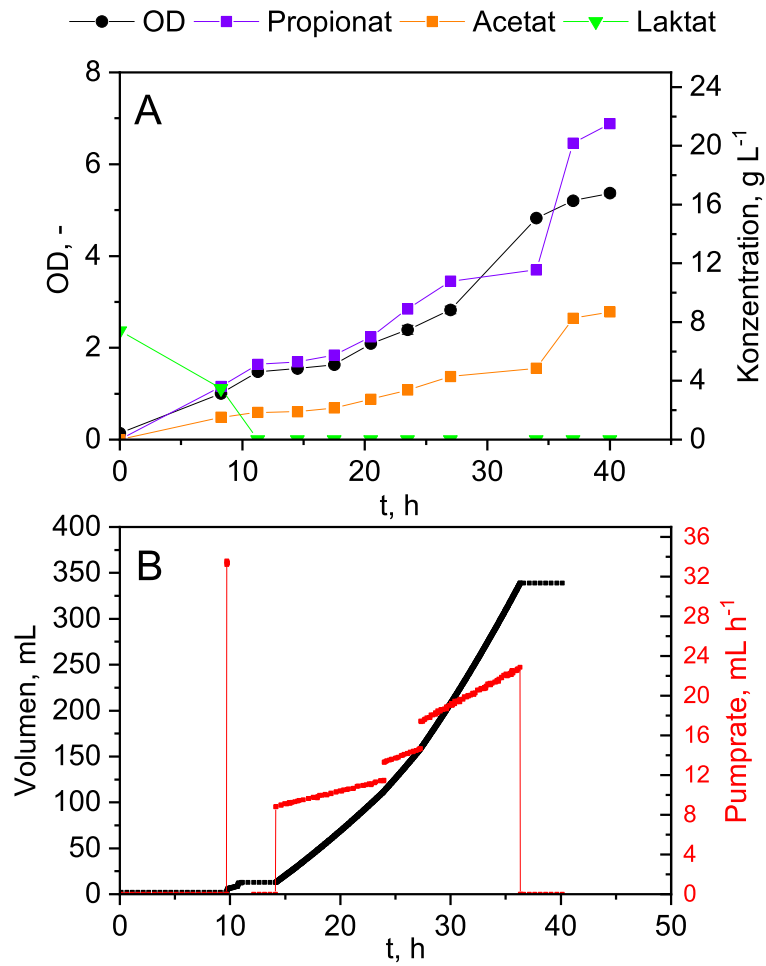


Abbildung 5.15: **A:**Fed-Batch Fermentation mit substrathaltiger Fermentationsbrühe als Feedlösung **B:** zugegebenes Volumen sowie Pumprate der substrathaltigen Fermentationsbrühe

Das initial vorgelegte Laktat wurde ohne Adaptionszeit sofort verbraucht und die Propionat- und Acetatbildung setzte parallel zum Verbrauch des Laktats ein. Nachdem das gesamte vorgelegte Substrat aufgebraucht war, wurde die Elektrodialyse für 2 h angeschaltet und transportierte Propionat und Acetat aus dem Reaktionsraum im Bioreaktor in das NaOH Kompartiment der Elektrodialyse. Dementsprechend ist in Abbildung 5.16 A eine Abnahme dieser beiden Stoffe ersichtlich, während in Diagramm B die Konzentrationen jeweils ansteigen. Nach Abschluss der Elektrodialyse wurde wieder Laktat zugegeben, da vorhandenes Laktat durch die Elektrodialyse ebenfalls entfernt würde. Diese Vorgehen wurde insgesamt 6 mal durchgeführt, wobei nach dem letzten Durchgang der Elektrodialyse kein neues Substrat mehr hinzugefügt wurde. In Diagramm A ist zu erkennen, dass die Konzentrationen von Propionat und Acetat im Reaktor jeweils während der Elektrodialyse abnahm. Gleichzeitig stieg die entsprechende Konzentration im NaOH Kompartiment der Elektrodialyse an. Die stufenartige Zunahme von Acetat- und Propionatkonzentration liegt daran, dass während des Elektrodialysevorgangs die beiden einwertigen Säuren entfernt wurden und nach Beendigung der Elektrodialyse anschließend im NaOH Kompartiment verblieben. Deswegen bleibt zwischen den einzelnen Intervallen die Konzentration konstant. Um keine unkontrollierten Diffusionsvorgänge zwischen den Intervallen zuzulassen, wurden Ein- und Auslass der Elektrodialyse verschlossen. Zum Schluss setzt augenscheinlich eine Rückdiffusion aus dem NaOH Kompartiment in den Reaktor ein. Dies ist daran ersichtlich, dass in Diagramm B die Konzentrationen an Propionat und Acetat während des letzten Dialysevorgangs abnehmen, sowie in Diagramm A die entsprechenden Konzentrationen zunehmen. Die OD steigt während der Fermentation bis ca. 45 h Fermentationszeit konstant auf einen Maximalwert von 7,4 an. Im Anschluss daran sank die OD rapide ab. Dadurch, dass zu diesem Zeitpunkt eine Konzentration von 16 g L^{-1} an Propionat vorhanden war, könnte dies bereits so inhibierend auf die Zellen wirken, dass folglich durch Lyse der Zellen der OD Wert so abrupt abnimmt. Es zeigt sich jedoch, dass bei den vorherigen vier Elektrodialysevorgängen keine Abnahme der OD zu verzeichnen ist, obwohl zu diesen Zeitpunkte entweder gar kein oder nur wenig Laktat zur Verfügung stand. Somit lässt sich daraus folgern, dass der Betrieb der Elektrodialyse dem Wachstum der Zellen nicht opportun gegenüber steht. Kombiniert mit Elektrodialyse und Fermentation wurden somit Titer an Propionat und Acetat von $20,26 \text{ g L}^{-1}$ und $9,74 \text{ g L}^{-1}$ erreicht, was einem molaren Verhältnis von $1,67 \text{ mol mol}^{-1}$ entspricht. Insgesamt wurde ein Ausbeute an Propionat und Acetat von $0,59 \text{ g g}^{-1}$ und $0,28 \text{ g g}^{-1}$ mit einer Produktivität von $0,43 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $0,24 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt. Die hierbei erzielten Resultate deuten darauf hin, dass eine Abtrennung der beiden Zielsubstanzen Propionat und Acetat aus der Fermentationsbrühe mittels Elektrodialyse möglich ist. Im Vergleich mit

der fed-batch Kultivierung, die Fermentationsbrühe als Substratlösung verwendet, wurde zwar ein vergleichbarer Titer an Propionat erzielt, allerdings fielen sowohl Ausbeute als auch molares Verhältnis deutlich niedriger aus. Eine mögliche Begründung hierfür ist die Strategie der Elektrodialyseintervalle und der korrelierenden Zufütterung des Substrats. Dadurch, dass während der Elektrodialyse die Mikroorganismen kein Substrat zur Verfügung haben, können diese weder weiter wachsen noch Produkte durch Stoffwechselfvorgänge generieren. Somit vermindert sich die Produktivität der Bakterien. Die Ausbeute und das molare Produktverhältnis hängen insofern zusammen, als die Bakterien mehr Acetat bilden als bei den Experimenten, bei denen stets Laktat als Substrat vorhanden war. Womöglich ist dies darin begründet, dass dadurch schnell ATP sowie NADH generiert werden können, was für das Überleben der Zellen essenziell ist.

5.3.1 Fazit der Propionsäureproduktion mittels *V. criceti*

Zusammenfassend sind in Tabelle 5.2 die Ergebnisse der Fermentation der Monokultur von *V. criceti* mit den entsprechenden Betriebsmodi und daraus gewonnenen Parameter zur Charakterisierung der Fermentation aufgeführt.

Tabelle 5.2: Parameter der Monokultur von *V. criceti*. Ausbeute und Produktivität sind bezogen auf Propionat angegeben. (Fer: laktathaltige Fermentationsbrühe)

Fermentation	Produktivität $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$	Ausbeute g g^{-1}	molares Verhältnis mol mol^{-1}	OD max
batch	0,46	0,75	2,54	1,6
Fed-batch manuell	0,47	0,69	2,13	1,5
Fed-batch	0,46	0,72	2,37	2,0
Fed-batch (Fer)	0,54	0,63	2,0	5,4
REED	0,43	0,59	1,67	7,4

Der Abgleich mit Literatur ist hier schwierig, da bisher nur eine Studie mit *V. criceti* publiziert wurde [20]. Dabei wurde ausgehend von Laktat als Substrat eine Produktivität von $0,39 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ mit einem finalen Produkttiter von ca. 17 g L^{-1} erreicht. Das molare Verhältnis der beiden Produkte Propionat und Acetat betrug dabei $1,27 \text{ mol mol}^{-1}$. Als Reaktoraufbau wurde ein Dialysereaktor verwendet, was bedeutet, dass zwei separate Reaktionsräume durch eine

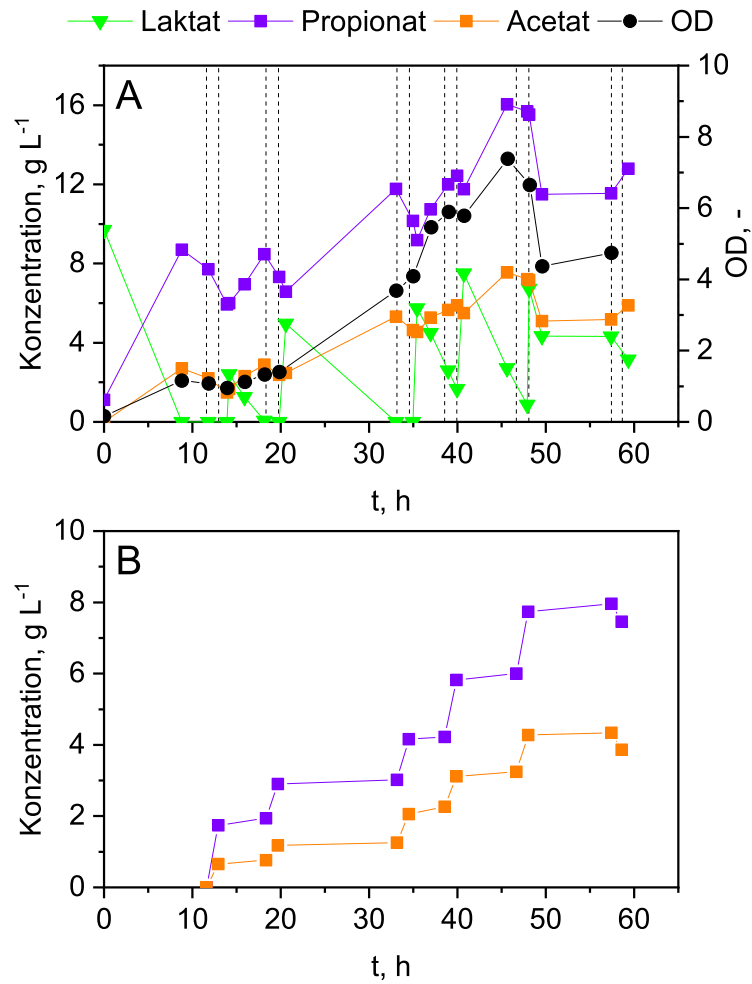


Abbildung 5.16: **A:** Konzentrationsverläufe von Laktat, Propionat und Acetat im Reaktionsmedium. Die vertikalen gestrichelten Linien begrenzen die Dauer der aktivierten Elektrodialyse, die mit einem Wechselintervall von 1 min und 200 A m^{-2} betrieben wurde. **B:** Konzentrationsverlauf von Propionat und Acetat im NaOH Kompartiment der Elektrodialyse

Membran getrennt waren, die lediglich von Laktat, Propionat und Acetat passierbar ist. Im Vergleich zu diesem Aufbau wurden in den Experimenten in der vorliegenden Arbeit grundsätzlich höhere Produktivitäten erzielt. Der größte Unterschied ist im Vergleich mit der fed-batch Kultivierung mit Fermentationsbrühe als Substratlösung feststellbar. Da in dem Fall des Dialysereaktors das Substrat pulsartig und nicht kontinuierlich in den Reaktor eingebracht wurde, akkumulierte Laktat, was unweigerlich zur Wachstumshemmung führt. Bei den hier durchgeführten Experimenten wurden die höchsten Produkttiter bei einer kontinuierlichen Zufuhr des Substrats erzielt, wenn die Laktatkonzentration so gering wie möglich gehalten werden konnte. Die kontinuierliche Zuführung ist bei der Anwendung der Elektrodialyse aber nicht praktikabel, da ansonsten das zugeführte Laktat ebenfalls entfernt würde. Deswegen ist es in diesem Fall sinnvoller, das Substrat pulsartig zuzugeben. Allerdings sollte dies in einem Maße geschehen, dass ein Ansteigen der Laktatkonzentration und die daraus folgende Inhibierung vermieden werden. Wie in Kapitel 3.2.1 erläutert, wird in Literaturstudien größtenteils *Propionibacterium acidipropionici* zur biotechnologischen Produktion untersucht. So konnte mit einer batch Kultivierung dieses Organismus ausgehend von Glucose und Glycerol als Mischsubstrat lediglich eine Produktivität von $0,125 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht werden [48]. Zudem fällt die Ausbeute mit $0,57 \text{ g Propionat pro g Glucose}$ ebenfalls geringer aus als in allen hier durchgeführten Fermentationen. Der Produkttiter ist mit 30 g L^{-1} zwar am höchsten, allerdings wird dafür mit 192 h Fermentationszeit fast die dreifache Zeitdauer der Fermentation mit gekoppelter Elektrodialyse benötigt. Ein weiterer häufig verwendeter Organismus ist *Propionibacterium freudenreichii*, der in der Lage ist, Glucose in Propionsäure umzuwandeln. Dieser Stamm ist in der Lage, den höchsten publizierten Produkttiter von 92 g L^{-1} zu generieren [24]. Die gemessene Produktivität beträgt dabei $0,36 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ mit einer Ausbeute von $0,46 \text{ g g}^{-1}$. Das hierfür verwendete Substrat war Melasse der Zuckerrübe. Allerdings war für das Erreichen dieses Titers eine Fermentationszeit von 254 h notwendig. Eine batch Kultivierung basierend auf diesem Stamm lieferte in 120 h Fermentationszeit eine Konzentration an Propionat von $14,6 \text{ g L}^{-1}$ mit einer Produktivität von $0,12 \text{ g L}^{-1}$ [25].

Somit zeigt sich, dass *V. criceti* als Produzent für Propionat geeignet ist. Zwar fallen die erzielten Produkttiter geringer aus als bei Verwendung von *Propionibacterium* spp., allerdings werden hier mit *V. criceti* höhere Produktivitäten erzielt. Zudem ist für die Kultivierung mit *Propionibacterium* spp. ein Vielfaches der Fermentationsdauer notwendig.

5.4 Propionsäureproduktion mittels definierter Mischkultur

Als weiterer Schritt in der Prozessentwicklung wurde untersucht, inwieweit beide Mikroorganismen in einem Reaktionsraum kultiviert werden können, so dass die mikrobiellen Vorgänge für die Produktion von Laktat und Propionat sowie Acetat in einem Reaktionsraum und zeitgleich ablaufen. Auf die Darstellung der OD wird im folgenden verzichtet, da diese nur die Gesamtheit des Zellwachstums wiedergeben kann und keine Unterscheidung zwischen den einzelnen Mikroorganismen möglich ist.

5.4.1 Mischkultur von *B. coagulans* und *V. criceti*

Zunächst wurde eine Mischkultur aus *B. coagulans* und *V. criceti* in demselben Reaktionsraum kultiviert. Hierfür wurde zunächst *B. coagulans* in den Reaktor gegeben und zu einem späteren Zeitpunkt, als Laktat gebildet wurde, *V. criceti* in den Reaktor inokuliert. In diesem Fall wurde die Zugabe von *V. criceti* nach 13,2 h (schwarzer Pfeil) durchgeführt, sobald bereits Laktat vorhanden war. Zu insgesamt vier Zeitpunkten erfolgte eine zusätzliche Zugabe von Glucose, welche pulsartig in den Reaktor gegeben wurde. Diese Zeitpunkte sind durch die roten Pfeile angezeigt.

Bei der Analyse der Verlaufskurve der Laktatkonzentration fällt auf, dass es zu einer zu hohen Zugabe an Glucose kam, da eine maximale Laktatkonzentration von $21,6 \text{ g L}^{-1}$ zum Zeitpunkt bei 22 h erreicht wurde. Jedoch ist ersichtlich, dass diese hohe Laktatkonzentration nicht zum Erliegen der Produktion von Propionat und Acetat führte, da beide Substanzen auch nach 22 h Fermentationszeit noch produziert wurden. Wie in Abbildung 5.11 allerdings dargestellt, sollen bei einer Laktatkonzentration von 20 g L^{-1} die Produktion und somit auch das Wachstum vollständig zum Erliegen kommen, jedoch ist dies hier nicht der Fall, so dass offenbar die Anwesenheit von *B. coagulans* das Bakterium *V. criceti* positiv beeinflusst, in dem eine höhere Toleranz für Laktat vorliegt. Möglicherweise liegt hier dann eine Form von mikrobiellem Mutualismus vor, das heißt, die Bakterien beeinflussen sich gegenseitig positiv [10]. Wie Abbildung 5.17 zu entnehmen, wird ein finaler Produkttiter von $15,4 \text{ g L}^{-1}$ für Propionat und $3,8 \text{ g L}^{-1}$ für Acetat erreicht. Die Ausbeute von Propionat bezogen auf Glucose beträgt $0,35 \text{ g g}^{-1}$ mit einer Produktivität von $0,63 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die Wiederfindungsrate des Kohlenstoffs beträgt hierbei 101 %, so dass die Kohlenstoffbilanz geschlossen werden konnte und keine Nebenprodukte außer den bekannten gebildet wurden. Das molare Verhältnis ist hier mit 3,25 mol Propionat pro mol Acetat der bisher höchste errechnete Quotient. Das hohe Verhältnis ist wahrscheinlich darauf

zurückzuführen, dass *V. criceti* die Laktatkonzentration so rasch wie möglich reduzieren möchte und dafür vermehrt Propionat gebildet wird. Diese Resultate zeigen, dass eine Mischkultur der beiden Mikroorganismen in der angedachten Art und Weise funktionieren kann. Somit kann ausgehend von einem sequentiellen Prozess hin zu einem kombinierten Fermentationsprozess, durch das parallele Ablaufen der jeweiligen Stoffwechselfvorgänge Zeit eingespart werden. Neben dem dadurch verminderten zeitlichen Aufwand reduziert sich der Bedarf der Mengen des Mediums.

Bis dato existiert nur eine vergleichbare Studie von Dietz *et al.*, bei der *V. criceti* mit *Lactobacillus zaea* kombiniert wurde [20]. Allerdings wurde diese Co-Kultur nicht in einem einzigen Reaktionsraum durchgeführt, sondern in einem Reaktor, der aus zwei Kompartments bestand, die durch eine Membran getrennt waren. Mit diesem Versuchsaufbau wurde ausgehend von Glucose als Substrat, eine Produktivität von $0,61 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei einem Produkttiter von $27,5 \text{ g L}^{-1}$ erzielt. Im Vergleich wurde eine sehr ähnliche Produktivität erreicht, jedoch hier fast nur die Hälfte des in der Literaturstudie erreichten Produkttiters. Allerdings stellt insbesondere die Membranverbindung des Dialysereaktors ein Hindernis für eine Maßstabsvergrößerung dar, da diese den durch das Rühren ausgelösten Kräften standhalten muss. In der besprochenen Studie kam es deswegen bereits im Labormaßstab zu einem Reißen der Membran.

5.4.2 Mischkultur von *B. coagulans* und *V. criceti* mit gekoppelter Elektrodialyse

Nachfolgend sind die Untersuchungen zur Kopplung der Fermentation mit der Elektrodialyse aufgeführt. Bei allen Untersuchungen wurde eine Stromdichte von 200 A m^{-2} , ein Wechselintervall von 1 min sowie eine Dauer von 2 h pro Elektrodialysedurchlauf gewählt.

Zuerst wurde kommerzielle Glucose für die Kopplung der Fermentation und Elektrodialyse verwendet. Dazu wurde Glucose vorgelegt und beide Bakterien von Anfang an in den Reaktor gegeben. Wie in Abbildung 5.18 zu sehen wurde 6 g L^{-1} Glucose vorgelegt, die sofort zu Laktat verstoffwechselt wurden. Nachdem die vorgelegte Konzentration auf 0 abgesunken war und gleichzeitig Laktat gebildet wurde, begann der Verbrauch von Laktat zu Propionat und Acetat. Die bereits zu Beginn vorliegende Propionatkonzentration wurde durch die Vorkultur hervorgerufen. Bei 18 h wurde das erste Elektrodialyseintervall gestartet, und, wie in der unteren Abbildung B zu sehen, Propionat und Acetat aus dem Reaktionsraum entfernt und in das NaOH Kompartiment überführt. Nach dem Betrieb der Elektrodialyse für 2 h wurde im Anschluss daran Glucose pulsar-

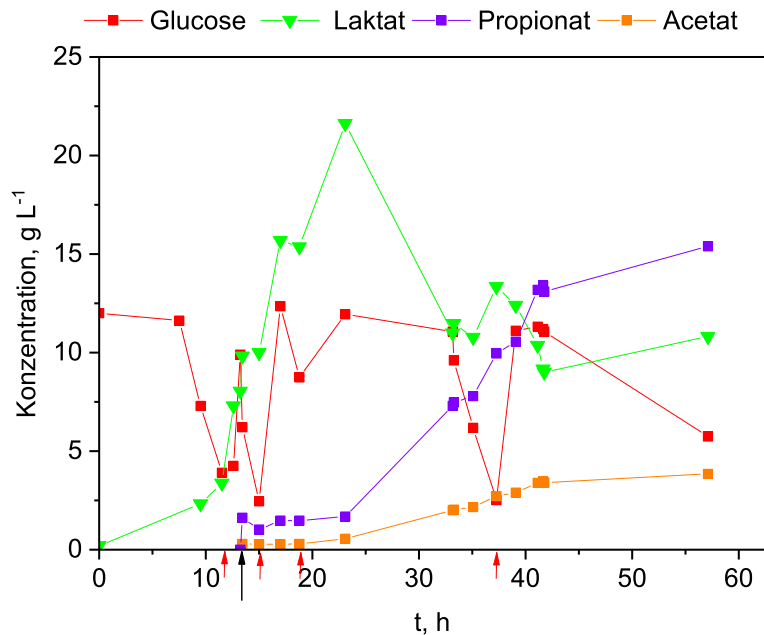


Abbildung 5.17: Mischkultur aus *B. coagulans* und *V. criceti* mit Glucose als Substrat. Die roten Pfeile geben die Zeitpunkte der Zugabe von Glucose an. Der schwarze Pfeil zeigt die Zugabe von *V. criceti* in den Reaktor an.

tig in den Reaktor eingebracht (rote Pfeile). Somit wurde insgesamt vier mal im Nachgang eines Elektrodialysedurchlaufs Glucose in das Reaktionsmedium hinzugefügt. Das Laktat, das daran im Anschluss gebildet wurde, wurde sofort in Propionat und Acetat umgewandelt. Dies kann man daran erkennen, dass die Laktatkonzentration bei nahezu 0 verblieb, jedoch die Acetat- und Propionatkonzentration wiederum anstieg. Danach wird abermals die Elektrodialyse aktiviert und die organischen Ionen werden entfernt. Dieser Zyklus wurde insgesamt fünf mal wiederholt, wobei nach dem letzten Durchlaufen der Elektrodialyse auf eine erneute Glucosezugabe verzichtet wurde. Wie in Abbildung B zu sehen, stieg die Propionat- und Acetatkonzentration stufenförmig an. Somit wurde in jedem Durchlauf inhibierendes Produkt erfolgreich entfernt. Die letzte Stufe zeigt jedoch in Abbildung B eine Abnahme der Konzentrationen im NaOH Kompartiment, was darauf zurückzuführen ist, dass es zu einer Rückdiffusion aufgrund der Konzentrationsdifferenz zwischen NaOH Kompartiment und Reaktor kam. Auffällig war aber, dass es nach der letzten Glucosezugabe bei 50 h zu keiner Wiederaufnahme der Produktion von Propionat und Acetat kommt und nur Laktat gebildet, aber nicht verbraucht wird. Im Gesamten wurde eine

Propionatkonzentration von $14,39 \text{ g L}^{-1}$ bei einer Produktivität von $0,67 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht. Die Ausbeute von Propionat bezogen auf Glucose beträgt hierbei $0,43 \text{ g g}^{-1}$. Insgesamt konnte die Kohlenstoffbilanz zu $94,1 \%$ geschlossen werden. Diese Abweichung nach unten liegt aber im Rahmen der Messungenauigkeit der HPLC Messung.

Anschließend wurde die Prozessführung optimiert, so dass die Laktatkonzentration möglichst niedrig gehalten wurde, um der Substratinhibierung sowie der Entfernung von Laktat durch die Elektrodialyse vorzubeugen. Dieses Experiment ist in Abbildung 5.19 dargestellt. Zunächst wurde Glucose mit einer Konzentration von 9 g L^{-1} vorgelegt, wobei *V. criceti* erst nach 10 h in den Reaktor eingebracht wurde. Die Glucose wurde innerhalb von 12 h verbraucht und gleichzeitig wurde Laktat gebildet, was in einer Konzentration von 8 g L^{-1} resultierte. Mit Einsetzen des Laktatverbrauchs und des Wachstums von *V. criceti* begann die Bildung von Propionat und Acetat bis das Laktat komplett verbraucht war. Bei 20 h wurde nun das erste Elektrodialyseintervall gestartet, und die beiden organischen Säuren wurden aus der Fermentationsbrühe entfernt. Nach einer Dauer von 2 h wurde die Elektrodialyse gestoppt und Glucose pulsartig in den Reaktor hineingegeben. Die Glucose wurde wieder verbraucht, zu Laktat umgewandelt, welches wiederum zu Propionat und Acetat verstoffwechselt wurde. Während der gesamten Fermentationsdauer konnte die Laktatkonzentration bei nahezu 0 gehalten werden. Trotzdem wurden aber weiterhin Produkte gebildet. Daraus kann gefolgert werden, dass die angewandte Zufütterungsstrategie gut funktioniert und das Problem der Substratinhibierung umgangen werden kann. Auch in diesem Fall zeigte sich, dass die Zellen von *V. criceti* einen kurze Zeitdauer, während derer sie ohne Substrat sind trotzdem überleben können und nach Substratzugabe das Wachstum und Produktbildung wieder aufnehmen. Dies ist auch über mehrere Zyklen hinweg möglich. Nach dem zweiten Durchlauf der Elektrodialyse wurde nur 5 g L^{-1} Glucose zugegeben, so dass nicht zu viel Laktat gebildet wird, was eine Operation der Elektrodialyse durch das Entfernen des Laktats unwirtschaftlich machen würde. Deutlich ist in Abbildung A das Absinken der Acetat und Propionatkonzentration zu erkennen, was belegt, dass beide Säuren in das NaOH Kompartiment (Diagramm B) überführt wurden. Allerdings ist auffällig, dass während der beiden letzten Elektrodialyseintervalle deutlich weniger Propionat entfernt wurde als in den beiden Durchgängen zuvor. Dies liegt möglicherweise an der Rückdiffusion der organischen Säuren aus dem NaOH Kompartiment zurück in das Reaktionsmedium. Insgesamt wird eine Propionatkonzentration von $8,22 \text{ g L}^{-1}$ bei einer Ausbeute von $0,23 \text{ g g}^{-1}$ und einer Produktivität an Propionat von $0,69 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht.

Im Anschluss an die beiden vorangegangenen Untersuchungen mit kommerzi-

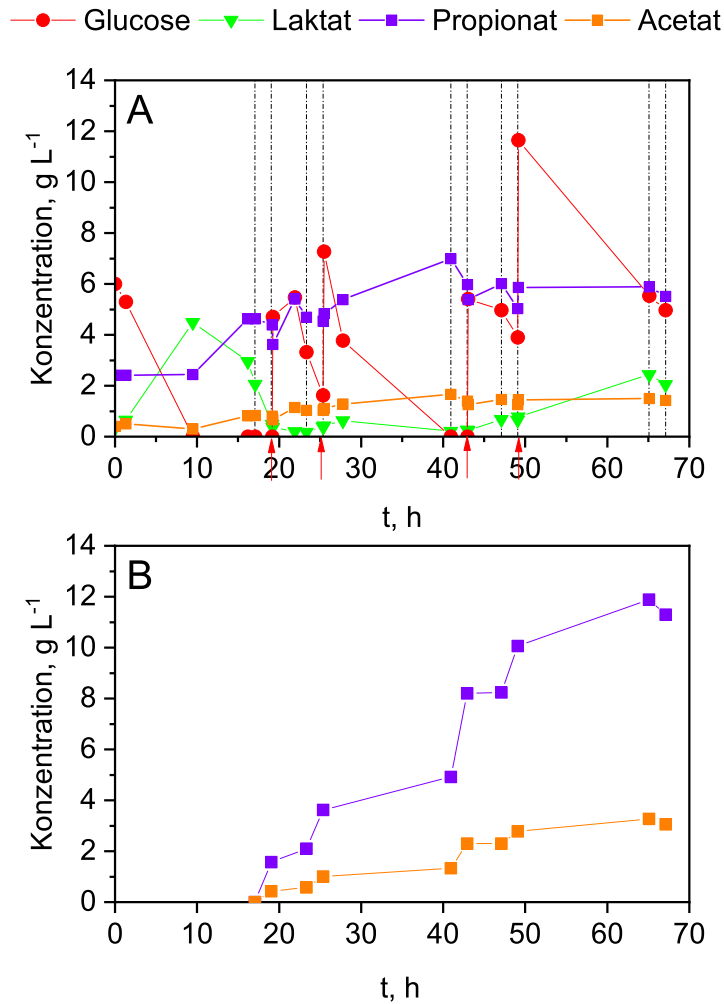


Abbildung 5.18: Fermentation von *B. coagulans* und *V. criceti* mit Glucose als Substrat und gekoppelter Elektrodialyse. Diagramm **A**: Konzentrationsverläufe innerhalb des Fermentationsmediums. Die roten Pfeile geben die Zeitpunkte der Glucosezugabe im Anschluss an das jeweilige Elektrodialyseintervall (gestrichelte Linien) Diagramm **B**: Konzentrationsverläufe im NaOH Kompartiment der Elektrodialyse

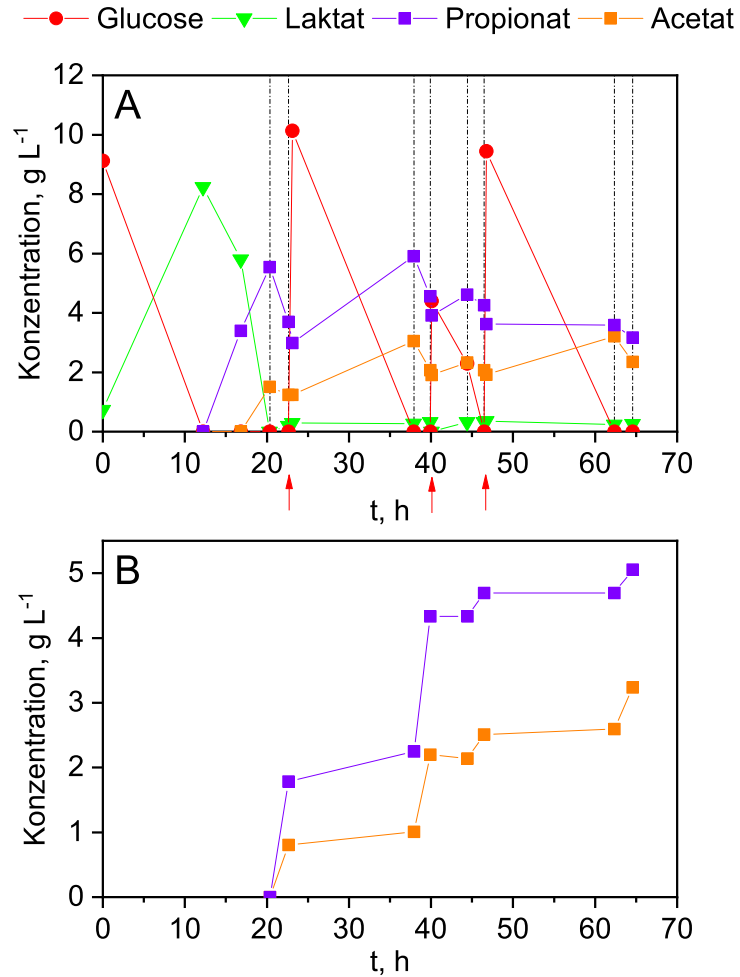


Abbildung 5.19: Fermentation einer Mischkultur von *V. criceti* (Zugabe nach 10 h) und *B. coagulans* mit Glucose als Substrat und gekoppelter Elektrodialyse. Diagramm **A**: Konzentrationsverläufe innerhalb des Reaktionsmediums. Die roten Pfeile markieren die Zeitpunkte der Glucosezugabe. Diagramm **B**: Konzentrationsverläufe innerhalb des NaOH Kompartments der Elektrodialyse.

eller Glucose wurde ein glucosereiches Biomassehydrolysat verwendet. Die dazugehörigen Verläufe der Fermentation und Elektrodialyse sind in Abbildung 5.20 dargestellt. Hierfür wurde Glucose mit einer Konzentration von $8,2 \text{ g L}^{-1}$ als Substrat vorgelegt und innerhalb von 10 h komplett in Laktat umgewandelt. Bereits zu Beginn der Fermentation wurde das Bakterium *V. criceti* in das Reaktionsmedium hinzugegeben, so dass nach dem kompletten Verbrauch der initialen Glucose das daraus gebildete Laktat in Propionat und Acetat umgewandelt wurde. Nachdem das Laktat vollständig verbraucht wurde, erfolgte die Entfernung der organischen Säuren durch das REED System für 2 h (Intervall zwischen den gestrichelten Linien). Wie zu sehen, war vor dem ersten Elektrodialysevorgang das Laktat komplett verbraucht und zu Propionat und Acetat umgewandelt. Während des Betriebs wurden Propionat und Acetat entfernt und in das NaOH Kompartiment überführt. Im Anschluss daran wurde das glucosereiche Hydrolysat in den Reaktor eingebracht. Die zugegebene Glucose wurde sofort verstoffwechselt und die Produktion von Laktat sowie Propionat und Acetat setzte wieder ein. Allerdings wurde der nächste Elektrodialysevorgang zu früh gestartet, da immer noch Laktat innerhalb des Fermentationsmediums vorlag und dieses somit entfernt wurde. Jedoch erreichte die Konzentration von Propionat zu diesem Zeitpunkt bereits inhibierende Werte, so dass eine Entfernung sinnvoll war. Nach diesem Durchlauf der Elektrodialyse wurde so viel Glucose zugegeben, dass eine Konzentration von 10 g L^{-1} im Reaktor vorlag. Auch hier erfolgte nach der Zugabe der Glucose sofort deren Verbrauch und die Bildung von Laktat sowie folglich Propionat und Acetat. Der dritte Betrieb der Elektrodialyse wurde 6 h nach der letzten Glucosezugabe gestartet und Propionat und Acetat entfernt. Allerdings wurde auch ein Teil des Laktats abgetrennt, so dass Substrat aus dem Reaktor entfernt wurde. Nach dem dritten Durchgang wurde wieder Glucose hinzugegeben und alle drei Säuren gebildet. Die Glucose wurde wieder komplett verbraucht und vor allem Laktat in großem Maße gebildet, jedoch nur wenig an Propionat und Acetat. Da die Propionatkonzentration nach dem dritten Elektrodialysevorgang immer noch bei über 10 g L^{-1} lag, ist eine Inhibierung von *V. criceti* durch Propionat der wahrscheinlichste Grund für die geringe Produktbildung zwischen dem dritten und vierten Elektrodialysebetrieb. Während des letzten Durchlaufs der REED ist zu sehen, dass verglichen mit drei vorangegangenen REED Vorgängen deutlich mehr Laktat aus dem Reaktor entfernt wurde als zuvor. Dies liegt an der hohen Konzentration an Propionat von $11,8 \text{ g L}^{-1}$. Bei Betrachtung der Entfernraten von Propionat im Diagramm B fällt auf, dass der Anti-Fouling Mechanismus der REED in der angedachten Art und Weise funktioniert hat. Im Schnitt wurde eine Abtrennrates von $1,54 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht, so dass es zwischen den einzelnen Vorgängen kaum Unterschiede gab. Dies deutet darauf hin, dass nach

jedem Wechselvorgang der Elektrodenpolarität die Deckschicht vollständig entfernt werden konnte. Dies ist besonders für die Verwendung von Hydrolysaten wichtig. Diese biomassebasierten Hydrolysate beinhalten eine Feststofffraktion aus Lignin, die nur schwer komplett abgetrennt werden kann. Insofern zeigen die Ergebnisse, dass der Betrieb der Elektrodialyse trotz der im Hydrolysat vorhandenen Feststoffe möglich ist. Insgesamt wurde bei der Fermentation eine Produktkonzentration von Propionat und Acetat von $24,35 \text{ g L}^{-1}$ sowie $9,48 \text{ g L}^{-1}$ erzielt. Die Propionatproduktivität erreichte dabei einen maximalen Wert von $0,70 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ mit einer auf Glucose bezogenen Ausbeute von $0,39 \text{ g g}^{-1}$.

Im Vergleich mit der Fermentation ohne gekoppelter Elektrodialyse aus Abbildung 5.17 konnte eine Erhöhung der spezifischen Ausbeute an Propionat von $0,35 \text{ g g}^{-1}$ zu $0,39 \text{ g g}^{-1}$ erreicht werden. Zudem konnte die Produktivität von $0,63 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $0,70 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gesteigert werden. Dies ist im Einklang mit Ergebnissen aus der Literatur. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Anwendung der REED zu einer Steigerung der Ausbeute und Produktivität an Butyrat führte, das mittels Fermentation aus Glucose und Xylose produziert wurde [5].

Im Zuge der Weiterentwicklung des Prozesses wurde untersucht, wie sich die Verwendung eines Mischsubstrates auf die Fermentation auswirkt. Dies ist in Abbildung 5.21 zu sehen, wobei die Abbildungen A und B die Konzentrationsverläufe im Reaktor und C den Reaktionsverlauf im NaOH Kompartiment der Elektrodialyse zeigt. Als Substrat wurde ein Gemisch aus Xylose und Glucose verwendet, welches in gleichbleibender Zusammensetzung nach der REED Operation wieder in den Reaktor eingebracht wurde. Xylose und Glucose wurden zunächst im Reaktionsraum vorgelegt und sofort zu Laktat verstoffwechselt. Mit dem Verbrauch der Glucose stieg die Menge an gebildetem Propionat und Acetat an, und die Elektrodialyse wurde gestartet. Hier wurde die Elektrodialyse etwas zu früh gestartet, da noch nicht alles Laktat umgewandelt war und durch die Elektrodialyse entfernt wurde. Direkt nach dem ersten Elektrodialyseintervall zwischen 18 h und 20 h wurde das Substratgemisch pulsartig zugegeben. Anschließend wurde dieses wieder verbraucht, Laktat und daraus Acetat und Propionat gebildet. Nachdem alles an Laktat verbraucht war, wurde die Elektrodialyse angeschaltet und Propionat und Acetat wie in Abbildung C zu sehen in das NaOH Kompartiment überführt. Nach der zweiten Elektrodialyse wurde weniger Substrat zugegeben, um eine Überproduktion von Laktat zu vermeiden. Nach der dritten Aktivierung der REED erfolgte die finale Zugabe des Substrats, das vollständig verbraucht wurde. Danach wurde die REED zum letzten Mal aktiviert. Wie im letzten REED Intervall zu sehen, wurde auch hier wie im ersten

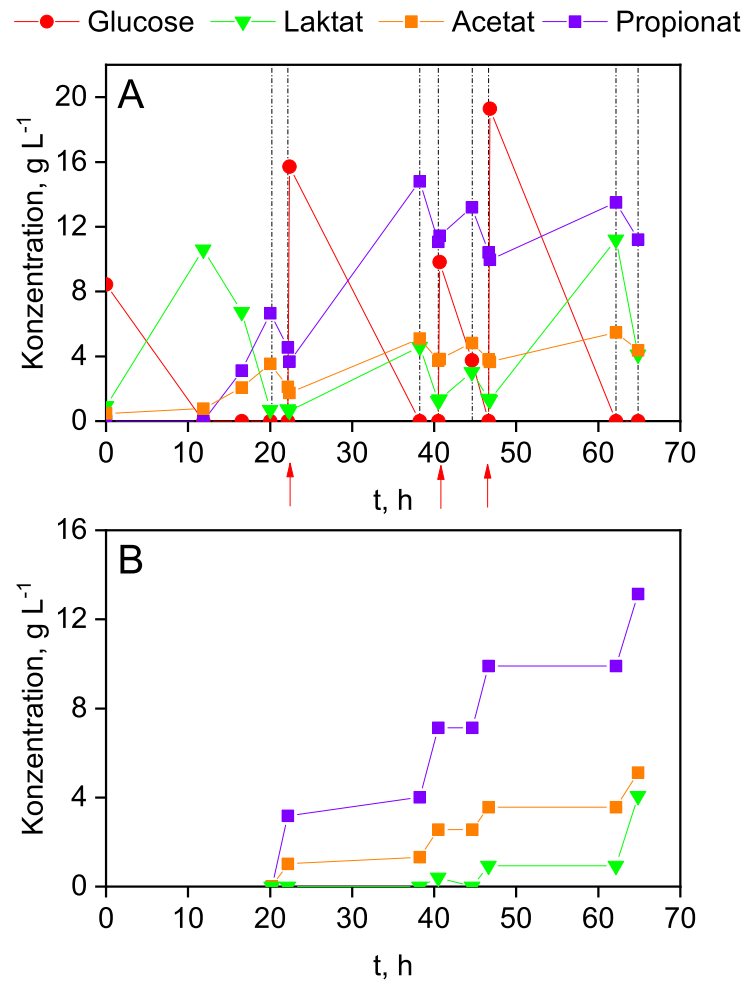


Abbildung 5.20: Fermentation mit gekoppelte Elektrodialyse einer Mischkultur von *B. coagulans* und *V. criceti* mit einem glucosereichen Biomassehydrolysat. Diagramm **A**: Verläufe der jeweiligen Konzentrationen innerhalb des Reaktionsmediums. Die roten Pfeile geben die Zeitpunkte der Zugabe des glucosereichen Biomassehydrolyrats an. Die Elektrodialyse wurde innerhalb des Zeitintervalls markiert durch die gestrichelten Linien aktiviert. Diagramm **B**: Konzentrationsverläufe der organischen Säuren im NaOH Kompartiment der Elektrodialyse

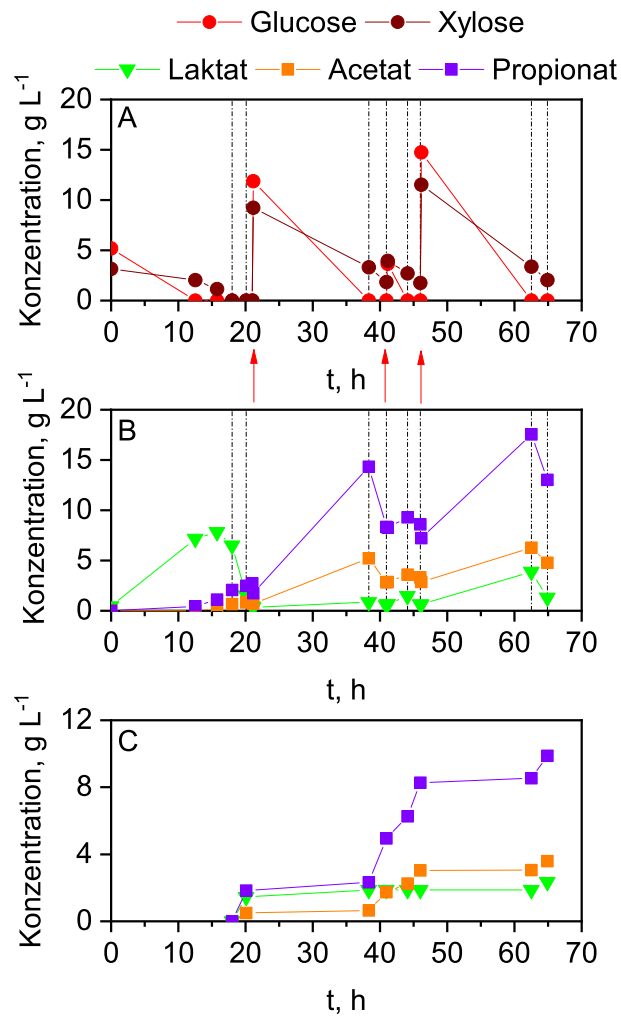


Abbildung 5.21: Fermentation eines Mischsubstrats aus Glucose und Xylose mittels *B. coagulans* und *V. criceti*. Die roten Pfeile geben die Zeitpunkte an, bei denen ein Gemisch aus Glucose und Xylose wieder in den Reaktor eingebracht wurde. *V. criceti* wurde zu Beginn der Fermentation in den Reaktor gegeben. **Abbildung A:** Konzentrationsverläufe der Substrate Glucose und Xylose innerhalb des Reaktionsmediums **Abbildung B:** Konzentrationsverläufe der gebildeten organischen Säuren innerhalb des Reaktionsmediums **Abbildung C:** Konzentrationsverlauf der entfernten organischen Säuren im NaOH Kompartiment der REED

Intervall Laktat entfernt. Aufgrund der Konzentration an Propionat und Acetat vor Beginn des vierten REED Intervalls ist es möglich, dass es zur Produktinhibierung kam und deswegen das Laktat nicht vollständig verbraucht wurde. Auffällig ist zudem, dass es zwischen Intervall zwei und drei zu einer Diffusion von Propionat und Acetat aus dem Reaktor in das NaOH Kompartiment kommt, was an der höheren Konzentration beider Säuren im Reaktor liegt. Anzumerken ist außerdem, dass die feed Strategie erfolgreich ist, da nur geringe Mengen an Laktat entfernt werden und während der Phasen des größten Anstiegs an Propionat kein Laktat entfernt wurde, was bedeutet, dass es zur vollständigen Umsetzung von Laktat in Acetat und Propionat kam. Schlussendlich ergibt sich eine kombinierte Propionatkonzentration von $22,90 \text{ g L}^{-1}$ bei einer Produktivität von $0,73 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die Ausbeute beträgt hierbei $0,36 \text{ g g}^{-1}$. Allerdings fällt bei Betrachtung von Abbildung A auf, dass Glucose präferiert gegenüber Xylose von *B. coagulans* aufgenommen wird, da zu Beginn und nach allen drei Zugaben des Substratgemisches die Glucose deutlich schneller verbraucht wird. Jedoch zeigt sich dadurch aber auch, dass eine Trennung der Zuckermonomere der Lignocellulose nicht zwingend notwendig ist, da Glucose und Xylose als Gemisch für die Propionatbildung verwendet werden können.

Für den spezifischen Energiebedarf ergaben sich Schwankungen zwischen den vier Intervallen, welche in Abbildung 5.22 dargestellt sind. Der hier angegebene Energiebedarf ist bezogen auf Propionat, und zeigt auf wie viel Energie aufgewendet wurde, um das Propionat im jeweiligen Intervall aus dem Reaktionsraum zu entfernen. Zu Beginn beträgt diese Energie $0,040 \text{ kWh g}^{-1}$ und sinkt leicht ab auf einen Wert von $0,038 \text{ kWh g}^{-1}$ für den dritten Durchlauf. Jedoch ist für den vierten Durchlauf der höchste Wert von $0,058 \text{ kWh g}^{-1}$ zu verzeichnen. Der hohe letzte Wert ist darauf zurückzuführen, dass mit steigender Fermentationsdauer eine Erhöhung der Biomasse und somit auch der Anzahl der Partikel im Reaktionsvolumen eintritt. Deswegen ist die Deckschichtbildung auf den Membranen ausgeprägter und der Widerstand innerhalb des 1 min Intervalls steigt schneller an als bei den drei vorhergehenden Durchgängen. Aufgrund der Einstellung des Potentiostaten ist somit eine Erhöhung der Spannung vonnöten, um die Stromstärke konstant zu halten, was in einer gesteigerten notwendigen Leistung resultiert. Die Abnahme von der ersten zum dritten Intervall lässt sich dadurch erklären, dass durch die Verteilung der Ladungsträger zwischen NaOH Kompartiment und Reaktionsraum der Stromfluss verbessert wird und somit eine geringere Spannung eingestellt werden kann, um die Stromstärke konstant zu halten.

Des Weiteren ist in Abbildung 5.23 der Verlauf des Widerstandes während der

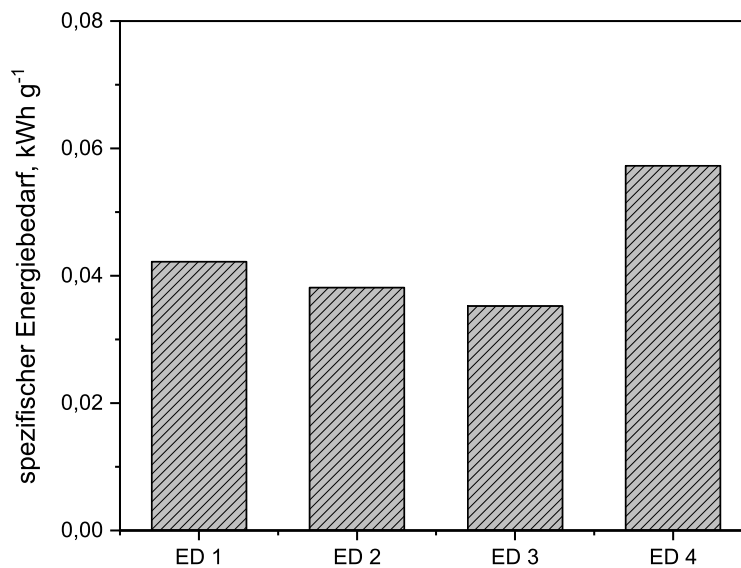


Abbildung 5.22: Spezifischer Energiebedarf des jeweiligen Elektrodialysedurchgangs aus Abbildung 5.21

Operation der Elektrodialyse aufgezeichnet. Der Widerstand wird aus der angelegten Spannung und der daraus resultierenden Stromstärke des Potentiostaten ermittelt. Wie bei allen vier Verläufen zu sehen, erfolgt zunächst ein rascher Abfall des Widerstandes, bis dieser einen Verlauf ähnlich einer Schwingung annimmt. Der rasche Abfall zu Beginn ist darin begründet, dass der Potentiostat die Spannung herunter regelt, das heißt mit einer zu hohen Spannung beginnt und diese dann reduziert, bis die eingestellte Stromstärke erreicht ist. Dadurch ist die Spannung zu Beginn für kurze Zeit höher als benötigt und ebenso der Widerstand. Außerdem sind zu Beginn die Ladungsträger in den beiden Kammern der Elektrodialyse noch zu ungleich verteilt, so dass der Ladungstransport mit einer erhöhten Spannung sicher gestellt wird. Das dynamische Pendeln entsteht durch das Wechseln der Polarität der Elektroden. Nach einem Umschaltvorgang bildet sich eine Deckschicht auf den Membranen, was zu einem erhöhten Spannungsbedarf, der zu einem höheren Widerstand führt. Nach dem Wechselvorgang sinkt die Spannung ab, da die Deckschicht entfernt wurde, so dass auch die benötigte Spannung absinkt. Die Deckschicht bildet sich jedoch wieder neu, somit steigt in der Folge der Widerstand wieder an. Dadurch entsteht der Verlauf ähnlich einer Schwingung, bei welcher der Widerstand um einen Mittelwert pen-

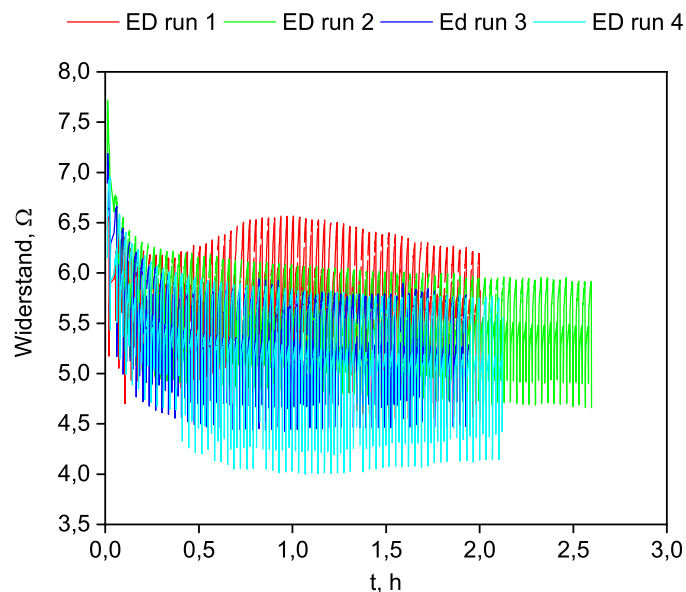


Abbildung 5.23: Verläufe des Widerstandes der vier Elektrodialysevorgänge aus Abbildung 5.21

delt. Bei Betrachten der Verläufe aus Abbildung 5.23 fällt bei den Verläufen der grünen und türkisen Linien auf, dass während der Elektrodialyse immer wieder der Ausgangswert des Widerstandes nach dem Umschalten erreicht wird, was darauf hindeutet, dass sich die Deckschicht bei jedem Mal entfernen lässt und keine irreversible Widerstand durch Fouling hervorgerufen wird. Lediglich der erste Verlauf (rote Linie) zeigt, dass es während der REED zu einem Anstieg des Widerstands kam, der danach aber wieder absank und sich nahezu dem Niveau der drei anderen REED Durchläufe angleich.

5.4.3 Fazit der Produktion von Propionsäure mittels Mischkulturen

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Elektrodialyse erfolgreich mit der Fermentation der Mischkultur verbunden werden konnte und dadurch die Produktinhibierung vermieden werden konnte. Bei allen durchgeführten Entwicklungsschritten zeigte sich, dass die organischen Säuren entfernt werden konnten. Allerdings ist dafür besonderes Augenmerk auf die Zugabe des Substrats zu legen, so dass vor dem Betrieb der Elektrodialyse möglichst kein Laktat mehr im Reaktionsraum vorhanden ist, da ansonsten Substrat für *V. criceti* entfernt

werden würde. Die ist jedoch über die pulsartige Zugabe von frischem Substrat durchführbar. Durch die bekannte Bildungs- beziehungsweise Verbrauchsrate des Laktats kann somit der Zeitpunkt, der optimal ist für den Betrieb der Elektrodialyse, gut abgeschätzt werden. Eine kontinuierliche Zugabe von Substrat würde dazu führen, dass das gebildete Laktat dauerhaft entfernt würde und *V. criceti* sich in einem ständigen Zustand der Substratinsuffizienz befinden würde. Weiter zeigte sich, dass sich die Polaritätswechselfunktion der Elektrodialyse dazu eignet, das bei Membranprozessen vorherrschende Problem des Fouling zu beseitigen. Dies ist von Vorteil, da ansonsten durch die Zunahme der Biomassekonzentration durch Zellwachstum das Risiko für das Verblocken der Membranen erhöht würde. Jedoch nimmt mit zunehmender Biomassebildung der Widerstand der Elektrodialyse zu, da dadurch die Deckschichtbildung ausgeprägter wird. Allerdings konnte die gewünschte Stromdichte aufrechterhalten werden. Hierfür muss aber zwangsläufig ein höherer Energiebedarf in Kauf genommen werden.

5.5 Verwendung von lignocellulosebasierten Hydrolysaten

Neben der Verwendung von kommerziell erhältlichen Zuckern, die in definierter Reinheit (ca. 99 %) erhältlich sind, wurde die Nutzbarkeit von Hydrolysaten untersucht. Problematisch war hierbei der Feststoffanteil in der Hemicellulosefraktion, der nach der Hydrolyse ausfällt. Zudem werden durch die harschen Bedingungen der Behandlung des lignocellulosebasierten Rohstoffes Nebenprodukte gebildet, die toxisch auf Mikroorganismen wirken, darunter Furfural und 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF).

5.5.1 Glucose- und xylosereiche Biomassehydrolysate

Zunächst wurde ein glucosereiches Hydrolysat untersucht, welches zu Laktat umgewandelt werden sollte. Dafür wurden 43 g L^{-1} an Glucose vorgelegt und insgesamt noch vier weitere Male dieses Hydrolysat pulsartig in den Reaktor eingebracht (schwarze Pfeile). Wie in Abbildung 5.24 gut zu erkennen ist, nahm die Glucosekonzentration nach einer kurzen Adaptionszeit von ca. 3 h rasch ab und parallel dazu wurde Laktat gebildet. Im Zuge der Laktatbildung stieg auch die OD und somit die Biomassekonzentration stark an. Die Produktivität, die zu Beginn erreicht wurde, beträgt $6,64 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für den Zeitraum vor der ersten Glucosezugabe. Auffällig ist jedoch, dass trotz der Verfügbarkeit von Laktat die Produktivität im Vergleich zu der ersten Produktionsphase bis 8 h Fermentationszeit deutlich abnahm. So beträgt die Produktivität zwischen 8

h und 14,4 h $1,73 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, was eine deutliche Abnahme im Vergleich zum ersten beschriebenen Zeitraum darstellt. Zudem sank die OD von 9 auf 7 bei 28 h ab was darauf hindeutet, dass Zellen abgestorben sind, und zwar mehr als durch Zellteilung entstanden sind. Die Laktatproduktion setzte sich nach Zugabe von Glucose bei 25 h fort, was an der steigenden Laktatkonzentration und der OD feststellbar ist. Die OD erreicht dabei einen Wert von 8 und verblieb danach nahezu konstant. Auch nach der zweiten Zugabe von Glucose bei 32 h stieg die Laktatkonzentration nicht mehr in dem Maße an, wie zu Beginn der Fermentation. So beträgt die Laktatproduktion nach 14,4 h nur noch $0,38 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Möglicherweise lag zum Ende der Fermentation eine Inhibierung durch unbekannte Stoffe in dem Biomassehydrolysat vor, da eine Produktinhibierung durch Laktat in den vorangegangenen Experimenten mit kommerzieller Glucose nicht festgestellt werden konnte. Wie in Abbildung 5.8 zu sehen, wurde dort eine Konzentration von über 90 g L^{-1} ohne feststellbare Inhibierung erreicht. Zudem wurde das Hydrolysat vor der Benutzung durch den Projektpartner um den Faktor 5 eingedampft, wodurch ebenso toxische Nebenprodukte konzentriert wurden. Die inhibierenden organischen Säuren sowie 5-HMF und Furfural lagen bei diesem Hydrolysat nicht in einer Konzentration vor, welche die Annahme fertigt, dass diese für die Inhibierung am wahrscheinlichsten sind.

Insgesamt wurde eine Ausbeute von $0,99 \text{ g g}^{-1}$ erreicht und die Kohlenstoffbilanz ist mit 97 % nahezu geschlossen. Die nicht vollständige Rückgewinnung des Kohlenstoffs ist hierbei wahrscheinlich mit dem üblichen Fehler bei der HPLC Messung zu begründen.

Das gleiche Hydrolysat wie in Abbildung 5.24 wurde für die Bildung von Propionat verwendet. Dafür wurde zuerst die darin enthaltene Glucose zu Laktat transformiert und dieses anschließend weiter zu Acetat und Propionat, dargestellt in Abbildung 5.25. Dazu wurde Glucose im Reaktor vorgelegt und *B. coagulans* inokuliert. Wie zu erkennen, setzt die Bildung von Laktat nach einer kurzen Adaptionszeit ein, und parallel dazu wurde die vorhandene Glucose aufgenommen und verstoffwechselt. Insgesamt wurde, zusätzlich zu der vorgelegten Konzentration an Glucose von 9 g L^{-1} , zweimal pulsartig das glucosereiche Biomassehydrolysat in den Reaktor eingebracht (schwarze Pfeile). In beiden Fällen wurde nach der Zugabe des Substrats dieses sofort aufgenommen und in Laktat transformiert. Nach der ersten Zugabe ist deswegen ein kurzes Ansteigen der Laktatkonzentration zur verzeichnen. Dies ist nach der zweiten Zugabe nicht erkennbar. Dies liegt daran, dass das gebildete Laktat sofort aufgenommen wurde, da sich die Zellen von *V. criceti* dort in der Phase der stärksten metabolischen Aktivität befinden, was durch die rasche Zunahme der Acetat- und Propionatkonzentration gekennzeichnet ist. Auffällig ist jedoch, dass trotz

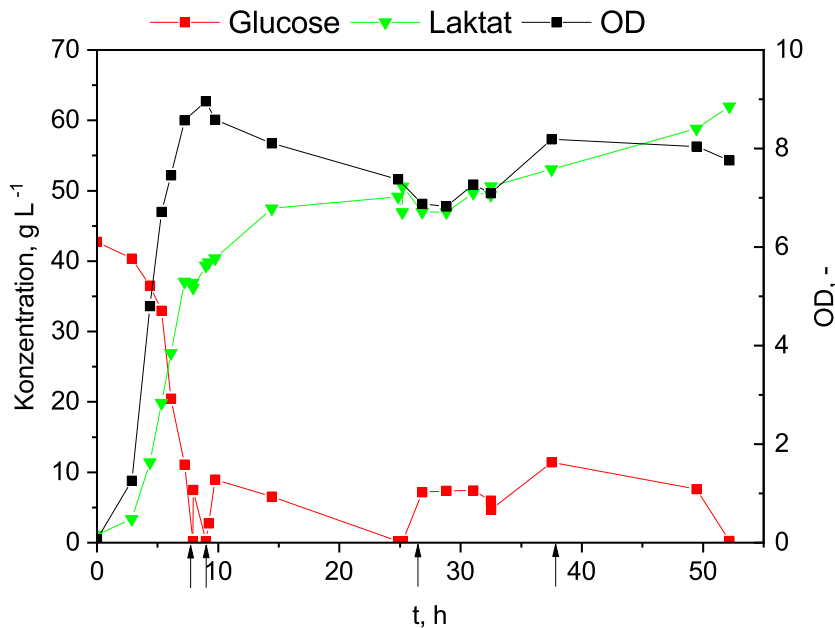


Abbildung 5.24: Kultivierung von *B. coagulans* mit einem glucosreichen Hydrolysat aus lignocellulosebasierter Biomasse zur Produktion von Laktat. Die schwarzen Pfeile repräsentieren die Zeitpunkte der pulsartigen Zugabe des Hydrolysats in den Reaktionsraum

des Vorhandenseins von Glucose diese nicht weiter konsumiert wurde, sondern nach der zweiten Zugabe und dem anschließenden Verbrauch bei einem Wert von $1,82 \text{ g L}^{-1}$ verblieb. Nach der ersten Bildung von Laktat wurde *V. criceti* in den Reaktor hinzugegeben. Im Anschluss an die nachfolgende Adaptionszeit von circa 10 h, startete die Produktion von Acetat und Propionat. Die Produktivität zwischen der Fermentationszeit von 30 h und 38 h beträgt $1,09 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für Propionat und $0,58 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für Acetat. Final wurden Titer an Propionat und Acetat von $10,16 \text{ g L}^{-1}$ und $5,37 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Die erzielte Propionatausbeute beträgt $0,49 \text{ g g}^{-1}$. Die Kohlenstoffbilanz konnte zu 94,4 % geschlossen werden, was im Rahmen der üblichen Ungenauigkeit, hervorgerufen durch die Messung mit der HPLC, liegt. Da dieses Hydrolysat eine starke Färbung besitzt, war es vonnöten, die Proben entsprechend zu verdünnen, um Hintergrundrauschen zu eliminieren. Durch die Verdünnung entsteht allerdings für diese Proben eine Fehlerquelle, die besonders durch das Multiplizieren mit dem jeweiligen Faktor, bedingt durch die Verdünnung, in den Vordergrund tritt.

Nach den glucosereichen Hydrolysaten wurden xylosereiche Hydrolysate unter-

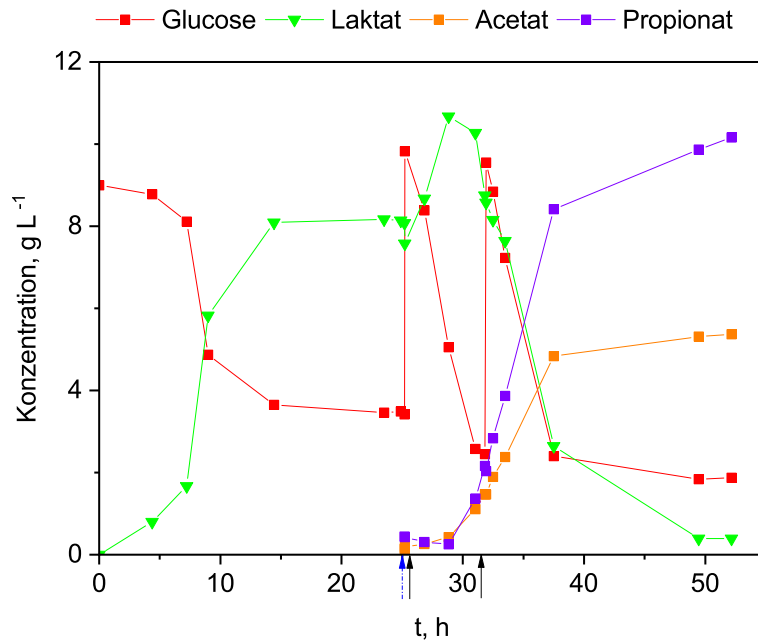


Abbildung 5.25: Kultivierung von *B. coagulans* und *V. criceti* mit einem glucosreichen Hydrolysat aus lignocellulosebasierter Biomasse zur Produktion von Propionat mittels Laktat als Zwischensubstrat. Der blaue gestrichelte Pfeil zeigt die Zugabe von *V. criceti* an. Die schwarzen Pfeile die pulsartige Zugabe des Hydrolysats in den Reaktionsraum.

sucht, wobei zunächst die Umwandlung der Xylose zu Laktat durchgeführt wurde und im Anschluss daran die Umwandlung der Xylose zu Propionat über Laktat. Hierfür wurde ein konzentriertes Hydrolysat verwendet, das ausschließlich Xylose als Kohlenstoffquelle enthält. Wie zu erkennen, wurde eine Xylosekonzentration von 40 g L^{-1} im Reaktor vorgelegt. Dabei erfolgte in den ersten 20 h nur eine geringe Zunahme an Laktat, aber ein ausgeprägter Anstieg der OD, das heißt die Zellen von *B. coagulans* vermehrten sich stetig, es erfolgte aber keine Bildung von Laktat. Hier ist wie zu erwarten eine ausgeprägte Adaptionszeit der Zellen im Vergleich zu der kurzen Adaptionszeit in 5.24 feststellbar. Dies lässt auch hier den Schluss zu, dass Xylose nicht das präferierte Substrat von *B. coagulans* ist. Erst nach ca. 24 h Fermentationszeit ist eine rasche Abnahme der Xylose zu verzeichnen, einhergehend mit der Bildung von Laktat. Nachdem die Xylosekonzentration auf nahezu 0 abgesunken war, wurde einmal pulsartig Xylose zugegeben (schwarzer Pfeil). Im Anschluss daran wurde die Xylose nahezu vollständig verbraucht, so dass lediglich eine Restkonzentration von $1,29 \text{ g L}^{-1}$

verblieb. Während der Phase der größten Zunahme an Laktat zwischen 18 h und 24 h beträgt die maximale Produktivität $0,70 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Final wird dabei eine Konzentration von $24,93 \text{ g L}^{-1}$ Laktat mit einer Ausbeute von $0,55 \text{ g g}^{-1}$ erzielt. Die Kohlenstoffbilanz konnte nicht geschlossen werden, da sich hierbei lediglich eine Wiederfindung von 56 % errechnete. Es konnten allerdings analytisch keine bekannten Nebenprodukte, wie beispielsweise organische Säuren, festgestellt werden. Außerdem ist die geringere Ausbeute von $0,55 \text{ g g}^{-1}$ im Vergleich zu $0,99 \text{ g g}^{-1}$ bei Glucose auffällig.

In der Literatur werden bei der Laktatgewinnung mittels *B. coagulans* und Xylose aus Lignocellulose grundsätzlich höhere Produktivitäten und Ausbeuten erzielt. So konnte aus Resten von Zuckerrohr eine Ausbeute von $0,87 \text{ g Laktat pro g Xylose}$ erzielt werden bei einer Produktivität von $1,7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [3]. Ye *et al.* erzielten eine Ausbeute von 98 % und eine Produktivität von $4,4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ mit einem Hydrolysat aus lignocellulosehaltigen Resten der Palmölproduktion [90]. Ouyang *et al.* erreichten dabei sogar die maximal theoretische Ausbeute von 100 % bei einer Produktivität von $1,04 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, ausgehend von Xylose, die aus Maisstroh gewonnen wurde [59].

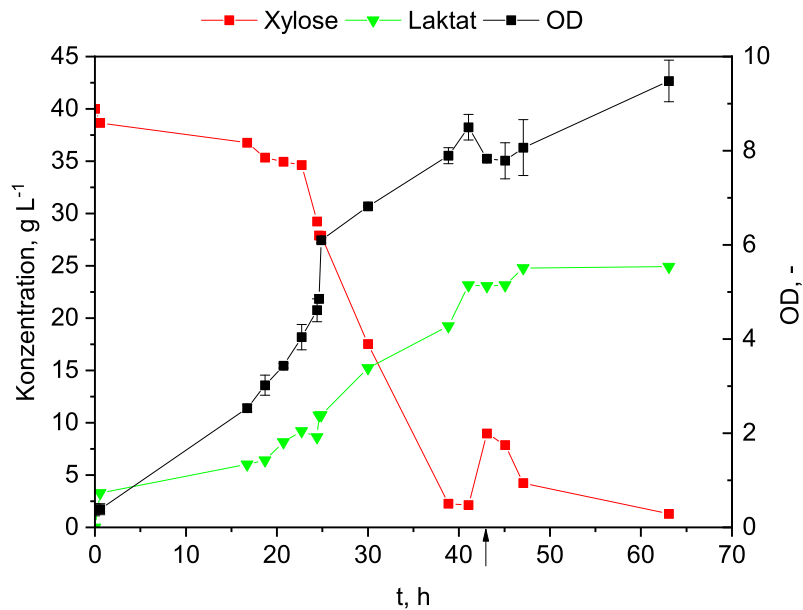


Abbildung 5.26: Kultivierung von *B. coagulans* zur Laktatgewinnung aus einem xylosereichen Biomassehydrolysat. Der schwarze Pfeil gibt den Zeitpunkt der zusätzlichen Substratzugabe an.

Für die Propionatproduktion mittels Mischkultur aus Xylose wurde eine Konzentration an Xylose von $13,05 \text{ g L}^{-1}$ vorgelegt. Zum Zeitpunkt von 31 h erfolgte die Zugabe von *V. criceti*. Dies ist in Abbildung 5.27 durch einen blauen Pfeil dargestellt. Das dabei verwendete Hydrolysat war dasselbe wie in Abbildung 5.26 und wurde einmal zusätzlich in den Reaktor eingebracht (schwarzer Pfeil). Nach kurzer Adaptionszeit erfolgte die Aufnahme von Xylose und daraus resultierend die Freisetzung von Laktat durch *B. coagulans*. Hierbei wurde eine maximale Laktatkonzentration von $12,48 \text{ g L}^{-1}$ erzielt. Wie in dem Diagramm zu erkennen, wurde dabei nahezu die gesamte vorgelegte Xylose in Laktat umgewandelt. Nach der Zugabe von *V. criceti* und der anschließenden Adaptionsphase von *V. criceti* erfolgte die Aufnahme von Laktat durch diese Mikroorganismen, und die Produktion von Propionat und Acetat setzte ein. Wie an dem steilen Anstieg der Xylosekonzentration bei 47 h Fermentationszeit zu erkennen, wurde zu diesem Zeitpunkt Xylose pulsartig in den Reaktor eingebracht (schwarzer Pfeil). Daran anschließend erfolgte kein Anstieg der Laktatkonzentration mehr, sondern nur von Propionat und Acetat. Da jedoch Xylose aufgenommen wurde, lässt dies den Schluss zu, dass das gebildete Laktat sofort verbraucht wurde und deswegen nicht im Reaktionsmedium kumuliert. Die erzielten Produkttiter an Propionat und Acetat betragen dabei $12,2 \text{ g L}^{-1}$ und $7,5 \text{ g L}^{-1}$ mit einer Ausbeute von $0,54 \text{ g}^{-1}$ für Propionat und $0,33 \text{ g g}^{-1}$ für Acetat. Die zu verzeichnende Produktivität beträgt für Propionat $0,61 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $0,35 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für Acetat. Die Bilanzierung des Kohlenstoffs ergibt eine Wiederfindungsrate von 103 %. Dieser Überschuss kann durch die hohe Konzentration an Komplexbestandteilen des Mediums (siehe Tabelle 4.4) sowie im Rahmen der HPLC Messung durch die übliche Ungenauigkeit begründet werden.

5.5.2 Simultane Verzuckerung und Fermentation

Für die gleichzeitige Verzuckerung und Fermentation wurde die Enzymlösung HTec2 (Novozymes, Dänemark) verwendet, die die Oligomere der Hemicellulose in die Monomere, in diesem Fall Xylose, spalten. Dazu wurde die Fermentation zuerst bei $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ betrieben, da dies neben *B. coagulans* auch für die Hydrolyse die optimale Temperatur darstellt. Nach Zugabe von *V. criceti* bei einer Fermentationszeit von 30 h wurde die Temperatur auf $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ reduziert. Wie in Abbildung 5.28 zu sehen, liegt bereits vor der Fermentation eine Konzentration von $7,1 \text{ g L}^{-1}$ an Xylose vor. Dies liegt daran, dass das Hydrolysat nicht ausschließlich nur aus den Oligomeren bestand, sondern an dem Umstand, dass bereits durch die Vorbehandlung zur Lignocellulose-Trennung Xylosemonomere freigesetzt wurden. Die Enzymlösung für die Hemicellulosehydrolyse wurde direkt nach der Inokulation des Reaktors mit *B. coagulans* hinzugegeben. Nach kurzer Zeit begann die Spaltung der Hemicellulose, Xylose wurde freigesetzt

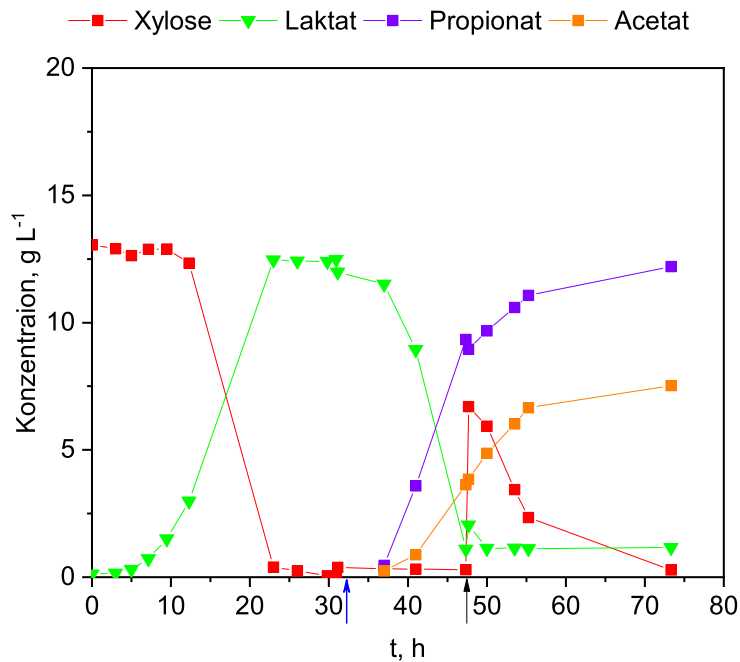


Abbildung 5.27: Kultivierung von *B. coagulans* und *V. criceti* mit einem xylose-reichen Hydrolysat aus lignocellulosebasierter Biomasse. Die Zugabe von *V. criceti* erfolgte nach 30 h (blauer Pfeil) sowie die zusätzliche Zugabe des Xylosehydrolysats bei 47 h (schwarzer Pfeil).

und Laktat gebildet. Durch das Ausfallen eines Feststoffkomplexes, konnte eine zuverlässige Messung der optischen Dichte nicht mehr durchgeführt werden. Bereits nach kurzer Zeit stieg die Laktatkonzentration merklich an, was bedeutet, dass die enzymatische Spaltung der Oligomere erfolgte, da nur die Monomere von *B. coagulans* in Laktat umgewandelt werden können. Hierbei wurde eine maximale Konzentration an Laktat von $16,06 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Nachdem die gesamte Menge an initialen Oligomeren verbraucht war, verblieb die Laktatkonzentration nahezu konstant und nahm erst nach der Adaptionszeit von *V. criceti* merklich ab. Mit dem Verbrauch des vorhandenen Laktats ging die Bildung von Propionat und Acetat einher. Dies geschah mit Produktivitäten von $0,57 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für Propionat und $0,41 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für Acetat. Nach einer Fermentationsdauer von 47,3 h wurde pulsartig wieder Oligomerlösung hinzugegeben, diese enzymatisch hydrolysiert, zu Laktat umgewandelt und direkt zu Propionat und Acetat verstoffwechselt. Dies ist aus dem Verlauf der Xylosekonzentration nicht direkt ersichtlich, da diese nahezu konstant bleibt und ebenso die Laktatkon-

zentration weiter abnimmt. Allerdings ist aus der Kohlenstoffbilanz, die mit 97 % nahezu geschlossen werden konnte, die Schlussfolgerung zu ziehen, dass auch die zusätzlich eingebrachte Oligomerlösung vollständig hydrolysiert und komplett verstoffwechselt wurde. Insgesamt wird dabei eine Ausbeute an Propionat und Acetat von $0,49 \text{ g g}^{-1}$ und $0,40 \text{ g g}^{-1}$ bezogen auf Xylose erreicht. Die finalen Produkttiter betragen $8,89 \text{ g L}^{-1}$ für Propionat und $7,21 \text{ g L}^{-1}$ für Acetat.

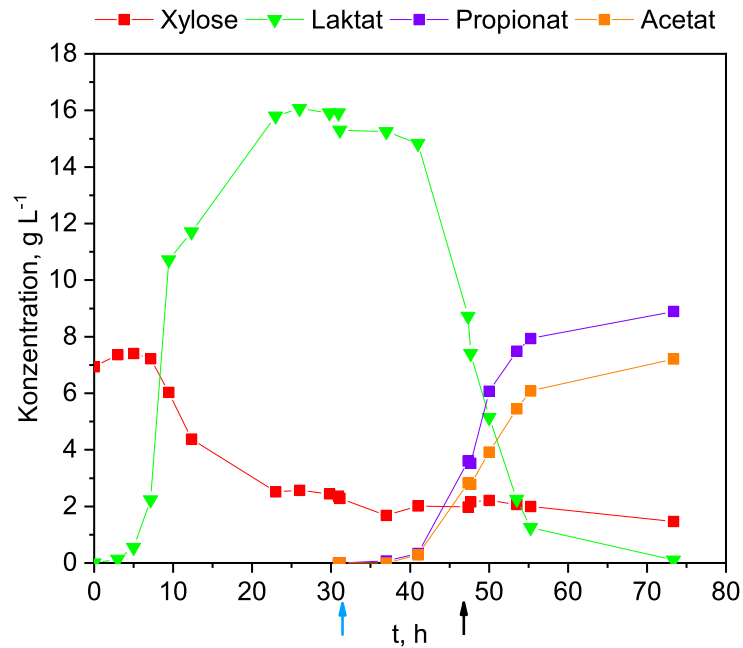


Abbildung 5.28: Simultane Verzuckerung und Fermentation einer Oligomerlösung aus Xylosemonomeren mittels *B. coagulans* und *V. criceti*. Die Zugabe von *V. criceti* erfolgte nach 30 h (schwarzer Pfeil). Die zusätzliche Zugabe an Oligomerlösung erfolgte nach 47 h (blauer Pfeil).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Möglichkeit der gleichzeitigen Verzuckerung und Fermentation (SSF - simultaneous saccharification and fermentation) gegeben ist, allerdings resultiert die enzymatische Hydrolyse in einer Bildung von Feststoffen. Dies ist in 5.29 zu erkennen. Eine Probe von 2 mL wurde zentrifugiert, wobei der unlösliche Rest im Reaktionsgefäß nach Verwurf der Flüssigphase verbleibt. Die durch mikrobielles Wachstum entstandene Masse ist, verglichen mit dem restlichen Feststoff, verschwindend gering. Diese ist innerhalb des roten Kreises in 5.29 zu erkennen. Nach Analyse des Feststoffes durch das Zentrallabor



Abbildung 5.29: Ausgefallener Feststoff nach enzymatischer Hydrolyse der Oligomerlösung aus Hemicellulose

der Technischen Universität Hamburg zeigte sich, dass der Großteil des Feststoffes aus stickstoffreichen Verbindungen bestand, was darauf schließen lässt, dass ein Teil des Hydrolyseenzym komplexiert ausfällt. Daraus ergibt sich, dass eine Kombination von SSF und Elektrodialyse nicht zweckmäßig ist, da der ausfallende Feststoff zum Verblocken der Membranen führen würde und somit ein Betrieb nicht möglich wäre. Allerdings ist die Möglichkeit gegeben, dieses Verfahren des SSF mit dem Ziel der Laktatbildung anzuwenden. Das gewonnene Laktat verbleibt in der flüssigen Phase und kann nach einer Feststoffabtrennung entweder als Substrat für die Produktion von organischen Säuren verwendet werden, wie in Abbildung 5.15 gezeigt, oder selbst als Zielprodukt dienen.

Bisher existiert nur eine Studie darüber wie SSF im Zusammenhang mit der Propionsäuregewinnung angewandt wurde. Dabei verwendeten Sabra *et al.* ein Mehlhydrolysat, das mit Hilfe des Enzyms Glucoamylase die Glucosemonomere freisetzte [73]. Die entstandenen Glucosemonomere wurden im Anschluss von *Lactobacillus zaea* in Laktat umgewandelt, welches von *V. criceti* zur Produktion von Propionat genutzt wurde. Die erzielte Produktivität von $0,24 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ liegt dabei deutlich unter der hier erzielten Produktivität, allerdings wurde mit $19,4 \text{ g L}^{-1}$ ein erkennbar höherer Produkttiter erzielt. Bei höherer Enzymkonzentration konnte die Produktivität auf $0,43 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gesteigert werden. Dadurch verringerte sich aber der Titer zu $14,5 \text{ g L}^{-1}$.

Im Vergleich mit den Ergebnissen aus Abbildung 5.28 wurde zwar hier ein geringerer Titer erreicht, allerdings trotz Xylose als Kohlenstoffquelle eine höhere Propionatproduktion im Vergleich zu Glucose als Substratquelle. Somit zeigt sich, dass die SSF als Kombination mehrere Schritte eine Alternative zu den getrennten Prozessen der enzymatischen Hydrolyse und Fermentation darstellt.

Jedoch erlaubt die Feststoffbildung keine Verwendung membranbasierter Trennverfahren als ISPR Technik.

5.5.3 Fazit der Produktion von Milchsäure und Propionsäure aus Biomassehydrolysaten

Das glucosereiche Hydrolysat stellte sich als geeignet für die Produktion von Laktat heraus, da mit einer Ausbeute von 0,99 g Laktat pro g Glucose nahezu das theoretische Maximum erreicht wurde. Jedoch wird im Vergleich zu kommerzieller Glucose nicht annähernd ein Produkttiter von 90 g L^{-1} erreicht. Zudem flacht die Produktivität in Abbildung 5.30 merklich ab, obwohl Glucose vorhanden war. Am naheliegendsten ist in diesem Fall eine Inhibierung durch unbekannte Störstoffe, die bei der Trennung der Lignocellulose entstehen, die dann in dem glucosereichen Hydrolysat vorhanden sind. Ein solche Stoff, der entstehen kann ist die Galacturonsäure. In Experimenten zeigte sich dabei, dass eine Totalinhibierung der Fermentation ab einer Konzentration von 4 g L^{-1} auftritt. In der darauffolgenden Fermentation mit diesem Hydrolysat und der Addition von *V. criceti* ist dies möglicherweise ebenfalls der Grund für die nicht vollständige Aufnahme der vorhandenen Glucose. Dies ist besonders auffällig im Fermentationszeitraum bevor *V. criceti* in den Reaktor eingebracht, da trotz des Vorhandenseins von Glucose diese nicht aufgenommen wird und deswegen die Laktatkonzentration zwischen 15 h und 25 h konstant bleibt. Erst im Anschluss an die pulsartige Zugabe von Glucose steigt diese wieder an.

Der Vergleich der Fermentation des Xylosehydrolysats aus Abbildung 5.27 mit der Fermentation aus Abbildung 5.28 zeigt, dass der Produkttiter an Propionat im ersten Fall mit 12,2 ca. 25 % höher ausfällt als bei der SSF Fermentation mit $8,89 \text{ g L}^{-1}$. Bei Betrachtung der Ausbeute ist dies ebenfalls zu verzeichnen, dass diese beim Xylosehydrolysat höher ist, als bei der SSF Fermentation. Dies lässt darauf schließen, dass der hohe Feststoffanteil, der während der SSF Fermentation entsteht, inhibierend auf die Mikroorganismen wirkt und somit beide Parameter verringert werden. Dies lässt sich auch anhand der Betrachtung der Xylosekonzentration während des SSF Experiments erklären, da eine Restkonzentration von Xylose von 2 g L^{-1} im Reaktor verbleibt und nicht mehr zu Laktat umgewandelt wird. Jedoch zeigt sich, dass in beiden Fällen die zusätzliche Zugabe von Substrat während der Fermentation möglich ist, da beispielsweise in Abbildung 5.27 die Zellen von *B. coagulans* sich über einen längeren Zeitraum ohne Substrat befinden, dass jedoch nach Zugabe von Xylose diese sofort verstoffwechselt wird. Im Fall des SSF Versuchs wird ersichtlich, dass die enzymatische Hydrolyse einsetzt, sobald Oligomerlösung zugesetzt wird und dass durch die Fermentation dadurch keine Hemmung der Hydrolyse eintritt. Schluss-

sendlich konnte gezeigt werden, dass eine gleichzeitige Hydrolyse und Fermentation der Xylosemonomere möglich ist, was die Möglichkeit eröffnet diese beiden Produktionsschritte zu kombinieren. Allerdings ist in diesem Fall zu bedenken, dass eine Kopplung mit jeglicher membranbasierten *in-situ* Produktentfernungstechnik wenig sinnvoll erscheint, da wegen des hohen Feststoffanteils, der sich während dieses Produktionsvorganges bildet, die Membranen sofort verblocken würden.

5.6 Produktion mittelkettiger organischer Säuren

Die gleiche Plattformtechnologie wurde weiterführend benutzt, um auch mittelkettige organische Säuren zu produzieren. Dafür wurden verschiedene definierte Mischkulturen und Substrate verwendet. Zuerst wurde eine Kohlenstoffquelle zu Laktat verstoffwechselt, das im Anschluss daran von einem zweiten Bakterium aufgenommen wurde und daraus mittelkettige organische Säuren produzierte. In den nachfolgenden Untersuchungen wurde für die Produktion der Milchsäure entweder *B. coagulans* oder *P. pentosaceus* verwendet. Diese wurden mit den Mikroorganismus *M. cerevisiae* gekoppelt, das aus Laktat mittelkettige organische Säuren produzieren kann. Zu beachten ist bei den folgenden Untersuchungen die verlängerte Adaptionszeit der Laktatbildner im Vergleich zu den vorangegangenen Experimente. Dies liegt daran, dass *M. cerevisiae* nur bis zu einer Temperatur von 30 °C kultiviert werden kann, so dass, für die Mischkultur, diese Temperatur ebenfalls nicht überschritten werden durfte.

Für die Untersuchungen zur Produktion von mittelkettigen organischen Säuren wurde am Anfang kommerziell erhältliche Glucose verwendet. Beide Mikroorganismen wurden bereits zu Beginn der Fermentation in den Reaktor gegeben. Das daraus resultierende Experiment ist in Abbildung 5.30 zu sehen. Im oberen Diagramm sind dabei Glucose und Laktat als Substrat beziehungsweise Zwischensubstrat aufgezeichnet. Wie zu erkennen, wurde Glucose zu Laktat verstoffwechselt, jedoch wurde nicht die gesamte Glucose verwendet, sondern es verblieb eine Restkonzentration von 12,31 g L⁻¹ im Reaktionsraum, bevor Glucose noch einmal zusätzlich zugegeben wurde.

Nachdem Laktat bis zu einer Konzentration von 7,46 g L⁻¹ gebildet wurde, wurde diese im Anschluss kontinuierlich verbraucht. Im unteren Diagramm von Abbildung 5.30 sind die Verläufe der Konzentrationen an organischen Säuren innerhalb des Reaktors zu sehen. Dabei ist eine Konzentration von 1,0 g L⁻¹ und 4,0 g L⁻¹ an Acetat und Propionat bereits zu Beginn der Fermentation vorgelegt. Dies dient dazu, das Wachstum von *M. cerevisiae* zu fördern, da beide organischen Säuren als Elektronenakzeptor dienen und somit die Bildung von Butyrat sowie Valerat und Caproat gefördert wird. Zunächst stieg die

Produktion von Propionat durch *M. cerevisiae* bis 40 h Fermentationszeit an, anschließend wurde es verbraucht. Wie in oberem und unterem Diagramm zu sehen, wurde Glucose und Acetat pulsartig nach 41 h Fermentationszeit in den Reaktionsraum eingebracht (roter und oranger Pfeil). Hiernach wurden beide Substanzen aufgenommen, was an der Abnahme der Glucose- und Acetatkonzentration feststellbar ist. Im Fall von Propionat war der Verbrauch nicht so deutlich zu erkennen, da das gebildete Propionat zu Valerat verlängert wurde, jedoch aus der Aufnahme von Laktat durch *M. cerevisiae* auch nachgebildet wurde. Wie ebenfalls zu erkennen, ging die Phase des stärksten Wachstums von Butyrat einher mit dem Verbrauch von Acetat. Butyrat wurde dabei aus zwei C2 Körpern gebildet. Die Kettenverlängerung von Butyrat zu Hexanoat fiel nicht so sehr ins Gewicht, dass dies anhand des Konzentrationsverlaufs an Butyrat erkennbar wäre, da Hexanoat aus Butyrat und einem C2 Körper gebildet wird. Schlussendlich wurden Konzentrationen an Butyrat, Valerat und Hexanoat von $4,40 \text{ g L}^{-1}$, $1,66 \text{ g L}^{-1}$ und $0,45 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Die jeweiligen Produktivitäten betragen $0,18 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ für Butyrat, $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für Valerat und $0,016 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für Hexanoat.

Auffällig ist hierbei, dass die Konzentration an gebildeter organischer Säure mit steigender Kettenlänge abnimmt. Dies liegt daran, dass für jede Verlängerung wiederum Energie verbraucht werden muss und die Inhibierung mit steigender Hydrophobizität-bedingt durch die Länge der hydrophoben Kette-zunimmt.

Dieses Resultat zeigt bereits, dass die Laktatplattform erweitert werden konnte und somit auch länger-kettige organische Säuren produziert werden können. Als nächster Schritt wurde als Substrat eine glucosereiche Hydrolysatlösung aus Lignocellulose verwendet. Diese wurde zunächst im Reaktor vorgelegt und direkt wie in Abbildung 5.31 zu sehen zu Laktat umgewandelt. Bereits zu Beginn wurden hierbei beide Mikroorganismen in den Bioreaktor gegeben. Wie im unteren Diagramm von Abbildung 5.31 zu sehen sind auch hier Acetat und Propionat vorgelegt, um das Wachstum von *M. cerevisiae* zu fördern und die Valerat- und Butyratausbeute zu erhöhen. Die Glucose wurde nach einer Adaptionszeit von ca. 20 h zu Laktat umgewandelt und eine Laktatkonzentration von $12,54 \text{ g L}^{-1}$ nach 30 h erreicht. Im Anschluss daran wurde Laktat verbraucht und die Produktion von Butyrat, Acetat und Propionat setzte ein.

Nach einer Fermentationszeit von 41 h und 46 h wurde eine Mischung aus Glucose, Acetat und Propionat pulsartig zugegeben. In beiden Fällen ist zu erkennen, dass Glucose, Acetat und Propionat unmittelbar aufgenommen wurden und zu Butyrat und Valerat verstoffwechselt wurden. Die dabei aufgenommene Glucose wurde direkt zu Laktat umgewandelt und anschließend von *M. cerevisiae* genutzt, um die Kettenverlängerungsreaktion zu bewerkstelligen. Deswegen war nach beiden Zugaben an Glucose keine merkliche messbare Zunahme der

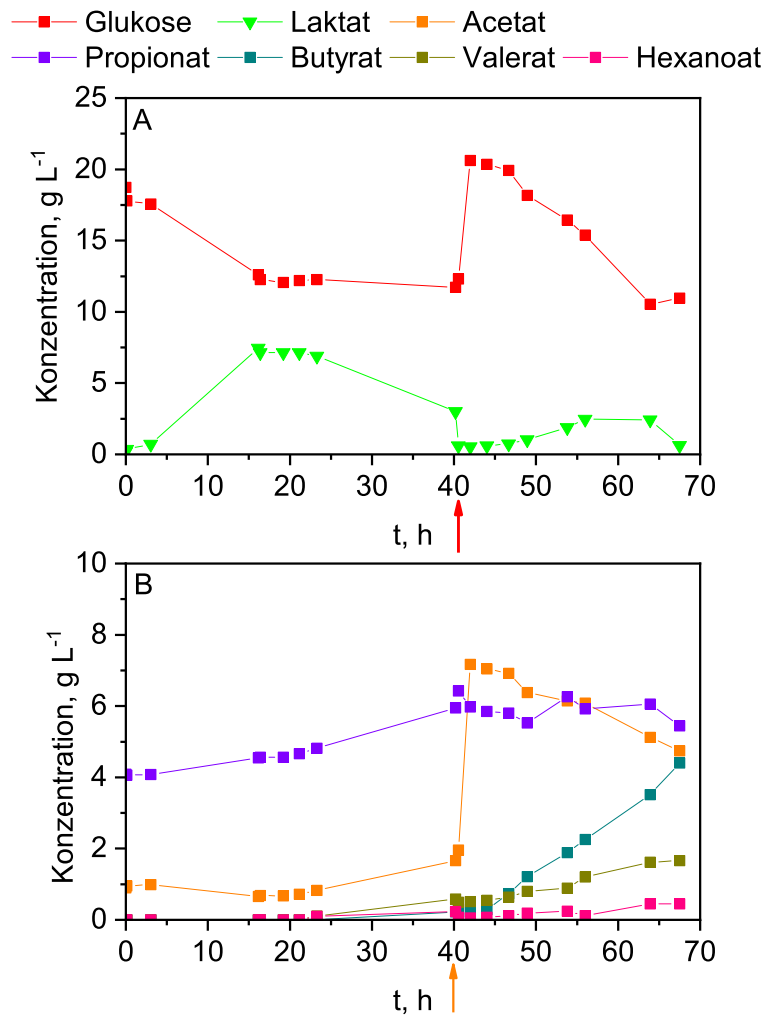


Abbildung 5.30: Mischkultur aus *B. coagulans* und *M. cerevisiae* mit Glucose als Substrat. Diagramm **A**: Konzentrationsverlauf von Glucose und Laktat im Reaktionsmedium. Der rote Pfeil gibt den Zeitpunkt an, an welchem zusätzlich Glucose in das Fermentationsmedium gegeben wurde. Diagramm **B**: Konzentrationsverläufe der organischen Säuren. Der orange Pfeil gibt den Zeitpunkt an, zu welchem zusätzlich Acetat in den Reaktor eingebracht wurde.

Laktatkonzentration feststellbar. Überraschenderweise konnte Hexanoat nicht gemessen werden, obwohl Butyrat als C4 Körper und Acetat als C2 Körper ausreichend vorhanden waren. Möglicherweise wurde Hexanoat zwar gebildet, lag aber unterhalb der Detektionsgrenze der HPLC von $0,1 \text{ g L}^{-1}$. Eine Inhibierung der Produktion der organischen Säuren durch die Zugabe von Propionat und Acetat konnte nicht festgestellt werden. So wird beispielsweise für Propionat nach der zweiten Zugabe eine Verbrauchsrate von $0,33 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht, wobei die Rate nach der ersten Zugabe nur $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ beträgt. Dies ist zudem der Fall für Glucose, da zuerst eine Verbrauchsrate von $0,38 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt wird, welche nach der zweiten externen Zugabe auf $0,78 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ansteigt. Lediglich im Fall von Acetat sinkt die Aufnahme rate von $0,29 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $0,26 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ mit zunehmender Fermentationsdauer ab. Final konnte Butyrat und Valerat mit Konzentrationen von $6,20 \text{ g L}^{-1}$ und $5,80 \text{ g L}^{-1}$ mit den jeweiligen Produktivitäten von $0,18 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $0,23 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzeugt werden.

In der voran aufgezeigten Fermentation wurden Acetat und Propionat jeweils extern zugegeben. Deswegen wurde untersucht inwieweit es möglich ist, Propionat und Acetat mittels Fermentation bereitzustellen. Dafür wurde eine definierte Mischkultur aus *B. coagulans*, *V. criceti* und *M. cerevisiae* kultiviert. Dabei stellte *B. coagulans* das Laktat zur Verfügung, das anschließend direkt von *M. cerevisiae* für die Kettenverlängerung benutzt werden kann. Zudem dient Laktat als Substrat für *V. criceti*, wodurch Acetat und Propionat generiert werden. Hierfür wurde Glucose als Substrat verwendet und eine Konzentration von 9 g L^{-1} im Reaktor vorgelegt. Alle drei Mikroorganismen wurden gleichzeitig zu Beginn in den Reaktor eingebracht. Auch in diesem Fall wurde Acetat vorgelegt, um das Wachstum von *M. cerevisiae* zu fördern, da bedingt durch die lange Adaptionszeit von *V. criceti* die Acetatproduktion erst verzögert einsetzt, die Wachstumsbedingungen von *M. cerevisiae* aber bereits bei Inokulation so optimal wie möglich sein sollten. Allerdings wurde diese im Vergleich zu den eingangs gezeigten Untersuchungen deutlich reduziert, so dass nur 1 g L^{-1} zu Beginn der Fermentation im Reaktionsmedium vorlag. Wie in Abbildung 5.32 zu erkennen, wurde die vorgelegte Glucose zu Laktat transformiert, wobei eine Konzentration von $8,94 \text{ g L}^{-1}$ erzielt wurde. Zu diesem Zeitpunkt war jedoch eine Konzentration an Glucose von 2 g L^{-1} vorhanden, was darauf schließen lässt, dass die Komplexbestandteile im Fermentationsmedium auch zur Laktatgewinnung genutzt wurden. Nach dem Erreichen des Maximums der Laktatkonzentration wurde Laktat langsam verbraucht und parallel dazu begann die Produktion von Butyrat. Etwas verspätet setzte im Anschluss daran die Produktion von Valerat sowie Propionat und Acetat ein. Dabei wurde für Propionat eine Produktivität von $0,16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und für Acetat von $0,09 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt. Die Konzentration von

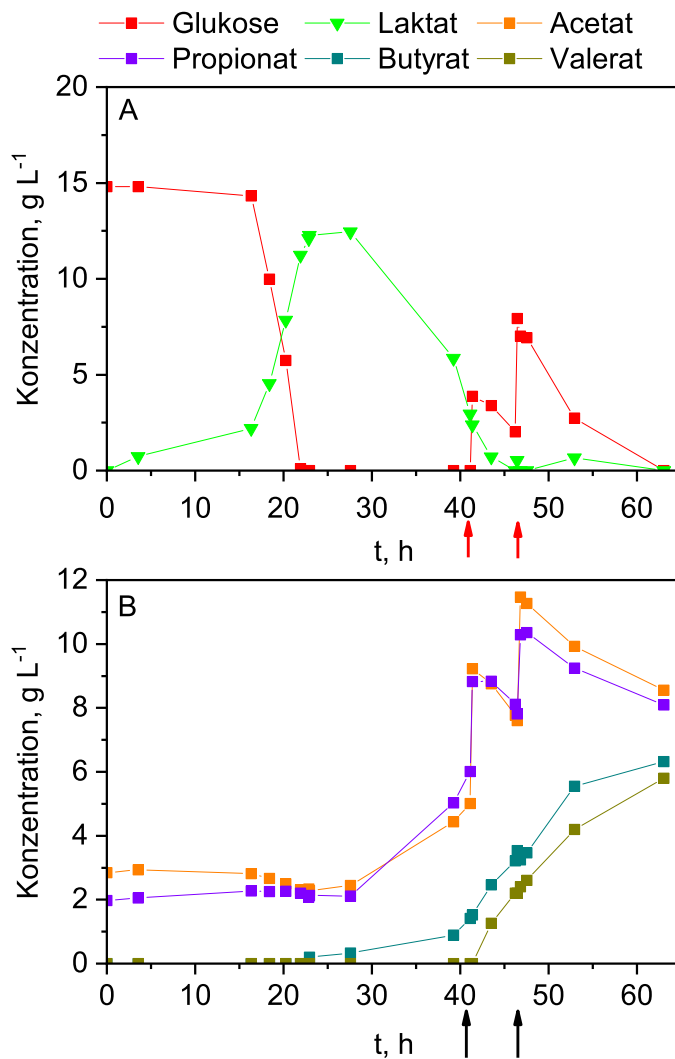


Abbildung 5.31: Mischkultur aus *B. coagulans* und *M. cerevisiae* mit Glucose aus Fichtenholz als Substrat. Diagramm **A**: Konzentrationsverläufe von Glucose und Laktat innerhalb des Reaktors. Die roten Pfeile markieren die Zeitpunkte der Zugabe von zusätzlichem Biomassehydrolysat. Diagramm **B**: Konzentrationsverläufe der organischen Säuren innerhalb des Reaktors. Die schwarzen Pfeile geben die Zeitpunkte der zusätzlichen Zugabe eines Gemisches aus Propionat und Acetat an.

Hexanoat stieg hier nur sehr langsam mit einer Produktivität von $0,006 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ an und mündete in einer finalen Konzentration von $0,20 \text{ g L}^{-1}$. Wegen der geringen Konzentration an Hexanoat war keine Abnahme der Butyratkonzentration ersichtlich. Diese verblieb nach 40 h Fermentationszeit nahezu konstant bei 1 g L^{-1} . Im Gegensatz dazu stiegen allerdings die Konzentrationen von Valerat, Propionat und Acetat. Dies deutet darauf hin, dass die Kettenverlängerung von Acetat mit einem C2 Körper zu Butyrat nicht mehr stattfand und nur noch Propionat um einen C2 Körper zu Valerat verlängert wurde. Dies ist überraschend, da in den beiden vorangegangenen Untersuchungen die Konzentration an Butyrat bis zum Abbruch der Fermentation stetig anstieg. Schlussendlich wurden Produkttiter von $0,20 \text{ g L}^{-1}$ für Hexanoat, $1,04 \text{ g L}^{-1}$ für Butyrat und $0,52 \text{ g L}^{-1}$ für Valerat erreicht. Die dazugehörigen Produktivitäten betragen $0,030 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für Butyrat, $0,022 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für Valerat und $0,006 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für Hexanoat.

Es konnte mit dieser Untersuchung gezeigt werden, dass prinzipiell keine externe Zugabe von Acetat und Propionat erfolgen muss, um mittelkettige organische Säuren zu erzeugen. Allerdings liegen die dabei erzielten Produktivitäten und Titer deutlich unter den Ergebnissen, die erreicht werden konnten bei Zugabe von Elektronenakzeptoren.

Neben *B. coagulans* wurde als Laktatbildner *P. pentosaceus* mit hydrolysierten Blumenkohlblättern als Substrat getestet, die Fructose und Glucose als Kohlenstoffquelle enthalten. Der Blumenkohl wurde vom Projektpartner VTT bereits im Vorfeld enzymatisch hydrolysiert und an die TUHH übersandt. Der hier verwendete Blumenkohl war Ausschussware und stand somit nicht in Konkurrenz zu einer Verwendung als Nahrungsmittel. Wie eingangs erwähnt, erfolgt hier die Verwendung von *P. pentosaceus* als Laktatbildner, da dieser dieser Stamm vom Projektpartner VTT verwendet wurde und an der TUHH der Scale-Up und die Kombination mit der Elektrodialyse durchgeführt wurden.

Die Verläufe der Konzentrationen sind in Abbildung 5.33 dargestellt. Wie zu erkennen, wurden Glucose und Fructose im Reaktor vorgelegt und von *P. pentosaceus* zu Laktat umgewandelt. Deutlich zu erkennen ist, dass Fructose langsamer verbraucht wurde als Glucose, da es sich im Vergleich zu Glucose nicht um das präferierte Substrat handelt. Dies wird zudem dadurch ersichtlich, dass Fructose erst verbraucht wird, nachdem die Glucose komplett verbraucht war. Dies könnte auf eine etwaige Katabolitrepression der Fructose bei Verfügbarkeit von Glucose hindeuten. So blieb die Fructosekonzentration nahezu konstant bis zu einem Zeitpunkt von 23 h und sank erst im Anschluss daran ab. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich nur noch 2 g L^{-1} an Glucose im Reaktor. Parallel zum Verbrauch der Kohlenstoffquellen bildete sich Laktat, das nach 24 h ein Maximum bei $14,8 \text{ g L}^{-1}$ erreichte und anschließend verbraucht wurde. Wie in Diagramm

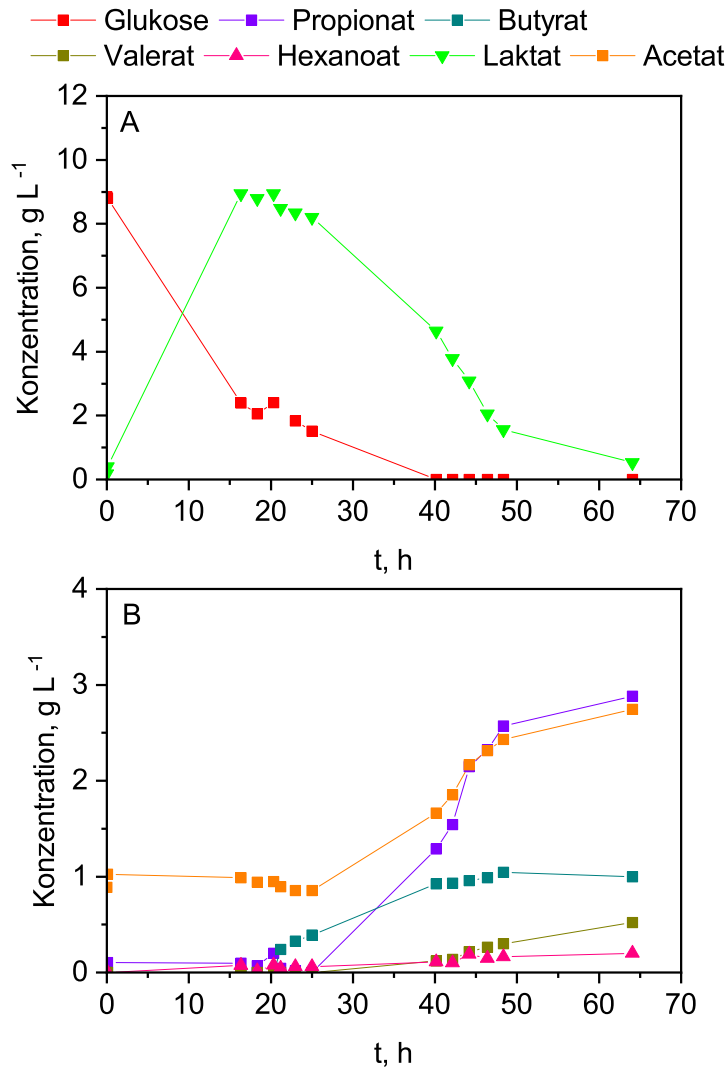


Abbildung 5.32: Mischkultur aus *B. coagulans*, *V. criceti* und *M. cerevisiae* mit Glucose als Substrat. Diagramm **A**: Glucose- und Laktatkonzentration innerhalb des Reaktionsmediums. Diagramm **B**: Konzentrationsverläufe der organischen Säuren innerhalb des Bioreaktors.

B zu sehen, hatte sich bis zu einer Fermentationsdauer von 23 h eine geringe Menge an Propionat gebildet und die Acetatkonzentration stieg ebenfalls leicht an. Auch hier wurde Acetat als Elektronenakzeptor vorgelegt, so dass bereits zu Beginn eine Konzentration von 5,5 g L⁻¹ vorhanden war, da Acetat als finaler Elektronenakzeptor das Wachstum von *M. cerevisiae* verbessert [36]. Neben der

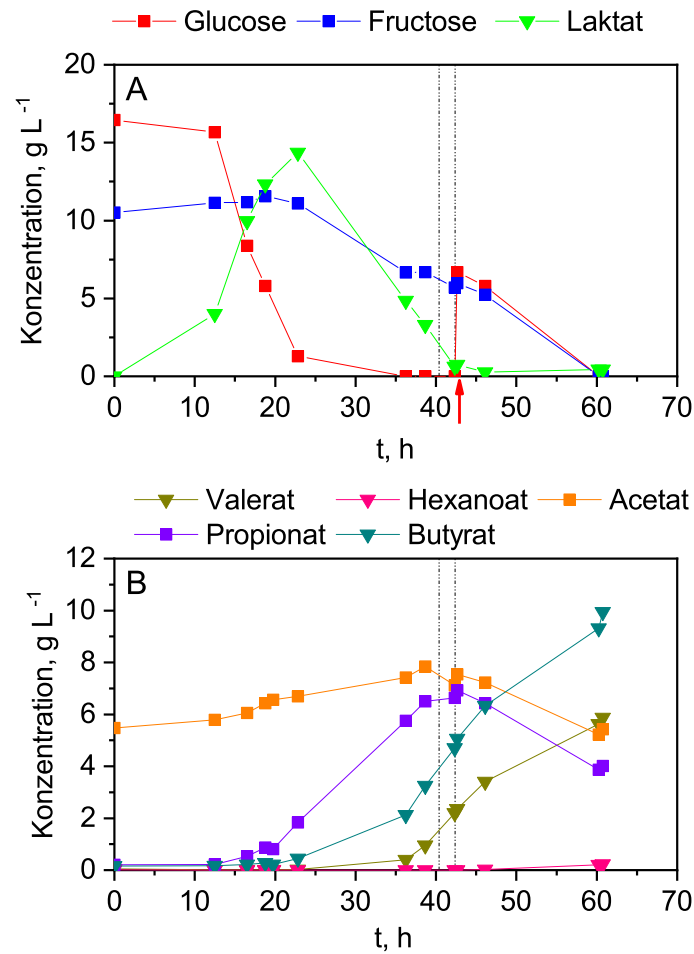


Abbildung 5.33: Mischkultur von *P. pentosaceus* und *M. cerevisiae* mit Glucose und Fructose aus enzymatischer Hydrolyse von Blumenkohl. Diagramm **A**: Konzentrationsverläufe der Substrate und des Zwischensubstrats. Der rote Pfeil markiert den Zeitpunkt der zusätzlichen Glucosezugabe. Diagramm **B**: Konzentrationsverläufe der gebildeten organischen Säuren.

Bildung von Acetat und Propionat ist zu erkennen, dass Valerat und Butyrat gebildet wurden. Dies geschieht dadurch, dass an Acetat ein C2 Körper angehängt wird und somit der C4 Körper des Butyrats entsteht. Im Fall von Propionat (C3) wird ebenfalls ein C2 Körper an den C3 Körper des Propionats angehängt

und es entsteht der C5 Körper Valerat. Besonders deutlich wurde diese Kettenverlängerungsreaktion nach dem Durchlaufen der Elektrodialyse bei 42,4 h. Die Konzentrationen an Acetat und Propionat sanken ab und gleichzeitig wurden Butyrat und Valerat gebildet. In geringer Konzentration wurde Hexanoat gebildet, das durch die Kettenverlängerung von Butyrat um einen C2 Körper entsteht. Des weiteren ist anzumerken, dass auch nach der Elektrodialyse und der pulsartigen Zugabe von Glucose, diese wieder vollständig verbraucht wurde und Laktat generiert wurde, welches sofort zu Propionat und Acetat und daran anschließend zu Butyrat und Valerat sowie Hexanoat verstoffwechselt wurde.

Bei Betrachten der Verbrauchsraten der initialen Glucose beziehungsweise der zugegebenen fällt auf, dass diese zu Beginn $1,39 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und später nur noch $0,38 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ betragen. Wahrscheinlich liegt dies an den bereits gebildeten organischen Säuren, die zum Zeitpunkt von 40 h bereits im Fermentationsmedium vorhanden waren. Nichtsdestotrotz wurde jedoch die gesamte zugegebene Glucose verbraucht, so dass zum Zeitpunkt der Beendigung der Fermentation kein Substrat mehr vorhanden war. Im Gesamten werden $6,18 \text{ g L}^{-1}$ Valerat, $0,23 \text{ g L}^{-1}$ Hexanoat und $10,99 \text{ g L}^{-1}$ Butyrat erzielt. Die jeweiligen Produktivitäten betragen dabei $0,30 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für Butyrat, $0,22 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für Valerat und $0,013 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für Hexanoat. Für den Betrieb der Elektrodialyse wurde dabei eine Energie von $0,06 \text{ kWh}$ bei einer Stromdichte von 412 A m^{-2} verbraucht. Die Stromdichte wurde hier abweichend von den standardmäßig verwendeten 200 A m^{-2} verdoppelt, um die Triebkraft zu erhöhen, da es durch die Partikel des Blumenkohls zu einer ausgeprägteren Deckschichtbildung auf den Membranen kam. Durch die Erhöhung des Stroms sollte sichergestellt werden, dass trotzdem die inhibierenden organischen Säuren entfernt wurden.

Die Abbildung 5.34 zeigt die gewichtsbasierte prozentuale Verteilung der generierten organischen Säuren. Hierbei nehmen Butyrat und Valerat mit $38,0 \%$ und $22,4 \%$ den größten Anteil ein. Die Kettenverlängerung von Propionat zu Valerat wurde somit ebenso durchgeführt wie die Verlängerungsreaktion von Acetat zu Butyrat. Wie Abbildung 5.33 zu entnehmen, wird kaum Hexanoat gebildet, was bedeutet, dass Butyrat fast nicht verbraucht wurde. Hexanoat besitzt lediglich einen Anteil von $0,9 \%$ an den gesamten Produkten. Eine etwaige Optimierung sollte hier vor allem auf die Reduktion von Laktat, Propionat und Acetat abzielen. Vor allem Laktat scheint hier am einfachsten, durch eine kontrollierte Substratzugabe zu vermeiden, so dass am Schluss der Fermentation kein Laktat mehr vorliegt. Dies ist insbesondere in Hinblick auf die nachfolgende Separation, Isolation und Reinigung der Säuren erstrebenswert.

In Abbildung 5.35 sind die Verläufe der Konzentrationen der jeweiligen organischen Säure im NaOH Kompartiment aufgetragen. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass am schnellsten Acetat und Propionat entfernt wurden. Dies liegt

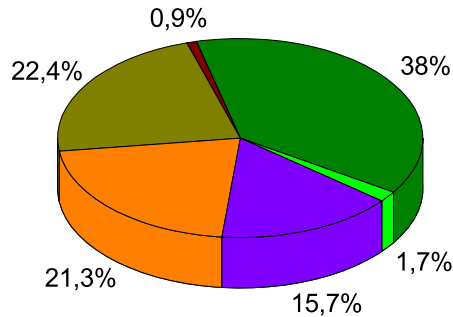


Abbildung 5.34: Prozentuale Verteilung (w/w) der produzierten organischen Säuren

einerseits an den Konzentrationen im Reaktor und dem daraus resultierenden Konzentrationsgradient, der eine Entfernung begünstigte, sowie an der Größe der beiden Moleküle. Da diese im Vergleich zu Butyrat und Valerat eine kürzere hydrophobe Kette aufweisen, können diese die Membranen schneller passieren. Im Fall von Laktat würde dies ähnlich schnell bewerkstelligt werden wie bei Acetat, jedoch ist die Laktatkonzentration im Reaktor zu Beginn der Elektrodialyse bereits so gering, dass sich nur ein kleiner Konzentrationsgradient ergibt und mit der Elektrodialyse auch das gesamte Laktat aus dem Reaktor entfernt wurde. Im Fall von Butyrat und Valerat wurde deutlich weniger entfernt, obwohl die Konzentration beider Substanzen während der Elektrodialyse durch die Aktivität von *M. cerevisiae* anstieg. Dies liegt an der hydrophoben Kette, die mit steigender Länge das Passieren der Elektrodialysemembranen verlangsamt.

Die Abbildung 5.36 zeigt den Verlauf des Widerstandes des Dialysestacks während des Betriebs der Elektrodialyse. So ist zu erkennen, dass der Widerstand zum Ende eines Schaltintervalls über die Dauer bis 41,5 h kontinuierlich anstieg, anschließend auf einem Niveau von 20 Ohm verblieb und zum Schluss hin wieder anstieg, wobei ein Wert von bis zu 30 Ohm erreicht wurde. Die Zunahme zu Beginn ist darauf zurückzuführen, dass sich eine Deckschicht auf den Membranen bildete, die nicht mehr vollständig durch den Polaritätswechsel beseitigt werden konnte. Möglicherweise löste sich diese Deckschicht plötzlich, so dass in der Folge

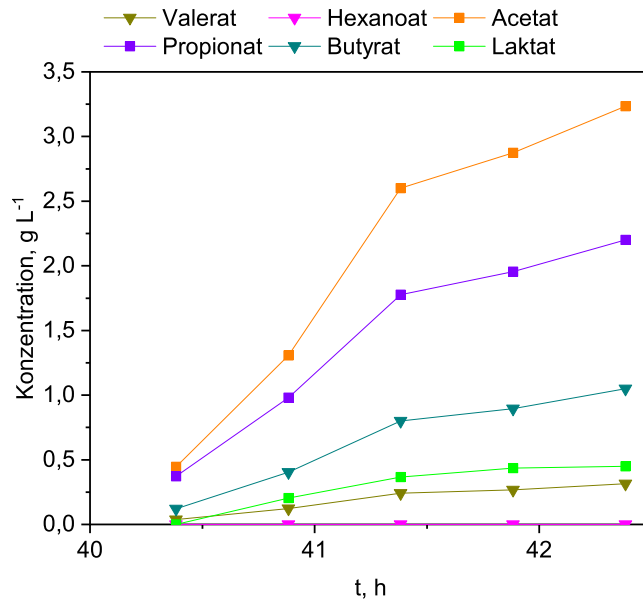


Abbildung 5.35: Konzentrationsverläufe der entfernten organischen Säuren im NaOH Kompartiment während des Betriebs der Elektrodialyse

der Widerstand wieder reduziert wurde, wodurch die rapide Abnahme nach 41,5 h zu erklären wäre. Im Anschluss daran folgte wieder eine kurze Phase, während der der Widerstand durch Deckschichtbildung wieder auf 30 Ohm anstieg.

Somit konnte gezeigt werden, dass neben Biomassehydrolysaten aus Lignocellulose auch bis dato kaum genutztes Hydrolysat aus Blumenkohl genutzt werden kann. Zudem konnte die Maßstabsvergrößerung hin zu einem Reaktionsvolumen von 25 L erfolgreich demonstriert werden.

Zusammenfassend sind nachfolgend in Tabelle 5.3 die Produktivitäten von Butyrat, Valerat und Hexanoat aufgelistet.

In der Literatur sind mehrere Studien mit *Megasphaera* spp. publiziert, jedoch bis dato keine veröffentlichte Kultivierung mit dem Stamm *Megasphaera cerevisiae*. Die meisten Studien wurden mit dem Bakterium *Megasphaera elsdenii* durchgeführt. Die dazu veröffentlichten Resultate weisen im Vergleich zu den hier erzielten Ergebnissen deutlich höhere Produkttiter und Produktivitäten für Hexanoat auf. So konnten Kim *et al.* Hexanoat mittels *M. elsdenii* bis zu einer Konzentration von 13,0 g L⁻¹ gewinnen, wobei eine maximale Produktivität von 0,52 g L⁻¹ h⁻¹ erzielt wurde [40]. Nelson *et al.* erzielten sogar einen Produkttiter von 20,7 g L⁻¹ Hexanoat bei einer Produktivität von 0,26 g L⁻¹ h⁻¹,

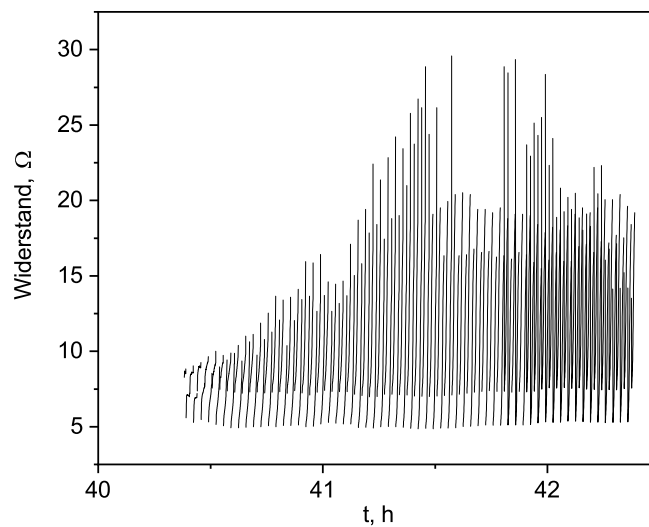


Abbildung 5.36: Verlauf des Widerstandes des Elektrodialysestacks während des Betriebs der REED

ausgehend von Glucose als Substrat [56]. Des weiteren konnte bei der Verwendung von Sucrose als Substrat eine Konzentration an Hexanoat von $28,42 \text{ g L}^{-1}$ mit einer Produktivität von $0,20 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt werden [15]. Roddick *et al.* konnten eine Konzentration von $8,2 \text{ g L}^{-1}$ mit einer Produktivität von $0,126 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreichen [70]. Allerdings haben alle diese Resultate gemeinsam, dass diese Werte nur in Kombination mit einer *in-situ* Produktentfernung erwirkt werden können. Die dazugehörigen Kontrollfermentationen ohne die jeweilige verwendete ISPR Technik wiesen immer deutlich niedrigere Titer auf. Dies liegt an der herrschenden Produktinhibierung durch Hexanoat, falls dieses nicht aus dem Fermentationsmedium entfernt wird.

5.6.1 Fazit der Produktion mittelkettiger organischer Säuren

Die erfolgreiche Produktion von kurz- sowie mittelkettigen organischen Säuren zeigt die Vielseitigkeit und Flexibilität der Verwendung von Laktat als Intermediat. Des weiteren ist es mit dieser Plattform möglich, vor allem organische Reststoffe, wie hier die hydrolysierten Blumenkohlblätter oder hydrolysierte Lignocellulose zu verwenden und wertschöpfende Chemikalien zu gewinnen. Auch hier besteht jedoch die Hürde, dass die gebildeten organischen Säuren eine Inhibierungswirkung gegenüber den Mikroorganismen erzeugen. Deswegen wurde

Tabelle 5.3: Zusammenfassung der Produktivitäten der Endprodukte der Untersuchungen zur Produktion mittelkettiger Säuren in Mischkultur

Fermentation	Substrat	Produktivität Butyrat g L ⁻¹ h ⁻¹	Produktivität Valerat g L ⁻¹ h ⁻¹	Produktivität Hexanoat g L ⁻¹ h ⁻¹
<i>B. coagulans</i> <i>M. cerevisiae</i>	Glucose	0,18	0,05	0,016
<i>B. coagulans</i> <i>M. cerevisiae</i>	Glucose (Fichte)	0,18	0,23	-
<i>B. coagulans</i> <i>V. criceti</i> <i>M. cerevisiae</i>	Glucose	0,030	0,022	0,006
<i>P. pentosaceus</i> <i>M. cerevisiae</i>	Glucose Fructose (Blumenkohl)	0,30	0,22	0,013

die Elektrodialyse eingesetzt, um spezifisch die inhibierenden Substanzen abzutrennen. Allerdings wird die Effizienz der Elektrodialyse durch die Länge der hydrophoben Kette eines Moleküls beeinflusst. Dies ist besonders deutlich in Abbildung 5.35 zu sehen, bei der die Abtrennrage mit steigender Kettenlänge abnimmt. Die Problematik der Effizienz wird dadurch verstärkt, dass die realen Substrate Feststoffe beinhalten. Dies führt bei einem membranbasierten Prozess wie der Elektrodialyse zu einem stetigen Verblocken der Membranporen. Um diese Verschmutzung zu beseitigen ist somit ein manueller Reinigungsprozess nach jedem Einsatz notwendig. Vor allem für mittelkettige organische Säuren ist es deshalb ratsam, auf eine andere ISPR Technik zu setzen als die Elektrodialyse. Hierfür hat sich die Reaktivextraktion als zielführend erwiesen. Diese wurde für die Entfernung von mittelkettigen organischen Säuren im Labormaßstab bereits erfolgreich eingesetzt. Eine industrielle Etablierung erfolgte allerdings bis dato nicht. Jedoch muss bei der Reaktivextraktion auf ein organisches Lösemittel wie tri-Octylamin (TOA) zurückgegriffen werden, das zudem in einem langkettigen Alkohol wie n-Octanol verdünnt werden muss. Im Gegensatz dazu, muss bei der Elektrodialyse nur Strom aufgebracht werden, allerdings eine geringere Abtrennrage in Kauf genommen werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem sich organische Säuren auf nachhaltigem Weg mit Hilfe der Biotechnologie produzieren lassen. Diese Konzepte sind insofern vonnöten, als bisher ein Großteil der chemischen Grundsubstanzen wie beispielsweise organische Säuren nahezu ausschließlich aus fossilen Rohstoffen gewonnen werden. In Hinblick auf deren Verknappung sowie den steigenden politischen und gesellschaftlichen Druck erscheint das Ersetzen von petrochemischen Verfahren richtig und notwendig.

Hierbei sollte ein Prozessplattform entwickelt werden, auf deren Grundlage eine Reihe von organischen Säuren produziert werden kann, die bis dato nicht biotechnologisch erzeugt werden. Diese können mikrobiell durch anaerobe Fermentation erzeugt werden, allerdings sind dabei Hindernisse zu überwinden. So werden grundsätzlich nur vergleichsweise geringe Titer mit geringen Ausbeuten erzielt. Zudem kann wegen der gebildeten Säuren eine Produktinhibierung hervorgerufen werden, was bedeutet, dass mikrobielles Wachstum gebremst oder komplett verhindert werden kann.

Um Produktinhibierung zu vermeiden wurde eine modifizierte Elektrodialyse als *in-situ* Produktentfernung etabliert, die in der Lage ist, monovalente Ionen aus der Fermentation abzutrennen. Die Triebkraft des Ionentransports wird dabei durch die Polarisierung der Elektroden hervorgerufen. Bei konventionellen Elektrodialyseaufbauten können die Elektroden nicht ihre Polarisierung wechseln. In diesem Fall waren jedoch Elektroden verbaut, die ihre Polarisierung wechseln können. Mit dem Wechsel der Polarisierung verändert sich die Flussrichtung der Ionen der gebildeten Säuren, da diese von der Anode angezogen und von der Kathode abgestoßen werden. Somit konnten Feststoffe, die durch Bakterienwachstum entstehen oder bereits vorhandene Partikel mit Wechsel der Polarisierung wieder von den Membranen der Elektrodialyse entfernt werden. Dies ermöglicht den gekoppelten Betrieb von Elektrodialyse und Fermentation, ohne dass eine Deckschichtbildung oder Fouling auf den Membranen der Elektrodialyse eintritt.

Die Produktion der organischen Säuren sollte dabei über Laktat als Zwischensubstrat realisiert werden. Da die Laktatfermentation ein lange etablierter Prozess ist, stehen deswegen viele verschiedene Bakterien zur Verfügung, die Substrate homofermentativ zu Milchsäure umwandeln können. Dies ist von Vorteil, da somit auf eine breite Palette an Substraten zurückgegriffen werden kann. Hier

wurden Zuckermonomere verwendet, zunächst in ihrer kommerziell erhältlichen Form und anschließend in Form von hydrolysiertes Biomasse. Die produzierte Milchsäure wird im Anschluss von einem zweiten Bakterium aufgenommen und zu anderen organischen Säuren, wie beispielsweise Propionsäure oder Hexansäure transformiert.

Die Reaktion der Zucker zu Laktat wurde hier durch das Bakterium *Bacillus coagulans* bewerkstelligt. Dieses Bakterium zeichnet sich durch einen breiten pH Toleranzbereich sowie eine Fermentationstemperatur von bis zu 52 °C aus. Als Substrate wurden Xylose und Glucose verwendet, da diese die fermentierbaren Bestandteile von Lignocellulose darstellen. Zunächst wurde *B. coagulans* in batch und fed-batch Verfahrensweise als Monokultur kultiviert. Dabei zeigte sich, dass mit diesem Stamm eine Ausbeute von nahezu 100 % erreicht werden kann und keine Produktinhibierung durch Laktat auftritt. Mit Glucose wurde dabei eine maximale Produktivität von 6,24 g L⁻¹ h⁻¹ erreicht. Bei der Verwendung von reiner Xylose wurde zwar eine deutlich geringere Ausbeute und Produktivität erzielt, jedoch immer noch ausreichend für die Bereitstellung der Milchsäure für den zweiten Mikroorganismus.

Für die Erzeugung von Propionsäure wurde das Bakterium *Veillonella criceti* verwendet, das aus Laktat Propionat und Acetat produziert. Ein Wachstum auf Glucose oder Xylose kann von diesem Bakterium nicht durchgeführt werden. Bisher wurde der Großteil der Studien zur Propionsäurebildung mittels biotechnologischer Verfahren mit Bakterien der Gattung *Propionibacterium* durchgeführt. Jedoch zeichnet sich dieses im Vergleich zu *V. criceti* durch niedrigere Wachstumsraten und Produktivitäten aus. Zudem werden von Propionibakterien neben Propionat und Acetat noch weitere Nebenprodukte gebildet. *V. criceti* wurde ebenfalls zunächst in einer Monokultur in batch und fed-batch Verfahrensweise kultiviert. Dabei ist zu beachten, dass die Konzentration an Laktat den Schwellenwert von 10 g L⁻¹ nicht überschreitet, da dieses Bakterium ab diesem Wert im Wachstum inhibiert wird. Für die Prozessentwicklung hin zu einer definierten Mischkultur wurde *V. criceti* mit einer laktathaltigen Fermentationsbrühe als Substrat kultiviert. Dabei wurde eine maximale Produktivität von 0,54 g L⁻¹ h⁻¹ erzielt sowie eine Ausbeute von 0,63 g g⁻¹. Im Anschluss daran wurde die Fermentation der Monokultur von *V. criceti* mit der Elektrodialyse verbunden, um einer Produktinhibierung Vorschub zu leisten. Da *V. criceti* allerdings nur auf Laktat wachsen kann, ist der dauerhafte Betrieb der Elektrodialyse nicht zielführend, da mit dieser Bauweise der Elektrodialyse auch dauerhaft das Laktat entfernt würde. Das Fermentationsverfahren wurde daher so gestaltet, dass die Elektrodialyse nur zu bestimmten Zeitpunkten aktiviert wurde und zwar nur dann, wenn das gesamte Laktat zu Propionat und Acetat umgewandelt war. Deswegen wurde frisches Substrat nicht kontinuierlich

hinzugefügt, sondern pulsartig zugegeben. Dies geschah nach Beendigung eines Elektrodialyseintervalls, welches circa 2 h dauerte. Somit konnte eine Substratinsuffizienz von *V. criceti* länger als 2 h vermieden werden.

Im Zuge der Weiterentwicklung des Prozesses wurden sowohl *B. coagulans* als auch *V. criceti* in einem Reaktionsraum als definierte Mischkultur fermentiert. Die Substratzufuhr musste dafür so gesteuert werden, dass nur so viel an Zuckermolekülen (Glucose oder Xylose) zugegeben wurde, dass keine Substratinhibierung durch das gebildete Laktat hervorgerufen wurde. Eine kontinuierliche Zugabe des Substrats ist nur möglich, wenn die Elektrodialyse nicht aktiviert ist, da ansonsten das gebildete Laktat fortlaufend aus dem Reaktionsmedium entfernt würde und somit kein Substrat für *V. criceti* mehr zur Verfügung stünde. Die gewählte Strategie der Fermentation wurde somit so gewählt, dass das zuckerhaltige Substrat zu Laktat verstoffwechselt wurde und im Anschluss zu Propionat und Acetat. Wenn das Laktat vollständig verbraucht war, wurde die Elektrodialyse aktiviert und Propionat und Acetat entfernt. Die Elektrodialyse wurde für ca. 2 h aktiviert, was einen Kompromiss zwischen entfernten Säuren und der Zeitdauer der Substratinsuffizienz von *V. criceti* darstellt. Nach der Beendigung der Elektrodialyse wurde direkt danach wieder das jeweilige Ausgangssubstrat pulsartig in den Reaktor eingebracht. Dieser Zyklus aus Substratzugabe und Elektrodialyse wurde mehrfach wiederholt. Es zeigte sich dabei, dass bei der Kultivierung dieser Mischkultur die Ausbeute und Produktivität mit gekoppelter Elektrodialyse im Vergleich zu einer Fermentation ohne Betrieb der Elektrodialyse erhöht werden konnte. So konnte die Produktivität an Propionat von $0,63 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ auf $0,70 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ gesteigert werden. Zudem ergab sich eine Erhöhung der Ausbeute von $0,35 \text{ g g}^{-1}$ zu $0,39 \text{ g g}^{-1}$.

Im Anschluss an die Kopplung der Fermentation mit der Elektrodialyse wurden verschiedene Biomassehydrolysate ausgehend von Lignocellulose getestet. Die Hydrolysate wurden in flüssiger Form zur Verfügung gestellt und enthielten entweder Glucose oder Xylose. Allerdings beinhalten diese Hydrolysate auch immer einen Feststoffanteil, hervorgerufen durch das in der Lignocellulose enthaltene Lignin. Dieses Lignin stellt insbesondere für die Elektrodialyse ein Problem dar, da diese Partikel an den Membranen haften. Deswegen wurden verschiedene Hydrolysate getestet, die von einem Projektpartner zur Verfügung gestellt wurden. Der Projektpartner entwickelte dabei ein Verfahren, das als eine Zielgröße die Reduktion der Feststoffbeladung mit Lignin hatte. Deswegen konnten schlussendlich Hydrolysate verwendet werden, die nahezu frei von Lignin waren und somit ein reibungsfreier Betrieb der Elektrodialyse gewährleistet war. Es zeigte sich hierbei, dass sowohl glucose- sowie xylosereiche Hydrolysate gut geeignet sind, um Propionat mittels der Laktatplattform und der gekoppelten Elektrodialyse zu generieren. So konnte aus einem xylosereichen Hydrolysat Propionat

mit einer Ausbeute von $0,54 \text{ g g}^{-1}$ und einer Produktivität von $0,61 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ generiert werden. Im Fall von Glucose wurde eine Ausbeute von $0,49 \text{ g g}^{-1}$ mit einer Produktivität von $1,09 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Neben der Verwendung von Hydrolysaten, die Monomere beinhalten, wurde auch ein Hydrolysat aus Oligomeren der Hemicellulose untersucht. Da die verwendeten Mikroorganismen allerdings diese Oligomere weder spalten noch verwerten können, müssen diese zuerst enzymatisch hydrolysiert werden. Dazu wurde *B. coagulans* und ein spezielles Enzym in einen Bioreaktor eingebracht, so dass Verzuckerung und Fermentation gleichzeitig erfolgten. Jedoch kam es während der Fermentation zu einem Ausfällen von Feststoff, der eine Benutzung der Elektrodialyse unmöglich machen würde. Trotz des Ausfalls des Feststoffkomplexes konnte die Propionatproduktion trotzdem durchgeführt werden. Dabei wurden eine Propionatausbeute von $0,49 \text{ g g}^{-1}$ und eine Propionatproduktivität von $0,57 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ erreicht.

Im Zuge der Weiterentwicklung der Laktatplattform wurde untersucht, wie das Produktspektrum erweitert werden kann. Dazu wurde entweder *B. coagulans* oder ein anderes milchsäurebildendes Bakterium, nämlich *Pediococcus pentosaceus*, mit dem Mikroorganismus *Megasphaera cerevisiae* kombiniert. *M. cerevisiae* kann ausgehend von Laktat mittelkettige organische Säuren wie Hexansäure (Caproat oder Hexanoat) und Valeriansäure (Valerat) bilden. Für die Verbesserung des Wachstums von *M. cerevisiae* ist allerdings die Anwesenheit von kurzkettigen organischen Säuren wie Essigsäure und Propionsäure vorteilhaft, da diese als Elektronenakzeptoren für die Kettenverlängerungsreaktion dienen, hin zu mittelkettigen organischen Säuren. Die Verlängerung von kurzkettigen zu mittelkettigen organischen Säuren wird durch *M. cerevisiae* mit Hilfe der umgekehrten β Oxidation bewerkstelligt.

Eine definierte Mischkultur, basierend auf *P. pentosaceus* und *M. cerevisiae*, wurde im Pilotmaßstab kultiviert und mit der Elektrodialyse verbunden. Als Substrat wurde hierfür ein Hydrolysat aus Resten von Blumenkohl, reich an Glucose und Fructose, verwendet. Es konnten dadurch Butyrat, Valerat und Hexanoat produziert werden. Zudem konnten durch den Betrieb der Elektrodialyse inhibierende organische Säuren aus der Fermentationsbrühe entfernt werden. Nach dem Betrieb der Elektrodialyse und der Zugabe von Glucose konnte der Produktionszyklus der organischen Säuren wieder erfolgen. Final konnte dabei $6,18 \text{ g L}^{-1}$ Valerat und $0,23 \text{ g L}^{-1}$ Hexanoat generiert werden. Da auch in dieser Fermentation Essigsäure zu Beginn zugegeben wurde, um das Wachstum zu verbessern, wurde im Anschluss daran eine Fermentation durchgeführt, die aus drei Mikroorganismen, nämlich *B. coagulans*, *V. criceti* und *M. cerevisiae* besteht. Dies führte dazu, dass Acetat nur geringfügig und Propionat nicht extern zugegeben werden mussten, sondern mikrobiell erzeugt werden konnten.

Damit konnte gezeigt werden, dass die Bereitstellung dieser Elektronenakzeptoren mit Hilfe des Bakteriums *V. criceti* erfolgen kann. Die beiden gewünschten Säuren, nämlich Valerat und Caproat, wurden dabei mit Konzentrationen von $0,52 \text{ g L}^{-1}$ für Valerat und $0,20 \text{ g L}^{-1}$ für Caproat gebildet.

Schlussendlich konnte demonstriert werden, dass organische Säuren biotechnologisch erzeugt werden können und zwar ausgehend von Substraten, die aus Biomasse bestehen und im Fall von Blumenkohl als Abfallstrom behandelt werden. Der Weg über Laktat als Zwischensubstrat erwies sich als praktikabel, da die Freisetzung des Laktats durch die Zugabestrategie des Ausgangssubstrats gesteuert werden konnte. Des weiteren konnte dargelegt werden, dass eine Vielzahl von organischen Säuren ausgehend von Laktat erzielt werden kann. Durch die Flexibilität der Plattformtechnologie ist somit durch gezielte Kombination von geeigneten Bakterien die Produktpalette beeinflussbar.

Allerdings sind die erzielten Produkttiter grundsätzlich noch nicht in einem Bereich, der eine Maßstabsvergrößerung des entwickelten Prozesses in industrielle Dimensionen wirtschaftlich rechtfertigen würde. Vor allem die Produktinhibierung durch die organischen Säuren stellt hierbei das größte Hindernis dar. Zudem bedingt die Substratinhibierung durch Milchsäure eine genau Dosierung der Substratzugabe.

Ein Ansatzpunkt, um diese Inhibierungen zu vermeiden, ist das sogenannte adaptive laboratory evolution (ALE). Dabei kann durch externe Zugabe der inhibierenden Substanzen die Toleranz des Mikroorganismus gegenüber diesen erhöht werden [22]. Hierfür hält sich der experimentelle Aufwand in Grenzen, da bereits vollautomatisierte Systeme hierfür existieren [68]. Eine weitere Möglichkeit wäre das gezielte Engineering der Mikroorganismen, um auf der Ebene des Stoffwechsels Verbesserungen vorzunehmen, so dass der Produkttiter gesteigert werden kann [46]. Neben der Steigerung der Produkttiter und Ausbeuten wäre ein Schritt hin zur Anwendbarkeit zudem die Reduzierung der Nebenprodukte.

Literaturverzeichnis

- [1] M. T. Agler, B. A. Wrenn, S. H. Zinder, and L. T. Angenent. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. *Trends in Biotechnology*, 29(2):70–78, 2011.
- [2] N. Ahmadi, K. Khosravi-Darani, and A. M. Mortazavian. An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 28:67–75, 2017.
- [3] R. Alves de Oliveira, R. Schneider, C. E. Vaz Rossell, R. Maciel Filho, and J. Venus. Polymer grade l-lactic acid production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using *Bacillus coagulans*. *Bioresource Technology Reports*, 6:26–31, 2019.
- [4] L. T. Angenent, H. Richter, W. Buckel, C. M. Spirito, K. J. J. Steinbusch, C. M. Plugge, D. P. B. T. B. Strik, T. I. M. Grootsholten, C. J. N. Buisman, and H. V. M. Hamelers. Chain Elongation with Reactor Microbiomes: Open-Culture Biotechnology To Produce Biochemicals. *Environmental Science & Technology*, 50(6):2796–2810, 2016.
- [5] G. N. Baroi, I. Baumann, P. Westermann, and H. N. Gavala. Butyric acid fermentation from pretreated and hydrolysed wheat straw by an adapted *Clostridium tyrobutyricum* strain. *Microbial Biotechnology*, 8(5):874–882, 2015.
- [6] G. N. Baroi, I. V. Skiadas, P. Westermann, and H. N. Gavala. Effect of in situ acids removal on mixed glucose and xylose fermentation by *Clostridium tyrobutyricum*. *AMB Express*, 5(1):67, 2015.
- [7] J. Baruah, B. K. Nath, R. Sharma, S. Kumar, R. C. Deka, D. C. Baruah, and E. Kalita. Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products. *Frontiers in Energy Research*, 6:1, 2018.
- [8] BASF Press Release. Succinity produces first commercial quantities of biobased succinic acid, 03.03.2014.

- [9] B. C. Behera, R. Mishra, and S. Mohapatra. Microbial citric acid: Production, properties, application, and future perspectives. *Food Frontiers*, 2(1):62–76, 2021.
- [10] D. H. Boucher, S. James, and K. H. Keeler. The Ecology of Mutualism. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13(1):315–347, 1982.
- [11] J. J. Bozell and G. R. Petersen. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. *Green Chemistry*, 12(4):539, 2010.
- [12] E. M. Buque-Taboada, A. J. J. Straathof, J. J. Heijnen, and L. A. M. van der Wielen. In situ product recovery (ISPR) by crystallization: basic principles, design, and potential applications in whole-cell biocatalysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(1):1–12, 2006.
- [13] H. Chen, J. Liu, X. Chang, D. Chen, Y. Xue, P. Liu, H. Lin, and S. Han. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology*, 160:196–206, 2017.
- [14] H. Chmiel. *Bioprozesstechnik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3., neu bearb. aufl. edition, 2011.
- [15] K. Choi, B. S. Jeon, B.-C. Kim, M.-K. Oh, Y. Um, and B.-I. Sang. In situ biphasic extractive fermentation for hexanoic acid production from sucrose by *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702410. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(5):1094–1107, 2013.
- [16] J. Chun, O. Choi, and B.-I. Sang. Enhanced extraction of butyric acid under high-pressure CO₂ conditions to integrate chemical catalysis for value-added chemicals and biofuels. *Biotechnology for Biofuels*, 11:119, 2018.
- [17] J. Coral, S. G. Karp, L. Porto de Souza Vandenberghe, J. L. Parada, A. Pandey, and C. R. Soccol. Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151(2-3):333–341, 2008.
- [18] E. Cubas-Cano, C. González-Fernández, M. Ballesteros, and E. Tomás-Pejó. Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(2):290–303, 2018.
- [19] M. C. Cuellar and A. J. J. Straathof. Chapter 4. Improving Fermentation by Product Removal. In A. Górak and A. Stankiewicz, editors, *Intensification*

of *Biobased Processes*, Green Chemistry Series, pages 86–108. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2018.

- [20] D. Dietz, W. Sabra, and A.-P. Zeng. Co-cultivation of *Lactobacillus zeae* and *Veillonella criceti* for the production of propionic acid. *AMB Express*, 3(1):29, 2013.
- [21] N. A. S. Din, S. J. Lim, M. Y. Maskat, S. A. Mutalib, and N. A. M. Zaini. Lactic acid separation and recovery from fermentation broth by ion-exchange resin: A review. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), 2021.
- [22] M. Dragosits and D. Mattanovich. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*, 12:64, 2013.
- [23] M. Dusselier, P. van Wouwe, A. Dewaele, E. Makshina, and B. F. Sels. Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis. *Energy & Environmental Science*, 6(5):1415, 2013.
- [24] X. Feng, F. Chen, H. Xu, B. Wu, H. Li, S. Li, and P. Ouyang. Green and economical production of propionic acid by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 in plant fibrous-bed bioreactor. *Bioresource Technology*, 102(10):6141–6146, 2011.
- [25] X.-H. Feng, F. Chen, H. Xu, B. Wu, J. Yao, H.-J. Ying, and P.-K. Ouyang. Propionic acid fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 in a multi-point fibrous-bed bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(9):1077–1085, 2010.
- [26] G. Fuchs, H. G. Schlegel, and T. Eitinger. *Allgemeine Mikrobiologie: 53 Tabellen*. Thieme, Stuttgart, 8.Edition edition, 2007.
- [27] M. Galbe and O. Wallberg. Pretreatment for biorefineries: a review of common methods for efficient utilisation of lignocellulosic materials. *Biotechnology for Biofuels*, 12:294, 2019.
- [28] R. Glaser and J. Venus. Model-based characterisation of growth performance and l-lactic acid production with high optical purity by thermophilic *Bacillus coagulans* in a lignin-supplemented mixed substrate medium. *New Biotechnology*, 37(Pt B):180–193, 2017.
- [29] R. Glaser and J. Venus. Co-fermentation of the main sugar types from a beechwood organosolv hydrolysate by several strains of *Bacillus coagulans* results in effective lactic acid production. *Biotechnology Reports*, 18:e00245, 2018.

- [30] R. Gonzalez-Garcia, T. McCubbin, L. Navone, C. Stowers, L. Nielsen, and E. Marcellin. Microbial Propionic Acid Production. *Fermentation*, 3(2):21, 2017.
- [31] Grand View Research. Lactic Acid Market Size Worth \$9.8Bn By 2025 & PLA To Reach \$6.5Bn, 2017.
- [32] C. Groeger, W. Sabra, and A.-P. Zeng. Simultaneous production of 1,3-propanediol and n -butanol by *Clostridium pasteurianum* : In situ gas stripping and cellular metabolism. *Engineering in Life Sciences*, 16(7):664–674, 2016.
- [33] T. I. M. Grootsholten, K. J. J. Steinbusch, H. V. M. Hamelers, and C. J. N. Buisman. High rate heptanoate production from propionate and ethanol using chain elongation. *Bioresource Technology*, 136:715–718, 2013.
- [34] T. Grosskopf and O. S. Soyer. Synthetic microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 18:72–77, 2014.
- [35] M. Hingsamer and G. Jungmeier. Biorefineries. In *The Role of Bioenergy in the Bioeconomy*, pages 179–222. Elsevier, 2019.
- [36] T. Hino, K. Miyazaki, and S. Kuroda. Role of extracellular acetate in the fermentation of glucose by a ruminal bacterium, *Megasphaera elsdenii*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 37(1):121–129, 1991.
- [37] F. H. Isikgor and C. R. Becer. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, 6(25):4497–4559, 2015.
- [38] E. M. Karp, R. M. Cywar, L. P. Manker, P. O. Saboe, C. T. Nimlos, D. Salvachúa, X. Wang, B. A. Black, M. L. Reed, W. E. Michener, N. A. Rorrer, and G. T. Beckham. Post-Fermentation Recovery of Biobased Carboxylic Acids. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(11):15273–15283, 2018.
- [39] A. Keshav, K. L. Wasewar, and S. Chand. Extraction of propionic acid with tri-n-octyl amine in different diluents. *Separation and Purification Technology*, 63(1):179–183, 2008.
- [40] H. Kim, O. Choi, B. S. Jeon, W.-S. Choe, and B.-I. Sang. Impact of feedstocks and downstream processing technologies on the economics of caproic acid production in fermentation by *Megasphaera elsdenii* T81. *Bioresource Technology*, 301:122794, 2020.

- [41] L. A. Kucek, J. Xu, M. Nguyen, and L. T. Angenent. Waste Conversion into n-Caprylate and n-Caproate: Resource Recovery from Wine Lees Using Anaerobic Reactor Microbiomes and In-line Extraction. *Frontiers in Microbiology*, 7:1892, 2016.
- [42] J. Y. Law, A. W. Mohammad, Z. K. Tee, N. K. Zaman, J. M. Jahim, J. Santanaraj, and M. S. Sajab. Recovery of succinic acid from fermentation broth by forward osmosis-assisted crystallization process. *Journal of Membrane Science*, 583:139–151, 2019.
- [43] Q. Li, D. Wang, Y. Wu, W. Li, Y. Zhang, J. Xing, and Z. Su. One step recovery of succinic acid from fermentation broths by crystallization. *Separation and Purification Technology*, 72(3):294–300, 2010.
- [44] X. Li, L. Wei, Z. Wang, Y. Wang, and Z. Su. Efficient co-production of propionic acid and succinic acid by *Propionibacterium acidipropionici* using membrane separation coupled technology. *Engineering in Life Sciences*, 21(6):429–437, 2021.
- [45] R. Liguori and V. Faraco. Biological processes for advancing lignocellulosic waste biorefinery by advocating circular economy. *Bioresource Technology*, 215:13–20, 2016.
- [46] J. Liu, J. Li, H.-D. Shin, L. Liu, G. Du, and J. Chen. Protein and metabolic engineering for the production of organic acids. *Bioresource Technology*, 239:412–421, 2017.
- [47] L. Liu, Y. Zhu, J. Li, M. Wang, P. Lee, G. Du, and J. Chen. Microbial production of propionic acid from *Propionibacteria*: current state, challenges and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(4):374–381, 2012.
- [48] Y. Liu, Y.-G. Zhang, R.-B. Zhang, F. Zhang, and J. Zhu. Glycerol/glucose co-fermentation: one more proficient process to produce propionic acid by *Propionibacterium acidipropionici*. *Current Microbiology*, 62(1):152–158, 2011.
- [49] C. S. Lopez-Garzon and A. J. J. Straathof. Recovery of carboxylic acids produced by fermentation. *Biotechnology Advances*, 32(5):873–904, 2014.
- [50] J. P. Lopez-Gomez, M. Alexandri, R. Schneider, and J. Venus. A review on the current developments in continuous lactic acid fermentations and case studies utilising inexpensive raw materials. *Process Biochemistry*, 79:1–10, 2019.

- [51] J. P. Lopez-Gomez, P. Unger, R. Schneider, and J. Venus. From Upstream to Purification: Production of Lactic Acid from the Organic Fraction of Municipal Solid Waste. *Waste and Biomass Valorization*, 2020.
- [52] M. McCoy. The final chapter for succinic acid. *American Chemical Society*, 2019.
- [53] T. Melin and R. Rautenbach. *Membranverfahren: Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung*, volume 3 of *Chemische Technik/Verfahrenstechnik*. Springer, Berlin, 2007.
- [54] C. Miller, A. Fosmer, B. Rush, T. McMullin, D. Beacom, and P. Suominen. Industrial Production of Lactic Acid. In *Comprehensive Biotechnology*, pages 179–188. Elsevier, 2011.
- [55] G. Min-tian, M. Hirata, M. Koide, H. Takanashi, and T. Hano. Production of l-lactic acid by electrodialysis fermentation (EDF). *Process Biochemistry*, 39(12):1903–1907, 2004.
- [56] R. Nelson, D. Peterson, E. Karp, G. Beckham, and D. Salvachúa. Mixed Carboxylic Acid Production by *Megasphaera elsdenii* from Glucose and Lignocellulosic Hydrolysate. *Fermentation*, 3(1):10, 2017.
- [57] M. Okabe, D. Lies, S. Kanamasa, and E. Y. Park. Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(4):597–606, 2009.
- [58] A. Olszewska-Widdrat, M. Alexandri, J. P. Lopez-Gomez, R. Schneider, M. Mandl, and J. Venus. Production and Purification of l-lactic Acid in Lab and Pilot Scales Using Sweet Sorghum Juice. *Fermentation*, 5(2):36, 2019.
- [59] J. Ouyang, C. Cai, H. Chen, T. Jiang, and Z. Zheng. Efficient non-sterilized fermentation of biomass-derived xylose to lactic acid by a thermotolerant *Bacillus coagulans* NL01. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(8):2387–2397, 2012.
- [60] M. A. Patel, M. S. Ou, R. Harbrucker, H. C. Aldrich, M. L. Buszko, L. O. Ingram, and K. T. Shanmugam. Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5):3228–3235, 2006.

- [61] T. T. H. Pham, T. H. Kim, and B.-H. Um. Recovery of Acetic Acid from An Ethanol Fermentation Broth by Liquid-Liquid Extraction (LLE) Using Various Solvents. *Korean Chemical Engineering Research*, 53(6):695–702, 2015.
- [62] J. Pietzsch. *Bioökonomie im Selbststudium: Grundlagen und Ausgangspunkte*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2020.
- [63] D. Pleissner, D. Dietz, J. B. J. H. van Duuren, C. Wittmann, X. Yang, C. S. K. Lin, and J. Venus. Biotechnological Production of Organic Acids from Renewable Resources. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 166:373–410, 2019.
- [64] D. Pleissner, A.-K. Neu, K. Mehlmann, R. Schneider, G. I. Puerta-Quintero, and J. Venus. Fermentative lactic acid production from coffee pulp hydrolysate using *Bacillus coagulans* at laboratory and pilot scales. *Bioresource Technology*, 218:167–173, 2016.
- [65] O. Prado-Rubio. *Integration of bioreactor and membrane separation processes: a model based approach*. PhD thesis, Technical University of Denmark, 2010.
- [66] O. A. Prado-Rubio, S. B. Jørgensen, and G. Jonsson. Reverse Electro-Enhanced Dialysis for lactate recovery from a fermentation broth. *Journal of Membrane Science*, 374(1-2):20–32, 2011.
- [67] J. Qin, B. Zhao, X. Wang, L. Wang, B. Yu, Y. Ma, C. Ma, H. Tang, J. Sun, and P. Xu. Non-sterilized fermentative production of polymer-grade L-lactic acid by a newly isolated thermophilic strain *Bacillus sp.* 2-6. *PLOS ONE*, 4(2):e4359, 2009.
- [68] A. Radek, N. Tenhaef, M. F. Müller, C. Brüsseler, W. Wiechert, J. Marienhagen, T. Polen, and S. Noack. Miniaturized and automated adaptive laboratory evolution: Evolving *Corynebacterium glutamicum* towards an improved d-xylose utilization. *Bioresource Technology*, 245(Pt B):1377–1385, 2017.
- [69] H. Richter, B. Molitor, M. Diender, D. Z. Sousa, and L. T. Angenent. A Narrow pH Range Supports Butanol, Hexanol, and Octanol Production from Syngas in a Continuous Co-culture of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium kluyveri* with In-Line Product Extraction. *Frontiers in Microbiology*, 7:1773, 2016.

- [70] F. A. Roddick and M. L. Britz. Production of Hexanoic Acid by Free and Immobilised Cells of *Megasphaera elsdenii*: Influence of in-situ Product Removal Using Ion Exchange Resin. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 69(3):383–391, 1997.
- [71] H. A. Ruiz, M. Conrad, S.-N. Sun, A. Sanchez, G. J. M. Rocha, A. Romaní, E. Castro, A. Torres, R. M. Rodríguez-Jasso, L. P. Andrade, I. Smirnova, R.-C. Sun, and A. S. Meyer. Engineering aspects of hydrothermal pretreatment: From batch to continuous operation, scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 299:122685, 2020.
- [72] P. O. Saboe, L. P. Manker, W. E. Michener, D. J. Peterson, D. G. Brandner, S. P. Deutch, M. Kumar, R. M. Cywar, G. T. Beckham, and E. M. Karp. In situ recovery of bio-based carboxylic acids. *Green Chemistry*, 20(8):1791–1804, 2018.
- [73] W. Sabra, D. Dietz, and A. P. Zeng. Substrate-limited co-culture for efficient production of propionic acid from flour hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(13):5771–5777, 2013.
- [74] H. Sahm, G. Antranikian, K.-P. Stahmann, and R. Takors. *Industrielle Mikrobiologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013.
- [75] U.-R. Samel, W. Kohler, A. O. Gamer, U. Keuser, S.-T. Yang, Y. Jin, M. Lin, Z. Wang, and J. H. Teles. Propionic Acid and Derivatives. In *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*, pages 1–20. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2000.
- [76] M. Sauer, D. Porro, D. Mattanovich, and P. Branduardi. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in Biotechnology*, 26(2):100–108, 2008.
- [77] S. Seeliger, P. H. Janssen, and B. Schink. Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA. *FEMS Microbiology Letters*, 211(1):65–70, 2002.
- [78] R. L. Shahab, S. Brethauer, M. P. Davey, A. G. Smith, S. Vignolini, J. S. Luterbacher, and M. H. Studer. A heterogeneous microbial consortium producing short-chain fatty acids from lignocellulose. *Science*, 369(6507), 2020.
- [79] C. M. Spirito, H. Richter, K. Rabaey, A. J. M. Stams, and L. T. Angenent. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. *Current Opinion in Biotechnology*, 27:115–122, 2014.

- [80] K. J. J. Steinbusch, H. V. M. Hamelers, C. M. Plugge, and C. J. N. Buisman. Biological formation of caproate and caprylate from acetate: fuel and chemical production from low grade biomass. *Energy & Environmental Science*, 4(1):216–224, 2011.
- [81] A. Straathof. The Proportion of Downstream Costs in Fermentative Production Processes. In *Comprehensive Biotechnology*, pages 811–814. Elsevier, 2011.
- [82] F. Su and P. Xu. Genomic analysis of thermophilic *Bacillus coagulans* strains: efficient producers for platform bio-chemicals. *Scientific Reports*, 4:3926, 2014.
- [83] S. Takkellapati, T. Li, and M. A. Gonzalez. An Overview of Biorefinery Derived Platform Chemicals from a Cellulose and Hemicellulose Biorefinery. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20(7):1615–1630, 2018.
- [84] L. Wang, B. Zhao, B. Liu, B. Yu, C. Ma, F. Su, D. Hua, Q. Li, Y. Ma, and P. Xu. Efficient production of L-lactic acid from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production, by a newly isolated xylose utilizing *Bacillus sp.* strain. *Bioresource Technology*, 101(20):7908–7915, 2010.
- [85] Z. Wang, J. Sun, A. Zhang, and S.-T. Yang. Propionic Acid Fermentation. In S.-T. Yang, H. A. El-Enshasy, and N. Thongchul, editors, *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*, volume 47, pages 331–350. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 2013.
- [86] D. B. Wilson, H. Sahm, K.-P. Stahmann, and M. Koffas. *Industrial microbiology*. Wiley-VCH, Weinheim, 2020.
- [87] J. M. Woodley, M. Bisschops, A. J. J. Straathof, and M. Ottens. Future directions for in-situ product removal (ISPR). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83(2):121–123, 2008.
- [88] T. Yamane and R. Tanaka. Highly accumulative production of L(+)-lactate from glucose by crystallization fermentation with immobilized *Rhizopus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(1):90–95, 2013.
- [89] L. Ye, M. S. B. Hudari, Z. Li, and J. C. Wu. Simultaneous detoxification, saccharification and co-fermentation of oil palm empty fruit bunch hydrolysate for l-lactic acid production by *Bacillus coagulans* JI12. *Biochemical Engineering Journal*, 83:16–21, 2014.

- [90] L. Ye, X. Zhou, M. S. B. Hudari, Z. Li, and J. C. Wu. Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. *Bioresource Technology*, 132:38–44, 2013.
- [91] A. Zhang and S.-T. Yang. Engineering *Propionibacterium acidipropionici* for enhanced propionic acid tolerance and fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(4):766–773, 2009.
- [92] C. Zhang, C. Zhou, N. Assavasirijinda, B. Yu, L. Wang, and Y. Ma. Non-sterilized fermentation of high optically pure D-lactic acid by a genetically modified thermophilic *Bacillus coagulans* strain. *Microbial Cell Factories*, 16(1):213, 2017.
- [93] Y. Zhang, X. Chen, J. Luo, B. Qi, and Y. Wan. An efficient process for lactic acid production from wheat straw by a newly isolated *Bacillus coagulans* strain IPE22. *Bioresource Technology*, 158:396–399, 2014.
- [94] X. Zhu, Y. Tao, C. Liang, X. Li, N. Wei, W. Zhang, Y. Zhou, Y. Yang, and T. Bo. The synthesis of n-caproate from lactate: a new efficient process for medium-chain carboxylates production. *Scientific Reports*, 5:14360, 2015.

Abbildungsverzeichnis

3.1	Allgemeines Schema für das <i>Downstream processing</i> zur Gewinnung von organischen Säuren aus Fermentationsbrühe	7
3.2	Schema der Extraktion	8
3.3	Struktur von TOA	9
3.4	Reppe Prozess zur Gewinnung von Propionsäure	11
3.5	Oxidation von Propionaldehyd zur Propionsäuregewinnung . .	12
3.6	Methyl-Malonyl-Stoffwechselweg (adaptiert nach [26])	14
3.7	Fermentationsschema der Laktatplattform zur Produktion von Propionsäure	16
3.8	Homofermentativer Abbau von Hexosen zu Laktat (adaptiert nach [26])	19
3.9	Schema der der Aufspaltung von Lignocellulose in die Grundbausteine	20
3.10	Mechanismus der Kettenverlängerung (vereinfacht nach [79]) . .	22
3.11	Operationsarten von ISPR (adaptiert nach [87])	24
3.12	Schema der Entsalzung mittels Elektrodialyse (AEX: Anionentauschermembran, CEX: Kationentauschermembran)	25
3.13	Aufbau der modifizierten Elektrodialyse (AEX: Anionentauschermembranen, CEM: Endständige Kationentauschermembran, Na_2SO_4 : Elektrodenspülung, NaOH: Natriumhydroxid)	27
3.14	Änderung der Flussrichtung der einwertigen Ionen, induziert durch einen Polaritätswechsel (Fer: Fermentationsbrühe; NaOH: Natriumhydroxidlösung; AEX: Anionentauschermembran)	28
3.15	Phasen des bakteriellen Zellwachstums	29
3.16	Schematische Darstellung der Zu- und Abläufe einer Satz- oder fed-batch Kultur. (Die grün gefärbten Symbole sind nur bei einer fed-batch Fermentation gültig.)	31
4.1	Kopplung von Bioreaktor und Elektrodialyse 1) Elektrodialyse Einheit 2) NaOH Reservoir 3) Probenahmeventil 4) pH Sensor .	41
5.1	Produktivität und Energiebedarf einer synthetischen Lösung mit 5 g L^{-1} Propionat	46

5.2	Auswirkung der NaOH Konzentration auf die Stromausbeute auf die Entsalzung einer synthetischen Lösung mit 5 g L ⁻¹ Propionat	47
5.3	Vergleich zwischen Donnan Dialyse (DD) und reversed electro-enhanced dialysis (REED) mit synthetischer Propionatlösung . .	48
5.4	Vergleich zwischen vier organischen Säuren und deren Entfernung	49
5.5	Entsalzung einer beendeten Laktatfermentation bei einer Stromdichte von 200 A m ⁻²	50
5.6	Entsalzung einer beendeten Mischkultur aus <i>B. coagulans</i> und <i>V. criceti</i> bei einer Stromdichte von 200 A m ⁻²	51
5.7	Fermentation zu Laktat aus Glucose mit <i>B. coagulans</i> im Satzverfahren	53
5.8	Laktatproduktion aus Glucose mittels <i>B. coagulans</i> . Zu den Zeitpunkten, die durch die schwarzen Pfeile markiert werden, wurde Glucose in den Reaktor eingebracht.	54
5.9	Laktatproduktion aus Xylose mittels <i>B. coagulans</i>	55
5.10	Laktatproduktion aus Xylose und Glucose mittels <i>B. coagulans</i> . Die schwarzen Pfeile symbolisieren die Zeitpunkte zu denen Glucose zusätzlich in den Reaktor eingebracht wurde.	56
5.11	Inhibierung von <i>V. criceti</i> durch Laktat	59
5.12	Propionatproduktion ausgehend von Laktat im Satzverfahren mit <i>V. criceti</i>	60
5.13	Propionatproduktion aus Laktat mit <i>V. criceti</i> . Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Zugabe von zusätzlichem Laktat . . .	61
5.14	A: Fed-Batch Fermentation mit Kaliumlaktat als Feedlösung B: zugegebenes Volumen an Kaliumlaktat mit der korrespondierenden Pumprate	63
5.15	A: Fed-Batch Fermentation mit substrathaltiger Fermentationsbrühe als Feedlösung B: zugegebenes Volumen sowie Pumprate der substrathaltigen Fermentationsbrühe	65
5.16	A: Konzentrationsverläufe von Laktat, Propionat und Acetat im Reaktionsmedium. Die vertikalen gestrichelten Linien begrenzen die Dauer der aktivierten Elektrodialyse, die mit einem Wechselintervall von 1 min und 200 A m ⁻² betrieben wurde. B: Konzentrationsverlauf von Propionat und Acetat im NaOH Kompartiment der Elektrodialyse	68
5.17	Mischkultur aus <i>B. coagulans</i> und <i>V. criceti</i> mit Glucose als Substrat. Die roten Pfeile geben die Zeitpunkte der Zugabe von Glucose an. Der schwarze Pfeil zeigt die Zugabe von <i>V. criceti</i> in den Reaktor an.	72

5.18	Fermentation von <i>B. coagulans</i> und <i>V. criceti</i> mit Glucose als Substrat und gekoppelter Elektrodialyse. Diagramm A : Konzentrationsverläufe innerhalb des Fermentationsmediums. Die roten Pfeile geben die Zeitpunkte der Glucosezugabe im Anschluss an das jeweilige Elektrodialyseintervall (gestrichelte Linien) Diagramm B : Konzentrationsverläufe im NaOH Kompartiment der Elektrodialyse	74
5.19	Fermentation einer Mischkultur von <i>V. criceti</i> (Zugabe nach 10 h) und <i>B. coagulans</i> mit Glucose als Substrat und gekoppelter Elektrodialyse. Diagramm A : Konzentrationsverläufe innerhalb des Reaktionsmediums. Die roten Pfeile markieren die Zeitpunkte der Glucosezugabe. Diagramm B : Konzentrationsverläufe innerhalb des NaOH Kompartiments der Elektrodialyse.	75
5.20	Fermentation mit gekoppelte Elektrodialyse einer Mischkultur von <i>B. coagulans</i> und <i>V. criceti</i> mit einem glucosereichen Biomassehydrolysat. Diagramm A : Verläufe der jeweiligen Konzentrationen innerhalb des Reaktionsmediums. Die roten Pfeile geben die Zeitpunkte der Zugabe des glucosereichen Biomassehydrolyrats an. Die Elektrodialyse wurde innerhalb des Zeitintervalls markiert durch die gestrichelten Linien aktiviert. Diagramm B : Konzentrationsverläufe der organischen Säuren im NaOH Kompartiment der Elektrodialyse	78
5.21	Fermentation eines Mischsubstrats aus Glucose und Xylose mittels <i>B. coagulans</i> und <i>V. criceti</i> . Die roten Pfeile geben die Zeitpunkte an, bei denen ein Gemisch aus Glucose und Xylose wieder in den Reaktor eingebracht wurde. <i>V. criceti</i> wurde zu Beginn der Fermentation in den Reaktor gegeben. Abbildung A : Konzentrationsverläufe der Substrate Glucose und Xylose innerhalb des Reaktionsmediums Abbildung B : Konzentrationsverläufe der gebildeten organischen Säuren innerhalb des Reaktionsmediums Abbildung C : Konzentrationsverlauf der entfernten organischen Säuren im NaOH Kompartiment der REED	79
5.22	Spezifischer Energiebedarf des jeweiligen Elektrodialysedurchgangs aus Abbildung 5.21	81
5.23	Verläufe des Widerstandes der vier Elektrodialysevorgänge aus Abbildung 5.21	82
5.24	Kultivierung von <i>B. coagulans</i> mit einem glucosereichen Hydrolysat aus lignocellulosebasierter Biomasse zur Produktion von Laktat. Die schwarzen Pfeile repräsentieren die Zeitpunkte der pulsartigen Zugabe des Hydrolyrats in den Reaktionsraum	85

5.25	Kultivierung von <i>B. coagulans</i> und <i>V. criceti</i> mit einem glucosereichen Hydrolysat aus lignocellulosebasierter Biomasse zur Produktion von Propionat mittels Laktat als Zwischensubstrat. Der blaue gestrichelte Pfeil zeigt die Zugabe von <i>V. criceti</i> an. Die schwarzen Pfeile die pulsartige Zugabe des Hydrolysats in den Reaktionsraum.	86
5.26	Kultivierung von <i>B. coagulans</i> zur Laktatgewinnung aus einem xylosereichen Biomassehydrolysat. Der schwarze Pfeil gibt den Zeitpunkt der zusätzlichen Substratzugabe an.	87
5.27	Kultivierung von <i>B. coagulans</i> und <i>V. criceti</i> mit einem xylosereichen Hydrolysat aus lignocellulosebasierter Biomasse. Die Zugabe von <i>V. criceti</i> erfolgte nach 30 h (blauer Pfeil) sowie die zusätzliche Zugabe des Xylosehydrolysats bei 47 h (schwarzer Pfeil).	89
5.28	Simultane Verzuckerung und Fermentation einer Oligomerlösung aus Xylosemonomeren mittels <i>B. coagulans</i> und <i>V. criceti</i> . Die Zugabe von <i>V. criceti</i> erfolgte nach 30 h (schwarzer Pfeil). Die zusätzliche Zugabe an Oligomerlösung erfolgte nach 47 h (blauer Pfeil).	90
5.29	Ausgefallener Feststoff nach enzymatischer Hydrolyse der Oligomerlösung aus Hemicellulose	91
5.30	Mischkultur aus <i>B. coagulans</i> und <i>M. cerevisiae</i> mit Glucose als Substrat. Diagramm A : Konzentrationsverlauf von Glucose und Laktat im Reaktionsmedium. Der rote Pfeil gibt den Zeitpunkt an, an welchem zusätzlich Glucose in das Fermentationsmedium gegeben wurde. Diagramm B : Konzentrationsverläufe der organischen Säuren. Der orange Pfeil gibt den Zeitpunkt an, zu welchem zusätzlich Acetat in den Reaktor eingebracht wurde.	95
5.31	Mischkultur aus <i>B. coagulans</i> und <i>M. cerevisiae</i> mit Glucose aus Fichtenholz als Substrat. Diagramm A : Konzentrationsverläufe von Glucose und Laktat innerhalb des Reaktors. Die roten Pfeile markieren die Zeitpunkte der Zugabe von zusätzlichem Biomassehydrolysat. Diagramm B : Konzentrationsverläufe der organischen Säuren innerhalb des Reaktors. Die schwarzen Pfeile geben die Zeitpunkte der zusätzlichen Zugabe eines Gemisches aus Propionat und Acetat an.	97
5.32	Mischkultur aus <i>B. coagulans</i> , <i>V. criceti</i> und <i>M. cerevisiae</i> mit Glucose als Substrat. Diagramm A : Glucose- und Laktatkonzentration innerhalb des Reaktionsmediums. Diagramm B : Konzentrationsverläufe der organischen Säuren innerhalb des Bioreaktors.	99

5.33	Mischkultur von <i>P. pentosaceus</i> und <i>M. cerevisiae</i> mit Glucose und Fructose aus enzymatischer Hydrolyse von Blumenkohl. Diagramm A : Konzentrationsverläufe der Substrate und des Zwischensubstrats. Der rote Pfeil markiert den Zeitpunkt der zusätzlichen Glucosezugabe. Diagramm B : Konzentrationsverläufe der gebildeten organischen Säuren.	100
5.34	Prozentuale Verteilung (w/w) der produzierten organischen Säuren	102
5.35	Konzentrationsverläufe der entfernten organischen Säuren im NaOH Kompartiment während des Betriebs der Elektrodialyse	103
5.36	Verlauf des Widerstandes des Elektrodialysestacks während des Betriebs der REED	104

Tabellenverzeichnis

3.1	Biotechnologische Produktion organischer Säuren im industriellen Maßstab	6
3.2	Aufarbeitung biotechnologisch erzeugter organischer Säuren . . .	10
3.3	Eigenschaften von Propionsäure	11
4.1	RCM Medium	36
4.2	<i>Veillonella</i> Medium	36
4.3	<i>Veillonella</i> Vitaminlösung	37
4.4	Mischkultur Medium	37
4.5	<i>Megasphaera</i> Medium	37
4.6	<i>Pediococcus</i> Medium	38
4.7	Scale-Up Medium	38
4.8	Vitaminlösung Scale-Up	38
4.9	Salzlösung	39
5.1	Ergebnisse der Laktatfermentation	57
5.2	Parameter der Monokultur von <i>V. criceti</i> . Ausbeute und Produktivität sind bezogen auf Propionat angegeben. (Fer: laktathaltige Fermentationsbrühe)	67
5.3	Zusammenfassung der Produktivitäten der Endprodukte der Untersuchungen zur Produktion mittelkettiger Säuren in Mischkultur	105

Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit sind in den folgenden Publikation veröffentlicht worden:

- Selder, L., Sabra, W., Jürgensen, N., Lakshmanan A., Zeng A.-P. Co-cultures with integrated in situ product removal for lactate-based propionic acid production. *Bioprocess Biosyst Eng* 43, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02300-0>
- Selder, L., Wang, W., Groeger, C., Sabra, W., Zeng, A.-P., 2021. Bioconversion and downstream processing in the context of biorefinery: principles and process examples. In: M. Aresta et al. (ed.) *Biorefineries*. De Gruyter Graduate
- Selder, L., Vuoristo, K., Turunen, R., Uusitalo, J., Zeng, A.-P. Volatile and medium chain fatty acid production from cabbage residues using mixed culture fermentations and in-situ product removal by electro dialysis. *Bioresource Technology Reports* 16, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100828>