

Lehrstuhl für Fluidverfahrenstechnik der
Technischen Universität München

Fermentation mit In-situ-Extraktion und In-situ-Elektroextraktion

Martin C. Klose

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines

Doktor-Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. D. Weuster-Botz

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dr.-Ing.habil. J. Stichtmair
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. W. Staudenbauer

Die Dissertation wurde am 19.10.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 06.12.2000 angenommen.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Fluidverfahrenstechnik der Technischen Universität München.

Mein herzlichster Dank gebührt meinem Lehrer und Doktorvater Herrn Prof. Dr.-Ing. J. Stichlmair. Seine engagierte Betreuung, das Schaffen von idealen Arbeitsbedingungen, die Gewährung von großen Freiräumen und das mir stets entgegengebrachte Vertrauen förderten meine Arbeit sehr stark.

Herrn Prof. Dr.-Ing. E. Blaß und Herrn Dr.-Ing. C. Weinhhammer danke ich für die intensive Einführung in das Arbeitsgebiet Fermentation mit thermophilen Clostridien.

Herrn Prof. W. Staudenbauer danke ich für die Übernahme des Korreferates. Er und seine Mitarbeiter am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München, Herr Dr. M. Mayer, Frau Dr. A. van Rinsum, Frau Dr. K. Bronnenmeier und Herr Dr. W. Schwarz, unterstützten und berieten mich umfassend in mikrobiellen Fragen.

Herrn Prof. Dr.-Ing. D. Weuster-Botz danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Herrn Prof. Dr. L. Bachmann danke ich für die Herstellung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Frau D. Styrnik, Frau H. Gross und Frau S. Dosch danke ich für die präzisen und umfangreichen analytischen Arbeiten im Labor, Frau R. Majewski für die Bearbeitung vieler Verwaltungsaufgaben. Mein Dank gilt Herrn S. Buhlmann, Herrn P. Buchbauer, Herrn A. Kolbe, Herrn L. Poller, Herrn L. Hinterneder, Herrn W. Papzien-Kahl und Herrn P. Hocke für Ihre Unterstützung und Durchführung von zahlreichen Planungs-, Umbau- und Reparaturarbeiten an meiner Versuchsanlage.

Mein besonderer Dank gilt meinen Semestranten und Diplomanden sowie studentischen Hilfskräften, die wesentlich zum Fortschritt meiner Arbeit beitrugen: Herrn R. Biedermann, Herrn J. Feigl, Herrn S. Högenauer, Herrn C. Steinbrecher, Herrn C. Ebi, Herrn K. Erhard, Herrn R. Häberle, Frau U. Haber, Frau S. Bauer, Herrn U. Gmach, Frau I. Heidgen und Frau S. Fedrau.

Bei meinen Kollegen möchte ich mich herzlichst für das angenehme, kooperative Arbeitsklima am Lehrstuhl bedanken, das sehr zum Gelingen meiner Arbeit beitrug.

München, im Januar 2001

Martin Klose

Meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Problemstellung	2
1.2	Ziel der Arbeit	3
2	Stand des Wissens	5
2.1	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	5
2.2	Integrierte biotechnologische Prozesse	9
2.2.1	Rückgewinnung von Alkoholen	9
2.2.2	Rückgewinnung von Carbonsäuren	12
2.3	Elektroextraktion	15
3	Experimentelle Untersuchungen	21
3.1	Das Lösungsmittel	21
3.2	Fermentationen mit <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	24
3.2.1	Vorkulturen und Medien	24
3.2.2	Immobilisierung	25
3.2.3	Kontinuierliche Fermentationen mit In-situ-Extraktion und In-situ-Elektroextraktion	27
3.2.4	Probleme bei der Versuchsdurchführung	38
3.3	Konzentrationsbestimmungen	42
3.3.1	Messung der optischen Dichte	42
3.3.2	Bestimmung der Zelltrockenmasse	43
3.3.3	Bestimmung der Produktkonzentrationen mit HPLC	43

3.3.4	Bestimmung der Stärkekonzentrationen	47
4	Ergebnisse	49
4.1	Immobilisierung	49
4.2	Kontinuierliche Fermentationen	53
4.3	Mathematische Modellierung	57
4.4	In-situ-Extraktion und In-situ-Elektroextraktion	62
5	Zusammenfassung	75
6	Literaturverzeichnis	78
7	Anhang	88

Formelzeichen

Basiszeichen

a	Koeffizient	l/g
b	Konstante	-
c	Konzentration	g/l, 1/l
d	Schichtdicke	cm
e	Elementarladung	A·s
E	elektrisches Feld	V/cm
E	Extinktion	-
F	Kraft	N
I	Intensität des Lichtes	W/m ²
k	Koeffizient	-
K	Gleichgewichtskonstante	-
\tilde{M}	Molare Masse	g/mol
n	Anzahl	-
N	Stoffmenge	mol
\dot{N}	Stoffmengenstrom	mol/d
OD	optische Dichte	-
Q	elektrische Ladung	A·s
r	Radius	m
s	Abstand	cm
s	Steigung	-
t	Zeit	d
U	elektrische Spannung	V
v	Geschwindigkeit	m/s

v	Probenvolumen	ml
V	Volumen	l, ml
\dot{V}	Volumenstrom	l/d
x	Abszisse	-
y	Ordinate	-

Griechische Formelzeichen

Δ	Differenz	-
ε	Extinktionskoeffizient	l/(mmol·cm)
η	dynamische Viskosität	kg/(m·s)
π	Kreiszahl	-

Kopfzeiger

+	positives Ion
-	negatives Ion

Indices

A	Ablauf
aus	austretend
C	Coulomb
C	Kohlenstoff
e	Elementarladung
ein	eintretend
F	Fermenter
gS	Konzentration an Stärke
gT	Konzentration an Tryptone
gY	Konzentration an Yeast Extract
G	Glucose
KOH	Kalilauge
0	Standardbedingungen
R	Reibung
S	Säuredissoziation, Substrat

T Tryptone

Y Yeast Extract

1 Einleitung

Seit Mitte der siebziger Jahre hat die Biotechnologie durch die Gentechnik einen großen Aufschwung genommen und gilt als Schlüsseltechnologie für Landwirtschaft, Lebensmittelindustrie, Medizin, Pharmazie, Energiewirtschaft und Umweltschutz. Mit Hilfe der Mikrobiologie, der Biochemie und der Ingenieurwissenschaften untersucht die Biotechnologie biologische Systeme, vor allem Mikroorganismen, um technische Verfahren zur Produktion von Zell- und Gewebekulturen (Biomasse), Zellinhaltsstoffe (z. B. Enzyme), Zellprodukten (z. B. Alkohole, Antibiotika) sowie zum Schadstoffabbau (z. B. Kläranlagen) zu entwickeln. Die Verfahrenstechnik biotechnischer Prozesse wird als Bioverfahrenstechnik bezeichnet. Sie umfaßt die Gebiete Verfahrenstechnik der Stoffgewinnung (Substratvorbereitung, Stoffumwandlung, Produktisolierung) und des Umweltschutzes (Abwasser, Abluft, Boden). In beiden Gebieten geschieht die Stoffumwandlung auf biologischem Weg. Während bei der Stoffgewinnung Wertstoffe hergestellt werden, ist das Ziel des Umweltschutzes der Abbau von Schadstoffen oder deren Umwandlung in umweltverträgliche Substanzen. Bioprozesse erfordern im Vergleich zu Chemieprozessen komplexe Betriebsbedingungen, weil Abbau- und Aufbauvorgänge simultan im gleichen Reaktor, eigentlich in der Zelle, ablaufen und es sich meist um Mehrstufenprozesse handelt, die eine hohe Komplexität aufweisen. Daher kann die Biologie auch Produkte liefern, die über chemische Verfahren nicht herstellbar sind.

Chemieprozesse laufen in der Regel bei hohen Konzentrationen und Drücken in einem weiten Temperaturbereich von $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $1200\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei extremen pH-Werten ab, so daß hohe Reaktionsgeschwindigkeiten realisiert werden können. Lange Katalysatorstandzeiten von Monaten bzw. Jahren und hohe Selektivitäten

ermöglichen den Einsatz kleiner, kompakter, geschlossener Reaktoren mit hoher Leistung. Im Gegensatz dazu laufen Bioprozesse in verdünnten, wäßrigen Lösungen (Wasser > 90 %) unter milden Bedingungen (pH 3 bis 8, 15 bis 40 °C) bei geringer Selektivität ab. Die Reaktionsgeschwindigkeiten sind deswegen niedrig, wodurch großvolumige Reaktoren mit geschlossener, monoseptischer Arbeitsweise eingesetzt werden müssen. In der Chemie werden Massenprodukte kontinuierlich, Spezialitäten diskontinuierlich hergestellt, während in der Biologie die diskontinuierliche Betriebsführung von Rührkesseln vorherrscht. Die Hauptursachen dafür sind das Auftreten mikrobieller Infektionen und die begrenzte Stabilität von Hochleistungsstämmen (*Deckwer 1988*).

1.1 Problemstellung

Biotechnologische Prozesse mit kontinuierlicher Betriebsführung weisen eine Reihe von Vorteilen gegenüber absatzweise geführten Bioprocessen auf. So lassen sich beispielsweise Arbeits- und Energiekosten reduzieren, und es kann eine einheitlichere Produktqualität erzielt werden. Aufgrund von optimierten Steriltechniken und besserem Verstehen der biochemischen Abbau- und Aufbauwege sowie deren regulatorischen Mechanismen ergeben sich bei Einsatz verbesserter Prozeßführungsstrategien und Bioreaktorautomatisierung höhere Substratausnutzung, höhere Selektivitäten und höhere Produktivitäten. Das komplexe Aufarbeiten der Kulturmedien ist meist nur bei kontinuierlichem Betrieb wirtschaftlich, insbesondere dann, wenn Massengüter produziert werden sollen.

Wenn eine kontinuierliche Prozeßführung angestrebt wird, ist die Immobilisierung von Biomasse im Reaktor oder die Zellrückführung in den Reaktor besonders effektiv und sinnvoll, weil damit höhere Produktivitäten und kleine Verweilzeiten realisiert werden können.

Das Zellwachstum oder die Produktbildung werden oft durch das Produkt selbst oder durch Nebenprodukte inhibiert. Die primären Metabolite wirken in unter-

schiedlicher Weise hemmend auf den bakteriellen Stoffwechsel. Die Zellen produzieren Alkohole und geben sie an ihr Umgebungsmilieu ab. Nach Überschreiten einer charakteristischen Alkoholkonzentration in der Fermentationsbrühe tritt die Lyse der Zellen ein: Die Zellen lösen sich nach Zerstörung der Zellmembran auf. Auch die Carbonsäuren werden als Stoffwechselendprodukte aus der Zelle geschleust. Falls die Konzentration der physiologisch wirksamen, undissoziierten Säuren außerhalb der Zellen zu hoch ist, werden die gebildeten Carbonsäuren nicht mehr ausgeschieden. Sie verbleiben in der Zelle und stören den intracellulären pH-Wert. Es tritt Selbsttötung ein.

In solchen Fällen der Produkthemmung müssen die Produkte dem Fermentationsprozeß entzogen werden. Dies kann durch Integration von Aufarbeitungsschritten in den Reaktor erfolgen. Für das Entfernen von Produkten aus dem Kultivierungsmedium und ihre Rückgewinnung während der Produktbildung eignen sich z. B. die folgenden Verfahren: Dialyse, Umkehrosmose, Ultrafiltration, Pervaporation, Extraktion, Adsorption, Entspannungsverdampfung, Verdampfung im Vakuum, Abstreifen mit einem Trägergas, Fällung, Elektrodialyse, Ionenaustausch, Kristallisation, Flotation (*Schügerl et al. 1994a*).

1.2 Ziel der Arbeit

Bei vielen Fermentationen inhibieren die Produkte den Stoffwechsel der eingesetzten Mikroorganismen. Werden die hemmenden Produkte aus der Fermenterbrühe abgetrennt, so kann die Stoffwechseltätigkeit aufrechterhalten werden. Eine Möglichkeit zur kontinuierlichen Produktabtrennung ist die In-situ-Extraktion. Um zu verallgemeinerungsfähigen Ergebnissen über die Leistungsfähigkeit der In-situ-Extraktion zu gelangen, soll dieses prozeßintegrierte Verfahren der Produktabtrennung auf die Butanol-Ethanol-Fermentation mit dem thermophilen, strikt anaeroben Mikroorganismus *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* angewendet werden. Lösliche Stärke als Substrat wird in einem kontinuierlichen Einstufenprozeß direkt in Lösungsmittel umgesetzt. Der Einsatz

von Stärke in kontinuierlichen Fermentationen ist aufgrund ihrer im Vergleich zu Glucose geringeren Löslichkeit und höheren Viskosität problematisch. Während der Fermentationen sollen mit einem geeigneten Extraktionsmittel die beiden Stoffwechselprodukte Ethanol und n-Butanol abgetrennt werden. Zusätzlich werden durch ein elektrisches Gleichspannungsfeld, dessen Feldlinien senkrecht zur Flüssig/Flüssig-Phasengrenze gerichtet sind, die ionogenen Stoffwechselprodukte Milchsäure, Essigsäure, und Buttersäure verstärkt extrahiert. Ziel der Arbeit ist die gleichzeitige Abtrennung der produktinhibierenden Alkohole und Säuren aus den Fermentationsbrühen mittels Extraktion bzw. Elektroextraktion sowie die Untersuchung der Auswirkungen dieser Abtrennung auf den Stoffwechsel von *T. thermosaccharolyticum*.

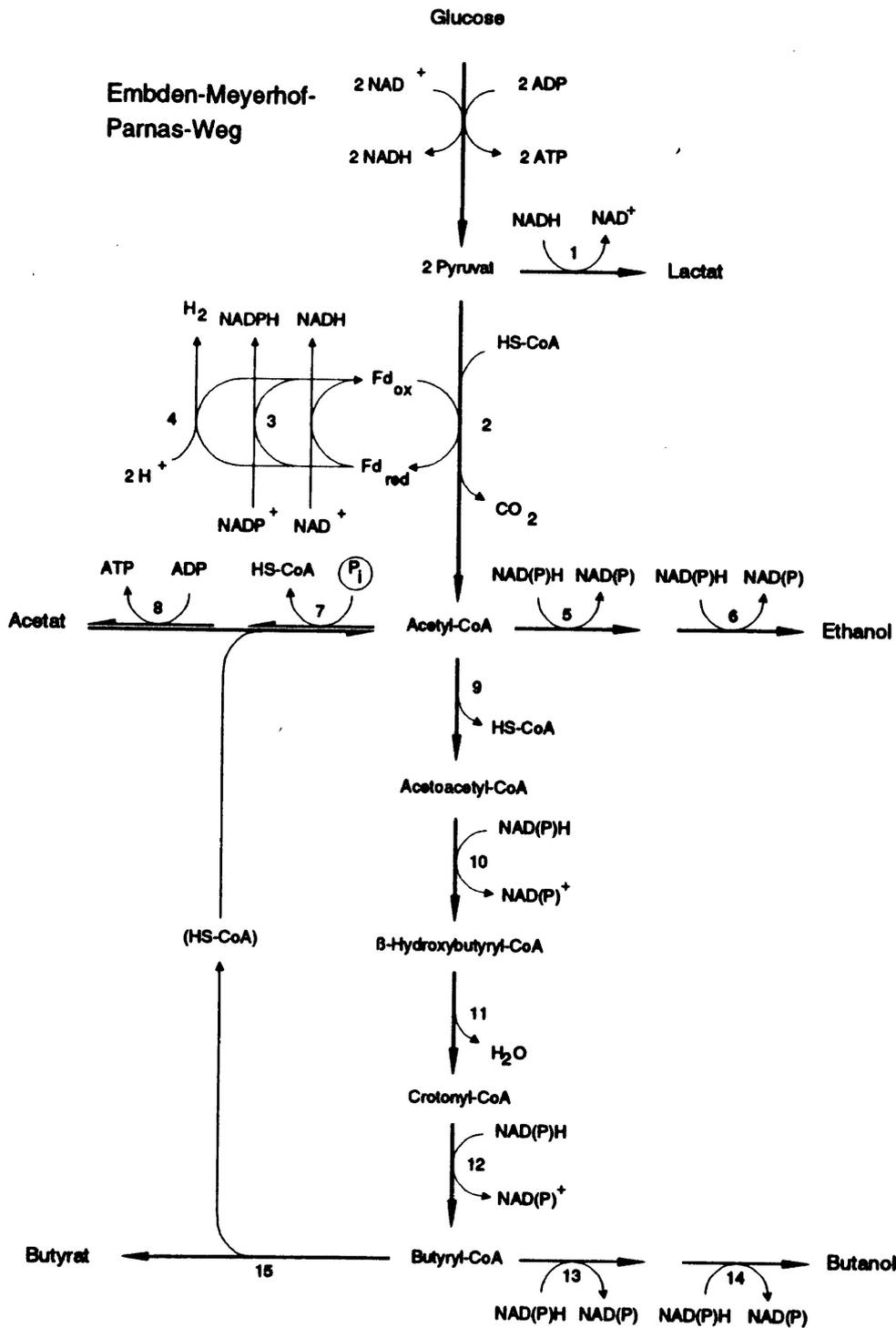
2 Stand des Wissens

2.1 *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*

Clostridien sind strikt anaerobe bis nahezu aerotolerante Bakterien, die im Boden, im Wasser, auf Pflanzen und in Lebensmitteln sowie als Kommensalen im Darm von Menschen und Tieren zu finden sind. Sie vergären zahlreiche organische Substrate und werden daher nach der Art der genutzten Elektronendonatoren in Subgruppen wie saccharolytisch und proteolytisch eingeteilt. Die Clostridien sind meist Gram-positiv und durch peritrich angeordnete Geißeln gut beweglich. Die vegetativen Zellen sind stäbchenförmig, ihre Gestalt ist jedoch variabel und wird maßgeblich von den Milieubedingungen bestimmt. Die thermoresistenten Endosporen sind oval oder kugelförmig. Momentan existieren mehr als 100 Arten, von denen nur wenige als humanpathogen (Wundstarrkrampf, Gasbrand, Botulismus) gelten (Scheinert 1996). Bestimmte Clostridienarten werden schon seit langem industriell zur Gewinnung organischer Lösungsmittel genutzt. *Clostridium acetobutylicum* kann die Substrate Glucose, Glycerin und Pyruvat zu den Gärprodukten Butyrat, Acetat, n-Butanol, 2-Propanol, Ethanol, Kohlendioxid und Wasserstoff umsetzen (Foerst 1953). Die für das Wachstum optimale Temperatur der meisten bekannten Clostridien liegt im Bereich von 30 bis 40 °C. Neben diesen mesophilen Vertretern gibt es unter den Clostridien viele thermophile Arten, deren Temperaturoptimum zwischen 60 und 75 °C liegt. Als Beispiele seien genannt: *Clostridium thermoaceticum*, *Clostridium thermohydrosulfuricum* und *Clostridium thermosaccharolyticum* (Schlegel 1992).

In der neu definierten Familie der *Thermoanaerobacteriaceae* gehört *Clostridium thermosaccharolyticum* in die Gattung *Thermoanaerobacterium*. Die Umgruppie-

rung der *Clostridien* führte zur Umbenennung von *Clostridium thermosaccharolyticum* in *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (van Rinsum 1999). Im Rahmen dieser Arbeit werden alle Untersuchungen mit dem Stamm DSM 571 (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen) durchgeführt. Die Zellen des strikt anaeroben Mikroorganismus besitzen einen niedrigen GC-Gehalt (Guanin, Cytosin) von 29 bis 32 Mol-%, sind Gram-positiv und durch peritriche Geißeln beweglich. Sie haben eine Größe von 0,4 bis 0,7 µm x 2,4 bis 16 µm und treten einzeln oder in Paaren auf. Die ovalen oder runden Endosporen sind 1,3 bis 1,5 µm groß, das Optimum für die Sporulation befindet sich bei pH-Wert 5,0 bis 5,5. Das Temperaturoptimum für das Wachstum liegt zwischen 55 und 62 °C (Sneath 1986). *T. thermosaccharolyticum* wächst sowohl auf synthetischen Medien (Baskaran et al. 1995b, Mayer 1995), als auch auf Komplexmedien, die z.B. auf Hefe- und Fleischextrakt basieren. Bei den Produkten des Metabolismus in Zellbrühen handelt es sich im Wesentlichen um Pyruvat (Lee und Ordal 1967), das anschließend zu Milchsäure, Essigsäure, Buttersäure, Ethanol, n-Butanol, Kohlendioxid und Wasserstoff umgesetzt wird (Sánchez-Riera et al. 1987). Der Stoffwechsel ist in **Abb. 2-1** dargestellt (Mayer 1995).



1, Lactat Dehydrogenase; 2, Pyruvat: Ferredoxin-Oxidoreduktase; 3, Ferredoxin: NAD(P)-Oxidoreduktase; 4, Hydrogenase; 5/13, Aldehyd Dehydrogenase; 6/14, Alkohol Dehydrogenase; 7, Phosphotransacetylase; 8, Acetat Kinase; 9, Thiolase; 10, β-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase; 11, Crotonase; 12, Butyryl-CoA Dehydrogenase; 15, Butyryl-CoA: Acetat-CoA-Transferase

Abb. 2-1: Gärungsstoffwechsel von *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (Mayer 1995)

Kohlenstoffquellen, die α -glucosidische Bindungen enthalten, wie z. B. Stärke, führen zu den höchsten Ethanol-Konzentrationen (Landuyt und Hsu 1985, Mistry und Cooney 1985a, b). *T. thermosaccharolyticum* ist das einzig bisher bekannte thermoanaerobe Bakterium, das nennenswerte Mengen an n-Butanol produzieren kann. Exoenzyme hydrolisieren die Poly- und Oligosaccharide zu Hexosen, die durch die Zellwand geschleust werden und über den Fructose-1,6-bisphosphatweg zu den Endprodukten umgesetzt werden. Es werden aber auch Pentosen, wie z. B. Xylose, verstoffwechselt (Hill et al. 1995), wobei Glucose zuerst genutzt wird, wenn Xylose und Glucose gleichzeitig als Kohlenstoffquelle vorliegen (Aduse-Opoka und Mitchell 1987). Konzentrationen um 0,1 mol/l überschüssigem CaCO_3 fördern das Wachstum. Die Clostridien bauen die Ca^{2+} -Ionen zur Verstärkung in die Zellwand ein (Landuyt und Hsu 1985). Niedrigere pH-Werte als pH=7 verringern die Ethanol-Produktion und erhöhen die Acetat-, Wasserstoff-, Butyrat-, n-Butanol- und Lactatbildung (Vancanneyt et al. 1987, Vancanneyt et al. 1990). Im Gegensatz zur klassischen, mesophilen Aceton-Butanol-Ethanol-Gärung mit *Clostridium acetobutylicum* läuft die Gärung von *T. thermosaccharolyticum* als einstufiger Prozeß ab, so daß kontinuierliche Fermentationen durchgeführt werden können.

Die hohe Fermentationstemperatur von etwa 60 °C reduziert das Risiko von Insterilitäten während der Langzeitversuche erheblich. Thermophile Bakterien werden nicht von Bakteriophagen befallen. Andere mesophile Kulturen sind dagegen durch Bakterienviren besonders während der kontinuierlichen Fermentation bedroht. n-Butanol und Ethanol inhibieren den Stoffwechsel (Baskaran et al. 1995a), so daß eine In-situ-Produktabtrennung notwendig wird. Fermentationsversuche in Schüttelkolben ergaben, daß Oleylalkohol (cis-9-Octadecen-1-ol, $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}$) als in Frage kommendes Extraktionsmittel für eine In-situ-Extraktion nicht toxisch auf *T. thermosaccharolyticum* wirkt. Bislang werden thermophile Mikroorganismen nicht in industriellen Herstellungsprozessen zur Gewinnung von Lösungsmitteln eingesetzt. Der mesophile Mikroorganismus *Clostridium acetobutylicum* erzeugt weit höhere Lösungsmittelkonzentrationen, so daß diese Gärung wirtschaftliche Bedeutung erlangte (Dürre 1998). Thermophile Biosysteme

werden erst seit kurzem erforscht und weisen nur geringe Produktkonzentrationen auf. Dies erfordert die Integration der Produktrückgewinnung in den Fermentationsprozeß, um die Endprodukthemmung zu beseitigen (Mayer 1995). Die thermostabilen Eigenschaften der Glucoamylasen von *T. thermosaccharolyticum* könnten für die Stärkeindustrie interessant werden (Specka et al. 1991).

2.2 Integrierte biotechnologische Prozesse

Wenn eine zu hohe Produktkonzentration den mikrobiellen Stoffwechsel hemmt, so muß zur Aufrechterhaltung der bakteriellen Umsetzung das Produkt während des Produktionsprozesses aus dem Kultivierungsmedium entfernt werden. Erfolgen Produktbildung und Produktgewinnung aus dem Medium gleichzeitig, nennt man diese Verfahren integrierte Prozesse. Sie lassen sich nach den Produkten in vier große Gruppen einteilen: Alkohole, organische Säuren, Antibiotika und Proteine (Schügerl et al. 1994).

2.2.1 Rückgewinnung von Alkoholen

Die leichtflüchtigen Alkohole Ethanol und Butanol beeinträchtigen das Wachstum und die Produktbildung der Bakterien schon bei niedrigen Konzentrationen. Eine Reihe unterschiedlicher Trennverfahren kann grundsätzlich zur Abtrennung von Alkoholen eingesetzt werden. Dialyse, Umkehrosmose, Ultrafiltration und Pervaporation haben gemeinsam, daß Membranen die Zellen zurückhalten und die inhibierenden Stoffe selektiv durch die Membranen diffundieren. Bei Extraktionsprozessen gehen die Stoffe in eine Zusatzflüssigkeit über. Lagern sich die Moleküle an einen Feststoff an, spricht man von Adsorption. Bei Anwendung der In-situ-Entspannungsverdampfung und der Verdampfung ins Vakuum gehen die Alkohole direkt aus der Zellbrühe in die Gasphase über. Das Strippen mit einem Gas stellt eine weitere Möglichkeit zur Entfernung der in der Flüssigkeit gelösten Stoffe dar.

Die Rückgewinnung von Ethanol und Butanol aus Kultivierungsmedien durch Umkehrosmose und Ultrafiltrationsmembranen ist teuer und nicht hinreichend selektiv (*Choudhury et al. 1985, Choudhury et al. 1986, Garcia et al. 1986*). Seit einigen Jahren setzt man solche Membranen zur Herstellung von alkoholfreien Bieren ein. Das Haupteinsatzgebiet ist jedoch nach wie vor die Trinkwassergewinnung aus Meer- und Brackwasser (*Rautenbach und Janisch 1987*). Die Membranen der Pervaporationsprozesse bestehen aus Silikonen, Silikon-Composit, Polyvinylalkohol, Tetrafluorethylen, Chitosan-Polyacrylonitril-Composit und festkörperunterstützten Oleylalkohol-Flüssigmembranen. Die leichtflüchtigen Alkohole permeieren durch die organophile Membran, so daß Produktivität und Substratverbrauch deutlich steigen. Dagegen reichern sich nichtflüchtige, höhere, toxische Alkohole in der Fermenterbrühe an, so daß sie nach einiger Zeit gänzlich erneuert werden muß (*Schügerl et al. 1994*). Auch bei der Verdampfung ins Vakuum (*Roffler et al. 1984, Cysewsky und Wilke 1978*) und bei der Entspannungsverdampfung (*Ghose et al. 1984, Majorella et al. 1984*) steigen die Konzentrationen von hochsiedenden Nebenprodukten an, die toxisch wirken und das bakterielle Wachstum stoppen.

Bélafi-Bakó et al. (1995) sehen in der Extraktion von Ethanol aus Fermentationslösungen das Hauptanwendungsgebiet für Verfahren der integrierten Produktabtrennung in Biokonversionsprozessen. Als Extraktionsmittel für Ethanol hat sich Oleylalkohol bewährt, weil er bioverträglich ist und einen hohen Verteilungskoeffizienten aufweist (*Schügerl 1994*). Durch Einsatz von Oleylalkohol bei der In-situ-Extraktion konnte *Weilhammer (1993)* die Ethanolproduktion verdoppeln und bis zu ca. 40 % des Ethanols extrahieren. *Koullas et al. (1999)* benutzten Isoamylacetat, Isooctylalkohol und n-Butylacetat, um Ethanol aus Bioethanol-Fermentationsbrühen zu extrahieren. Untersuchungen zur Wirtschaftlichkeit der Ethanol-Extraktion ergaben, daß die Rohstoffkosten etwa 60 % der Gesamtkosten betragen (*Daugulis et al. 1991*). Ethanol ist eine Grundchemikalie der chemischen Industrie, die auf der Basis von Erdöl gewonnen wird (direkte katalytische Hydratisierung von Ethylen). Aufgrund einer Erdöl-Verteuerung könnte es jedoch wieder in zunehmendem Maße zur Ethanolgewinnung durch Gärprozesse kom-

men. Durch Immobilisierung wird die Toxizität des Lösungsmittels vermindert. Der zusätzliche Stofftransportwiderstand wirkt allerdings wiederum limitierend (*Gianetto et al. 1988, Honda et al. 1986, Tanaka et al. 1987*).

Clostridium acetobutylicum produziert Aceton, n-Butanol und Ethanol, wobei Aceton die Produktbildung nur gering hemmt, n-Butanol das Wachstum dagegen stark beeinträchtigt. Als nicht toxische Lösungsmittel mit hohen Verteilungskoeffizienten kommen n-Decanol (*Eckert und Schügerl 1987*), Dibutylphthalat und Polypropylenglykol (*Wayman und Parekh 1987*) sowie Oleylalkohol (*Barton und Daugalis 1992, Roffler et al. 1988, Jeon und Lee 1989*) zum Einsatz. In einem Extraktionsmittelvergleich zwischen Oleylalkohol, Benzylbenzoat und Dibutylphthalat erzielten *Qureshi und Maddox (1995)* mit Oleylalkohol bei Fermentationen mit immobilisierten Zellen von *Clostridium acetobutylicum* die besten Ergebnisse. *Ishizaki et al. (1999)* verwenden methyliertes rohes Palmöl als preiswertes Extraktionsmittel und erreichen die gleichen Produktionssteigerungen bei Aceton-Butanol-Ethanol-Fermentationen wie mit Oleylalkohol als Extraktionsmittel.

Die Löslichkeit polarer Primärmetabolite wie Ethanol in Wasser ist hoch, so daß die Extraktion mit unpolaren Extraktionsmitteln wenig effizient ist. Die Umwandlung der Primärstoffwechselprodukte in Substanzen mit hohem Verteilungskoeffizienten in unpolaren Lösungsmitteln stellt eine denkbare Alternative zu konventionellen Extraktionen dar. Im Rahmen von Arbeiten zur Reaktiv-Membran-Extraktion untersuchten *Burfeind und Schügerl (1999)* die Reaktion von Ethanol mit Octan-, Heptan- und Ölsäure zu Estern. Die ethanolreiche wäßrige Phase war durch eine mikroporöse Polypropylen-Hohlfasermembran von der organischen Phase getrennt.

In einem Wirtschaftlichkeitsvergleich der Verfahren Adsorption, Extraktion, Pervaporation, Membranextraktion und Stripping bewerten *Groot et al. (1992)* Pervaporation und Solventextraktion als die besten Verfahren. Die Beladungen von Ethanol und Butanol auf Aktivkohle und Polystyrol sind zu gering, so daß die Adsorption mit Pervaporation und Extraktion nicht konkurrieren kann (*Schügerl et al. 1994*).

Die gegebene Übersicht zeigt, daß die Rückgewinnung von Alkoholen aus Fermentationsbrühen durch eine Vielzahl von Verfahren erfolgen kann. Die Konzentration von Alkoholen in den aufzubereitenden Brühen ist gering. In der Industrie hat sich keiner der untersuchten Prozesse zur Herstellung von Alkoholen als Grundchemikalien durchgesetzt. Im Gegensatz dazu wird Ethanol als Genußmittel per Gesetz ausschließlich durch Gärprozesse gewonnen. Der Energie- und Investitionsbedarf der biotechnologischen Verfahren zur Alkoholgewinnung aus Biomasse ist im Vergleich zu konventionellen Produktionsverfahren auf der Basis von Erdöl sehr hoch.

2.2.2 Rückgewinnung von Carbonsäuren

Während des Wachstumsprozesses produzieren die Mikroorganismen organische Säuren und geben sie an das Kultivierungsmedium ab. Der pH-Wert sinkt so lange, bis die Säurekonzentration die Mikroorganismen abtötet. Auch bei einer Kontrolle des pH-Wertes steigt bei Säureabgabe durch die Zellen die Konzentration an protolysierten und unprotolysierten Säuremolekülen immer mehr an, bis das Zellwachstum durch Produktinhibierung gestoppt wird. Dieser toxische Effekt wirkt bei niedrigen pH-Werten besonders stark auf die Zelle, weil in diesem Fall mehr undissoziierte Säuremoleküle in der wäßrigen Lösung vorliegen, welche die Zellmembran passieren. Zur In-situ-Säure-Rückgewinnung eignen sich die Fällung, die Solventextraktion, die Elektrodialyse, der Ionenaustausch und die Kristallisation (*Schügerl et al. 1994*).

Durch Zugabe von CaCO_3 werden bei der Produktion von Milchsäure und Citronensäure der pH-Wert konstant gehalten und die Säuren ausgefällt. Ca-Lactat und Ca-Citrat werden aus der Fermenterbrühe abgetrennt, mit Schwefelsäure behandelt und als freie Säuren isoliert (*Schügerl et al. 1994*).

Wieczorek und Brauer (1998a) führten mit dem Pilz *Aspergillus niger* kontinuierliche Fermentationen zur Produktion von Citronensäure durch. Aufbauend auf diese Versuche wurde aus einem Teil der Fermentationsbrühe mit

einem Gemisch aus Octanol, Kerosin und Tridocylamin der Wertstoff Citronensäure extrahiert und die abgereicherte Brühe nach Aufreinigen mit Aktivkohle in den Fermenter zurückgeführt. Auch das Extraktionsmittel wurde aufgereinigt und rezirkuliert. Auf diese Weise konnte die anfallende Abwassermenge im Vergleich zu mehreren aufeinander folgenden Batch-Fermentationen erheblich reduziert werden (*Wieczorek und Brauer 1998b*).

Um reine Milchsäure für industrielle Zwecke zu gewinnen, setzt man oft *Lactobacillus delbrueckii* ein (*Schlegel, 1992*). *Honda et al. (1995)* und *Ye et al. (1996)* verwendeten ein Gemisch aus 40 % Alamine 336 (C₈-C₁₀ tert. Amin, Fa. Henkel) und 60 % Oleylalkohol, um Milchsäure durch Extraktivfermentation mit *Lactobacillus delbrueckii* zu produzieren. *Honda et al. (1995)* extrahierten das zellfreie Medium, während *Ye et al. (1996)* durch Verwendung von Hohlfasermodule die toxische Wirkung des Extraktionsmittels verminderten. Anstelle von Alamine 336 mischten *Tong et al. (1998)* TOMAC (Tri-n-Octylmethylammoniumchlorid) mit Oleylalkohol, um damit in Hohlfasermodule Milchsäure aus Fermentationsbrühen von *Lactobacillus rhamnosus* zu extrahieren. Zur Abtrennung der Milchsäure wurden immobilisierte Zellen mit dem Extraktionsmittel, z. B. Gemische aus Trioctyl-phosphinoxid/Dodekan/Isopar M (*Yabannavar und Wang 1991a*) oder Trioctylamin/Oleylalkohol (*Yabannavar und Wang 1991b*), bei niedrigen pH-Werten in Kontakt gebracht. Für die Extraktion von Milchsäure, Citronensäure und Essigsäure verwendeten *Bar und Gainer (1987)* langkettige Kohlenwasserstoffe, z. B. Perfluordekalin und Methyloleat. Mit dem Gemisch Alamine 336/Methylisobutylketon ließ sich Milchsäure durch eine Membran extrahieren (*Bartels et al. 1987*).

Damit die Carbonsäuren in nennenswertem Maß in das organische Lösungsmittel übergehen, muß die Konzentration an undissoziierter Säure möglichst hoch sein. Allerdings vertragen die Zellen keine niedrigen pH-Werte. Da die Rückextraktion bei höheren pH-Werten erfolgt, wird das Salz der Säuren gewonnen. Die Rückextraktion der freien Säuren ist mit erheblichen Nachteilen wie Ausbeuteverlust verbunden und deshalb unwirtschaftlich (*Schügerl et al. 1994*).

Solichien et al. (1995) testeten zahlreiche mikroporöse Membranen und Extraktionsmittel, um in Hohlfasermembranen Essigsäure und Propionsäure aus Fermentationsbrühen von *Propionibacterium acidipropionici* zu gewinnen. Phenylalanin ist eine essentielle Aminosäure für Menschen. *Maaß et al. (1999)* trennten aus einer *E.-coli*-Fermentationslösung in einem Hohlfasermembranmodul mittels eines Extraktionsmittels, einer Mischung aus Kerosin und Bis-2-Ethyl-Hexylphosphorsäureester, L-Phenylalanin ab. Es wurde keine Beeinflussung der Mikroorganismen durch das Extraktionsmittel beobachtet und über 80 % Extraktionsausbeute erreicht. *Kwon et al. (1996)* arbeiteten mit wäßrigen Zweiphasensystemen, wobei die Extraktionsmittelphase aus Polyethylenimin (PEI) und Hydroxyethylcellulose (HEC) bestand. Die Menge an produzierter Milchsäure und Biomasse (*Lactococcus lactis*) war um den Faktor drei bis vier höher als bei konventionellen Batch-Fermentationen. Auch *Lactobacillus casei* erzeugt Milchsäure, die von *Katzbauer et al. (1995a)* mittels Polyethylenglycol/Dextran, das mit der Fermentationsbrühe ebenfalls ein wäßriges Zweiphasensystem bildete, extraktiv entfernt wurde. Der Ascomycet *Gibberella fujikuroi* produziert im Sekundärstoffwechsel Gibberellinsäure, die als Pflanzenwachstumshormon eingesetzt wird. Unter Fermentationsbedingungen ist sie nicht stabil und wurde deshalb mittels einer Mischung aus 65 Gew.-% „Genapol 2822“ (Fa. Hoechst AG) und 35 Gew.-% Wasser aus einem zellfreien Filtrat extrahiert. Allerdings durfte die Extraktion im Fed-Batch-Prozeß nicht zu früh gestartet werden, weil das Extraktionsmittel toxisch wirkte (*Hollmann et al. 1995*).

Bei Membranprozessen besteht immer die Gefahr, daß die Membran von einer bakteriellen Deckschicht überzogen wird, die den Stoffübergang wesentlich verschlechtert. Auch bei der Anwendung der Elektrodialyse zur Entfernung von Carbonsäuren werden die Zellen durch Filtration oder Immobilisierung aus dem zellhaltigen Medium entfernt. Durch Elektrodialyse ließen sich Lactat, Milchsäure, Apfelsäure und Essigsäure gewinnen (*Schügerl et al. 1994*). Ionenaustausch und Kristallisation sind kaum angewandte Verfahren zur In-situ-Entfernung von Carbonsäuren aus biologischen Reaktionsgemischen.

Bei der Rückgewinnung von Carbonsäuren aus Fermentationsbrühen wird die Anwendung zahlreicher Stofftrennungungsverfahren erforscht. Trotzdem werden nur wenige biotechnologische Verfahren großtechnisch eingesetzt, weil diese Verfahren in der Regel eine zu geringe Effektivität aufweisen, um mit Vollsynthesen konkurrieren zu können. Lediglich Citronensäure wird technisch zu ca. 90 % durch Fermentation von Zuckerlösungen mit *Aspergillus niger*-Kulturen im Submersverfahren hergestellt. Die betrachteten Verfahren zur Alkohol- und Carbonsäuregewinnung haben gemeinsam, daß entweder ein Alkohol oder eine Carbonsäure aus der Fermentationsbrühe entfernt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird versucht, in einem Verfahrensschritt Alkohole und Carbonsäuren gleichzeitig in situ zu extrahieren.

2.3 Elektroextraktion

Bei der Solventextraktion werden aus einem homogenen Flüssigkeitsgemisch eine oder mehrere Komponenten durch innigen Kontakt mit einem Lösungsmittel, dem Extraktionsmittel, abgetrennt. Grundvoraussetzung für die Extraktion ist, daß die Raffinatphase und die Extraktphase eine Mischungslücke aufweisen. Idealerweise sind Raffinat- und Extraktphase ineinander völlig unlöslich. Das Extraktionsmittel soll den Wertstoff mit hoher Kapazität aufnehmen und sich leicht regenerieren lassen. Es soll nicht korrosiv, nicht brennbar, ungiftig, chemisch stabil, kostengünstig und leicht beschaffbar sein. Der Extraktionsprozeß soll durch die Stoffwerte wie Grenzflächenspannung, Viskositäten, Dichtedifferenz und Dampfdrücke günstig beeinflusst werden (*Mersmann 1980*).

Die Verfahren Elektrolyse, Elektrophorese und Elektrodialyse nutzen jeweils ein elektrisches Gleichspannungsfeld zur Stofftrennung. Als Elektrolyse bezeichnet man eine unter Ionenentladung ablaufende Zerlegung einer chemischen Verbindung mittels des elektrischen Stromes. Bei diesem Vorgang wird der Elektrolyt zersetzt. Als Trennverfahren für vorwiegend mikropräparative Zwecke wird die Elektrophorese eingesetzt. Sie beruht auf der Wanderung der in Flüssigkeit

dispergierten oder kolloidal gelösten geladenen Teilchen in einem elektrischen Gleichspannungsfeld. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel, meist Makromoleküle, hängt von ihrer Größe und Form, ihrer Ladung, dem pH-Wert, der Temperatur, der Viskosität und der Feldstärke ab.

Die Dialyse ist ein Trennverfahren, das aus einer kolloidalen oder makromolekularen Lösung niedermolekulare Begleitstoffe entfernen kann. Die Lösung wird durch eine semipermeable Membran vom laufend erneuerten, reinen Lösungsmittel getrennt. Die niedermolekularen Stoffe diffundieren durch diese Membran in das außen vorbeifließende Lösungsmittel. Die größeren Kolloidteilchen oder Makromoleküle können die Membran hingegen nicht passieren. Eine Hauptanwendung ist das Entgiften des Blutes in der künstlichen Niere. Bei der Elektrodialyse nutzt man die Ladung mancher Kolloidteilchen aus und beschleunigt die Dialyse durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Mittels Elektrodialyse wird aus Meer- und Brackwasser Trinkwasser gewonnen. Bei der Käseherstellung fallen milchsäurehaltige Abwässer an, aus denen *Boniardi et al. (1997a, b)* durch Elektrodialyse Natriumlactat abtrennen. Milchsäure gewinnt als billiger Rohstoff für die Herstellung biologisch abbaubarer Polymere zunehmend an Bedeutung.

Bei der Elektroextraktion werden zwei flüssige Phasen, die eine Mischungslücke aufweisen, übereinander geschichtet. Ein elektrisches Gleichspannungsfeld, dessen Feldlinien senkrecht zur Flüssig/Flüssig-Phasengrenze gerichtet sind, soll den Stoffübergang von elektrisch geladenen Teilchen über die Phasengrenze von der Raffinat- in die Extraktphase verstärken (**Abb. 2-2**).

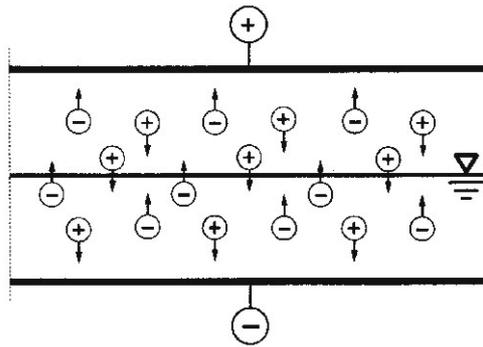


Abb. 2-2: Prinzip der Trennung elektrisch geladener Teilchen durch die Elektroextraktion

In der Umgebung eines elektrisch geladenen Körpers bzw. zwischen zwei elektrisch geladenen Körpern besteht ein elektrisches Feld. Die Stärke des elektrischen Feldes E wird durch die Kraft F_C (elektrische Kraft, Coulomb-Kraft) ausgedrückt, die auf eine Ladung Q in diesem Feld wirkt.

$$E = \frac{F_C}{Q} \quad (2-1)$$

Wenn zwischen zwei geladenen Platten mit dem Abstand s die elektrische Spannung U angelegt wird, so gilt für das homogene elektrische Feld zwischen den Platten:

$$E = \frac{U}{s} \quad (2-2)$$

Die im Elektrolyten frei beweglichen Ionen tragen eine oder mehrere (Anzahl n_e) positive oder negative Elementarladungen e .

$$Q = n_e \cdot e \quad (2-3)$$

Aufgrund ihrer elektrischen Ladung werden Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt und wandern ihrer Ladungsart entsprechend in Richtung der Pole,

der Elektroden. Die näherungsweise kugelförmigen Ionen erfahren infolge der Stokes-Reibung eine Bremskraft. Für die laminare Strömung gilt:

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (2-4)$$

Die Reibungskraft F_R ist direkt proportional zur dynamischen Viskosität η des Fluids, zum Kugelradius r und zur Geschwindigkeit v . Die Geschwindigkeit nimmt so lange zu, bis das Kräftegleichgewicht zwischen Coulomb-Kraft und Reibungskraft erreicht ist.

Schmidt (1990) führte zunächst diskontinuierliche Elektroextraktionen durch und trennte die Übergangskomponenten Säurefuchsin, Schwefelsäure und Citronensäure aus der wäßrigen Phase im Zweiphasengemisch n-Butanol/Wasser ab. In kontinuierlichen Elektroextraktionen wurden der Stoffübergang von Säurefuchsin und Citronensäure aus der wasserreichen in die butanolreiche Phase untersucht. Weitere grundlegende Arbeiten erfolgten durch *Proplesch (1994)*. Er verwendete in als Zweiphasensysteme n-Butanol/Wasser, n-Pentanol/Wasser und n-Hexanol/Wasser sowie die Extraktstoffe Pyrazin-2,3-dicarbonsäure, Apfelsäure, Bernsteinsäure und Ammoniumsulfat. Die Aufkonzentrierung von Citronensäure, Pyrazin-2,3-dicarbonsäure und Apfelsäure gelang *Proplesch (1994)* auch in einer Gegenstromanlage mit sechs bis zehn Böden für kontinuierliche Elektroextraktionen. *Raghavarao et al. (1998)* trennten erfolgreich Proteine mit elektrischen Feldstärken von 20 bis 50 V/cm aus dem wäßrigen Zweiphasensystem Polyethylenglycol/Dextran ab.

Neben den üblichen Anforderungen muß ein Extraktionsmittel für die Elektroextraktion noch weitere Bedingungen erfüllen. Es muß ausreichend Wasser aufnehmen können, damit die elektrolytisch vorliegenden Extraktstoffe sich darin lösen können. Die Autoprotolyse des Wassers sorgt dafür, daß an den inerten Elektroden sowohl in der Extrakt- als auch in der Raffinatphase Wasser in Wasserstoff und Sauerstoff gespalten wird. Auf diese Weise wird die Elektroneutralitätsbedingung erfüllt.



Man geht davon aus, daß die Extraktstoffe nicht an den Elektroden zersetzt werden.

Eine wichtige Frage ist, ob elektrische Gleichspannungsfelder bioelektrische Wechselwirkungen in Mikroorganismen hervorrufen. *Wever (1982)* berichtet, daß alle biologischen Wirkungen elektrischer Felder mit Wechselfeldern erzielt wurden, wobei sie eine hohe Frequenz-Spezifität zeigten. Mit elektrischen Gleichspannungsfeldern konnte dagegen grundsätzlich keine biologische Wirkung nachgewiesen werden. Andererseits beschreiben *Markx und Davey (1999)* dielektrische Eigenschaften von Zellen und deren Nutzung für technische Zwecke wie dielektrische Spektroskopie und Elektrokinetik. *Nakanishi et al. (1998)* fermentierten *Saccharomyces cerevisiae* unter dem Einfluß von 10 mA Gleichstrom und beobachteten einen signifikanten Anstieg der Zellgröße und der Alkoholproduktionsraten. Auch die Konzentrationen höherer Alkohole, Ester und organischer Säuren in den Fermentationsbrühen unter Stromeinfluß wichen von den Konzentrationen in den Kontrollkulturen ab. Hybridoma Kulturen produzierten bei der Applikation von elektrischen Feldern (Stromdichte 70 A/m^2) in Verbindung mit einer Nährstoffanreicherung mehr Antikörper (*Chang et al. 1995*). Es kann deshalb vermutet werden, daß *T. thermosaccharolyticum* durch den Einfluß eines elektrischen Gleichspannungsfeldes nicht geschädigt wird, sondern unter Umständen sogar zu höherer biologischer Aktivität angeregt wird.

Eine wichtige technische Anwendung von bioelektrisch wirksamen Gleichspannungsfeldern ist die Elektroporation. In sogenannten Elektroporatoren setzt man Zellen elektrischen Feldstärken der Größenordnung von 5 bis 40 kV/cm bei Pulslängen im Bereich von Millisekunden aus. Die kurzen Hochspannungsimpulse führen nach Überschreitung des Membranpotentials (ca. 1 V) zum reversiblen

elektrischen Durchbruch. Die Poren (lokale Störungen der Phospholipid-Doppelschichten) erlauben einen Austausch von Makromolekülen (z. B. Genmaterial, Proteine und andere Substanzen) zwischen den Zellen und dem umgebenden Medium (*Wolf 1989, Sprafke 1991, Hannig 1993, Kirches 1993*).

3 Experimentelle Untersuchungen

3.1 Das Lösungsmittel

Weilhammer (1993) extrahierte in situ Ethanol mit dem Extraktionsmittel Oleylalkohol (cis-9-Octadecen-1-ol) aus Fermenterbrühen von *Clostridium thermohydrosulfuricum*. Dieses Extraktionsmittel ist auch für *T. thermosaccharolyticum* ungiftig (*Mayer 1995*). Für die Elektroextraktion ist es dagegen nicht geeignet, weil es kein Wasser aufnimmt. In eigenen Versuchen mit elektrischen Feldstärken von 1250 V/cm konnte kein Stoffübergang von Säurefuchsin aus der Wasserphase in die Oleylalkoholphase erzielt werden. *Hiller et al. (1996)* benutzten Miglyol, ein Triglycerid der Fa. Hüls AG, um aus Pflanzenkulturen von *Galium verum* (Gemeines Labkraut) in situ die Sekundärmetabolite Anthrachinone zu extrahieren. Bei Miglyol handelt es sich um wasserklare, leicht gelbliche Neutralöle, die aus Estern gesättigter Kokos- und Palmkernfettsäuren Capryl- und Caprinsäure mit Glycerin und Propylenglycol bestehen. In Versuchen zeigt sich, daß Miglyol zu wenig Wasser aufnimmt, um für die Elektroextraktion zum Einsatz zu kommen.

Als geeignetes Extraktionsmittel erwies sich in weiteren Vorversuchen Imwitor 742, das ebenfalls von der Fa. Hüls AG produziert wird *Hüls (1996)*. Imwitor 742 ist ein Gemisch aus Mono-, Di- und Triglyceriden, in denen hauptsächlich Caprylsäure ($C_8H_{16}O_2$) und Caprinsäure ($C_{10}H_{20}O_2$) verestert sind. Bei Raumtemperatur ist Imwitor 742 eine weißlich-gelbliche, amorphe Masse mit leichtem Kokosgeruch und einem fettigen, kratzenden und bitteren Geschmack. Es schmilzt bei einer Temperatur von ca. 25 °C zu einer öligen, gelblichen Flüssigkeit. Imwitor 742 ist in Diethylether, n-Hexan sowie Ethanol leicht löslich und mit allen Fetten und Ölen mischbar. In Wasser ist Imwitor 742 schwer löslich. Es ist aber in der

Lage, ca. 10 Ma.-% Wasser klar aufzunehmen. In der Pharmazie wird Imwitor 742 in externen, rektalen, vaginalen und nasalen Zubereitungen in Mengen von 3-15 % als Absorptionspromotor von allein schlecht resorbierbaren Arzneistoffen eingesetzt. In oralen Arzneiformen wirkt Imwitor 742 ebenfalls als Absorptionsförderer. Es zeigt Oberflächenaktivität und wirkt als Weichmacher in Tablettenüberzügen und als Co-Emulgator in Emulsionen. Imwitor 742 kann in kosmetischen Formulierungen als Co-Emulgator für Cremes und Lotionen eingesetzt werden. Als Dispergator für Wirkstoffe in Anti-Akne-Cremes ist es ebenfalls gut geeignet. Aufgrund seiner bakteriostatischen Eigenschaften wirkt es vorbeugend gegen Pilzkrankungen aller Art und kann deshalb vorteilhaft in Fußbalsam und Desinfektionsmitteln eingesetzt werden.

Am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München überprüfte Dipl.-Biol. Andrea van Rinsum die Bioverträglichkeit von Imwitor 742 gegenüber *T. thermosaccharolyticum*, indem Bakterienkulturen in Schüttelkolben mit dem Extraktionsmittel in Kontakt gebracht wurden. Das Wachstum der mit Imwitor 742 überschichteten Kulturen wird nicht beeinträchtigt.

Das Stoffsystem Imwitor 742/Wasser bzw. Imwitor 742/Fermentationsbrühe weist einige für die Extraktion ungünstige Eigenschaften auf. Die mechanische Trennung bei einer Temperatur von 60 °C gestaltet sich wegen der geringen Dichtedifferenz zwischen mit Wasser abgesättigtem Imwitor 742 (981 kg/m³) und Fermentationsbrühe (1020 kg/m³) schwierig. Dazu trägt auch die niedrige Grenzflächenspannung zwischen Wasser und Imwitor 742 von etwa $0,005 \cdot 10^{-3}$ N/m bei. Ungünstig für den Stoffübergang wirkt sich die hohe kinematische Viskosität von $1,3 \cdot 10^{-5}$ m²/s des Extraktionsmittels aus. Wasser besitzt bei einer Temperatur von 60 °C eine kinematische Viskosität von $4,8 \cdot 10^{-7}$ m²/s, die Fermentationsbrühe ist mit $5,9 \cdot 10^{-7}$ m²/s nur unwesentlich viskoser. Die Randlöslichkeit von 0,54 Ma.-% in Wasser führt zu Verlusten von Imwitor 742 bei der In-situ-Extraktion. Die Verluste bei der Reextraktion mit Wasser werden durch die Betriebstemperatur von 60 °C in der Reextraktionskolonne vermindert.

Tab. 3-1: Stoffdaten von Imwitor 742 aus *Hüls (1996)* und eigenen Messungen

Handelsname	Imwitor 742			
Chemische Formel	R-O-CH-CHOR-CH-O-R			
Dichte	rein	(30 °C)	993,867	kg/m ³
		(60 °C)	981,820	kg/m ³
	mit Wasser gesättigt	(30 °C)	994,362	kg/m ³
		(60 °C)	981,992	kg/m ³
Oberflächenspannung	rein	(30 °C)	29,6·10 ⁻³	N/m
		(60 °C)	28,2·10 ⁻³	N/m
	mit Wasser gesättigt	(30 °C)	27,8·10 ⁻³	N/m
		(60 °C)	27,4·10 ⁻³	N/m
Grenzflächenspannung zu Wasser		(30 °C)	0,044·10 ⁻³	N/m
		(60 °C)	0,005·10 ⁻³	N/m
Kinematische Viskosität	rein	(30 °C)	5,781·10 ⁻⁵	m ² /s
		(60 °C)	1,578·10 ⁻⁵	m ² /s
	mit Wasser gesättigt	(30 °C)	4,198·10 ⁻⁵	m ² /s
		(60 °C)	1,276·10 ⁻⁵	m ² /s
Dynamische Viskosität	rein	(30 °C)	0,0589	kg/(m·s)
		(60 °C)	0,0158	kg/(m·s)
	mit Wasser gesättigt	(30 °C)	0,0422	kg/(m·s)
		(60 °C)	0,0133	kg/(m·s)
Löslichkeit				
Imwitor 742 in Wasser		(30 °C)	0,49	Ma.-%
		(60 °C)	0,54	Ma.-%
Wasser in Imwitor 742		(30 °C)	14,64	Ma.-%
		(60 °C)	12,50	Ma.-%
Verteilungskoeffizienten				
Imwitor 742/Ethanol/Wasser		(60 °C)	0,273	-
Imwitor 742/Essigsäure/Wasser		(60 °C)	0,449	-
Imwitor 742/Milchsäure/Wasser		(60 °C)	0,259	-
Imwitor 742/n-Butanol/Wasser		(60 °C)	3,714	-
Imwitor 742/Buttersäure/Wasser		(60 °C)	4,128	-

3.2 Fermentation mit *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*

3.2.1 Vorkulturen und Medien

Der Stamm *T. thermosaccharolyticum* (DSM 571) wird von Dipl.-Biol. M. Mayer des Lehrstuhls für Mikrobiologie der TU München bezogen. Zur Züchtung der Vorkulturen werden Schüttelkolben mit einem Volumen von 100 ml verwendet, die zur Hälfte mit Flüssigkeit gefüllt und mit Gummistopfen und Bördelkappen verschlossen werden. In einem Erlenmeyerkolben (Volumen 200 ml) wurden für 100 ml Probenvolumen die in **Tab. 3-2** angegebenen Mengen an löslicher Stärke (Fa. Difco), Tryptone (Fa. Difco), Yeast Extract (Fa. Difco), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Fa. Merck) und NaCl p.a. (Fa. Merck) eingewogen. Die Zugabe von 2,4 g MOPS/3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid, $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{SNa}$ (Fa. Sigma) wirkt als pH-Puffer. Nach dem Lösen in 80 ml bidestilliertem Wasser werden 4 ml Reduktionslösung zugegeben. Dazu löst man 1,25 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Fa. Merck) und 1,25 g L-Cysteine ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S} \cdot \text{HCl}$) (Fa. Sigma) in 100 ml 0,2 n NaOH p.a. (Fa. Merck). Die Reduktionslösung soll den gelösten, auf *T. thermosaccharolyticum* toxisch wirkenden Sauerstoff, binden. Um zu überprüfen, ob die Lösung noch Sauerstoff enthält, werden 0,1 ml einer 1 g/l wässrigen Resazurinlösung ($\text{C}_{12}\text{H}_6\text{NNaO}_4$) (Fa. Fluka) als Sauerstoffindikator zugegeben. Die Farbe schlägt bei vorhandenem Sauerstoff von gelb nach rot um. Mit einer Pipette tropft man solange 1 n HCl p.a. (Fa. Merck) zu, bis der pH-Wert von 7,2 erreicht wird. Nach dem Auffüllen mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml Probenvolumen wird der Ansatz auf zwei Kulturflaschen verteilt, die sofort verschlossen werden. Mittels einer Begasungsstation wird der restliche Sauerstoff aus den Kulturflaschen entfernt, indem durch die Gummistopfen Kanülen gestochen werden, die mit Schläuchen versehen sind. Durch Umlegen eines Ventils kann entweder Vakuum oder Stickstoff auf das Restgasvolumen in den Flaschen angelegt werden. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis der Farbumschlag auf gelb erfolgt. Das Austreiben des Sauerstoffs wird durch

Erhitzen der Flaschen im Wasserbad beschleunigt. Abschließend werden die Proben bei einer Temperatur von 121 °C im Autoklaven sterilisiert.

Tab. 3-2: Zusammensetzung des Nährmediums

Bestandteil	Konzentration g/l
Lösliche Stärke	20,0
Tryptone	10,0
Yeast Extract	2,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,33
NaCl	5,0

Nach der Sterilisation der Oberflächen der Gummistopfen in der Bunsenbrennerflamme werden die Flaschen mit einer sterilen 1 ml-Einwegspritze mit 1 ml Vorkultur angeimpft.

Zum Anlegen einer Vorkultur werden 10 ml Glycerin p.a. (C₃H₅(OH)₃) (Fa. Merck) in eine Kulturflasche gefüllt, die Flasche mit einem Gummistopfen verschlossen, der Sauerstoff im Restgasvolumen entfernt und durch Stickstoff ersetzt. In die sterilisierte Kulturflasche werden 10 ml Kulturbrühe gespritzt, das Gemisch geschüttelt und bei einer Temperatur von -20 °C aufbewahrt. Das Glycerin verhindert das Einfrieren der Vorkultur. Um optimale Wachstumsergebnisse zu erzielen, sollte die Kulturbrühe aus der logarithmischen Wachstumsphase stammen.

3.2.2 Immobilisierung

Bei Fermentationen im kontinuierlichen Betrieb kann es zum sogenannten Wash-out kommen. Der Verlust an Zellen durch den kontinuierlichen Ablaufstrom wird durch die Bildung neuer Zellen nicht mehr kompensiert. Die Immobilisierung ist eine Technik zur Bindung von Zellen an einen Träger. Sie werden auf einer Matrix fixiert. Auf diese Weise lassen sich für den kontinuierlichen Betrieb im Fermenter

kürzere Verweilzeiten realisieren. *Katzbauer et al. (1995b)* teilen die Immobilisierungsmechanismen in drei Gruppen ein: mechanische Immobilisierung (wie z. B. in einem Filter oder einer Membran), adsorptive Immobilisierung (wie z. B. Adhäsion an eine inerte Oberfläche) und Phaseneinschluß (wie z. B. in einem Gel oder in einer Phase eines wäßrigen Zweiphasensystems).

Für den thermophilen Anaerobier *T. thermosaccharolyticum* gibt es bisher noch keine Erfahrungen auf dem Gebiet der Immobilisierung. In Schüttelkolbenversuchen soll der Mikroorganismus mit einem geeigneten Trägerstoff in Kontakt gebracht und die Immobilisierung untersucht werden. Als Trägermaterial wird durch Hitze denaturierte Cellulose (Handelsname Aquacel), das in Japan von der Fa. Biomaterial hergestellt wird, verwendet. Die würfelförmigen Partikel mit äußerlich schwammartigem Aussehen haben eine Kantenlänge von 2 bis 3 mm. Ein 50 ml-Ansatz in einem 100 ml-Schüttelkolben enthält 23 g/l Immobilisierungsmatrix. Das Material wird von Dr.-Ing. R. Pörtner vom Lehrstuhl für Biotechnologie an der Universität Hamburg-Harburg zur Verfügung gestellt. Die Partikel werden zusammen mit den anderen Bestandteilen des Mediums in die Kulturflaschen gefüllt und autoklaviert. Der pH-Wert muß durch Zugabe von Salzsäure vor dem Animpfen mit 1 ml Vorkultur auf den Sollwert pH-Wert von 7,2 korrigiert werden, weil in Anwesenheit von Aquacel während der Sterilisation im Autoklaven der pH-Wert der Nährlösung auf Werte von ca. 8 ansteigt. Als Kohlenstoffquellen werden lösliche Stärke und Glucose (Fa. Merck) in der Konzentration von 10 g/l getestet. Im Gegensatz zu löslicher Stärke wird frisch angesetzte Glucoselösung erst nach der Sterilisation zugesetzt, da sonst Karamelisierung und Maillard-Reaktionen der Glucose mit Protein auftreten. Der Röhreintrag erfolgt erst, wenn nach ca. 24 Stunden in dem wasserbadtemperierten (60 °C) Schüttelkolben ein sichtbares Wachstum festgestellt wird. Für das Rühren kommen teflummantelte Rührfische (Länge 1 cm, Durchmesser 6 mm) zum Einsatz. Die Drehzahl beträgt 200 Umdrehungen/Minute. Das Ende der Batchfermentationen wird durch pH-Wertmessungen bestimmt.

Um feststellen zu können, ob und in welchem Maße sich der Mikroorganismus an den Trägerstoff gebunden hat, werden einzelne Matrixpartikel in einem Raster-

elektronenmikroskop von Prof. L. Bachmann am Lehrstuhl für Technische Chemie I der TU München untersucht. Nach Versuchsende werden die Partikel aus der Kulturbrühe abfiltriert und zweimal gespült. Als Waschmittel dient entweder Wasser oder eine 10-prozentige Formaldehydlösung. Die gereinigten Matrixkörner werden anschließend bei Zimmertemperatur luftgetrocknet. Um Klarheit darüber zu erlangen, ob die Bakterien tatsächlich in das Innere der weit verzweigten Matrixstruktur eindringen und sich dort festsetzen, werden die Matrixkörner in der Mitte mehrmals durchtrennt.

3.2.3 Kontinuierliche Fermentationen mit In-situ-Extraktion und In-situ-Elektroextraktion

Die Versuchsanlage für kontinuierliche Fermentationen mit In-situ-Extraktion und In-situ-Elektroextraktion ist vereinfacht in **Abb. 3-1** dargestellt.

Kernbestandteil ist ein sterilisierbarer Fermenter aus Glas mit einem nutzbaren Volumen von 22 Litern der Fa. Chemap AG mit der zugehörigen Steuer- und Regeleinheit (Typ FZ 3000).

Die Hauptabmessungen des Fermenters sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 3-3: Hauptabmessungen des Fermenters

Innendurchmesser	250 mm
Höhe	500 mm
Volumen	22 l
Werkstoff	Glas mit Edelstahlarmaturen
Rührer	Doppelter Vierblatt-Scheibenrührer mit Stromstörern
Rührerdurchmesser	74 mm

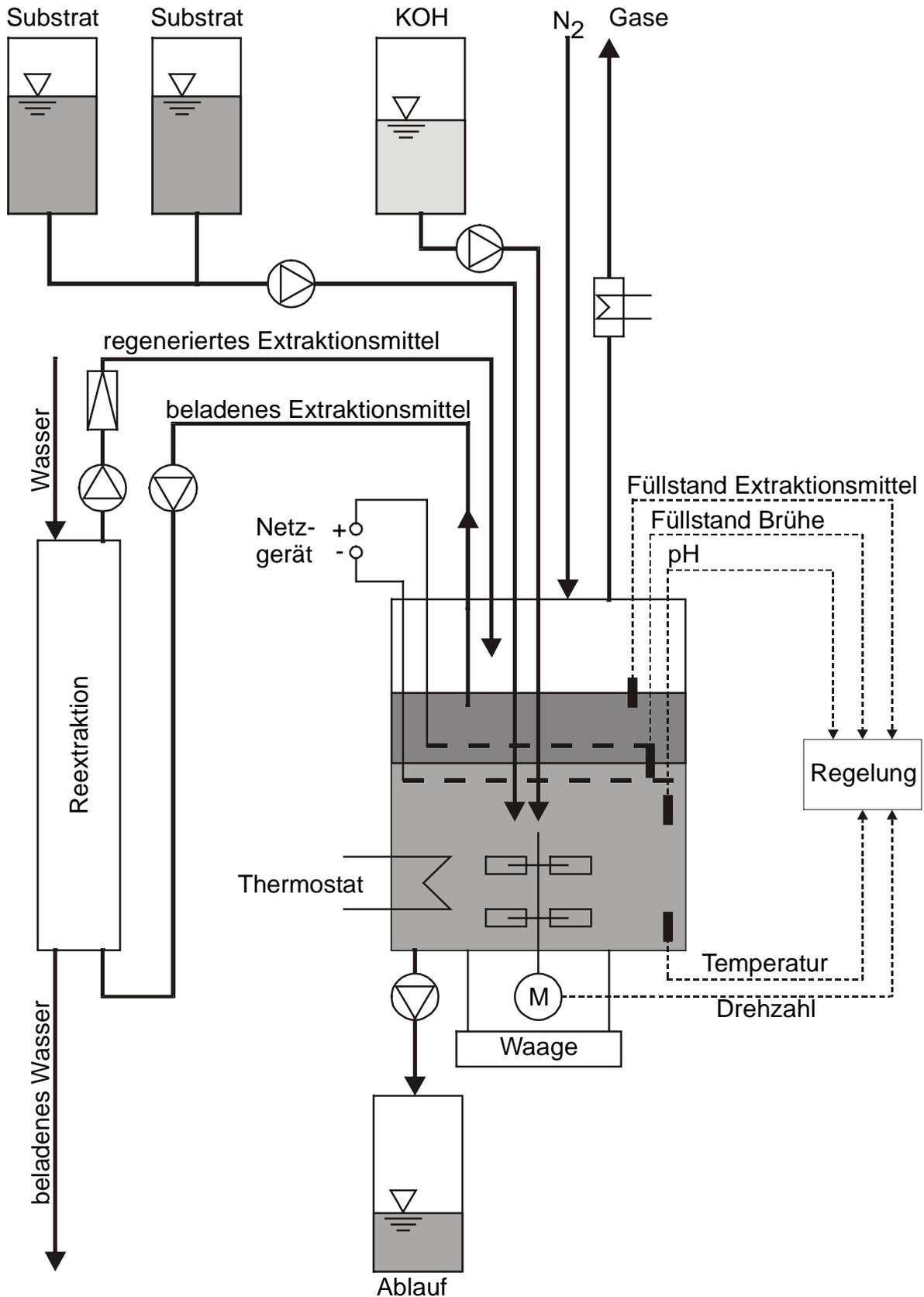


Abb. 3-1: Vereinfachtes Fließschema der Versuchsanlage für Fermentationen mit In-situ-Extraktion und In-situ-Elektroextraktion

Das Brühenvolumen beträgt bei den kontinuierlichen Fermentationen 16 l, bei den Extraktionsversuchen 17 l. Der Fermenter wird kontinuierlich betrieben, d. h. es wird ein konstanter Fermenterbrühenstrom abgeführt und ein Substratstrom zugeführt. Die Ablaufpumpe ist ebenso wie die Zulauf- und die Laugenpumpe als Schlauchpumpe ausgeführt. Als Sammelgefäß für die abgezogene Fermenterbrühe dient eine 50-l-Glaskolonne. Während der Fermentationsversuche ohne In-situ-Extraktion kann das Reaktionsvolumen im Fermenter konstant gehalten werden, indem der komplette Fermenter auf einer Kraftmeßdose plaziert wird. Sie erfaßt das Gewicht des Fermenterinhalt und aktiviert die Zulaufpumpe bei Abfall auf das Mindestgewicht. Während der Extraktionsversuche detektiert ein höhenverstellbarer Leitfähigkeitssensor die Flüssig/Flüssig-Phasengrenze und regelt die Substratzufuhr. Das Substrat (pH-Wert 7,2) für die kontinuierlichen Fermentationen besitzt dieselbe Zusammensetzung (**Tab. 3-4**) wie das Nährmedium für die Schüttelkolbenversuche. Es wird in Vorratsbehältern aus Edelstahl mit einem Volumen von 50 l autoklaviert und bereitgehalten. Die Stärkelösung besitzt im Vergleich zu einer Glucoselösung eine höhere Viskosität. Trotzdem läßt sich die Nährlösung problemlos fördern und ist damit für den kontinuierlichen Fermentationsbetrieb einsatzfähig.

Tab. 3-4: Zusammensetzung des Nährmediums

Bestandteil	Konzentration g/l
Lösliche Stärke	20,0 bzw. 50,0
Tryptone	10,0
Yeast Extract	2,0
NaCl	5,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,33

Aus den Produktspezifikationen für Tryptone und Yeast Extract (*Difco 1997*) lassen sich die Konzentrationen der Aminosäuren und Kohlenhydrate entnehmen und somit der Gesamtkohlenstoffgehalt für die beiden Bestandteile des Mediums

berechnen (**Tab. 3-5**). Tryptone enthält 40,00 Ma.-% Kohlenstoff, Yeast Extract 36,44 Ma.-% Kohlenstoff. Dabei wird für die Kohlenhydrate die molare Masse von 180,16 g/mol der Glucose eingesetzt. Messungen des Glucosegehaltes der löslichen Stärke ergeben, daß ein Gramm lösliche Stärke lediglich 0,8423 g Glucose entspricht. Der Rest von ca. 15 Ma.-% besteht vermutlich aus Wasser. Bezieht man den Wasseranteil auf Stärke mit einer formalen molaren Masse von $\tilde{M}_s = 162,1$ g/mol, so beträgt der Wasseranteil 24,47 Ma.-%.

Tab. 3-5: Auszug aus der Produktspezifikation für Tryptone und Yeast Extract der Fa. Difco (*Difco 1997*)

	Tryptone	Yeast Extract
amino acids:	Ma.-%	Ma.-%
alanine	2,86	5,36
arginine	3,03	3,02
aspartic acid	6,11	6,69
cystine	0,42	0,74
glutamic acid	17,05	14,20
glycine	1,75	3,25
histidine	2,02	1,20
isoleucine	4,40	3,23
leucine	7,11	4,69
lysine	6,70	5,15
methionine	2,57	1,05
phenylalanine	3,71	2,53
proline	7,45	2,60
serine	4,29	2,84
threonine	3,58	2,95
tryptophan	0,71	1,36
tyrosine	1,42	1,20
valine	5,00	3,79
carbohydrate	7,70	17,50

Aufgrund der mikrobiellen Säureproduktion muß der pH-Wert im Fermenter durch Zufuhr von Lauge konstant gehalten werden. Eine Glas-pH-Elektrode (Typ 465, Fa. Ingold) mißt den pH-Wert und aktiviert bei zu geringen Werten die Laugenpumpe, die Kalilauge (10 Ma.-%) in den Fermenter fördert. Am Boden des Lauge-Vorlagebehälters befindet sich ein Drucksensor, der über den hydrostatischen Druck den aktuellen Flüssigkeitsstand erfaßt. Das Meßsignal wird über einen Echtzeitschreiber kontinuierlich aufgezeichnet und liefert eine Aussage über den Laugenverbrauch.

In die Stromstörer ist eine Heiz-Kühl-Einrichtung integriert, die über eine Temperaturregelung den Inhalt des Reaktors auf eine Temperatur von 60 °C thermostatisiert. Je nach Bedarf werden die Stromstörer auf der Innenseite mit Heißdampf oder Kühlwasser durchströmt. Ein lokaler Dampferzeuger stellt den zu Heiz- und Spülzwecken benötigten Dampf zur Verfügung.

Das Flüssigkeitsvolumen wird durch einen doppelten Vierblatt-Scheibenrührer permanent durchmischt, dessen Welle von unten durch den Fermenterboden geführt ist. Sie wird durch eine doppelt wirkende Gleitringdichtung gegenüber dem Fermenterinhalt abgedichtet. Durch die Rührbewegung werden Konzentrationsunterschiede und Temperaturgradienten ausgeglichen, Laugen- und Substratstrom gleichmäßig verteilt und die Zellsubstanz in die Flüssigkeit suspendiert. Dadurch wird verhindert, daß sich die Zellen am Behälterboden absetzen. Die Drehzahl beträgt im Normalbetrieb konstant 100 U/min. Die vier Stromstörer verhindern die Bildung einer Trombe an der Phasengrenze.

Im Fermenter herrscht ein Überdruck von 0,1 bar, um ohne Saugvorrichtung über die Probeentnahmeleitung Proben der Fermentationsbrühe abziehen zu können und um das Eindringen von Fremdstoffen zu verhindern. Sämtliche den Reaktor verlassenden Gase werden über eine Abluftgruppe, die eine Kühlfalle zur Rückkondensation leichtflüchtiger Komponenten enthält, zu einem U-Rohr-Manometer geleitet. Es ist mit Wasser gefüllt und läßt einen maximalen Differenzdruck von 0,1 bar (1 m Wassersäule) zu.

Für den Fall, daß ein Druckabfall im Fermenter nicht durch mikrobielle Gasbildung kompensiert werden kann, besteht die Möglichkeit der Stickstoffzufuhr über die Zuluftgruppe, die wie die Abluftgruppe auf dem Fermenterdeckel montiert ist. Ein gesinterter Keramikkörper filtert Feststoffpartikel und Flüssigkeitströpfchen aus dem zuströmenden Gas. Stickstoff wird auch in der Rückkühlphase nach der Sterilisation des Fermenters benötigt.

Die Zufuhr des Extraktionsmittels erfolgt über einen Verteiler direkt in die Extraktionsmittelphase im Fermenter. Auf der gegenüberliegenden Seite des Verteilers wird mittels eines Sammlers das Extraktionsmittel nahe der Zwei-Phasengrenze wieder abgezogen. Sammler und Verteiler sind in Form eines T-Rohrstückes ausgeführt. An den Rohrenden und durch eine Bohrung am T-Übergang tritt die Flüssigkeit aus und ein. Durch diese Ausführung des Verteilers und Sammlers werden Totzonen weitgehend vermieden und eine gleichmäßige Strömungsgeschwindigkeit entlang der Flüssig/Flüssig-Phasengrenze erreicht. Die Zu- und Ablaufpumpen für das Extraktionsmittel sind als Zahnrادpumpen ausgeführt. Der Ablaufstrom für das beladene Extraktionsmittel wird fest eingestellt und beträgt bei allen Versuchen 6,67 l/h. Die Füllstandsregelung im Fermenter erfolgt durch einen Vibrationsgrenzschalter Typ Liquiphant T FTL 260 der Fa. Endress + Hauser. Der Schalter ist mittig und höhenverstellbar auf dem Fermenterdeckel montiert. Während der Extraktionsversuche wird der Füllstand auf 21 l Gesamtvolumen gehalten.

Abb. 3-2 zeigt den Fermenter im Extraktionsbetrieb. Er ist mit 17,0 l Fermentationsbrühe gefüllt, die eine gelblich weiße Farbe mit einem leichten Grünstich besitzt. Darüber befinden sich 4,0 l der bräunlich weißen Extraktionsmittelphase. Sowohl die Bakterienbrühe als auch das Extraktionsmittel Imwitor 742 weisen eine sehr starke Trübung auf.

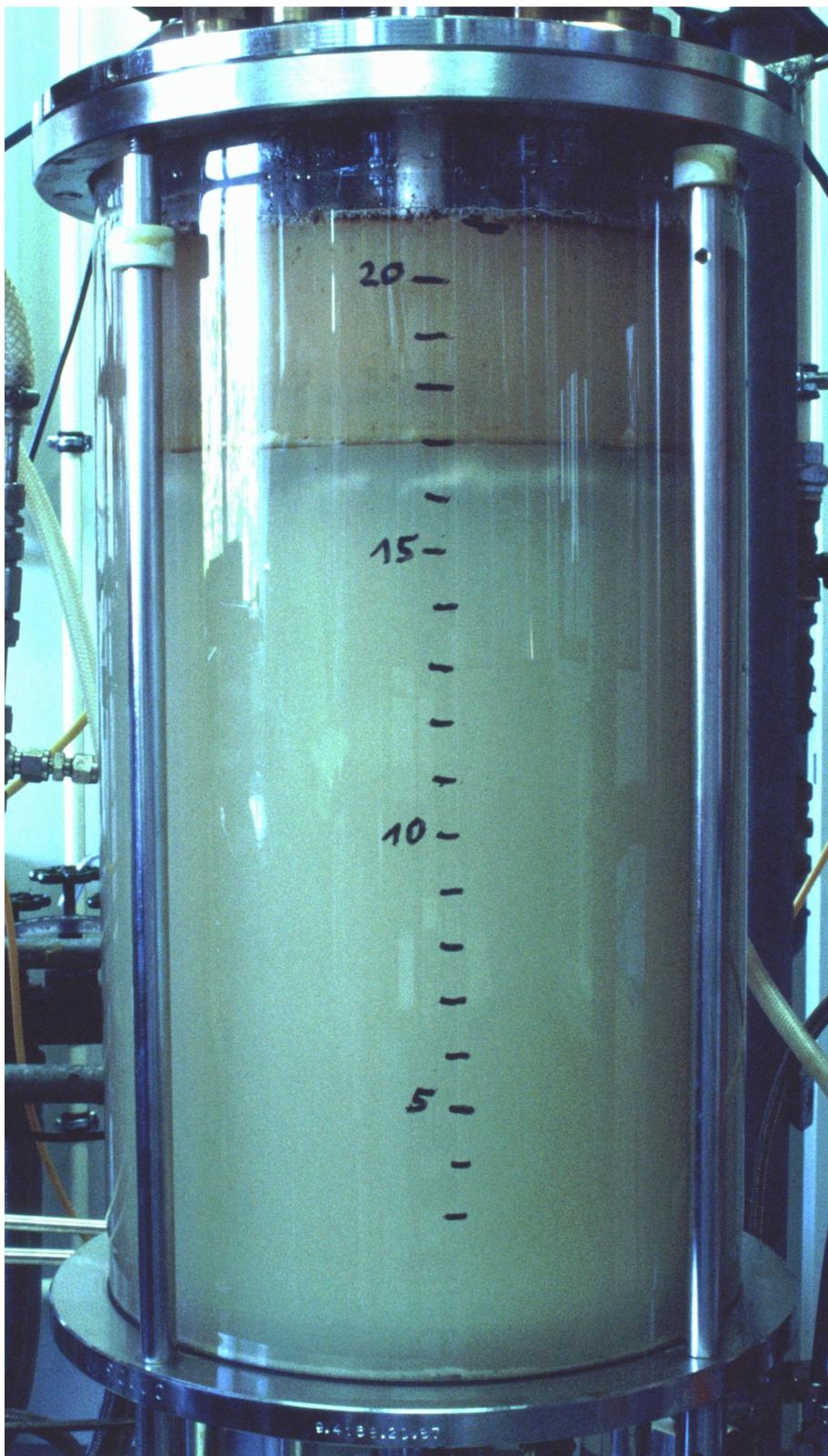


Abb. 3-2: Fermenter im Extraktionsbetrieb

Das beladene Extraktionsmittel wird in einer Glaskolonne mit Wasser bei einem Volumenstrom von 60 l/h und einer Temperatur von 60 °C im Gegenstrom reextrahiert. Die Reextraktionskolonne besitzt eine Stoffaustauschhöhe von 1 m, einen Innendurchmesser von 70 mm und einen Außendurchmesser von 85 mm. Das organische Lösungsmittel wird in Wasser dispergiert. **Abb. 3-3** zeigt das Tropfenregime in der Reextraktionskolonne. Durch die Dispergierung stellt sich ein Tropfendurchmesser von 3 bis 5 mm ein. Neben den großen Tropfen erkennt man eine große Zahl kleiner Tropfen, deren Durchmesser weniger als ein Millimeter beträgt. Diese Tropfen sind zu klein, um im Gegenstrom aufzusteigen und werden deshalb vom Wasser aus der Kolonne ausgetragen. Aufgrund der langen Verweilzeit dieser kleinen Tropfen lösen sie sich teilweise im Wasser. Bei einer Temperatur von 60 °C weist Imwitor 742 eine Randlöslichkeit von 0,54 Ma.-% in Wasser auf. Die Extraktionsmittelverluste betragen ein bis zwei Liter pro Woche.

Im rechten Teil des gezeigten Kolonnenabschnittes steigen mehr Tropfen auf als im linken Teil, was auf die örtlich unterschiedliche Wärmeabstrahlung an die Umgebung zurückgeführt wird. Direkt rechts neben der Kolonne befindet sich die Meß- und Regeleinheit der Fermentationsanlage, welche die Wärmeabstrahlung der Kolonne vermindert. Im Kolonnenkopf koaleszieren die Tropfen wieder zu einer homogenen Phase. Nach einer Filterung (Fa. Sartorius, Porenweite 0,2 µm) wird das regenerierte Extraktionsmittel rezirkuliert, so daß ein Kreislauf entsteht.

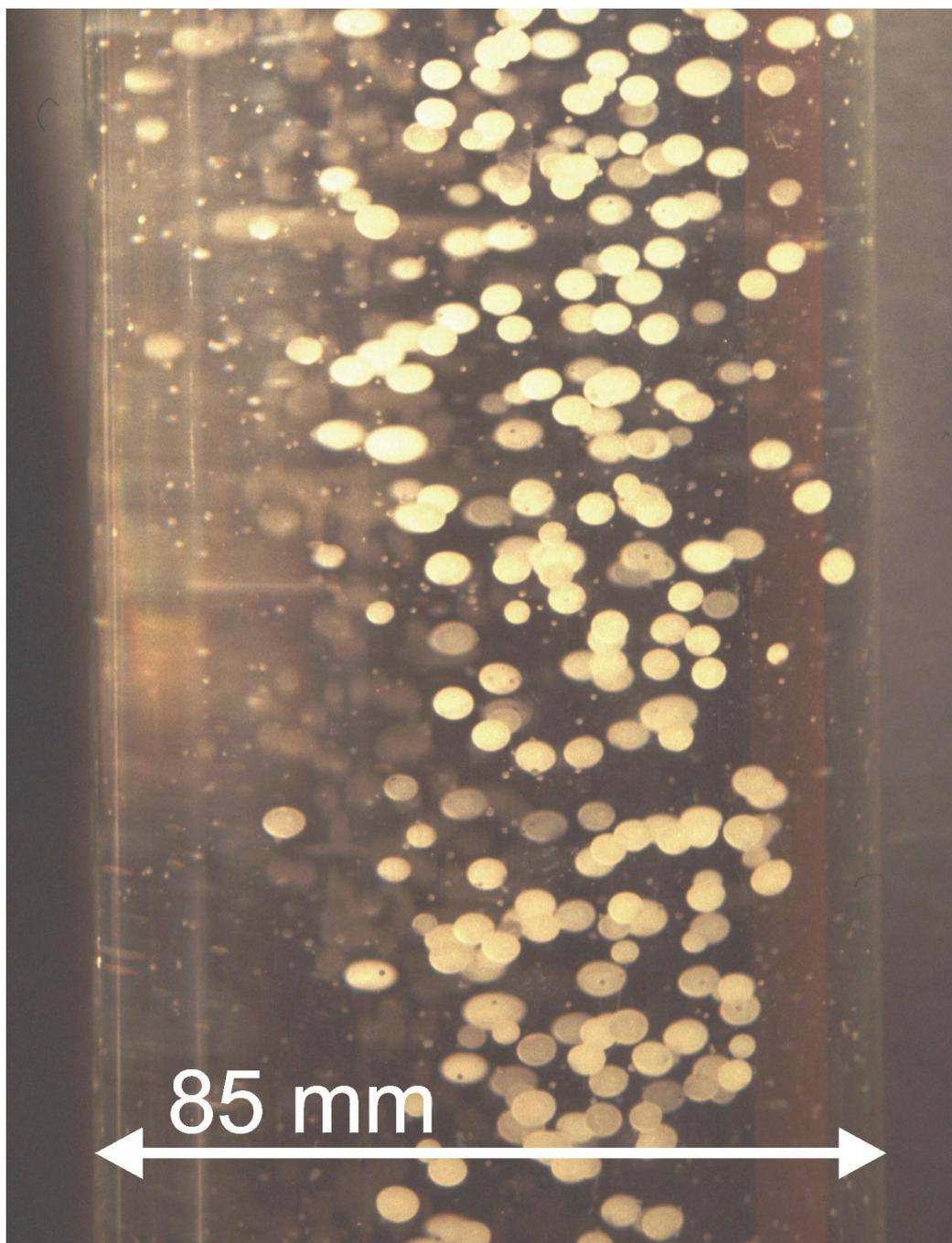


Abb. 3-3: Tropfenregime in der Reextraktionskolonne

Die für die Elektroextraktion notwendige elektrische Gleichspannung liefert im Bereich von 0 bis 250 V ein Netzgerät, wobei aus Sicherheitsgründen die maximale Stromstärke auf 50 mA begrenzt wird. Die Anode befindet sich 1,5 cm über, die Kathode 1,5 cm unter der Flüssig/Flüssig-Phasengrenze. Die beiden platinieren Gitterelektroden sind höhenverstellbar. Sie dämpfen die durch den großen Viskositätsunterschied erzeugte Wellen- und Trombenbildung an der Phasengrenze nicht ausreichend. An die untere Elektrode wird mittig eine Edstahlscheibe mit einem Durchmesser von 120 mm befestigt, um die Turbulenzen an der Phasengrenze zu reduzieren. Im Fermenter wird für alle spannungsführenden Teile wärmebeständiges PTFE (Polytetrafluorethylen) als Isolationsmaterial eingesetzt.

Der Fermenter, alle Zu- und Ablaufleitungen sowie Armaturen werden vor dem Animpfen sterilisiert. Zunächst werden ca. 15 l Substrat eingefüllt. Die Regelungseinheit besitzt ein integriertes automatisches Sterilisationsprogramm, das den Fermenter für die Dauer von 20 Minuten auf einer Temperatur von 121 °C thermostatisiert. Nach der Rückkühlphase auf die vorgesehene Betriebstemperatur von 60 °C werden über den mit einem Gummistopfen verschlossenen Animpfstutzen 500 ml Animpfkulturen aus zehn bis zwölf Schüttelkolben in den Fermenter gespritzt und die Laugenzufuhr aktiviert. Nach mehreren Stunden beginnen sich die Mikroorganismen zu vermehren. Die damit verbundene Trübung im Fermenter wird mittels Messungen der optischen Dichte (OD) quantifiziert, ab einem OD-Wert von ca. 1 wird auf kontinuierlichen Betrieb umgeschaltet. Zeigt die kontinuierliche Fermentation nach ca. drei bis vier Tagen stabile Parameter, wird mit der In-situ-Extraktion begonnen. Beim Erreichen günstiger Meßwerte wird die Elektroextraktion durch Hinzuschalten des elektrischen Feldes gestartet. Nach Fermentationszeiten von ein bis vier Wochen stellt sich ein stationärer Betriebszustand ein, und die Betriebsparameter werden entsprechend dem Versuchsprogramm geändert.

Der Fermentationsverlauf wird durch Messungen der optischen Dichte und des Laugenverbrauchs kontrolliert. Täglich werden je 5 Proben von 1,7 ml der gefilterten und ungefilterten Fermenterbrühe sowie des Wasserablaufes der Reextraktionskolonne gezogen (Einmalfilter 0,2 µm Porenweite, Fa. Schleicher & Schuell). Die Proben werden in Eppendorf-Schraubdeckelgefäßen bei einer Temperatur von

-20 °C eingefroren und für die HPLC-Analysen, die Zelltrockenmassenbestimmung und die Stärketests benötigt.

Tab. 3-6 gibt eine Übersicht sämtlicher durchgeführter Versuchsreihen. Der Extraktionsmittelstrom (6,67 l/h) und der Wasserstrom in der Reextraktion (60 l/h) werden konstant gehalten. Der Ablaufstrom wird im Bereich von 2 bis 12 l/d variiert. Die Stärkekonzentration des Substrates beträgt 20 bzw. 50 g/l. Die angelegte Spannung wird bei den letzten beiden Versuchen von 50 auf 250 V erhöht.

Tab. 3-6: Versuchsprogramm

Versuchsreihe	Stärkekonz. g/l	Ablauf l/d	Spannung V	Dauer h
Fermentation	20	2,44	-	820
Fermentation	20	4,00	-	290
Fermentation	20	5,62	-	210
Fermentation	20	11,08	-	250
Fermentation	50	5,15	-	490
Fermentation	50	10,88	-	190
Extraktion	20	4,90	-	420
Extraktion	50	7,20	-	530
Extraktion	20	11,25	-	220
Extraktion	50	11,25	-	130
Elektroextraktion	20	5,23	50	590
Elektroextraktion	50	5,47	50	290
Elektroextraktion	20	9,55	50	530
Elektroextraktion	50	9,82	50	220
Elektroextraktion	20	11,50	250	160
Elektroextraktion	50	11,49	250	140

3.2.4 Probleme bei der Versuchsdurchführung

Die Wahrscheinlichkeit des Anwachsens einer bakteriellen Kultur im Fermenter hängt wesentlich von der Qualität der Animpfkultur ab. Sie soll idealerweise aus der logarithmischen Wachstumsphase der Bakterien stammen. Bei der Verwendung von 10 Schüttelkolben mit einem Volumen von jeweils 50 ml trifft dies sicherlich nicht für alle Schüttelkolben zu. Im Idealfall beginnen die Bakterien im Fermenter sich sofort zu vermehren. Üblicherweise muß die Lag-Phase abgewartet werden, in der sich die Mikroben an die neuen Fermentationsbedingungen adaptieren. Nach einer zu langen Lag-Phase ist die Konzentration an Produkten der Karamelisierung und Maillard-Reaktion so groß, daß sich *T. thermosaccharolyticum* in einem solchen Medium nicht mehr vermehren kann. Bei der Maillard-Reaktion reagieren reduzierende Zucker mit freien Aminogruppen der Proteine. Die braun gefärbten Produkte sind schwer abbaubar und wirken stoffwechsellhemmend. Die Fermentation muß abgebrochen werden.

Die langen Versuchszeiten der kontinuierlichen Fermentationen von 130 bis 820 h (d. h. 34 Tage) führen zu erheblichen Problemen während des Fermentationsbetriebes. In den drei Schlauchpumpen für den Ablaufstrom, die Substrat- und Lauenzufuhr werden die Silikonschläuche im Dauerbetrieb stark belastet, so daß sie täglich auf Verschleiß kontrolliert sowie gegebenenfalls ersetzt werden müssen. Ein Ausfall einer Schlauchpumpe führt zum vorzeitigen Ende einer Versuchsreihe.

Während des Dauerbetriebes kommt es zu Ausfällungen von Carbonaten im Fermenter. Sie lagern sich an Einbauten wie den Stromstörern, den Rohrzuführungen sowie am Fermenterboden ab. Solche Bodenablagerungen sind bereits in **Abb. 3-2** zu erkennen. Falls sich davon Partikel lösen, können sie das Ernteventil und die Ablaufleitung der Fermentationsanlage verstopfen. Außerdem sedimentieren die Zellen in der Ablaufleitung aufgrund der niedrigen Strömungsgeschwindigkeit. Sind das Ernteventil oder die Ablaufleitung durch Ablagerungen verstopft, wird keine Zellbrühe aus dem Reaktor gefördert. Es gelangt deshalb auch kein frisches Substrat in den Fermenter. Die Bakterien sterben wegen Nährstoffman-

gels ab. Um störende Ablagerungen in der Ablaufleitung zu vermeiden, wird sie täglich mehrere Minuten lang mittels einer Dampf- und Stickstoffspülung gereinigt.

Wie die Ablaufleitung müssen auch die Zulaufleitungen für die Nährlösung täglich mit Dampf gespült werden. Obwohl die Wachstumsgeschwindigkeit der thermophilen Bakterien bei Raumtemperatur gering ist, gelingt es *T. thermosaccharolyticum* in den Zulaufleitungen entgegen der Strömungsrichtung zu wachsen. Die in den Fermenter gepumpte Nährlösung besitzt in diesem Fall nicht mehr die ursprüngliche Zusammensetzung. Die Substratlösung ist bereits mit mikrobiellen Stoffwechselprodukten angereichert, und ein Teil der Nährstoffe ist verbraucht. Die Kühlung der Zulaufleitungen auf eine Temperatur von 4 °C und der Einbau einer mechanischen Sperre in Form einer Tropfflasche können das Zurückwachsen der Bakterien in die Zulaufleitungen lediglich verzögern. Deshalb wird die Tropfflasche täglich gewechselt, die entsprechenden Leitungen werden mit Dampf sterilisiert sowie mit Stickstoff gespült. Unter Umständen muß bei einer Kontamination auch der Restinhalt der Vorratsbehälter für das Substrat verworfen werden.

Während der Extraktions- und Elektroextraktionsversuche neigen die Bakterien im Dauerbetrieb dazu, einen Biofilm auf der in der Bakterienbrühe befindlichen Gitterelektrode zu bilden. Der Biofilm verschlechtert den Austausch der Bakterienbrühe zwischen Gitterelektrode und Flüssig/Flüssig-Phasengrenze. **Abb. 3-4** zeigt eine Ausschnittsvergrößerung von **Abb. 3-2**. In beiden Abbildungen erkennt man im Abstand von 1,5 cm unter der Flüssig/Flüssig-Phasengrenze zwischen den schwarzen Füllstandsmarkierungen für 16 und 17 l den weißen, flockigen Bewuchs auf der Gitterelektrode. Trotz des Rührens gelingt es *T. thermosaccharolyticum*, sich auf der Oberfläche festzusetzen und sich dort zu vermehren. Bei zu starker Biofilmbildung muß die Fermentation vorzeitig abgebrochen werden, weil zur Reinigung der Elektrode der Fermenter geöffnet werden muß.

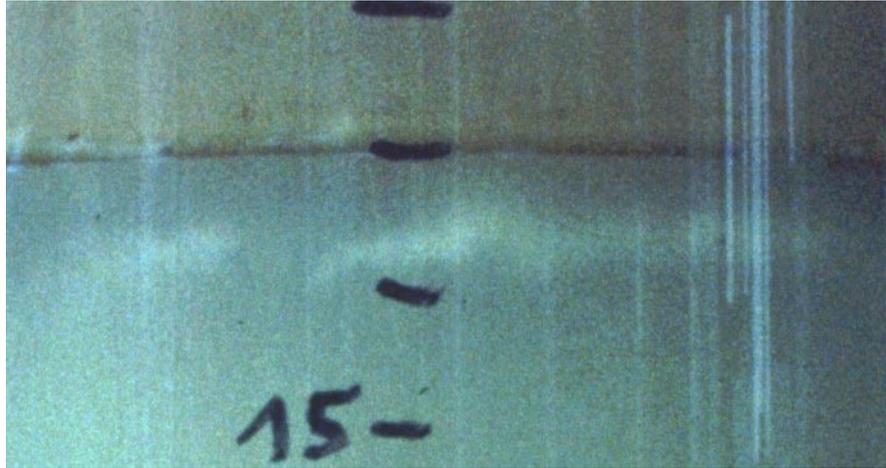


Abb. 3-4: Biofilmbildung durch *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* an der in der Bakterienbrühe befindlichen Gitterelektrode

Ein Versuchsabbruch kann auch durch Anlagerungen toter Zellen an der Flüssig/Flüssig- sowie der Flüssig/Gas-Phasengrenze verursacht werden. **Abb. 3-5** (Ausschnittsvergrößerung von **Abb. 3-2**) zeigt beide Phasengrenzen im Fermenter während einer kontinuierlichen Fermentation mit In-situ-Extraktion. Die Flüssig/Flüssig-Phasengrenze an der Füllstandsmarkierung für 17 l ist durch die Braunfärbung deutlich erkennbar. Sie wird durch die Ansammlung abgestorbener Zellen verursacht. An der Flüssig/Gas-Phasengrenze an der Füllstandsmarkierung für 21 l befindet sich an der Glasinnenseite ein brauner Belag aus toten Zellen. Auf welche Weise die Zellen aus der Fermentationsbrühe durch die Extraktionsmittelpphase hindurch dorthin gelangen, ist ungeklärt. Die Anlagerungen an der Flüssig/Flüssig-Phasengrenze verhindern den Stoffübergang der Stoffwechselprodukte aus der Fermentationsbrühe in die Extraktionsmittelpphase. Durch die Zellanreicherungen an der Flüssig/Gas-Phasengrenze kann es zu Verstopfungen im Leitungssystem des Extraktionsmittels kommen. Eine Absaugung der Anlagerungen an den Phasengrenzen ist während des Fermentationsbetriebes nicht durchführbar. Bei zu starker Verschmutzung muß der Fermentationsbetrieb beendet werden.

In **Abb. 3-5** sind an der Flüssig/Gas-Phasengrenze Gasblasen erkennbar. *T. thermosaccharolyticum* produziert neben Alkoholen und Carbonsäuren auch die

Gase Kohlendioxid und Wasserstoff. Sie steigen als Gasblasen auf, wenn die maximale Löslichkeit in der Fermentationsbrühe überschritten ist. Des Weiteren bilden sich an den Gitterelektroden die Elektrolysegase Sauerstoff und Wasserstoff, die nach Passieren der Extraktionsmittelphase ebenfalls in den Gasraum des Fermenters gelangen.

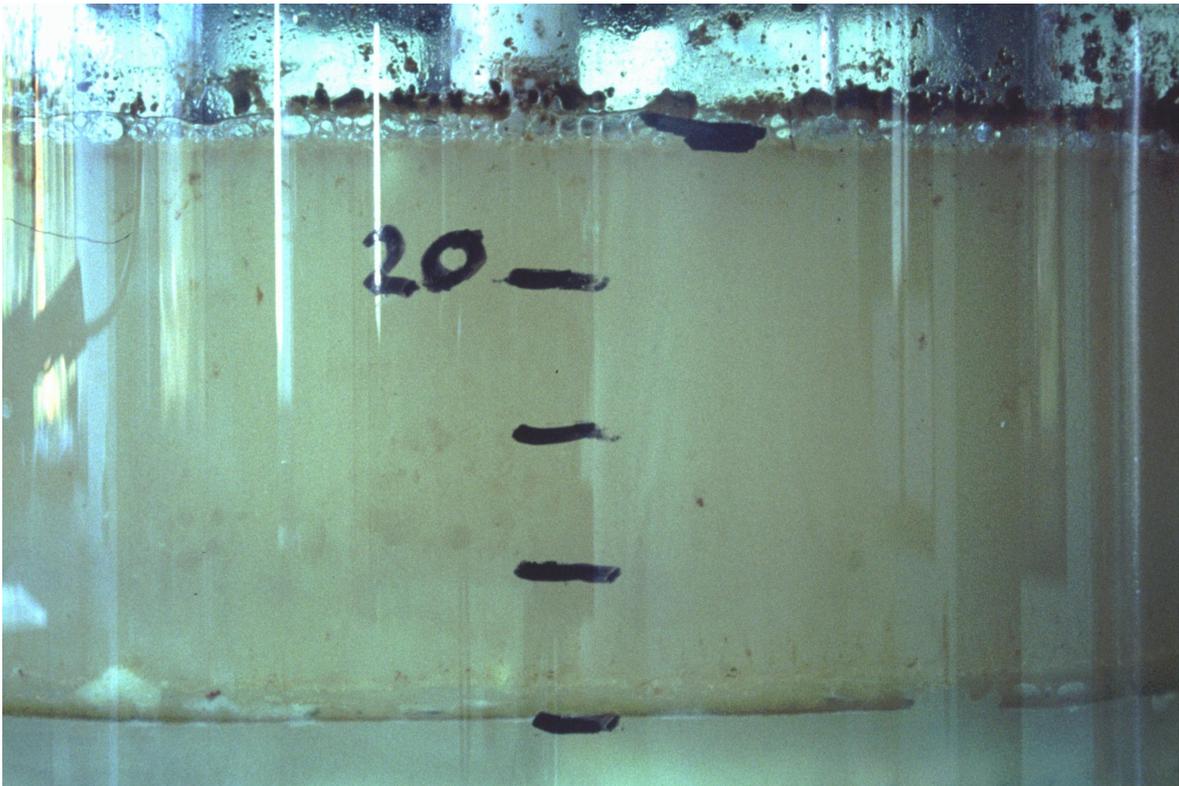


Abb. 3-5: Flüssig/Flüssig-Phasengrenze und Flüssig/Gas-Phasengrenze im Fermenter mit Extraktionsbetrieb

Die hier geschilderten Probleme bei der Versuchsdurchführung führten oft zu vorzeitigen Versuchsabbrüchen, so daß die Durchführung einiger Versuchsreihen mehrfach wiederholt werden mußte. Dadurch wurde der Aufwand für die Experimente stark erhöht.

3.3 Konzentrationsbestimmungen

3.3.1 Messung der optischen Dichte

Durch das Wachstum der Bakterien ergibt sich eine Trübung der Fermenterbrühe. Diese Trübung nutzt man in den Verfahren der Trübungsanalyse aus, um die Konzentration von Zellen oder Partikeln einer Suspension mittels eines durch die Suspension gehenden Lichtstrahls zu bestimmen. Ein Maß für die Abnahme des durchgelassenen Lichts ist die optische Dichte (OD), die als Logarithmus $\log_{10} = (I_0 / I)$ definiert ist, wobei I_0 die Intensität des Referenzlichtstrahls ist.

$$OD = \log_{10}(I_0 / I) \quad (3-1)$$

Für einen vorgegebenen Zelltyp ist die optische Dichte direkt proportional zur Konzentration der Zellen.

$$OD \sim c_{Zellen} \quad (3-2)$$

Diese Proportionalität gilt allerdings nur in einem eingeschränkten Wertebereich (*Singelton und Sainsbury 1996*). Die Messungen erfolgen in einem Spektralphotometer (Spectronic 1001, Fa. Bausch & Lomb) bei einer Wellenlänge von 580 nm mit Einmal-Küvetten (Plastibrand, Fa. Brand). Der Meßwert ergibt sich aus der Differenz zwischen der optischen Dichte der Brühe und der optischen Dichte der gefilterten Probe.

3.3.2 Bestimmung der Zelltrockenmasse

Zur Bestimmung der Zelltrockenmasse wird 1 ml Fermentationsbrühe durch einen zuvor gewogenen Filter mit 0,2 µm Porenweite (Fa. Gelman Sciences) gepreßt. Das Filterpapier mit dem Filterkuchen trocknet man 24 h im Trockenschrank bei einer Temperatur von 120 °C. Aufgrund der hygroskopischen Eigenschaften des Filterpapiers läßt man den Filterkuchen zusammen mit dem Filter anschließend 1 h an der Umgebungsluft mit Luftfeuchtigkeit absättigen. Die gesuchte Trockenmasse bestimmt sich aus der Massendifferenz zwischen dieser Probe und dem unbenutzten Filterpapier. Da Stärkemoleküle das Filterpapier nicht passieren, muß im Falle des Vorhandenseins von Reststärke in der Brühe diese bei der Zelltrochkenmassenbestimmung berücksichtigt werden. Dazu wird die Reststärkekonzentration ermittelt und von der zunächst bestimmten Trockenmassenkonzentration abgezogen.

3.3.3 Bestimmung der Produktkonzentrationen mit HPLC

Die Quantifizierung der löslichen Fermentationsprodukte erfolgt mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Die Trennsäule der HPLC-Apparatur wurde bereits erfolgreich zur Trennung von Gemischen aus Alkoholen, Aldehyden, Ketonen, Kohlehydraten, organischen Säuren und Fettsäuren eingesetzt (*Pecina et al. 1983*). In der folgenden Aufstellung ist der Umfang der HPLC-Apparatur zusammengefaßt:

Tab. 3-7: Umfang der HPLC-Apparatur

Komponente	Hersteller	Bezeichnung
Entgaser	Shodex Degas	KT-37
Pumpe	Perkin Elmer	Binary LC Pump Model 250
Automatischer Probenaufgeber	Perkin Elmer	ISS 200
Vorsäule	BioRad	Micro Guard Cation H+
Säulen-Thermostatisiereinheit	Spark Holland	Mistral
Trennsäule	BioRad	HPX-87H
UV/VIS-Detektor	Perkin Elmer	LC-295
RI-Detektor	Perkin Elmer	LC-30
Interface 1	Perkin Elmer	900er Serie
Interface 2	Perkin Elmer	600er Serie
Interface 3	Perkin Elmer	Nelson 950A/970A

Die Ausgabe der Daten erfolgt auf einem PC, auf dem mit der Perkin Elmer-Software die Chromatogramme ausgewertet werden.

Mayer (1995) entwickelte für die Trennsäule BioRad HPX-87H eine Analysenmethode für Fermentationsbrühen von *T. thermosaccharolyticum*. Die charakteristischen Betriebsbedingungen sind in **Tab. 3-8** zusammengefaßt.

Tab. 3-8: Betriebsbedingungen der HPLC-Apparatur

Eluent (mobile Phase)	5,0 mM H ₂ SO ₄
Spülflüssigkeit	5,0 mM H ₂ SO ₄
Flußrate	0,8 ml/min
Hauptsäulentemperatur	45 °C
Vorsäulentemperatur	Raumtemperatur
Sampling Rate	2,5 pts/s
Injektionsvolumen	10 µl
Spülvolumen	1000 µl
Ruhefluß	0,05 ml/min
max. Druck	1500 PSI
max. Hauptsäulentemperatur	65 °C (bei Regeneration)

Um die Produktkonzentration der Fermentationsproben in quantitativer Form zu erhalten, ist eine Kalibrierung mit Proben definierter Zusammensetzung nötig (siehe **Tab. 3-9**).

Tab. 3-9: Stoffwerte der Kalibriersubstanzen

Substanz	Hersteller	molare Masse g/mol
Glucose-Monohydrat p.a.	Merck	198,17
Lactat p.a.	Fluka	90,08
Acetat p.a.	Merck	60,05
Ethanol p.a.	Merck	46,07
Butyrat p.a.	Merck	88,11
n-Butanol p.a.	Merck	74,12

Die Konzentrationen der einzelnen Kalibrierproben sind in **Tab. 3-10** zusammengestellt:

Tab. 3-10: Konzentrationen der Kalibrierproben

Substanz	Konzentration g/l				
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
Glucose	20,0	5,0	1,0	0,5	0
Lactat	0	0,5	1,0	5,0	20,0
Acetat	0	0,2	0,5	2,0	10,0
Ethanol	0	0,2	0,5	2,0	10,0
Butyrat	0	0,2	0,5	1,0	5,0
n-Butanol	0	0,2	0,5	1,0	5,0

Da die Kalibrierung basierend auf Peakflächen in den meisten Fällen der Peakhöhenauswertung überlegen ist, werden die Detektoren auf Peakflächen kalibriert. Für alle Stoffe erhält man mit dieser Methodik über dem gesamten Meßbereich der Detektoren einen linearen Zusammenhang zwischen Substanzkonzentration und Peakfläche. Für die Retentionszeiten der Reinstoffe ergeben sich die in **Tab. 3-11** aufgeführten Werte. Aufgrund unterschiedlicher Leitungslängen differieren die Retentionszeiten von UV/VIS- und RI-Detektor.

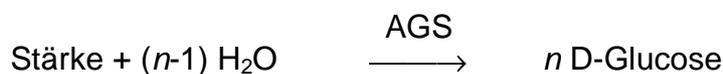
Tab. 3-11: Retentionszeiten der Substanzen

Substanz	Retentionszeit min	
	UV/VIS-Detektor	RI-Detektor
Glucose	-	7,185
Lactat	9,940	10,120
Acetat	11,795	11,980
Ethanol	-	16,815
Butyrat	17,265	17,440
n-Butanol	-	29,355

Nach jedem Säulenwechsel, jeder Säulenregeneration oder jedem anderen Eingriff in das HPLC-System wird die Kalibrierung erneut durchgeführt.

3.3.4 Bestimmung der Stärkekonzentrationen

Für die Bestimmung der Stärkekonzentrationen in den Fermentationsbrühen wird ein UV-Test zur Bestimmung von nativer Stärke in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien (Best.-Nr. 207 748) der Fa. Roche Diagnostics (ehemals Fa. Boehringer Mannheim) verwendet. Der enzymatische Bioanalytik-Test funktioniert nach folgendem Prinzip: Stärke wird durch das Enzym Amyloglucosidase (AGS) bei einer Temperatur von 55-60 °C und pH-Wert=4,6 in D-Glucose gespalten.



Die gebildete D-Glucose wird bei einem pH-Wert=7,6 mit den Enzymen Hexokinase (HK) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) bestimmt. D-Glucose wird mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP) in Gegenwart von Hexokinase zu D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) phosphoryliert unter gleichzeitiger Bildung von Adenosin-5'-diphosphat (ADP) (Raumtemperatur).



G-6-P wird mit Nicotinamid-dinucleotidphosphat (NADP) in Gegenwart von G-6-P-DH zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert, wobei reduziertes Nicotinamid-dinucleotidphosphat (NADPH) entsteht (Raumtemperatur).



Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der durch Hydrolyse der Stärke gebildeten D-Glucose-Menge proportional. NADPH ist die Meßgröße, die aufgrund seiner Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt wird (UV/VIS-Spektrometer Lambda 2, Fa. Perkin Elmer). Die zugehörige Glucosekonzentration c_G berechnet sich nach der folgenden Gleichung:

$$c_G = \frac{V \cdot \tilde{M}_G}{\varepsilon \cdot d \cdot \nu} \cdot \Delta E \quad (3-3)$$

Darin steht V für das Testvolumen (2,32 ml), ν für das Probevolumen (0,1 ml), \tilde{M}_G für das Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz (Glucose=180,1 g/mol) und d für die Schichtdicke (1 cm). Der Term ΔE beschreibt die Differenz aus der Extinktionsdifferenz der Probe und der Extinktionsdifferenz der Reagenzien. Der Extinktionskoeffizient ε von NADPH hat bei der gewählten Wellenlänge von 340 nm einen Wert von 6,3 l/(mmol·cm). Roche Diagnostics liefert die drei Enzympräparate in Form von zwei Lösungen (AGS, Puffer) und einer Suspension (HK und G-6-P-DH) zusammen mit einer Standard-Stärkesubstanz, die zur Kalibrierung des Photometers verwendet werden kann. Der Bestimmungssatz kann bis zu einer Stärkekonzentration von 0,7 g/l ohne Probenverdünnung angewendet werden.

4 Ergebnisse

4.1 Immobilisierung

Die **Abb. 4-1** bis **Abb. 4-4** sind Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen vom Inneren der Matrix-Körner, die aus Versuchen zur Immobilisierung von *T. thermosaccharolyticum* auf der Matrix Aquacel mit den Substraten Glucose und lösliche Stärke stammen.

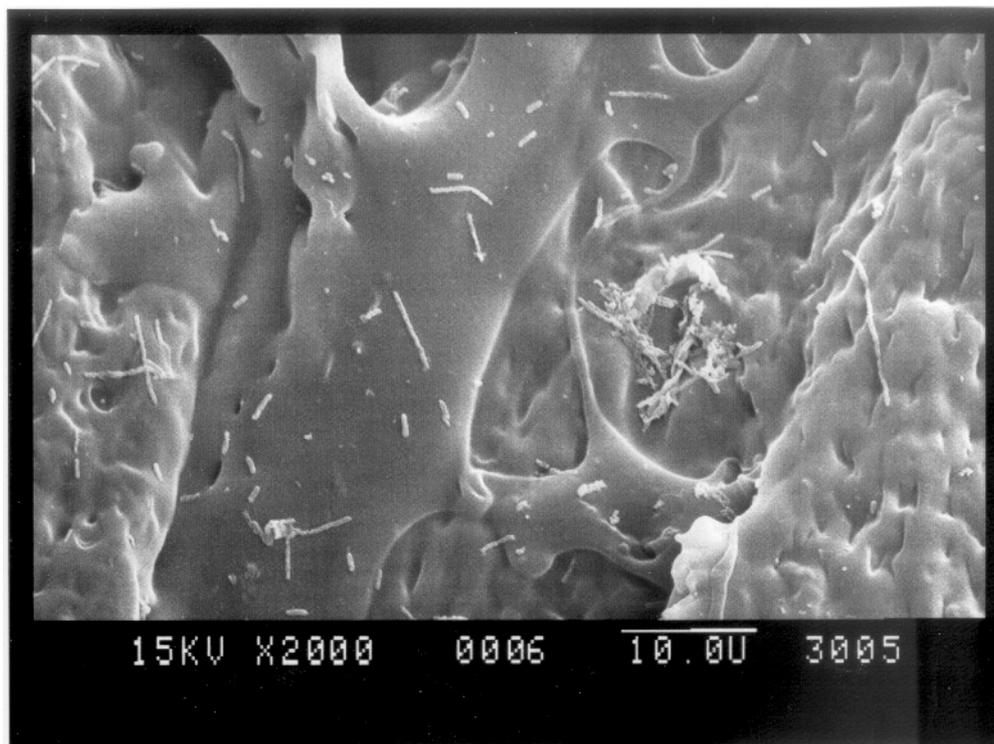


Abb. 4-1: REM-Aufnahme vom Inneren eines Matrix-Korns, Substrat: Glucose, Spülmittel: 10 prozentige Formaldehydlösung, Vergrößerungsfaktor: 2000

Aufgrund der Tiefenschärfe der REM-Aufnahmen sind die räumliche, schwammartige Struktur und die zerklüftete Oberfläche der Körner sehr gut erkennbar. Die Bakterien sind als weiße, stäbchenförmige Gebilde mit einer Größe von ein bis zehn Mikrometer auf der denaturierten Zelloberfläche zu sehen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wandern die Bakterien selbständig in das Innere der Körner und besiedeln dort die Oberfläche. Die Ausschnittsvergrößerungen (**Abb. 4-2** und **Abb. 4-4**) aus den Zentren der Aufnahmen mit 2000facher Vergrößerung zeigen Ansätze zur Koloniebildung der Bakterien.

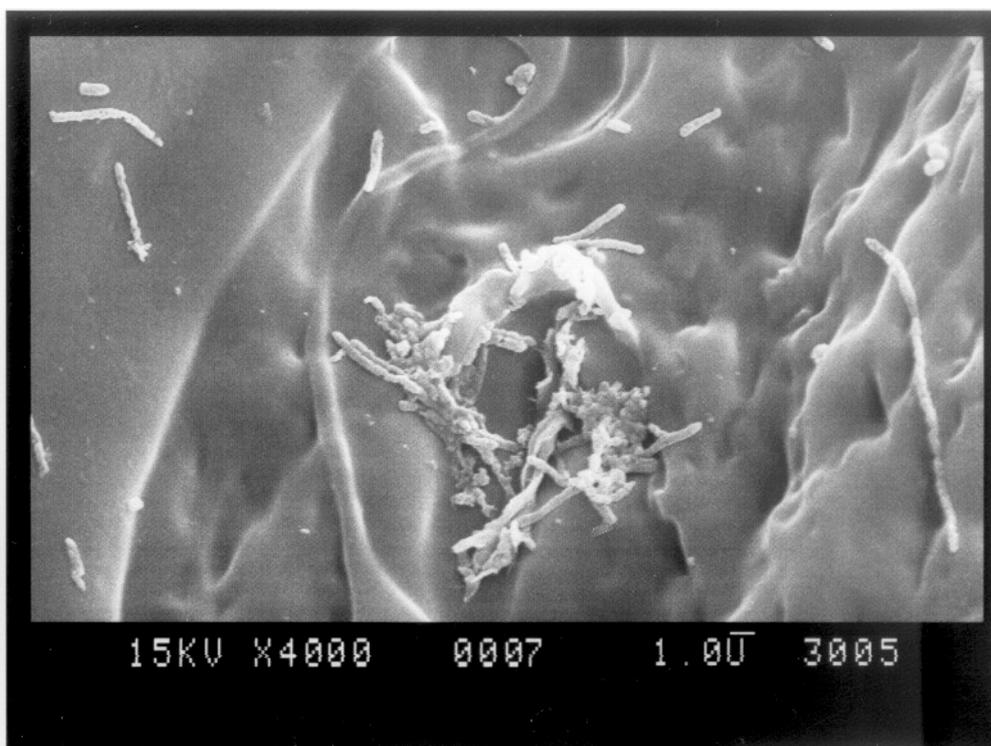


Abb. 4-2: REM-Aufnahme vom Inneren eines Matrix-Korns (Ausschnittsvergrößerung von obiger REM-Aufnahme), Substrat: Glucose, Spülmittel: 10 prozentige Formaldehydlösung, Vergrößerungsfaktor: 4000

Allerdings kann man noch keinen flächendeckenden Biofilm erkennen. Die Bildqualität der Aufnahmen, die aus den Versuchen mit Glucose stammen, ist wesentlich besser, als die der Bilder aus den Versuchen mit löslicher Stärke. Die verminderte Schärfe ist auf Verunreinigungen der Oberfläche zurückzuführen. Es handelt sich hierbei um Rückstände des Kultivierungsmediums, die trotz zweimaligen Spülens mit Wasser nicht entfernt werden können. Im Gegensatz zu

Glucose bildet Stärke in wässriger Lösung zusammen mit den anderen Bestandteilen des Mediums eine schleimartige, viskose und trübe Flüssigkeit, die von der Zelluloseoberfläche nicht vollständig entfernt werden kann.

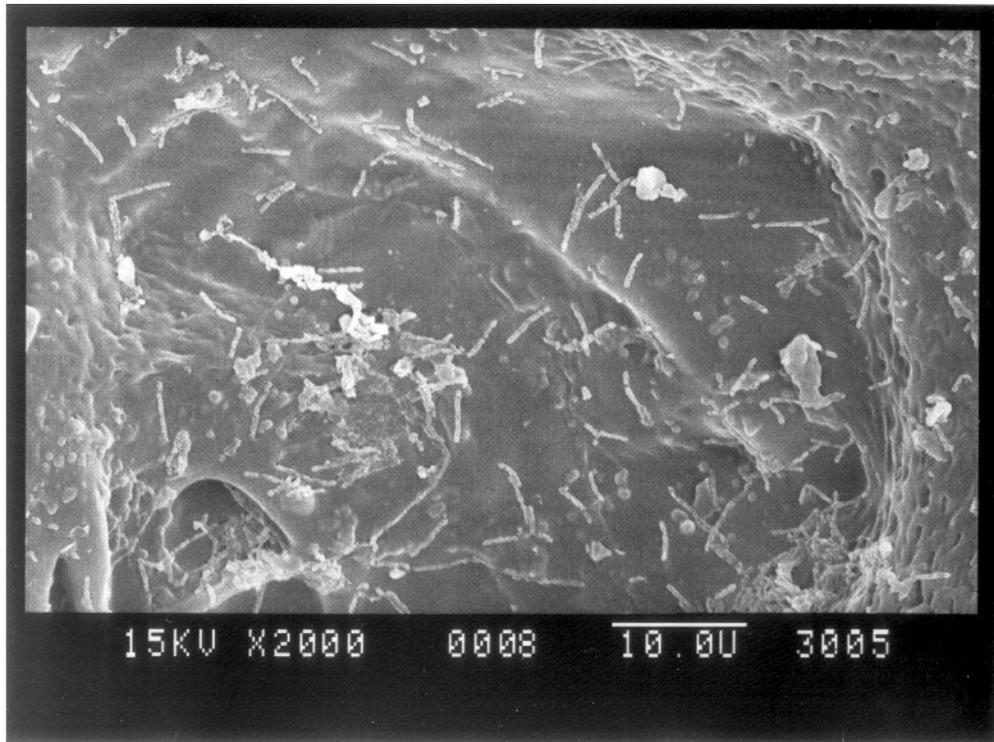


Abb. 4-3: REM-Aufnahme vom Inneren eines Matrix-Korns, Substrat: lösliche Stärke, Spülmittel: Wasser, Vergrößerungsfaktor: 2000

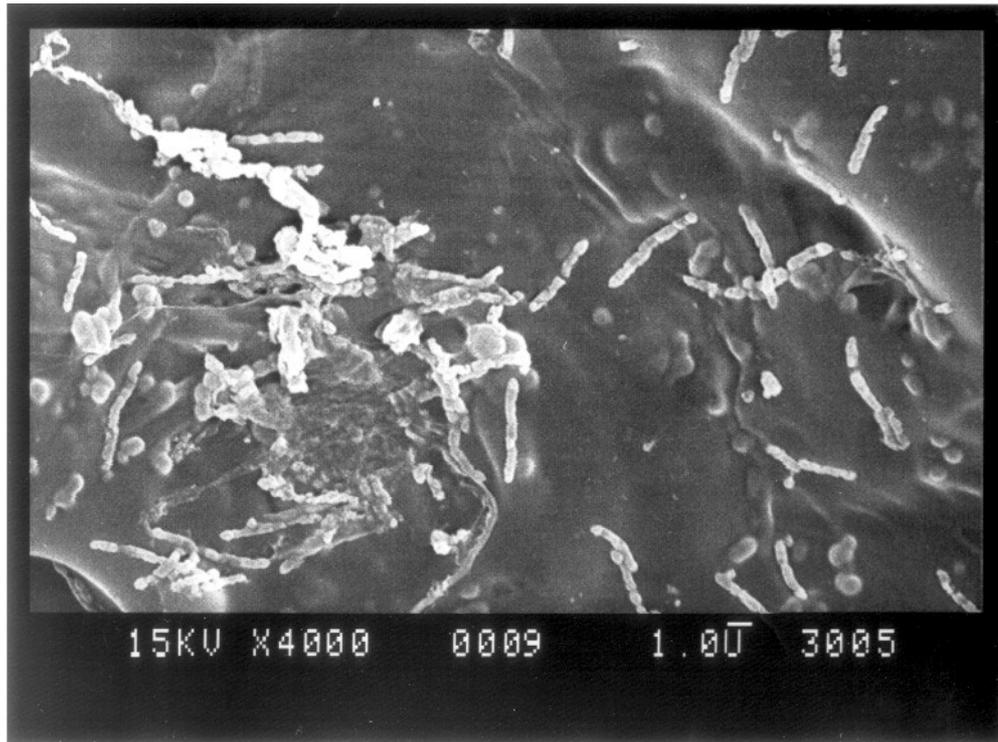


Abb. 4-4: REM-Aufnahme vom Inneren eines Matrix-Korns (Ausschnittsvergrößerung von obiger REM-Aufnahme), Substrat: lösliche Stärke, Spülmittel: Wasser, Vergrößerungsfaktor: 4000

Eine Aussage über den Anteil der Bakterien, die tatsächlich die Körner bevölkern und nicht in der Submerskultur verbleiben, könnte nur auf der Grundlage weiterer Untersuchungen gemacht werden. Des weiteren müßte geklärt werden, ob die Matrixeinhüllung die Stoffwechselleistung der Mikroorganismen beeinträchtigt, weil die Matrixumgebung den Stoffaustausch der Zellen einschränken kann. Außerdem steht durch die Fixierung der Zelle auf der Oberfläche ein Teil der Zellwand nicht mehr zur Stoffaufnahme und Stoffabgabe zur Verfügung. Die Arbeiten bezüglich der Immobilisierung von *T. thermosaccharolyticum* auf Aquacel werden an dieser Stelle nicht weiter geführt, weil im Zusammenhang mit den geplanten Untersuchungen zur In-situ-Extraktion und In-situ-Elektroextraktion zu viele Schwierigkeiten zu erwarten sind, so daß die Vorgänge im Fermenter zu komplex werden würden.

4.2 Kontinuierliche Fermentationen

Ziel eines kontinuierlichen Betriebes ist das Erreichen und Aufrechterhalten eines stationären Zustandes. Grundvoraussetzung hierfür ist das exakte Konstanthalten der Fermentationsbedingungen, wobei je nach Durchflußzeit lange Wartezeiten eingehalten werden müssen. Betrachtet man den Fermenter vereinfacht als kontinuierlich betriebenen, vollständig durchmischten Idealkessel (KIK), so läßt sich ausgehend von einer Stoffbilanz die Reaktorgleichung nach Gl. 4-1 aufstellen.

$$\frac{dN}{N} = -\frac{\dot{V}}{V_F} dt \quad (4-1)$$

Nach Integration und Umstellung erhält man Gl. 4-2.

$$t = -\frac{\dot{V}}{V_F} \ln \frac{N}{N_0} \quad (4-2)$$

Diese gibt die Zeit t an, die bei vorgegebenem Volumenstrom \dot{V} und bei bekanntem Fermentervolumen V_F nötig ist, bis sich eine Änderung der Stoffmenge von N_0 auf N einstellt. Bei einem Fermentervolumen von 16 l und einem Volumenstrom von 2,44 l/d dauert es 4,5 Tage, bis die Konzentration eines Stoffes um 50 % reduziert ist. Eine Reduzierung der Konzentration um 99 % ist erst nach 30 Tagen erreicht.

Weilhammer (1993) postulierte folgendes Kriterium für einen stationären Zustand: Über einen Zeitraum von ca. 100 Stunden dürfen sich die Konzentrationen kaum mehr verändern, und der auf Grundlage von Selektivitäten definierte Bilanzfehler muß kleiner als 20 % sein.

Die Fermentationsbrühen werden erst analysiert, nachdem die Fermentationen längst abgeschlossen sind. Die Meßgrößen optische Dichte als Maß für die Anzahl der Zellen und der Laugenverbrauch als Maß für die mikrobielle Säureproduktion können quasi on-line gemessen werden. Deshalb werden optische Dichte und Laugenverbrauch im Rahmen dieser Arbeit für die Definition eines stationären Zustandes herangezogen:

Ein Betriebszustand wird als stationär betrachtet, wenn während eines Zeitraumes von mindestens 72 Stunden die optische Dichte um weniger als 0,05 vom zeitlichen Mittelwert abweicht und der Verbrauch an Kalilauge konstant ist.

Bei den kontinuierlichen Fermentationen werden die Konzentration von löslicher Stärke im Substrat und der Ablaufvolumenstrom variiert. Die Betriebsdaten und die gemessenen Konzentrationen für diese stationären Zustände sind in **Tab. 4-1** aufgelistet.

Tab. 4-1: Betriebsdaten und Konzentrationen kontinuierlicher Fermentationen (KF1 bis KF6)

Betriebsdaten				
Versuchsreihe	Stärke-Konz. g/l	Ablauf l/d	KOH l/d	Zulauf l/d
KF1	20	2,44	0,32	2,12
KF2	20	4,00	0,60	3,40
KF3	20	5,62	0,86	4,76
KF4	20	11,08	1,67	9,41
KF5	50	5,15	1,34	3,81
KF6	50	10,88	2,89	7,99

Konzentrationen in der Brühe								
Versuchsreihe	OD ₅₈₀ -	Tr.-ma. g/l	Glucose g/l	Lactat g/l	Acetat g/l	Ethanol g/l	Butyrat g/l	n-Butanol g/l
KF1	1,70	10,20	0,0177	0	14,7618	0,1349	0,2325	0
KF2	1,62	9,20	0,0495	1,0353	11,4324	1,4663	0,0704	0
KF3	1,57	10,50	0,0349	1,2178	8,7677	2,5302	0	0
KF4	1,60	9,60	0,0282	1,0028	7,5965	2,6441	0	0
KF5	1,70	12,23	4,0320	1,0110	13,2460	4,0080	0	0
KF6	1,80	13,80	1,1152	7,2445	7,0950	5,8007	0	0

Die Erhöhung des Ablaufvolumenstromes führt zu einer Zunahme des Substratzulaufes, so daß die Bakterien mehr Stärke verstoffwechseln und somit auch mehr Lauge verbraucht wird. Die optische Dichte liegt zwischen 1,57 und 1,80. Allerdings läßt sich kein direkter Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Zelltrockenmasse feststellen, wie ihn *Weilhammer (1993)* postulierte. Bei den auf löslicher Stärke basierenden Fermentationen mit *T. thermosaccharolyticum* ist die optische Dichte eine komplexe Funktion von Zelldichte, Stärkemolekülen und anderen Brühenbestandteilen.

Während der Versuche mit der niedrigen Stärkekonzentration von 20 g/l im Zulauf kann mit der HPLC-Analytik keine freie Glucose nachgewiesen werden. Auch mit

den Stärketests läßt sich keine Restglucose finden. Offensichtlich werden die Stärkepolymere sofort hydrolysiert und die Monomere anschließend von den Zellen aufgenommen. Erst bei Stärkekonzentrationen von 50 g/l im Zulauf wird Reststärke in der Fermenterbrühe detektiert, was auf eine Produkthemmung hinweist.

Lactat wird zunächst als Nebenprodukt gebildet, lediglich bei größerem Stärkeangebot wird mehr Milchsäure produziert. Bei geringem Stärkeangebot ist Acetat das Hauptprodukt, dessen Menge zugunsten von Ethanol abnimmt, wenn die Stärkezufuhr gesteigert wird. Wenn *T. thermosaccharolyticum* im Batch-Betrieb fermentiert wird, betreiben die Bakterien den C₄-Stoffwechsel und stellen n-Butanol und Butyrat her. Im kontinuierlichen Betrieb stellt *T. thermosaccharolyticum* die n-Butanol- und Butyrat-Produktion zugunsten anderer Stoffwechselprodukte ein. Lediglich bei geringem Stärkeangebot ist etwas Butyrat in der Fermenterbrühe nachweisbar.

Um die Ursache dieser Degeneration herauszufinden, werden Schüttelkolben mit Animpfgut aus kontinuierlichen Fermentationen angeimpft. Mit diesem ersten Satz Schüttelkolbenkulturen wird ein zweiter Satz Schüttelkolben inkubiert und die Fermenterbrühen nach abgeschlossener Batch-Fermentation mit der HPLC analysiert. Schon der erste Satz Schüttelkolbenkulturen produziert wie der zweite in charakteristischer Weise wieder n-Butanol (ca. 1,1 g/l) und Butyrat (ca. 2,1 g/l). Deshalb kann vermutet werden, daß die Degeneration bei kontinuierlichen Fermentationen nicht genetisch bedingt ist, sondern durch die Fermentationsbedingungen verursacht wird. Möglicherweise liegt eine Deaktivierung nicht chromosomaler DNA, eines Plasmids, vor.

4.3 Mathematische Modellierung

Ein Modell ist die vereinfachte, auf die wesentlichen Parameter reduzierte Beschreibung eines Sachverhaltes. Modelle, die angeben, wie ein System sich unter bestimmten Bedingungen verhält, ohne zu berücksichtigen, was sich im Inneren des Systems (Zelle) abspielt, nennt man unstrukturierte oder „black box“ Modelle. Unstrukturierte Modelle sind rein beschreibende, empirische Modelle, die keine Erklärungen der beobachteten Effekte geben. Entsprechend spricht man von strukturierten Modellen, wenn das Modell eine gewisse Differenzierung des Systems (Zelle) berücksichtigt (Mutzall (1994), Sinclair et al. (1993)).

Die eigenen Ansätze mit reaktionskinetischen Gleichungen verschiedener Ordnungen und Michaelis-Menten-Gleichungen zur Entwicklung eines strukturierten Modells für den Metabolismus von *T. thermosaccharolyticum* in kontinuierlichen Fermentationen, das auf den Versuchsdaten und den Kenntnissen über die Stoffwechselfade beruht, führten nur zu unbefriedigenden Ergebnissen. Auch die Übertragung der Modelle von *Weilhammer (1993)* oder von *Honorato da Silva et al. (1999)*, die beide Produktinhibierung und Produktabzug berücksichtigen, zeigt keine zufriedenstellende Übereinstimmung von Simulation und Realität. Deshalb wird die Beschreibung der biologischen Prozesse in dieser Arbeit auf einfache, empirische Bildungsgeschwindigkeitsgleichungen für die Hauptprodukte Lactat, Ethanol und Acetat in Abhängigkeit des Substratangebotes reduziert. Das Modell soll die stationären Fermentationszustände ohne Extraktion und Elektroextraktion beschreiben. Es wird angenommen, daß der Fermenter ideal durchmischt ist und durch mikrobielle Prozesse verursachte Volumen- sowie Dichteänderungen vernachlässigbar sind. Der Ablaufvolumenstrom \dot{V}_A ist die Summe aus Substratzulauf-Volumenstrom \dot{V}_S und Laugenzulauf-Volumenstrom \dot{V}_{KOH} .

$$\dot{V}_A = \dot{V}_S + \dot{V}_{KOH} \quad (4-3)$$

Diese Annahme wird experimentell überprüft und bestätigt. In **Abb. 4-5** wird deutlich, daß die Abhängigkeit des Laugenverbrauches vom Ablaufstrom durch Ursprungsgeraden beschrieben werden kann, deren Steigungen s von den Stärkekonzentrationen im Substrat c_{gS} abhängig sind.

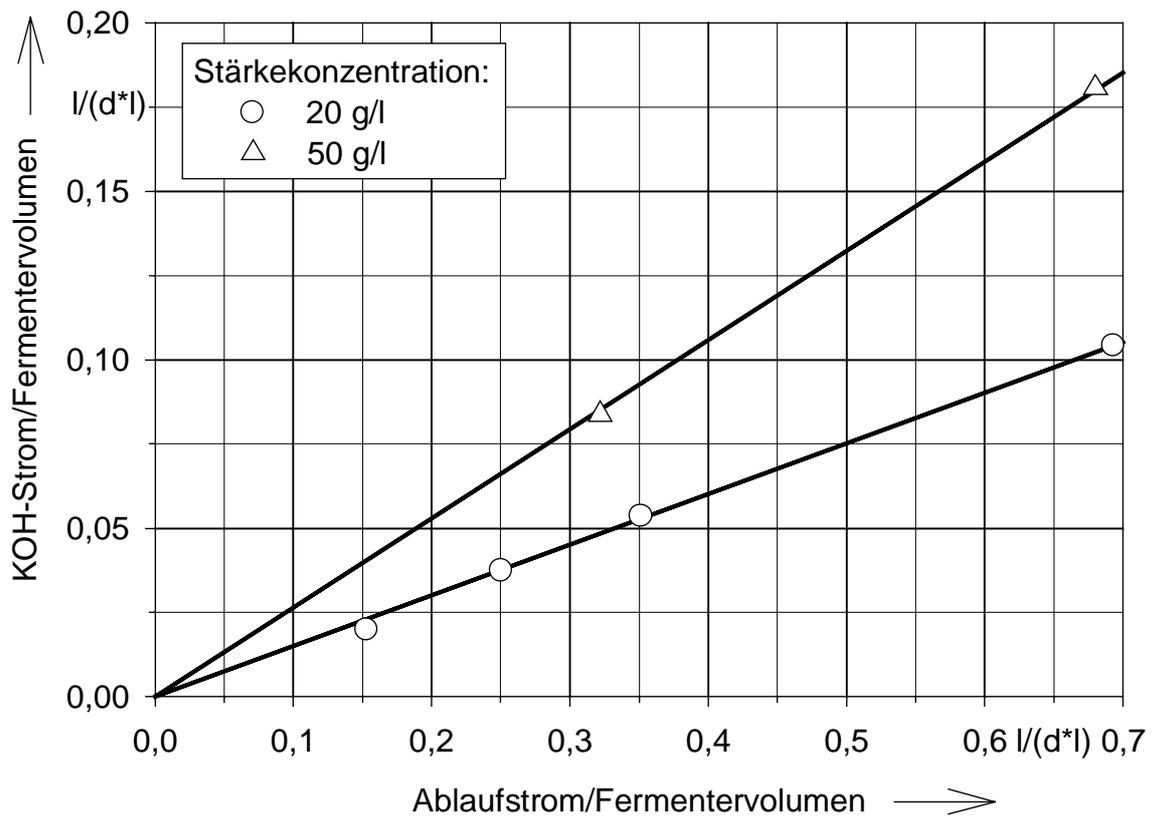


Abb. 4-5: Abhängigkeit des Laugenverbrauches von Ablaufstrom und Stärkekonzentration

Es wird angenommen, daß die Steigung s von der Stärkekonzentration c_{gS} linear abhängig ist. Der Proportionalitätsfaktor a spiegelt den Kohlenstoffinhalt der löslichen Stärke wider. Der Einfluß der anderen Bestandteile Tryptone und Yeast Extract im Substrat geht in die Konstante b ein.

$$s = f(c_{gS}) = a \cdot c_{gS} + b \quad (4-4)$$

Es ergibt sich für die Steigung s

$$s = 3,77 \cdot 10^{-3} \frac{l}{g} \cdot c_{gS} + 7,46 \cdot 10^{-2} \quad (4-5)$$

sowie für den Laugenverbrauch \dot{V}_{KOH} und Substratzulauf \dot{V}_S :

$$\frac{\dot{V}_{KOH}}{V_F} = s \cdot \frac{\dot{V}_A}{V_F} \quad (4-6)$$

$$\frac{\dot{V}_S}{V_F} = (1-s) \cdot \frac{\dot{V}_A}{V_F} \quad (4-7)$$

Da für das Modell die Kohlenstoffzufuhr pro Liter Fermentervolumen als Grundlage dienen soll, wird der Substratvolumenstrom als Funktion des Ablaufvolumenstromes nach Gl. 4-7 in eine Kohlenstoffzufuhr als Funktion des Ablaufvolumenstromes umgerechnet. Die Stärke besitzt einen Restwasseranteil von 24,47 Ma.-%. Daher können nur 75,53 % an Stärke als Kohlenstofflieferant gezählt werden. Tryptone und Yeast Extract enthalten die folgenden Konzentrationen an Kohlenstoff: $k_T=0,0333$ mol/g und $k_Y=0,0304$ g/mol. Die Konzentrationen von Tryptone und Yeast Extract im Substrat betragen immer $c_{gT}=10$ g/l und $c_{gY}=2$ g/l. Unter Berücksichtigung der formalen molaren Masse von Stärke \tilde{M}_S und der Anzahl von sechs Kohlenstoffatomen in einem Stärkemolekül ergibt sich aus Gleichung (4-7) der gesamte zugeführte Kohlenstoffmolenstrom \dot{N}_C :

$$\frac{\dot{N}_C}{V_F} = \frac{\dot{V}_A}{V_F} \cdot (1-s) \cdot \left[6 \cdot \frac{0,7553 \cdot c_{gS}}{\tilde{M}_S} + c_{gT} \cdot k_T + c_{gY} \cdot k_Y \right] \quad (4-8)$$

Adenosintriphosphat (ATP) ist der universelle Überträger chemischer Energie zwischen energieverzeugenden und energieverbrauchenden Reaktionen in der Zelle. Bei der Bildung eines Mols Lactat, Ethanol, Butyrat und n-Butanol gewinnt *T. thermosaccharolyticum* jeweils ein Mol ATP, bei der Acetatbildung fallen zwei Moleküle ATP an. In **Abb. 4-6** ist die ATP-Produktion über die Bildung von Lactat, Ethanol und Acetat sowie die ATP-Gesamtproduktion in Abhängigkeit des zugeführten Kohlenstoffmolenstroms dargestellt.

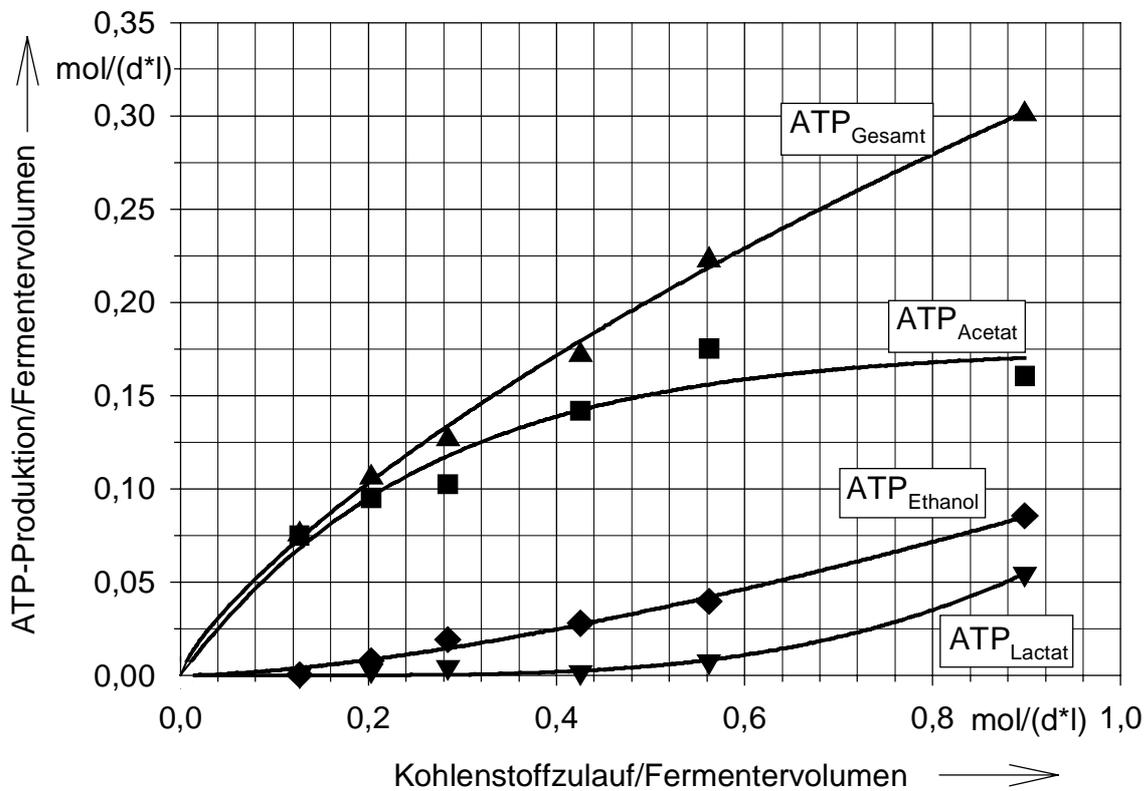


Abb. 4-6: ATP-Produktion des Stoffwechsels von *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*

Die Meßpunkte im Diagramm lassen sich gut mit Exponentialfunktionen der Form $y = k_1 \cdot [1 - \exp(-k_2 \cdot x)]^{k_3}$ beschreiben. Auf diese Weise erhält man für die einzelnen Stoffe die folgenden Ausdrücke:

ATP-Gesamt-Molenstrom:

$$\frac{\dot{N}_{ATP/Gesamt}}{V_F} = 0,9308 \frac{mol}{(d \cdot l)} \cdot \left[1 - \exp\left(-0,2916 \frac{d \cdot l}{mol} \cdot \left(\frac{\dot{N}_c}{V_F}\right)\right) \right]^{0,7666} \quad (4-9)$$

ATP-Molenstrom durch Ethanol:

$$\frac{\dot{N}_{ATP/Ethanol}}{V_F} = 1,6630 \frac{mol}{(d \cdot l)} \cdot \left[1 - \exp\left(-0,1929 \frac{d \cdot l}{mol} \cdot \left(\frac{\dot{N}_c}{V_F}\right)\right) \right]^{1,6172} \quad (4-10)$$

ATP-Molenstrom durch Acetat:

$$\frac{\dot{N}_{ATP/Acetat}}{V_F} = 0,1754 \frac{mol}{(d \cdot l)} \cdot \left[1 - \exp\left(-3,9441 \frac{d \cdot l}{mol} \cdot \left(\frac{\dot{N}_c}{V_F}\right)\right) \right]^{1,0137} \quad (4-11)$$

ATP-Molenstrom durch Lactat:

$$\frac{\dot{N}_{ATP/Lactat}}{V_F} = 4,1452 \frac{mol}{(d \cdot l)} \cdot \left[1 - \exp\left(-0,6116 \frac{d \cdot l}{mol} \cdot \left(\frac{\dot{N}_c}{V_F}\right)\right) \right]^{5,0267} \quad (4-12)$$

Der ATP-Gesamt-Molenstrom nimmt mit steigender Kohlenstoffzufuhr stetig zu. Anfangs wird ATP fast ausschließlich durch Bildung von Acetat gewonnen. Ab einer Zufuhr von ca. 0,5 mol/(d·l) wird ATP zunehmend durch Ethanolbildung hergestellt. Auch bei hoher Kohlenstoffzufuhr bleibt die ATP-Produktion über Acetat mit mehr als 50 % der ATP-Gesamtproduktion der wichtigste Stoffwechselfad. Für noch höheren Kohlenstoffzulauf außerhalb des untersuchten Bereiches könnte man bezüglich Acetat eine Sättigung erwarten. Der Weg über Ethanol mit ca. 30 % der ATP-Gesamtproduktion gewinnt zunehmend an Bedeutung. Ebenso trägt die ATP-Bildung über Lactat mit ca. 20 % der ATP-Gesamtproduktion erheblich zur Energiegewinnung bei.

4.4 In-situ-Extraktion und In-situ-Elektroextraktion

Bei den kontinuierlichen Fermentationen mit In-situ-Extraktion und In-situ-Elektroextraktion werden die Konzentration von löslicher Stärke im Substrat und der Ablaufvolumenstrom variiert. Zusätzlich wird bei zwei Versuchen zur In-situ-Elektroextraktion die elektrische Spannung von 50 auf 250 V erhöht. Die Betriebsdaten und die gemessenen Konzentrationen für diese stationären Zustände sind in **Tab. 4-2** aufgelistet.

Tab. 4-2: Betriebsdaten und Konzentrationen kontinuierlicher Fermentationen mit In-situ-Extraktion (E1 bis E2) und In-situ-Elektroextraktion (EE1 bis EE6)

Betriebsdaten						
Versuchsreihe	Stärke-Konz. g/l	Ablauf l/d	KOH l/d	Zulauf l/d	Spannung V	Stromstärke mA
E1	20	4,90	0,594	4,306	-	-
E2	20	11,25	0,589	10,661	-	-
E3	50	7,20	1,516	5,684	-	-
E4	50	11,25	1,619	9,631	-	-
EE1	20	5,23	0,545	4,680	50	3
EE2	20	9,55	1,012	8,538	50	17
EE3	50	5,47	1,078	4,392	50	2
EE4	50	9,82	1,967	7,853	50	8
EE5	20	11,50	1,481	10,019	250	13
EE6	50	10,49	2,405	8,083	250	7

Konzentrationen in der Brühe								
Versuchsreihe	OD ₅₈₀ -	Tr.-ma. g/l	Glucose g/l	Lactat g/l	Acetat g/l	Ethanol g/l	Butyrat g/l	n-Butanol g/l
E1	1,15	7,72	2,479	2,463	8,723	0	0,770	0
E2	0,95	9,48	7,418	0,542	4,292	0	0,653	0
E3	1,55	13,94	4,901	5,036	12,743	0,984	0,746	0
E4	1,25	10,49	15,912	1,538	8,830	0,892	0,622	0
EE1	1,15	9,64	0,256	2,404	7,430	0,439	0,847	0
EE2	1,23	8,19	0,565	1,889	6,887	1,914	0,364	0
EE3	1,55	13,66	3,340	4,941	11,893	1,359	0,869	0
EE4	1,65	11,43	5,725	3,747	8,176	2,002	0,486	0
EE5	1,45	11,81	0,318	1,605	7,470	1,274	0,483	0
EE6	1,65	12,57	4,855	3,353	8,751	1,922	0,481	0

Konzentrationen im Ablauf der Reextraktion				
Versuchsreihe	Lactat mg/l	Acetat mg/l	Ethanol mg/l	Butyrat mg/l
E1	0,6	4,0	0	0,9
E2	0,1	2,4	0	2,1
E3	2,8	9,4	0,3	1,4
E4	0,6	9,9	0,4	1,5
EE1	0,9	3,2	0,1	2,0
EE2	1,1	4,9	1,1	1,2
EE3	2,8	8,3	0,4	2,3
EE4	3,2	8,4	1,3	1,8
EE5	1,9	9,7	0,7	2,4
EE6	4,9	10,9	1,2	2,2

In **Abb. 4-7** sind die KOH-Ströme der Fermentationen mit In-situ-Extraktion und In-situ-Elektroextraktion zusammen mit den Ergebnissen der Modellrechnung für Fermentationen ohne Extraktion dargestellt. Der Laugenverbrauch ist bei den Versuchen mit In-situ-Extraktion wesentlich geringer als die Modellrechnung vorhersagt. Bei niedrigen Ablaufströmen liegt der Laugenverbrauch ca. 20 % unter

dem vorausberechneten Wert, dies gilt für beide Stärkekonzentrationen von 20 und 50 g/l im Substrat. Werden der Ablaufstrom und damit auch der Kohlenstoffstrom gesteigert, stagniert der Verbrauch an Lauge unerwarteterweise und beträgt nur etwa 50 % des Modellwertes. Der Grund dafür ist nicht die Säureabtrennung durch das Extraktionsmittel, sondern vermutlich eine durch das Extraktionsmittel hervorgerufene Stoffwechselhemmung der Bakterien. Eine derartige Hemmung tritt bei den Toxizitätsversuchen in Schüttelkolben nicht auf. In den Fermenterbrühen befindet sich Restglucose in großen Konzentrationen von 2 bis 16 g/l. Sie wird von *T. thermosaccharolyticum* nicht als Nährstoffquelle genutzt, mit der Folge daß weniger organische Säuren gebildet werden.

Der Einsatz des elektrischen Feldes bei der In-situ-Elektroextraktion hebt die inhibierende Wirkung des Extraktionsmittels auf *T. thermosaccharolyticum* teilweise auf. Bei den Elektroextraktionsversuchen mit 50 V Gleichspannung besteht wieder ein linearer Zusammenhang zwischen Ablaufstrom und Laugenverbrauch. Er ist etwa um 25 % geringer als nach der Modellrechnung zu erwarten ist. Für die Versuche mit 250 V Gleichspannung kann diese Proportionalität nur vermutet werden, weil nur zwei Meßpunkte mit 20 sowie 50 g/l Stärke im Substrat vorliegen. Die Konzentrationen an Restglucose betragen lediglich 0,25 bis 6 g/l. Bei hohen Ablaufströmen wird deshalb auch mehr Lauge zur Säurekompensation benötigt. Wird die angelegte elektrische Spannung auf 250 V erhöht, erreicht der Laugenverbrauch etwa 90 % des Wertes der Modellrechnung. Wahrscheinlich gehen aufgrund des verstärkten elektrischen Feldes mehr Säureanionen aus der Fermenterbrühe ins Extraktionsmittel über. Gemäß dem Dissoziationsgleichgewicht der organischen Säuren dissoziieren mehr Säuremoleküle. D. h. es sind mehr OH⁻-Ionen nötig, um die H⁺-Ionen zu neutralisieren.

$$K_s = \frac{[Sr^-] \cdot [H^+]}{[SrH]} \quad (4-13)$$

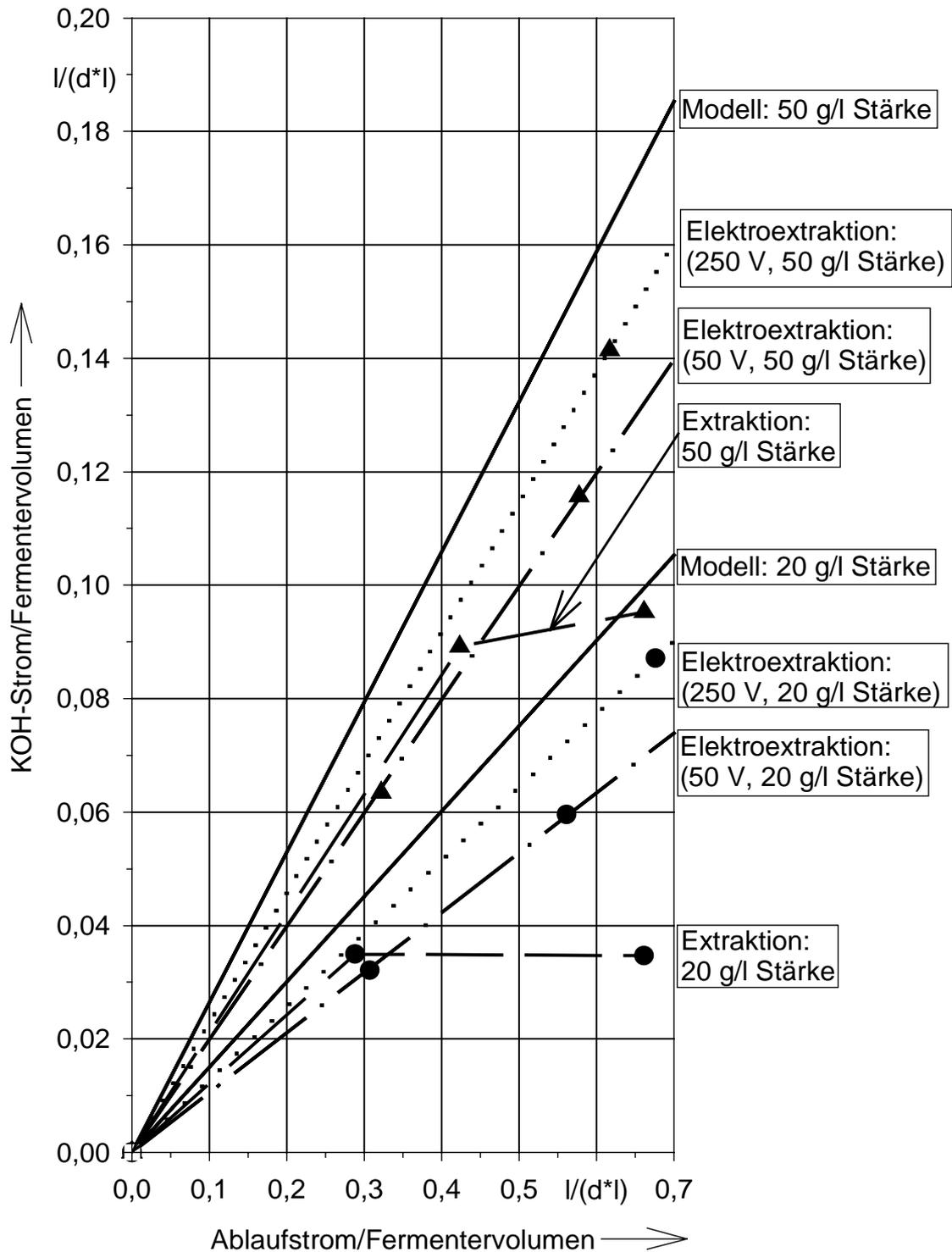


Abb. 4-7: Abhängigkeit des Laugenverbrauchs von Ablaufstrom und Stärkekonzentration bei Fermentationen mit In-situ-Extraktion und In-situ-Elektroextraktion

Zwischen den angelegten elektrischen Spannungen von 50 und 250 V und den daraus resultierenden Stromstärken von 2 bis 17 mA kann kein Zusammenhang abgeleitet werden. Möglicherweise kommt es während des Dauerbetriebes zu Verschmutzungen und einer Biofilmbildung auf den Gitterelektroden, welche die sich einstellende Stromstärke signifikant beeinflusst.

Hinsichtlich der gemessenen Zelltrockenmassen ist kein signifikanter Einfluß der Extraktion und Elektroextraktion auf *T. thermosaccharolyticum* feststellbar. Im Gegensatz zur Zelltrockenmasse ist die optische Dichte der Zellbrühen bei den Versuchen zur Extraktion (0,95 bis 1,55) und Elektroextraktion (1,15 bis 1,65) geringer als bei den kontinuierlichen Fermentationen (1,57 bis 1,80). Wiederum kann keine Abhängigkeit zwischen optischer Dichte und Zelltrockenmasse nachgewiesen werden.

In **Abb. 4-8** ist die ATP-Gesamtproduktion aus den Extraktions- und Elektroextraktionsversuchen in Abhängigkeit von der Kohlenstoffzufuhr zusammen mit den Ergebnissen der Modellrechnung dargestellt. Die schon bei der Betrachtung des Laugenverbrauches festgestellte Stoffwechselhemmung bei den Extraktionsversuchen ist im Diagramm deutlich erkennbar. Bei den Stärkekonzentrationen von 20 und 50 g/l im Nährmedium steigt die ATP-Produktion trotz zunehmendem Durchsatz nicht an. Sie liegt bis zu 50 % unter dem Modellwert. Diese Hemmung wird bei den ersten drei Versuchspunkten der Elektroextraktion mit einer elektrischen Spannung von 50 V aufgehoben. Die Meßwerte liegen sehr nahe an der berechneten Kurve. Bei großem Kohlenstoffzulauf von 0,85 mol/(d·l) liegt der Meßwert ca. 20 % unter dem vorausberechneten Wert. Dabei befindet sich Restglucose (5,7 g/l) im Medium, die von den Bakterien nicht aufgenommen wird. Die Erhöhung der elektrischen Spannung von 50 auf 250 V bringt bei mittelgroßem Kohlenstoffzulauf keine Steigerung der ATP-Produktion mit sich. Die Bakterien verstoffwechseln die Stärke nahezu vollständig, der Restglucosegehalt beträgt 0,3 g/l. Bei hohem Kohlenstoffzulauf führt die Spannungserhöhung zu einer Steigerung der ATP-Produktion. Der berechnete Wert wird zu 90 % erreicht, der Restglucosegehalt beträgt 5 g/l.

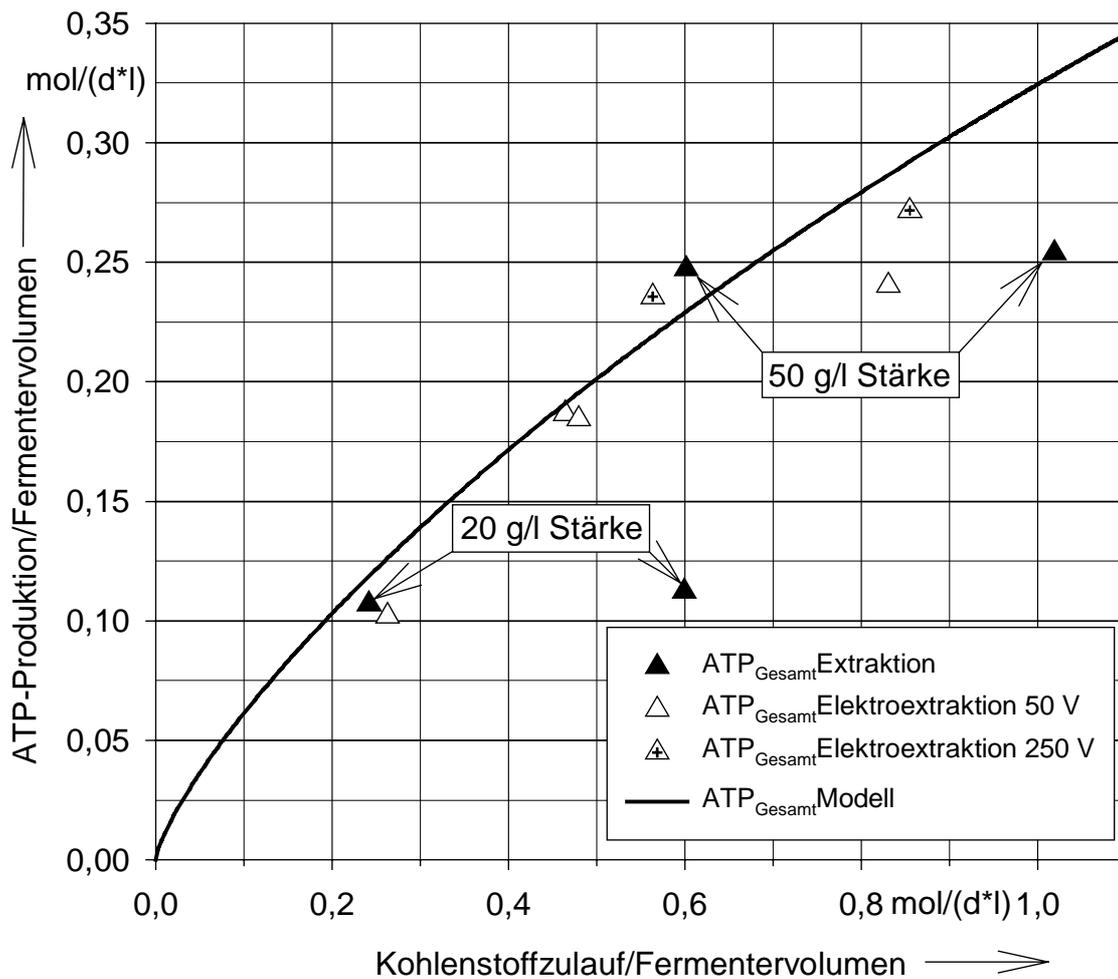


Abb. 4-8: ATP-Gesamtproduktion bei In-situ-Extraktion und In-situ-Elektroextraktion in Abhängigkeit vom Kohlenstoffzulauf

Während *T. thermosaccharolyticum* unter den gewählten Bedingungen in kontinuierlichen Fermentationen keinen C₄-Stoffwechsel betreibt, werden bei den Extraktions- und Elektroextraktionsversuchen Buttersäurekonzentrationen von 0,4 bis 0,9 g/l gemessen. Allerdings ist der Anteil der ATP-Produktion durch die Buttersäurebildung mit 2 bis 6 % der ATP-Gesamt-Produktion gering. Auch die ATP-Produktion über den Ethanol-Stoffwechselfad beträgt bei den Extraktionsversuchen nur noch maximal 5 % der Gesamtproduktion. Bei den Elektroextraktionsversuchen hat die ATP-Gewinnung durch die Ethanolbildung mit 3 bis 14 % der ATP-Produktion halb soviel Gewicht wie bei den reinen Fermentationen. Die Bakterien produzieren hauptsächlich Acetat.

In **Abb. 4-9** ist die Abhängigkeit der ATP-Produktion über den verstärkt wahrgenommenen Lactat- und Acetat-Stoffwechselfad bei den Extraktions- und Elektroextraktionsversuchen von der Kohlenstoffzufuhr zusammen mit den Ergebnissen der Modellrechnung dargestellt.

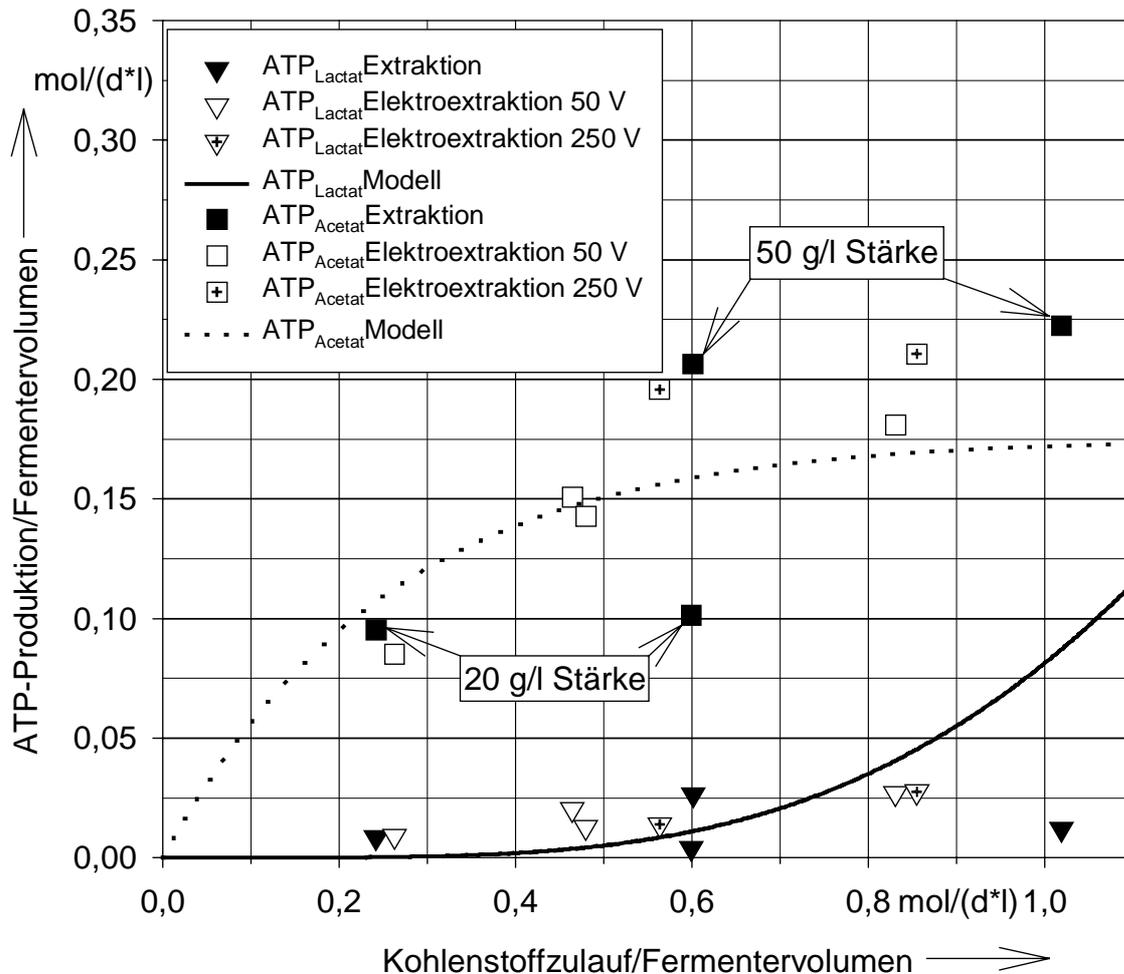


Abb. 4-9: ATP-Produktion über die Lactat- und Acetatbildung bei In-situ-Extraktion und In-situ-Elektroextraktion in Abhängigkeit vom Kohlenstoffzulauf

Für die ATP-Produktion über die Lactatbildung läßt sich keine eindeutige Beeinflussung durch die Extraktion und Elektroextraktion erkennen. Das Bakterium produziert bei geringem bis mittlerem Kohlenstoffzulauf deutlich mehr Milchsäure, als man nach dem Modell erwarten würde, doch die Lactatbildung

bleibt näherungsweise konstant und steigt nicht mit dem zunehmenden Kohlenstoffzulauf an.

Der Meßwert aus dem Extraktionsversuch für die ATP-Gewinnung über den Acetat-Stoffwechselfad bei geringem Kohlenstoffzulauf stimmt sehr gut mit dem entsprechenden Rechenwert überein. Wird der Durchsatz bei der Stärkekonzentration von 20 g/l erhöht, nimmt die ATP-Produktion nicht zu, weil die bereits diskutierte Stoffwechselhemmung vorliegt. Der Kohlenstoffzulauf von 0,6 mol/(d·l) wird ebenso durch geringeren Durchsatz und die Stärkekonzentration von 50 g/l erzielt. In diesem Fall steigt die ATP-Produktion über die Acetatbildung sprunghaft an und erreicht einen um 25 % größeren Wert als berechnet. Deshalb ist bei diesem Versuchspunkt die Ethanolbildung entsprechend reduziert. Es wird insgesamt nur unwesentlich mehr ATP gewonnen. Die weitere Erhöhung des Kohlenstoffzulaufes führt nicht zu einer Steigerung der Acetatbildung, da wiederum Stoffwechselhemmung eintritt.

Unter dem Einfluß des elektrischen Feldes bei der gewählten Spannung von 50 V liegen alle Meßpunkte für Acetat in der Nähe der berechneten Kurve. Durch Erhöhung der Spannung auf 250 V wird etwa 20 % mehr ATP über die Acetatbildung gewonnen, als vorausberechnet wurde. Die Zellen geben dementsprechend weniger Ethanol ab.

Der Einfluß der Elektroextraktion auf den Stoffwechsel von *T. thermosaccharolyticum* läßt sich nur sehr eingeschränkt beschreiben, weil die Extraktion die Bakterien durch einen nicht aufgeklärten Mechanismus hemmt. Diese Hemmung wird durch den Einsatz des elektrischen Feldes an der Flüssig/Flüssig-Phasengrenze teilweise kompensiert. Die Verstärkung des elektrischen Feldes wirkt sich positiv auf die mikrobielle Umsetzung der Stärke aus.

Die Ergebnisse der Stoffübergangsuntersuchungen sind in **Abb. 4-10** dargestellt. Sie zeigt die in der Reextraktion gefundenen Anteile der Fermentationsprodukte bezogen auf die von *T. thermosaccharolyticum* gebildete Gesamtmenge eines Produktes. Die Stoffmengen in der Reextraktion ergeben sich aus den Konzen-

trationen im Ablauf und dem Wasservolumenstrom (60 l/h). Die Konzentrationen von Ethanol in den Fermentationsbrühen betragen 0,5 bis 2 g/l. Der durch die Extraktion abgetrennte Anteil steigt linear mit der Ethanolkonzentration an. Es werden 4 bis 7 % des Ethanols in der Reextraktion gefunden. Die annähernd lineare Abhängigkeit der extraktiven Produktabtrennung von der Brühenkonzentration zeigt sich auch bei Lactat und Acetat sowie bei der Elektroextraktion dieser beiden Säuren. Die Verteilungskoeffizienten von Acetat (0,449) und Lactat (0,259) sind annähernd gleich groß, aber Lactat wird besser als Acetat abgetrennt. Durch die Extraktion werden 3 bis 10 % der Milchsäure gewonnen. Das elektrische Feld (50 V) erhöht den abgetrennten Anteil auf 8 bis 13 %, die Verstärkung des elektrischen Feldes (250 V) führt zur Abtrennung von 13 bis 17 % der Gesamtproduktion an Milchsäure. Essigsäure kommt im Konzentrationsbereich von 4 bis 13 g/l in den Fermentationsbrühen vor. Etwa 7 bis 13 % der Essigsäure werden extrahiert. Die Steigerung der Abtrennung auf 10 bis 16 % durch die Elektroextraktion (50 V) ist bei Acetat geringer als bei Lactat. Auch die Elektroextraktion mit einer Spannung von 250 V trennt lediglich 13 bis 17 % der Essigsäure aus der Bakterienbrühe ab. Buttersäure besitzt den größten Verteilungskoeffizienten (4,128) der drei produzierten Säuren. Selbst bei geringen Konzentrationen um 0,5 g/l im Fermenter werden extraktiv durchschnittlich 25 % der Buttersäure der Fermentationsbrühe entzogen. Die Abtrennung erhöht sich auf 34 bis 41 %, wenn die Elektroextraktion (50 V, 250 V) hinzugeschaltet wird.

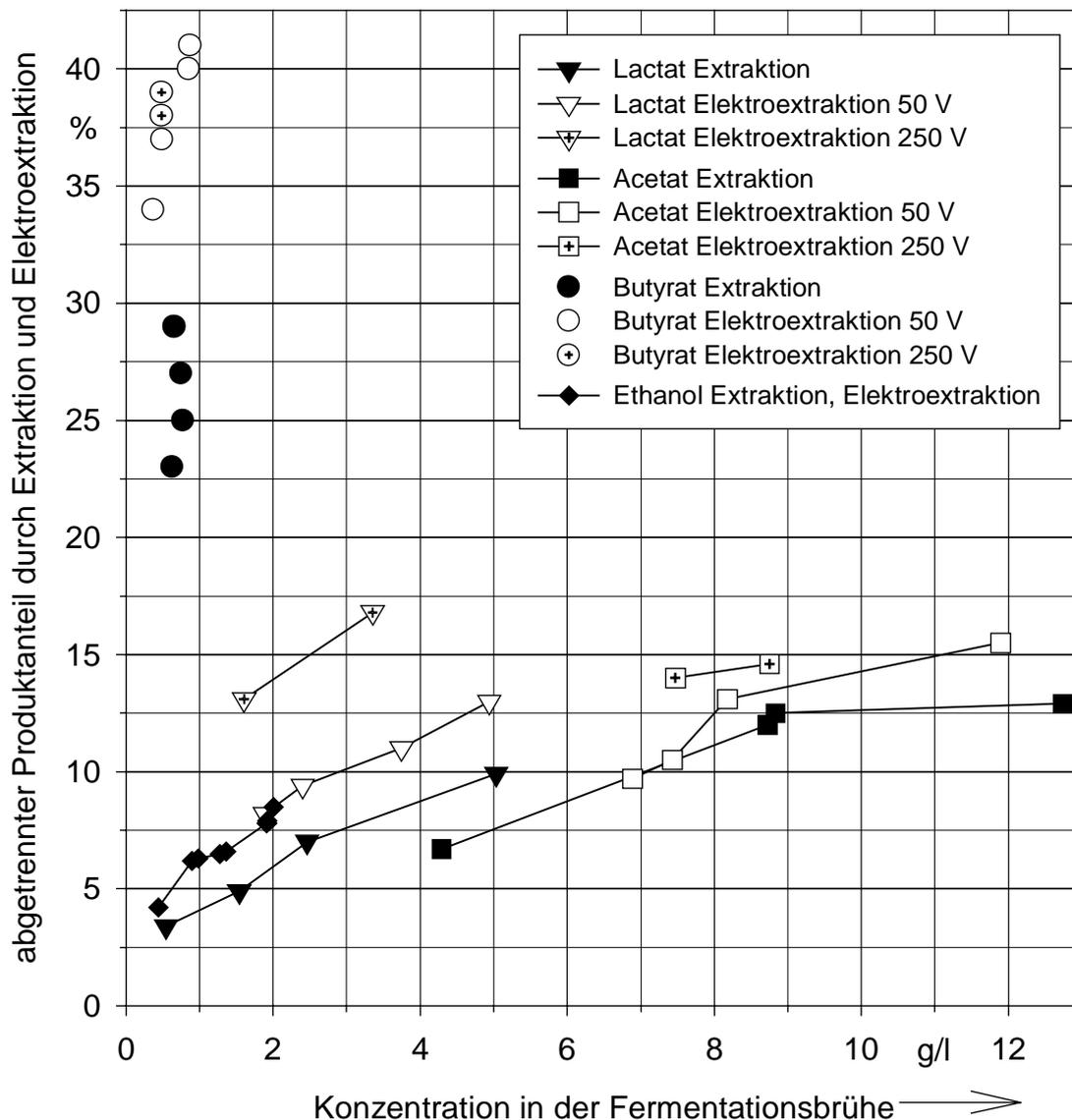


Abb. 4-10: Abhängigkeit des abgetrennten Produktanteils durch Extraktion und Elektroextraktion von der Konzentration in der Fermentationsbrühe

Vergleicht man die Extraktionsleistung für die Hauptprodukte Ethanol, Acetat und Lactat mit den von *Weilhammer (1993)* erzielten Extraktionsleistungen für Ethanol aus Fermentationsbrühen von *Clostridium thermohydrosulfuricum*, stellt man fest, daß *Weilhammer (1993)* etwa 40 % des Ethanols extraktiv entfernen konnte. Das Extraktionsmittel Imwitor 742 ist bei einer Temperatur von ca. 60 °C etwa 30fach viskoser als Wasser und etwa 1,5fach viskoser als der von *Weilhammer (1993)* verwendete Oleylalkohol. Deshalb ist der den Stoffübergang wesentlich bestimmende Diffusionskoeffizient in der Extraktionsmittelphase sehr

klein. Ein weiterer Hauptgrund für die wesentlich höhere Extraktionsleistung liegt wahrscheinlich in der Dispergierung des Extraktionsmittels in der Fermentationsbrühe, wodurch die Stoffaustauschfläche und somit auch der Stoffübergang wesentlich erhöht wird. Um die Versuchsergebnisse von Extraktion und Elektroextraktion miteinander vergleichen zu können, wird die Dispergierung von Imwitor 742 nicht durchgeführt, weil eine Dispergierung bei der Elektroextraktion grundsätzlich nicht möglich ist.

Die geringe Steigerung der Extraktionsleistung durch die Wirkung des elektrischen Feldes kann hauptsächlich darauf zurückgeführt werden, daß das elektrische Feld lediglich auf 5 % des Fermentervolumens in der Nähe der Phasengrenze wirkt. *Weilhammer (1993)* konnte den stoffwechsellanregenden Effekt der Produktentfernung sehr gut nachweisen, weil bei den gewählten Fermentationsbedingungen mit bis zu 100 g/l Glucose im Nährmedium vermutlich das Substrat im Überschuß vorhanden war und Produktinhibierung eintrat. Mit der geringen maximalen Löslichkeit von 50 g/l der löslichen Stärke läßt sich wahrscheinlich kein Substratüberschuß und keine Produktinhibierung bei kontinuierlichen Fermentationen mit *T. thermosaccharolyticum* erzielen.

Stellt man die Kohlenstoffbilanzen für die Fermentationen mit *T. thermosaccharolyticum* auf, so berücksichtigt der in den Fermenter eintretende Kohlenstoff-Molenstrom den Kohlenstoffgehalt des Nährmediums (lösliche Stärke, Tryptone, Yeast Extract). Der austretende Molenstrom umfaßt die gemessenen Konzentrationen der Brühenbestandteile Lactat, Acetat, Ethanol, Butyrat, n-Butanol und Restglucose. Die produzierten Mengen an Kohlendioxid werden nicht gemessen, sondern gemäß dem Metabolismus in Relation zu den gebildeten Mengen an C₂- und C₄-Körpern bestimmt. *Schlegel (1992)* und *Sinclair et al. (1993)* geben für die Zelltrockenmasse von Mikroorganismen als Richtwert einen Kohlenstoffgehalt von 50 Ma.-% an. Die Quotienten aus ein- und austretenden Kohlenstoff-Molenströmen sind in **Tab. 4-3** für alle Versuchsreihen aufgelistet.

Tab. 4-3: Kohlenstoffbilanzierung der Fermentationen mit *T. thermosaccharolyticum*

Versuchsreihe	$\frac{\dot{N}_{C, \text{ein}}}{\dot{N}_{C, \text{aus}}}$
	-
KF1	0,69
KF2	0,74
KF3	0,75
KF4	0,83
KF5	0,83
KF6	0,91
E1	0,79
E2	0,79
E3	0,95
E4	0,94
EE1	0,82
EE2	0,82
EE3	0,87
EE4	0,98
EE5	0,73
EE6	0,91

Der Quotient ist stets kleiner als 1. D. h. bei allen Versuchsreihen ist der Kohlenstoffablauf größer als der Kohlenstoffzulauf. Wahrscheinlich ist der Bilanzfehler auf den als zu groß angenommenen Kohlenstoffgehalt (50 Ma.-%) der Zelltrockenmassen zurückzuführen. Rechnet man mit einem Kohlenstoffgehalt von 40 Ma.-% statt mit 50 Ma.-%, wird der Bilanzfehler kleiner. Eine experimentelle Bestimmung des Kohlenstoffgehaltes der Zelltrockenmassen aus den kontinuierlichen Fermentationen mit *T. thermosaccharolyticum* wird nicht durchgeführt. Die üblichen Verfahren zur Kohlenstoffbestimmung wie die Bestimmung des CSB (Chemischer Sauerstoffbedarf), die Bestimmung des TOC

(Total Organic Carbon) und die Elementarkohlenstoff-Bestimmung liefern Ergebnisse mit großer Schwankungsbreite.

5 Zusammenfassung

Die Produktion von Wertstoffen mittels biologischer Prozesse gewinnt zunehmend an Bedeutung. Dabei schränkt die Produkthemmung bei vielen Fermentationen die erzielbare Produktivität erheblich ein. Eine zu hohe Alkoholkonzentration in der Fermentationsbrühe führt zur Lyse der Bakterienzellen. Die Zellwände können ihre zahlreichen, wichtigen Funktionen für die Zelle nicht mehr erfüllen, weil es zu einer Aufweichung der Zellwandstrukturen kommt. Überschreitet die extracelluläre Konzentration an Carbonsäuren eine kritische Grenze, so können die Zellen keine Säuremoleküle mehr ausscheiden. Der Stoffwechsel kommt zum Erliegen, und die Zellen sterben ab. Die Produkthemmung kann vermieden werden, wenn bereits während der Fermentation das hemmende Produkt aus der Fermentationsbrühe abgetrennt wird. Ein aussichtsreiches Verfahren der Produktabtrennung ist die In-situ-Extraktion, bei der das Extraktionsmittel bereits im Fermenter in direkten Kontakt mit der Fermentationsbrühe gebracht wird. Das Extraktionsmittel nimmt bakterielle Produkte aus der wäßrigen Phase auf. Auf diese Weise sinkt die Konzentration der hemmenden Produkte in der Bakterienbrühe, mit der Folge daß die Bakterien angeregt werden, den Stoffwechsel fortzuführen und weiteres Substrat umzusetzen.

Im Rahmen dieser Arbeit werden kontinuierliche Fermentationen mit dem thermophilen, strikt anaeroben Mikroorganismus *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* durchgeführt. Dieser Mikroorganismus setzt in Batchfermentationen das Substrat, lösliche Stärke, in Kohlendioxid, Wasserstoff, Milchsäure, Essigsäure, Ethanol, Buttersäure und n-Butanol um. Die kontinuierlichen Fermentationen mit einer Versuchsdauer zwischen 130 und 820 Stunden laufen bei einer Temperatur von 60 °C und einem pH-Wert von 7,0 ab. Das komplexe

Nährmedium besteht aus 20 bzw. 50 g/l löslicher Stärke, 10 g/l Tryptone und 2 g/l Yeast Extract. Die bakterielle Säureproduktion wird durch Zugabe von 10 Ma.-% Kalilauge kompensiert. Die Verweilzeiten werden im Bereich von 1,4 bis 6,6 Tagen variiert. Unter den gewählten Bedingungen stellt das Bakterium in den kontinuierlichen Fermentationen den C₄-Stoffwechsel vermutlich aufgrund einer Plasmiddeaktivierung ein. Auf der Grundlage der Versuchsergebnisse der kontinuierlichen Fermentationen wird ein empirisches Modell zur Beschreibung der mikrobiellen Produktbildung entwickelt.

Als Extraktionsmittel für die prozeßintegrierte In-situ-Extraktion wird Imwitor 742 eingesetzt. Es besteht aus einem Gemisch aus Mono-, Di- und Triglyceriden der Capryl- und Caprinsäure. Nach der Extraktion im Fermenter wird das Extraktionsmittel in einer Reextraktionskolonne mit Wasser im Gegenstrom aufgereinigt und nach einer Sterilfilterung erneut dem Fermenter zugeführt. Durch die Anwendung von Imwitor 742 tritt eine Stoffwechselhemmung auf. Die lösliche Stärke wird von den Bakterien durch extracelluläre Enzyme nur noch teilweise hydrolysiert. Es stehen den Mikroorganismen wesentlich weniger Glucose-Monomere als Nährstoffquelle zur Verfügung. Trotzdem können aus den Fermentationsbrühen 7 % des Ethans und Lactats sowie 12 % des Acetats extrahiert werden. Während der Extraktionen produziert *T. thermosaccharolyticum* wieder Butyrat, das zu 25 % extraktiv gewonnen wird.

Bei den Versuchen zur In-situ-Elektroextraktion wird ein elektrisches Feld eingesetzt, dessen Feldlinien senkrecht zur Flüssig/Flüssig-Phasengrenze gerichtet sind, um die Stoffabtrennung der ionogenen Substanzen aus den Fermentationsbrühen zu erhöhen. Der Stoffübergang der Säureanionen wird durch das elektrische Feld verstärkt. Durch die Elektroextraktion wird die stoffwechselhemmende Wirkung des Extraktionsmittels aufgehoben. Die Bakterien nutzen wieder fast die gesamte angebotene lösliche Stärke als Energiequelle. Bei einer elektrischen Feldstärke von 16,7 V/cm werden 10 % des Lactats, 13 % des Acetats und 40 % des Butyrats gewonnen. Die Erhöhung der Feldstärke auf 83,3 V/cm führt zu einer Steigerung der Abtrennung von Lactat (15 %) und Acetat (14 %).

Die geringen Extraktionsleistungen können im wesentlichen auf zwei Gründe zurückgeführt werden. Das Extraktionsmittel wird im Fermenter nicht dispergiert. Somit steht für den Stoffübergang nur eine geringe Stoffaustauschfläche zur Verfügung. Das Extraktionsmittel besitzt eine hohe Viskosität. Der den Stoffübergang wesentlich bestimmende Diffusionskoeffizient in der Extraktionsmittelpphase ist deshalb klein.

Um die bisher gewonnenen Erkenntnisse über die Einsatzmöglichkeiten der In-situ-Extraktion und In-situ-Elektroextraktion bei Fermentationen mit Produkt- hemmung verallgemeinern zu können, müssen diese prozeßintegrierten Stoff- abtrennungsverfahren auch auf andere Biosysteme angewendet werden. Vielversprechend könnte die extraktive Rückgewinnung von sekundären Meta- boliten sein, weil viele dieser Stoffe als Therapeutika, Stimulantien und Futter- mittelzusätze eine große wirtschaftliche Rolle spielen. Die manigfaltigen Sekun- därmetabolite werden aus wenigen Schlüsselbausteinen des Grundstoffwechsels über zahlreiche Zwischenstufen gebildet. Im Gegensatz zu Grundchemikalien wie Alkoholen und einfachen Carbonsäuren lassen sich diese Produkte nicht kosten- günstig synthetisieren und erzielen deshalb hohe Preise auf dem Weltmarkt.

6 Literatur

Aduse-Opoku, J., Mitchell, W. J. (1987), *Diauxic growth of Clostridium thermosaccharolyticum on glucose and xylose*, FEMS Microbiol. Lett. **50** (1988), 45-49

Bar, R., Gainer, J. L. (1987), *Acid Fermentation in Water-Organic Solvent Two-Liquid Phase Systems*, Biotechnol. Progr. **3** (1987), 109-114

Bartels, P. V., Drost, J. C. G., de Gaauw, J. (1987), *Solvent extraction of carboxylic acids from aqueous solution using a porous membrane module*, in Neissel, O. M., van der Meer R. R., Luyben, K. Ch. A. M. (Hrsg.), Proc. 4th European Congress of Biotechnol. 2, Elsevier Sci. Publ. BV, Amsterdam (1987), 558-559

Barton, W. E., Daugalis, A. J. (1992), *Evaluation of solvents for extractive butanol fermentation with Clostridium acetobutylicum and the use of poly(propylene glycol) 1200*, Appl. Microbiol. Biotechnol. **36** (1992), 632-639

Baskaran, S., Ahn, H.-J., Lynd, L. R. (1995a), *Investigation of the Ethanol Tolerance of Clostridium thermosaccharolyticum in Continuous Culture*, Biotechnol. Progr. **11** (1995), 276-281

Baskaran, S., Hogstett, D. A. L., Lynd, L. R. (1995b), *Optimization of a Chemically Defined, Minimal Medium for Clostridium thermosaccharolyticum*, Appl. Biochem. Biotechnol. **51/52** (1995), 399-411

Bélafi-Bakó, K., Harasek, M., Friedl, A. (1995), *Product Removal in Ethanol and ABE Fermentation*, Hung. J. Ind. Chem. **23** (1995), 309-319

- Boniardi, N., Rota, R., Nano, G., Mazza B. (1997), *Lactic acid production by e-lektrodialysis Part I: Experimental tests*, J. of Appl. Electrochem. **27** (1997), 125-133
- Boniardi, N., Rota, R., Nano, G., Mazza B. (1997), *Lactic acid production by e-lektrodialysis, Part II: Modelling*, J. of Appl. Electrochem. **27** (1997), 135-145
- Burfeind, J., Schügerl, K. (1999), *Reactive-Membrane-Extraction of Ethanol*, Chem. Eng. Technol. **22** (1999) 3, 197-199
- Chang, Y.-H. D., Grodzinsky, A. J., Wang, D. I. C. (1995), *Nutrient Enrichment and In-Situ Waste Removal through Electrical Means for Hybridoma Cultures*, Biotechn. Bioengng. **47** (1995), 319-326
- Choudhury, J. P., Ghosh, P., Guha, B. K. (1985), *Separation of Ethanol from Ethanol-Water Mixture by Reverse Osmosis*, Biotechnol. Bioeng. **27** (1985), 1081-1084
- Choudhury, J. P., Ghosh, P., Guha, B. K. (1986), *Ethanol separation from Molasses based fermentation broth by reverse osmosis*, Biotechnol. Lett. **8** (1986), 731-734
- Cysewski, G. R., Wilke, C. R. (1977), *Rapid ethanol fermentations using vacuum and cell recycle*, Biotechnol. Bioeng. **19** (1977), 1125-1143
- Daugulis, A. J., Axford, D. B., McLellan, P. J. (1991), *The Economics of Ethanol Production by Extractive Fermentation*, Canad. J. Chem. Eng. **69** (1991), 488-497
- Deckwer, W.-D. (1988), *Bioreaktoren - derzeitiger Stand und erkennbare Entwicklungen*, Chem.-Ing.-Tech. **60** (1988) 8, 583-590
- Difco (1997), *Produktinformation Tryptone und Yeast Extract*, Difco GmbH (1997)

Dürre, P. (1998), *New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation*, Appl. Microbiol. Biotechnol. **49** (1998), 639-648

Eckert, G., Schügerl, K. (1987), *Continuous acetone butanol production with direct product removal*, Appl. Microbiol. Biotechnol. **27** (1987), 221

Foerst, W. (1953), Ullmanns Encyclopädie der technischen Chemie, 4. Band: Arzneimittel bis Calcium, Verlag Urban & Schwarzenberg, München, Berlin (1953), 775-796

Garcia, A., Iannotti, E., Fischer, J. L. (1986), *Butanol Fermentation Liquor Production and Separation by Reverse Osmosis*, Biotechnol. Bioeng. **28** (1986), 785-791

Ghose, T. K., Roychoudhury, P. K., Ghose, P. (1984), *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of Lignocellulosics to Ethanol Under Vacuum Cycling and Step Feeding*, Biotechnol. Bioeng. **26** (1984), 377-381

Gianetto, A., Ruggeri, B., Specchia, V., Sassi, G., Forna, R. (1988), *Continuous Extraction Loop Reactor (CELR): Alcoholic Fermentation by Fluidized Entrapped Biomass*, Chem. Eng. Sci. **43** (1988), 1891

Groot, W. J., van der Laans, R. G. J. M., Luyben, K. C. A. M. (1992), *Technologies for Butanol Recovery Integrated with Fermentations*, Proc. Biochem. **27** (1992), 61-75

Hannig, J. (1993), *Elektroporation von Lipidvesikeln und Erythrozyten*, Dissertation, Universität Bielefeld, 1993, Bielefeld

Hill, P. W., Klapatch, T. R., Lynd, L. R. (1993), *Bioenergetics and End-Product Regulation of Clostridium thermosaccharolyticum in Response to Nutrient Limitation*, Biotechnol. Bioeng. **43** (1993), 873-883

Hiller, H., Dörnenburg, H., Knorr, Dietrich (1996), *Immobilisierte Zellen*, Bio Tec Zellbiologie **2** (1996), 42-49

Hollmann, D., Switalski, J., Geipel, S., Onken, U. (1995), *Extraktiv-Fermentation von Gibberelinsäure mit Gibberella fujikuroi*, Chem.-Ing.-Tech. **7** (1995), 892-895

Honda, H., Taya, M., Kobayashi, T. (1986), *Ethanol Fermentation Associated With Solvent Extraction Using Immobilized Growing Cells Of Saccharomyces Cerevisiae And Ist Lactose-Fermentable Fusant*, J. Chem. Eng. Jpn. **19** (1986) 4, 268-273

Honda, H., Toyama, Y., Takashi, H., Nakazeko, T., Kobayashi, T. (1995), *Effective Lactic Acid Produktion by Two-Stage Extractive Fermentation*, J. Ferment. Bioeng. **79** (1995) 6, 589-593

Honorato da Silva, F. L., Rodrigues, M. I., Maugeri, F. (1999), *Dynamic modelling, simulation and optimization of an extractive continuous alcoholic fermentation process*, J. Chem. Technol. Biotechnol. **74** (1999), 176-182

Hüls (1996), *Produktinformation Imwitor 742*, Hüls AG Werk Witten (1996)

Ishizaki, A., Michiwaki, S., Crabbe, E., Kobayashi, G., Sonomoto, K., Yoshino, S. (1999), *Extractive acetone-butanol-ethanol fermentation methylated crude palm oil as extractant in batch culture of Clostridium saccharoperbutylaceticum N1-4 (ATCC 13564)*, J. Biosci. Bioeng. **87** (1999) 3, 352-356

Job, C., *Hydrodynamische Auswahl und Auslegung von Apparaten zur Direktextraktion von Fermenterbrühen*, Dissertation, TU München, 1990, München

Job, C., Blass, E. (1994), *Problems concerning liquid-liquid extraction of extracellular products directly from fermenter broths*, Chem. Eng. J. **56** (1994), B1-B8

Jeon, Y. J., Lee, Y. Y. (1989), *In situ product separation in butanol fermentation by membrane-assisted extraction*, Enzyme Microb. Technol. **11** (1989), 575

Katzbauer, B., Cesi, V., Narodoslowsky, M., Moser, A. (1995), *Extractive Lactic Acid Fermentation Using Aqueous Two-Phase Systems*, Chem. Biochem. Eng. **9** (1995) 2, 79-87

Katzbauer, B., Nardoslowsky, M., Moser, A. (1995), *Classification system for immobilization techniques*, Bioprocess Eng. **12** (1995), 173-179

Kirches, E. (1993), *Direkter Gentransfer in Protoplasten der Sonnenblume (Helianthus annuus L.) mittels Elektroporation oder PEG*, Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 1993, Bonn

Koullas, D. P., Umealu, O. S., Koukios, E. G., *Solvent selection for the extraction of ethanol from aqueous solutions*, Sep. Sci. and Technol. **34** (1999) 11, 2153-2163

Kwon, Y. J., Kaul, R., Mattiasson, B. (1996), *Extractive Lactic Acid Fermentation in Poly(ethyleneimine)-Based Aqueous Two-Phase System*, Biotechnol. Bioengn **50** (1996) 3, 280-290

Landuyt, S. L., Hsu, E. J. (1985), *Solvent Fermentation Precedes Acid Fermentation in Elongated cells of Clostridium Thermosaccharolyticum*, in Dring, G. J., Ellar, D. J., Gould, G. W. (Hrsg.), *Fundamental and Applied Aspects of Bacterial Spores*, Academic Press, London (1985), 485-501

Landuyt, S., Hsu, E. J. (1992), *Preparation of Refractile Spores of Clostridium thermosaccharolyticum Involves a Solventogenic Phase*, Appl. Env. Microbiol. **58** (1992) 6, 1797-1800

Lee, C. K., Ordal, Z. J. (1967), *Regulatory Effect of Pyruvate on the Glucose Metabolism of Clostridium thermosaccharolyticum*, J. Bacteriol **94** (1967) 3, 530-536

Lilly, M. D. (1983), *Two-liquid phase biocatalytic reactors*, Phil. Trans. R. Soc. Lond. **B 300** (1983), 391-398

Maaß, D., Silberbach, K., Kaftzik, N., Takors, R., Weuster-Botz, D., Wandrey, C. (1999), *Membrangestützte Reaktiv-Extraktion zur integrierten Produktabtrennung bei der fermentativen Herstellung von Aminosäuren*, Chem.-Ing.-Tech. **71** (1999) 9, 945-946

Maiorella, B. L., Blanch, H. W., Wilke, C. R. (1984), *Economic Evaluation of alternative Ethanol Fermentation Processes*, Biotechnol. Bioeng. **26** (1984), 1003

Markx, G. H., Davey, C. L. (1999), *The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: Applications in biotechnology*, Enzyme Microb. Technol. **25** (1999), 161-171

Mayer, M. (1995), *Physiologische und biochemische Untersuchungen zum Gärungsstoffwechsel von Clostridium thermosaccharolyticum*, Dissertation, TU München, 1995, München

Mersmann, A. (1980), *Thermische Verfahrenstechnik*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1980)

Mistry, F. R., Cooney, C. L. (1989), *Production of Ethanol by Clostridium Thermosaccharolyticum: I. Effect on Cell Recycle and Environmental Parameters*, Biotechnol. Bioengn **34** (1989), 1295-1304

Mistry, F. R., Cooney, C. L. (1989), *Production of Ethanol by Clostridium thermosaccharolyticum: II. A Quantitative Model Describing Produkt Distributions*, Biotechnol. Bioengn **34** (1989), 1305-1320

Muttzall, K. (1994), *Modellierung von Bioprozessen*, Behr's Verlag, Hamburg (1994)

Nakanishi, K., Tokuda, H., Soga, T., Yoshinaga, T., Takeda, M. (1998), *Effect of Electric Current on growth and Alcohol Production by Yeast Cells*, J. Ferment. Bioeng. **85** (1998) 2, 250-253

Pecina, R., Bonn, G., Burtscher, E., Bobleter, O. (1984), *High-Performance Liquid Chromatographic Elution Behaviour of Alcohols, Aldehydes, Ketones, Organic Acids, and Carbohydrates on a Cation-Exchange Stationary Phase*, J. Chromatogr. **287** (1984), 245-254

Qureshi, N., Maddox, I. S. (1995), *Continuous Production of Acetone-Butanol-Ethanol Using Immobilized Cells of Clostridium acetobutylicum and Integration with Product Removal by Liquid-Liquid Extraction*, J. Ferment. Bioeng. **80** (1995) 2, 185-189

Raghavarao, K. S. M. S., Guinn, M. R., Todd, P. (1998), *Recent Developments in Aqueous Two-phase Extraction in Bioprocessing*, Sep. Purif. Meth. **27**(1) (1998), 1-49

Rautenbach, R., Janisch, I. (1987), *Membranverfahren in der Umwelttechnik*, Chem.-Ing.Tech. **59** (1987), 187-196

van Rinsum, A. (1999), *Biochemische und genetische Charakterisierung des Gärungsstoffwechsels von Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, Dissertation, TU München, 1999, München

Roffler, S. R., Blanch, H. W., Wilke, C. R. (1984), *In situ recovery of fermentation products*, Trends Biotechnol. **2** (1984), 129-136

Roffler, S. R., Blanch, H. W., Wilke, C. R. (1988), *In Situ Extractive Fermentation of Acetone and Butanol*, Biotechnol. Bioeng. **31** (1988), 135-143

Sánchez-Riera, F., Cameron, D. C., Cooney, C. L. (1987), *Influence of Environmental Factors in the Production of R(-)-1,2-Propanediol by Clostridium Thermosaccharolyticum*, Biotechnol. Lett. **9** (1987) 7, 449-454

-
- Scheinert, P. (1996), *Clostridien - Tödliche Toxinbildner*, BioTec Zellbiologie **6** (1996), 42-44
- Schlegel, H. G. (1992), *Allgemeine Mikrobiologie*, Verlag Georg Thieme, Stuttgart, New York (1992)
- Schügerl, K., Kretzmer, G., Freitag, R., Scheper, T. (1994), *Integrierte biotechnologische Produktionsprozesse*, Chem.-Ing.-Tech. **66** (1994) 12, 1585-1592
- Schügerl, K. (1994), *Solvent Extraction in Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest (1994)
- Sinclair, C. G., Kristiansen, B., Bu`Lock, J. D. (1993), *Fermentationsprozesse*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest (1993)
- Singelton, P., Sainsbury, D. (1996), *Dictionary of Mikrobiology and Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore (1996)
- Sneath, P. H. A. (1986), *Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkens, Baltimore, Hong Kong, London, Sydney (1986), 1198
- Stichlmair, J., Schmidt, J., Proplesch, R. (1992), *Electroextraction: A novel separation technique*, Chem. Eng. Sci. **47** (1992) 12, 3015-3022
- Solichien, M. S., O`Brien, D., Hammond, E. G., Glatz, C. E. (1995), *Membrane-based exraktiv fermentation to produce propionic and acetic acids: Toxicity and mass transfer considerations*, Enzyme Microb. Technol. **17** (1995), 23-31

Specka, U., Mayer, F., Antranikian, G. (1991), *Purification and Properties of a Thermoactive Glucoamylase from Clostridium thermosaccharolyticum*, Appl. Env. Microbiol. **57** (1995) 8, 2317-2323

Sprafke, A. (1991), *Elektrooptische und konduktometrische Untersuchungen an Lipidvesikeln*, Dissertation, Universität Bielefeld, 1991, Bielefeld

Tanaka, H., Harada, S., Kurosava, H., Yajima, M. (1987), *A New Immobilized Cell System with Protection against Toxic Solvents*, Biotechnol Bioeng **30** (1987), 22-30

Tong, Y., Hirata, M., Takanashi, H., Hano, T. (1998), *Solvent Screening for Production of Lactic Acid by Extractive Fermentation*, Sep. Sci. Technol. **33** (1998) 10, 1439-1453

Vancanneyt, M., De Vos, P., De Ley, J. (1987), *Ethanol Produktion From Glucose By Clostridium thermosaccharolyticum Strains: Effekt of pH and Temperature*, Biotechnol. Lett. **9** (1987) 8, 567-572

Vancanneyt, M., De Vos, P., Maras, M., De Ley, J. (1990), *Ethanol Produktion in Batch and Continuous Culture from Some Carbohydrates with Clostridium thermosaccharolyticum LMG 6564*, System. Appl. Microbiol. **13** (1990), 382-387

Wayman, M., Parekh, R. (1987), *Production of Acetone-Butanol by Extractive Fermentation Using Dibuthylphtalate as Extractant*, J. Ferment. Technol. **65** (1987), 295

Weilnhammer, C. (1993), *Fermentation mit In-situ-Extraktion*, Dissertation, TU München, 1993, München

Weilnhammer, C., Blass, E. (1994), *Continuous Fermentation with Product Recovery by in-situ Extraction*, Chem. Eng. Technol. **17** (1994), 365-373

-
- Wever, R. (1982), *Bioelektrische Wechselwirkungen*, in Newi, G. (Hrsg.), *Biologische Wirkungen elektrischer, magnetischer und elektromagnetischer Felder*, Expert-Verlag, Grafenau/Württemberg (1982), 29-141
- Wieczorek, S., Brauer, H. (1998a), *Continuous production of citric acid with recirculation of the fermentation broth after product recovery, Part 1: Continuous production of citric acid*, *Bioprocess Eng.* **18** (1998), 1-5
- Wieczorek, S., Brauer, H. (1998b), *Continuous production of citric acid with recirculation of the fermentation broth after product recovery, Part 2: Product recovery and recirculation of the fermentation broth*, *Bioprocess Eng.* **18** (1998), 75-77
- Wolf, H. (1989), *Physikalisch-chemische Parameter der Transformation von *Corynebacterium glutanicum* und Ovarzellen des Chinesischen Hamsters durch Elektroporation*, Dissertation, Universität Bielefeld, 1989, Bielefeld
- Yabannavar, V. M., Wang, D. I. (1991a), *Bioreactor System with Solvent Extraction for Organic Acid Production*, *An. N. Y. Acad. Sci.* **506** (1991), 523-535
- Yabannavar, V. M., Wang, D. I. (1991b), *Strategies for Reducing Solvent Toxicity in Extractive Fermentations*, *Biotechnol. Bioeng.* **37** (1991), 716-722
- Ye, K., Shimizu, K. (1996), *Performance Improvement of Lactic Acid Fermentation by Multistage Extractive Fermentation*, *J. Ferment. Bioeng.* **81** (1996) 3, 240-246

7 Anhang

Chronologische Aufstellung der im Rahmen dieser Arbeit am Lehrstuhl für Fluidverfahrenstechnik der Technischen Universität München angefertigten Semester- und Diplomarbeiten:

Axel Stelzmann, *Sterilisation von stärkehaltigen Nährlösungen für Fermentationen mit Clostridium thermosaccharolyticum*, Semesterarbeit, 1996

Robert Biedermann, *Elektroextraktion - Anwendung bei der Entfernung von organischen Säuren aus wässrigen Medien*, Diplomarbeit, 1996

Jürgen Feigl, *Kontinuierliche Fermentation mit Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, Diplomarbeit, 1997

Simon Högenauer, *Batchfermentation mit Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, Semesterarbeit, 1997

Christian Steinbrecher, *Konstruktion einer Apparatur zur Elektroextraktion und Integration in eine vorhandene Fermentationsanlage*, Semesterarbeit, 1998

Christian Ebi, *Bilanzierung des Stoffwechsels von Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, Semesterarbeit, 1998

Klaus Erhard, *Konstruktion und Inbetriebnahme einer Fermentationsanlage mit In-situ-Extraktion und Reextraktionskolonne*, Semesterarbeit, 1998

Rudolf Häberle, *Kontinuierliche Fermentation mit Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, Diplomarbeit, 1998

Ulrike Haber, *Kontinuierliche Fermentation mit Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, Diplomarbeit, 1999

Lebenslauf

Name: Martin C. Klose

Geburtsdatum: 29.10.1968

Geburtsort: München

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1975 - 1979 Grundschule, Münchsmünster

1979 - 1985 Schyren-Gymnasium, Pfaffenhofen

1985 - 1988 Apian-Gymnasium, Ingolstadt

1988 Abitur, Allgemeine Hochschulreife

Bundeswehr:

1988 - 1989 Grundwehrdienst

Studium:

1989 - 1992 Grundstudium Maschinenwesen an der Technischen
Universität München

1992 Vordiplom

1992 - 1994 Hauptstudium Maschinenwesen Fachrichtung
Verfahrenstechnik an der Technischen Universität München

1995 Dipl.-Ing. (Univ.)

Berufstätigkeit:

seit 1995 wissenschaftlicher Assistent am Lehrstuhl für
Fluidverfahrenstechnik der Technischen Universität München