

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Institut für Verfahrenstechnik

# Optimierung der mikrobiellen Herstellung von Dihydroxyaceton

Rüdiger Bauer

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. Dr.-Ing. habil. Johann Stichlmair

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz  
2. Priv.-Doz. Dr.-Ing. Dariusch Hekmat

Die Dissertation wurde am 21.12.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 23.03.2005 angenommen

## Danksagung

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

Herrn Priv. Doz. Dr.-Ing. D. Hekmat, der die Themenstellung dieser Arbeit anregte, danke ich für zahlreiche Anregungen, die stete Diskussionsbereitschaft und das in mich gesetzte Vertrauen. Herrn Prof. Dr.-Ing. D. Weuster-Botz danke ich für das Interesse an meiner Arbeit. Herrn Prof. Dr.-Ing. J. Stichlmair danke ich für die Übernahme des Vorsitzes.

Bei meinen Studenten und Diplomanden möchte ich mich für ihre große Einsatzbereitschaft und ihr Engagement bedanken, ohne die diese Arbeit in ihrer jetzigen Form nicht möglich gewesen wäre. Im Speziellen gilt mein Dank den Herren Volker Neff, Nikolaos Katsikis und Stefan Varga.

Besonderen Dank gebührt den beiden Werkstattmeistern H. Kappel und H. Baier, die durch ihre langjährige Erfahrung und Kompetenz sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dem bayerischen Landesamt für Wasserwirtschaft, namentlich Herrn Regierungsdirektor Dr. rer. nat. G. Metzner, Herrn Bauoberrat H. Wagner und Herrn Leppert danke ich für die freundliche Betreuung und Hilfe mit dem Sapromaten A6.

Herrn Dr. rer. nat. K. Offhaus, leitender Chemiedirektor a. D., danke ich für das Interesse an meiner Arbeit, den zahlreichen Anregungen und dem Lesen der Korrektur.

Meinen Eltern, für ihre Aufopferung und Mühe während meines Studiums.

Der Volkswagenstiftung sei für die Bereitstellung der finanziellen Mittel dieser Arbeit gedankt. Ferner danke ich der Merck KGaA, die den Industriestamm M1136 zur Verfügung gestellt hat und der H+P Labortechnik GmbH für die freundliche Überlassung des Sapromat A6.

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 THEORETISCHER HINTERGRUND</b> .....	<b>6</b>
2.1 BIOLOGIE VON <i>GLUCONOBACTER OXYDANS</i> .....	6
2.1.1 Taxonomie, Morphologie und Vorkommen von <i>Gluconobacter oxydans</i> .....	6
2.1.2 Stoffwechsel von <i>Gluconobacter oxydans</i> .....	7
2.1.3 Einflussfaktoren auf Wachstum und Produktbildung von <i>Gluconobacter oxydans</i> .....	11
2.1.3.1 Glycerin .....	11
2.1.3.2 Weitere Kohlenstoffquellen .....	12
2.1.3.3 Dihydroxyaceton (DHA) .....	13
2.1.3.4 Sauerstoff.....	15
2.1.3.5 Nährsalze und Einfluss von Calciumchlorid.....	16
2.1.3.6 pH.....	18
2.1.3.7 Temperatur.....	19
2.2 GRUNDLAGEN DER ZELLRÜCKHALTUNG .....	21
2.3 ENTWICKLUNG VON BIOFILMEN.....	22
2.4 AUSWAHL UND CHARAKTERISIERUNG EINER GEEIGNETEN TRÄGERMATRIX .....	26
2.5 MATHEMATISCHE MODELLIERUNG .....	30
2.5.1 Entwicklung eines segregierten Verzugszeitmodells.....	30
2.5.2 Kinetik des segregierten Verzugszeitmodells .....	37
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>42</b>
3.1 STAMM UND STAMMHALTUNG .....	42
3.2 MEDIENZUSAMMENSETZUNG .....	42
3.3 ANALYTIK.....	43
3.3.1 Bestimmung der Glycerin- und DHA-Konzentrationen .....	43
3.3.2 Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) .....	45
3.3.3 Bestimmung der aktiven Zellen .....	47
3.3.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl.....	52
3.4 HERSTELLUNG SILIKONBESCHICHTETER RALU <sup>®</sup> -RINGE .....	52
3.5 VERWENDETE REAKTORTYPEN .....	55

3.5.1	Sapromat® .....	55
3.5.2	Laborblasensäulenreaktor.....	57
3.5.3	Rührkesselreaktor.....	59
3.5.4	Zweistufige Technikumsanlage.....	60
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>68</b>
4.1	EINFLUSS VON DIHYDROXYACETON AUF DAS WACHSTUM UND DIE PRODUKTBI- LUNG VON <i>GLUCONOBACTER OXYDANS</i> .....	68
4.1.1	Untersuchung des DHA-Einflusses auf die Wachstumsfähigkeit der Kultur mit Hilfe des Sapromats .....	68
4.1.2	Untersuchung von Schüttelkolbenproben im Sapromat.....	70
4.1.3	Untersuchung von Proben aus der zweistufigen Technikumsanlage und dem Laborblasensäulenreaktor im Sapromat .....	75
4.1.4	Schwellwertuntersuchungen im Laborreaktor .....	77
4.1.5	Untersuchung der Zellaktivität.....	78
4.1.6	Zusammenfassung der reaktionskinetischen Untersuchungen.....	83
4.2	ERGEBNISSE DER VERSUCHE MIT DEN ZWEISTUFIGEN TECHNIKUMS- UND LABORREAKTORANLAGEN .....	85
4.2.1	Referenzläufe in der Technikumsanlage im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren.....	85
4.2.2	Zugabe einer weiteren Kohlenstoffquelle .....	90
4.2.3	Versuche mit 12 g/l Saccharose im Nährmedium im Technikumsmaßstab.....	90
4.2.4	Versuche mit 10 g/l Sorbit im Nährmedium im Technikumsmaßstab.....	95
4.2.5	Vergleich der verschiedenen Kohlenstoffquellen .....	98
4.2.6	Variation des Schwellwertes für DHA in der zweistufigen Laborreaktoranlage .....	100
4.2.7	Zusammenfassung der Versuche im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren.....	104
4.3	IMMOBILISIERUNG.....	105
4.3.1	Vergleich mit bisher erzielten Ergebnissen.....	105
4.3.1.1	Zyklisch betriebenes Zulaufverfahren ohne Immobilisierung .....	105
4.3.1.2	Zyklisch betriebenes Zulaufverfahren mit immobilisierten Zellen.....	107
4.3.2	Immobilisierung von <i>Gluconobacter oxydans</i> bei optimiertem Sorbitmedium .....	112
4.3.3	Einfluss des DHA-Schwellwertes auf die Immobilisierung .....	115

---

4.3.4	Zweistufiges zyklisch betriebenes Zulaufverfahren mit Zellrückhaltung.....	117
4.3.5	Zusammenfassung der Immobilisierungsversuche .....	118
4.4	MODELLRECHNUNGEN UND VERGLEICH MIT MESSUNGEN.....	120
4.4.1	Verdeutlichung des Einflusses der Vorgeschichte der Kultur .....	120
4.4.2	Anpassung des Modells an experimentelle Daten.....	122
4.4.2.1	Parameteroptimierung.....	122
4.4.2.2	Anpassung an experimentelle Werte zur Ermittlung der Modellparameter.....	123
4.4.3	Parametersatz für den Laborreaktor .....	125
4.4.4	Bestimmung der Güte des mathematischen Modells .....	132
4.4.5	Vergleich des segregierten Verzugszeitmodells mit einem unsegregierten Modell mit stationärer Kinetik .....	138
4.4.6	Parametersatz für die Technikumsanlage.....	142
4.4.7	Parametersensibilitätsanalyse.....	149
4.4.7.1	Kinetik .....	150
4.4.7.2	Stöchiometrie .....	155
4.4.7.3	Verzugszeit .....	155
4.4.7.4	Segregation .....	159
4.4.7.5	Zusammenfassung der Parametersensibilitätsanalyse .....	163
4.4.8	Rechnergestützte Optimierung des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens .....	163
4.4.9	Zusammenfassung der Simulationsergebnisse.....	167
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>169</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>172</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>181</b>

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Oft lässt sich die Produktion von Wertstoffen auf konventionellem chemischen Weg aufgrund extremer Reaktionsbedingungen, einer Vielzahl von Arbeitsschritten oder einer niedrigen Produktselektivität nicht wirtschaftlich realisieren. In diesen Fällen wird auf biologische Verfahren zurückgegriffen. Ein Produkt, das heute nahezu ausschließlich auf biologischem Weg hergestellt wird, ist Dihydroxyaceton (DHA). Die chemische Synthese von DHA läuft durch die katalytische Kondensation von Formaldehyd ab. Der Prozess ist dadurch gekennzeichnet, dass er nur bei hoher Temperatur und hohem Druck abläuft und aufgrund zahlreicher Nebenprodukte nicht selektiv genug ist. Dieses Verfahren wurde zwar von Gehrer [Gehrer et al. 1993] patentiert, kommt aber industriell aus oben genannten Gründen kaum zum Einsatz [Ohrem, 1994]. Stattdessen wird DHA durch die enzymatisch katalysierte Oxidation von Glycerin durch das Bakterium *Gluconobacter oxydans* gewonnen [Gupta und Singh, 2001; Ohrem, 1994]. Charakteristisch für die biotechnologische Gewinnung ist die stark ausgeprägte Produktinhibition, die bis zur irreversiblen Schädigung der Kultur führen kann.

DHA wird in der Kosmetikindustrie als künstliches Bräunungsmittel eingesetzt und findet zudem als Synthesebaustein in der chemischen und pharmazeutischen Industrie eine breite Anwendung. Eine ausführliche Beschreibung der pharmazeutischen Anwendungsbereiche ist bei Green zu finden [Green et al. 1961]. In der chemischen Industrie wird DHA als Zwischenprodukt für die Herstellung von Gerbmitteln, Emulgatoren, Weichmachern, Kunststoffen (Alkydharz-Typ), Fungiziden und Redoxkatalysatoren verwendet [Falbe 1997].

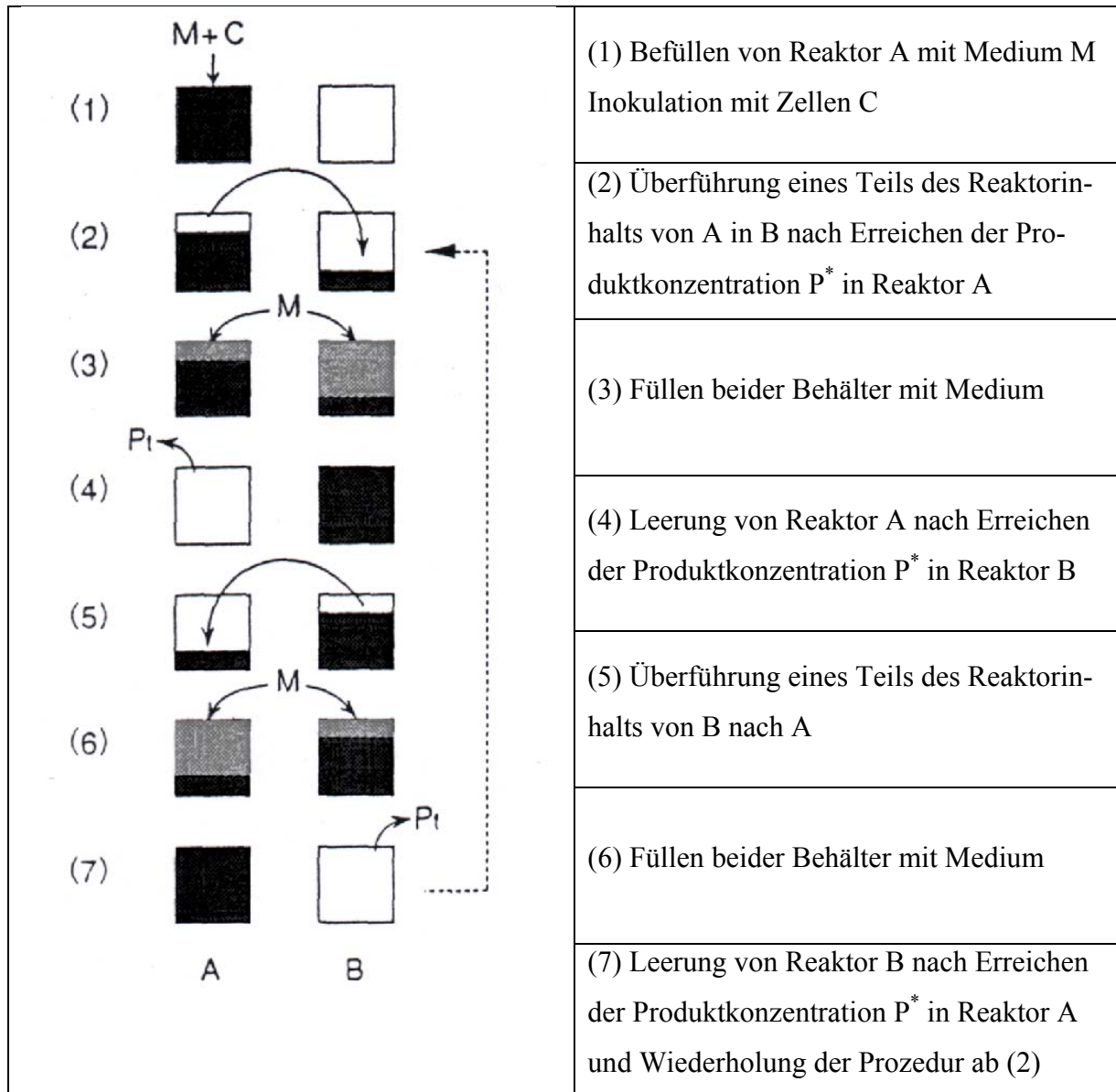
Stand der Technik ist die mikrobielle Herstellung von DHA im Rührkessel im Zulaufbetrieb. Der Nachteil dieser konventionellen Betriebsweise ist, dass nach jedem Produktionszyklus eine Reinigung, Sterilisation und eine erneute Inokulation mit einer Vorkultur erforderlich ist. Diese Unterbrechung nach jedem Zyklus im Zulaufverfahren führt zu einer Verschlechterung der integralen Raum-Zeit-Ausbeute. In der Literatur lassen sich daher eine Vielzahl von alternativen Verfahren finden, die aufgrund verbesserter Prozesstechnik zu höheren Produktbildungsrate führen:

- 1.) Izuo entwickelte für die DHA-Gewinnung eine kontinuierliche, dreistufige Reaktorkaskade [Izuo, 1980]. Die erste Stufe diente der Bereitstellung einer hohen Biomassekonzentration, die zweite und dritte Stufe dienten der DHA-Produktion und der vollständigen Substratumsetzung. Die erreichte Endkonzentration lag bei 128 g/l und die Produktbildungsrate bei 4 g/(lh).
- 2.) Ohrem stellte theoretische und experimentelle Untersuchungen zur Durchführung ver-

schiedener kontinuierlicher Verfahren mit Zellrückhaltung an [Ohrem, 1994]. Mit Hilfe eines segregierten Modells simulierte Ohrem eine zweistufige kontinuierliche Betriebsweise mit Zellrückhaltung und erreichte Endkonzentrationen von 180 g/l bei einer Produktbildungsrate von 10 g/(lh). Experimentell wurden diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt. Nachteile dieser kontinuierlichen Verfahren gegenüber dem konventionellen Zulaufverfahren sind der enorme steriltechnische und apparative Aufwand. Zudem besitzen kontinuierliche Verfahren aufgrund ihrer Komplexität eine hohe Störanfälligkeit und ein erhöhtes Kontaminationsrisiko, die zum kompletten Prozessabbruch führen können [Storhas, 1994]. Ein weiteres Problem dieser Prozessführung ergibt sich aus dem relativ lange andauernden Anfahrprozess, bis eine für die Aufarbeitung ausreichende Produktendkonzentration und Produktreinheit (bezüglich der Glycerinkonzentration) erreicht werden. Aus diesen Gründen haben sich kontinuierliche Verfahren gegenüber dem bewährten Zulaufverfahren bisher nicht durchgesetzt.

Eine geeignete Alternative zu den kontinuierlichen Verfahren stellen die semikontinuierlichen Verfahren dar. Erste erfolgreiche Testreihen konnte Hekmat im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren mit Zellrückhaltung durchführen. Er erreichte dabei eine Produktbildungsrate von 2,8 g/(lh) und eine Endkonzentration von 60 g/l [Hekmat et al., 2001; 2003]. Der Nachteil dieser Prozessführung liegt aufgrund der Produktinhibition in der relativ niedrigen Produktendkonzentration.

Abhilfe verschafft ein von Ito et al. für die Essigsäuregewinnung entwickeltes zweistufiges zyklisch betriebenes Zulaufverfahren [Ito, 1991]. Die Problematik der irreversiblen Schädigung bei hohen Produktkonzentrationen existiert bei der Gewinnung von Essigsäure in gleicher Weise wie bei DHA. Das Verfahren ist in Abbildung 1-1 beschrieben. Die auf diese Weise erreichte Produktendkonzentration ist aufgrund der verbesserten Prozesstechnik deutlich höher als beim einstufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren.



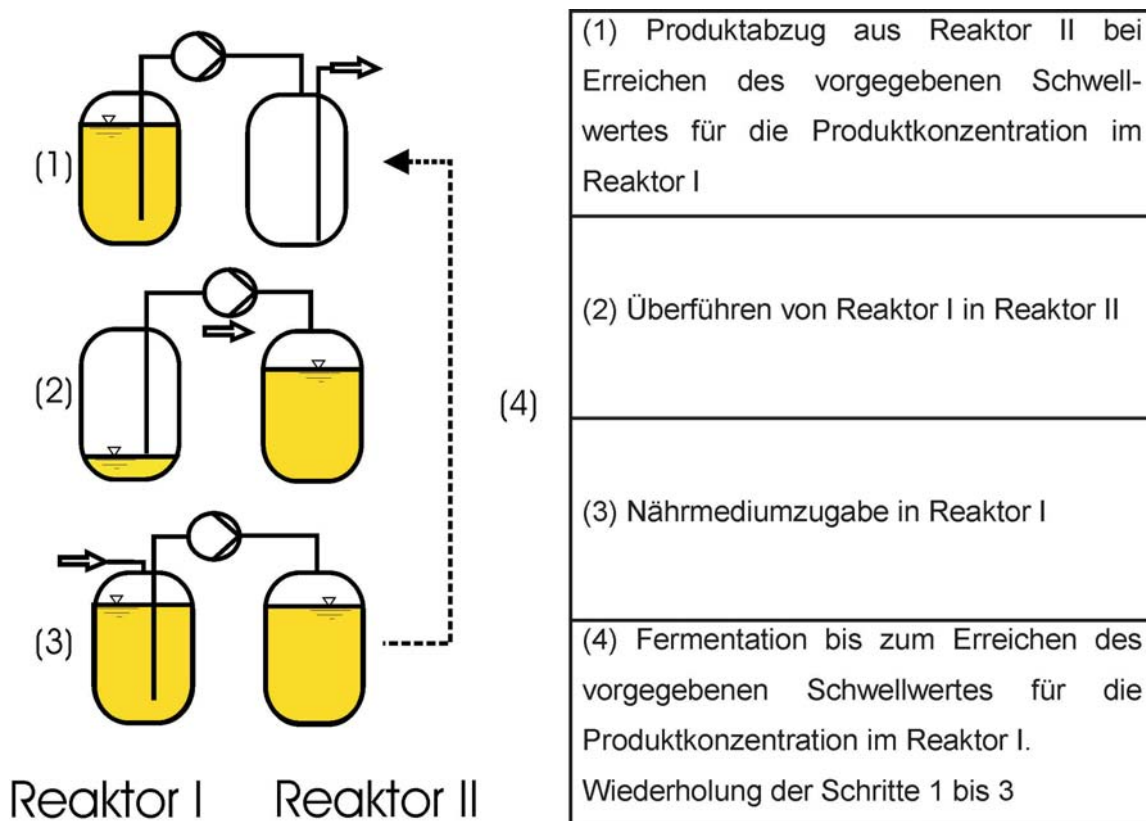
**Abbildung 1-1: Zweistufiges zyklisch betriebenes Zulaufverfahren nach Ito et al. [1991]**

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Optimierung eines verbesserten semikontinuierlichen Verfahrens, welches hohe integrale Raum-Zeit-Ausbeuten bei gleichzeitig hoher Produktkonzentration liefert. Der apparative und steriltechnische Aufwand soll dabei so gering wie möglich gehalten werden.

Als Grundlage für die Verfahrensentwicklung soll das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren von Ito in modifizierter Form dienen [Ito, 1991]. Die DHA-Produktion wird dabei in zwei räumlich getrennten Stufen aufgeteilt. Die erste Stufe dient der Bereitstellung und Bildung einer vitalen und regenerationsfähigen Kultur und die zweite Stufe dem Erreichen einer für die Produktaufarbeitung vorteilhaften hohen Produktkonzentration. Bei



Erreichen des vorgegebenen Schwellwertes für die Produktkonzentration wird der Inhalt der ersten Stufe bis auf ein bestimmtes Restvolumen in die zweite Stufe übergeführt. Während in der ersten Stufe durch die Zugabe von frischem Medium der nächste Zyklus beginnt wird in der zweiten Stufe bis zum nächsten Chargenwechsel weiterkultiviert. Vor jedem Chargenwechsel wird der Inhalt der zweiten Stufe der Aufarbeitung zugeführt. In Abbildung 1-2 ist das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren im Dauerbetrieb (Schritte 1 bis 4) dargestellt.



**Abbildung 1-2: Zweistufiges zyklisch betriebenes Zulaufverfahren**

Die Grundlage für die Umsetzung des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens stellt eine genaue Kenntnis über den Einfluss von DHA auf die Kultur dar. Der Einfluss von DHA auf die Kultur wurde zwar schon von vielen Forschergruppen beschrieben, die Ergebnisse schwanken jedoch zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen sehr stark und lassen zudem keine Aussage über die Regenerationsfähigkeit der Kultur in Abhängigkeit des zeitlichen und absoluten Einflusses von DHA zu. Für die Ermittlung eines geeigneten DHA-Schwellwertes für das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren und für die Simulation semikontinuierlicher Verfahren ist es wichtig, den absoluten und zeitlichen Einfluss von DHA zu kennen. Dies setzt allerdings experimentelle Untersuchungen des DHA-Einflusses voraus.

Neben der Umsetzung des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens soll eine Verfahrensoptimierung erfolgen. Eine erste Möglichkeit stellt dabei die Zugabe einer weiteren Kohlenstoffquelle in der ersten Stufe dar, die zu einer höheren Biomasse und somit zu höheren Produktbildungsraten führen soll. Hierfür sollen verschiedene Kohlenstoffquellen auf ihre Eignung hin überprüft werden. Eine weitere Möglichkeit der Prozessintensivierung und Optimierung stellt die Erhöhung der Biomassekonzentration in der ersten Stufe durch Zellrückhaltung dar. Die Zellrückhaltung soll durch adsorptive Immobilisierung der Zellen auf eine Trägermatrix realisiert werden. Durch die Immobilisierung werden die Zellen zu einer eigenständigen lokalisierbaren Phase, die auf einfache Art und Weise von der flüssigen Umgebung abgetrennt und somit im Reaktionsvolumen zurückgehalten werden kann. Der sich daraus ergebende Vorteil ist eine Anreicherung der Zellen in der ersten Reaktorstufe, wodurch über die erhöhte Zellenkonzentration eine höhere Produktivität erreicht wird. Die höhere Biomassekonzentration in der ersten Stufe führt zu höheren Produktbildungsraten und damit zum schnelleren Erreichen des Schwellwertes für DHA. Durch die Verkürzung der Zykluszeit lässt sich somit die Produktbildungsrate des Verfahrens erhöhen.

Begleitend zu den experimentellen Untersuchungen wird ein Modell entwickelt, das sich für die Simulation semikontinuierlicher Verfahren eignet. Als Grundlage für dieses Modell dienen die entsprechenden Stoffbilanzen sowie die formalkinetischen Ansätze für die Bioreaktion. Um den Einfluss von DHA auf die Kultur besser berücksichtigen zu können wird auf Basis der experimentellen Ergebnisse eine Unterteilung der Zellen in verschiedene Zellzustände vorgenommen. Zudem soll das Modell die für die instationäre Betriebsweise semikontinuierlicher Verfahren charakteristischen dynamischen Anpassungseffekte der Mikroorganismen bei sich schlagartig ändernden Milieubedingungen (Chargenwechsel) beschreiben können. Die Güte des Modells wird schließlich mit Hilfe experimentell gewonnener Datensätze überprüft. In einem zweiten Schritt wird mit Hilfe dieses Modells eine rechnergestützte Optimierung des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens im Technikumsmaßstab bezüglich des Restvolumens und des DHA-Schwellwertes durchgeführt.

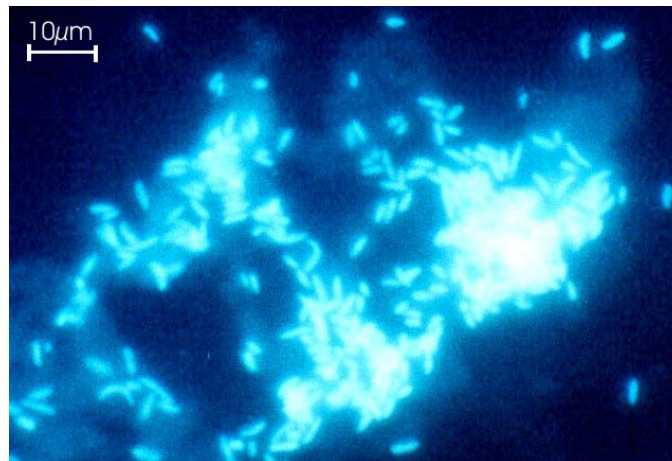
## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Biologie von *Gluconobacter oxydans*

#### 2.1.1 Taxonomie, Morphologie und Vorkommen von *Gluconobacter oxydans*

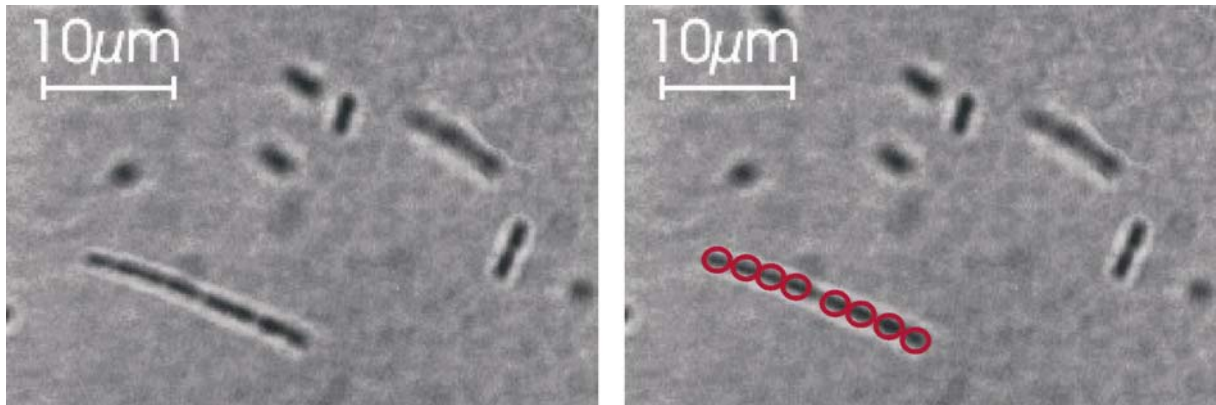
Die Gattungen *Gluconobacter* und *Acetobacter* werden nach Bergey's Manual of Systematic Bacteriology der Familie der *Acetobacteraceae* zugeordnet [De Ley et al. 1984]. Ein Charakteristikum der Familie der *Acetobacteraceae* ist die Fähigkeit, bei tiefen pH Ethanol zu Acetat zu oxidieren. Im Gegensatz zu *Acetobacter* ist die Gattung *Gluconobacter* allerdings nicht in der Lage, Acetat zu Wasser und Kohlendioxid zu oxidieren.

*Gluconobacter oxydans* ist ein strikt aerobes, stäbchenförmiges Bakterium mit einem Durchmesser von 0.5 bis 1  $\mu\text{m}$  und einer Länge zwischen 1 und 4  $\mu\text{m}$  [Macauley et al, 2001].



**Abbildung 2-1: Darstellung von *Gluconobacter oxydans*; zyklisch betriebenes Zulaufverfahren im Laborblasensäulenreaktor; DAPI-Färbung; (Fluoreszenzphotographie, 1000-fache Vergrößerung)**

Der Mikroorganismus besitzt polar inserierte Geißeln, mit denen er schwach beweglich ist [Schlegel, 1976]. Ist *Gluconobacter oxydans* ungünstigen Lebensbedingungen, wie dem Mangel einer geeigneten C-Quelle ausgesetzt, tritt ein Wandel in der Morphologie des Bakteriums ein. Es bildet sich ein Kolonieverband mit einer Länge von bis zu 60  $\mu\text{m}$  [Katsikis, 2003].



**Abbildung 2-2: Probe einer Schleimkolonie von *Gluconobacter oxydans* (links: Kolonieverband, rechts: Hervorheben des Kolonieverbandes durch Markierung) aus einem Lauf des zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens im Technikum; (1000-fache Vergrößerung, Verdünnung: 1:10; Hellfeld-Aufnahme)**

Da dieser von einer Gallerthülle aus Polysacchariden und Polypeptiden umzogen ist, wird er auch „Schleimkolonie“ genannt [Vogel und Angermann, 1984]. Diese entsteht bei der ungeschlechtlichen Fortpflanzung durch Querteilung senkrecht zur Längsachse, wenn die entstehenden Tochterzellen nach der Spaltung verbunden bleiben. Die Koloniebildung dient der Kultur vermutlich als Schutz vor schlechten Umweltbedingungen wie Nährstoffmangel.

In der Natur ist *Gluconobacter oxydans* vornehmlich in Blüten und Früchten anzutreffen [Swings, 1992]. *Gluconobacter oxydans* ist in der Lage, eine Vielzahl von Polyolen mittels membrangebundener Dehydrogenasen zu Säuren, Aldehyden und Ketonen zu oxidieren. Diese Art der unvollständigen Oxidation lässt sich mit dem reichhaltigen Angebot von Nährstoffen in seiner Umgebung erklären.

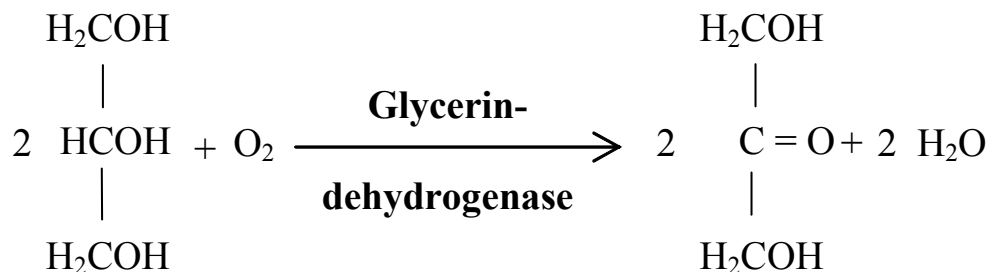
Der in dieser Arbeit verwendete *Gluconobacter*-Stamm ist der Hochleistungsstamm M1136 aus der Stammsammlung der Firma Merck KGaA, Darmstadt. Der Vergleich von Ergebnissen, die mit einer Kultur aus öffentlichen Stammsammlungen gewonnen wurden, ist daher nur bedingt möglich.

### 2.1.2 Stoffwechsel von *Gluconobacter oxydans*

*Gluconobacter oxydans* ist in der Lage, mittels membrangebundener Dehydrogenasen eine Vielzahl von Polyolen zu oxidieren. Neben der enzymatischen Oxidation von Glycerin zu DHA ist die Umwandlung von Sorbit in Sorbose von wirtschaftlicher Bedeutung, da sie einen

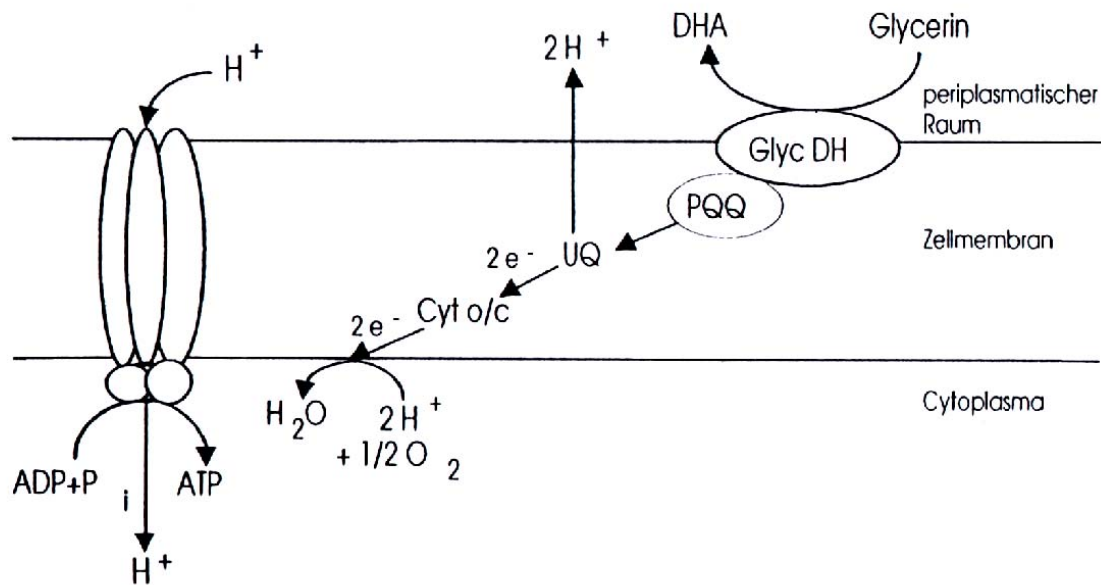
wichtigen Zwischenschritt für die Vitamin C-Herstellung darstellt. Eine weitere industrielle Anwendung ist die Herstellung von Gluconsäure, 5-Keto-, und 2-Ketogluconsäure aus Glucose mittels *Gluconobacter oxydans*. Eine ausführliche Übersicht über weitere biotechnologisch interessante Produkte und Anwendungen in der Biosensortechnik von *Gluconobacter oxydans* bieten die Arbeiten von Lusta, Gupta und Macauley [Lusta et al. (1998); Macauley et al. (2001); Gupta und Singh, 2001].

In dieser Arbeit wird von *Gluconobacter oxydans* Glycerin mittels einer membranständigen Glycerindehydrogenase zu DHA oxidiert [Claret et al., 1994]. Der Kultur dient diese unvollständige Oxidation zur Gewinnung von Energie in Form von ATP für den Erhaltungsstoffwechsel und die Vermehrung [Wethmar, 1998].



**Abbildung 2-3: Reaktionsgleichung der Oxidation von Glycerin zu Dihydroxyacetone**

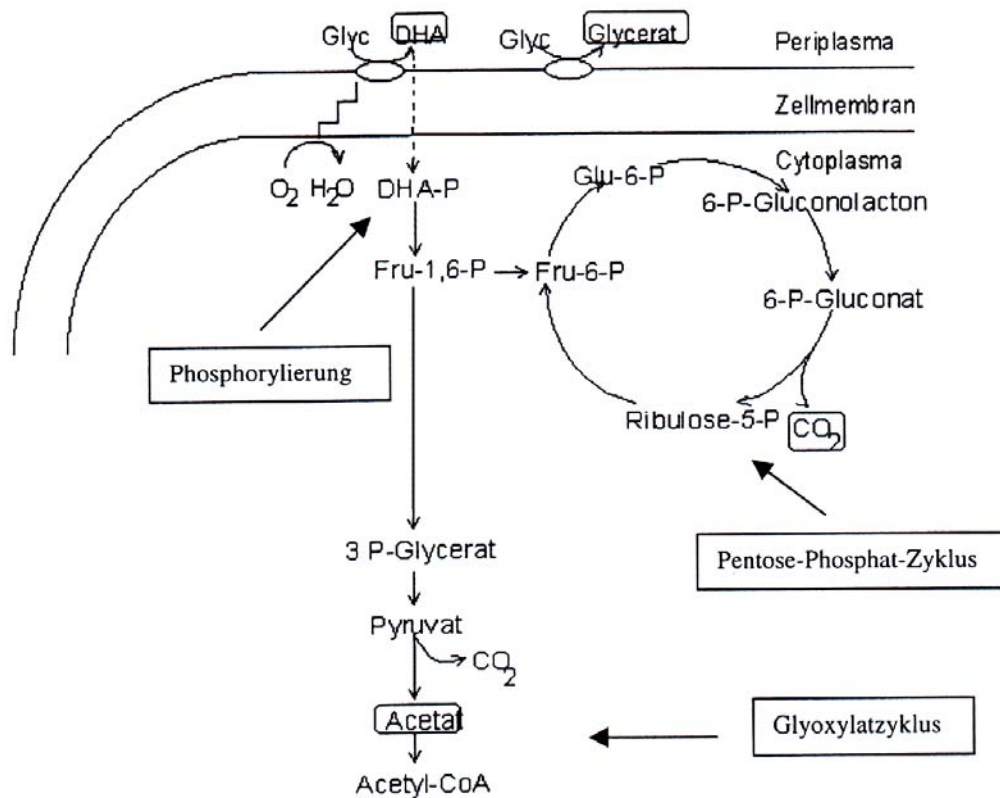
Der Elektronentransfer vom Glycerin auf das Sauerstoffmolekül erfolgt bei *Gluconobacter oxydans* nicht über den Weg der NAD(P)H<sub>2</sub>-Bildung, sondern über einen alternativen Weg. Dieser lässt sich in mehrere Teilschritte gliedern. Die entscheidende prosthetische Gruppe der Glycerindehydrogenase, welche in der äußeren Lipiddoppelschicht sitzt, ist Pyrrolochinolinchinon (PQQ) [Ameyama et al., 1981]. PQQ katalysiert die Oxidation von Glycerin zu DHA. Als nächstes Glied der Atmungskette folgt Ubichinon, ein lipidlösliches Benzochinon, welches in der Lage ist, Protonen aus dem Zellinneren in den periplasmatischen Raum und die Elektronen auf das letzte Glied der Kette, die Elektronenübertragungsproteine Cytochrom c und o der Plasmamembran zu übertragen [Lehninger et al., 1994]. Beim Zurückfließen der ausgeschiedenen Protonen wird durch die in der Membran lokalisierten ATPasen aus ADP und Phosphat ATP gebildet [Wethmar, 1998].



**Abbildung 2-4: Atmungskette und ATP-Synthese an der Zellmembran [Wethmar, 1998]**

Die Existenz einer intrazellulären Glycerindihydrogenase im Cytoplasma und der damit verbundenen Anreicherung von DHA innerhalb der Zelle wird zwar von verschiedenen Gruppen in der Literatur erwähnt, hat aber einen kaum messbaren Einfluss und kann deshalb vernachlässigt werden. [Bories et al., 1991; Claret et al., 1994; Hauge et al., 1954, a, b]

Das gebildete Oxidationsprodukt DHA wird in das umgebende Medium ausgeschieden. Es kommt zur Akkumulation des Produkts, da die Umsetzung von Glycerin zu DHA schneller verläuft als die Veratmung von DHA über den Pentose-Phosphat-Zyklus, der in Abbildung 2-5 gezeigt ist. Hierzu wird DHA in die Zelle eingeschleust und phosphoryliert. Das so entstandene DHA-Phosphat (DHA-P) wird umgewandelt in Fructose-1,6-Phosphat (Fru-1,6-P) und letztlich in Fructose-6-Phosphat (Fru-6-P), welches Teil des Pentose-Phosphat-Zyklus ist.



**Abbildung 2-5: Glycerinumsetzung durch *Gluconobacter oxydans* nach Bettin et al. [1996]**

Der Pentose-Phosphat-Zyklus wird durch einen sinkenden pH in der Kulturbrühe zunehmend gehemmt. Unterhalb eines pH von 3.5 bis 4 kommt er vollkommen zum Erliegen [Ohrem, 1994]. Die Veratmung von DHA kann demnach durch niedrige pH unterdrückt werden. Gleichzeitig wird jedoch auch das Wachstum der Bakterien gehemmt, da der Pentose-Phosphat-Zyklus wichtig für den Aufbau von Biomasse ist.

*Gluconobacter oxydans* fehlen wichtige Schritte des Zitronensäurezyklus [De Ley et al. 1961] und der Glycolyse [Hauge et al. 1954 b]. Der Mikroorganismus besitzt keine Citratsynthase und keine Dehydrogenasen zur Spaltung von Pyruvat. Stattdessen setzt *Gluconobacter oxydans* Pyruvat mit Hilfe einer Pyruvatcarboxylase unter Abspaltung von Kohlendioxid in Acetat um. Zur Versorgung der Zellen mit Energie und C-Bausteinen verwendet *Gluconobacter oxydans* die Enzyme des Glyoxylatzyklus [Sommer et al., 1998]. Der Glyoxylatzyklus ist eine Variante des Zitronensäurezyklus. Glyoxylsäure kondensiert mit Acetyl-CoA zur Apfelsäure. Aus Apfelsäure kann Oxaloesigsäure regeneriert werden, die mit einem weiteren Molekül Acetyl-CoA zur Zitronensäure kondensiert.

Bei der Glycerinumsetzung entstehen also neben DHA und Biomasse auch Nebenprodukte, insbesondere Glycerat und Acetat. Diese Säuren sind maßgebliche Ursache für den Abfall des pH während der Kultivierung.

### **2.1.3 Einflussfaktoren auf Wachstum und Produktbildung von *Gluconobacter oxydans***

In der Literatur lassen sich eine Vielzahl von Informationen über die DHA-Produktion mittels *Gluconobacter oxydans* finden. Dieses Kapitel soll daher eine Übersicht über die in der Literatur beschriebenen Einflussfaktoren auf Wachstum und Produktbildung von *Gluconobacter oxydans* bieten. Die wichtigsten Einflussgrößen sind Temperatur, pH, Sauerstoff, Glycerin, DHA und weitere im Nährmedium enthaltenen Stoffe wie Calciumchlorid.

#### **2.1.3.1 Glycerin**

Glycerin dient *Gluconobacter oxydans* als Energiequelle und als Kohlenstoffquelle zum Aufbau von Biomasse (siehe Kap. 1.1.2). Glycerin wirkt auf *Gluconobacter oxydans* sowohl limitierend als auch inhibierend [Wethmar, 1998].

Claret et al. [1992] untersuchten in Läufen im Satzbetrieb für Glycerinkonzentrationen von 31 g/l bis 129 g/l dessen Einfluss auf Wachstum und Produktbildung. Sie stellten fest, dass die Wachstumsrate mit einer steigenden Glycerinstartkonzentration von 31 g/l auf 129 g/l um 70 % abnahm. Gleichzeitig nahm die Produktbildungsrate um 30 % ab.

Ohrem [1994] stellte in Schüttelkolbenversuchen fest, dass ab einer Glycerinkonzentration von 350 g/l kein Wachstum mehr möglich war und dass mit steigender Glycerinkonzentration die Inhibition auf das Wachstum linear zunahm. Die Produktbildung wurde indessen durch hohe Glycerinkonzentrationen nicht gehemmt. Eine Substratlimitierung wurde von ihm nicht festgestellt.

Wethmar [1998] versuchte in Schüttelkolbenversuchen den Glycerineinfluss genauer zu quantifizieren. Die starke Streuung der spezifischen Wachstumsrate ließ allerdings eine genauere Quantifizierung nicht zu. Weitere Untersuchungen im Chemostat ergaben, dass die für das Wachstum und die Produktbildung optimale Glycerinkonzentration bei 10-20 g/l lag. Gestützt wurde diese Untersuchung durch Versuche von Bettin et al. [1996], die herausfanden, dass die Glycerinverbrauchsrate bis 10 g/l zunahm und oberhalb von 20 g/l abnahm (Abbildung 2-6).



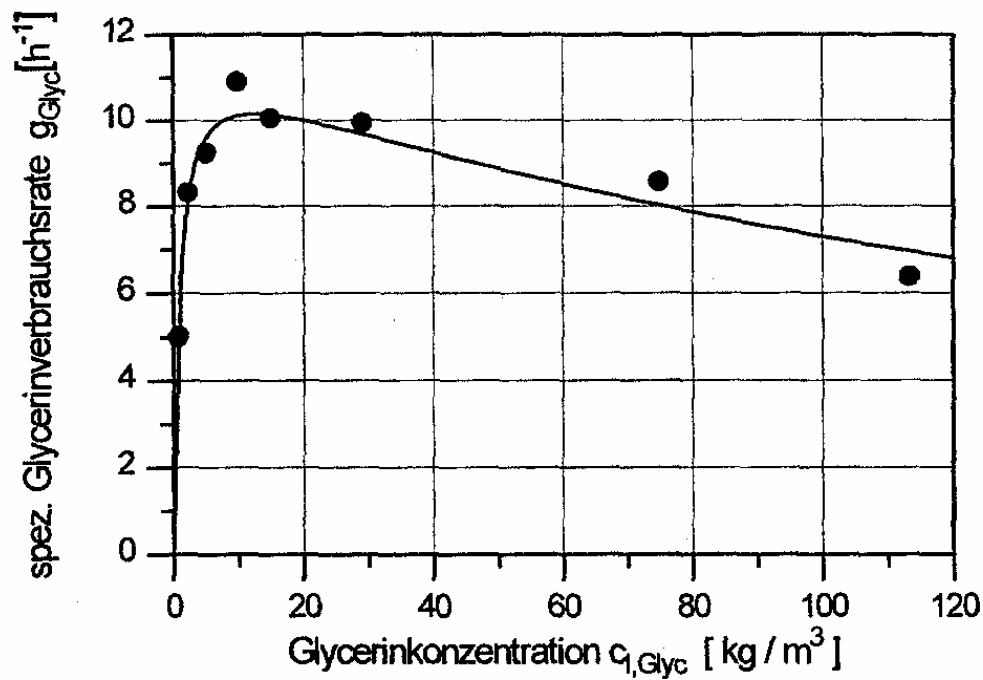


Abbildung 2-6: Spezifische Glycerinverbrauchsrate in Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration bei kontinuierlichem Betrieb im 2 l Rührkessel nach Bettin et al., [1996]

### 2.1.3.2 Weitere Kohlenstoffquellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass *Gluconobacter oxydans* eine Vielzahl von Polyolen oxidieren kann. Einen Überblick über ausgewählte, von *Gluconobacter oxydans* oxidierbare Kohlenstoffquellen ist in den Übersichtsarbeiten von Lusta, Gupta und Macauley gegeben [Lusta et al. (1998); Macauley et al. (2001); Gupta und Singh, 2001]. Ziel der Zugabe einer weiteren Kohlenstoffquelle ist es, die aktive Biomasse im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren zu erhöhen und somit die Produktbildungsrate des Prozesses zu verbessern. Interessante Untersuchungen auf diesem Gebiet wurden von Yamada et al. angestellt [1979, b]. Er entdeckte, dass mit Glucose und Fructose als einziger Kohlenstoffquelle im Schüttelkolben höhere Biomassen und eine höhere Enzymaktivität von Glycerindehydrogenase erreicht wurden als mit Glycerin als Kohlenstoffquelle (Tabelle 2-1). Die besten Ergebnisse erreichte Yamada mit 8 - 20 gew.-% Sorbit bzw. Mannit als einziger Kohlenstoffquelle.

**Tabelle 2-1: Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Biomasse- und die Glycerindehydrogenasebildung von *Acetobacter suboxydans* [Yamada; 1979, b]**

Einziges Kohlenstoffquelle	Zugabemenge ( Gew-% )	Biomasse (mg/ml)	Enzymaktivität (Units pro ml Kulturbrühe)
Glucose	20	3.63	3.22
Fructose	20	3.13	2.89
Glycerin	20	2.9	2.93
Sorbit	20	4.02	5.49
Mannit	20	4.15	5.29

In den Patenten von Ohrem et al. [Ohrem et al. 1995] und Charney [Charney, 1978] zur industriellen Gewinnung von DHA mittels *Gluconobacter oxydans* ließ sich in der Nährmedienzusammensetzung die Zugabe von verschiedenen zusätzlichen C-Quellen finden. Diese waren Glucose und Sorbit. Die Auswirkungen auf die Biomasse- und Produktbildung wurden hingegen nicht näher beschrieben.

### 2.1.3.3 Dihydroxyaceton (DHA)

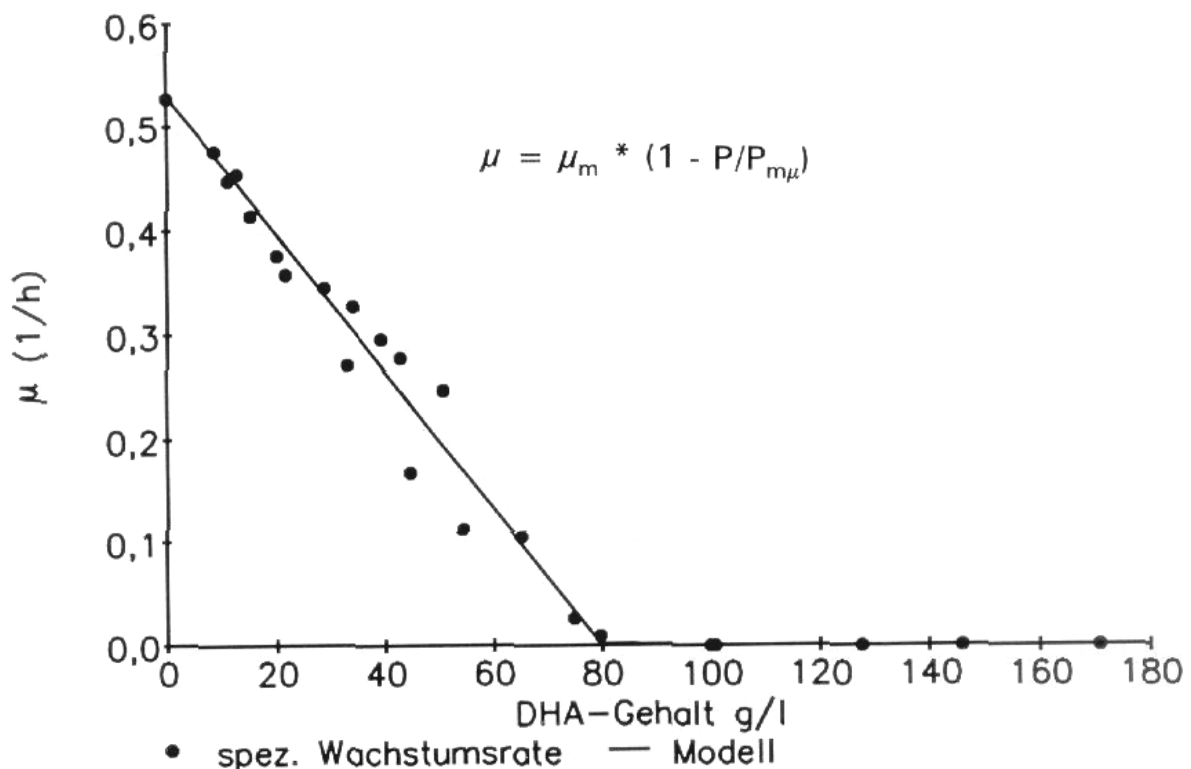
Dihydroxyaceton ist das bei der unvollständigen Glycerinoxidation extrazellulär anfallende Produkt. Mit steigender DHA-Konzentration wird die spezifische Glycerinverbrauchsrate, die DHA-Produktbildungsrate und die Wachstumsrate inhibiert.

Wethmar [1998] stellte im Chemostat durch die Variation der Durchflussrate DHA-Konzentrationen von 0 g/l bis 60 g/l ein. Dabei zeigte sich, dass die Inhibierung der spezifischen Wachstumsrate durch DHA deutlich stärker war, als die der spezifischen DHA-Produktbildungsrate. Die spezifische Wachstumsrate wurde, bei einer Erhöhung der DHA-Konzentration von 0 g/l auf 60 g/l, um 84 % reduziert, wohingegen die spezifische DHA-Produktbildungsrate um 58 % vermindert wurde.

Claret et al. [1993] untersuchte im Satzbetrieb, in denen er DHA-Konzentrationen von 0 bis 100 g/l vorlegte, welchen Einfluss DHA auf Wachstum und Produktbildung hat. Er stellte fest, dass die Kultur bis 85 g/l wachstumsfähig ist. Eine niedrigere Konzentration gaben hingegen Bories et al. [1991] an. Sie hatten bereits ab 61 g/l DHA im Medium in Versuchen im Zulaufverfahren kein Zellwachstum mehr gemessen. Durch wachstumsunabhängige Produkt-

bildung konnten sie die Konzentration an DHA noch bis 108 g/l steigern. Über diesen Wert war eine Umsetzung von Glycerin nicht mehr möglich. Zudem stellten Borjes et al. [1991] fest, dass DHA nicht nur einen inhibierenden Einfluss auf die Produktivität und das Wachstum der Mikroorganismen hat, sondern auch zu einer irreversiblen Schädigung der Wachstumsfähigkeit der Zellen führen kann. Die Schädigung war umso größer, je höher die DHA-Konzentration war, der die Zellen ausgesetzt wurden. Eine genauere Quantifizierung dieses Phänomens nahmen sie jedoch nicht vor.

Die oben genannten Werte stehen im Widerspruch zu deutlich höheren Schwellwerten, die Ohrem [1994] veröffentlichte. Ein möglicher Grund dafür ist, dass Ohrem mit dem Hochleistungsstamm M1136 der Firma Merck arbeitete, die anderen Arbeitsgruppen ihren Stamm hingegen aus öffentlichen Stammsammlungen bezogen. Ohrem ermittelte eine DHA-Endkonzentration von fast 200 g/l und beobachtete einen Stillstand des Wachstums erst ab 80 g/l (Abbildung 2-7).



**Abbildung 2-7: Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate in Abhängigkeit der DHA-Konzentration im Schüttelkolben [Ohrem et al.; 1996]**

Zudem postulierte Ohrem die Existenz von Sterilzellen, welche zwar nicht mehr teilungsfähig waren, aber noch Produkt bilden konnten. Ihre Bildung wurde durch höher werdende DHA-

Konzentrationen während der Kultivierung beschleunigt. Des Weiteren untersuchte Ohrem den zeitlichen Einfluss von DHA auf die Kultur. So stellte Ohrem et al. [1996] fest, dass mit zunehmender Einwirkdauer einer im Schüttelkolben fest vorgegebenen DHA-Konzentration die relative Vitalität der Kultur abnahm. Eine genauere Quantifizierung dieses Effektes wurde von Ohrem jedoch nicht vorgenommen.

#### 2.1.3.4 Sauerstoff

*Gluconobacter oxydans* ist ein strikt aerobes Bakterium und benötigt Sauerstoff als Elektronenakzeptor für die Umsetzung von Glycerin zu DHA (Kapitel 2.1.2). Deshalb ist die Kultur auf eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff angewiesen.

Bettin et al. [1996] untersuchten in einem Rührkesselreaktor den Einfluss von Sauerstoff während einer kontinuierlichen Kultivierung auf die spezifische Produktbildungsrate. Oberhalb einer Sauerstoffkonzentration von 30 % der Luftsättigung (= 2.25 mg/l Sauerstoff bei  $T = 30$  °C) übte die Sauerstoffkonzentration keinen signifikanten Einfluss auf die spezifische Produktbildungsrate aus. Unterhalb einer Luftsättigung von 30 % beobachteten Bettin et al. [1996] einen limitierenden Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die spezifische Produktbildungsrate. Unterhalb von 10 % (= 0.75 mg/l Sauerstoff bei  $T = 30$  °C) wurde dieser Einfluss signifikant (Abbildung 2-8). Die von Ohrem [1994] durchgeführten Untersuchungen stimmen mit den Ergebnissen von Bettin [1996] überein. Yamada et al. [1979, a] entdeckten, dass eine Erhöhung der Gelöstsauerstoffkonzentration über 17 % (= 1.275 mg/l Sauerstoff bei  $T = 30$  °C) zu keiner weiteren Verbesserung der Produktbildungsrate und der Wachstumsrate führte.

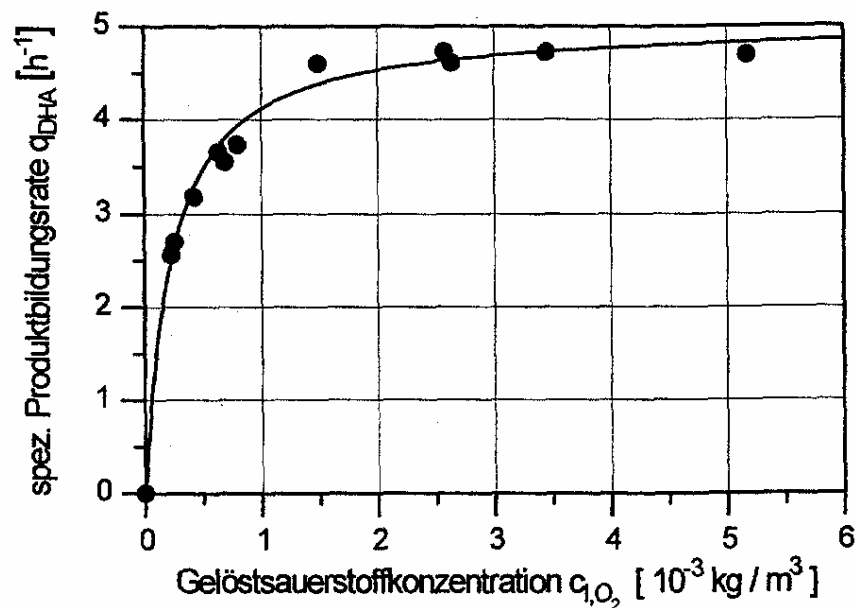


Abbildung 2-8: Spezifische DHA-Produktbildungsrate in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration bei kontinuierlicher Kultivierung im Rührkesselreaktor nach Bettin et al., [1996]

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine ausreichende Versorgung der Kultur mit Sauerstoff gewährleistet ist, wenn eine Gelöstsauerstoffkonzentration von 20 % (= 1.5 mg/l Sauerstoff bei  $T = 30$  °C) nicht signifikant unterschritten wird.

### 2.1.3.5 Nährsalze und Einfluss von Calciumchlorid

Zum Wachstum benötigt *Gluconobacter oxydans* neben einer geeigneten Kohlenstoffquelle und Sauerstoff auch noch weitere Makroelemente wie Stickstoff, Phosphor, Schwefel, Kalium, Calcium, Natrium, Magnesium etc. und weitere Suppline (Ergänzungstoffe) wie Aminosäuren, Vitamine, Purine oder andere Substanzen [Schlegel, 1976]. Um den Bedarf von *Gluconobacter oxydans* an diesen Stoffen zu decken, werden dem Nährmedium die Makroelemente in Form von Salzen zugegeben. Der Bedarf an Supplinen wird durch die Zugabe von Hefeextrakt gedeckt. Die Medienzusammensetzung ist in Kapitel 3.2 zu finden. Einer besonderen Betrachtung bedarf die Zugabe von Calcium zum Nährmedium, da viele Arbeitsgruppen aufgrund der schlechten Löslichkeit von  $Ca^{2+}$ -Ionen auf dessen Zugabe verzichteten [Claret, 1994; Hekmat, 2001, 2003]. Ohrem [1994] und Wethmar [1998] fanden allerdings heraus, dass sich die Zugabe von  $CaCl_2$  zum Nährmedium positiv auf das Wachstum und die Pro-

duktbildung auswirkte. Ohrem [1994] injizierte einer kontinuierlichen Kultur im Fließgleichgewicht 2 g/l  $\text{CaCl}_2$  und beobachtete eine signifikante Steigerung der Oxygen Uptake Rate (OUR) um 80 %, welche ein Maß für die Produktivität ist. Als Begründung für diesen Effekt verwies Ohrem auf die Fähigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, DHA in einem bimolekularen Komplex zu binden und damit die Konzentrationen an freiem DHA zu senken. Der  $\text{CaCl}_2$ -Einfluss lässt sich allerdings mit der Theorie von Ohrem [1994] nicht hinreichend erklären. Zwar können  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen DHA in einem tetrakoordinierten Komplex binden, aber bei hohen DHA-Konzentrationen von 60 bis 180 g/l befindet sich im Kultivierungsmedium ein Großteil des Dihydroxacetons im ungebundenen Zustand. Dies lässt sich durch eine einfache Berechnung für eine Lösung mit 120 g/l DHA zeigen. Die Molmasse von DHA beträgt 90 g/mol, also befindet sich in einem Liter dieser Lösung 1.33 mol. Bei einer Zugabe von 2 g/l  $\text{CaCl}_2$  befindet sich in einem Liter Lösung 0.018 mol  $\text{CaCl}_2$ . Also bleiben  $1.33 - 4 \cdot 0.018 = 1.258$  mol DHA in der Lösung ungebunden. In Schüttelkolbenversuchen konnte Katsikis [2003] durch die Zugabe von 1.5 g/l Calciumchlorid eine Steigerung der Wachstumsrate um 26 % feststellen. Die DHA-Konzentration lag zum Zeitpunkt der Messung im Schüttelkolben unter 5 g/l. Nach Abbildung 2-7 traten keine nennenswerten inhibierenden Effekte durch DHA bei diesen Konzentrationen auf. Eine Verminderung der inhibierenden Effekte von DHA durch  $\text{CaCl}_2$  ist somit auszuschließen. Varga [2004] führte hingegen die wachstumsfördernde Wirkung von Calcium auf zellinterne Vorgänge zurück. Calcium hat einen positiven Einfluss auf das Wachstum von Mikroorganismen, in dem es die chromosomale Replikation fördert [Stokes und Green, 2000]. Es hat auch eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion in der Zelle, in dem es eine integrale Rolle in der Funktion von den Calciumkanälen einnimmt. Für die Erforschung der Funktionsweise dieser komplexen Membranproteine durch site-induzierter Mutagenese sowie durch Röntgenkristallographie wurde der Chemie-Nobelpreis 2003 an den Wissenschaftler Roderick Mac Kinnon vergeben. Die Signaltransduktion reguliert auch die Aufnahme der Nährmedienbestandteile durch die Zelle (Sauerstoff, Kohlenstoffquellen) [Albers 1967]. Calcium spielt eine wichtige Rolle bei der Energieerzeugung in der Zelle durch die Funktion der calciumabhängigen ATPasen [de Meis und Vianna, 1979]. Die Erzeugung der aktivierten phosphorylierten Verbindungen in der Zelle ist also auch calciumgebunden. Calcium verbessert auch die Stressresistenz der Zellen, indem es die Aktivität der regulierenden Proteine potenziert.

In dieser Arbeit wurde deshalb mit einer Zugabe von 1.5 g/l  $\text{CaCl}_2$  zum Nährmedium gearbeitet. Die Zugabe von Calciumsalzen verursachte mit anderen Komponenten des Nährmedi-

ums einen Niederschlag nach dem Autoklavieren. Deshalb musste es getrennt zum Nährmedium zugeführt werden.

### 2.1.3.6 pH

*Gluconobacter oxydans* gehört zur Familie der Essigsäurebakterien und toleriert daher einen sauren pH. Da der pH, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, die Stoffwechselfvorgänge von *Gluconobacter oxydans* stark beeinflusst, ist es wichtig, bei einem für Wachstum und Produktbildung optimalen pH zu arbeiten.

Yamada et al. [1979, a] stellte bei einem pH von 5.5 optimales Wachstum und Produktbildung fest. Oberhalb eines pH von 7 nahm sowohl das Wachstum als auch die Produktbildung ab. Für das Enzym Glycerindehydrogenase fand Yamada et al. [1979, b] einen optimalen Bereich von pH 5 bis 6. Im Widerspruch zu dieser Tendenz aus den Arbeiten vieler Forschungsgruppen fanden Ohrem und Voß [1994] heraus, dass sich eine Absenkung des pH auf 4.5 im Zulaufverfahren wachstumsförderlich auswirkte. Eine Anhebung des pH von 4.5 auf 6.0 bzw. von 5.0 auf 6.0 im Chemostat-Betrieb brachte deutliche Einbußen in der spezifischen Atmungsaktivität der Kultur, die direkt mit dem spezifischen Wachstum korreliert. Zudem stellte Ohrem fest, dass *Gluconobacter oxydans* oberhalb eines pH von 5.0 in der Lage ist, DHA zu veratmen.

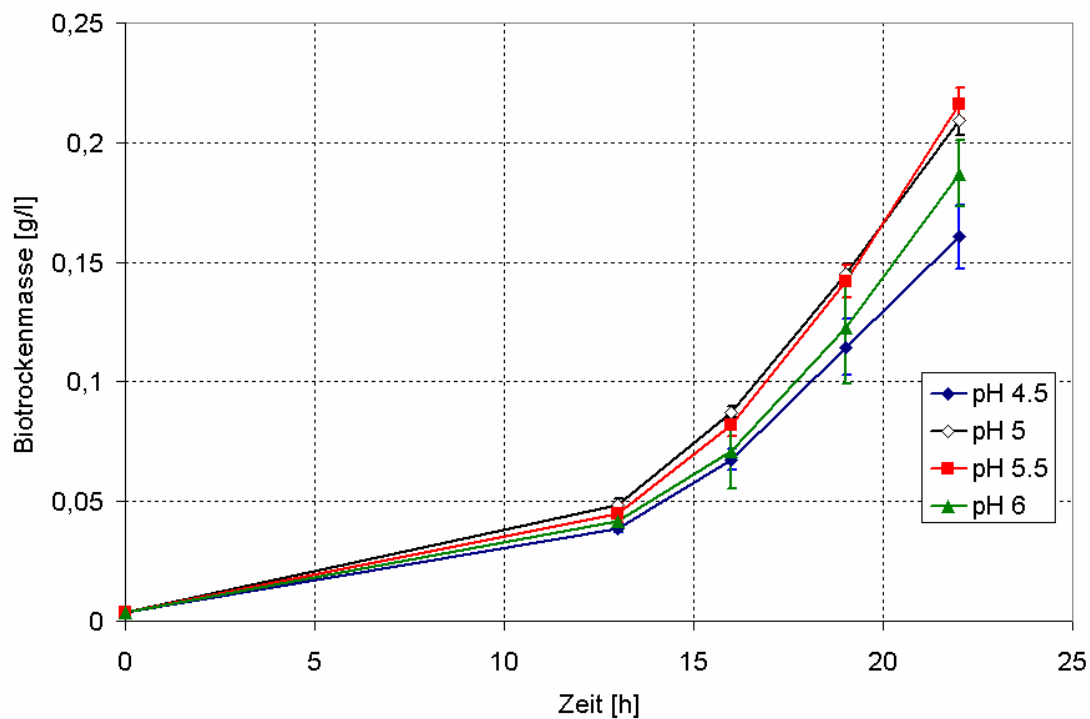
In Tabelle 2-2 ist ein Überblick über den optimalen pH in Bezug auf das Wachstum von *Gluconobacter oxydans* basierend auf Literaturdaten gegeben.

**Tabelle 2-2: Zusammenstellung optimaler pH in Bezug auf das Wachstum von *Gluconobacter oxydans* aus veröffentlichten experimentellen Untersuchungen**

Referenz	Jahr	pH
Adlerkreutz et al.	1985	5
Bories et al.	1991	6
Flickinger und Perlman	1977	7
Makhotkina et al.	1981	5
Molinari et al.	1995	6.3
Ohrem et al.	1994	4.5
Svitel und Strudrik	1994	5

Underkofler und Fulmer	1937	5.5 - 7
Wethmar	1998	5.5
Yamada et al.	1979	5.5

Aufgrund der grossen Bandbreite der Versuchsergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen wurden eigene Untersuchungen durchgeführt. In Schüttelkolbenversuchen konnte, wie in Abbildung 2-9 ersichtlich, festgestellt werden, dass die Biomassebildung für einen pH zwischen 5.0 und 5.5 optimal ist. In dieser Arbeit wurde deshalb in sämtlichen Technikums- und Laborreaktorversuchen mit einem pH von 5.3 gearbeitet.



**Abbildung 2-9: Einfluss des pH auf die Biomassebildung im Schüttelkolben (eigene Messungen)**

### 2.1.3.7 Temperatur

Von entscheidender Bedeutung für das Wachstum und die Produktbildung von *Gluconobacter oxydans* ist die Temperatur. Sie beeinflusst unmittelbar über die Enzymaktivität die Stoff-



wechselforgänge des Mikroorganismus. Der für das Wachstum optimale Temperaturbereich liegt nach Tabelle 2-3 in einem Bereich zwischen 28 °C und 30 °C.

**Tabelle 2-3: Zusammenstellung optimaler Temperaturen in Bezug auf das Wachstum von *Gluconobacter oxydans* aus veröffentlichten experimentellen Untersuchungen**

Referenz	Jahr	Temperatur [°C]
Adlerkreutz et al.	1985	30
Bories et al.	1991	28
Flickinger und Perlman	1977	30
Makhotinka et al.	1981	26-28
Molinari et al.	1995	28
Ohrem	1994	30
Svitel und Strudrik	1994	30
Underkofler und Fulmer	1937	28-30
Wethmar	1998	28

Weitere Untersuchungen bezüglich der Glycerindehydrogenase ergaben für den Umsatz von Glycerin in DHA eine optimale Temperatur von ca. 35 °C (Tabelle 2-4).

**Tabelle 2-4: Zusammenstellung optimaler Temperaturen in Bezug auf den Umsatz von Glycerin zu DHA durch *Gluconobacter oxydans* aus veröffentlichten experimentellen Untersuchungen**

Referenz	Jahr	Temperatur [°C]
Adlerkreutz et al.	1985	35 – 40
Yamada et al.	1979	35

Diese Untersuchungen berücksichtigten insbesondere die Aktivität des Enzymsystems. Sowohl Adlerkreutz et al. [1985] als auch Yamada et al. [1979] stellten fest, dass das Optimum der Glycerindehydrogenase-Aktivität bei über 35 °C lag. Beide erkannten, dass unter diesen Bedingungen keine dauerhaft stabile Kultivierung stattfinden konnte und empfahlen daher eine Temperatur von 30 °C. *Gluconobacter oxydans* lässt sich somit der Gruppe der mesophi-

len Bakterien zuordnen. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Schüttelkolben und Sapro-  
matenversuche bei 28 °C und Laborreaktor- und Technikumsversuche bei 30 °C durchgeführt.

## 2.2 Grundlagen der Zellrückhaltung

Die drei bedeutendsten Formen der Zellrückhaltung mit technischer Anwendung in der In-  
dustrie sind die Mikrofiltration, die Einschlussimmobilisierung und die Adsorptionsimmobili-  
sierung [Bettin, 2001].

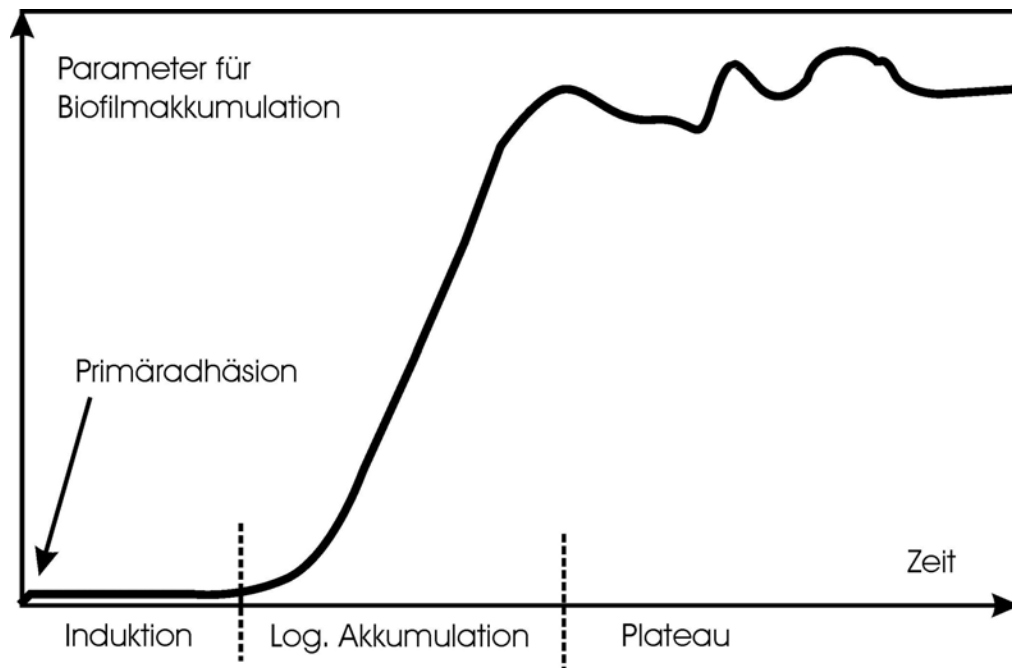
- Durch die Mikrofiltration in einem externen Kreislauf können die Zellen effektiv im Re-  
aktor zurückgehalten und das Produkt zellfrei abgezogen werden. Bei der Verwendung ei-  
nes Mikrofilters können sehr hohe Zelldichten im Reaktionsraum erreicht werden. Ein  
entscheidender Nachteil ist die in dem externen Kreislauf auftretende O<sub>2</sub>-Limitierung. Ein  
weiterer Nachteil der Mikrofiltration ist das auftretende Fouling, bei dem der Filter zuge-  
setzt und der Produktabzug erschwert wird. In sterilen Prozessen können diese Filter nicht  
auf einfache Weise regeneriert oder ausgetauscht werden. Aus diesem Grund wurde diese  
Art der Zellrückhaltung in dieser Arbeit nicht in Betracht gezogen.
- Bei der Einschlussimmobilisierung werden die Zellen in natürliche oder synthetische po-  
lymere Netzwerke eingeschlossen. Eine Auswahl geeigneter natürlicher und synthetischer  
Polymere ist bei Willaert zu finden (Willaert et al., 1996). Einen Überblick der bei der  
Einschlussimmobilisierung verwendeten Methoden bietet die Arbeit von Woodward  
[1987]. Der Nachteil der eingesetzten Materialien besteht im überwiegend schlechten  
Stofftransport von Sauerstoff und Substrat durch das Polymer, der schlechten mechani-  
schen Stabilität und der teilweise relativ leichten biologischen Abbaubarkeit. Ein weiteres  
Problem stellt zudem die große Toxizität einiger Polymere wie Polyurethan und Polyvi-  
nylalkohol dar. Die Einschlussimmobilisierung wurde in dieser Arbeit daher aus den ge-  
nannten Gründen nicht eingesetzt.
- Die Adsorptionsimmobilisierung basiert auf der selbstständigen Anlagerung der Mikroor-  
ganismen an die Oberfläche einer Trägermatrix. Es werden zwei Formen von Adsorpti-  
onsimmobilisierung unterschieden: Die aktive Form ist durch die Produktion und Aus-  
scheidung von Makromolekülen, insbesondere Exopolysacchariden (EPS), gekennzeich-

net, welche die Anlagerung an die Trägermatrix verstärken [Lewin, 1984]. Die passive Form beruht hingegen nur auf den Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Trägermatrix. Eine Auswahl geeigneter Trägermaterialien ist bei Willaert zu finden [Willaert et al., 1996]. Die Trägermaterialien besitzen sowohl poröse als auch unporöse Oberflächen. Poröse Trägermaterialien haben im Gegensatz zu unporösen Trägermaterialien eine hohe spezifische Oberfläche und somit eine große Besiedelungsfläche. Zudem bieten poröse Trägermaterialien in den Poren Schutz vor Abrasion. Die Zellen lagern sich auf der Oberfläche und im Inneren der Matrix an. Auf der Oberfläche können die Mikroorganismen relativ gut mit Sauerstoff und Substrat versorgt werden. Im Inneren hingegen kann die Sauerstoffversorgung zum limitierenden Faktor werden. In dieser Arbeit wurde die Adsorptionsimmobilisierung als Zellrückhaltungsmethode eingesetzt.

### **2.3 Entwicklung von Biofilmen**

Biofilme entstehen durch die Anlagerung von Mikroorganismen an geeignete Trägermatrizen. Sie setzen sich aus immobilisierten Zellen, extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), eingelagerten Partikeln und gelösten Stoffen zusammen [Flemming, 1991]. Die Dicke von Biofilmen variiert von wenigen Zellschichten bis hin zu einer Dicke von 300 - 400 µm [Characklis et al., 1989, a]. Der größte Teil des Biofilms besteht aus Wasser (zwischen 50 und 95 %). Die organische Masse des Biofilms besteht zu 60 bis 90 % aus EPS. EPS besteht überwiegend aus Polysacchariden, aber auch aus Proteinen, Glycoproteinen und Lipoproteinen. Biofilmsysteme lassen sich in fünf Teilbereiche gliedern (Abbildung 2-10): Die Aufwuchsfläche (Substratum), den Basisbiofilm, der im Kontakt zur Unterlage steht, die Oberflächenzone, die in Wechselwirkung zum flüssigen Medium steht und die Rauigkeit des Biofilms bestimmt, die flüssige Phase und schließlich die Gasphase [Characklis et al., 1989 a; b].





**Abbildung 2-11: Verlauf der Biofilmmakkumulation nach Characklis [1990, modifiziert]**

### 1. Induktionsphase [Flemming; 1991]

Die Primäradhäsion stellt die Voraussetzung für die Bildung eines Biofilms dar. Bereits in den ersten Stunden kann in Abhängigkeit von der Zellzahl im Medium eine rapide Oberflächenbelegung stattfinden. Zobell [1943] entwickelte für die Primäradhäsion ein Modell, welches in zwei Schritten abläuft und von Marshall et al. [1971] experimentell verifiziert werden konnte. Dabei erfolgte zunächst eine reversible Anheftung, der nach längerer Aufenthaltszeit an der Oberfläche eine irreversible Anheftung folgte. Die Zellen haften fest auf den Oberflächen und beginnen extrazelluläre polymere Substanzen zu bilden. Die Adhäsion von Mikroorganismen wird durch verschiedene Kräfte verursacht. Dies sind neben hydrophoben Wechselwirkungen im Wesentlichen elektrostatische Wechselwirkungen, van-der-Waals'sche Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. In der Induktionsphase wirkt sich der Biofilm noch nicht so stark auf das technische System aus, so dass ein Effekt auf die Betriebsparameter, wie z.B. Strömungswiderstand oder Wärmeübergang, noch nicht erkennbar ist. Eine mikrobielle Belegung der Oberfläche lässt sich jedoch mit Hilfe der Mikroskopie nachweisen. Die Länge der Induktionsphase kann zwischen wenigen Stunden bis einigen Monaten liegen. In die Induktionsphase fällt zumeist der unbemerkte Beginn der Biofilmentwicklung. Bei der Immobilisierung von Mikroorganismen soll die Induktionsphase, die im Wesentlichen von der Art und Rauigkeit des Aufwuchsmaterials beeinflusst wird, möglichst

kurz sein, was durch die geeignete Auswahl von leicht besiedelbaren Materialien erreicht werden kann.

## 2. Logarithmische Akkumulation (Wachstumsphase) [Flemming; 1991]

Nach der irreversiblen Anheftung an die Oberfläche beginnen die Primärbesiedler zu wachsen. Für die Akkumulation des Biofilms sind zwei Faktoren maßgeblich: Die Adsorption neu hinzukommender Mikroorganismen und das Wachstum bereits anhaftender Zellen. Die neuen Zellen kommen nun nur noch mit der Oberfläche des Biofilms in Kontakt. Die Biofilm-Akkumulation wird in dieser Phase hauptsächlich durch das Wachstum bestimmt. Die wichtigsten Faktoren sind daher die Nährstoffversorgung und die Temperatur. Das Wachstum des Biofilms wird in erster Linie durch Transportprozesse kontrolliert, z.B. durch den Diffusionswiderstand der Gel-Matrix.

## 3. Plateau-Phase [Flemming; 1991]

Biofilme erreichen keine unbegrenzte Dicke, sondern es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Neubildung und Ablösung des Biofilms auf einem Plateau ein. Dieser Zustand ist in den meisten aquatischen Systemen nach wenigen Wochen erreicht. In dieser Phase halten sich Zuwachs- und Ablösungsprozesse die Waage. Das Gleichgewicht wird in erster Linie vom Wachstum der Mikroorganismen (aufgrund des Angebotes an chemischer Energie der Nährstoffe im Medium) und den auftretenden Scherkräften (mechanische Energie des strömenden Mediums) bestimmt. Die vorliegenden Umgebungsbedingungen beeinflussen die Schichtdicke stark. In einem System mit starken Scherkräften kann sie wenige  $\mu\text{m}$  betragen, während sich in hydraulisch wenig belasteten Bereichen ein mikrobieller Rasen mit bis zu mehreren Zentimetern Dicke bilden kann. Durch starke Scherkräfte wird die Bildung von Biofilmen grundsätzlich nicht verhindert, sondern führt zur Entstehung von festeren und dünneren Biofilmen. In nährstofflimitierten Systemen können hohe Fließgeschwindigkeiten zunächst das Biofilm-Wachstum begünstigen, weil die Nährstofffracht vergrößert wird. Biofilme werden erst durch Scherkräfte beeinflusst, wenn ihre Dicke jene der laminaren Grenzschicht überschreitet. Im Falle einer Nährstoffverringerung geht die Biofilmdicke wieder zurück.

In aeroben Systemen kann es zur Bildung anaerober Bereiche in Biofilmen kommen. Ab einer Schichtdicke von 50 bis 200  $\mu\text{m}$  nimmt der Diffusionswiderstand zu und somit tritt ein Sauerstoffdefizit im Inneren des Biofilms auf, der zur Bildung anaerober Bereiche führen kann. Um

diesem Effekt entgegenzuwirken ist es daher von Vorteil, eine Trägermatrix zu verwenden, die für Sauerstoff permeabel ist.

## 2.4 Auswahl und Charakterisierung einer geeigneten Trägermatrix

In bisherigen Untersuchungen konnte Hekmat [2001; 2003] zeigen, dass sich durch die Immobilisierung von *Gluconobacter oxydans* die Produktbildungsrate des einstufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens im Rieselbettreaktor in einem Zeitraum von 17 Tagen von ca. 1.6 g/(lh) auf 2.8 g/(lh) steigern ließ. Dies entsprach einer Steigerung von 75 %. Die Ausbildung eines Biofilms fand auf hydrophilierten Ralu-Ringen aus Polypropylen jedoch nur partiell statt und war daher unbefriedigend. Deshalb wurde für weitere Immobilisierungsversuche nach einer geeigneten Trägermatrix gesucht. In dieser Arbeit wurde, wie in Kapitel 2.2 erwähnt, die Adsorptionsimmobilisierung auf porösen Trägermaterialien eingesetzt. Bei der Auswahl der Trägermatrix wurde darauf geachtet, dass folgende Punkte erfüllt wurden:

1. sterilisierbar; d.h. thermisch stabil bei 121 °C während einer Zeitdauer von 2 h
2. mechanisch stabil; dauerhafte Stabilität gegen die durch Begasung auftretenden Scherkräfte während der Kultivierung
3. biologisch und chemisch inert; die Trägermatrix soll dauerhaft stabil sein
4. hohe volumenspezifische Aufwuchsfläche
5. gute hydrodynamische Eigenschaften; geringer Druckverlust und homogene Blasenverteilung über den Reaktorquerschnitt
6. gute Sauerstoffversorgung des Biofilms
7. leichte Herstellung und Wiederverwendbarkeit sowie geringe Materialkosten

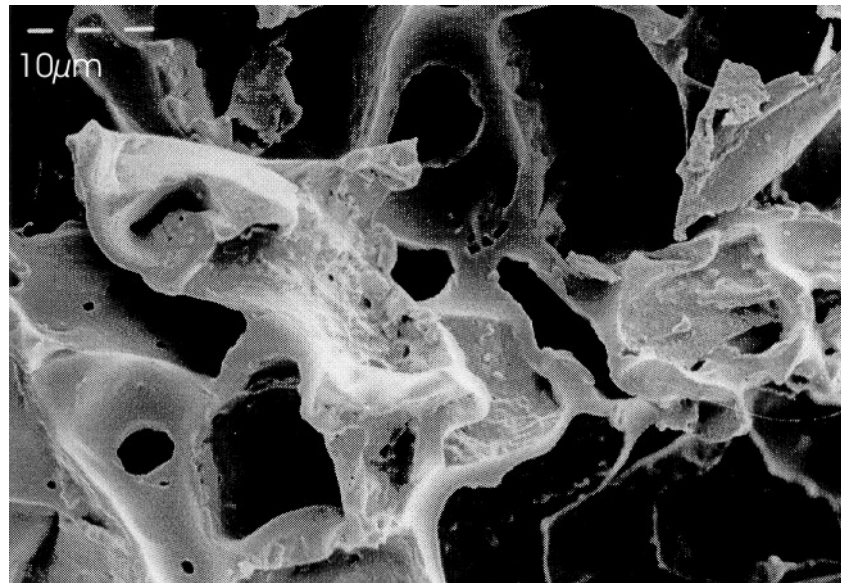
Eine Trägermatrix, welche diese Eigenschaften besitzt, sind silikonbeschichtete Raluringe. Als Beschichtungsmaterial wurde ein Silikonkautschukgemisch verwendet, dem Titandioxid zur Verbesserung des Kontaktwinkels<sup>1</sup> und Kochsalz zur Erzeugung der Porosität zugegeben wurde. Entwickelt wurde diese poröse Silikonmatrix von Muscat [1995]. Das Porensystem

---

<sup>1</sup> Die Benetzbarkeit einer Festkörperoberfläche durch eine Flüssigkeit lässt sich anhand des Kontaktwinkels  $\Theta$  an der Dreiphasengrenze fest/flüssig/gasförmig quantitativ erfassen. Je kleiner der Kontaktwinkel ist, desto besser ist die Benetzbarkeit. Feststoffoberflächen mit einem Kontaktwinkel von  $\Theta > 90^\circ$  gelten als nicht benetzend, von  $0^\circ < \Theta < 90^\circ$  als teilweise benetzend und von  $\Theta = 0^\circ$  als vollständig benetzend [Palzer et al., 2001]. Auf unbehandelten PP-Füllkörpern wurden Kontaktwinkel mit Wasser zwischen  $100^\circ$  und  $110^\circ$  beobachtet.

entstand durch das Auskochen der eingeschlossenen NaCl-Kristalle in entionisiertem Wasser. Die Verbindungskanäle entstanden einerseits durch Kontaktpunkte und –flächen zwischen den Salzpartikeln sowie andererseits durch das Aufplatzen von abgeschlossenen Salzkavernen. Silikon ist undurchlässig für flüssiges Wasser und begrenzt durchlässig für Wasserdampf. Während des Kochvorgangs dringt der Wasserdampf in die Silikonmatrix ein und löst das Kochsalz auf. Durch den Innendruck als Folge des osmotischen Drucks des gelösten Kochsalzes reißt der dünne Silikonfilm ein [Bettin, 2001; 1996]. Die Verbindungskanäle sind dadurch in ihrer Größe naturgemäß recht unterschiedlich. Bei zu geringer Porosität werden nur oberflächennahe Bereiche für die Adsorption von Mikroorganismen genutzt, da die Poren, die sich im Inneren der Silikonmatrix befinden, keine Verbindung zur Oberfläche haben. Die maximal erreichbare Porosität, die sich aus Oberflächen- und innerer Porosität ergibt, liegt nach Bettin [2001] etwa bei 65 %. Die Porosität entspricht der eingesetzten Salzkonzentration. Oberhalb dieser maximalen Salzkonzentration ist das Silikongemisch nicht mehr gleichmäßig fließfähig und lässt sich nicht mehr verarbeiten. In dieser Arbeit wurde mit einer Porosität von 55 % gearbeitet. Da Silikon ein hydrophobes Material ist und somit das Anwachsen von lebenden Zellen erschwert, wurde als Additiv Titandioxid hinzugesetzt. Titandioxid ist chemisch inert und daher gut geeignet, um als Additiv in einem Immobilisationsträger eingesetzt zu werden. Es verändert die Oberflächeneigenschaften der Matrix, indem es den Kontaktwinkel von Wasser auf der Oberfläche der Träger von ca.  $104^\circ$  auf  $93^\circ$  reduziert [Bettin, 2001]. In Abbildung 2-12 ist die poröse Silikonschicht nach dem Auswaschen der Salzkristalle dargestellt.





**Abbildung 2-12: Porenstruktur eines von Salz befreiten Silikon-Adsorbers (REM-Aufnahme; ein Balken entspricht jeweils 10 µm). Die Porosität des Silikons betrug bei dieser Aufnahme ca. 70 % [Bettin, 2001]**

Bettin [2001] setzte die Silikonmatrix in Form von porösen Silikonkugeln mit einem Durchmesser von 1 - 2 mm zur Immobilisierung von Nitrifikanten ein. Um die hydrodynamischen Eigenschaften wie Druckverlust und homogene Blasenverteilung in der Blasensäule zu verbessern, beschichtete Neff [2002; 2003] Raluringe mit dem porösen Silikonkautschuk. Die Herstellung der silikonbeschichteten Raluringe wird im Kapitel 3.4 beschrieben. Die beschichteten Füllkörper ließen sich mit relativ geringem Aufwand herstellen. Während der Sterilisation und des Betriebes erwiesen sich die beschichteten Raluringe als thermisch und mechanisch stabil, sowie chemisch und biologisch inert. Die makroporöse Struktur der silikonbeschichteten Füllkörper boten zudem den Vorteil, dass die Träger auch in tieferen Schichten besiedelt werden konnten.

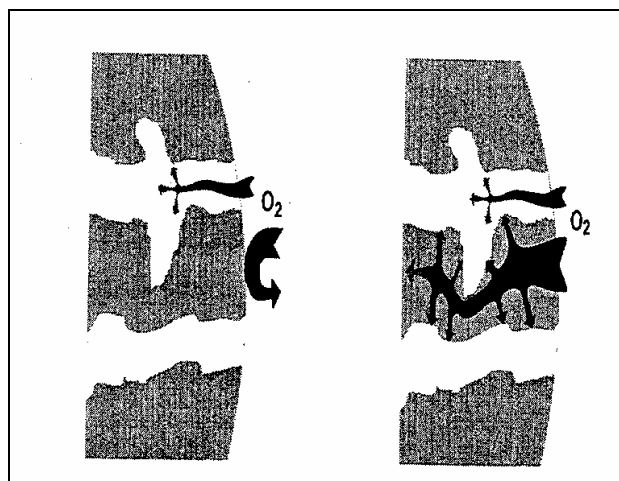
Die Sauerstoffversorgung erfolgt in oberflächennahen Bereichen über die Flüssigphase auf diffusivem und konvektivem Weg. Im Inneren der Silikonmatrix erfolgt die Sauerstoffversorgung hingegen ausschließlich auf diffusivem Weg. Silikon besitzt eine hohe Sauerstofflöslichkeit und Permeabilität [Wick et al., 1982], so dass die Sauerstoffversorgung nicht nur über die Flüssigphase sondern auch über die Trägermatrix erfolgt. Nach Bettin beträgt der Permeationskoeffizient  $3.5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 / \text{s}$  [2001]. Der Permeationskoeffizient ist das Produkt aus Diffusionskoeffizient und Sauerstofflöslichkeit im betrachteten Material. Der Vergleich der Diffusionskoeffizienten in Tabelle 2-5 zeigt, dass der Diffusionskoeffizient von Sauerstoff durch

die Silikonmatrix ca. fünfmal höher ist als bei Wasser. Die Versorgung mit Sauerstoff im Inneren erfolgt also größtenteils über die Silikonmatrix.

**Tabelle 2-5: Diffusionskoeffizient von Sauerstoff in Wasser und der Silikonmatrix unter Standardbedingungen**

	Diffusionskoeffizient [ $\text{m}^2/\text{s}$ ]	Quelle
$D_{\text{O}_2;\text{Wasser}}$	$2.83 \cdot 10^{-9}$	[Wise et al.; 1966]
$D_{\text{O}_2;\text{Silikonmatrix}}$	$15 \cdot 10^{-9}$	[Bettin; 2001]

In Abbildung 2-13 wird dieser Zusammenhang noch einmal im Vergleich zu herkömmlichen Immobilisaten wie Siranglas qualitativ verdeutlicht.



**Abbildung 2-13: Sauerstoffversorgung von Mikroorganismen in einem porösen Silikonmaterial: Links: herkömmliches Immobilisat, z.B. poröses Glas. Rechts: Immobilisat auf Silikonbasis [Sommer, 1997; 1998]**

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich silikonbeschichtete Raluringe als Trägermatrix für die Immobilisierung eignen. Es wird erwartet, dass die obligat aerobe *Gluconobacter oxydans* - Kultur ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird.

## 2.5 Mathematische Modellierung

Zur Auslegung, Regelung und Optimierung von biotechnologischen Verfahren werden mathematische Modelle benötigt, die das Verhalten der Mikroorganismen während der Kultivierung möglichst exakt abbilden können. In der Literatur lässt sich eine Vielzahl verschiedener Modelle zur Beschreibung der mikrobiellen DHA- bzw. Sorbosegewinnung mittels *Gluconobacter oxydans* finden. So entwickelten Bonomi et al. [1992], Claret et al. [1992], Giridhar et al. [2000] und Hekmat [2001] einfache unstrukturierte und unsegregierte Modelle. Diese Modelle lieferten eine gute Beschreibung in Bereichen, in denen die Zellen als einheitliche disperse Phase mit gleich bleibendem physiologischem Zustand aufgefasst werden können. Dies ist allerdings nur für eine nicht produktinhibierte Kultur der Fall. Ab einer kritischen Produktkonzentration von ca. 80 g/l ist die Kultur nicht mehr wachstumsfähig und der physiologische Zustand verändert sich. In diesem Bereich liefern diese Modelle nur noch eine unzureichende Beschreibung. Ohrem [1994] entwickelte ein segregiertes Modell zur Beschreibung einer sich verschiebenden Altersverteilung. Doch auch dieses Modell war nicht in der Lage, die bei semikontinuierlichen Verfahren auftretenden charakteristischen dynamischen Anpassungseffekte, auf welche in Kapitel 4.4.1 detailliert eingegangen wird, zu beschreiben. In dieser Arbeit wurde daher ein Modell entwickelt, welches sich für die Simulation semikontinuierlicher Verfahren zur DHA-Produktion mittels *Gluconobacter oxydans* eignet. Grundlage für das mathematische Modell sind die reaktionskinetischen experimentellen Untersuchungen des DHA-Einflusses auf *Gluconobacter oxydans* in Kapitel 4.1.

### 2.5.1 Entwicklung eines segregierten Verzugszeitmodells

In den folgenden zwei Kapiteln wird die in dieser Arbeit verwendete Kinetik beschrieben. Aufbauend auf einem einfachen unstrukturierten unsegregierten Modell erfolgt eine sukzessive Erweiterung zur Beschreibung der für die semikontinuierliche Betriebsweise relevanten Phänomene.

## Entwicklung der grundlegenden Kinetik

Die mikrobielle Umsetzung von Glycerin zu DHA mittels *Gluconobacter oxydans* wird von den in Kapitel 2.1.3 beschriebenen Einflussgrößen bestimmt. Über die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  wird das Wachstum von *Gluconobacter oxydans* an diese Einflussgrößen im Modell gekoppelt. Die spezifische Wachstumsrate wird auf die Biomasse bezogen und hat die Einheit (1/h):

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

Im Modell soll der Einfluss von Glycerin, Sauerstoff und DHA berücksichtigt werden. In allgemeiner Form gilt für die spezifische Wachstumsrate mit Glycerin als C-Quelle:

$$\mu_{\text{Gly}} = f(c_{\text{Gly}}) \cdot f(c_{\text{O}}) \cdot f(c_{\text{DHA}}) \quad (2-2)$$

Glycerin wirkt auf das Wachstum sowohl limitierend als auch inhibierend, Sauerstoff hingegen nur limitierend und DHA inhibierend. Der Sauerstoffeinfluss wird als Sättigungskinetik nach Monod [1942] berücksichtigt. Die Glycerininhibition wurde als quadratischer Term nach Andrews [Andrews, 1968] in die Sättigungskinetik für Glycerin mit eingearbeitet. Für die Produktinhibition wird ein Exponentialterm nach Aiba et al. [1968] verwendet. Bonomi et al. [1992] entwickelte einen äquivalenten Ansatz für die Sorboseherstellung mittels *Gluconobacter oxydans*. Für die auf den oben genannten stationären Kinetiken basierende spezifische Wachstumsrate ergibt sich folgender Ausdruck:

$$\mu_{\text{stat,Gly}} = \mu_{\text{max,Gly}} \cdot \frac{c_{\text{Gly}}}{c_{\text{Gly}} + K_{\text{Gly}} + \frac{c_{\text{Gly}}^2}{W}} \cdot \frac{c_{\text{O}}}{c_{\text{O}} + K_{\text{O}}} \cdot \exp(-K_{\text{DHA}} \cdot c_{\text{DHA}}) \quad (2-3)$$

Die Produktbildung lässt sich (wie in Kapitel 4.1.5 ausführlich beschrieben und in Abbildung 4-10 dargestellt) in wachstumsabhängige und wachstumsunabhängige Produktbildung unterteilen. Zur Berechnung der Produktbildungsrate unter stationären Bedingungen wird deshalb die von Luedeking-Piret [1959] für die Milchsäuregärung entwickelte Kinetik verwendet:

$$\pi_{\text{stat,DHA}} = A_{\text{DHA}} \cdot \mu_{\text{stat,Gly}} + B \quad (2-4)$$

Während  $A_{\text{DHA}}$  nur eine Konstante darstellt, durch die die Produktbildungsrate linear vom Wachstum abhängt, ist  $B$  der wachstumsunabhängige Anteil der Produktbildung, der aber dennoch von der Substrat- und der Sauerstoffkonzentration abhängt:

$$B = B_{\text{max}} \cdot \frac{c_{\text{Gly}}}{c_{\text{Gly}} + K_{\text{b,Gly}}} \cdot \frac{c_{\text{O}}}{c_{\text{O}} + K_{\text{b,O}}} \quad (2-5)$$

Für diesen Anteil verwendeten Bonomi et al. [1992] ausschließlich Monod-Terme, da sowohl eine Limitation von Glycerin als auch von Sauerstoff sich im wachstumsunabhängigen Bereich der Produktbildung auswirkt. Inhibierungen wurden nicht berücksichtigt.

Wie in Kapitel 4.2.4 gezeigt, wirkt sich die Zugabe von Sorbit positiv auf die Biomassebildung und Produktbildung aus. Daher wird in dem Modell neben dem Glycerin auch Sorbit mitberücksichtigt. Da *Gluconobacter oxydans* sowohl auf Glycerin als auch auf Sorbit wachsen kann, setzt sich die Wachstumsrate additiv aus Wachstum aufgrund von Glycerinumsetzung und Wachstum aufgrund von Sorbitumsetzung zusammen:

$$\mu = \mu_{\text{Gly}} + \mu_{\text{Sorbit}} \quad (2-6)$$

Für die Wachstumsrate auf Sorbitbasis wird, äquivalent zu Gleichung (2-3), folgende Kinetik verwendet:

$$\mu_{\text{stat,Sorbit}} = \mu_{\text{max,Sorbit}} \cdot \frac{c_{\text{Sorbit}}}{c_{\text{Sorbit}} + K_{\text{Sorbit}}} \cdot \frac{c_{\text{O}}}{c_{\text{O}} + K_{\text{O,Sorbit}}} \cdot \exp(-K_{\text{DHA}} \cdot c_{\text{DHA}}) \quad (2-7)$$

Hierbei wird mitberücksichtigt, dass hohe DHA-Konzentrationen ebenfalls das Wachstum auf Sorbitbasis inhibieren. Da Sorbit nur in relativ niedrigen Konzentrationen von 10 g/l zugegeben wird, muss eine zusätzliche Inhibition durch das Produkt Sorbose nicht berücksichtigt werden.

$$\pi_{\text{stat,Sorbose}} = A_{\text{Sorbose}} \cdot \mu_{\text{stat,Sorbit}} \quad (2-8)$$

Zur Beschreibung der spezifischen Produktbildungsrate von Sorbit wird die Luedeking-Piret Kinetik auf den wachstumsabhängigen Teil reduziert. Auf den wachstumsunabhängigen Produktbildungsterm kann verzichtet werden, da Sorbit nur als Zugabe zur Erhöhung der Biomasse dient und nur zu Beginn der Wachstumsphase zugegeben wird.

### **Erweiterung zum Verzugszeitmodell**

Kennzeichnend für Mikroorganismen ist, dass sie ihren Stoffwechsel an eine verändernde Umgebung anpassen können. Allerdings erfordert die Anpassung des Stoffwechsels eine gewisse Zeit (Verzugszeit), so dass die Zellen nur relativ langsamen Veränderungen des Milieus unmittelbar folgen können. Auf schlagartige Änderungen des Milieus, wie sie im speziellen bei dem zyklisch betriebenen Zulaufverfahren während eines Chargenwechsels auftreten, reagieren die Organismen erst mit einer Verzögerung, da sie ihren Metabolismus den neuen Bedingungen nicht schlagartig anpassen können. In diesem Fall hängen die Kinetiken des biologischen Wachstums und des Umsatzes nicht mehr nur von den aktuellen Bedingungen, sondern auch von der Vorgeschichte der Kultur ab. Um dieses, auch als biologische Trägheit bekannte Phänomen erfassen zu können, ist es notwendig, für die Wachstumsrate  $\mu$  eine sinnvolle Zeitfunktion zu finden. Eine reine stationäre Beschreibung der Wachstumsrate  $\mu$  nach dem Ansatz von Monod [1942] erscheint hier als wenig sinnvoll, da dieser Ansatz lediglich die aktuell vorherrschenden Milieubedingungen berücksichtigt.

In der Literatur lassen sich zur Beschreibung der biologischen Trägheit eine Vielzahl verschiedener Ansätze finden. In den Dissertationsschriften von Hekmat [1990] und Kruppa [1997] ist eine Übersicht über diese Ansätze zu finden. Caperon [1996] entwickelte auf Basis der Monod-Kinetik für die instationäre Wachstumsrate  $\mu(t)$  ein erweitertes Modell, welches über eine modifizierte Substratkonzentration  $\hat{S}(t)$  die Vorgeschichte mitberücksichtigt.

$$\mu(t) = \mu_{\max} \left( \frac{\hat{S}(t)}{K_s + \hat{S}(t)} \right) \quad (2-9)$$

Für  $\hat{S}(t)$  wurde das Faltungsintegral in Gleichung (2-10) angesetzt, wobei  $\tau$  eine konstante Verzögerungszeit und  $G(t-\tau)$  eine Gewichtsfunktion in Form einer Rechtecksfunktion darstellen.

$$\hat{S}(t) = \int_{-\infty}^t S(\tau) \cdot G(t-\tau) d\tau \quad (2-10)$$

Jerusalimsky [1967] führte die biologische Trägheit auf die Veränderung der internen Zellzusammensetzung zurück. Als Maß für die Veränderung der Zellzusammensetzung zog er den RNA-Gehalt der Zelle heran.

$$\mu = \mu_0 R \frac{S}{K_R + S} \quad (2-11)$$

$$\frac{dR}{dt} = \frac{1}{T} (R_s - R) \quad (2-12)$$

Da es jedoch nach Kruppa [1997] schwierig war, einen zuverlässigen Zusammenhang zwischen dem zellinternen RNA-Gehalt und der Wachstumsrate herzustellen, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Vielversprechender war es hingegen, die biologische Trägheit mit einem rein phänomenologischen Ansatz zu beschreiben. Kruppa [1997] entwickelte als kinetischen Ansatz ein Verzugszeitmodell zweiter Ordnung bezüglich der Wachstumsrate und erster Ordnung bezüglich der Produktbildungsrate. Dieses Modell zeichnet sich dahingehend aus, dass sich die Reaktionsraten erst verzögert an ihre stationären Werte von den Gleichungen (2-3) bis (2-4) anpassen. Dieses Modell scheint für eine Beschreibung der mikrobiellen DHA-Herstellung durch *Gluconobacter oxydans* geeignet, weil es für die Essigsäureherstellung durch *Acetobacter*-Stämme entwickelt wurde, welche der gleichen Familie angehören wie *Gluconobacter oxydans*. Beispielsweise ist beiden Prozessen gemein, dass die Produktbildung an den Energiehaushalt der Zelle gekoppelt ist. Die Ansätze von Kruppa [1997] lauten:

$$\frac{d^2\mu_{\text{instat}}}{dt^2} = -\frac{2 \cdot D_X}{T_X} \cdot \frac{d\mu_{\text{instat}}}{dt} + \frac{1}{T_X^2} \cdot (\mu_{\text{stat}} - \mu_{\text{instat}}) \quad (2-13)$$

$$\frac{d\pi_{\text{instat}}}{dt} = \frac{1}{T_P} \cdot (\pi_{\text{stat}} - \pi_{\text{instat}}) + R_P \cdot \frac{dc_P}{dt} \quad (2-14)$$

Die Parameter  $T_X$  und  $T_P$  sind charakteristische Zeitkonstanten für die biologische Trägheit der spezifischen Wachstums- bzw. Produktbildungsrate. Aus der Analogie zu mechanischen oder elektrischen Schwingungen, die eine ähnliche Form der Differentialgleichung (2-13) aufweisen, kann  $D_X$  als Dämpfungskonstante des harmonischen Systems angesehen werden. Der Faktor  $R_P$  in Gleichung (2-14) ist hingegen eine Konstante, die die aktuelle zeitliche Änderung der Produktkonzentration mit der zeitlichen Änderung der instationären spezifischen Produktbildungsrate in Beziehung setzt [Kruppa, 1997].

Die instationären spezifischen Wachstums- und Produktbildungsrate sind also keine expliziten Funktionen der vorhandenen Konzentrationen im Nährmedium mehr. Stattdessen wurden sie durch zeitabhängige Differentialgleichungen beschrieben, in die die stationären Kinetiken (2-3) und (2-4) eingehen.

**Für die instationär spezifische Wachstumsrate für Glycerin gilt:**

$$\frac{d^2\mu_{\text{inst,Gly}}}{dt^2} = -\frac{2 \cdot D_{x,\text{Gly}}}{T_{X,\text{Gly}}} \cdot \frac{d\mu_{\text{inst,Gly}}}{dt} + \frac{1}{T_{X,\text{Gly}}^2} (\mu_{\text{stat,Gly}} - \mu_{\text{inst,Gly}}) \quad (2-15)$$

**Für die instationär spezifische Wachstumsrate für D-Sorbit gilt entsprechend:**

$$\frac{d^2\mu_{\text{inst,Sorbit}}}{dt^2} = -\frac{2 \cdot D_{x,\text{Sorbit}}}{T_{X,\text{Sorbit}}} \cdot \frac{d\mu_{\text{inst,Sorbit}}}{dt} + \frac{1}{T_{X,\text{Sorbit}}^2} (\mu_{\text{stat,Sorbit}} - \mu_{\text{inst,Sorbit}}) \quad (2-16)$$

**Instationäre Produktbildungsrate zur Bildung von DHA:**

$$\frac{d\pi_{\text{inst,DHA}}}{dt} = \frac{1}{T_{\text{DHA}}} \cdot (\pi_{\text{stat,DHA}} - \pi_{\text{inst,DHA}}) + R_{\text{DHA}} \frac{dc_{\text{DHA}}}{dt} \quad (2-17)$$



### Instationäre Produktbildungsrate zur Bildung von L-Sorbose:

$$\frac{d\pi_{\text{inst,Sorbose}}}{dt} = \frac{1}{T_{\text{Sorbose}}} \cdot (\pi_{\text{stat,Sorbose}} - \pi_{\text{inst,Sorbose}}) + R_{\text{Sorbose}} \frac{dc_{\text{Sorbose}}}{dt} \quad (2-18)$$

### Segregation des Modells

In der Regel ist der physiologische Zustand einer vitalen Kultur integral gesehen als konstant anzunehmen. Eventuell vorhandene unterschiedliche physiologische Zustände von Fraktionen der Kultur gleichen sich aus und die gesamte lebende Biomasse kann daher als einheitliche disperse Phase betrachtet und modelliert werden [Kruppa; 1997]. Anders hingegen verhält es sich bei der mikrobiellen Umsetzung von Glycerin in DHA mittels *Gluconobacter oxydans* bei hohen Produktkonzentrationen. Da die Kultur ab 80 g/l DHA nicht mehr wachstumsfähig ist, verschiebt sich im weiteren Prozessverlauf die Populationszusammensetzung und muss somit im Modell berücksichtigt werden. So unterteilte Ohrem [1994] die *Gluconobacter oxydans*-Zellen in drei mögliche Zustände, nämlich in lebend, steril und tot. Als „steril“ bezeichnete Ohrem Zellen und Zellfragmente, die im Gegensatz zu den „lebenden“ nicht mehr teilungsfähig waren. Dennoch waren beide Zellarten katalytisch aktiv und konnten Glycerin in DHA umwandeln. „Tote“ Zellen waren hingegen weder teilungsfähig noch katalytisch aktiv. Dieser von Ohrem angenommene Sachverhalt konnte, wie später gezeigt wird, durch eigene reaktionskinetische Untersuchungen bestätigt werden (Kapitel 4.1). Zur Beschreibung der verschiedenen Zellzustände wird angenommen, dass sich lebende Zellen erst in sterile Zellen umwandeln und nur sterile Zellen absterben können. Diese Segregation in drei mögliche Zustände ist in Abbildung 2-14 dargestellt.

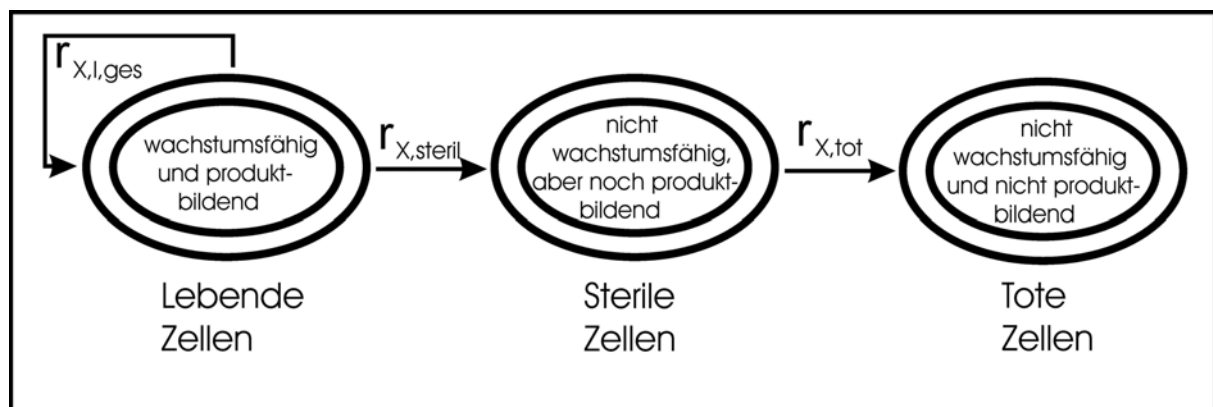


Abbildung 2-14: Einteilung der Kultur in drei Zellklassen

Durch die Differenzierung des Modells in drei verschiedene Zelltypen, wurden folgende Gleichungen für die Reaktionsgeschwindigkeiten angesetzt:

$$r_{X,l,ges} = (\mu_{inst,Gly} + \mu_{inst,Sorbit}) \cdot c_{X,l} \quad (2-19)$$

$$r_{X,steril} = c_{X,l} \cdot \mu_{steril} \cdot \exp(K_{DHA,steril} \cdot c_{DHA}) \quad (2-20)$$

$$r_{X,tot} = c_{X,steril} \cdot \mu_{tot} \cdot \exp(K_{DHA,tot} \cdot c_{DHA}) \quad (2-21)$$

Im Gegensatz hierzu verwendete Ohrem [1994] auf der Grundlage eigener experimenteller Untersuchungen für die Umwandlung in Sterilzellen einen linearen, von der Produktkonzentration abhängigen Term und für die Absterberate eine Konstante, da er für 3 verschiedene DHA-Konzentrationen im Schüttelkolben eine lineare Abnahme der relativen Vitalität der Kultur beobachtete. Eigene Untersuchungen (Kapitel 4.1, S. 68) zeigten jedoch, dass sich für die Umwandlung in sterile und tote Zellen exponentielle Ansätze besser eigneten.

Die Produktbildungsraten für die lebenden und die sterilen Zellen lassen sich wie folgt beschreiben:

$$r_{P,l} = \pi_{inst} \cdot c_{X,l} \quad (2-22)$$

$$r_{P,steril} = S \cdot c_{X,steril} \quad (2-23)$$

Der konstante Parameter  $S$  bei der Reaktionsgeschwindigkeit der Produktbildung von Sterilzellen stellt eine wachstumsunabhängige spezifische Produktbildungsrate der sterilen Zellen dar.

### 2.5.2 Kinetik des segregierten Verzugszeitmodells

Zusammenfassend lassen sich die für die Beschreibung des vorliegenden semikontinuierlichen Verfahrens notwendigen kinetischen Ansätze wie folgt darstellen:

#### Zellbildungsgeschwindigkeiten

Die Zellbildungsgeschwindigkeiten wurden jeweils für die lebenden, sterilen und toten Zellen aufgestellt. Die Zellbildungsgeschwindigkeit der lebenden Zellen wird durch Gleichung (2-

26) wiedergegeben. Die Wachstumsrate der lebenden Zellen setzte sich dabei additiv aus den instationären Wachstumsraten auf der Basis von Glycerin- und Sorbitwachstum zusammen.

Bildungsgeschwindigkeit der lebenden Zellen durch Glycerin

$$r_{X,l,Gly} = \mu_{inst,Gly} \cdot c_{X,l} \quad (2-24)$$

Bildungsgeschwindigkeit der lebenden Zellen durch D-Sorbit

$$r_{X,l,Sorbit} = \mu_{inst,Sorbit} \cdot c_{X,l} \quad (2-25)$$

Summe der Bildungsgeschwindigkeiten der lebenden Zellen

$$r_{X,l,ges} = r_{X,l,Gly} + r_{X,l,Sorbit} = c_{X,l} \cdot (\mu_{inst,Gly} + \mu_{inst,Sorbit}) \quad (2-26)$$

Bildungsgeschwindigkeit der sterilen Zellen

$$r_{X,steril} = c_{X,l} \cdot \mu_{steril} \cdot \exp(K_{DHA,steril} \cdot c_{DHA}) \quad (2-27)$$

Bildungsgeschwindigkeit von toter Biomasse

$$r_{X,tot} = c_{X,steril} \cdot \mu_{tot} \cdot \exp(K_{DHA,tot} \cdot c_{DHA}) \quad (2-28)$$

### Produktbildungsgeschwindigkeiten

Die Produktbildungsgeschwindigkeit für DHA setzte sich aus der Produktbildung für die lebenden und die sterilen Zellen zusammen. Die tote inaktive Biomasse war hingegen nicht mehr in der Lage, Produkt zu bilden. Für L-Sorbose wurde auf Grund der niedrig eingesetzten Konzentrationen für D-Sorbit zu Beginn eines jeden Zyklus näherungsweise angenommen, dass die Umsetzung ausschließlich durch die lebenden Zellen bewerkstelligt wurde. Die Produktbildung von L-Sorbose durch die „Sterilzellen“ wurde vernachlässigt, da D-Sorbit bis zum Erreichen einer signifikanten Sterilzellkonzentration schon verbraucht wurde.

Bildungsgeschwindigkeit von DHA in lebenden Zellen:

$$r_{DHA,l} = \pi_{inst,DHA} \cdot c_{X,l} \quad (2-29)$$

Bildungsgeschwindigkeit von L-Sorbose in lebenden Zellen:

$$r_{Sorbose,l} = \pi_{inst,Sorbose} \cdot c_{X,l} \quad (2-30)$$

Bildungsgeschwindigkeit von DHA in sterilen Zellen:

$$r_{DHA,steril} = S \cdot c_{X,steril} \quad (2-31)$$

### Reaktionsgeschwindigkeiten für den Substratverbrauch

Ausgehend von den Zell- bzw. Produktbildungsraten wurden mit Hilfe von Ertragskoeffizienten die Reaktionsgeschwindigkeitsgleichungen für den Substratverbrauch von Glycerin und D-Sorbit aufgestellt.

Glycerinverbrauch durch Zellwachstum:

$$r_{\text{Gly},X} = \frac{r_{X,l,\text{Gly}}}{Y_{X,\text{Gly}}} \quad (2-32)$$

D-Sorbitverbrauch durch Zellwachstum:

$$r_{\text{Sorbit},X} = \frac{r_{X,l,\text{Sorbit}}}{Y_{X,\text{Sorbit}}} \quad (2-33)$$

Glycerinverbrauch durch Produktbildung von DHA:

$$r_{\text{Gly},\text{DHA}} = \frac{r_{\text{DHA},l} + r_{\text{DHA},\text{steril}}}{Y_{\text{DHA},\text{Gly}}} \quad (2-34)$$

D-Sorbitverbrauch durch Produktbildung von L-Sorbose:

$$r_{\text{Sorbit},\text{Sorbose}} = \frac{r_{\text{Sorbose},l}}{Y_{\text{Sorbose},\text{Sorbit}}} \quad (2-35)$$

### Reaktionsgeschwindigkeiten für den Sauerstoffverbrauch

Der Sauerstoffverbrauch wurde entweder durch das Zellwachstum oder durch den Erhaltungstoffwechsel hervorgerufen. Ertragskoeffizienten stellen einen Bezug zu den Zell- bzw. Produktbildungsgeschwindigkeiten her.

Sauerstoffverbrauch durch Zellwachstum mit Glycerin:

$$r_{\text{O},X,\text{Gly}} = \frac{r_{X,l,\text{Gly}}}{Y_{X,\text{O},\text{Gly}}} \quad (2-36)$$

Sauerstoffverbrauch durch Zellwachstum mit D-Sorbit:

$$r_{\text{O},X,\text{Sorbit}} = \frac{r_{X,l,\text{Sorbit}}}{Y_{X,\text{O},\text{Sorbit}}} \quad (2-37)$$

Gesamter Sauerstoffverbrauch durch Zellwachstum:

$$r_{O,X,ges} = \frac{r_{X,l,Gly}}{Y_{X,O,Gly}} + \frac{r_{X,l,Sorbit}}{Y_{X,O,Sorbit}} \quad (2-38)$$

Sauerstoffverbrauch durch Produktbildung mit Glycerin:

$$r_{O,DHA} = \frac{r_{DHA,l} + r_{DHA,steril}}{Y_{DHA,O}} \quad (2-39)$$

Sauerstoffverbrauch durch Produktbildung mit D-Sorbit:

$$r_{O,Sorbose} = \frac{r_{Sorbose,l}}{Y_{Sorbose,O}} \quad (2-40)$$

Gesamter Sauerstoffverbrauch durch Produktbildung:

$$r_{O,P,ges} = \frac{r_{DHA,l} + r_{DHA,steril}}{Y_{DHA,O}} + \frac{r_{Sorbose,l}}{Y_{Sorbose,O}} \quad (2-41)$$

### Sauerstoffeintrag

Für eine kontinuierliche Begasung mit Sauerstoff gilt die folgende Beziehung für den Sauerstofftransportstrom:

$$T_O = k_L \cdot a \cdot (c_{O,sat} - c_O) \quad (2-42)$$

### Substratzufuhr

Die Glycerinkonzentration wird während der Kultivierung konstant gehalten. Die verbrauchte Menge an Glycerin entspricht also genau der zugeführten Menge an Glycerin.

$$\dot{V}_{Gly,fed} = (r_{Gly,X} + r_{Gly,DHA}) \cdot \frac{V_R}{c_{Gly,fed}} \quad (2-43)$$

Zusammenfassend wurde für die Modellierung des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens ohne Immobilisierung folgender Satz aus acht gekoppelten Differenzialgleichungen verwendet:

DGL für die Konzentration des Sauerstoffes:

$$\frac{dc_{\text{O}}}{dt} = T_{\text{O}} - (r_{\text{O},\text{X,ges}} + r_{\text{O},\text{P,ges}}) \quad (2-44)$$

DGL für die Konzentration des Substrates Glycerin (stationär):

$$\frac{dc_{\text{Gly}}}{dt} = c_{\text{Gly, fed}} \cdot \frac{\dot{V}_{\text{fed}}}{V_{\text{R}}} - (r_{\text{Gly},\text{X}} + r_{\text{Gly},\text{DHA}}) = 0 \quad (2-45)$$

DGL für die Konzentration des Substrates D-Sorbit:

$$\frac{dc_{\text{Sorbit}}}{dt} = -(r_{\text{Sorbit},\text{X}} + r_{\text{Sorbit},\text{Sorbitose}}) \quad (2-46)$$

DGL für die Konzentration des Produktes DHA:

$$\frac{dc_{\text{DHA}}}{dt} = r_{\text{DHA},\text{l}} + r_{\text{DHA},\text{steril}} \quad (2-47)$$

DGL für die Konzentration des Produktes L-Sorbitose:

$$\frac{dc_{\text{Sorbitose}}}{dt} = r_{\text{Sorbitose},\text{l}} \quad (2-48)$$

DGL für die Konzentration der insgesamt gebildeten Zellmasse:

$$\frac{dc_{\text{X,ges}}}{dt} = r_{\text{X},\text{l,ges}} \quad (2-49)$$

DGL für die Konzentration der lebenden Zellen:

$$\frac{dc_{\text{X},\text{l}}}{dt} = r_{\text{X},\text{l,ges}} - r_{\text{X},\text{steril}} \quad (2-50)$$

DGL für die Konzentration der toten Zellen:

$$\frac{dc_{\text{X},\text{tot}}}{dt} = r_{\text{X},\text{tot}} \quad (2-51)$$

Die Gesamtzellmasse setzt sich additiv aus lebenden, sterilen und toten Zellen zusammen. Die Konzentration der „sterilen“ Zellen lässt sich daher wie folgt berechnen:

$$c_{\text{X},\text{steril}} = c_{\text{X},\text{ges}} - c_{\text{X},\text{l}} - c_{\text{X},\text{tot}} \quad (2-52)$$

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Stamm und Stammhaltung

Alle in dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Untersuchungen wurden mit dem Hochleistungsstamm M1136 aus der Stammsammlung der Firma E. Merck, Darmstadt, durchgeführt. Um sicherzustellen, dass für sämtliche Untersuchungen genetisch einheitliches Material verwendet werden konnte, wurde eine Kryokultur auf Basis eines Sorbitmediums (Tabelle 3-1) angelegt. Dafür wurde aus einer Schüttelkolbenkultur in der exponentiellen Wachstumsphase bei 28 °C jeweils ein Milliliter entnommen und in sterile Eppendorfgefäße abgefüllt. Die Kryokultur wurde bei minus 22 °C gelagert und halbjährlich erneuert.

#### 3.2 Medienzusammensetzung

Zur Aufzucht von Zellen aus der Kryokultur wurde das in Tabelle 3-1 beschriebene Sorbitmedium verwendet, da die aufgetaute Kultur nicht sofort in der Lage war, auf einem Glycerinmedium zu wachsen. Der pH des Sorbitmediums wurde auf 5.5 eingestellt. Für sämtliche experimentelle Untersuchungen im Labor- und Technikumsmaßstab wurde in seiner Grundzusammensetzung das in Tabelle 3-2 beschriebene Medium mit einem pH von 5.3 verwendet. Die Kultivierung im Schüttelkolben erfolgte bei 28 °C, im Labor- und Technikumsmaßstab bei 30 °C.

**Tabelle 3-1: Zusammensetzung des Sorbitmediums für die Schüttelkolbenkulturen und die Kryokulturen**

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.1 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.9 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1 g/l
Hefeextrakt	2.5 g/l
Sorbit	50 g/l

**Tabelle 3-2: Zusammensetzung des Glycerinmediums**

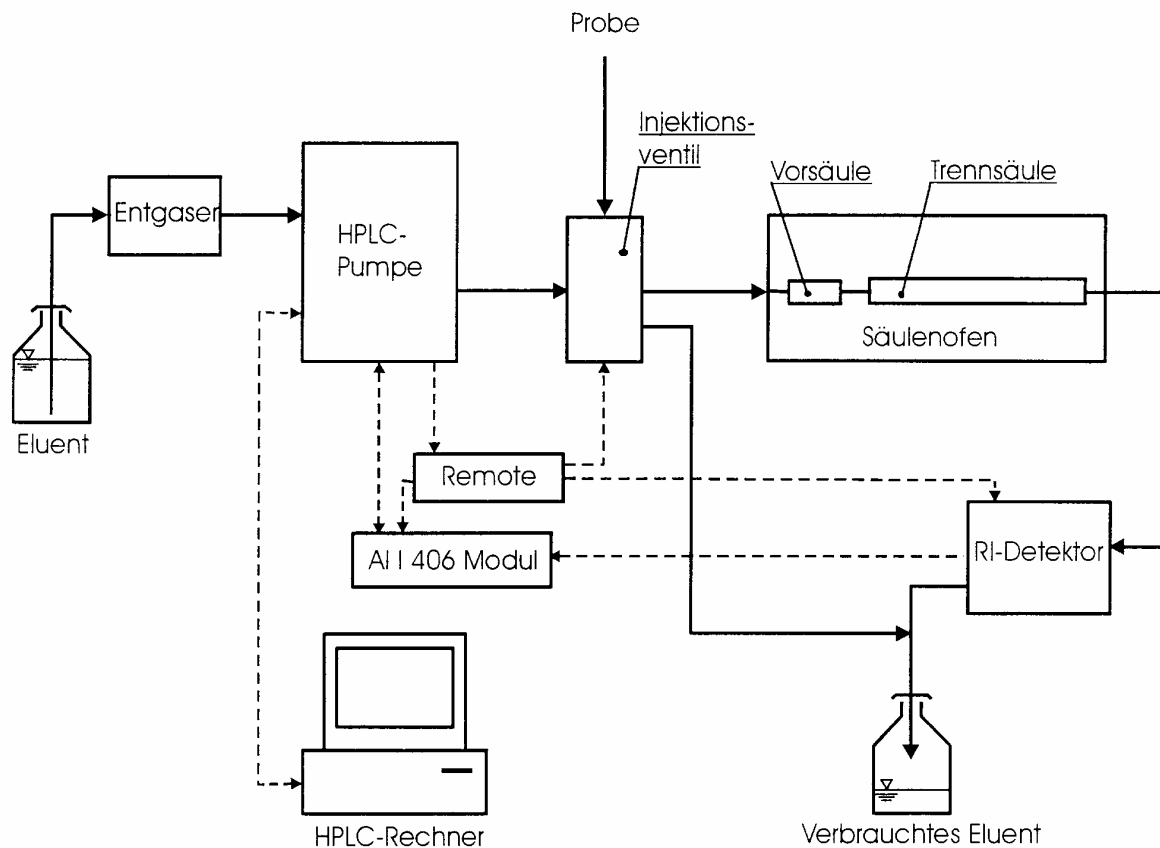
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.1 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.9 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1 g/l
$\text{CaCl}_2$	1.5 g/l
Hefeextrakt	3.5 g/l
Glycerin	15 g/l

### 3.3 Analytik

#### 3.3.1 Bestimmung der Glycerin- und DHA-Konzentrationen

Die Glycerin- und DHA-Konzentrationen wurden mittels High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) bestimmt. Die Flüssigchromatographie stellt ein analytisches Standardverfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung einzelner Komponenten in einem flüssigen Stoffgemisch dar. Das zu analysierende Stoffgemisch wurde über ein 6-Port / 3-Kanal Injektionsventil in den Eluentenstrom eingeschleust und zur Chromatographiesäule transportiert. In der Chromatographiesäule erfolgte die Auftrennung des Stoffgemisches. Die Trennwirkung beruht auf den unterschiedlich stark ausgeprägten physikalischen Wechselwirkungen der einzelnen Stoffe der Flüssigphase mit dem Festbett der Trennsäule. Nach der Auftrennung des Stoffgemisches wurden die einzelnen Komponenten mittels Refraktometer detektiert. Die Stärke der gemessenen Lichtbrechung ist proportional zu der Konzentration eines Stoffes. Die Darstellung der Analyseergebnisse erfolgte als Chromatogramm. Anhand der Retentionszeit und der Peakfläche aus dem Chromatogramm ließ sich durch eine vorherige Kalibration ermitteln, welche Stoffkomponente in welcher Konzentration in dem Stoffgemisch vorlag. In Abbildung 3-1 ist der schematische Aufbau der HPLC-Anlage wiedergegeben.





**Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der HPLC-Anlage**

Zur Bestimmung der Glycerin- und DHA-Konzentration wurde eine HPLC-Anlage mit isokratischer Pumpe der Firma Beckman verwendet. Neben der Glycerin- und DHA-Konzentration wurden auch die Konzentrationen von Sorbit, Sorbose, Glucose, Fructose und Saccharose bestimmt. Die verwendete Trennsäule zur Analyse von Glycerin und Dihydroxyaceton war ein Ca-Kationentauscher der Firma Phenomenex. Als Vorsäule wurde eine LSG Micro-Guard Carbo-C der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH verwendet. Die Geräteparameter und Spezifikationen der Chromatographiesäule sind in Tabelle 3-3 aufgelistet:

**Tabelle 3-3: Spezifikation der Trennsäule; Einstellungen während des Betriebes**

Gerät:	HPLC der Firma Beckman (Software System Gold)
Hauptsäule:	Phenomenex Rezex RCM Monosaccharide
Vorsäule:	Bio-Rad LSG Micro-Guard Carbo-C
Trägermaterial:	8 % quervernetztes Styroldivinylbenzol
Partikelgröße:	8 $\mu\text{m}$

---

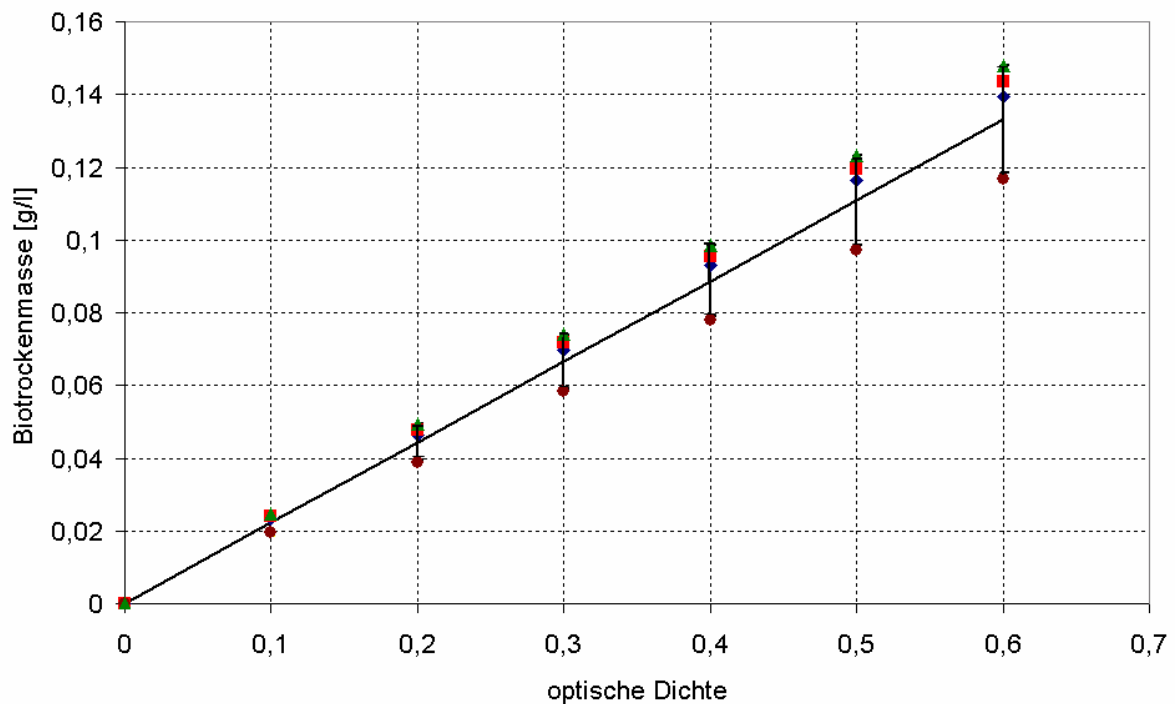
Ionenform:	Ca <sup>2+</sup>
Elutionsmittel:	bidest. H <sub>2</sub> O
Max. Druck:	600 psi (41.3 bar)
Betriebsdruck:	zwischen 370 und 500 psi
Fließrate:	0.6 ml/min (Analyse); 0.2 ml/min (stand-by-Betrieb)
Säulentemperatur:	80 °C
Injektionsvolumen:	4 µl
Detektion	Brechungsindex

Die HPLC-Anlage wurde je nach Einsatzbereich durch Standards auf Basis von Glycerin, DHA, Sorbit, Sorbose, Glucose, Fructose und Saccharose kalibriert. Die Kalibration wurde als Vierpunktkalibration durchgeführt. Die Konzentrationen und Zusammensetzungen der Kalibrierlösungen wurden nach den Erfordernissen des Untersuchungsbereichs eingestellt.

### 3.3.2 Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)

Die Biotrockenmasse von *Gluconobacter oxydans* wurde indirekt aus der optischen Dichte (OD) der Kulturbrühe ermittelt. Die OD wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 578$  nm bestimmt. Als Photometer wurde das Spektralphotometer Lambda 2 von Perkin Elmer verwendet.

Um den Zusammenhang zwischen OD und BTM herstellen zu können, musste eine Kalibrationsgerade erstellt werden. Dazu wurden Laborreaktorproben mit bekannter OD zu je 40 ml dreimal zentrifugiert, dekantiert und wieder resuspendiert, um die Biomasse vom restlichen Kulturmedium zu befreien. Anschließend wurden die Proben bei 105 °C 24 h lang getrocknet und danach gewogen (siehe Abbildung 3-2).



**Abbildung 3-2: Kalibrationsgerade zur Bestimmung der Biotrockenmasse durch Trübungsmessungen**

Ein linearer Zusammenhang zwischen Biotrockenmasse und optischer Dichte war nur in einem Bereich der OD-Einheit bis 0.6 gewährleistet, da es bei höheren OD-Werten verstärkt zur „Mehrfachlichtbrechung“ und somit zu einer Verfälschung des Trübheitsgrades kam. Für den Bereich zwischen  $0 < OD_{578\text{nm}} < 0.6$  konnten die gemessenen OD-Werte nach Gleichung (3-1) in Biotrockenmassekonzentrationen umgerechnet werden. Lag der OD-Wert darüber, musste mit vollentsalztem Wasser entsprechend verdünnt werden. Es ergab sich folgender linearer Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Biotrockenmasse:

$$\text{BTM} = 0.247 \cdot OD_{578\text{nm}} \quad (3-1)$$

Zur Bestimmung der maximal möglichen Biotrockenmasse in der Technikumsanlage im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren wurden im Reaktor 2 in einem DHA-Konzentrationsbereich von 80 g/l bis 100 g/l Proben gezogen und die BTM bestimmt.

### 3.3.3 Bestimmung der aktiven Zellen

Zur Identifikation aktiver Zellen wurde in dieser Arbeit die Methode der Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung (FISH) eingesetzt. In einem ersten Schritt wurden die Zellwände der Bakterien für die Oligonukleotidsonde durchlässig gemacht. Nach dem Eindringen hybridisierte die fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonde mit einem spezifischen Abschnitt der bakteriellen ribosomalen RNA. Sämtliches überschüssiges und nicht gebundenes Sondenmaterial wurde in einem nachfolgenden Waschschrift abgetrennt. Durch eine geeignete Lichtquelle konnten nun mikroskopisch sämtliche markierte ribosomale RNA und damit proteinproduzierende Zellen zur Fluoreszenz angeregt und somit sichtbar gemacht werden. Die Intensität der Fluoreszenz steht im direkten Zusammenhang mit dem Ribosomengehalt der detektierten Zelle. Der Ribosomengehalt korreliert wiederum bei Standardbedingungen mit der Wachstumsgeschwindigkeit bzw. der Stoffwechselaktivität von Zellen. [De Long et al., 1989; Wallner et al., 1993] So konnten mit Hilfe des FISH-Tests allgemeine Informationen über den physiologischen Zustand der Zellen gewonnen werden [Amann et al., 1990].

Als Oligonukleotidsonde wurde die Sonde EUB 338 verwendet. Diese Sonde wird von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, hergestellt und ist an ihrem 5'-Ende über einen Alkyl-Abstandshalter mit einer zusätzlichen, primären Aminogruppe versehen (5'-Amino-Modifier c6: trifluoroacetyl-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit). Über diese zusätzlich eingeführte Aminogruppe ist das Oligonukleotid kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff FLUOS (5, (6) Carboxyfluorescein-N hydroxysuccinimidester (Roche Applied Science); Absorptionsmaximum bei 494 nm) verwendet. In der folgenden Tabelle ist die Spezifikation der Sonde wiedergegeben:

**Tabelle 3-4: Sequenz und Position der Oligonukleotidsonde EUB 338**

Sonde	Sequenz (5'-3')	Position (16S rRNA)	Referenz
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	338-355	Amann et al. 1990

Zur Durchführung des FISH-Tests wurde die Kultur nach dem untenstehenden Verfahren behandelt. Diese Prozedur entsprach dem von Linn und Amann für die Populationsanalyse eingesetzten Verfahren [Linn, 1998; Amann et al. 1995].

### **Zellfixierung: Paraformaldehydfixierung**

Die Oligonukleotidsonde wurde zunächst in die Zelle eingeschleust, um dort an die ribosomale RNA binden zu können. Da die Zellhülle ein natürliches Hindernis für das Eindringen der Sonde darstellte, wurden die Zellwände durch Agentien wie Paraformaldehyd und Ethanol durchlässig gemacht.

Die Probensuspension wurde in einer Tischzentrifuge (12000 U/min, 5 min) pelletiert und in 1\*PBS resuspendiert. Drei Teile 4 %-iger, frisch hergestellter, auf Eis gekühlter Paraformaldehydlösung wurden mit einem Teil Zellsuspension gemischt und 2 h bei 4 °C inkubiert. Nach dieser Vorfixierung erfolgte die Endfixierung. Nach Zentrifugation (12000 U/min, 5 min) wurde das Zellpellet mit 1\*PBS gewaschen, abzentrifugiert, in 1\*PBS resuspendiert und mit demselben Volumen eiskaltem Ethanol (absolut) versetzt. Die so fixierten Zellen wurden bei -20 °C gelagert.

### **Beschichtung der Objektträger mit Gelatine**

Die gereinigten teflonbeschichteten Objektträger (6 Aussparungen, Paul Marienfeld) wurden langsam in die warme Gelatine-Lösung getaucht. Danach wurden sie 3 Stunden an einem staubfreien Ort bei Raumtemperatur getrocknet.

Verwendete Gelatinelösung: 1 gew.-% Gelatine, 0.01 gew.-% Kaliumchromsulfat in bidestilliertem Wasser bei 60 °C gelöst.

### **Hybridisierungs- und Waschbedingungen**

Für bereits beschriebene Sonden wurde bei der jeweils vorhandenen Stringenz gearbeitet. Stringenz steht für die Intensität der Bindung zwischen DNA oder RNA- Einzelsträngen, die stark von den Eigenschaften der Lösung und dessen chemischer Zusammensetzung abhängt. Für die verwendeten Sonden wurden die Hybridisierungsbedingungen empirisch bestimmt.

Alle Hybridisierungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die für die jeweilige Sonde notwendige Stringenz wurde durch die Zugabe von Formamid zum Hybridisierungspuffer eingestellt. Formamid destabilisiert Hybride und wirkt so stringenzerhöhend. Die Zugabe von Formamid hatte somit zur Folge, dass sich die Sonde leichter an die DNA bzw. RNA anlagern konnte. Im Waschpuffer wurde die identische Stringenz durch eine entsprechende Absenkung

der Kationenkonzentration eingestellt (s. nächste Tabelle). Dadurch wurden große Abfallmengen an Formamid verhindert. Die NaCl-Konzentration für den Waschpuffer wurde nach folgender Formel berechnet:

$$0.5 \cdot (\% \text{ Formamid}) = -16.6 \log [\text{Na}^+]$$

Die NaCl-Konzentrationen im Waschpuffer für Ganzzell-Hybridisierungen sind in der Tabelle 3-5 zusammengestellt:

**Tabelle 3-5: Zusammensetzung der Hybridisierungs- und Waschpuffer**

<b>Hybridisierung</b>	<b>Waschung</b>	
% Formamid bei der Hybridisierung	[NaCl] in mM	µl NaCl auf 50 ml*
0	900	9000
5	636	6300
10	450	4500
15	318	3180
20	225	2150
25	159	1490
30	112	1020
35	80	700
40	56	460
45	40	300
50	28	180
55	20	100
60	14	40
65	10	-

\*) ab 20 % Formamid wurden 5 mM EDTA zum Waschpuffer zugegeben, weil ansonsten bereits Spuren zweiwertiger Kationen durch ihre starke Hybridstabilisierung die Stringenz beeinflussten.

Die genaue Festlegung der Hybridisierungsstringenz für die Sonden erfolgte in Formamidreihen. Die optimale Stringenz war bei den Bedingungen erreicht, bei denen mit den Zielorga-

nismen (*Gluconobacter oxydans*) starke Signale erzielt wurden und gleichzeitig alle Nicht-Zielpartikel keine Signale mehr zeigten. Als optimale Hybridisierungslösung erwies sich die Lösung mit 30 % Formamid, als optimale Waschlösung die Lösung mit 112 mM NaCl.

**Hybridisierungsprozedur:****Verwendete Lösungen:**

NaCl-Stammlösung: 5 M NaCl

EDTA-Stammlösung, pH 8.0: 0.5 M EDTA

Natriumodecylsulfat (SDS)-Lösung: 10 % SDS sterilfiltriert

Tris/HCl-Lösung: 1M Tris, pH 8 mit konz. HCl einstellen

**Hybridisierungspuffer:**

Formamid 30 gew.-%

5 M NaCl 360 µl

Tris / HCl 50 µl

10 % SDS 2 µl

H<sub>2</sub>O bidestilliert ad 2 ml

**Waschpuffer:**

1 M Tris / HCl: 1 ml

10 % SDS 50 µl

5M NaCl 1020 µl

H<sub>2</sub>O bidest. ad 50 ml

Von den fixierten Zellsuspensionen wurden je nach Zelldichte zwischen 1.5-10 µl Proben auf die Aussparungen der beschichteten Objektträger pipettiert, bei 46 °C getrocknet und in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydratisiert (50 %, 80 %, 96 % Ethanol, je 3 min). Dafür wurden die Objektträger vorsichtig in einer entsprechenden Lösung, die sich in einer Petrischale befand, eingetaucht, inkubiert und entnommen. Danach wurde das Ethanol durch Trocknung bei Raumtemperatur entfernt. Auf die getrockneten Objektträger wurde auf jedes Feld 8 µl Hybridisierungspuffer und je 1 µl des markierten Oligonucleotids (Konz. 30-50 ng/µl) zupipet-

tiert und sorgfältig, ohne die fixierten Zellen vom Objektträger wieder abzulösen, vermischt. Zur simultanen Doppelhybridisierung mit unterschiedlich markierten Sonden wurden zwei mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sonden gleichzeitig eingesetzt. Anschließend wurden die Objektträger in ein 50 ml Probengefäß, welches zuvor mit 2 ml befeuchteten Zellstoff ausgelegt wurde, übergeführt und verschlossen. Für die Hybridisierungsreaktion war eine wasserhaltige Umgebung wichtig. Die Objektträger wurden dann 2.5 h bei 46 °C in horizontaler Lage inkubiert. Dann wurden die Objektträger sofort mit 1 ml 48 °C warmen Waschpuffer abgespült und in ein mit Waschpuffer gleicher Temperatur gefülltes Probengefäß übergeführt. Nach einem 20 minütigen Waschschrift bei 48 °C wurden die Objektträger entnommen, vorsichtig mit bidestilliertem Wasser gespült und luftgetrocknet. Der hybridisierte Objektträger war nun für die mikroskopische Auswertung bereit.

### **Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen durch Epifluoreszenzmikroskopie**

Für die Auswertung der Epifluoreszenzuntersuchungen wurde ein Durchlicht-Universalmikroskop der Firma Zeiss mit der Typbezeichnung Axioplan verwendet. Zur Untersuchung wurde ein Plan-Neofluar Objektiv mit 100-facher Vergrößerung eingesetzt. Das Universalmikroskop war mit einem 35 mm Kameraansatz für das Modell Zeiss MC 100 ausgestattet. Die Dokumentation erfolgte photographisch mit einem Farbfilm der Firma Kodak mit einer Lichtempfindlichkeit von ISO 200. Die Größe von *Gluconobacter oxydans* beträgt bis zu 4 µm, weshalb bei einer Vergrößerung von 1000 gearbeitet wurde. Als Immersionsöl wurde Zedernholzöl der Firma Merck verwendet.

Folgende Filterkombinationen wurden benutzt:

**Tabelle 3-6: Kenndaten der verwendeten Filtersysteme**

Filtersatz	Anregungsfilter	Farbteiler [nm]	Emmisionsfilter	Verwendung
01- Zeiss	BP 365	395	LP 397	DAPI
09 - Zeiss	450-490	510	LP 520	FLUOS

Der Objektträger wurde vor der mikroskopischen Auswertung zur Verzögerung von Ausbleicheeffekten der Fluoreszenzfarbstoffe in Citifluor AF1 (Citifluor Ltd, London, UK) eingebettet und nach 5 min Inkubationszeit im Dunkeln unter dem Mikroskop (Axioplan, Zeiss) betrachtet.



Zur Auszählung wurden auf jedem Objektträger 6 Proben auf den 6 Aussparungen zugegeben, fotografiert und ausgezählt.

### **3.3.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl**

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde der DAPI-Test verwendet. Es handelt sich dabei um einen häufig eingesetzten Standardtest zur Bestimmung der Gesamtzellzahl.

Verwendete Lösung: 1 µg/ml DAPI (Sigma, Deisenhofen) in bidestilliertem Wasser.

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid) bindet bevorzugt an Adenin-Thymin-reiche Regionen der DNS, womit gleichzeitig eine Verstärkung der Fluoreszenz verbunden ist. DAPI zeigt ein Anregungsoptimum bei 418 nm und wird für die Bestimmung der Gesamtzellzahl verwendet. Gefärbte Zellen erscheinen blau, während eine unspezifische Bindung von DAPI an Polyanionen wie Polyphosphat und Natriumlaurylsulfat zu einer Gelbfärbung der Partikel führt.

Das Biomaterial wurde, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, mittels Paraformaldehydfixierung und der Hybridisierung vorbehandelt. Im Anschluss an die Hybridisierung wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI nachgefärbt. Dafür wurde der Objektträger im Dunkeln luftgetrocknet und für jedes Hybridisierungsfeld 10 µl der DAPI-Arbeitslösung (1 µg/ml DAPI in bidest. Wasser) pipettiert. Die Inkubation dauerte 5 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Objektträger mit bidest. Wasser abgespült, im Dunkeln luftgetrocknet und in Citifluor eingebettet (Citifluor Ltd, London, UK). Die Auswertung erfolgte mikroskopisch unter UV-Anregung mit Hilfe eines Zähllokulars. Die Gesamtzellzahl wurde durch Auszählen mit Hilfe eines manuellen Zählers bestimmt.

## **3.4 Herstellung silikonbeschichteter Ralu<sup>®</sup>-Ringe**

### **Füllkörper**

In dieser Arbeit wurden Füllkörper der Firma Raschig als Trägermaterial für die Beschichtung verwendet. Die Ralu<sup>®</sup>-Ringe sind aus Polypropylen (Ralu 15), einem ausreichend chemisch

inerten Material. Sie sind dauerhaft mechanisch stabil und sterilisierbar. Ihre Spezifikation ist in Tabelle 3-7 wiedergegeben. Die Ralu<sup>®</sup>-Ringe boten eine große Stoffaustauschfläche, wodurch eine hohe Besiedlungsdichte ermöglicht wurde. Ein weiterer Vorteil war der geringe Druckverlust aufgrund des großen Lückenvolumens (94 %) und der günstigen Geometrie.

**Tabelle 3-7: Spezifikation der Ralu<sup>®</sup>-Ringe 15**

Durchmesser × Höhe mm	Gewicht kg/m <sup>3</sup>	Stückzahl -	Oberfläche m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup>	Freies Volumen %
18 x 18	92	170 000	320	94

Das Aufwuchsverhalten der Mikroorganismen an die Oberfläche der Polypropylenringe war, wie in Kapitel 4.3 beschrieben, aufgrund ihres hydrophoben Charakters und der damit verbundenen schlechten Benetzbarkeit mit dem Nährmedium ungenügend. Um das Anwachsen der Mikroorganismen zu verbessern, wurden die Ralu<sup>®</sup>-Ringe unter Beibehaltung der günstigen geometrischen Struktur mit einem porösen Silikonkautschukgemisch beschichtet.

### **Beschichten der Ralu<sup>®</sup>-Ringe**

Für die Beschichtung der Ralu<sup>®</sup>-Ringe mit einer porösen Silikonträgermatrix wurden die in Tabelle 3-8 aufgeführten Materialien verwendet. Die Zusammensetzung der Beschichtung basierte auf den Arbeiten von Muscat und Bettin [Muscat, 1995; Bettin, 2001].

**Tabelle 3-8: Beschichtungsmaterialien**

Beschichtungsmaterial	Spezifikation	Hersteller
Silopren U1	Basispolymer	Bayer AG, Leverkusen
Silopren U Vernetzer 260	Vernetzer	Bayer AG, Leverkusen
Silopren U Katalysator Pt-L	Platinkatalysator	Bayer AG, Leverkusen
Kochsalz SOLSEL	Partikelgrößenverteilung zw. 100 bis 300 µm (extrafein)	Solvay, Musternr. 3356
Titandioxid	Rutilpigment 2210	Kronos

Zur Beschichtung wurde der 2-Komponenten Silikonkautschuk (RTV 2) verwendet. Das RTV 2-Silikon bestand aus einem Basispolymer (Silopren U1) und einem Vernetzer (Silopren U Vernetzer 260), die im Verhältnis von 94 : 6 miteinander vermischt wurden. Dem 2-Komponenten Gemisch wurde anschließend ein Platinkatalysator (Silopren U Katalysator Pt-L) im Verhältnis RTV 2 : Pt-L = 1000 : 1 hinzugegeben. Danach wurde das fließfähige Gemisch mit dem Kochsalz SOLSEL der Firma Solvay vermengt. Der Volumenanteil, die Partikelgröße und deren Verteilung an Kochsalz hatten enorme Auswirkungen auf die rheologischen Eigenschaften der Silikon/Salzmischung. Nach Bettin [2001] war das Gemisch nur bis zu einem Volumenanteil von 50 % Salz gleichmäßig fließfähig. Die Viskosität stieg im Bereich von 40 bis 50 % Volumenanteil Salz exponentiell mit dem Salzgehalt. Die Verwendung von feineren Salzpartikeln (50 bis 100  $\mu\text{m}$ ) führte zu deutlich höheren Viskositäten. Die Hydrophilie und die Benetzbarkeit wurden durch die Zugabe von Titandioxid erhöht. Um eine Deaktivierung des Katalysators zu verhindern, wurde das gesamte Gemisch mit einem nicht-metallischen Hilfsmittel (Glasstab) gerührt. Im Anschluss wurden die Raluringe in die Mischung getaucht, herausgezogen und mit Hilfe von Druckluft solange behandelt, bis sich ein gleichmäßiger Film ausbildete und dadurch überschüssiges Material entfernt wurde. Um die Porosität der Silikonoberfläche zu erhöhen, wurden die beschichteten Ringe in Kochsalz gewendet. Durch die entstehende poröse Oberfläche konnte die Gesamtporosität um ca. 15 Volumenprozent gesteigert werden. Danach wurden die beschichteten Füllkörper bei 90 °C ca. 1 h im Trockenschrank getrocknet. Das Kochsalz wurde aus dem ausgehärteten Träger durch mehrfaches Erhitzen auf 120 °C in einem Wasserbad ausgewaschen. Der so entstandene Porenvolumenanteil entsprach somit annähernd dem Volumenanteil des eingesetzten Kochsalzes. Das Porenvolumen der Silikonfilme wurde so eingestellt, dass die viskose Silikonmischung eine hinreichend gute Tauchfähigkeit besaß. Da mit höheren Porenvolumina die Aufwuchsbedingungen für die Mikroorganismen besser waren, wurden Silikonfilme mit einem Porenvolumen von 40 % für die Beschichtung verwendet. Durch die zusätzlich porös gestaltete Oberfläche wurde somit ein Porenvolumen von 55 % erzielt.

**Tabelle 3-9: Zusammensetzung der eingesetzten Komponenten; Massenanteile des Kochsalzes, des Silikons und des Titandioxids in Abhängigkeit vom Porenvolumen**

Porenvolumen [%]	NaCl [%]	Basispolymer U1 [%]	Silopren U Vernetzer 260 [%]	TiO <sub>2</sub> [%]	Silopren U Katalysator Pt-L [%]
40	55.63	33.83	2.19	8.31	0.04

In Abbildung 3-3 sind unbeschichtete und silikonbeschichtete Ralu<sup>®</sup>-Ringe dargestellt.

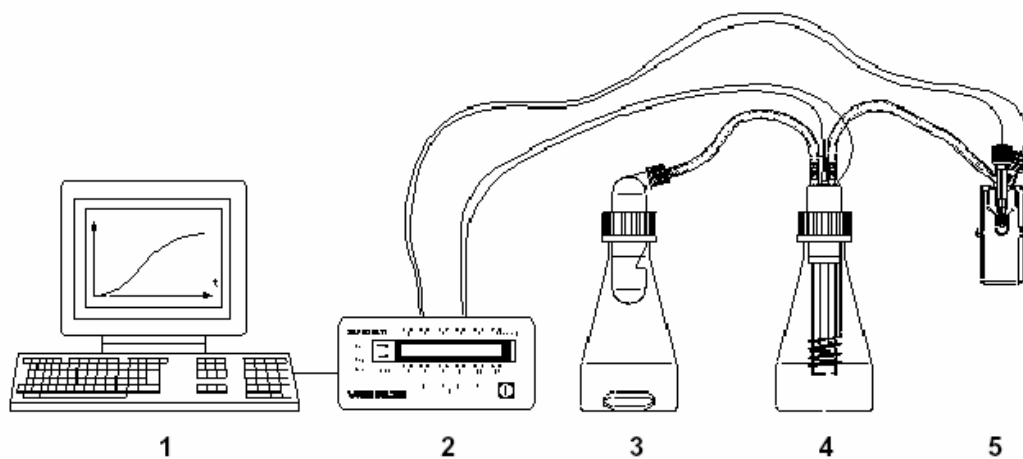


**Abbildung 3-3: Links: Unbeschichtete Ralu<sup>®</sup>-Ringe; Rechts: Silikonbeschichtete Ralu<sup>®</sup>-Ringe**

### 3.5 Verwendete Reaktortypen

#### 3.5.1 Sapromat<sup>®</sup>

Der Sapromat<sup>®</sup> stellt einen Standardapparat zur Bestimmung der Toxizität von Inhaltsstoffen im Abwasser und Böden dar [Offhaus; 1965]. Gemessen wird der biochemische Sauerstoffbedarf (BSB-Wert) einer Kultur. Der BSB-Wert ist die Menge an Sauerstoff, die vom Mikroorganismus benötigt wird, um im Wasser enthaltene Substanzen oxidativ abzubauen. In dieser Arbeit wurde der Sapromat<sup>®</sup> zur Untersuchung des inhibierenden und toxischen Einflusses von DHA auf die Kultur herangezogen. Die Experimente erfolgten mit freundlicher Unterstützung der Firma H+P Labortechnik AG, Unterschleißheim, welche den Sapromat<sup>®</sup> E zur Verfügung stellte. Der Sapromat<sup>®</sup> bestand aus einem Mess- und Steuergerät und einem Brutraum. Die Temperatur im Brutraum wurde auf 28 °C eingestellt. In diesem Brutraum befanden sich nebeneinander zwölf Messzellen. Eine Messzelle setzte sich aus Reaktionsgefäß (3), Sauerstofferzeuger (4) und Kontaktmanometer (5) zusammen (Abbildung 3-4).



1 Auswertung	4 Sauerstoffzeuger
2 Steuergerät	5 Schaltmanometer
3 Reaktionsgefäß	

**Abbildung 3-4: Schematischer Aufbau eines SAPROMAT® E**

Der Sauerstoffzeuger (4) bestand aus einer Elektrolyse-Zelle, in der eine schwefelsaure Kupfersulfatlösung durch einen konstanten Strom von 100 mA in Sauerstoff und Schwefelsäure einerseits und Kupfer andererseits zerlegt wurde. Die in den Elektrolyten eintauchenden Elektroden waren an einem luftdicht abschließenden Stopfen befestigt.

Das Reaktionsgefäß (3) wurde von einem Glasaufsatz mit integriertem CO<sub>2</sub>-Absorberkorb für den Natronkalk im Kopf des Reaktionsgefäßes luftdicht abgeschlossen. Die zu untersuchende Probe wurde in dem Reaktionsgefäß (3) durch einen Magnetrührer umgewälzt, um für einen besseren Sauerstoffeintrag zu sorgen. Stoffwechselfvorgänge der Bakterien führten zur Bildung von Kohlendioxid, welches durch den CO<sub>2</sub>-Absorber gebunden wurde. Durch die Adsorption entstand im abgeschlossenen Messsystem ein Unterdruck, auf den das Schaltmanometer (5) ansprach, indem die Kontaktflüssigkeit im Steigrohr des Schaltmanometers nach oben stieg und zwischen zwei Platinelektroden Kontakt herstellte. Über einen Schaltverstärker im Steuergerät (2) wurde der Sauerstoffzeuger gestartet. Die mit konstant gehaltenem Strom erzeugte Sauerstoffmenge wurde dem Reaktionsgefäß solange zugeführt, bis der Ausgangsdruck im Messsystem wieder hergestellt war und der Kontakt zwischen den Platinelektroden wieder gelöst wurde. Die Einschaltzeit des Sauerstoffzeugers war proportional zum biochemischen Sauerstoffbedarf.

Der mit dem verwendeten Sapromaten noch messbare biochemische Sauerstoffbedarf BSB war durch die maximale Leistung des Sauerstoffzeugers von 90 mg/l Sauerstoff pro Stunde

begrenzt. Eine Füllung des Sauerstofferzeugers reichte für etwa 30000 mg/l aus. Basierend auf der maximalen Sauerstoffzehrrate von *Gluconobacter oxydans* aus den Versuchen mit der Technikumsanlage ließ sich errechnen, dass ein Sorbitmedium zu verwenden war, welches im Vergleich zum Sorbitmedium aus Tabelle 3-1 um das Fünffache zu verdünnen war.

### 3.5.2 Laborblasensäulenreaktor

Zur Kultivierung im Labormaßstab wurde eine selbstgebaute Blasensäule mit einer Höhe von 300 mm, einem Durchmesser von 100 mm und einem maximalen Fassungsvermögen von zwei Litern verwendet. Die Begasung erfolgte über eine Sintermetallplatte, welche im Reaktorboden eingebaut wurde. Zur Messung der Sauerstoffkonzentration wurde die Sauerstoffelektrode InPro6800 der Firma Mettler Toledo verwendet. Die pH Messung erfolgte über die pH-Gelelektrode 405-DPAS-SC-K8S der Firma Mettler Toledo. Die Temperatur wurde über einen Pt-100 Widerstandsmessfühler der Bioengineering AG (Wald, Schweiz) gemessen. Zur Temperatur- und pH-Regelung wurde der Temperatur- und pH-Controller der Firma Bioengineering verwendet. Die Online-Probennahme zur Bestimmung der Glycerin- und DHA-Konzentrationen mittels HPLC erfolgte über eine sterilisierbare Mikrofiltrations-Membransonde. Sie bestand aus Polypropylen mit 0.2 µm Porendurchmesser und ermöglichte eine zellfreie Probennahme.

Da das Durchführen von Läufen im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren einen vollautomatisierten Versuchsstand voraussetzte, wurde ein Steuerungsprogramm in der objektorientierten Programmiersprache Borland Pascal 7.0 geschrieben. Es erlaubte sowohl das manuelle Eingreifen in das Prozessgeschehen als auch die vollautomatisierte Steuerung des Prozesses über den Prozessrechner. Folgende Aufgaben wurden vom Prozessleitsystem durchgeführt:

1. Vollautomatisierte Probennahme und Analyse der Glycerin und DHA-Konzentration mittels HPLC alle zwei Stunden
2. Datenerfassung und Speicherung von pH, Temperatur und Sauerstoffkonzentration alle zehn Minuten und der Glycerin und DHA-Konzentration alle zwei Stunden
3. Zufuhr von Glycerin bei Unterschreitung einer Glycerinkonzentration von 15 g/l im Reaktor

4. Durchführen eines Chargenwechsels bei Erreichen eines vorgegebenen DHA-Schwellwertes im Reaktor

Zur Realisierung wurde das Messwerterfassungssystem Microlink der Firma WES GmbH (Nidderau-Heldenbergen) verwendet. Zur Steuerung der einzelnen Prozesse wurden die in Tabelle 3-10 aufgeführten Module eingesetzt:

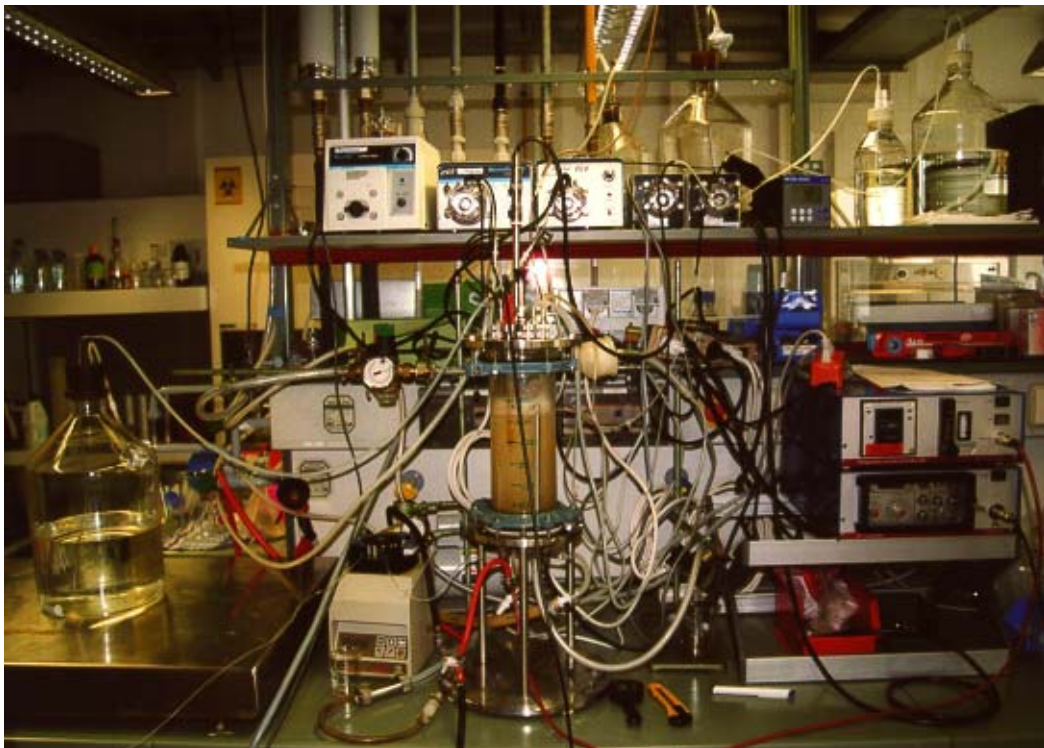
**Tabelle 3-10: Verwendete Hardwarekomponenten des Prozessleitsystems**

Modul	Verwendung
RR-8 mit 8 Reed- Relais Ausgängen	-Steuerung der Dosierpumpen für Glycerin und Nährmedium -Steuerung der Produktabzugpumpe -Starten der HPLC-Routine
AD-12 INT Analog-Digital-Wandler	-Erfassung der Sauerstoffkonzentration, der Temperatur und des pH
RS232 Schnittstelle am Prozessrechner	-Einlesen der Glycerin- und DHA-Konzentration über einen Datenpuffer -Einlesen der Glycerinzugabemenge über eine Waage der Firma Sartorius (Genauigkeitsklasse II)

### **Sterilisation und Inbetriebnahme der Blasensäule**

Die Sterilisation der Blasensäule erfolgte über eine externe Dampfzufuhr und der Abzug von Kondensat über eine Kondensatleitung. Der Reaktor wurde für 30 min bei 121 °C sterilisiert. Nach erfolgter Sterilisation der Blasensäule wurden sämtliche sterilisierten Peripheriegefäße, die Substrat, Nährlösung und Lauge enthalten, angestochen. Dem Anstechen folgte eine Validierung der Sterilisationsprozedur über einen Zeitraum von drei Tagen. Der Reaktor wurde dazu mit Nährlösung beschickt und kontinuierlich begast. Über den angegebenen Zeitraum wurden der pH und die gelöstsauerstoffkonzentration In-Situ gemessen und dokumentiert. Erfolgte in diesem Zeitraum keine Absenkung der pO<sub>2</sub>-Konzentration und des pH, war die Sterilisationsprozedur erfolgreich.

Während der Kultivierung wurde die Blasensäule mit Volumenströmen von 130 bis 360 nl/h belüftet. Der  $k_L a$  wurde mit der dynamischen Gas-In/Gas-Out-Methode während der Kultivierung bei einem Volumenstrom von 130 nl/h ermittelt und betrug 162 1/h. Die Temperatur wurde während der Kultivierung auf 30 °C eingestellt. Der pH wurde über die Zudosierung von Lauge auf einem konstanten Niveau von 5.3 gehalten.



**Abbildung 3-5 : Der Laborblasensäulenreaktor und periphere Einrichtungen (links: Feed-Zufuhr Gefäß auf der Waage; mitte: 2 Liter Laborblasensäulenreaktor; rechts: Regeleinheit für pH und Temperatur; oben: Pumpen für Chargenwechsel beim zyklisch betriebenen Zulaufverfahren sowie Pumpe für Lauge Zufuhr**

### 3.5.3 Rührkesselreaktor

Um auch im Laborreaktormaßstab das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren realisieren zu können, wurde als zweite Stufe ein zwei Liter Rührkesselreaktor der Firma Bioengineering AG (Wald, Schweiz) verwendet. Dieser Reaktor wurde nicht sterilisiert sondern unter hygienisch sauberen Bedingungen betrieben und lediglich auf 30 °C temperiert. Eine pH-Regelung erfolgte nicht.



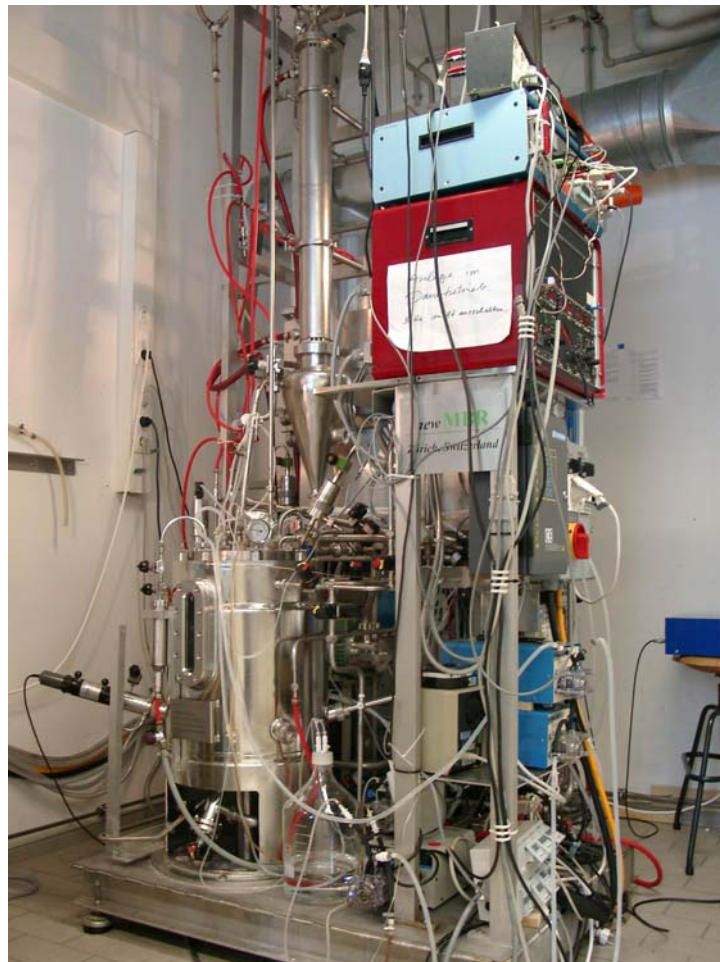
### 3.5.4 Zweistufige Technikumsanlage

#### Beschreibung der Technikumsanlage

Für das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren im Technikumsmaßstab wurde in der ersten Stufe mit einem Rührkesselreaktor der Firma new MBR AG (Zürich, Schweiz) und in der zweiten Stufe mit einer Blasensäule der Naue GmbH (Weiterstadt) gearbeitet. Der Inhalt der ersten Stufe konnte mittels der selbstansaugenden Kreiselpumpe HD 88 der Firma Sawa (Degersheim, Schweiz) in die zweite Stufe übergeführt werden. Eine genauere Beschreibung des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens ist in Kapitel 1 zu finden.

Der Rührkesselreaktor hatte ein maximales Fassungsvermögen von 60 l und die Blasensäule von 40 l. Beide Reaktoren und sämtliche periphere Einrichtungen waren auf einen Anlagen- druck von maximal 6 bar ausgelegt. Die Belüftung des Rührkesselreaktors erfolgte über einen Spargerring, der unterhalb des Rührorgans angebracht war. Die Belüftung der Blasensäule erfolgte über sternförmig angeordnete Sintermetallrohre, die gleichzeitig auch für homogene Verhältnisse in der Blasensäule sorgten. Die Temperaturregelung im Rührkesselreaktor erfolgte über einen mit Wasser gefüllten Wärmetauschermantel mit integriertem Kühl- und Heizkreislauf. Der Kaltwasserzufuhrstrom wurde vor dem Eintritt in den Mantel mit einem Durchlauferhitzer erwärmt. Die Blasensäule wurde über einen Wärmetauschermantel mit Kühlwasser aus der Hausleitung versorgt und über einen integrierten Heizfinger temperiert. Die Temperatur wurde in beiden Reaktoren auf 30 °C eingestellt. Die pH Messung und Regelung erfolgte in beiden Reaktoren jeweils über die pH-Gelelektrode 405-DPAS-SC-K8S der Firma Mettler Toledo und dem pH-Controller der Firma Bioengineering. Zur Messung der Sauerstoffkonzentration wurde in beiden Reaktoren eine Sauerstoffelektrode der Firma Mettler Toledo verwendet. Die Abluft der beiden Reaktoren wurde gekoppelt und über eine Ablufteinheit, bestehend aus einem Zyklonabscheider und einem Wärmetauscher entfeuchtet. Die manuelle Probenentnahme zur Bestimmung der optischen Dichte erfolgte bei beiden Reaktoren auf dieselbe Art: Über ein Steigrohr und eine Schlauchverbindung wurde durch den Innendruck des Reaktors Flüssigkeit nach außen gedrückt. Der Probenschlauch konnte durch Klemmen vom Reaktor getrennt werden und wurde zur Desinfektion nach jeder Probenentnahme mit Ethanol gespült. Die Online-Probenentnahme für die HPLC geschah über eine Mikrofiltrations-Membransonde aus Polypropylen mit 0.2 µm Porendurchmesser.

Das Nährmedium wurde in 12.5-facher Konzentration zugeführt. Das vollentsalzte Wasser (VE-Wasser) wurde der Hausleitung entnommen und über einen Sterilfilter steril zudosiert. In Abbildung 3-6 ist die Anlage im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren während des Betriebes zu sehen.



**Abbildung 3-6: Technikumsanlage im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren; Links unten: 60 l Rührkesselreaktor, links oben: Abluftgruppe mit Zyklonabscheider und Wärmetauscher, Rechts oben: Steuereinheit, rechts unten: Dosierpumpen und verdeckt: 40 l Blasensäule**

Der Betrieb der Technikumsanlage im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren setzte ebenso wie der Laborblasensäulenreaktor einen vollautomatisierten Versuchsstand voraus. Folgende Aufgaben wurden vom Prozessleitsystem durchgeführt:

1. Vollautomatisierte stündliche Probennahme und Analyse der Glycerin und DHA-Konzentration mittels HPLC sowohl in Reaktor 1 als auch in Reaktor 2. Die Probennahme konnte alternierend oder ausschließlich in Reaktor 1 und 2 erfolgen.
2. Datenerfassung und Speicherung von pH, Temperatur und Sauerstoffkonzentration alle fünfzehn Minuten und der Glycerin und DHA-Konzentration alle zwei Stunden für Reaktor 1 und 2
3. Zufuhr von Glycerin bei Unterschreitung einer Glycerinkonzentration von 15 g/l in Reaktor 1 und 2
4. Durchführen eines Chargenwechsels bei Erreichen eines vorgegebenen DHA-Schwellwertes im Reaktor; Leeren von Reaktor 2, Überführen des Inhalts von Reaktor 1 nach Reaktor 2, Zufuhr von frischem Nährmedium in Reaktor 1

Zur Realisierung wurde wieder das Messwerterfassungssystem Microlink der Firma WES Ebert Systeme Electronic GmbH verwendet. Zur Steuerung der einzelnen Prozesse wurden die in Tabelle 3-11 aufgeführten Module eingesetzt:

**Tabelle 3-11: Verwendete Hardwarekomponenten des Prozessleitsystems**

Modul	Verwendung
RR-8 mit 8 Reed- Relais Ausgängen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Steuerung der Dosierpumpen für Glycerin, Nährmedium und VE-Wasser</li> <li>- Steuerung der Produktabzugpumpe für Reaktor 2</li> <li>- Starten der HPLC-Routine</li> <li>-Schalten des HPLC Ventils für eine alternierende Probennahme aus Reaktor 1 und 2</li> <li>- Kontrolle und Steuerung sämtlicher pneumatischer Ventile</li> </ul>
Q12D-A Digital-Analog-Wandler	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Steuerung der Kreiselpumpe für den Chargenwechsel</li> </ul>
AD-12 INT Analog-Digital-Wandler	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Erfassung der Sauerstoffkonzentration, der Temperatur und des pH</li> </ul>
RS232 Schnittstelle am Prozessrechner	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Einlesen der Glycerin- und DHA-</li> </ul>

	Konzentration über einen Datenpuffer - Einlesen der Glycerinzugabemenge über eine Waage der Firma Sartorius
--	---

### **Sterilisation und Inbetriebnahme der Technikumsanlage**

Die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Sterilisation der Anlage war ein vorausgehender Drucktest, um eventuelle Leckagen zu lokalisieren. Der Drucktest war wichtig für ein sicheres Durchführen der Sterilisation, da aus Leckagen heißer Dampf austreten kann. Zudem konnte eine Leckage die Ursache für Kontaminationen während der Kultivierung sein. Die Sterilisation beinhaltete das Aufheizen bis 100 °C zwecks Inertgasentfernung, das Erreichen und Halten der Sterilisationstemperatur von 121 °C über eine Zeitdauer von 30 min, das Kühlen bis 105 °C, das Brechen des Vakuums, und anschließend das Kühlen bis zur Kultivierungstemperatur. Ein Sterilisationsprotokoll für die Anlage wurde in der Diplomarbeit von Katsikis entwickelt und in dieser Arbeit für die Sterilisation und Inbetriebnahme der Technikumsanlage eingesetzt [Katsikis, 2003].

Danach folgte die Validierung der Sterilisation, bei der beide Reaktoren mit Nährmedium befüllt und über einen Zeitraum von drei Tagen belüftet wurden. Danach wurde die Zuluft abgedreht. Ein eventueller Abfall der gelösten Sauerstoffkonzentration oder des pH im Nährmedium dienten als Indikator für eine Kontamination. Auch eine Trübung des Mediums deutete auf eine Kontamination hin. War die Sterilisation erfolgreich, so konnte durch die Inokulation von Reaktor 1 der Technikumsbetrieb aufgenommen werden.

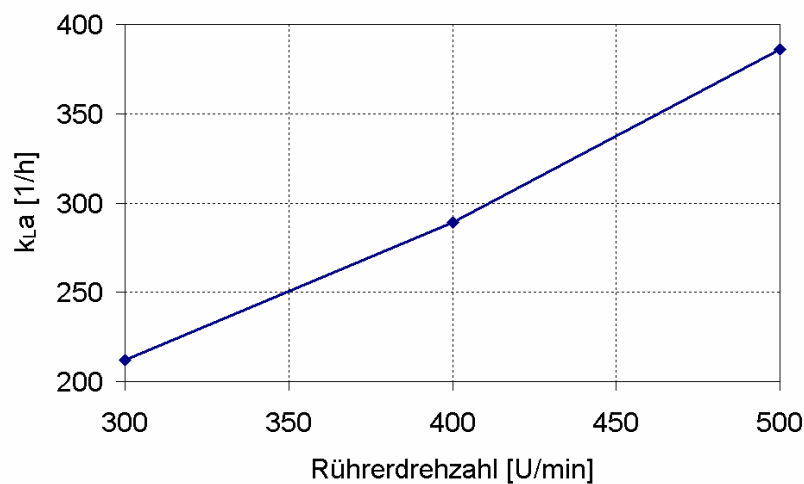
### **Reaktorcharakteristik**

Während der Kultivierung betrug der Anlagenüberdruck 0.2 – 0.3 bar. Die Rührerdrehzahl für den Rührkesselreaktor wurde auf 470 U/min eingestellt. Die Volumenströme für die Belüftung der beiden Reaktoren betrugen 20 nl/min in Reaktor 1 und 15 nl/min in Reaktor 2.

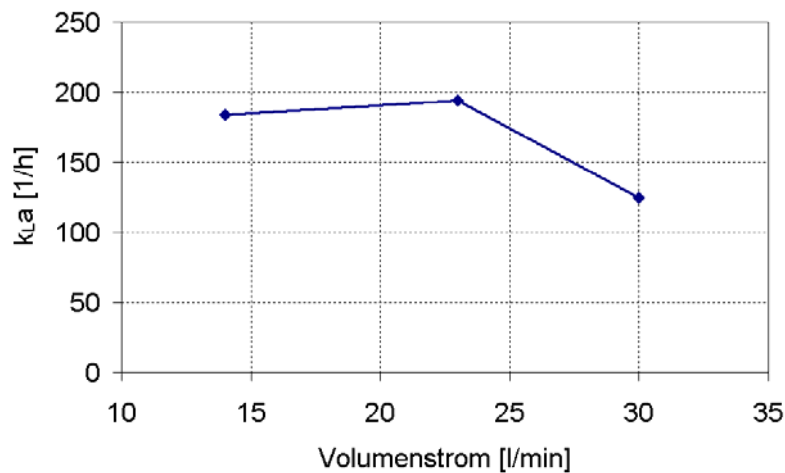
Die Bestimmung des  $k_L a$  erfolgte wieder mit der dynamischen Gas-in/Gas-out-Methode während des Betriebes. Der  $k_L a$  wurde im Rührkesselreaktor hinsichtlich des Volumenstroms und der Rührerdrehzahl bestimmt. Im untersuchten Betriebsbereich von 12 bis 36 nl/min konnte im Rührkesselreaktor für eine Rührerdrehzahl von 400 U/min kein signifikanter Einfluss des Volumenstroms auf den  $k_L a$  festgestellt werden. Der  $k_L a$  betrug 294 1/h. Einer Steigerung der

Rührerdrehzahl von 300 auf 500 U/min führte hingegen zu einer Erhöhung des  $k_{La}$  von mehr als 80 % (Abbildung 3-7):

Für die Blasensäule wurde der  $k_{La}$  hinsichtlich des Volumenstroms bestimmt. Es ergab sich mit einer Erhöhung des Volumenstroms von 14 nl/min auf 23 nl/min eine Erhöhung des  $k_{La}$  um 5 %. Von 23 nl/min auf 30 nl/min nahm der  $k_{La}$  jedoch um 35 % (Abbildung 3-8) ab. Hier war bereits ein Bereich erreicht, in dem die erzeugten Blasen kurz nach dem Eintrag in das Medium koagulierten, da sie bei der hohen Blasendichte leicht einen Koagulationspartner fanden. Weil die Größe der Blasen auf diese Weise zunahm, sank die volumenspezifische Stoffaustauschfläche und damit der Sauerstoffeintrag in das System. Verstärkt wurde dieser Effekt durch Zugabe von 0.5 g/l Desmophen 3600 Z (Bayer, Leverkusen), eines Anti-Schaummittels, das die Oberflächenspannung der Flüssigkeit anhub.



**Abbildung 3-7: Abhängigkeit des  $k_{La}$  von der Rührerdrehzahl in Reaktor 1 (Rührkeselreaktor)**

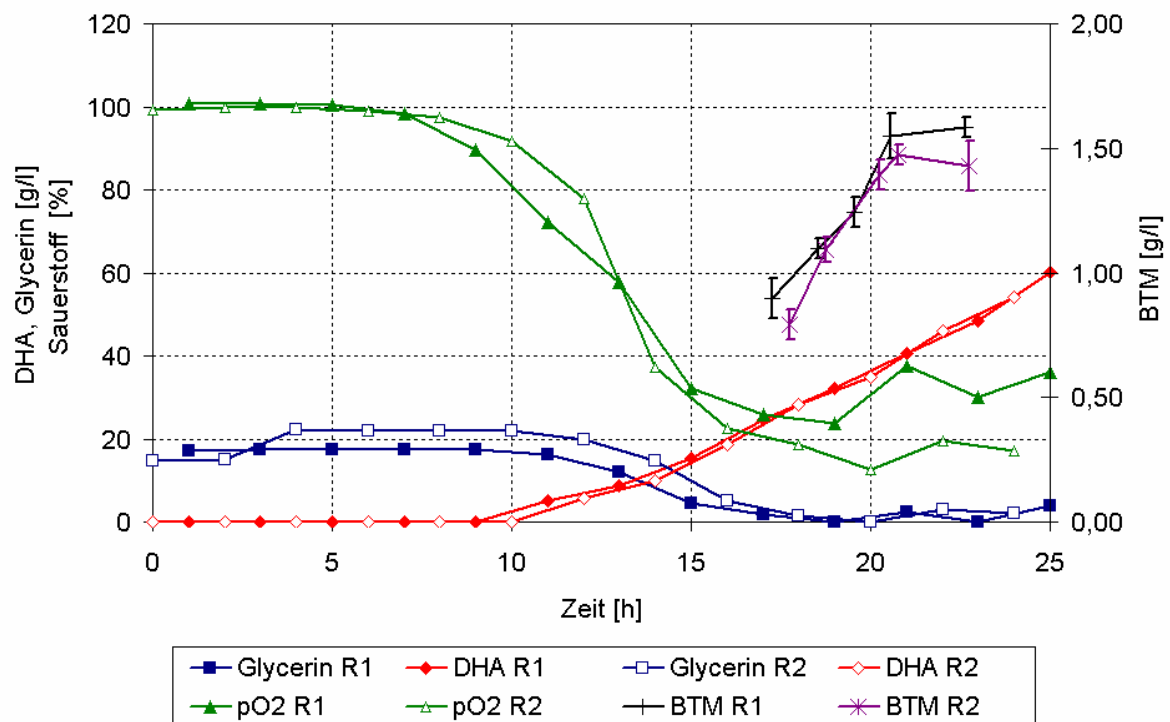


**Abbildung 3-8: Abhängigkeit des  $k_{La}$  vom Volumenstrom in Reaktor 2 (Blasensäule)**

Da eine Erhöhung des Volumenstroms über das Mindestmaß von etwa 12 nl/min keine Erhöhung des  $k_{La}$  mit sich brachte, dafür aber eine stärkere Belastung des Abluftsystems, wurde während der gesamten Kultivierung mit einem Volumenstrom von 15 nl/min in beiden Reaktoren gearbeitet.

### **Reaktorvergleich am Beispiel einer Kultivierung im Zulaufverfahren**

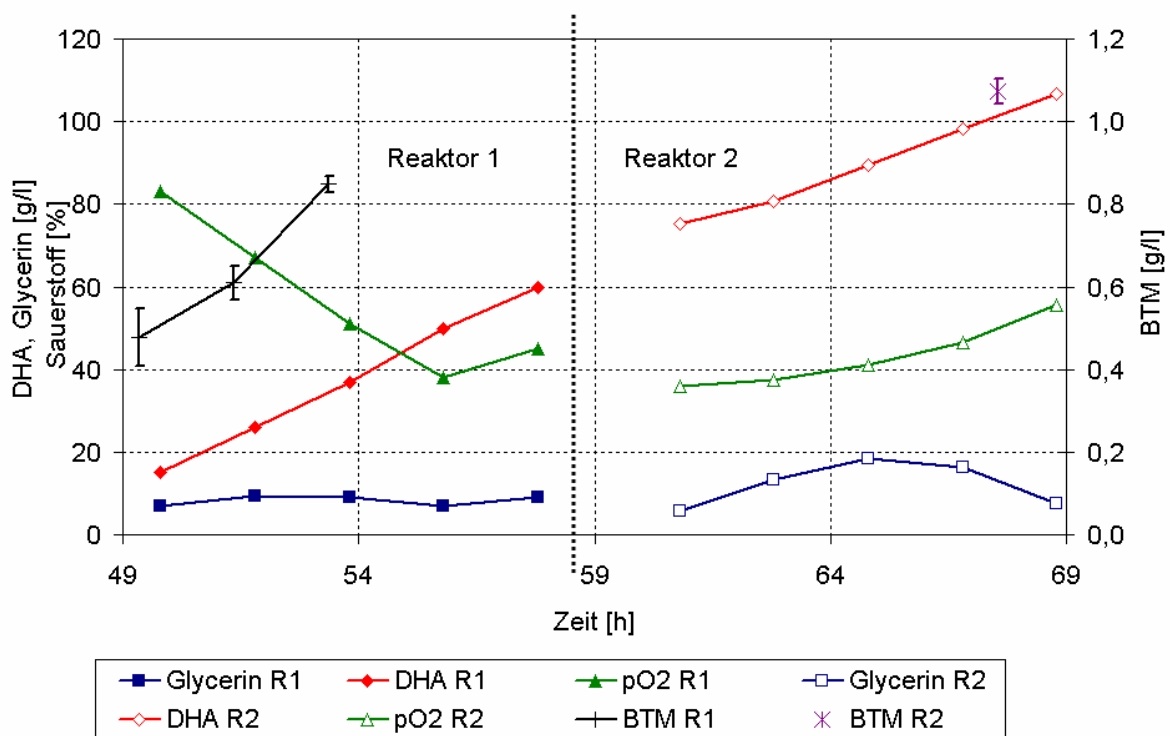
Um den Einfluss der verschiedenen Reaktortypen auf die Kultivierung zu untersuchen, wurde in beiden Reaktoren parallel eine Kultivierung im Zulaufverfahren durchgeführt. Zuerst wurden die Behälter mit denselben Mengen an Nährsalzkonzentrat, VE-Wasser, Desmophen und Glycerin gefüllt. Das Flüssigvolumen betrug in beiden Reaktoren 27 Liter. Der pH wurde in beiden Reaktoren auf 5.3 eingestellt. Die Temperatur betrug 30 °C. Der Anlagenüberdruck betrug 0.2 bar. Der Luft-Volumenstrom betrug im ersten und im zweiten Reaktor 15 nl/min. Die Rührerdrehzahl in Reaktor 1 war auf 400 U/min eingestellt. Zum gleichen Zeitpunkt wurden beide Reaktoren mit einem identischen Volumen von 50 ml einer Schüttelkolbenkultur inokuliert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-9 für eine DHA-Endkonzentration von ca. 60 g/l dargestellt:



**Abbildung 3-9: Konzentrationsverläufe von DHA, Glycerin, Sauerstoff und Biotrockenmasse in Reaktor 1 und Reaktor 2, Zulaufverfahren, zeitgleiche Inokulation**

Die lag-Phasen in Reaktor 1 und Reaktor 2 dauerten ca. 9 - 10 h. Ein möglicher Grund für die Länge der lag-Phase waren das kleine Inokulatsvolumen und die veränderten Kultivierungsbedingungen im Vergleich zum Schüttelkolben, an die sich die Kultur erst anpassen musste. Glycerin wurde erstmalig nach ca. 10 Stunden umgesetzt. Nach ca. 18 h trat eine Glycerinlimitation auf, da die Zufütterungsraten für Glycerin in beiden Reaktoren zu niedrig angesetzt wurden. Der Sauerstoffgehalt in der Lösung sank in Reaktor 2 weiter ab als in Reaktor 1. Der Grund für den stärkeren Abfall war der niedrigere  $k_L a$  von  $190 \text{ h}^{-1}$  im Reaktor 2, während er im Reaktor 1  $290 \text{ h}^{-1}$  betrug. Die Biomassekonzentrationen wurden erst 17 h nach der Inokulation gemessen und verliefen in Reaktor 1 äquivalent zu Reaktor 2. Die Verläufe der Produktbildung waren annähernd parallel. Im Reaktor 1 wurde eine Produktbildungsrate von  $3.92 \text{ g/(lh)}$  festgestellt, im Reaktor 2 ein Wert von  $4.02 \text{ g/(lh)}$ . Diesbezüglich sind daher die beiden Reaktoren gut vergleichbar.

In einem zweiten Schritt wurde überprüft, ob ein Umpumpen des Reaktorinhaltes von R1 in R2 eine Beeinträchtigung der Kultur mit sich brachte. Beispielhaft wurde der vierte Zyklus des Referenzlaufes im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren für diesen Vorgang in Abbildung 3-10 betrachtet.



**Abbildung 3-10: Konzentrationsverläufe von DHA, Glycerin Sauerstoff und Biotrockenmasse in Reaktor 1 und 2, zweistufiges zyklisch betriebenes Zulaufverfahren, Zyklus Nr. 4 des Referenzlaufes**

Die Messdaten aus Reaktor 2 setzten die Tendenzen aus Reaktor 1 fort. Einzige Ausnahme war der Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration aufgrund des niedrigeren  $k_L a$  in Reaktor 2. Hier waren direkt nach dem Chargenwechsel die in Reaktor 2 gemessenen Werte niedriger als in Reaktor 1, aber dennoch nicht so niedrig, um limitierend zu wirken. Das Umpumpen des Inhaltes von Reaktor 1 nach Reaktor 2 beeinträchtigte demnach die Kultur nicht messbar.



## 4 Ergebnisse und Diskussion

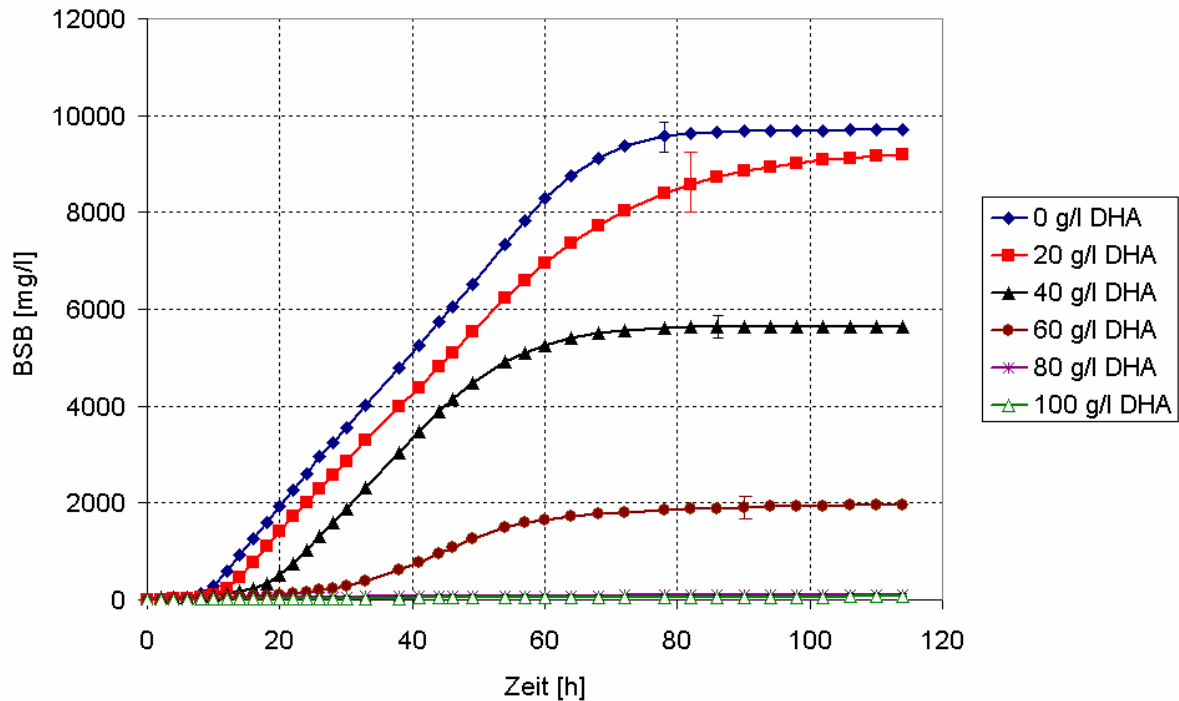
### 4.1 Einfluss von Dihydroxyaceton auf das Wachstum und die Produktbildung von *Gluconobacter oxydans*

Der Einfluss von DHA auf *Gluconobacter oxydans* wurde bereits von vielen Arbeitsgruppen untersucht, wie im Kapitel 2.1.3 beschrieben. Aus den Ergebnissen der einzelnen Arbeitsgruppen ließ sich entnehmen, dass die Inhibition mit steigender DHA-Konzentration zunahm und die Kultur bis zu einer DHA-Konzentration von 60 bis 120 g/l wachstumsfähig war. Eine Produktbildung wurde jedoch auch darüber hinaus beobachtet [Bories et al., 1991; Ohrem et al., 1996]. Die Produktbildung ließ sich somit in einen wachstumsabhängigen und einen wachstumsunabhängigen Abschnitt unterteilen. Über die Regenerationsfähigkeit der Organismen, die hohen DHA-Konzentrationen ausgesetzt waren, war allerdings nichts bekannt. Neben der DHA-Konzentration als Absolutwert war das Zeitfenster, während dem die Kultur einer bestimmten DHA-Konzentration ausgesetzt war, von entscheidender Bedeutung. Diesbezüglich ließen sich jedoch in der Literatur nur unzureichende Informationen finden. Da diese Punkte im Hinblick auf die Simulation semikontinuierlicher Verfahren von entscheidender Bedeutung waren, wurden sie in dieser Arbeit mit einer Kombination aus Versuchen im Labor und Technikumsmaßstab, Schüttelkolbenversuchen und Sapromatenversuchen detailliert untersucht. Begleitend zu diesen Untersuchungen wurde mit Hilfe des FISH-Tests und der DAPI-Messmethode der Zustand der Biomasse genauer bestimmt.

#### 4.1.1 Untersuchung des DHA-Einflusses auf die Wachstumsfähigkeit der Kultur mit Hilfe des Sapromats

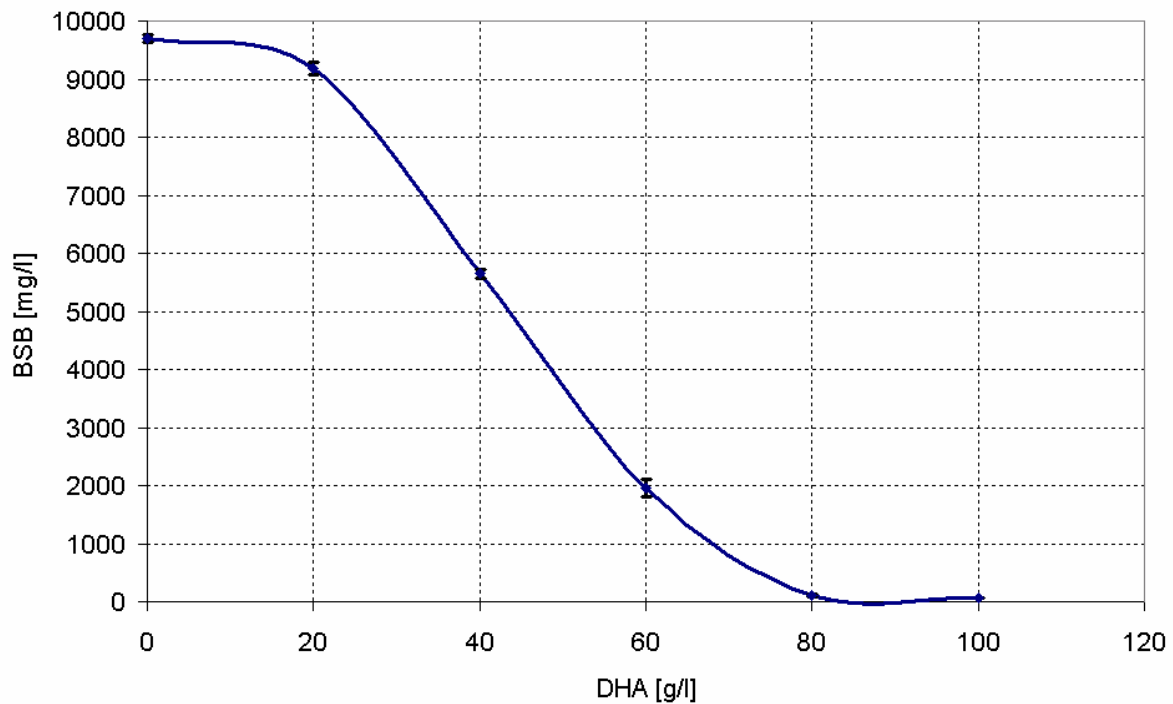
In einer ersten Versuchsreihe wurde die Wachstumsfähigkeit der Kultur in Abhängigkeit von der DHA-Konzentration bestimmt. Dazu wurden im Sapromat sechs unterschiedliche DHA-Konzentrationen in einem Bereich von 0 g/l bis 100 g/l DHA in einem Sorbitmedium eingestellt und diese mit einer in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Sorbitkultur angeimpft. Zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit lag sämtlichen Versuchen eine Doppelbe-

stimmung zugrunde. In Abbildung 4-1 ist der zeitliche Verlauf des BSB-Bedarfes der Kultur dargestellt.



**Abbildung 4-1: Biochemischer Sauerstoffbedarf aufgetragen gegen die Versuchszeit in Abhängigkeit von der DHA-Konzentration bei Versuchen im Sapromat (gemittelte Werte)**

Die Ergebnisse der Experimente mit dem Sapromat belegen die Wachstumsinhibierung durch den Einfluss von DHA auf die Organismen. Aus Abbildung 4-1 geht hervor, dass mit steigender DHA-Konzentration die lag-Phase zunahm und der erreichte BSB-Endwert abnahm. Ab einer DHA-Konzentration von 80 g/l kam schließlich die Atmungsaktivität der Kultur vollständig zum Erliegen. In Abbildung 4-2 ist der BSB-Endwert gegen die eingestellte DHA-Konzentration aufgetragen.



**Abbildung 4-2: Biochemischer Sauerstoffbedarf nach 110 Stunden bei Versuchen im Sapromat aufgetragen gegen die DHA-Konzentration im Medium (gemittelte Werte)**

Aus Abbildung 4-2 ist ersichtlich, dass ab einer DHA-Konzentration von 70 bis 80 g/l die Atmungsaktivität von *Gluconobacter oxydans* zum Erliegen kam. *Gluconobacter oxydans* benötigt die Umsetzung von Glycerin zu DHA für die Energiegewinnung. Dabei dient Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Verbraucht die Kultur keinen Sauerstoff, so kann die für das Wachstum benötigte Energie nicht bereitgestellt werden. Da *Gluconobacter oxydans* ein strikt aerobes Bakterium ist, war deshalb ab dieser Konzentration auch kein Wachstum mehr möglich. Dieses Ergebnis stimmte mit den in der Literatur angegebenen und in Kapitel 2.1.3 zusammengefassten Werten überein.

#### 4.1.2 Untersuchung von Schüttelkolbenproben im Sapromat

In einer zweiten Versuchsreihe wurden in einer Schüttelkolbenkultur, welche sich in der exponentiellen Wachstumsphase befand, schlagartig DHA-Konzentrationen von 100 g/l und 130 g/l eingestellt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben gezogen und damit Sapromatzellen, welche ein Sorbitmedium enthielten, angeimpft. In der Abbildung 4-3 und

Abbildung 4-4 sind die zeitlichen Verläufe der BSB-Summenkurven für DHA-Konzentrationen von 100 g/l und 130 g/l dargestellt.

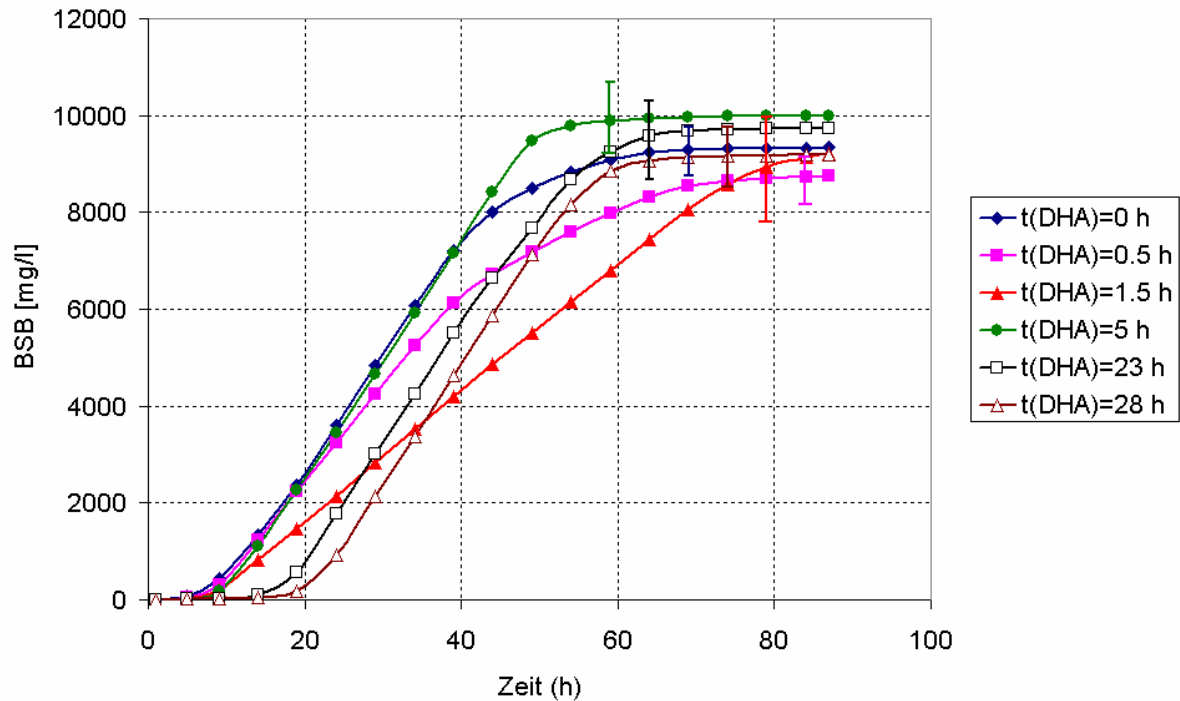
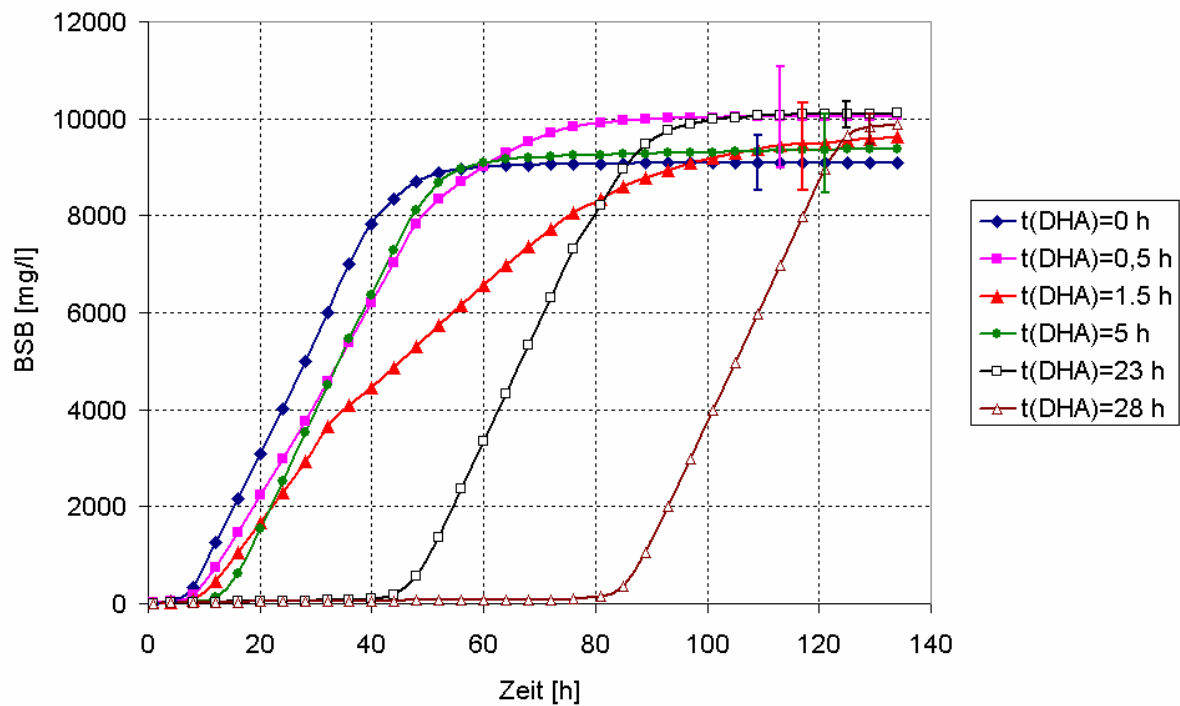
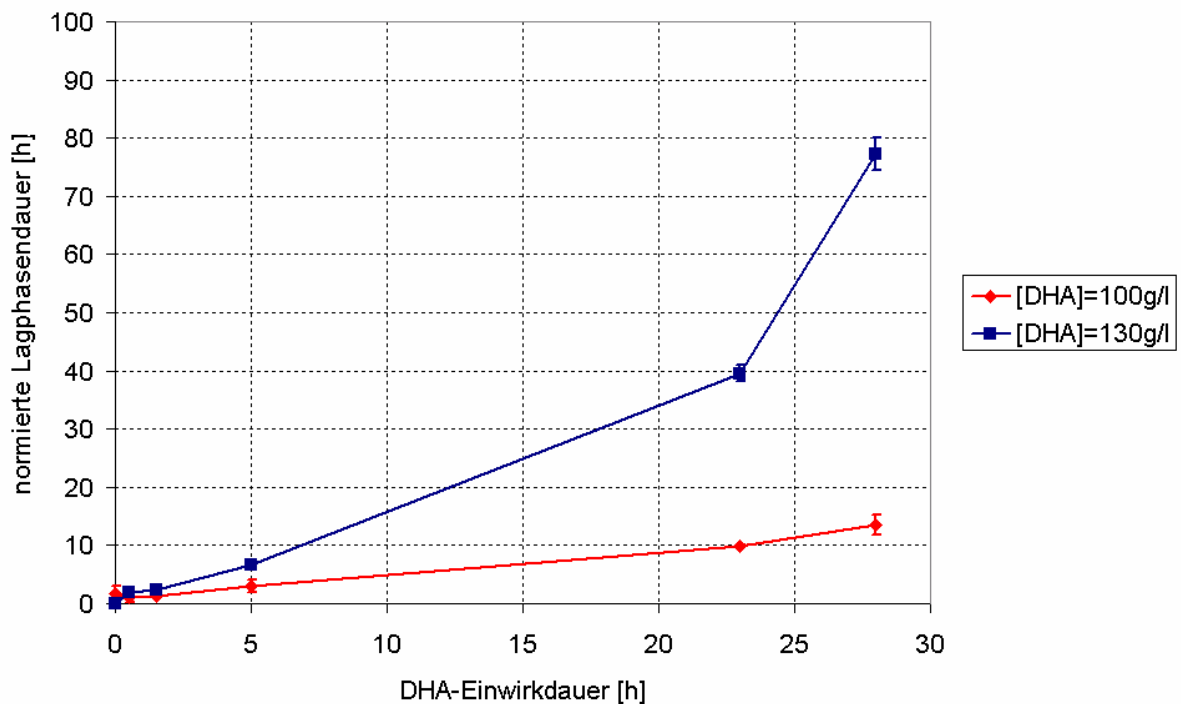


Abbildung 4-3: Zugabe von 100 g/l DHA im Schüttelkolben und Probennahme nach 0, 0.5, 1.5, 5, 23 und 28 h mit anschließender Analyse der Probe im Sapromat (gemittelte Messwerte)



**Abbildung 4-4: Zugabe von 130 g/l DHA im Schüttelkolben und Probennahme nach 0, 0,5, 1,5, 5, 23 und 28 h mit anschließender Analyse der Probe im Sapromat (gemittelte Werte)**

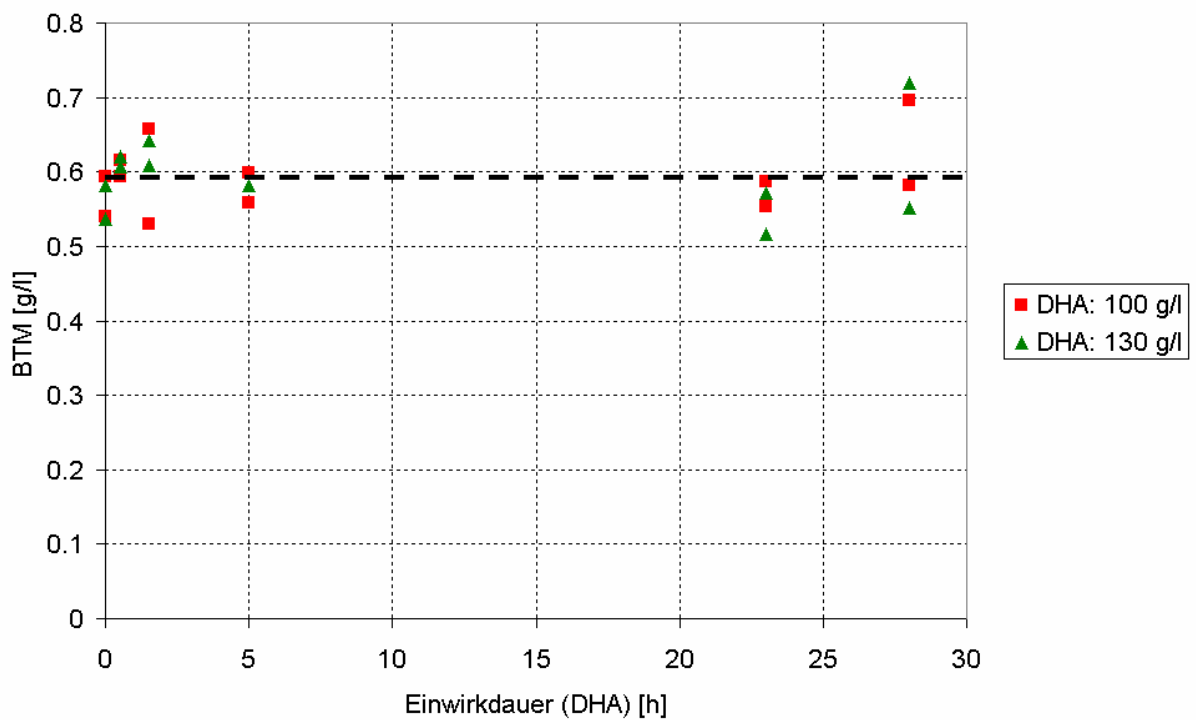
Es ist ersichtlich, dass mit höher werdender DHA-Einwirkdauer die Lagphase in beiden Versuchsreihen anstieg. In Abbildung 4-5 sind die auf  $t(\text{DHA}) = 0$  h normierten Lagphasen gegen die Einwirkdauer aufgetragen.



**Abbildung 4-5: Auftragung der normierten Lagphasendauer aus den in den Abbildungen 4-3 und 4-4 dargestellten Versuchen gegen die DHA-Einwirkdauer**

Der Anstieg der Lagphase mit höher werdender Einwirkdauer lässt sich wie folgt begründen: Durch die Zugabe von 100 bzw. 130 g/l DHA war die Kultur im Schüttelkolben nicht mehr in der Lage, zu wachsen. Der physiologische Zustand verschlechterte sich und die intakte Biomasse im Schüttelkolben nahm somit mit steigender DHA-Einwirkdauer ab. Die im Inokulat des Sapromatgefäßes enthaltene intakte Biomasse wurde demnach mit steigender Einwirkdauer kleiner. Somit nahm die Lagphase im Sapromat zu. Aus Abbildung 4-5 ist ersichtlich, dass die Lagphase nicht nur mit der DHA-Einwirkdauer sondern auch bei der höheren DHA-Konzentration von 130 g/l deutlich größer wurde.

Aus Abbildung 4-3 und Abbildung 4-4 geht zudem hervor, dass sämtliche untersuchte Proben ähnliche BSB-Endwerte erreichten und vergleichbare Atmungsaktivitäten besaßen. Die Messung der BTM-Endwerte im Sapromat ergab, dass trotz unterschiedlicher Einwirkdauern und DHA-Konzentrationen ähnliche BTM-Endwerte erreicht wurden ( Abbildung 4-6 ).



**Abbildung 4-6: Endwerte der Biotrockenmasse im Sapromat aufgetragen gegen die Einwirkdauer (100 g/l und 130 g/l DHA im Schüttelkolben)**

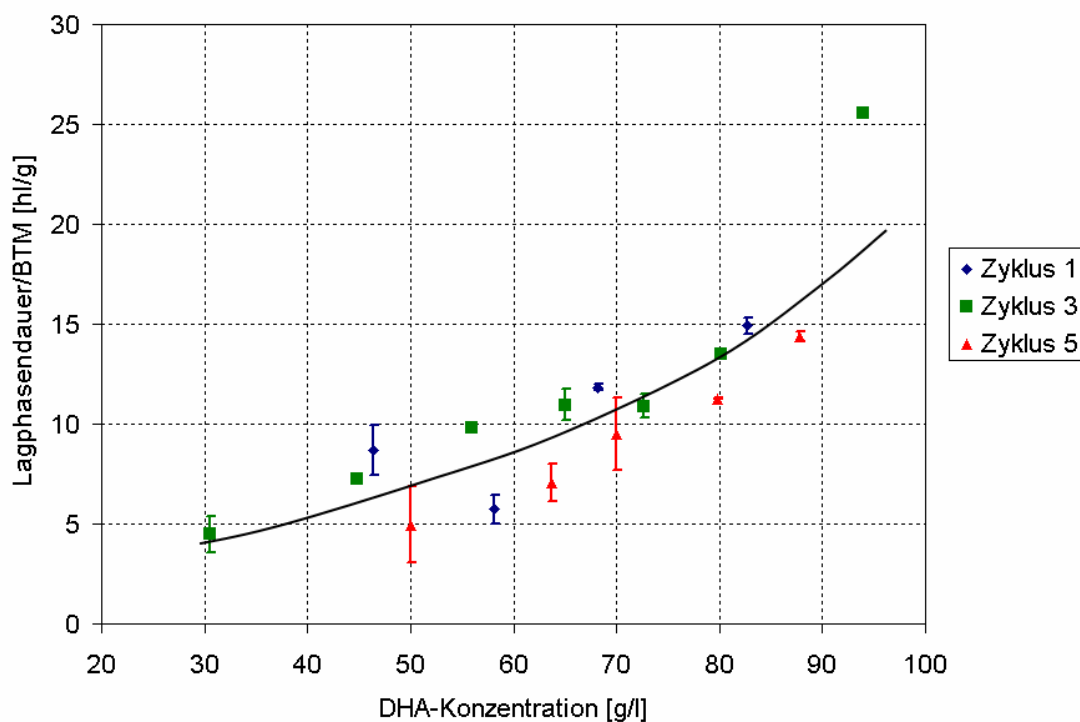
In Tabelle 4-1 sind die BSB- und BTM-Endwerte noch einmal zusammengefasst. Gleicher BSB-Endverbrauch und gleiche Biotrockenmasseendkonzentration ließen im untersuchten Bereich auf eine vollständige Regenerationsfähigkeit der Kultur schließen. Es konnte also angenommen werden, dass die Kultur trotz unterschiedlicher Lagphasendauer im untersuchten Bereich nicht irreversibel geschädigt wurde und vollständig regenerationsfähig war.

**Tabelle 4-1: Gemittelte BSB- und BTM-Endwerte**

DHA-Konzentration	BSB-Endwert [mg/l]	BSB-Standardabweichung [mg/l]	BTM-Endwert [g/l]	BTM-Standardabweichung [g/l]
100 g/l	9370	442	0.59	0.03
130 g/l	9695	400	0.58	0.04

### 4.1.3 Untersuchung von Proben aus der zweistufigen Technikumsanlage und dem Laborblasensäulenreaktor im Sapromat

In weiteren Versuchsreihen wurde nun geklärt, in welchem DHA-Konzentrationsbereich die Kultur während eines Laufes im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren noch regenerationsfähig war und mit welchen Lagphasen nach einem Chargenwechsel zu rechnen war. Zu unterschiedlichen Läufen wurden deshalb Proben aus dem zweistufigen Technikumsbetrieb gezogen und damit ein Sorbitmedium im Sapromat angeimpft. Es zeigte sich, dass mit steigender DHA-Konzentration die, auf die in der Probe enthaltene Biotrockenmasse bezogene Lagphase zunahm. Die BSB- und BTM-Endkonzentration waren hingegen nahezu identisch. In Abbildung 4-7 ist das Ergebnis für die untersuchten Proben aus den Läufen des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens der Technikumsanlage dargestellt.



**Abbildung 4-7: Analyse von Proben aus dem ersten, dritten und fünften Zyklus aus dem Referenzlauf (Abbildung 4-18) der Technikumsanlage mit dem Sapromat. Auftragung der auf die BTM bezogene Lagphasendauer gegen die DHA-Konzentration**

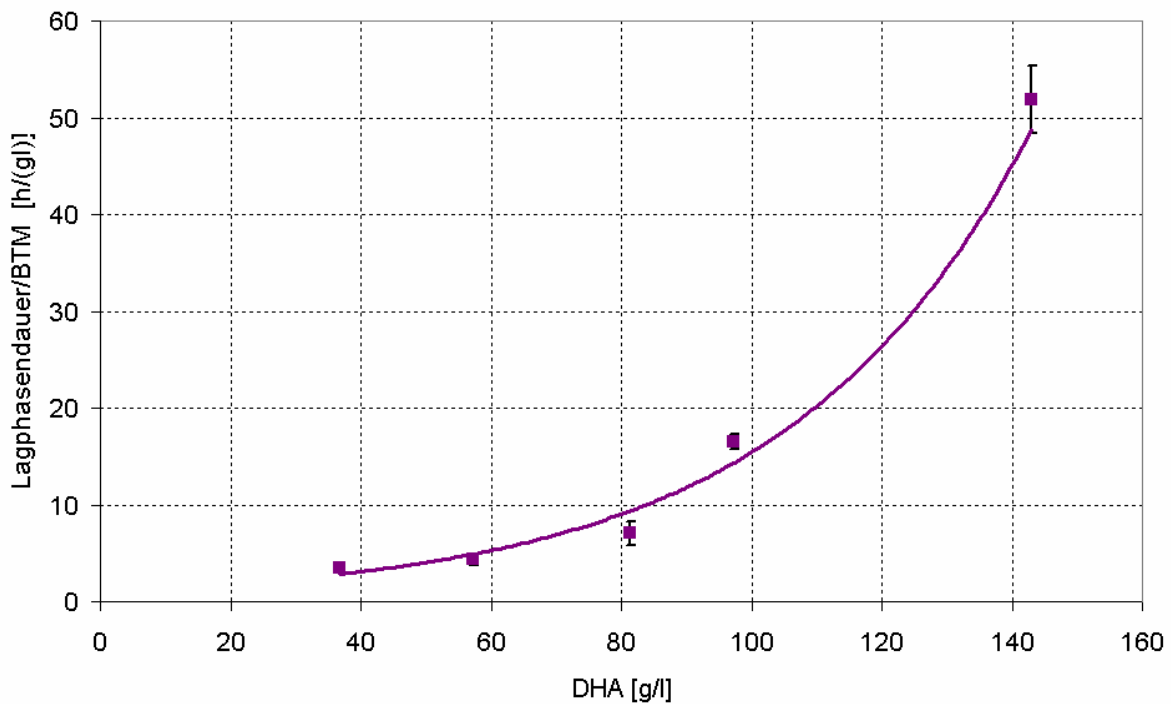
Um über den kompletten DHA-Konzentrationsbereich Aussagen treffen zu können, wurden aus einem im Zulaufverfahren betriebenen Lauf im Laborreaktor zu unterschiedlichen DHA-



Konzentrationen Proben gezogen und diese im Sapromat auf einem Sorbitmedium untersucht. Auch hier zeigte sich, dass die BTM-spezifische Lagphase mit steigender DHA-Konzentration exponentiell zunahm. Zudem stellte sich heraus, dass die Kultur ab einer DHA-Konzentration von 150 g/l nicht mehr regenerationsfähig war. In Abbildung 4-8 und in Tabelle 4-2 sind diese Ergebnisse zusammengefasst dargestellt.

**Tabelle 4-2: Zusammenfassung der Analyse von Proben aus dem Laborreaktor (Zulaufverfahren) mit unterschiedlichen DHA-Konzentrationen im Sapromat**

DHA-Konzentration [g/l]	Lagphasendauer/BTM [h/(g/l)]
36.7	$3.5 \pm 0.1$
57.2	$4.3 \pm 0.6$
81.3	$7 \pm 1.2$
97.3	$16.6 \pm 0.7$
143	$51.9 \pm 3.4$
150.7	$\infty$
165.2	$\infty$
188.4	$\infty$
193.8	$\infty$

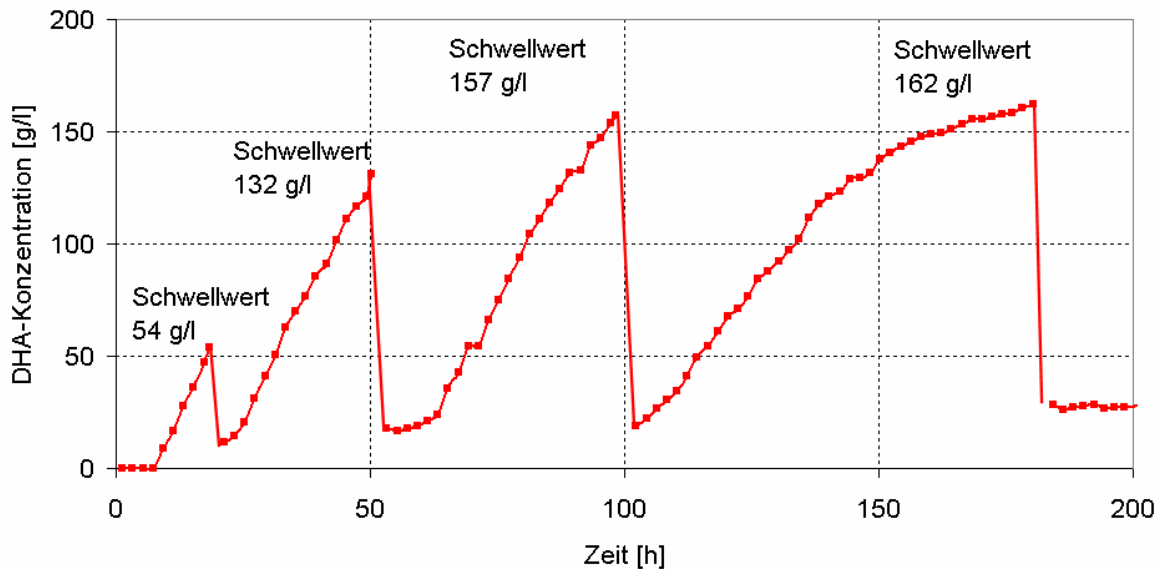


**Abbildung 4-8: Bestimmung der BTM-spezifischen Lagphasedauer von Proben aus dem Laborreaktor (Zulaufverfahren) in Abhängigkeit der DHA-Konzentration im Sapromat**

#### 4.1.4 Schwellwertuntersuchungen im Laborreaktor

In weiteren Versuchsreihen im Laborreaktor wurden die mit Hilfe des Sapromat gewonnenen Ergebnisse untermauert. Dazu wurden im einstufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren verschiedene DHA-Schwellwerte angefahren und überprüft, ob die Kultur regenerationsfähig war oder nicht. In Abbildung 4-9 sind die Messungen zum DHA-Schwellwert aufgetragen. Die ersten Messungen der DHA-Konzentration unmittelbar nach den Chargenwechseln zeigten einen zu hohen Wert auf. Dies hatte seine Ursache im memory-Effekt der HPLC-Analytik. Auf eine Darstellung dieser Messwerte wurde deshalb verzichtet. Beginnend bei einem niedrigen DHA-Schwellwert von 54 g/l wurde dieser sukzessive auf 162 g/l erhöht. Es stellte sich heraus, dass die Kultur bei einem DHA-Schwellwert von 157 g/l zwar noch regenerationsfähig, die Produktivität im darauf folgenden Zyklus aber wesentlich schlechter war. Auffällig war, dass nach dem Chargenwechsel bei einem DHA-Schwellwert von 157 g/l keine Lagphase auftrat. Die Ursache hierfür blieb unbekannt. Nach dem Erreichen eines Schwellwertes von 162 g/l konnte sich die Kultur nicht mehr regenerieren. Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem DHA-Schwellwert von 150 g/l aus den Sapromatversuchen, so lässt sich fest-

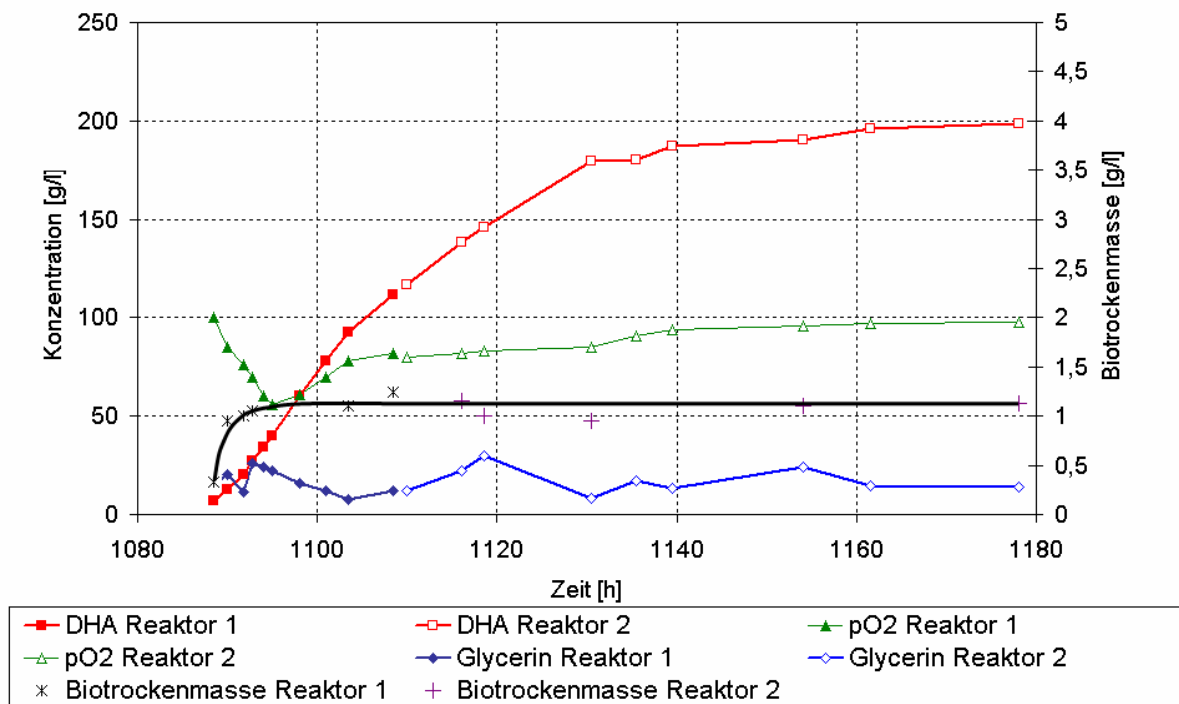
stellen, dass die Grenze für die Regenerationsfähigkeit der Zellen im Bereich von 150 bis 160 g/l DHA liegt.



**Abbildung 4-9: Untersuchungen zum DHA-Schwellwert im Laborblasensäulenreaktor im einstufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren**

#### 4.1.5 Untersuchung der Zellaktivität

In Abbildung 4-10 ist ein Lauf aus dem zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren der Technikumsanlage dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die gemessene Biotrockenmasse nach dem Ende der Wachstumsphase einen konstanten Wert von ca. 1.1 g/l erreichte. Die Produktbildung lässt sich folglich in einen wachstumsabhängigen und einen wachstumsunabhängigen Teil aufteilen. Aus dem Kapitel 4.1.3 ist bekannt, dass *Gluconobacter oxydans* ab 160 g/l DHA irreversibel geschädigt ist und noch bis ca. 220 g/l DHA bilden kann. Daher ist ersichtlich, dass die BTM-Bestimmung über OD-Messung (Streulichtmessung) ein stark verfälschtes Ergebnis lieferte und keine Aussage über den wahren physiologischen Zustand der Kultur getroffen werden konnte. Um feststellen zu können, in welchem Zustand sich die Zellen befanden und wie viel intakte Biomasse bei einer bestimmten DHA-Konzentration noch vorhanden war, wurde deshalb auf die molekularbiologischen Methoden der DAPI Färbung und der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) zurückgegriffen.



**Abbildung 4-10: Lauf aus dem zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren der Technikumsanlage nach einer Betriebszeit von 1090 h**

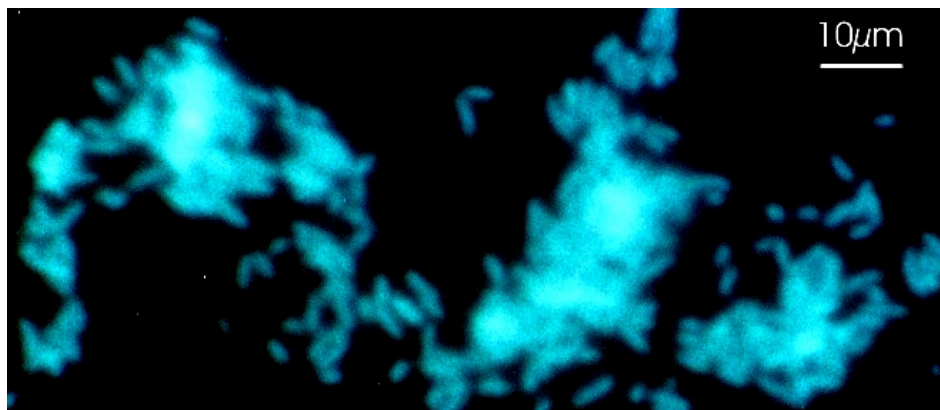
Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde der DAPI-Test (4',4'-Diamidino 2-phenylindol-dihydrochlorid) verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet bevorzugt an Adenin-Thymin-reiche Regionen der DNA. Es handelt sich dabei um einen häufig eingesetzten Standardtest zur Bestimmung der Gesamtzellzahl.

Die aktiven Zellen wurden in dieser Arbeit mit der Methode der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) bestimmt. Eine genaue Beschreibung zur Durchführung der Methode findet sich in Kapitel 3.3.3. Dabei hybridisiert die fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonde EUB 338 mit einem spezifischen Abschnitt der bakteriellen ribosomalen RNA. Die ribosomale RNA dient den Zellen zur Herstellung wichtiger Proteine. Deshalb korreliert der Ribosomengehalt bei Standardbedingungen mit der Wachstumsgeschwindigkeit bzw. der Stoffwechselaktivität von Zellen [De Long et al.,1989; Wallner et al.,1993]. So können mit Hilfe des FISH-Tests allgemeine Informationen über den physiologischen Zustand der Zellen gewonnen werden [Amann et al., 1990].

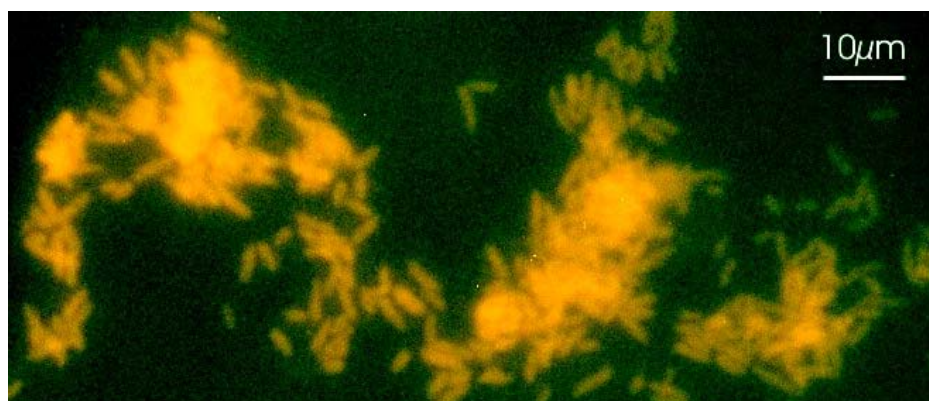
FISH- und DAPI-Tests sollten nun in weiteren Versuchen Aufschluss darüber bringen, inwieweit DHA die Kultur schädigt. Hierfür wurden während eines Laufes im Zulaufverfahren aus dem Laborreaktor Proben bei 90 g/l, 150 g/l und 200 g/l mit Hilfe des FISH-Tests auf ihre

aktive Zellzahl und mit Hilfe des DAPI-Tests auf die Gesamtzellzahl hin untersucht. Der Probenbereich wurde so ausgewählt, dass er den für die Schädigung der Kultur interessanten Bereich abdeckte. Die Proben mit einer DHA-Konzentration von 150 und 200 g/l stammten aus dem gleichen Lauf, die Probe mit 90 g/l hingegen aus einem anderen Lauf.

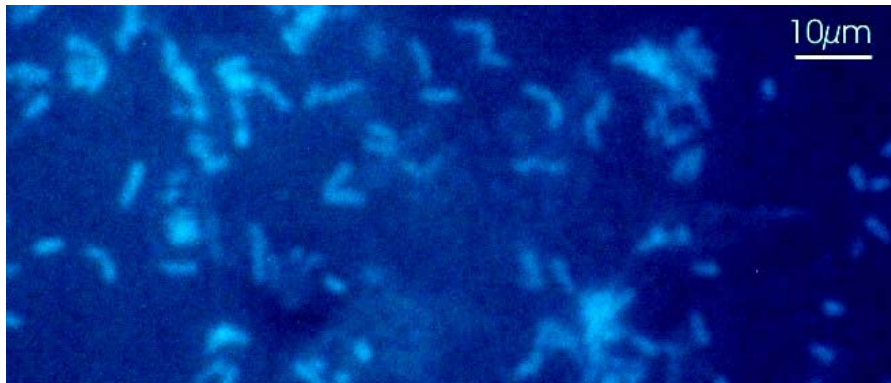
In Abbildung 4-11 bis 4-14 sind die Ergebnisse für den FISH- und DAPI-Test für eine Produktkonzentration von 90 und 150 g/l dargestellt.



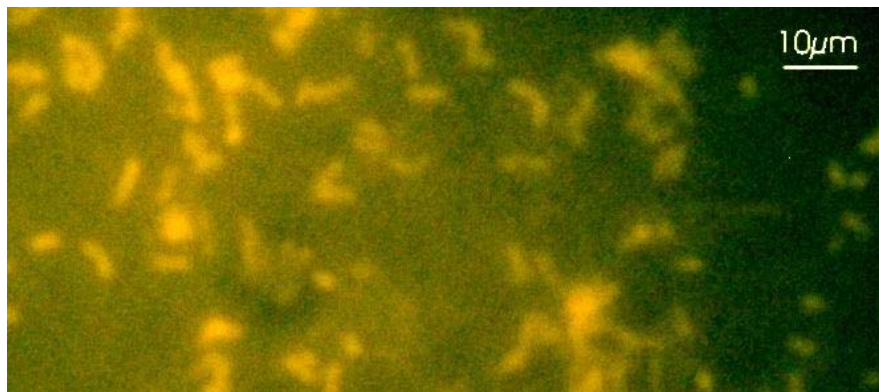
**Abbildung 4-11: Analyse der Gesamtzellzahl einer Probe von 20 ml aus einem Lauf im Zulaufverfahren aus dem Laborblasensäulenreaktor für eine DHA-Konzentration von 90 g/l mittels DAPI-Test**



**Abbildung 4-12: Analyse der Anzahl an aktiven Zellen einer Probe von 20 ml aus einem Lauf im Zulaufverfahren aus dem Laborblasensäulenreaktor für eine DHA-Konzentration von 90 g/l mittels FISH-Test**



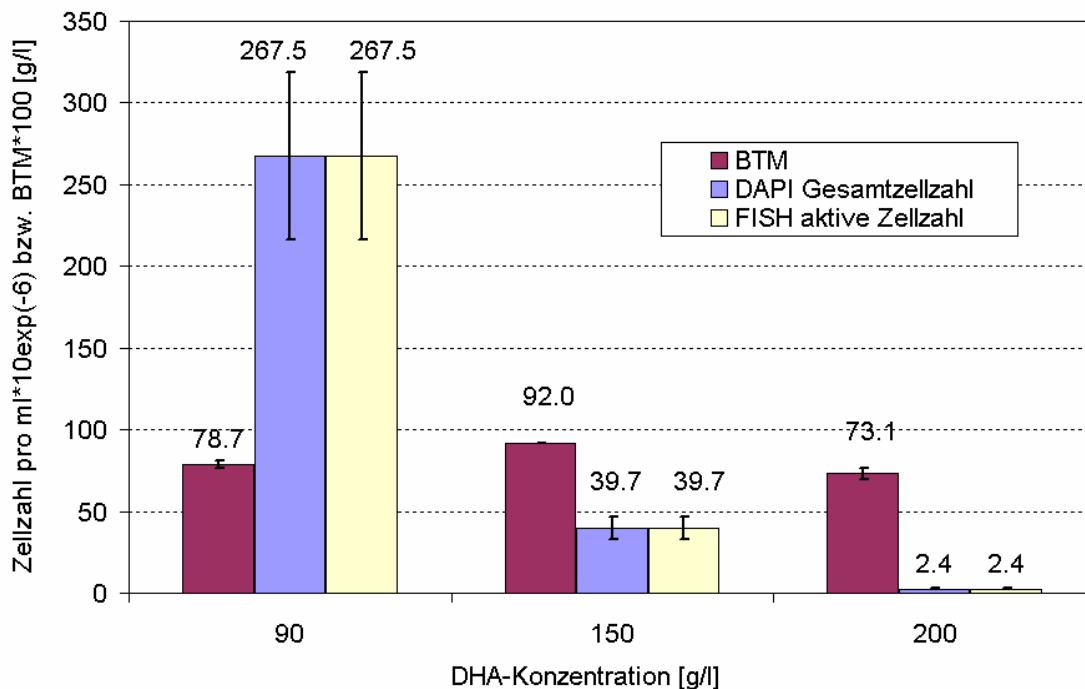
**Abbildung 4-13: Analyse der Gesamtzellzahl einer Probe von 20 ml aus einem Lauf im Zulaufverfahren aus dem Laborblasensäulenreaktor für eine DHA-Konzentration von 150 g/l mittels DAPI-Test**



**Abbildung 4-14: Analyse der Anzahl an aktiven Zellen einer Probe von 20 ml aus einem Lauf im Zulaufverfahren aus dem Laborblasensäulenreaktor für eine DHA-Konzentration von 150 g/l mittels FISH-Test**

Da sowohl FISH als auch DAPI die gleiche Fluoreszenzintensität besaßen, ließ sich daraus schließen, dass alle Zellen die gleiche Aktivität besaßen und deshalb die Gesamtzellzahl der aktiven Zellzahl entsprach. Für eine Produktkonzentration von 200 g/l konnten hingegen keine intakten Zellen mehr detektiert werden (nicht dargestellt). Zudem konnte beobachtet werden, dass eine steigende DHA-Konzentration zu einem stärkeren Hintergrundleuchten und zu einer Abnahme des Kontrastes führte (Abbildung 4-11 bis Abbildung 4-14). Eine mögliche Ursache dafür ist, dass mit steigender DHA-Konzentration die als Lyseprodukte in der Kulturbrühe angefallene und noch nicht vollständig zersetzte DNA und RNA zunahm und durch den DAPI- und FISH-Test in Form eines stärkeren Hintergrundleuchtens erfasst wurde.

Die Auszählung der Proben ergab, dass im untersuchten Bereich von 90 g/l bis 200 g/l die Zellzahl abnahm. In Abbildung 4-15 ist das Ergebnis der Auszählung für die beiden Fluoreszenzmethoden, verglichen mit der gemessenen BTM, dargestellt. Die Anzahl der in der Thoma-Kammer mit FISH und DAPI detektierten Zellen nahm deutlich mit steigender DHA-Konzentration ab. Die photometrisch bestimmte BTM blieb hingegen annähernd konstant. Mit Hilfe des FISH- und DAPI-Tests konnten also intakte Zellen auf dem Objektträger markiert und detektiert werden. Mit Hilfe der photometrisch bestimmten BTM konnte hingegen nicht zwischen intakten Zellen, Zelltrümmern und anderen makromolekularen Lyseprodukten unterschieden werden.



**Abbildung 4-15: BTM, Gesamtzellzahl und aktive Zellzahl in Abhängigkeit von der DHA-Konzentration**

Über den in Abbildung 4-10 dargestellten Lauf im Zulaufverfahren lässt sich also feststellen, dass die intakten Zellen in Reaktor 2 bis ca. 150 g/l sukzessiv abnahmen. Ab 150 g/l war die Biomasse irreversibel geschädigt und nicht mehr teilungsfähig, die Produktbildung war dennoch bis 200 g/l aktiv.

#### 4.1.6 Zusammenfassung der reaktionskinetischen Untersuchungen

Die Ergebnisse der reaktionskinetischen Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die Regenerationsfähigkeit<sup>2</sup> einer Kultur wird durch die Höhe und die Zeitdauer der DHA-Belastung bestimmt. Das Zeitfenster der Regenerationsfähigkeit ist dabei dynamisch und hängt von der Höhe der DHA-Belastung ab. Ist die Kultur einer hohen DHA-Belastung ausgesetzt, so ist das Zeitfenster der Regenerationsfähigkeit entsprechend kürzer als bei einer niedrigen DHA-Belastung. Aus Abbildung 4-5 (S. 73) ist anhand der länger werdenden Lag-Phasen ersichtlich, dass sich der physiologische Zustand der Zellen mit zunehmender Zeitdauer und Höhe der DHA-Belastung verschlechterte. Über die zyklische, mit zunehmender Prozessdauer steigende DHA-Belastung, wie sie bei semikontinuierlichen Verfahren auftritt, ergab sich:

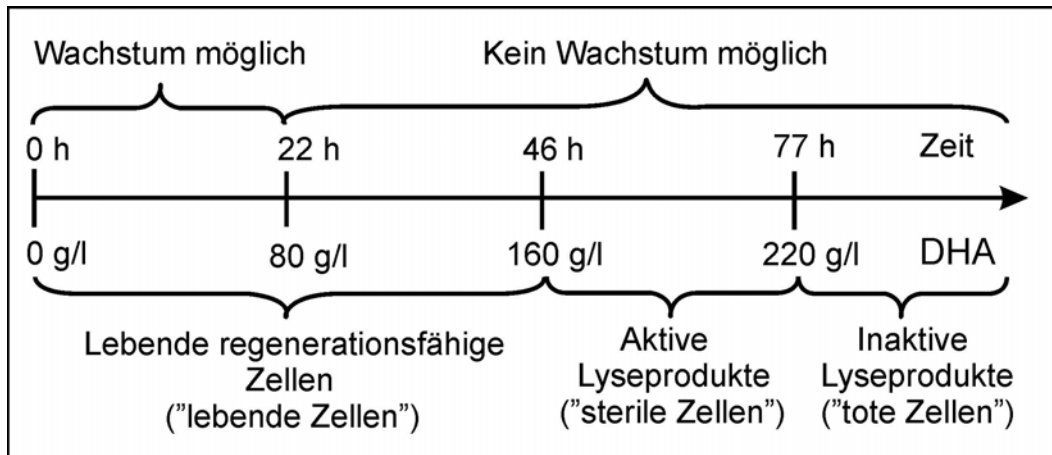
Bis zu einer DHA-Konzentration von 80 g/l war *Gluconobacter oxydans* in der Lage, zu wachsen (Abbildung 4-2, S. 70). Mit steigender DHA-Konzentration verlor die Kultur aber mehr und mehr ihre Fähigkeit zur Zellteilung. Ab 80 g/l DHA war die Produktinhibierung so stark, dass die Biomasse nicht weiter zunahm und konstant blieb. Bis zu einer DHA-Konzentration von 160 g/l war die Kultur regenerationsfähig, allerdings nahm mit zunehmender Einwirkdauer und DHA-Konzentration die Menge an regenerationsfähigen Zellen in der Kulturbrühe ab (Abbildung 4-15, S. 82). Ab einer DHA-Konzentration von 160 g/l waren die Zellen irreversibel geschädigt und nicht mehr regenerationsfähig (Abbildung 4-9, S. 78). In den Lyseprodukten waren die membrangebundenen Dehydrogenasen weiterhin intakt und in der Lage, Glycerin in DHA umzusetzen. Diese aktiven Lyseprodukte wurden als „sterile Zellen“ bezeichnet. Ab 220 g/l DHA lagen nur noch inaktive Lyseprodukte vor. Unter inaktiven Lyseprodukten sind Zelltrümmer und Zellysate zu verstehen, die das Licht streuen, also durch die OD-Messung erfasst werden, aber keine intakten membrangebundenen Dehydrogenasen mehr aufweisen. In Anlehnung an Ohrem [1994] wurde dieser Zustand als „tote Zellen“ bezeichnet. Die Unterteilung in drei Zellklassen darf allerdings nur als starke Vereinfachung gesehen werden. In Wirklichkeit existieren zusätzlich dynamische Übergangszustände zwischen den genannten Zelltypen. In Abbildung 4-16 sind die für das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren relevanten DHA-Konzentrationen und Zeitfenster für den Laborre-

---

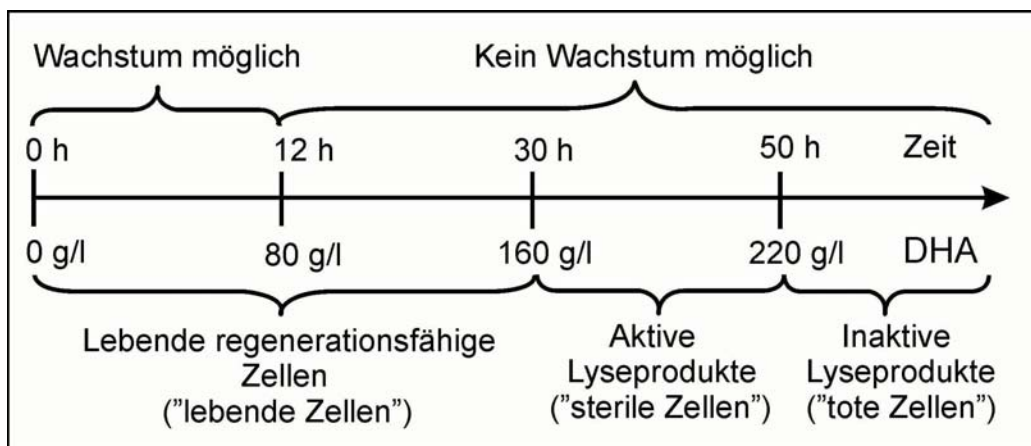
<sup>2</sup> Unter regenerationsfähigen Zellen werden vitale und teilungsfähige Zellen verstanden, die durch die DHA-Inhibition noch nicht irreversibel geschädigt wurden.



aktorbetrieb zusammengefasst. Die Zeitfenster im Technikumsbetrieb waren hingegen kürzer (Abbildung 4-17). Die Daten zur Ermittlung der Zeitfenster stammen aus Abbildung 4-32 (Laborreaktoranlage) und Abbildung 4-29 (Technikumsanlage). Die Ursachen für die unterschiedlichen Zeitfenster sind in der Bauart und dem Dimensionsunterschied zwischen dem Laborreaktor und der Technikumsanlage zu finden.



**Abbildung 4-16: Zustand der *Gluconobacter oxydans* - Zellen in der Laborreaktoranlage im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren in Abhängigkeit von der DHA-Konzentration**



**Abbildung 4-17: Zustand der *Gluconobacter oxydans* - Zellen in der Technikumsanlage im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren in Abhängigkeit von der DHA-Konzentration**

## 4.2 Ergebnisse der Versuche mit den zweistufigen Technikums- und Laborreaktoranlagen

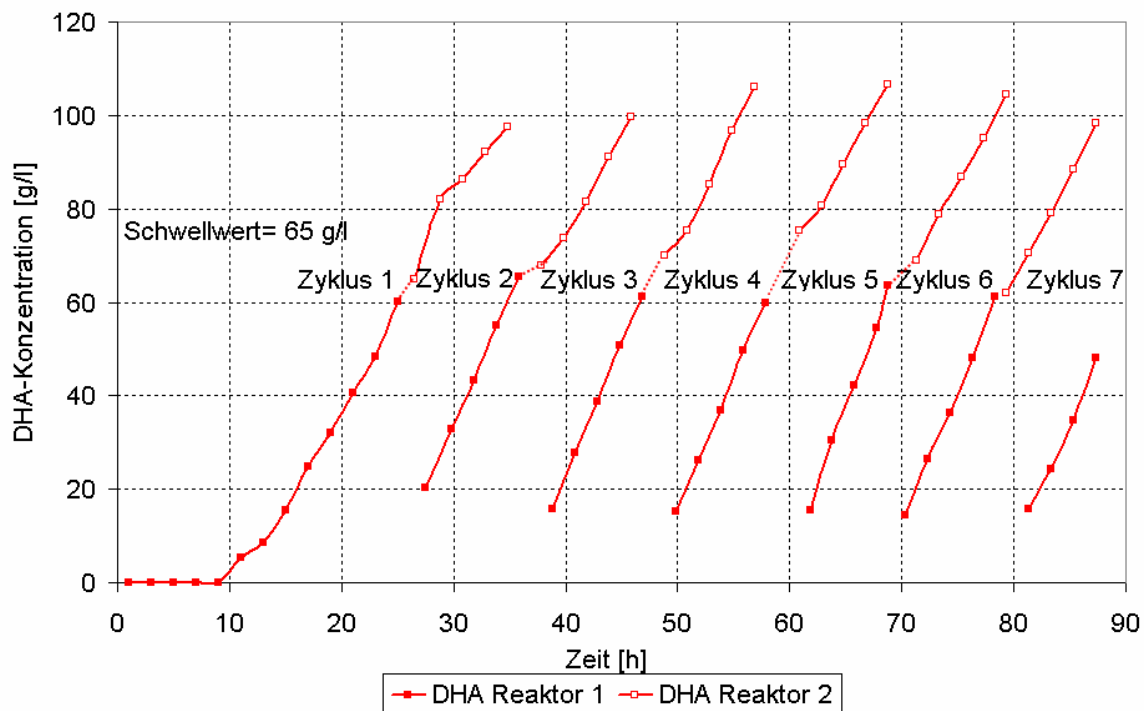
### 4.2.1 Referenzläufe in der Technikumsanlage im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren

In einer ersten Versuchsreihe wurde das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren im Technikumsmaßstab getestet. Die Grundeinstellungen für den Betrieb sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst.

**Tabelle 4-3: Spezifikationen für den Betrieb der Technikumsanlage im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren**

	Standardeinstellung	
Glycerinkonzentration	10 – 20 g/l; Zudosierung nach Bedarf	
DHA-Schwellwert	65 g/l	
Temperatur	30° C	
pH	5.3	
Restvolumen in Reaktor 1 bei Chargenwechsel	2.4 Liter $\hat{=}$ 10 % des Reaktionvolumens	
	Reaktor 1	Reaktor 2
Reaktionsvolumen	24 Liter	21,6 Liter
Belüftung	15 nl/min	15 nl/min

Über einen Zeitraum von 90 Stunden wurden 7 reproduzierbare Zyklen gefahren. Die erreichte DHA-Endkonzentration im Reaktor 2 betrug 98 - 110 g/l. Die DHA-Konzentrationsprofile von Reaktor 1 und 2 sind in Abbildung 4-18 über der Zeit aufgetragen.



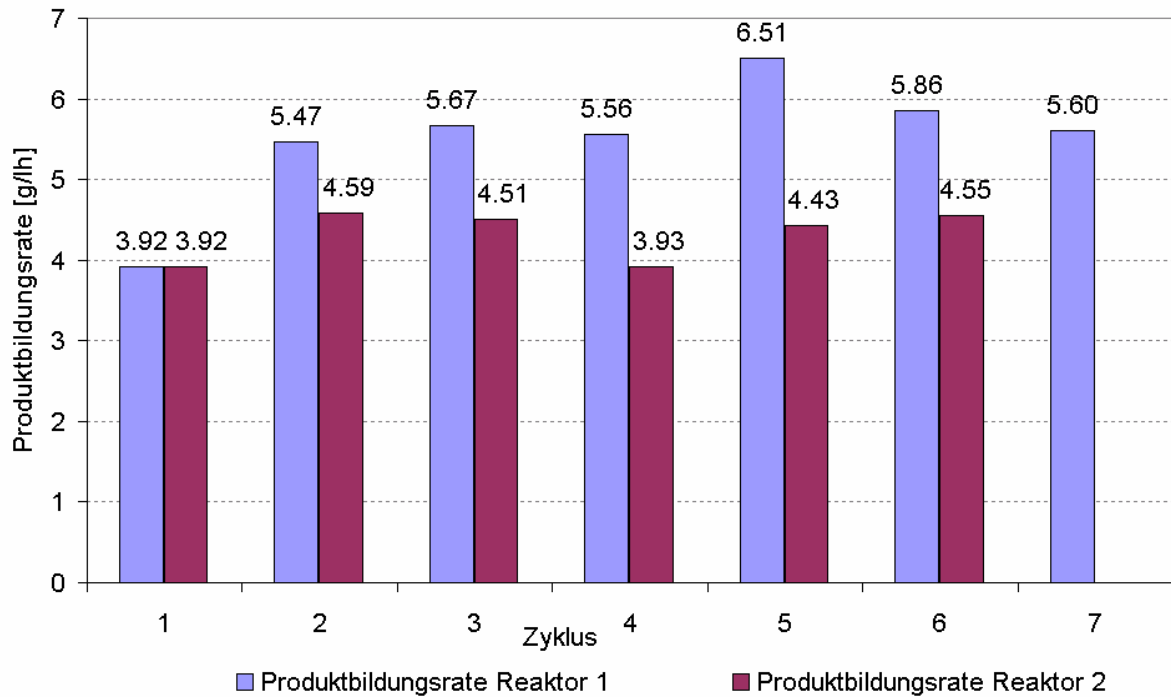
**Abbildung 4-18: DHA-Konzentrationsprofile von Reaktor 1 und 2 im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren in der Technikumsanlage; Referenzläufe**

Bemerkenswert ist, dass die Produktbildung in Reaktor 1 und 2 annähernd linear verlief. Die Gelöstsauerstoffkonzentration (hier nicht dargestellt) durchlief, wie schon in vorigen Läufen beobachtet, ein respiratorisches Minimum. Die Biotrockenmasse nahm im Reaktor 1 aufgrund von Zellwachstum zu und erreichte in Reaktor 2 ab einer DHA-Konzentration von ca. 70 g/l einen stationären Endwert (hier nicht dargestellt). Zyklusspezifisch schwankte die maximale Biotrockenmassekonzentration zwischen 1.0 g/l und 1.9 g/l. In Abbildung 4-19 und Abbildung 4-20 sind die Produktbildungsraten  $\dot{r}_{\text{DHA}}$ <sup>3</sup> und Ertragskoeffizienten  $Y_{\text{DHA}/\text{Gly}}$ <sup>4</sup> der einzelnen Zyklen und Reaktoren aufgetragen. Für den Reaktor 1 ergaben sich Produktbildungsraten von 3.92 g/(lh) bis 6.51 g/(lh) und für Reaktor 2 von 3.92 g/(lh) bis 4.59 g/(lh). Der Ertragskoeffizient  $Y_{\text{DHA}/\text{Gly}}$  betrug in beiden Reaktoren zwischen 0.67 und 0.89. Die Werte waren mit Ausnahme des ersten Zyklus reproduzierbar, da hier der

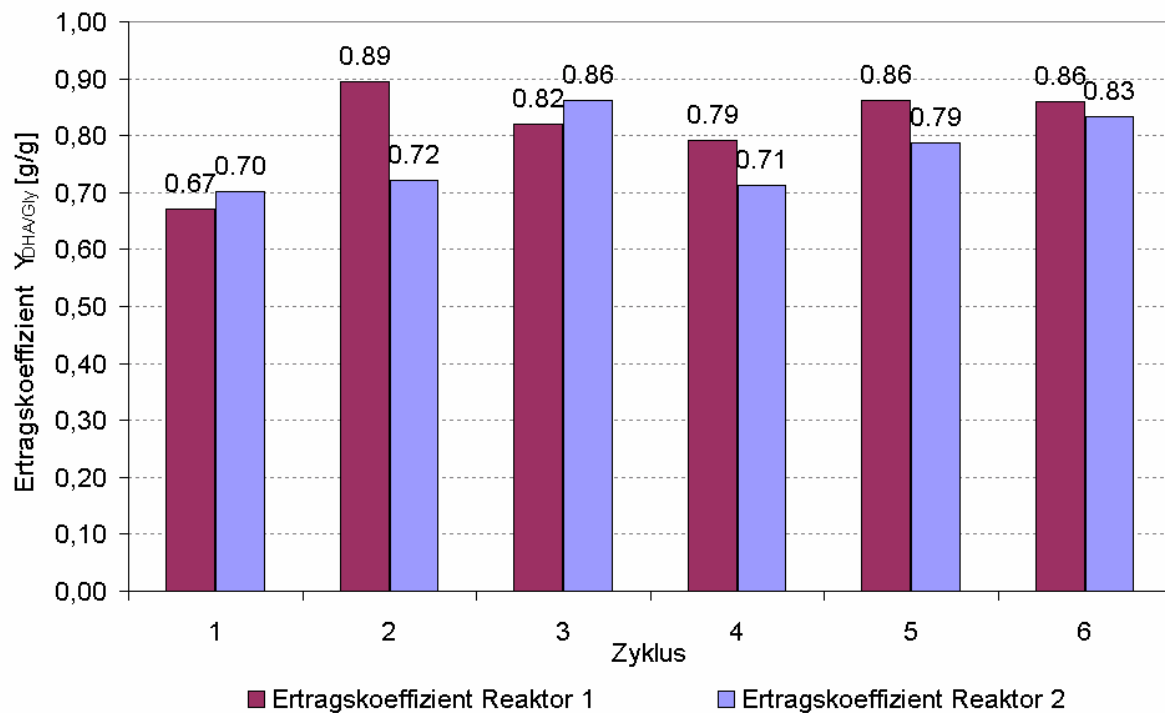
<sup>3</sup> Die Produktbildungsrate  $\dot{r}_{\text{DHA}}$  ist definiert als  $\dot{r}_{\text{DHA}} = \frac{c_{\text{DHA, Ende}} - c_{\text{DHA, Anfang}}}{t_{\text{Ende}} - t_{\text{Anfang}}}$  und wurde in den folgenden Betrachtungen zur Bewertung der Experimente herangezogen.

<sup>4</sup> Der Ertragskoeffizient  $Y_{\text{DHA}/\text{Gly}}$  ist definiert als  $Y_{\text{DHA}/\text{Gly}} = \frac{c_{\text{DHA, Ende}} - c_{\text{DHA, Anfang}}}{m_{\text{Gly, Zugabe}} / V_{\text{R}}}$ .

te waren mit Ausnahme des ersten Zyklus reproduzierbar, da hier der Glycerinverbrauch nicht durch die Glycerinzugabe ausgeglichen wurde und deshalb eine Substratlimitation vorherrschte.



**Abbildung 4-19: Produktbildungsraten von Reaktor 1 und 2 aufgetragen über die Zyklenzahl im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren in der Technikumsanlage**



**Abbildung 4-20: Ertragskoeffizient  $Y_{\text{DHA/Gly}}$  von Reaktor 1 und 2 aufgetragen über die Zyklenzahl im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren in der Technikumsanlage**

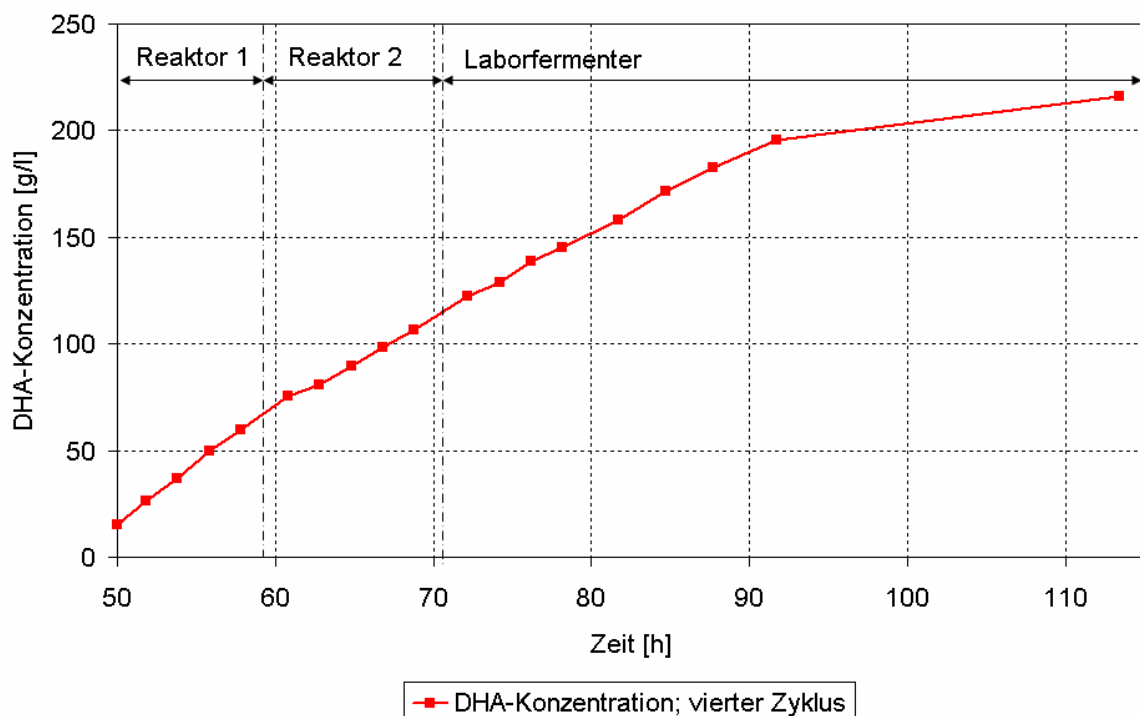
**Tabelle 4-4: Zusammenfassung der Produktbildungsrate und der Ertragskoeffizienten  $Y_{\text{DHA/Gly}}$  und  $Y_{\text{X/Gly}}$  im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren in der Technikumsanlage**

	Reaktor 1	Reaktor 2	Zweistufiges zyklisch betriebenes Zulaufverfahren
Produktbildungsrate [g/(lh)]	$5.78 \pm 0.38$	$4.28 \pm 0.3$	$5.03 \pm 0.34$
Ertragskoeffizient $Y_{\text{DHA/Gly}}$ [g/g]	$0.82 \pm 0.08$	$0.77 \pm 0.07$	$0.79 \pm 0.07$
Ertragskoeffizient $Y_{\text{X/Gly}}^5$ [g/g]	$(1.87 \pm 0.41) \cdot 10^{-2}$	0	$(1.06 \pm 0.32) \cdot 10^{-2}$

<sup>5</sup> Der Ertragskoeffizient  $Y_{\text{X/Gly}}$  ist definiert als  $Y_{\text{X/Gly}} = \frac{c_{\text{X,Ende}} - c_{\text{X,Anfang}}}{m_{\text{Gly,Zugabe}} / V_{\text{R}}}$ .

In Tabelle 4-4 sind die berechneten Mittelwerte für Reaktor 1 und 2 bzw. dem gesamten Prozess dargestellt. Es ist ersichtlich, dass sowohl die Produktbildungsrate als auch der Ertragskoeffizient  $Y_{DHA/Gly}$  in Reaktor 2 unter den Werten von Reaktor 1 liegt. Der Grund dafür ist die zunehmende Produktinhibition mit steigender Produktkonzentration. Die Ertragskoeffizient  $Y_{X/Gly}$  war in Reaktor 2 null, da die DHA-Konzentration hier schon über 65 g/l lag und keine Biomassebildung mehr möglich war.

Dem vierten Zyklus wurden bei einer Produktkonzentration von 106 g/l DHA vor dem Chargenwechsel zwei Liter entnommen und in einem vorher nicht sterilisierten, aber sauberen Rührkessellaborreaktor bei 30 °C weiterkultiviert, um die maximal mögliche DHA-Endkonzentration zu bestimmen. In Abbildung 4-21 ist das entsprechende DHA-Konzentrationsprofil für den vierten Zyklus dargestellt. Während der weiteren Kultivierung fiel der pH von 5.3 auf 4.5 ab. Es wurde eine maximale DHA-Endkonzentration von 216 g/l nach 64 h erreicht.



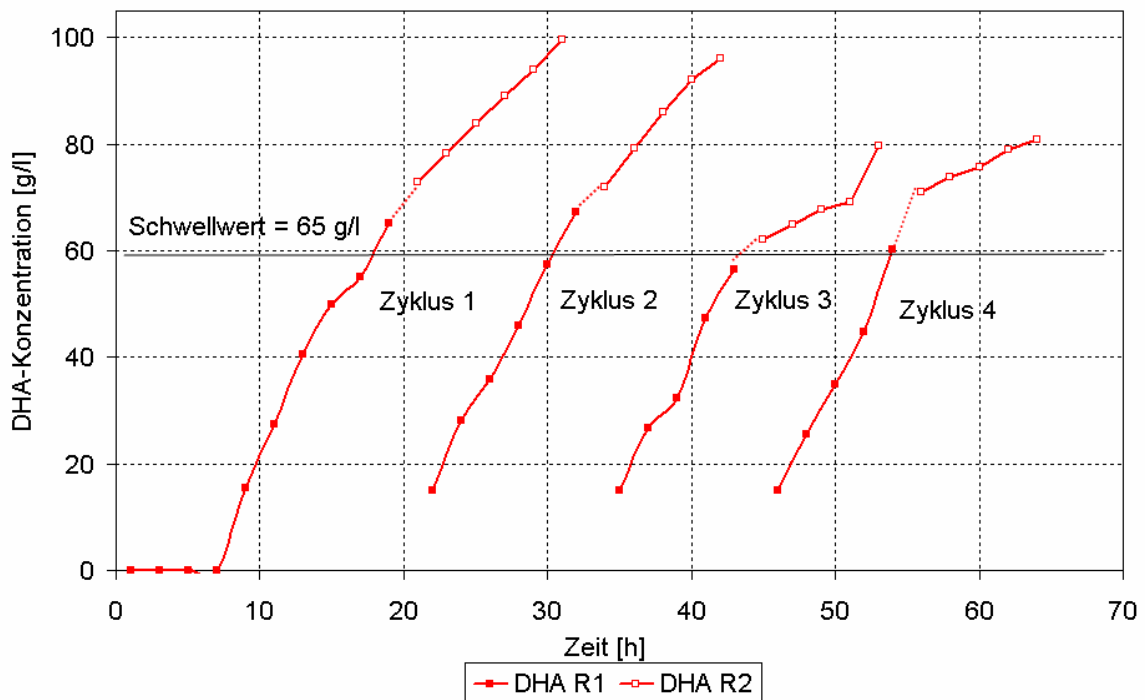
**Abbildung 4-21: DHA-Konzentrationsprofil im dreistufigen Betrieb, Referenzlauf (Probe aus dem vierten Zyklus)**

#### 4.2.2 Zugabe einer weiteren Kohlenstoffquelle

In Kapitel 2.1.3.2 wurden ausgewählte C-Quellen aufgeführt, die *Gluconobacter oxydans* neben dem Glycerin umsetzen konnte. Aufbauend auf den Untersuchungen von Yamada [Yamada; 1997, b] wurde der Einfluss von Sorbit und Saccharose in eigenen Schüttelkolbenversuchen untersucht. Eine Zugabe von 12 g/l Saccharose erwies sich in Schüttelkolbenversuchen als wachstumsfördernd und nicht inhibierend. Auf eine experimentelle Untersuchung von Mannit als zusätzliche Kohlenstoffquelle wurde verzichtet, da es identische Retentionszeiten wie DHA besitzt und deshalb analytisch nicht erfasst werden konnte. Aufgrund vielversprechender Ergebnisse im Schüttelkolben mit 10 g/l Sorbit wurden auch Versuche mit dieser zusätzlichen C-Quelle in der Technikumsanlage gefahren. Zur Erfassung der zusätzlichen C-Quelle wurde die HPLC neben Glycerin und DHA zusätzlich noch für Glucose, Fructose, Saccharose, Sorbit und Sorbose kalibriert.

#### 4.2.3 Versuche mit 12 g/l Saccharose im Nährmedium im Technikumsmaßstab

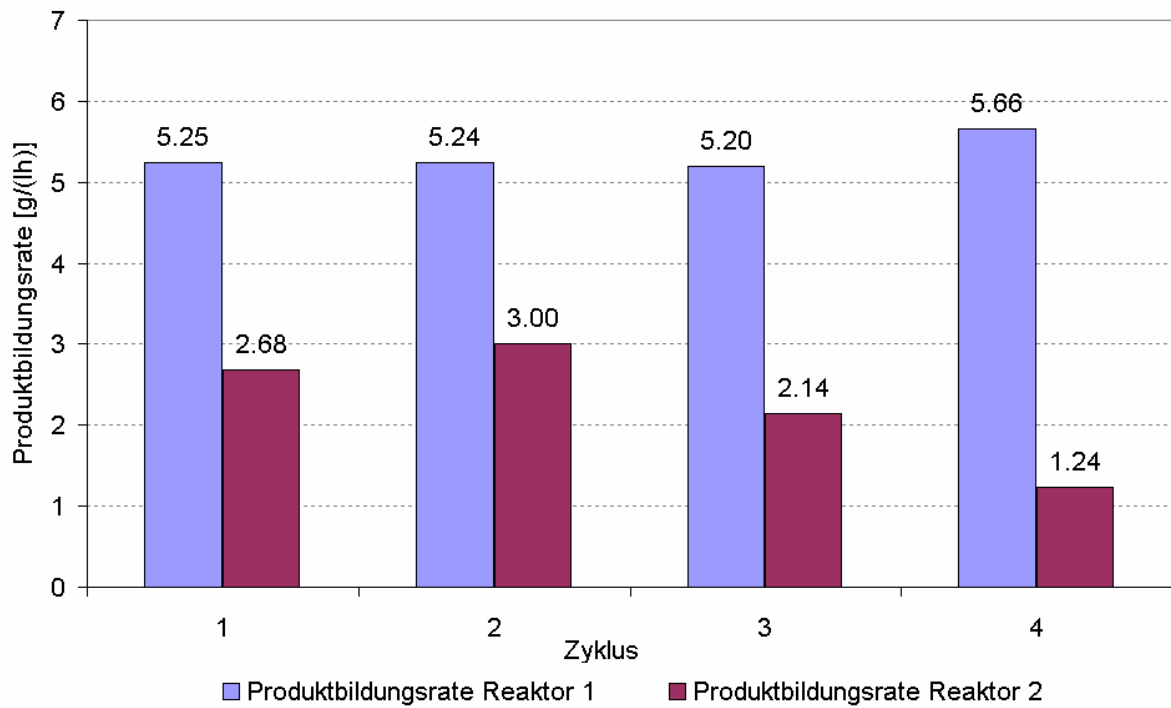
Die Zugabe von 12 g/l Saccharose erfolgte diskontinuierlich nach jedem Chargenwechsel zeitgleich mit der Zugabe des Nährmedienkonzentrats und dem VE-Wasser. Saccharose setzt sich aus Glucose und Fructose zusammen und wurde bei dem im Medium eingestellten pH von 5.3 hydrolysiert. Die Hydrolyse von Saccharose in Glucose und Fructose erfolgte innerhalb der ersten Stunde. Glycerin, Glucose und Fructose wurden von *Gluconobacter oxydans* zeitgleich verwertet. Eine vollständige Glucoseumsetzung wurde 2 h nach Zyklusbeginn beobachtet. Fructose wurde hingegen erst nach 10 h vollständig umgesetzt. Das DHA-Konzentrationsprofil für Reaktor 1 und 2 ist in Abbildung 4-22 dargestellt. In Reaktor 1 konnten reproduzierbare Zyklen gefahren werden. In Reaktor 2 hingegen nahm die Produktivität nach dem zweiten Zyklus mit fortlaufender Zyklenzahl ab. Die Ursache für die Abnahme der Produktivität konnte nicht eindeutig geklärt werden.



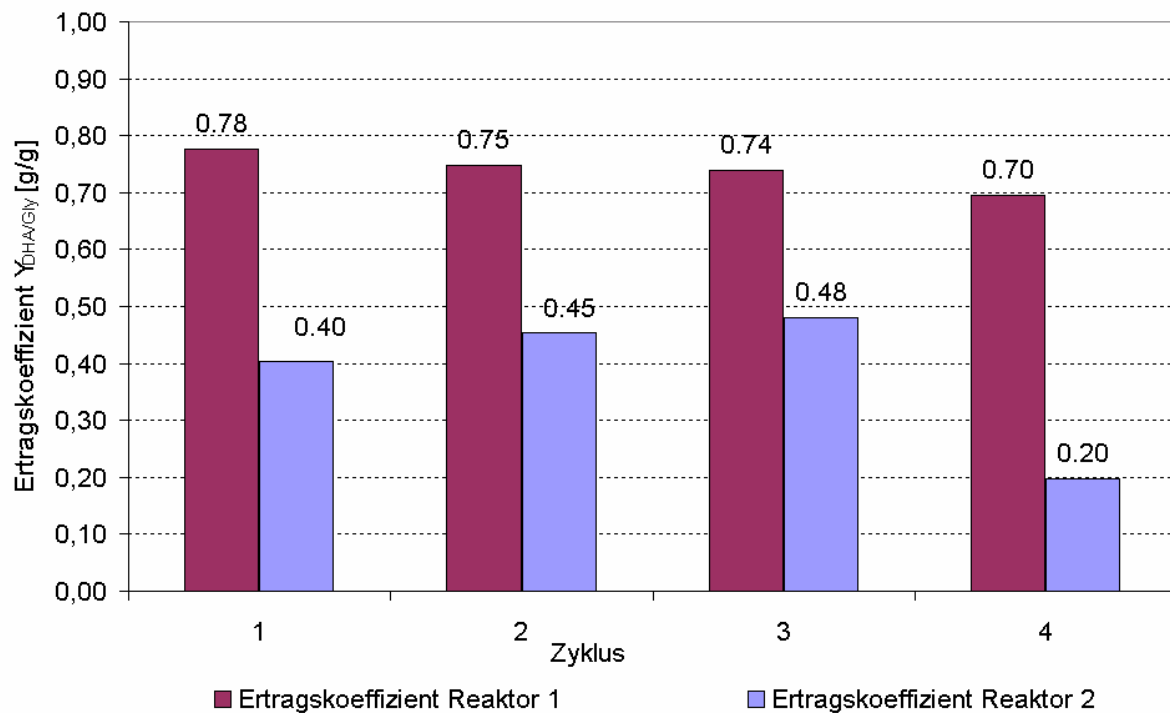
**Abbildung 4-22: DHA-Konzentrationsprofile in Reaktor 1 und 2 mit 12 g/l Saccharose im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren in der Technikumsanlage**

In Abbildung 4-23 und Abbildung 4-24 sind die Produktbildungsraten und Ertragskoeffizienten für  $Y_{\text{DHA/Gly}}$  der einzelnen Zyklen und Reaktoren aufgetragen. Für den Reaktor 1 ergaben sich Werte von 5.2 g/(lh) bis 5.66 g/(lh) und für Reaktor 2 Werte von 1.24 g/(lh) bis 3 g/(lh). Die Ertragskoeffizienten für  $Y_{\text{DHA/Gly}}$  lagen zwischen 0.7 und 0.78 im Reaktor 1 und 0.2 und 0.48 im Reaktor 2.





**Abbildung 4-23: Produktbildungsrate von Reaktor 1 und 2 aufgetragen über die Zyklenzahl für die Zugabe von 12 g/l Saccharose im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren in der Technikumsanlage**



**Abbildung 4-24: Ertragskoeffizient  $Y_{\text{DHA/Gly}}$  von Reaktor 1 und 2 aufgetragen über die Zyklenzahl für die Zugabe von 12 g/l Saccharose im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren in der Technikumsanlage**

In Tabelle 4-5 sind die berechneten Mittelwerte für Reaktor 1 und 2 und den gesamten Prozess zusammengefasst. Es ist ersichtlich, dass sowohl die Produktbildungsrate als auch der Ertragskoeffizient  $Y_{\text{DHA/Gly}}$  in Reaktor 2 unter den Werten von Reaktor 1 lagen. In Reaktor 1 wurde ein Ertragskoeffizient  $Y_{\text{X/Gly}}$  von  $(2.47 \pm 0.45) \cdot 10^{-2}$  erreicht. Der Ertragskoeffizient  $Y_{\text{X/Gly}}$  war in Reaktor 2 null, da die DHA-Konzentration hier schon über 65 g/l lag und keine Biomassebildung mehr möglich war. Die Biotrockenmasse in Reaktor 2 ab einer DHA-Konzentration von 70 g/l schwankte zyklusspezifisch zwischen 1.45 g/l und 1.9 g/l. Trotz der höheren Biomasse von 1.73 g/l nahm die Produktbildung im Vergleich zum Referenzmedium in Reaktor 1 und 2 ab. Eine mögliche Ursache für die schlechtere Produktbildung könnte sein, dass das für die Glycerinumsetzung notwendige Enzymsystem nicht im gleichen Maße gebildet wurde, wie es bei den Referenzläufen der Fall war.

**Tabelle 4-5: Zusammenfassung der Produktbildungsrate und der Ertragskoeffizienten  $Y_{\text{DHA/Gly}}$  und  $Y_{\text{X/Gly}}$  für die Zugabe von Saccharose im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren in der Technikumsanlage**

	Reaktor 1	Reaktor 2	Zweistufiges zyklisch betriebenes Zulaufverfahren
Produktbildungsrate [g/(lh)]	$5.34 \pm 0.22$	$2.26 \pm 0.77$	$3.8 \pm 0.5$
Ertragskoeffizient $Y_{\text{DHA/Gly}}$ [g/g]	$0.74 \pm 0.03$	$0.38 \pm 0.13$	$0.56 \pm 0.08$
Ertragskoeffizient $Y_{\text{X/Gly}}$ [g/g]	$(2.47 \pm 0.45) \cdot 10^{-2}$	0	$(1.33 \pm 0.2) \cdot 10^{-2}$

Dem zweiten Zyklus wurden bei einer Produktkonzentration von 96 g/l DHA vor dem Chargenwechsel zwei Liter entnommen und unsteril in einem Rührkessellaborreaktor bei 30 °C weiterkultiviert, um die maximal mögliche DHA-Endkonzentration zu bestimmen. In Abbildung 4-25 ist das DHA-Konzentrationsprofil für den zweiten Zyklus dargestellt. Es konnte eine maximale DHA-Endkonzentration von 182 g/l nach 41 h erreicht werden. In einem vergleichbaren Zeitraum konnte bei den Referenzläufen (ohne die Zugabe von Saccharose) eine DHA-Konzentration von über 200 g/l erreicht werden.

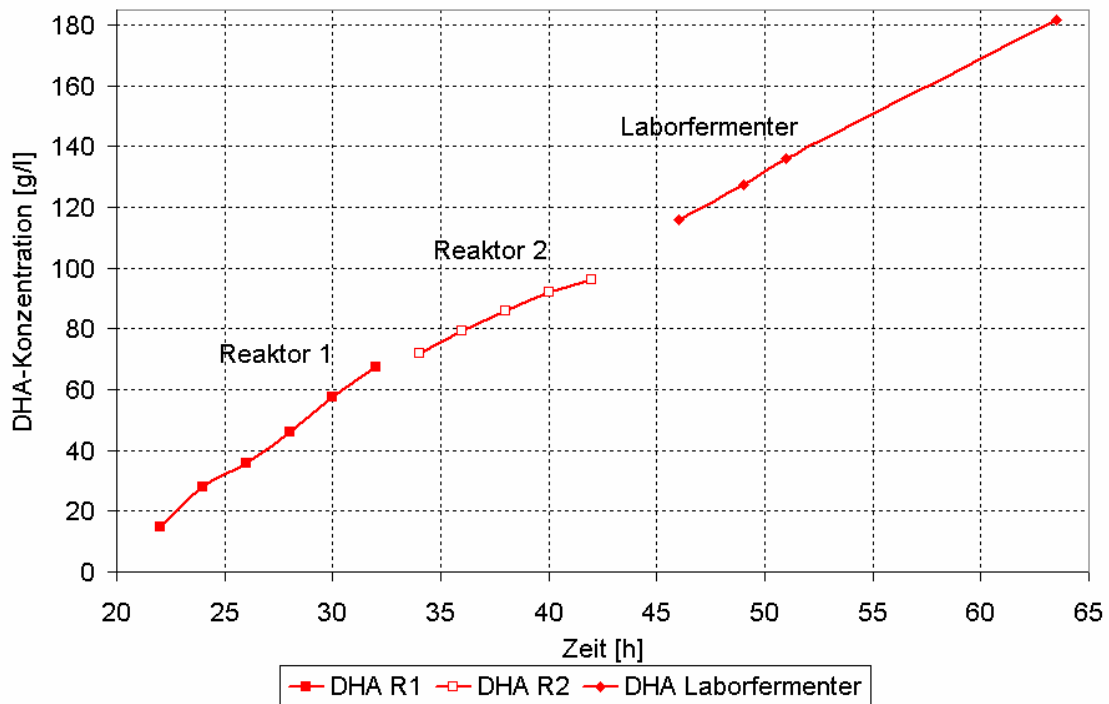


Abbildung 4-25: DHA-Konzentrationsprofil nach der Zugabe von 12 g/l Saccharose im dreistufigen Betrieb (Probe aus dem zweiten Zyklus)

#### 4.2.4 Versuche mit 10 g/l Sorbit im Nährmedium im Technikumsmaßstab

Die Zugabe von 10 g/l Sorbit erfolgte diskontinuierlich nach jedem Chargenwechsel zeitgleich mit der Zugabe des Nährmedienkonzentrats und dem VE-Wasser. Glycerin und Sorbit wurden von *Gluconobacter oxydans* zeitgleich verwertet. Eine vollständige Umwandlung von Sorbit in Sorbose konnte nach vier Stunden beobachtet werden. Das DHA-Konzentrationsprofil für Reaktor 1 und 2 ist in Abbildung 4-26 dargestellt. Es wurden vier reproduzierbare Zyklen vermessen. In den Abbildung 4-27 und Abbildung 4-28 sind die Produktbildungsraten und Ertragskoeffizienten für  $Y_{\text{DHA/Gly}}$  der einzelnen Zyklen und Reaktoren aufgetragen. Für den Reaktor 1 ergaben sich Werte von 5.72 g/(lh) bis 6.89 g/(lh) und für Reaktor 2 Werte von 4.7 g/(lh) bis 5.1 g/(lh). Die Ertragskoeffizienten für  $Y_{\text{DHA/Gly}}$  lagen zwischen 0.87 und 0.93 im Reaktor 1 und 0.68 und 0.74 im Reaktor 2.

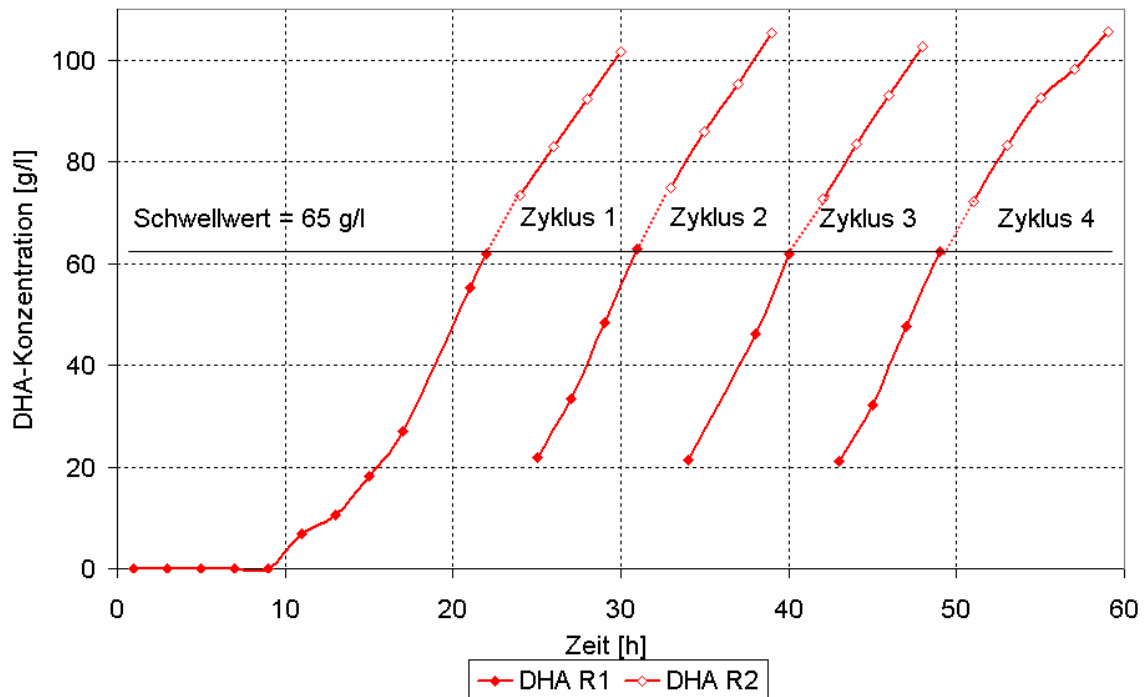


Abbildung 4-26: DHA-Konzentrationsprofile in Reaktor 1 und 2 mit 10 g/l Sorbit im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren in der Technikumsanlage

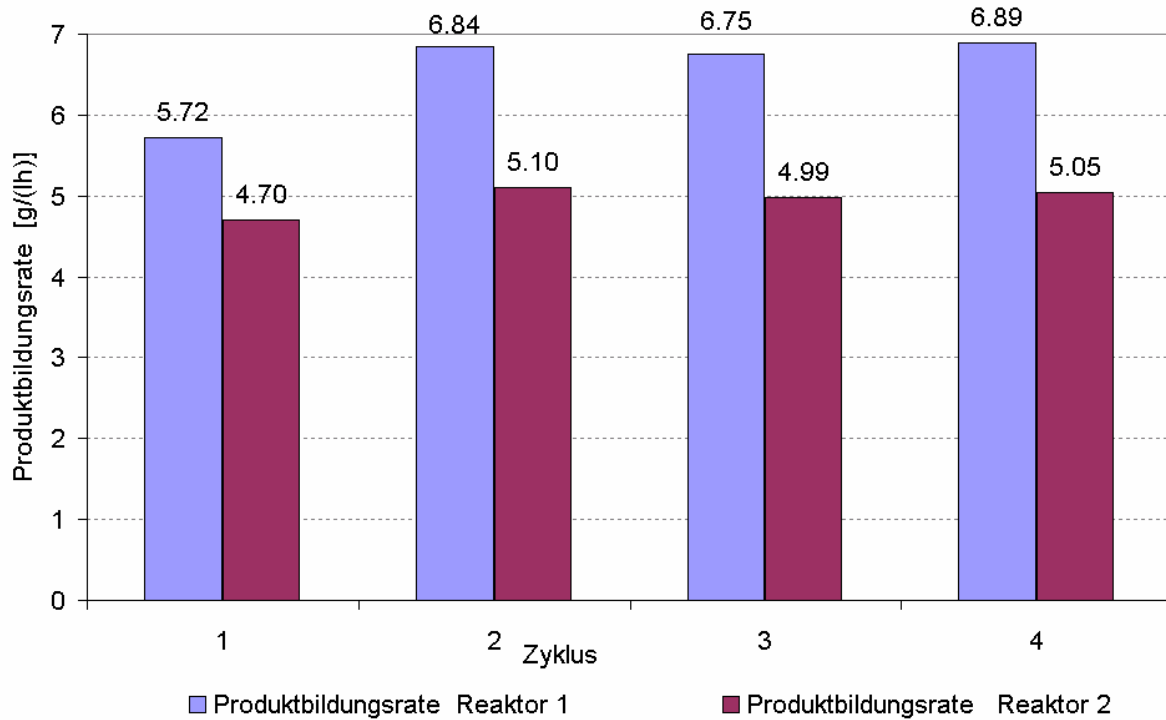
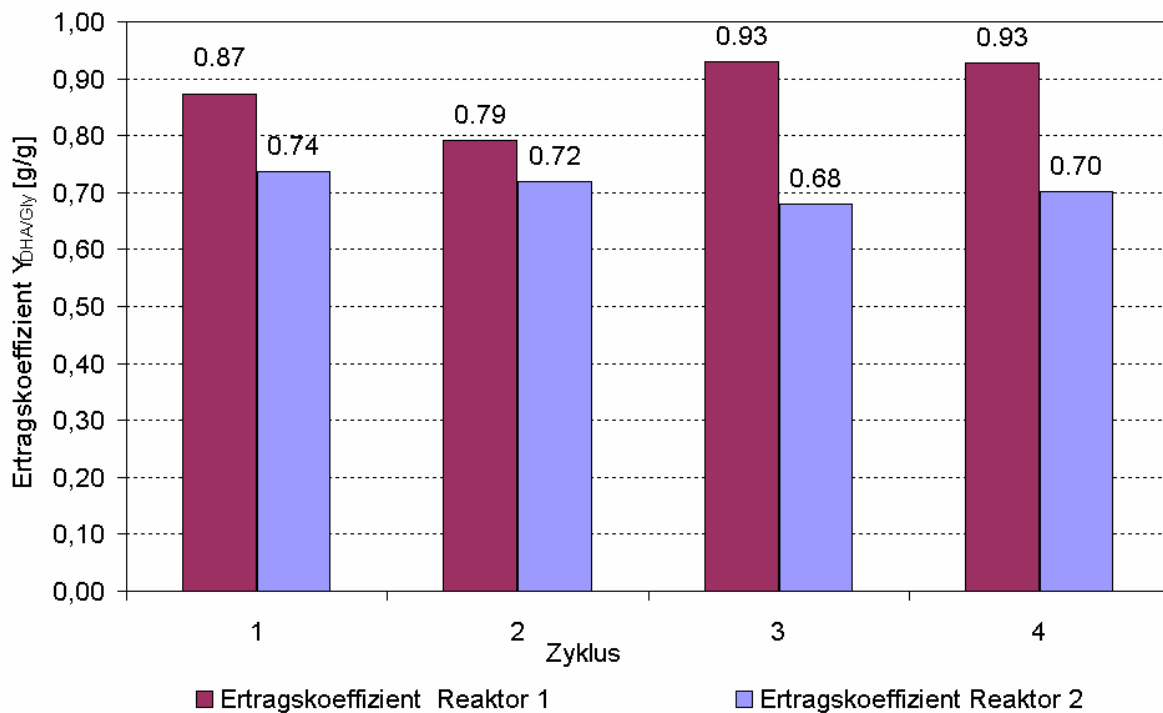


Abbildung 4-27: Produktbildungsrate von Reaktor 1 und 2 aufgetragen über die Zyklenzahl nach der Zugabe von 10 g/l Sorbit im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren in der Technikumsanlage



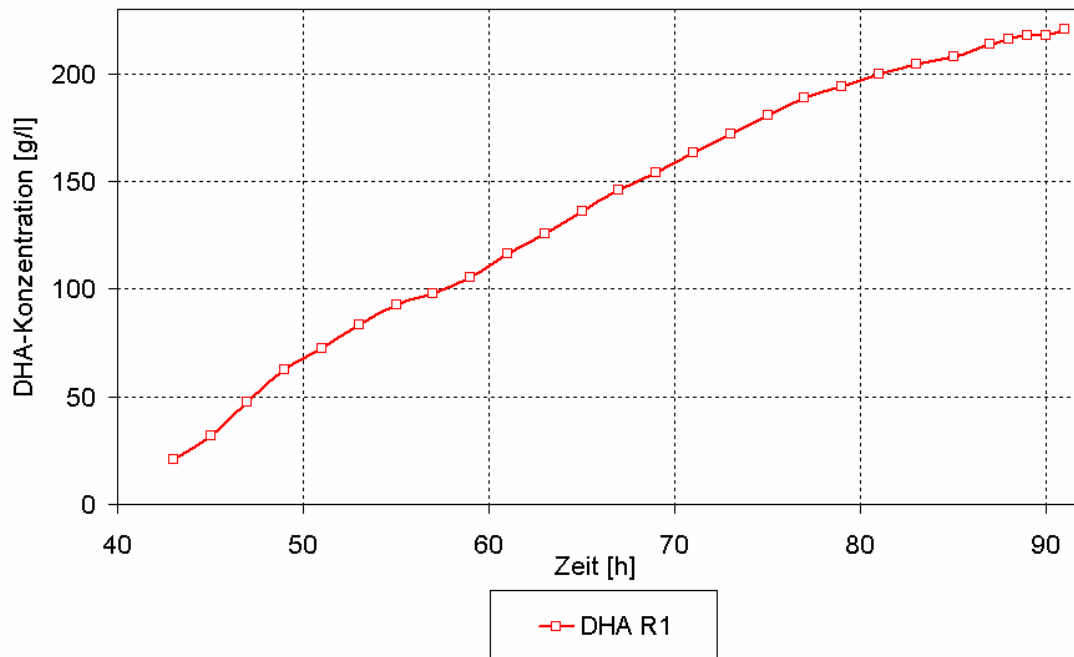
**Abbildung 4-28: Ertragskoeffizient  $Y_{\text{DHA/Gly}}$  von Reaktor 1 und 2 aufgetragen über die Zyklenzahl nach der Zugabe von 10 g/l Sorbit im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren in der Technikumsanlage**

In Tabelle 4-6 sind die berechneten Mittelwerte für Reaktor 1 und 2 und den gesamten Prozess dargestellt. Der Ertragskoeffizient  $Y_{\text{X/Gly}}$  betrug in Reaktor 1  $(3.37 \pm 0.2) \cdot 10^{-2}$  und in Reaktor 2 null, da die DHA-Konzentration hier schon über 65 g/l lag und keine Biomassebildung mehr möglich war. Die maximale Biotrockenmassekonzentration in Reaktor 2 lag zwischen 2.25 g/l und 3.05 g/l.

**Tabelle 4-6: Zusammenfassung der Produktbildungsrate und der Ertragskoeffizienten  $Y_{\text{DHA/Gly}}$  und  $Y_{\text{X/Gly}}$  für die Zugabe von Sorbit im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren in der Technikumsanlage**

	Reaktor 1	Reaktor 2	Zweistufiges zyklisch betriebenes Zulaufverfahren
Produktbildungsrate [g/(lh)]	$6.8 \pm 0.07$	$4.96 \pm 0.18$	$5.9 \pm 0.12$
Ertragskoeffizient $Y_{\text{DHA/Gly}}$ [g/g]	$0.88 \pm 0.06$	$0.71 \pm 0.02$	$0.79 \pm 0.04$
Ertragskoeffizient $Y_{\text{X/Gly}}$ [g/g]	$(3.37 \pm 0.2) \cdot 10^{-2}$	0	$(2.2 \pm 0.19) \cdot 10^{-2}$

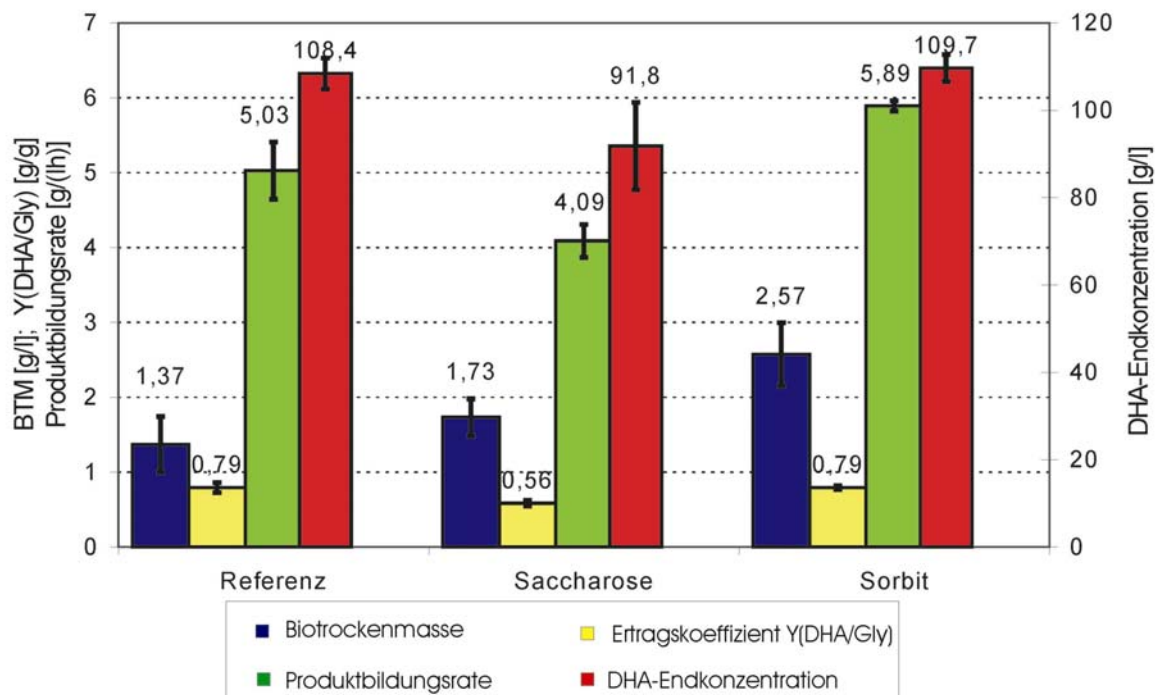
In Abbildung 4-29 ist das entsprechende DHA-Konzentrationsprofil dargestellt. Der vierte Zyklus wurde im Reaktor 1 bis zu einer DHA-Endkonzentration von 221 g/l gefahren und dann abgebrochen. Diese wurde nach 48 h erreicht.



**Abbildung 4-29: DHA-Konzentrationsprofil nach der Zugabe von 10 g/l Sorbit im Reaktor 1 der Technikumsanlage (vierter Zyklus)**

#### 4.2.5 Vergleich der verschiedenen Kohlenstoffquellen

Zur Quantifizierung des Grades der Optimierung wurden die maximal erreichbare Biomasse, der Ertragskoeffizient für  $Y_{\text{DHA}/\text{Gly}}$ , die Produktbildungsrate und die DHA-Endkonzentration herangezogen. In Abbildung 4-30 sind die Ergebnisse ohne und mit Zugabe von Sorbit und Saccharose für das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren (DHA-Schwellwert = 65 g/l) zusammengefasst dargestellt.



**Abbildung 4-30: Vergleich von maximal erreichbarer BTM, Produktbildungsrate, Ertragskoeffizient  $Y_{DHA/Gly}$  und DHA-Endkonzentration im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren in der Technikumsanlage; Referenz, Saccharose 12 g/l, Sorbit 10 g/l**

Die Ergebnisse in Abbildung 4-30 zeigen, dass die maximale BTM-Konzentration im Reaktor 2 durch die Zugabe einer weiteren Kohlenstoffquelle um ca. 26 % für Saccharose und um ca. 88 % für Sorbit erhöht werden konnte. Die Ertragskoeffizienten  $Y_{DHA/Gly}$  für die Referenzläufe und die Sorbitläufe betragen 0,79, für Saccharose lag er hingegen mit 0,56 deutlich niedriger. Ferner wirkte sich die Zugabe von 12 g/l Saccharose kontraproduktiv auf die Produktbildungsrate aus, da sie im Vergleich zu den Referenzläufen um ca. 25 % abnahm. Positiv hingegen wirkte sich die Zugabe von 10 g/l Sorbit auf die Produktbildungsrate aus. Sie nahm im Vergleich zu den Referenzläufen um ca. 17 % zu. Die in Reaktor 2 erreichte DHA-Endkonzentration lag bei den Referenz- und Sorbitläufen um ca. 18 - 19 % höher als bei den Saccharoseläufen. An dieser Stelle sei auf Kapitel 2.1.3.2 verwiesen, in der sich die Ergebnisse aus dem Technikum teilweise widerspiegeln: Die erhöhte Aktivität der Glycerindehydrogenase führte aufgrund der Sorbitumsetzung zu einer größeren Biomassebildung, da die für das Wachstum nötige Energie schneller gewonnen werden konnte. Die entsprechend größere Biomasse führte schließlich nach der Umsetzung des Sorbit zu einer verstärkten Glycerinumsetzung. Die Zugabe von Saccharose führte zwar auch zu einer höheren Biomasse, allerdings



ist anzunehmen, dass die für die DHA-Produktion benötigte Glycerindehydrogenase nicht in gleichem Maße gebildet wurde und somit die Produktbildungsrate für DHA abnahm.

#### 4.2.6 Variation des Schwellwertes für DHA in der zweistufigen Laborreaktoranlage

Als Reaktor 1 diente der Laborblasensäulenreaktor (siehe Kapitel 3.5.2) und als Reaktor 2 der Rührkesselreaktor (siehe Kapitel 3.5.3). Da sich der Betrieb in der Laborreaktoranlage gegenüber der Technikumsanlage als weniger störanfällig erwies und aufgrund des geringeren Materialaufwandes kostengünstiger umgesetzt werden konnte, wurden die folgenden Untersuchungen in der Laborreaktoranlage durchgeführt. Ein Nachteil gegenüber der Technikumsanlage ergab sich jedoch aus den niedrigeren Produktbildungsraten.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass sich das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren ohne technische Probleme für eine DHA-Schwellwertkonzentration von 65 g/l umsetzen ließ. Zudem konnte durch die Zugabe von 10 g/l Sorbit die Produktbildungsrate im Vergleich zu den Referenzläufen um ca. 17 % gesteigert werden. Die erreichte DHA-Endkonzentration betrug dabei 110 g/l. Um höhere DHA-Endkonzentrationen zu erreichen, war es allerdings notwendig, den DHA-Schwellwert zu erhöhen.

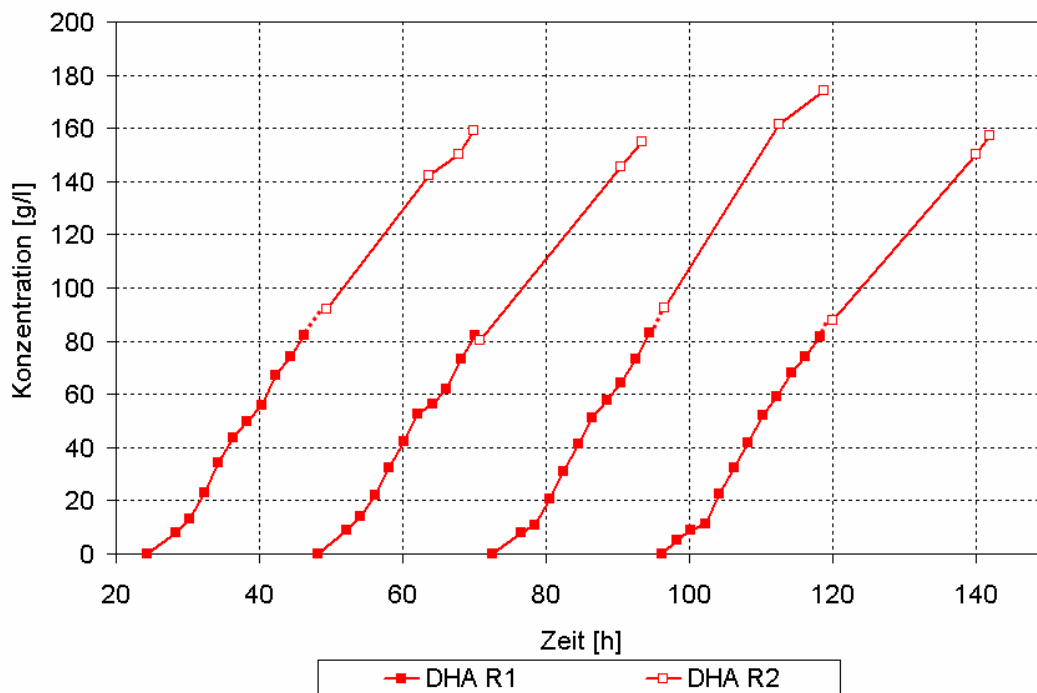
Aus Kapitel 4.1.3 ist bekannt, dass die Kultur eine Regenerationsfähigkeit bis 150 g/l DHA besitzt. Deshalb wurde nun in einem nächsten Schritt das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren bei höheren DHA-Schwellwerten durchgeführt. Im Laborreaktor wurden Schwellwertkonzentrationen von 82 g/l und 101 g/l gefahren. Im Gegensatz zu den Technikumsversuchen wurde die zweite Stufe in einem unsterilen, hygienischen Rührkesselreaktor durchgeführt. Als Inokulat wurden 50 ml einer in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Schüttelkolbenkultur verwendet. Sämtliche für das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren relevanten Betriebsparameter sind in Tabelle 4-7 zusammengefasst.

**Tabelle 4-7: Spezifikationen für den Laborreaktorbetrieb im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren; Zugabe von 10 g/l Sorbit**

	Standardeinstellung
Glycerinkonzentration	10 – 20 g/l; Zudosierung nach Bedarf
DHA-Schwellwert	82 g/l bzw. 101 g/l
Temperatur	30 ± 0.1 ° C

Restvolumen in Reaktor 1 bei Chargenwechsel	0.03 l (2 % des Reaktionsvolumens)	
	Reaktor 1 (Blasensäule)	Reaktor 2 (Rührkessel)
Reaktionsvolumen	1.5 Liter	1.47 Liter
pH	5.3 ± 0.1	ungeregelt
Belüftung	130 nl/h	130 nl/h

Nach dem Anfahrvorgang wurden über einen Zeitraum von ca. 120 Stunden 4 reproduzierbare Zyklen gefahren. Die eingestellte DHA-Endkonzentration im Reaktor 1 betrug 82 g/l. Im Reaktor 2 wurde eine DHA-Konzentration von 161.5 g/l erreicht. Die Konzentrationsprofile für DHA von Reaktor 1 und 2 sind in Abbildung 4-31 über der Zeit aufgetragen. Für den Reaktor 1 ergaben sich Produktbildungsraten von 3.7 - 4.1 g/(lh) und für Reaktor 2 von 3.2 - 3.7 g/(lh). Die Produktbildungsraten im Laborreaktor lagen damit deutlich unter den erreichten Produktbildungsraten aus dem Technikumsbetrieb. Der Ertragskoeffizient für  $Y_{\text{DHA}/\text{Gly}}$  lag ca. 5 % über dem Wert aus der Technikumsanlage. Eine Zusammenfassung ist in Tabelle 4-8 gegeben.

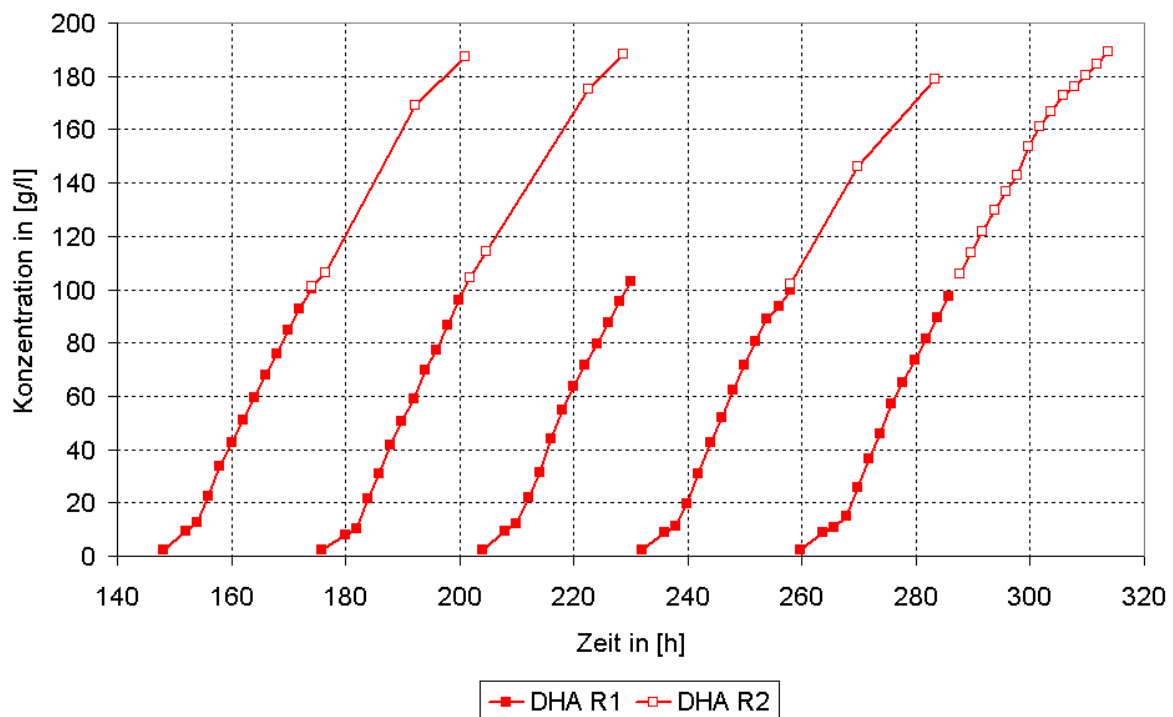


**Abbildung 4-31: DHA-Konzentrationsprofile für das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren im Laborreaktor; Schwellwert = 82 g/l; Zugabe von 10 g/l Sorbit**

**Tabelle 4-8: Zweistufiges zyklisch betriebenes Zulaufverfahren im Laborreaktor; DHA-Schwellwert = 82 g/l; Zugabe von 10 g/l Sorbit**

	Reaktor 1	Reaktor 2	Zweistufiges zyklisch betriebenes Zulaufverfahren
Produktbildungsrate [g/(lh)]	$3.74 \pm 0.03$	$3.36 \pm 0.22$	$3.55 \pm 0.13$
DHA-Endkonzentration [g/l]	$82.3 \pm 0.6$	$161.5 \pm 8.7$	$161.5 \pm 8.7$
Ertragskoeffizient $Y_{\text{DHA/Gly}}$ [g/g]	$0.85 \pm 0.04$	$0.81 \pm 0.1$	$0.83 \pm 0.07$
Ertragskoeffizient $Y_{\text{X/Gly}}$ [g/g]	$(1.1 \pm 0.05) \cdot 10^{-2}$	0	$(0.56 \pm 0.02) \cdot 10^{-2}$

In einer weiteren Versuchsreihe wurden über einen Zeitraum von ca. 165 Stunden 5 reproduzierbare Zyklen mit einem DHA-Schwellwert von 101 g/l gefahren. Die eingestellte DHA-Endkonzentration im Reaktor 1 betrug 101 g/l. Im Reaktor 2 wurde eine DHA-Konzentration von 186 g/l erreicht. Die Konzentrationsprofile für DHA von Reaktor 1 und 2 sind in Abbildung 4-32 über der Zeit aufgetragen. Wegen HPLC-Wartungsarbeiten konnten im Reaktor 2 für den dritten Zyklus keine Konzentrationswerte gemessen werden. Für den Reaktor 1 ergaben sich Produktbildungsrate von 3.9 g/(lh) bis 4.1 g/(lh) und für Reaktor 2 von 3.0 g/(lh) bis 3.8 g/(lh). Die Produktbildungsrate und der Ertragskoeffizient  $Y_{\text{DHA/Gly}}$  für die beiden Schwellwertstellungen von 82 und 101 g/l im Laborreaktor unterschieden sich damit nicht signifikant voneinander (siehe Tabelle 4-8 und Tabelle 4-9). Die DHA-Endkonzentration lag jedoch bei der Versuchsreihe mit einem DHA-Schwellwert von 101 g/l um ca. 15 % höher. Damit konnte gezeigt werden, dass ein höherer DHA-Schwellwert deutlich zur Verbesserung der Gesamtleistung des Verfahrens beitrug.



**Abbildung 4-32: DHA-Konzentrationsprofile für das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren im Laborreaktor; Schwellwert = 101 g/l; Zugabe von 10 g/l Sorbit (HPLC Wartung während des 3. Zyklus R II)**

**Tabelle 4-9: Zweistufiger zyklisch betriebenes Zulaufverfahren im Laborreaktor; DHA-Schwellwert = 101 g/l; Zugabe von 10 g/l Sorbit**

	Reaktor 1	Reaktor 2	Zweistufiges zyklisch betriebenes Zulaufverfahren
Produktbildungsraten [g/(lh)]	$3.94 \pm 0.03$	$3.3 \pm 0.35$	$3.62 \pm 0.19$
DHA-Endkonzentration [g/l]	$101.1 \pm 2.6$	$186 \pm 4.7$	$186 \pm 4.7$
Ertragskoeffizient $Y_{\text{DHA/Gly}}$ [g/g]	$0.89 \pm 0.05$	$0.82 \pm 0.08$	$0.855 \pm 0.065$
Ertragskoeffizient $Y_{\text{X/Gly}}$ [g/g]	$(0.97 \pm 0.14) \cdot 10^{-2}$	0	$(0.5 \pm 0.07) \cdot 10^{-2}$

#### **4.2.7 Zusammenfassung der Versuche im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren**

Das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren wurde erfolgreich im Labor- und Technikumsmaßstab umgesetzt. In einem Zeitraum von 90 h wurden im Technikumsmaßstab sieben reproduzierbare Zyklen mit einer Produktbildungsrate von ca. 5.0 g/(lh) und einer DHA-Endkonzentration von 110 g/l gefahren. Die Zugabe von Saccharose wirkte sich positiv auf die Biomassebildung und negativ auf die Produktbildungsrate aus. Durch die diskontinuierliche Zugabe von 10 g/l Sorbit konnte die im System befindliche Biomasse um ca. 88 % von 1.4 g/l auf 2.6 g/l gesteigert und die Produktbildungsrate von DHA um ca. 17 % von 5.03 g/(lh) auf 5.89 g/(lh) vergrößert werden. Die erreichte DHA-Endkonzentration in Reaktor 2 betrug 110 g/l.

In einem zweiten Schritt wurde im Labormaßstab gezeigt, dass durch eine Erhöhung des DHA-Schwellwertes auf 101 g/l eine DHA-Endkonzentration von 186 g/l erzielt werden konnte. Die Produktbildungsrate für den Lauf im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren mit einem DHA-Schwellwert von 101 g/l betrug 3.6 g/(lh). Im Vergleich zu den Technikumsläufen wurde festgestellt, dass im Laborreaktor die Produktbildungsrate um ca. 39 % und die maximal erreichbare Biomassekonzentration um ca. 77 % niedriger waren.

## 4.3 Immobilisierung

### 4.3.1 Vergleich mit bisher erzielten Ergebnissen

Um eine Vergleichbarkeit zu den Ergebnissen von Hekmat [2001; 2003] im Rieselbettreaktor zu erzielen, wurde in Vorversuchen im Laborblasensäulenreaktor mit der gleichen Medienzusammensetzung (ohne CaCl<sub>2</sub> und Sorbit) und einem pH von 4.5 gearbeitet. Die mit dieser Mediumzusammensetzung erzielte Produktbildungsrate ist geringer als bei den Versuchen aus Kapitel 4.2. Der DHA-Schwellwert wurde auf 60 g/l eingestellt. Die Versuche wurden in der vollautomatisierten Blasensäule im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden Referenzversuche ohne Füllkörper und damit ohne immobilisierter Biomasse angesetzt.

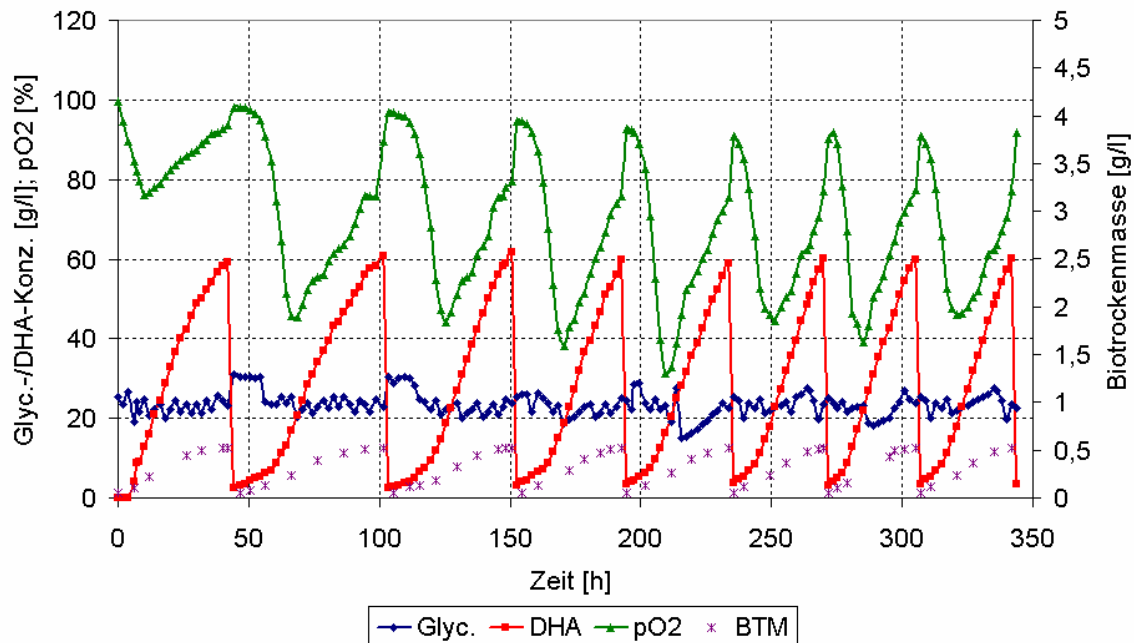
#### 4.3.1.1 Zyklisch betriebenes Zulaufverfahren ohne Immobilisierung

Als Inokulat wurden 2 ml einer in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Schüttelkolbenkultur verwendet. Die Spezifikationen für den Reaktorbetrieb sind in Tabelle 4-10 zusammengefasst.

**Tabelle 4-10: Spezifikationen für den Reaktorbetrieb im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren**

	Einstellung
Glycerinkonzentration	20 – 25 g/l; Zudosierung nach Bedarf
DHA-Schwellwert	60 g/l
Temperatur	30 ± 0.1 ° C
pH	4.5 ± 0.1
Luftvolumenstrom	130 nl/h
Reaktionsvolumen	1.25 l
Reaktorvolumen	2 l
Restvolumen bei Chargenwechsel	2.5 % des Reaktionsvolumens

Über einen Zeitraum von 350 Stunden wurden 8 Zyklen im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren vermessen. Die Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 4-33 über der Zeit aufgetragen.



**Abbildung 4-33: Konzentrationsverläufe im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren ohne Füllkörper mit einem nicht optimierten Medium (ohne CaCl<sub>2</sub> ; pH 4.5)**

Die lag-Phase für das Wachstum reduzierte sich während der ersten 4 Zyklen von anfänglich ca. 7 h auf dann annähernd konstant bleibend 1 h. Die Biotrockenmasse nahm im Laufe eines Zyklus aufgrund von Wachstum bis zu einem Wert von ca. 0.5 g/l zu. Die lag-Phase für die Produktbildung reduzierte sich innerhalb der ersten 4 Zyklen von anfänglich 10 Stunden, bis sie mit ca. 4 h einen konstanten Wert annahm. Ab dem 4. Zyklus konnte ein schwach gekrümmter S-förmiger Verlauf der DHA-Konzentration bis zu 60 g/l verzeichnet werden. Die in Abbildung 4-33 dargestellte Gelöstsauerstoffkonzentration durchlief in den Zyklen des zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens ein deutliches Minimum. Der Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration war auf eine Änderung der respiratorischen Aktivität der Zellen zurückzuführen. Die Ursache für die Abnahme der Respirationsaktivität der Mikroorganismen war die reversible Produktinhibierung.

Es ist zu erkennen, dass die Kultur bei der gewählten maximalen Produktkonzentration von 60 g/l nicht irreversibel geschädigt wurde. Der Ertragskoeffizient  $Y_{DHA/Gly}$  von Produkt aus

Substrat schwankte zwischen ca. 0.95 – 0.99 und der Ertragskoeffizient  $Y_{X/Gly}$  von Zellmasse aus Substrat lag konstant bei ca. 0.01. Die Produktbildungsrate stieg von 1.27 g/(lh) im zweiten Zyklus auf einen konstanten Wert von 1.86 g/(lh) nach dem fünften Zyklus an. Für diesen Anstieg waren vermutlich adaptive Effekte von *Gluconobacter oxydans* im Verlauf des Prozesses verantwortlich.

#### 4.3.1.2 Zyklisch betriebenes Zulaufverfahren mit immobilisierten Zellen

Zur Durchführung der Versuche im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren mit Zellrückhaltung wurden als Trägermatrix 53 beschichtete Ralu-Ringe mit einem Feststoffvolumen von 106 ml verwendet. Dies entsprach ca. 8.5 % des Reaktionsvolumens. Die beschichteten Ralu-Ringe wurden als ungeordnete Packung mit einem Schüttvolumen von 514 ml in einen Gitterkorb (Durchmesser 6.5 cm; Höhe 15.5 cm) gefüllt. Während der Kultivierung waren die Ralu-Ringe vollständig im Nährmedium eingetaucht. Weitere Spezifikationen für den Reaktorbetrieb sind in Tabelle 4-11 zusammengefasst. Bei einer DHA-Konzentration von 60 g/l wurde der Chargenwechsel durchgeführt. Der Luftvolumenstrom wurde sukzessiv von 130 auf 360 nl/h erhöht, um ein Abfallen der Gelöstsauerstoffkonzentration unter 20 % Luftsättigung zu verhindern.

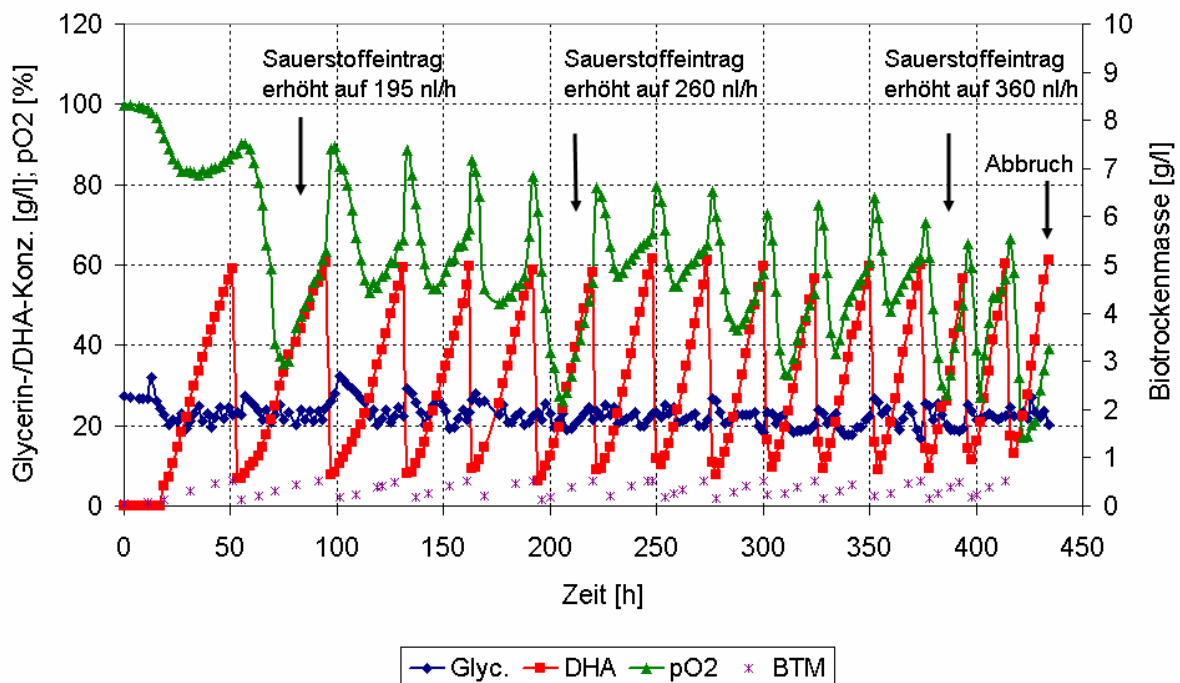
**Tabelle 4-11: Spezifikationen für den Reaktorbetrieb im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren**

	Einstellung
Glycerinkonzentration	20 – 25 g/l; Zudosierung nach Bedarf
DHA-Schwellwert	60 g/l
Temperatur	$30 \pm 0.1$ °C
pH	$4.5 \pm 0.1$
Luftvolumenstrom	130 – 360 nl/h
Restvolumen bei Chargenwechsel	2.5 % des Reaktionsvolumens
Reaktionsvolumen	1.25 l
Trägermatrix	Silikonbeschichtete Ralu-Ringe Anzahl: 53 Stück (8.5 % des Reaktionsvolumens) Schüttvolumen: ca. 514 ml



Der zyklisch betriebene Zulaufbetrieb wurde mit 2 ml Zellsuspension aus den Schüttelkolben angeimpft. Über einen Zeitraum von 430 Stunden wurden 15 Zyklen gefahren. Die Konzentrationsverläufe von Glycerin, DHA und Biotrockenmasse sowie der Gelöstsauerstoffkonzentration sind in Abbildung 4-34 über der Zeit aufgetragen.

Unmittelbar nach dem Animpfen des Reaktors aus der Schüttelkolbenkultur war die lag-Phase sehr ausgeprägt. Die Dauer der lag-Phase ging wieder mit steigender Zyklenzahl zurück. Nach dem achten Zyklus konnte fast keine lag-Phase mehr beobachtet werden. Der Verlauf der DHA-Konzentration war dann annähernd linear.



**Abbildung 4-34: Konzentrationsverläufe im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren mit Füllkörpern mit einem nicht optimierten Medium (ohne CaCl<sub>2</sub>; pH 4.5)**

Die während der einzelnen Zyklen gemessene submerse Biomassekonzentration erreichte gegen Zyklusende konstante Werte von  $c_x = 0.5 - 0.6$  g/l. Die Gelöstsauerstoffkonzentration durchlief, äquivalent zu den Referenzversuchen, ein ausgeprägtes Minimum, welches auf respiratorische Effekte zurückzuführen war. Während des zweiten, sechsten und dreizehnten Zyklus wurde der Luftvolumenstrom auf 195 nl/h, 260 nl/h und 360 nl/h erhöht, um eine Sauerstofflimitation zu vermeiden. Die zunehmende Sauerstoffzehrung war auf eine zunehmende Immobilisierung von *Gluconobacter oxydans* an die Trägermatrix zurückzuführen. Die Pro-

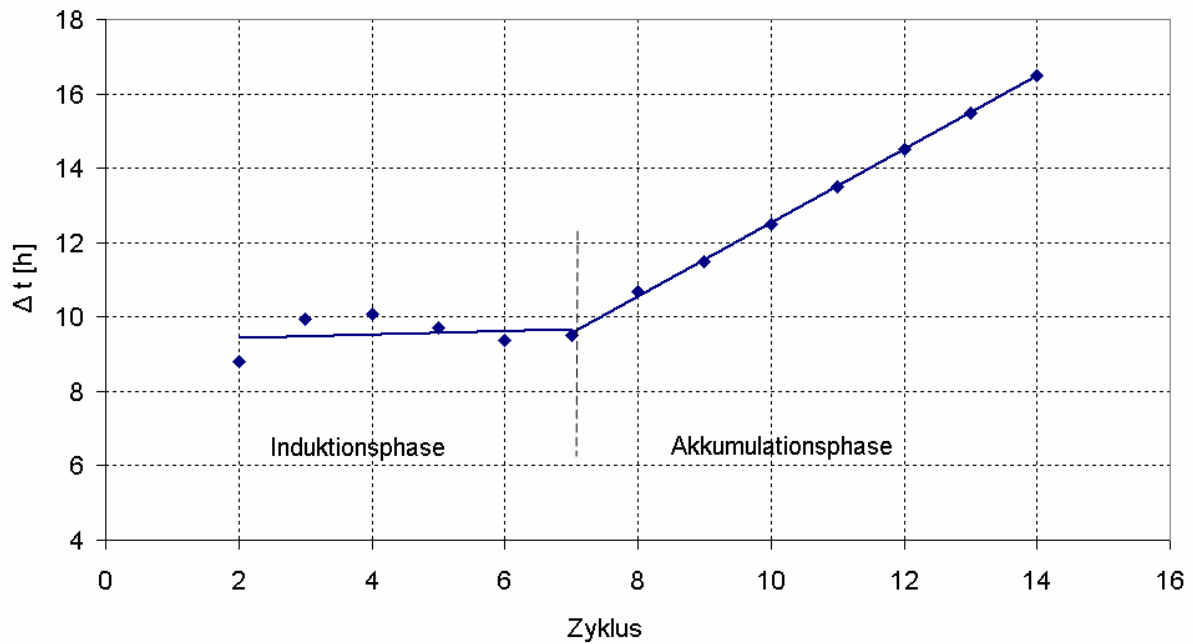
duktionszyklen wurden mit zunehmender Prozessdauer immer kürzer und verringerten sich ausgehend von 51 Stunden im ersten Zyklus auf 20 Stunden im 15. Zyklus, da die Produktbildungsrate des Systems zunahm und gleichzeitig die lag-Phase abnahm. Dies entsprach einer Abnahme der Zyklendauer um 60 %. Die Produktbildungsrate stieg innerhalb von 17 Tagen von 1.45 g/(lh) auf 3.12 g/(lh). Dies entsprach einer Steigerung um ca. 115 %. Der Ertragskoeffizient  $Y_{\text{DHA/Gly}}$  von Produkt aus Substrat schwankte zwischen 0.95 – 0.99 und der Ertragskoeffizient  $Y_{\text{X/Gly}}$  von Zellmasse aus Substrat lag bei ca. 0.01. Beide Ertragskoeffizienten blieben während der Kultivierungsdauer konstant.

Verglichen mit der maximalen Produktbildungsrate der Referenzversuche von 1.86 g/(lh) stieg die Produktbildungsrate mit immobilisierten Zellen um ca. 70 %. Wie bereits erwähnt, zeigten die Läufe im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren ohne Zellrückhaltung, dass die Produktbildungsrate aufgrund adaptiver Effekte bis zum fünften Zyklus anstieg und ab dem fünften Zyklus ein konstantes Niveau erreichte. Die Zunahme der Produktbildungsrate mit Zellrückhaltung resultierte hingegen aus einer Überlagerung von adaptiven Effekten und dem zunehmenden Einfluss der Immobilisierung. Da beide Versuchsreihen unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, war anzunehmen, dass die adaptiven Effekte ungefähr von gleicher Ausprägung waren. Um den Grad der Immobilisierung darzustellen, wurde deshalb der Einfluss der Immobilisierung vom Einfluss der adaptiven Effekte mit Hilfe von Gleichung (4-1) separiert:

$$\Delta t_i = t_{\text{Ref } i} - t_{\text{Immobi } i} \quad (4-1)$$

mit  $i$  = Zyklusnummer

Durch die Zeitdifferenz  $\Delta t_i$  der Zyklendauer des  $i$ -ten Zyklus des Referenzverlaufes mit der entsprechenden Zykluszeit des Versuches mit Zellrückhaltung konnte nun die Akkumulation des Biofilms in Abhängigkeit der Zyklusanzahl dargestellt werden. Auf diese Weise konnten die Adaptionseffekte der Zellen kompensiert werden. In Abbildung 4-35 ist der Verlauf der Biomasseakkumulation ab dem zweiten Zyklus quantitativ dargestellt. Da der Verlauf des ersten Zyklus stark vom Zustand des Inokulates abhing, wurde dieser Zyklus in der Auftragung nicht berücksichtigt. Ab dem 8`ten Zyklus der Referenzläufe wurde als Zyklendauer die gemittelte Zyklendauer vom 6`ten bis 8`ten Zyklus verwendet.



**Abbildung 4-35: Quantitative Darstellung des Verlaufs der Biomasseakkumulation durch das Auftragen der Zyklusanzahl über die zeitliche Differenz der Produktionszyklen nach Gleichung (4-1)**

In Abbildung 4-35 sind, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, die verschiedenen Phasen der Biomasseakkumulation ersichtlich. In der Induktionsphase, in der die Primärbesiedelung stattfand, mussten sich die Zellen an die herrschenden Bedingungen im Reaktor adaptieren. Die immobilisierte Biomasse wirkte sich noch nicht signifikant auf das System aus. Die Länge der Induktionsphase ging bis zum 6. Zyklus. Danach ging die Biofilmbildung in eine lineare Akkumulationsphase über. Die Akkumulation des Biofilms erfolgte durch die Adsorption neu hinzukommender Organismen und das Wachstum bereits anhaftender Zellen. Die Plateauphase und die damit verbundene maximale Biomassebelastung wurde in den durchgeführten Experimenten nicht erreicht.

Es wurde eine sukzessive Steigerung der Produktbildungsrate während des Kultivierungsprozesses erzielt. Dafür war die Zunahme der Anzahl der aktiven immobilisierten Mikroorganismen verantwortlich. Das zyklisch betriebene Zulaufverfahren mit immobilisierten Zellen zeigte demnach deutliche Vorteile gegenüber der Betriebsweise ohne Zellrückhaltung. In Tabelle 4-12 sind die Ertragskoeffizienten  $Y_{\text{DHA/Gly}}$  und  $Y_{\text{X/Gly}}$  und die maximalen Produktbil-

dungsraten der verschiedenen Versuchsreihen im Vergleich zu den Versuchsreihen von Hekmat [2001; 2003] im Rieselbettreaktor dargestellt.

**Tabelle 4-12: Vergleich von Ertragskoeffizient, Produktbildungsrate und Raum-Zeit-Ausbeute ohne und mit Immobilisierung auf Basis hydrophilierter und silikonbeschichteter Raluringe**

Betriebsweise	zyklisch betriebenes Zulaufverfahren mit Zellrückhaltung	zyklisch betriebenen Zulaufverfahren ohne Zellrückhaltung	zyklisch betriebenen Zulaufverfahren mit Zellrückhaltung
Reaktortyp	Rieselbettreaktor	Blasensäule	Blasensäule
Trägermatrix	Hydrophilierter Raluringe [Hekmat; 2001; 2003]	-	Silikonbeschichtete Raluringe
Ertragskoeffizient $Y_{DHA/Gly}$ [g/g]	0.8	0.95 – 0.99	0.95 – 0.99
Reaktionsvolumen $V_R$ [l]	32	1.25	1.25
Reaktorvolumen $V_{ges}$ [l]	Rührkessel: 45	2	2
	Kolonnen: 40		
Füllkörperschüttvol. $V_F$ [l]	40	-	0.514
Änderung der Produktbildungsrate [g/(lh)]	1.6 – 2.8 in 17 Tagen	1.27 – 1.86 in 14 Tagen	1.57 – 3.38 in 17 Tagen
Änderung der Raum-Zeit-Ausbeute <sup>6</sup> [g/(lh)]	0.6 – 1.0 in 17 Tagen	0.8 – 1.2 in 14 Tagen	1 – 2.1 in 17 Tagen

Zum Vergleich dieser drei Betriebsweisen wurde die Raum-Zeit-Ausbeute herangezogen, da so das Verhältnis aus Reaktionsvolumen zu Gesamreaktorvolumen mitberücksichtigt wurde. Für die Zellrückhaltung mit silikonbeschichteten Raluringen in der Blasensäule stellte sich im Vergleich zu der Zellrückhaltung mit hydrophilierten Raluringen im Rieselbettreaktor eine ca.

<sup>6</sup> Die Raum-Zeit Ausbeute ist definiert als  $A_{R-Z} = \frac{V_R}{V_{ges}} \cdot \frac{c_{DHA,1} - c_{DHA,0}}{t_1 - t_0}$  mit 0: Anfang; 1: Ende

um den Faktor 2 höhere Raum-Zeit-Ausbeute ein. In beiden Versuchsreihen betrug die Kultivierungsdauer 17 Tage. Die verbesserte Immobilisierung bei den silikonbeschichteten Raluringen ließ sich auf den Schutz der angelagerten Mikroorganismen vor Abrasion und der verbesserten Sauerstoffversorgung über die Silikonmatrix zurückführen.

#### 4.3.2 Immobilisierung von *Gluconobacter oxydans* bei optimiertem Sorbitmedium

Auf Basis der in Kapitel 3.2 angegebenen Medienzusammensetzung und der Zugabe von 10 g/l Sorbit wurden nun weitere Läufe im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren mit silikonbeschichteten Raluringen im Laborreaktor durchgeführt. Referenzläufe im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren mit einem DHA-Schwellwert von 82 g/l sind in Kapitel 4.2.6 zu finden. Auffallend an diesen Referenzläufen war, dass es im Vergleich zu den Vorversuchen in Kapitel 4.3.1.1 zu keinen nennenswerten adaptiven Anpassungseffekten kam. Zur Durchführung der Versuche im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren mit Zellrückhaltung wurden als Trägermatrix nunmehr 130 neu beschichtete Ralu-Ringe mit einem Feststoffvolumen von 300 ml verwendet. Dies entsprach ca. 25 % des Reaktionsvolumens. Die Beschichtung war ca. 14 % dünner als in den Vorversuchen, da die Silikonbeschichtung durch eine verbesserte Herstellungstechnik feiner aufgetragen werden konnte. Die beschichteten Ralu-Ringe wurden als ungeordnete Packung mit einem Schüttvolumen von 1250 ml oberhalb der Begasungseinrichtung fixiert. Während der Kultivierung waren die Ralu-Ringe vollständig im Nährmedium eingetaucht. Als Inokulat wurden 50 ml einer in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Schüttelkolbenkultur verwendet. Die Spezifikation für den Reaktorbetrieb ist in Tabelle 4-13 zusammengefasst.

**Tabelle 4-13: Spezifikationen für den Reaktorbetrieb im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren mit Immobilisierung; Zugabe von 10 g/l Sorbit**

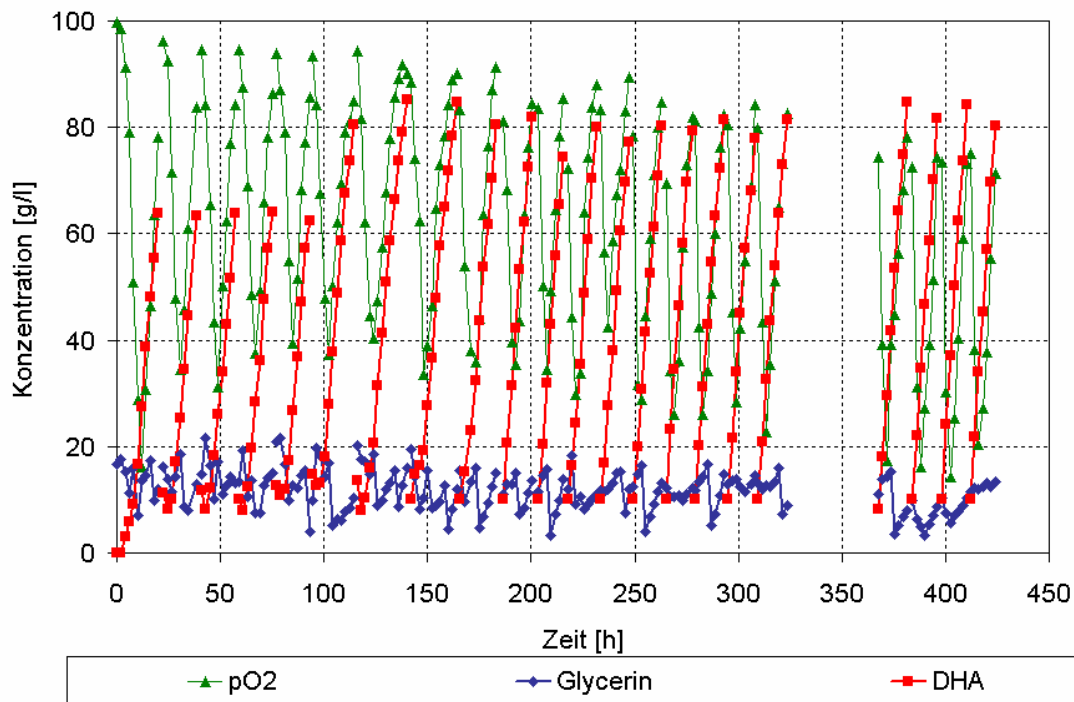
	Einstellung
Glycerinkonzentration	10 – 20 g/l; Zudosierung nach Bedarf
DHA-Schwellwert	65 g/l; 80 g/l;
Temperatur	30 ± 0.1 ° C
pH	5.3 ± 0.1
Luftvolumenstrom	130 nl/h

Reaktionsvolumen	1.2 l
Restvolumen bei Chargenwechsel	2.5 % des Reaktionsvolumens
Trägermatrix	Silikonbeschichtete Ralu-Ringe Anzahl: 130 Stück (25 % des Reaktionsvolumens) Schüttvolumen ca. 1250 ml

Um die Anwuchsbedingungen zu verbessern und somit die Immobilisierung zu beschleunigen wurde der DHA-Schwellwert für die ersten fünf Zyklen auf 65 g/l eingestellt. Über einen Zeitraum von 430 h wurden 26 Zyklen gefahren. Die Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 4-36 über der Zeit aufgetragen. Aufgrund von Wartungsarbeiten an der HPLC wurde zwischen der 320`sten und 370`sten Stunde nicht gemessen. Unmittelbar nach dem Animpfen des Reaktors aus der Schüttelkolbenkultur betrug die lag-Phase 4 h. Die Dauer der lag-Phase ging mit steigender Zyklenzahl zurück. Nach dem siebten Zyklus konnte keine lag-Phase mehr beobachtet werden.

Während dem 23`ten bis zum 25`ten Zyklus wurde die submerse Biomassekonzentration im Reaktor gemessen. Sie betrug gegen Ende der Zyklen  $c_X = 0.6 \pm 0.04$  g/l und lag damit trotz der Zugabe von Sorbit in der gleichen Größenordnung wie bei den Vorversuchen. In Abbildung 4-36 ist zu erkennen, dass die Gelöstsauerstoffkonzentration mit steigender Zyklenzahl abnahm. Dies deutete auf eine zunehmende Immobilisierung von *Gluconobacter oxydans* hin.

Der Ertragskoeffizient  $Y_{DHA/Gly}$  von Produkt aus Substrat betrug  $0.87 \pm 0.05$  und der Ertragskoeffizient  $Y_{X/Gly}$  von Zellmasse aus Substrat lag bei ca. 0.65. Beide Ertragskoeffizienten blieben während der Kultivierungsdauer konstant. Die Raum-Zeit-Ausbeute nahm während der Kultivierungsdauer von 18 Tagen von anfänglich 2.2 g/(lh) auf 3.7 g/(lh) zu. Dies entsprach einer Zunahme um ca. 69 %. Verglichen mit den Referenzläufen aus Kapitel 4.2.6 nahm die Raum-Zeit-Ausbeute um ca. 32 % zu. In Tabelle 4-14 sind die Ergebnisse der Läufe im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren mit und ohne Immobilisierung zusammengefasst.

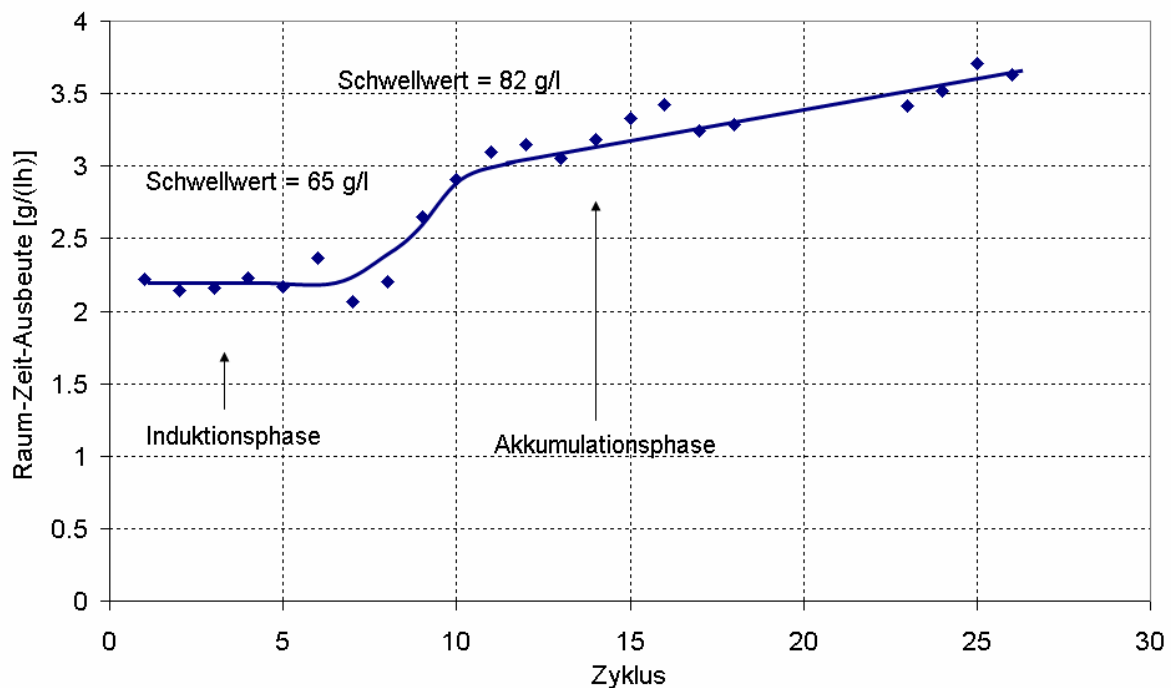


**Abbildung 4-36: Konzentrationsverläufe im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren mit silikonbeschichteten Raluringen in der Laborblasensäule (Wartung der HPLC zwischen 320 – 370 h)**

**Tabelle 4-14: Vergleich der Ertragskoeffizienten und der Produktbildungsraten mit und ohne Immobilisierung; Zugabe von 10 g/l Sorbit**

Betriebsweise	zykl. betr. Zulaufverfahren ohne Zellrückhaltung (Tabelle 4-8; R I)	zykl. betr. Zulaufverfahren mit Zellrückhaltung
Trägermatrix	-	Silikonbeschichtete Raluringe
Ertragskoeffizient $Y_{\text{DHA/Gly}}$ [g/g]	$0.85 \pm 0.04$	$0.87 \pm 0.05$
Reaktionsvolumen $V_R$ [l]	1.5	1.2
Reaktorvolumen $V_{\text{ges}}$ [l]	2	2
Füllkörperschüttvol. $V_F$ [l]	-	1.25
Änderung der Produktbildungsrate [g/(lh)]	$3.74 \pm 0.03$ nach 6 Tagen	3.5 – 5.9 in 18 Tagen
Änderung der Raum-Zeit-Ausbeute [g/(lh)]	$2.81 \pm 0.02$ nach 6 Tagen	2.2 – 3.7 in 18 Tagen

In Abbildung 4-37 ist die Raum-Zeit-Ausbeute der Läufe im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren mit Immobilisierung gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Bis zum fünften Zyklus war für einen Schwellwert von 65 g/l keine signifikante Änderung der Raum-Zeit-Ausbeute erkennbar. Die Immobilisierung befand sich in der Induktionsphase. Das Verhalten der Kultur zwischen dem fünften und zehnten Zyklus wurde vom Übergang von der Induktionsphase in die logarithmische Wachstumsphase geprägt. Überlagert wurde dieser Übergang durch adaptive Anpassungseffekte wegen der Erhöhung des Schwellwertes von 65 g/l auf 82 g/l. Ab dem zehnten Zyklus war eine lineare Zunahme der Raum-Zeit-Ausbeute erkennbar. Die Biofilmmak- kumulation war demnach annähernd linear.



**Abbildung 4-37: Darstellung des Verlaufs der Biomasseakkumulation durch Auftragen der Raum-Zeit-Ausbeute der Produktionszyklen gegen die Zykluszahl**

### 4.3.3 Einfluss des DHA-Schwellwertes auf die Immobilisierung

In Tabelle 4-15 sind die Ergebnisse der Immobilisierung mit und ohne optimierten Nährmedium gegenübergestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass mit dem optimierten Nährmedium sowohl bei den Referenzläufen als auch bei der Immobilisierung deutlich höhere Produktbil-



dungsraten erzielt wurden. Die Ursache dafür war in der Zugabe von 1.5 g/l Calciumchlorid (Kapitel 2.1.3) und 10 g/l Sorbit (Kapitel 4.2.4) zu finden.

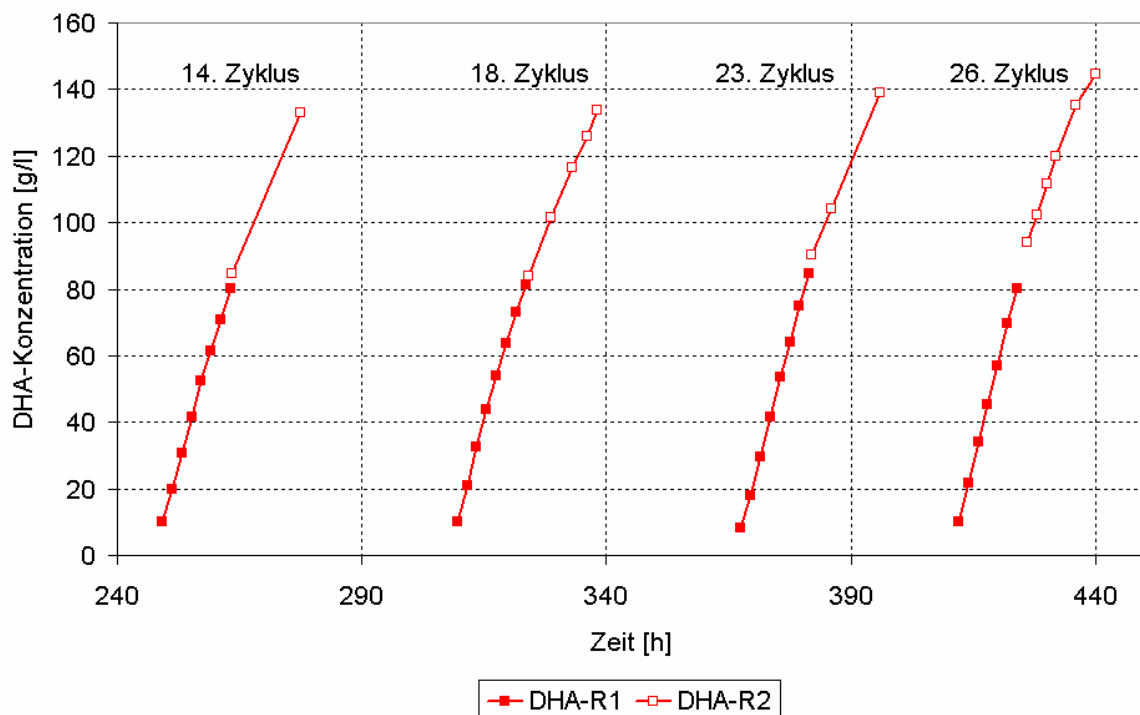
**Tabelle 4-15: Vergleich der Immobilisierung mit und ohne optimiertem Medium in der Laborblasensäule**

	Vorversuche		Versuche mit optimiertem Medium	
	Referenzläufe	Immobilisierung	Referenzläufe	Immobilisierung
DHA-Schwellwert	60 g/l	60 g/l	82 g/l	82 g/l
Raum-Zeit-Ausbeute	1.2 g/(lh)	2.1 g/(lh)	2.8 g/(lh)	3.7 g/(lh)
Proz. Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute	75 %		32 %	

Im Vergleich zu den Vorversuchen mit Immobilisierung war die prozentuale Steigerung der Produktbildungsrate mit dem optimierten Medium trotz höheren Schüttvolumens im vergleichbaren Zeitraum um 43 % niedriger. Ein möglicher Grund dafür war, dass die Kultur in den Vorversuchen aufgrund des niedriger angesetzten Schwellwertes von 60 g/l im Vergleich zu 82 g/l besseren Bedingungen für das Wachstum und folglich für die Immobilisierung ausgesetzt war. Die besseren Wachstumsbedingungen resultierten dabei aus einer niedrigeren integralen DHA-Inhibition. Allgemein lässt sich feststellen, dass mit zunehmendem DHA-Schwellwert die Immobilisierung erschwert wurde.

#### 4.3.4 Zweistufiges zyklisch betriebenes Zulaufverfahren mit Zellrückhaltung

In einem zweiten Schritt wurde das Verhalten der Kultur nach dem Chargenwechsel in der zweiten Reaktorstufe (Rührkessel; Reaktionsvolumen = 1.2 l) untersucht. In Abbildung 4-38 ist das DHA-Konzentrationsprofil für das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren mit Immobilisierung im ersten Reaktor und ohne Immobilisierung im zweiten Reaktor dargestellt.



**Abbildung 4-38: DHA-Konzentrationsprofil des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens in der Laborreaktoranlage mit Immobilisierung, DHA-Schwellwert = 82 g/l, Darstellung von 4 einzelnen Zyklen aus Abbildung 4-36 und manuell vermessener zweiter Reaktorstufe**

Verglichen mit den Referenzläufen von Kapitel 4.2.6 ist ersichtlich, dass die erzielte Produktbildungsrate der zweiten Reaktorstufe mit 3.52 g/(lh) über dem Wert der zweiten Reaktorstufe der Referenzläufe von 3.36 g/(lh) lag. Die erreichte DHA-Endkonzentration lag hingegen mit durchschnittlich 137.5 g/l deutlich unter dem Referenzwert von 161.5 g/l (siehe Tabelle 4-16). Aufgrund der durch die Immobilisierung verkürzten Zyklendauer im ersten Reaktor war die Kultivierungsdauer im zweiten Reaktor ebenfalls verkürzt und führte daher zu einer niedrigeren DHA-Endkonzentration.

**Tabelle 4-16: Vergleich des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens in der Laborreaktoranlage mit und ohne Immobilisierung**

	Zweistufiges zyklisch betriebenes Zulaufverfahren mit Immobilisierung	Zweistufiges zyklisch betriebenes Zulaufverfahren ohne Immobilisierung (Kap. 4.2.6)
DHA-Schwellwert [g/l]	81.7 ± 2.1 g/l	82.3 ± 0.6
DHA-Endkonzentration [g/l]	137.5 ± 5.5	161.5 ± 8.7
Produktbildungsrate [g/(lh)] (erste Stufe)	5.9 nach 18 Tagen $V_R = 1.2\ l$	3.74 ± 0.03 nach 6 Tagen $V_R = 1.5\ l$
Produktbildungsrate [g/(lh)] (zweite Stufe)	3.52 ± 0.1 $V_R = 1.2\ l$	3.36 ± 0.22 $V_R = 1.47\ l$
Produktbildungsrate [g/(lh)] (RI und RII)	4.71 ± 0.05 $V_R = 2.4\ l$	3.55 ± 0.13 $V_R = 2.97\ l$
Raum-Zeit-Ausbeute [g/(lh)]	2.84	2.64

Eine Erhöhung des DHA-Schwellwertes zur Verlängerung der Zykluszeit der ersten und zweiten Stufe würde zwar zu einer höheren DHA-Endkonzentration führen, allerdings auch zu einer schlechteren Immobilisierung in der ersten Stufe, weil die immobilisierte Biomasse einer längeren Zeit höheren DHA-Konzentrationen ausgesetzt wäre. Um sowohl eine adäquate Immobilisierung als auch eine hohe Produktendkonzentration zu erreichen, wäre daher eine dritte Reaktorstufe notwendig.

#### 4.3.5 Zusammenfassung der Immobilisierungsversuche

Die zur Immobilisierung verwendeten silikonbeschichteten Ralu-Ringe boten aufgrund der in Kapitel 2.4 beschriebenen Eigenschaften wie der Permeabilität der Silikonbeschichtung für Sauerstoff eine gute Voraussetzung für die Immobilisierung von *Gluconobacter oxydans*. Mit Hilfe der silikonbeschichteten Ralu-Ringe konnte die aktive Biomasse in der ersten Reaktorstufe des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens erhöht und somit die Produktbildungsrate des Systems gesteigert werden. Die Biofilmbildung erfolgte dabei nach dem im Kapitel 2.3 beschriebenen klassischen Schema. Die Induktionsphase dauerte ca. 100 h. An-

schließlich ging die Biofilmbildung in die Akkumulationsphase über. Nach einer Kultivierungsdauer von ca. 17 Tagen wurde der Versuch wegen technischer Probleme noch vor dem Erreichen der von Flemming postulierten Plateauphase abgebrochen [Flemming; 1991]. Während dieser Zeitspanne ließ sich die Zunahme der aktiven Biomasse in der Laborblasensäule durch Immobilisierung anhand des stärker werdenden Sauerstoffverbrauches und der kürzer werdenden Zykluszeit bis zum Erreichen des DHA-Schwellwertes erkennen (Abbildung 4-36). Auf Basis der optimierten Nährmedienzusammensetzung und einem DHA-Schwellwert von 82 g/l konnte die Raum-Zeit-Ausbeute im Laborreaktor um 32 % auf 3.7 g/(lh) gesteigert werden. Zudem konnte beobachtet werden, dass die Zunahme der Biomasse während der Akkumulationsphase entscheidend von der Höhe des DHA-Schwellwertes beeinflusst wurde. Eine Erhöhung des DHA-Schwellwertes führte zu einer höheren Produktinhibition und schließlich zu einer langsameren Ausbildung des Biofilms.

Die sukzessive Erhöhung der Produktbildungsrate in der ersten Reaktorstufe führte zu einer Verkürzung der Zykluslaufzeit in Reaktor 1 und 2, da der DHA-Schwellwert schneller erreicht wurde. Durch die verkürzte Kultivierungsdauer nahm die DHA-Endkonzentration bei einem DHA-Schwellwert von 82 g/l von 161.5 g/l auf 137.5 g/l ab. Um höhere DHA-Endkonzentrationen mit einer Immobilisierung in Reaktor 1 zu erreichen, wäre es deshalb zweckmäßig, eine weitere Reaktorstufe hinzuzufügen und den Prozess im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren als dreistufige Reaktorkaskade zu betreiben. Dies ist allerdings mit deutlichen Investitionskosten verbunden. Um die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens zu erhöhen, bietet es sich an, nur die erste Stufe unter steriltechnischen Bedingungen zu betreiben. Den Vorteilen einer semikontinuierlichen Prozessführung im Vergleich zur diskontinuierlichen Prozessführung stehen die Nachteile einer aufwändigeren Handhabung und höhere Investitionskosten gegenüber. Zudem ist das Langzeitverhalten der immobilisierten Kultur nicht bekannt. Abschließend lässt sich feststellen, dass das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren mit Immobilisierung eine interessante Alternative zu dem in der Industrie betriebenen Zulaufverfahren darstellt.

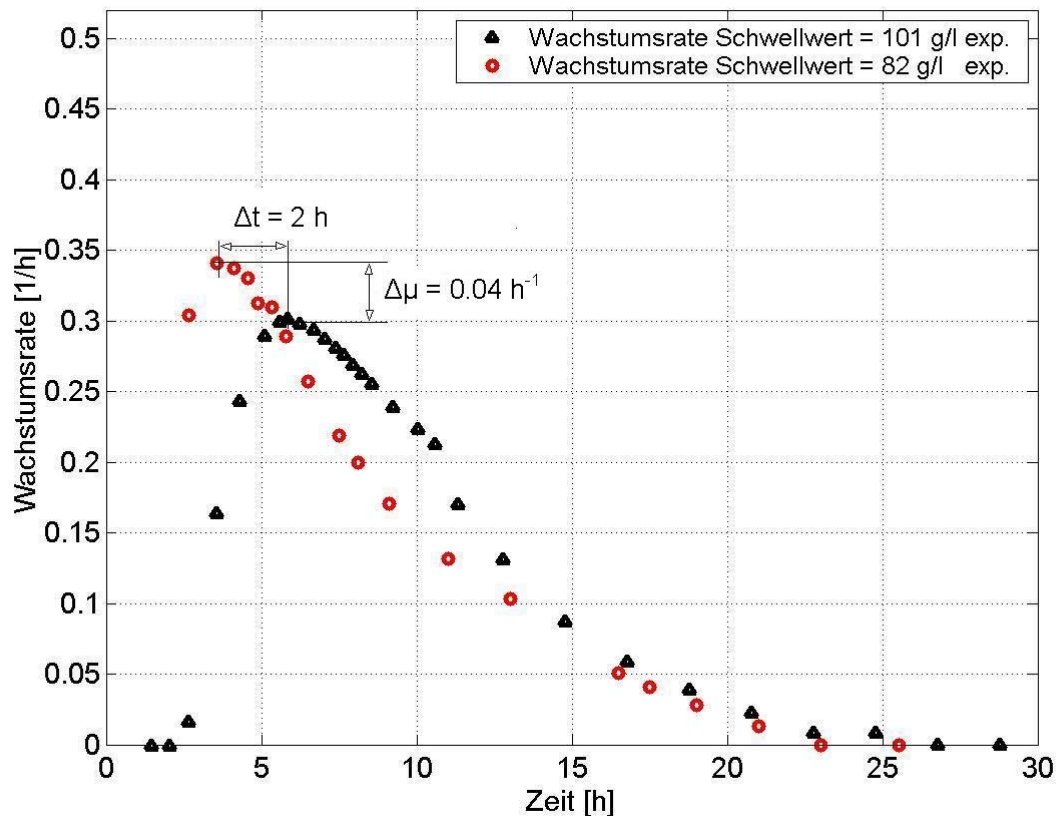
## 4.4 Modellrechnungen und Vergleich mit Messungen

### 4.4.1 Verdeutlichung des Einflusses der Vorgeschichte der Kultur

Um die Relevanz des in Kapitel 2.5.1 dargestellten Verzugszeitmodelles zu verdeutlichen, wurde der Verlauf der Wachstumsrate für einen Zyklus im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren im Labormaßstab mit DHA-Schwellwerten von 82 g/l und 101 g/l untersucht. In Abbildung 4-39 ist der Verlauf dargestellt. Zur Darstellung der Wachstumsrate wurde die experimentell bestimmte Biotrockenmassekonzentration durch einen geeigneten Fit geglättet. Aus den geglätteten Werten wurde schließlich die Wachstumsrate mit Hilfe von Gleichung (4-2) ermitteln:

$$\mu_{\text{exp}}(i+0,5) = \frac{2}{c_{X,\text{ges}}(i+1) + c_{X,\text{ges}}(i)} \cdot \frac{c_{X,\text{ges}}(i+1) - c_{X,\text{ges}}(i)}{t(i+1) - t(i)} \quad (4-2)$$

Zur Berechnung der Wachstumsrate  $\mu_{\text{exp}}$  wurde die Biotrockenmassekonzentration  $c_{X,\text{ges}}$  anstatt der Konzentration der teilungsfähigen Zellen  $c_{X,1}$  herangezogen, da die verschiedenen Zelltypen nur unter erheblichen Aufwand separat gemessen werden konnten. Trotz dieses systematischen Fehlers bei der Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate blieb die relative Aussagekraft der Ergebnisse erhalten.



**Abbildung 4-39: Verlauf der Wachstumsrate über der Zeit für einen Zyklus im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren im Laborblasensäulenreaktor mit DHA-Schwellwerten von 82 g/l und 101 g/l; Restvolumen bei Chargenwechsel: 2 %**

Die schlagartige Veränderung der Konzentrationsverhältnisse nach einem Chargenwechsel im Reaktor führte zu einer verzögerten Zunahme der Wachstumsrate. Ein DHA-Schwellwert von 82 g/l verursachte eine Verzugszeit von ca. 4 h bis zum Erreichen der maximalen Wachstumsrate. Ein DHA-Schwellwert von 101 g/l sogar von ca. 6 h.

Ein weiteres Beispiel stellen die in Abbildung 4-4 (S. 72) dargestellten Ergebnisse dar. Hier ist deutlich erkennbar, dass die Kultur aufgrund der unterschiedlich langen Einwirkdauer von 130 g/l DHA erst deutlich verzögert mit einer signifikant messbaren Sauerstoffveratmung begann. Die unterschiedliche Länge der Lagphasen war auf die Vorgeschichte zurückzuführen. Beide Beispiele belegen daher, dass nicht nur die aktuell im Milieu herrschenden Bedingungen sondern auch die Vorgeschichte eine große Rolle spielen.

## 4.4.2 Anpassung des Modells an experimentelle Daten

### 4.4.2.1 Parameteroptimierung

Im Kapitel 2.5 wurde für das semikontinuierliche Verfahren ein geeignetes kinetisches Modell entwickelt, welches an experimentelle Daten angepasst werden musste. Das kinetische Modell besitzt 35 Parameter welche überwiegend experimentell nicht direkt zugänglich waren. Die Bestimmung eines geeigneten Parametersatzes konnte nur numerisch erfolgen, da das verwendete Differenzialgleichungssystem analytisch nicht lösbar war.

Bei der Parameteroptimierung wurde als kennzeichnende Größe die Fehlerquadratsumme bestimmt. Als Minimierungskriterium galt es, die kleinste mögliche Fehlerquadratsumme zu finden (Gleichung 4-3):

$$\theta^* = \theta^* \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n \frac{(y_{ji} - f(x_{ji}, \theta^*))^2}{\sigma_{y_{ji}}^2} \quad (4-3)$$

Es wurde je Messgröße  $k$  das Quadrat des Abstandes jedes Messwertes  $n$  von den berechneten Werten ermittelt, durch die entsprechende Varianz  $\sigma^2$  dividiert und anschließend summiert. Je kleiner die Fehlerquadratsumme war, desto besser stimmten die berechneten mit den experimentellen Werten überein. Durch eine zusätzliche Gewichtung des Fehlerquadrats der einzelnen Messgrößen mit den in Tabelle 4-17 dargestellten Multiplikatoren wurden die Messwerte für die DHA-Konzentration stärker berücksichtigt, um eine bessere Anpassung an diese Werte zu erhalten.

**Tabelle 4-17: Gewichtungsfaktoren der einzelnen Kenngrößen**

Kenngröße	$c_{\text{DHA}}$	$c_{\text{O}}$	$c_{\text{x,ges}}$	$\mu$	$\pi$
Gewichtung	2	1	1	1	1

Zur Parameteroptimierung wurden die Monte-Carlo Methode und die Simplex-Methode herangezogen. Um einen geeigneten Startbereich für die Monte Carlo Methode zu ermitteln, war es von besonderer Bedeutung, mit einem geeigneten Anfangswertdatensatz zu beginnen. Für

die kinetischen Parameter von  $\mu$  und  $\pi$  wurde dieser nach dem Modell von Bonomi [1992] mittels Linearisierung ermittelt. Für die Parameter des Verzugszeitmodells wurden die Werte von Kruppa [1997] verwendet. Geeignete Startwerte für die Parameter  $\mu_{\text{steril}}$ ,  $\mu_{\text{tot}}$ ,  $K_{\text{DHA,steril}}$  und  $K_{\text{DHA,tot}}$  des Segregationsmodells wurden empirisch auf Basis des in Abbildung 4-16 (Seite 84) dargestellten DHA-Einflusses auf die Kultur gewonnen. Zur genauen Ermittlung des Fehlerquadratminimums wurde schließlich der beste Parametersatz der Monte-Carlo-Methode für eine weitere Optimierung als Startwert für die Simplex-Methode herangezogen.

#### 4.4.2.2 Anpassung an experimentelle Werte zur Ermittlung der Modellparameter

Die Parameteranpassung erfolgte jeweils an einen Datensatz aus dem Laborreaktor und an einen Datensatz aus der Technikumsanlage, da sich der Labormaßstab vom Technikumsmaßstab durch niedrigere Biomassekonzentrationen und Produktbildungsraten unterschied. Eine Überprüfung der Modellgüte wurde anhand der Laborreaktoranpassung vorgenommen, da hierfür eine größere Menge an experimentellen Werten zur Verfügung stand. Die Optimierung des zweistufigen Verfahrens wurde hingegen mit der Technikumsanpassung vorgenommen, da hier eine bessere Übertragbarkeit auf den großtechnischen Maßstab gegeben war. Als geeigneter experimenteller Datensatz für die Anpassung an die Technikumsversuche wurden die Messwerte des zweiten bis vierten Zyklus im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren aus Abbildung 4-26 verwendet. Der Parametersatz für den Laborreaktor wurde an den dritten und fünften Lauf des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens mit einem DHA-Schwellwert von 101 g/l in Abbildung 4-32 angepasst. Es erfolgte für beide Parametersätze neben der Anpassung an die DHA-, Sauerstoff- und BTM-Konzentrationen auch eine Anpassung an die kinetischen Größen  $\mu$  und  $\pi$ , um eine optimale Bestimmung der Verzugszeitparameter zu ermöglichen.

Um die Anzahl der zu optimierenden Parameter so gering wie möglich zu halten, wurden die experimentell zugänglichen Parameter von der Optimierung ausgeschlossen. So war beispielsweise der  $k_{\text{L}}a$  durch eine Vielzahl von Experimenten hinreichend genau bestimmt, so dass eine Optimierung keine Verbesserung bewirkt hätte. Auch der Ertragskoeffizient  $Y_{\text{P/S}}$  wurde bereits durch mehrere Versuche mit dem zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren hinreichend experimentell bestimmt. Des Weiteren war es beim vorliegenden Verfahren nicht notwendig, die Parameter zu optimieren, die sich auf den Glycerinverbrauch bezo-



gen, da sie experimentell hinreichend genau in der Arbeit von Wethmar [1997] bestimmt wurden. Zudem wurde die Glycerinkonzentration auf 15 g/l konstant gehalten, was zur Folge hatte, dass weder Glycerinlimitierung noch -inhibierung auftraten. Die folgenden 5 Parameter wurden deshalb jeweils nicht optimiert (Tabelle 4-18 und Tabelle 4-19):

**Tabelle 4-18: Festgelegte nicht optimierte Parameter für den Laborreaktor (5 Parameter)**

$Y_{\text{DHA, Gly}} = 8.50 \cdot 10^{-1}$	[g/g]	(experimentell bestimmt)
$Y_{\text{Sorbitose, Sorbit}} = 8.00 \cdot 10^{-1}$	[g/g]	(experimentell bestimmt)
$k_L \cdot a = 1.62 \cdot 10^2$	[1/h]	(experimentell bestimmt)
$W = 1.16 \cdot 10^2$	[g/l]	(Wethmar [1998])
$K_{\text{Gly}} = 8.00 \cdot 10^{-1}$	[g/l]	(Wethmar [1998])

**Tabelle 4-19: Festgelegte nicht optimierte Parameter für die Technikumsanlage (5 Parameter)**

$Y_{\text{DHA, Gly}} = 8.10 \cdot 10^{-1}$	[g/g]	(experimentell bestimmt)
$Y_{\text{Sorbitose, Sorbit}} = 8.00 \cdot 10^{-1}$	[g/g]	(experimentell bestimmt)
$k_L \cdot a = 3.80 \cdot 10^2$	[1/h]	(experimentell bestimmt)
$W = 1.16 \cdot 10^2$	[g/l]	(Wethmar [1998])
$K_{\text{Gly}} = 8.00 \cdot 10^{-1}$	[g/l]	(Wethmar [1998])

Die Ertragskoeffizienten  $Y_{\text{Gly, DHA}}$  zwischen dem Labor- und Technikumsbetrieb unterscheiden sich um ca. 5 %. Die Ertragskoeffizienten  $Y_{\text{Sorbitose, Sorbit}}$  sind hingegen identisch. Die Abweichung des  $k_L a$  zwischen der Labor- und Technikumsanlage ist auf die unterschiedliche Begasungsart zurückzuführen.

### 4.4.3 Parametersatz für den Laborreaktor

Zunächst wurden die Parameter an die Laborreaktorversuche mit den in Tabelle 4-20 bis Tabelle 4-22 aufgeführten Startwerten und Randbedingungen angepasst. Für die Modellrechnungen wurde auf die experimentell zugrundeliegenden Startwerte zurückgegriffen. Dabei wurde angenommen, dass die im Inokulat enthaltene Biomasse keine sterilen und toten Zellen enthielt ( $c_{X,ges,t=0} = c_{X,l,t=0} = 0.003 \text{ g/l}$ ). Die Anpassung erfolgte an die Daten des dritten und fünften Laufes des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens mit einem DHA-Schwellwert von 101 g/l in Abbildung 4-32 (Seite 103).

**Tabelle 4-20 : Startwerte für Sauerstoff, Substrate und Produkte**

Anfangskonzentration des Sauerstoffes:	$c_{O,t=0} = 7.5$	[mg/l]
Anfangskonzentration des Substrates Glycerin:	$c_{Gly,t=0} = 15$	[g/l]
Anfangskonzentration des Substrates D-Sorbit:	$c_{Sorbit,t=0} = 10$	[g/l]
Anfangskonzentration des Produktes DHA:	$c_{DHA,t=0} = 0$	[g/l]
Anfangskonzentration des Produktes L-Sorbose:	$c_{Sorbose,t=0} = 0$	[g/l]
Anfangskonzentration der Bakterien:	$c_{X,ges,t=0} = 0.003$	[g/l]
Anfangskonzentration der lebenden Bakterien:	$c_{X,l,t=0} = 0.003$	[g/l]
Anfangskonzentration der sterilen Bakterien:	$c_{X,steril,t=0} = 0$	[g/l]
Anfangskonzentration der toten Bakterien:	$c_{X,tot,t=0} = 0$	[g/l]

**Tabelle 4-21: Startwerte für die Produktbildungs- und Wachstumsraten**

Anfangswert der inst. Produktbildungsrate für DHA:	$\pi_{inst,DHA,t=0} = 0$	[g/(gh)]
Anfangswert der inst. Produktbildungsrate für L-Sorbose:	$\pi_{inst,Sorbose,t=0} = 0$	[g/(gh)]
Anfangswert der inst. Wachstumsrate durch Glycerin:	$\mu_{inst,Gly,t=0} = 0$	[1/h]
Anfangswert der ersten Ableitung der inst. Wachstumsrate:	$\mu'_{inst,Gly,t=0} = 0$	[1/h <sup>2</sup> ]
Anfangswert der inst. Wachstumsrate durch D-Sorbit:	$\mu_{inst,Sorbit,t=0} = 0$	[1/h]
Anfangswert der ersten Ableitung der inst. Wachstumsrate:	$\mu'_{inst,Sorbit,t=0} = 0$	[1/h <sup>2</sup> ]

**Tabelle 4-22: Randbedingungen für den Laborreaktor**

Reaktionsvolumen Reaktor 1:	$V_R = 1.5$	[l]
Restvolumen der Flüssigkeit nach der Entleerung:	$V_{\text{Rest}} = 0.03$	[l]
Schwellwert für den Chargenwechsel:	$SW_{\text{DHA}} = 101$	[g/l]

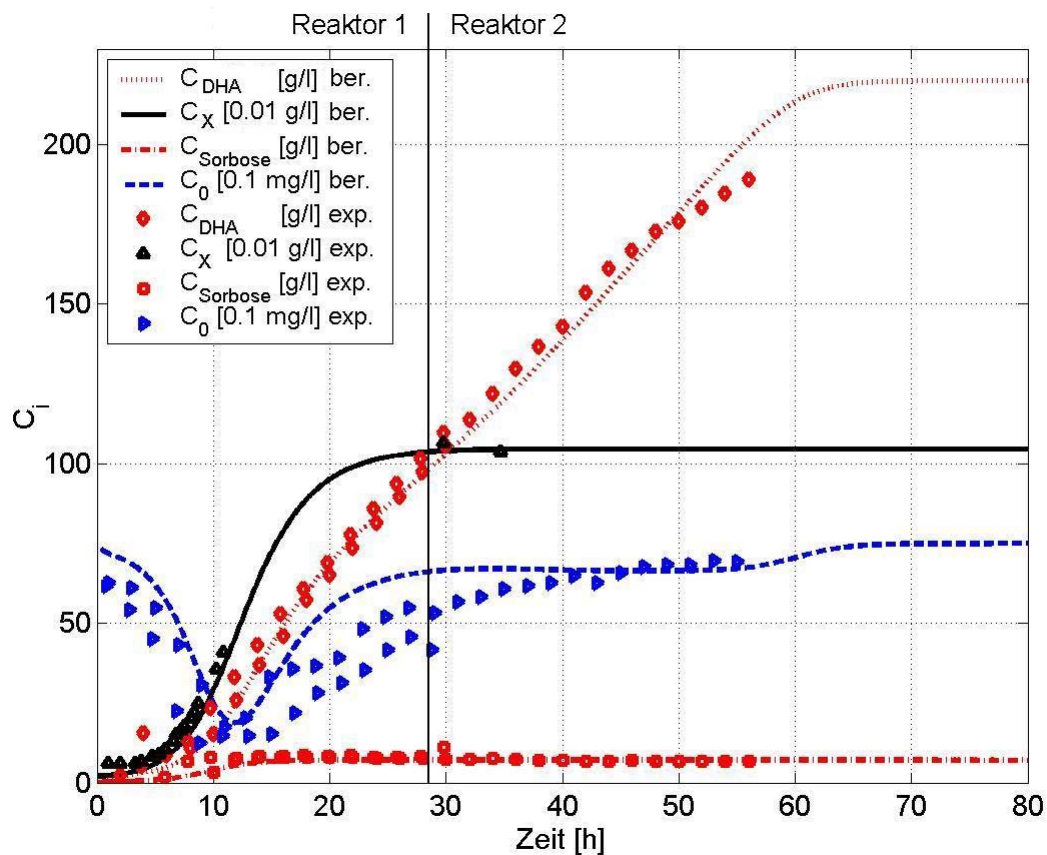
Tabelle 4-23 zeigt die Ergebnisse der Parameteroptimierung für den Laborreaktor.

**Tabelle 4-23: Optimierter Parametersatz des segregierten Verzugszeitmodells für den Laborreaktor (30 Parameter)**

Kinetik			
$\mu_{\text{max,Gly}} = 2.37 \cdot 10^{-1}$	[1/h]	$A_{\text{DHA}} = 9.91 \cdot 10^1$	[g/g]
$\mu_{\text{max,Sorbit}} = 4.71 \cdot 10^{-1}$	[1/h]	$A_{\text{Sorbitose}} = 2.39 \cdot 10^1$	[g/g]
$K_{\text{O,Gly}} = 3.14 \cdot 10^{-2}$	[mg/l]	$B_{\text{max}} = 1.56$	[g/(g·h)]
$K_{\text{O,Sorbit}} = 4.96 \cdot 10^{-2}$	[mg/l]	$K_{\text{b,Gly}} = 2.80 \cdot 10^{-1}$	[g/l]
$K_{\text{Sorbit}} = 5.28$	[g/l]	$K_{\text{b,O}} = 5.92 \cdot 10^{-3}$	[mg/l]
$K_{\text{DHA}} = 4.55 \cdot 10^{-2}$	[l/g]		
Stöchiometrie			
$Y_{\text{X,Gly}} = 9.70 \cdot 10^{-3}$	[g/g]	$Y_{\text{X,O,Sorbit}} = 6.99 \cdot 10^{-4}$	[g/g]
$Y_{\text{X,Sorbit}} = 5.30 \cdot 10^{-1}$	[g/g]	$Y_{\text{DHA,O}} = 2.90 \cdot 10^{-2}$	[g/g]
$Y_{\text{X,O,Gly}} = 5.04 \cdot 10^{-5}$	[g/g]	$Y_{\text{Sorbitose,O}} = 1.21 \cdot 10^{-1}$	[g/g]
Verzugszeit			
$D_{\text{X,Gly}} = 5.41$	[-]	$T_{\text{DHA}} = 2.49$	[h]
$D_{\text{X,Sorbit}} = 5.09$	[-]	$T_{\text{Sorbitose}} = 3.31 \cdot 10^{-1}$	[h]
$T_{\text{X,Gly}} = 3.72 \cdot 10^{-2}$	[h]	$R_{\text{DHA}} = 8.43 \cdot 10^{-2}$	[l/(g·h)]
$T_{\text{X,Sorbit}} = 3.51 \cdot 10^{-1}$	[h]	$R_{\text{Sorbitose}} = 7.47 \cdot 10^{-2}$	[l/(g·h)]
Segregation			

$\mu_{\text{steril}} = 2.81 \cdot 10^{-3}$	[1/h]	$K_{\text{DHA,steril}} = 3.29 \cdot 10^{-2}$	[l/g]
$\mu_{\text{tot}} = 1.37 \cdot 10^{-11}$	[1/h]	$K_{\text{DHA,tot}} = 1.10 \cdot 10^{-1}$	[l/g]
$S = 3.88$	[1/h]		

Die grafische Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 4-40 gibt darüber Aufschluss, wie gut die Anforderungen an das Modell erfüllt wurden.



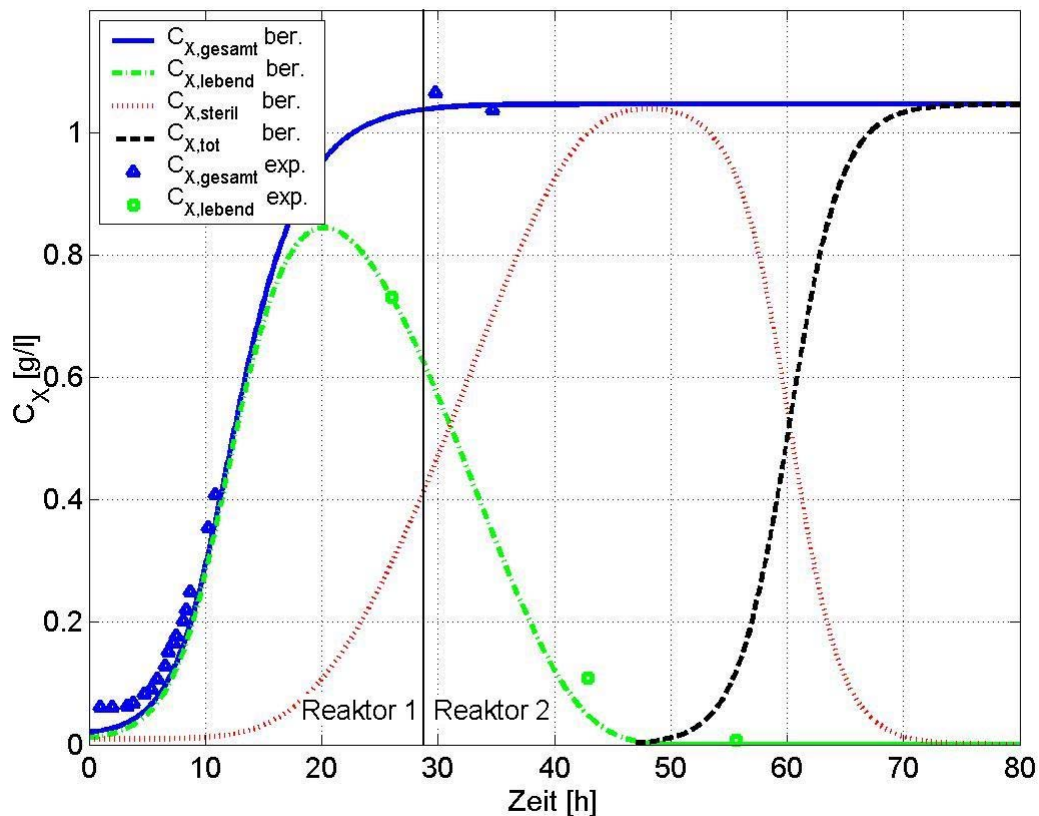
**Abbildung 4-40: Ergebnis der Anpassung des segregierten Verzugszeitmodells für den Laborreaktor mit einem DHA-Schwellwert von 101 g/l an die Messwerte aus dem dritten und fünften Zyklus des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens aus Abbildung 4-32. Die Messungen erfolgten bis ca. 55 h nach dem Beginn der Zyklen. Die Messung der Biotrockenmassekonzentration erfolgte manuell**

Wie ersichtlich, liefert das Modell sowohl qualitativ als auch quantitativ eine gute Beschreibung für die Verläufe von DHA, Biomasse und Sorbose. Der Verlauf der Sauerstoffkonzentration konnte hingegen nur qualitativ beschrieben werden. Die Sauerstoffkonzentration durch-

lief nach ca. 12 h ein ausgeprägtes Minimum, da sich zu diesem Zeitpunkt eine zunehmende Inhibierung durch DHA bemerkbar machte. Der Konzentrationsverlauf für das Substrat D-Sorbit (nicht dargestellt), welches bei jedem Chargenwechsel diskontinuierlich mit jeweils 10 g/l im Reaktor vorgelegt wurde, nahm mit fortschreitender Prozessdauer ab. Nach ca. 25 h stand der Kultur kein D-Sorbit mehr zur Verfügung. Zudem konnte eine sehr gute Anpassung an die Sorbose- und DHA-Konzentrationsverläufe erzielt werden. Die mit dem segregierten Verzugszeitmodell berechnete maximal erreichbare DHA-Konzentration lag bei ca. 220 g/l. Abbildung 4-41 und Abbildung 4-42 zeigen die berechneten und experimentellen Konzentrationsverläufe für die gesamte Biomasse und deren Fraktionen lebende, sterile und tote Zellen in Abhängigkeit von der Zeit und der DHA-Konzentration. Die Gesamtzellkonzentration wurde mittels OD-Messung bestimmt und erfolgte manuell. Um eine Schätzung von der Güte des Verlaufes der Konzentration der lebenden Zellen zu bekommen, wurden die Ergebnisse des FISH-Tests aus Kapitel 4.1.5 in die entsprechenden Konzentrationen<sup>7</sup> umgerechnet und neben den experimentellen Werten für die Gesamtzellkonzentration in Abbildung 4-41 und Abbildung 4-42 aufgenommen. Die mit Hilfe des segregierten Verzugszeitmodells berechnete Abnahme der lebenden Zellen in einem DHA-Konzentrationsbereich von 90 g/l bis 200 g/l stimmte relativ gut mit der experimentell ermittelten Abnahme überein. Es lässt sich also feststellen, dass die Umwandlung der lebenden Zellen in sterile Zellen mit Hilfe von Gleichung (2-20) gut beschrieben wurde.

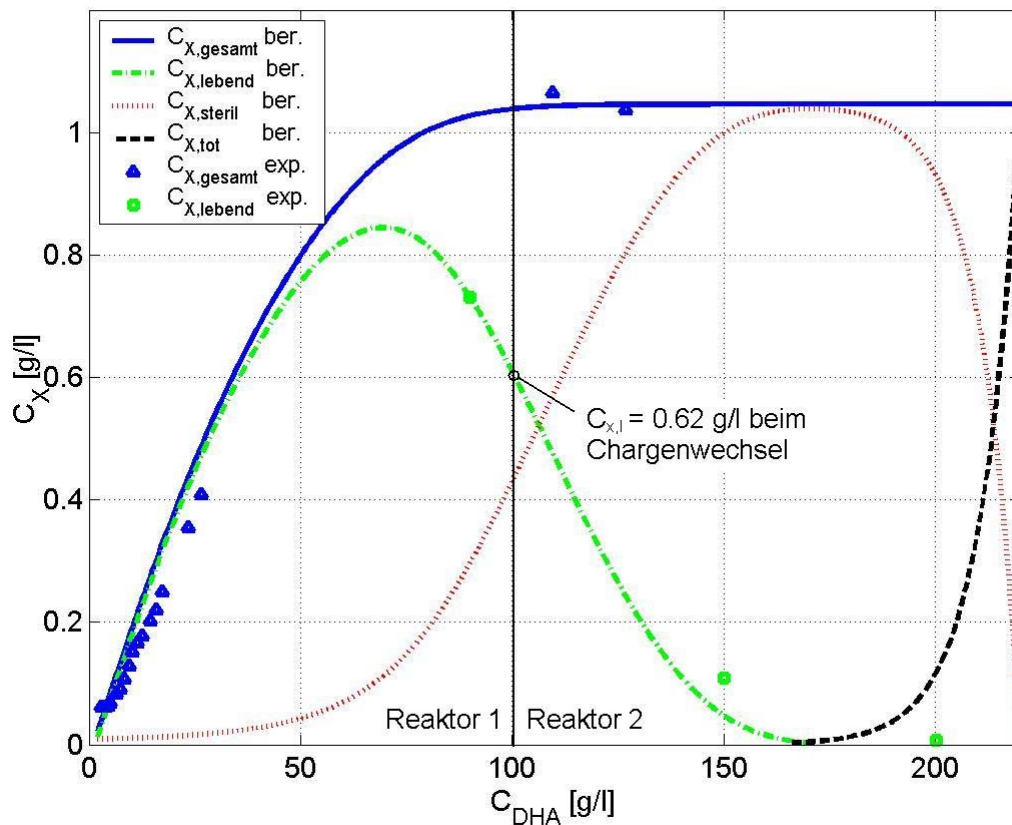
---

<sup>7</sup> Zur Umrechnung der Zellanzahl in ihre entsprechende Masse musste die mittlere Zell-Trockenmasse  $m_{MO}$  ermittelt werden. Als mittlere Zell-Trockenmasse  $m_{MO}$  wurde  $2.9 \cdot 10^{-12}$  g<sub>TM</sub> (Schätzwert) verwendet. Die entsprechende Masse lässt sich wie folgt berechnen:  $m_{Glu. oxy.} = n_{Glu. oxy.} \cdot m_{MO}$



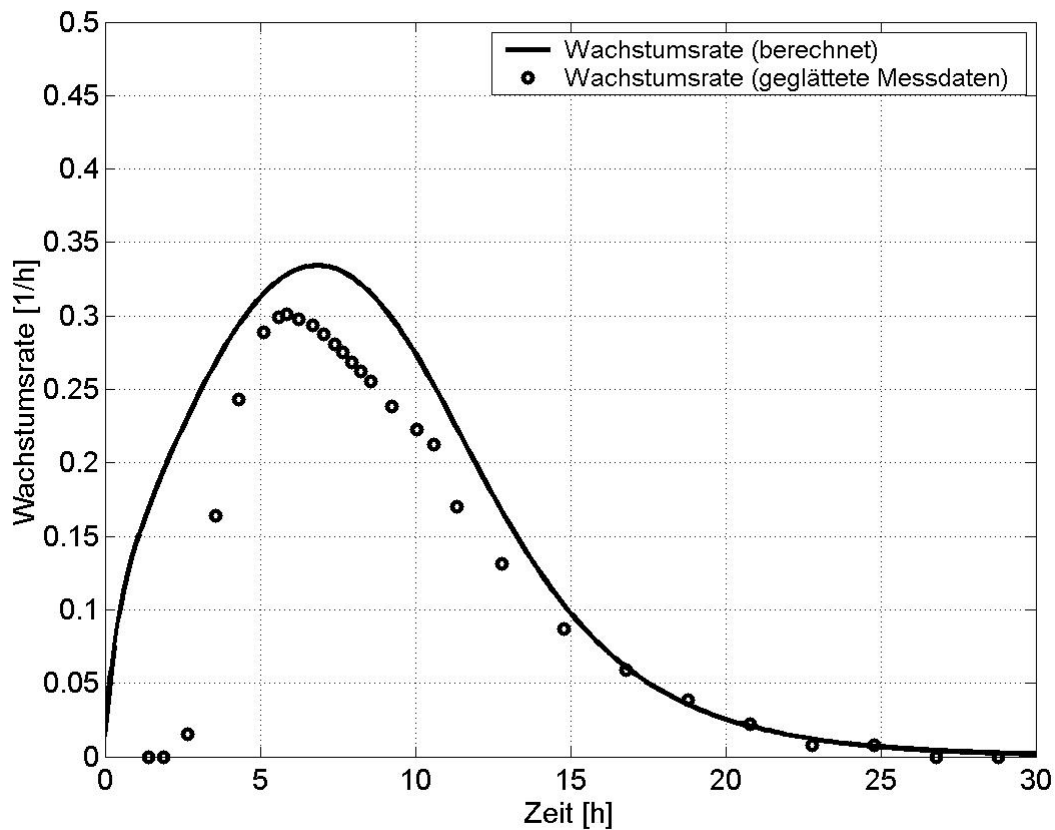
**Abbildung 4-41: Auftragung der berechneten und experimentellen Werte der Gesamtzellkonzentration sowie der einzelnen Zelltypen über der Zeit für den Laborreaktor mit einem DHA-Schwellwert von 101 g/l. Die Gesamtzellkonzentration wurde mittels OD-Messung bestimmt und erfolgte manuell. Die Konzentration der lebenden Zellen wurde mit Hilfe des FISH-Tests bestimmt**

Aus Abbildung 4-41 ist ersichtlich, dass die Konzentration für die lebenden Zellen nach ca. 20 h ihr Maximum erreichte. Dies entsprach einer DHA-Konzentration von ca. 75 g/l (Abbildung 4-42). Die Gesamtzellkonzentration stieg nach diesem Zeitpunkt nur noch wenig an und stagnierte nach 30 h bei einem konstanten Wert von 1.04 g/l. Nach ca. 47 h waren keine lebenden und somit regenerationsfähigen Zellen im System mehr vorhanden. Die DHA-Konzentration betrug zu diesem Zeitpunkt ca. 170 g/l DHA. Nach 75 h war nur noch inaktive Biomasse im System vorhanden. Die maximale DHA-Konzentration lag bei 220 g/l. Das segregierte Verzugszeitmodell war demnach in der Lage, die in Abbildung 4-16 dargestellten experimentellen Erkenntnisse über den DHA-Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung wiederzugeben.



**Abbildung 4-42:** Auftragung der berechneten und experimentellen Werte der Gesamtzellkonzentration sowie der einzelnen Zelltypen über der DHA-Konzentration für den Laborreaktor mit einem DHA-Schwellwert von 101 g/l. Die Gesamtzellkonzentration wurde mittels OD-Messung bestimmt und erfolgte manuell. Die Konzentrationen der lebenden Zellen wurde mit Hilfe des FISH-Tests bestimmt

In Abbildung 4-43 ist der experimentelle und der berechnete Verlauf der spezifischen Wachstumsrate über der Zeit aufgetragen. Die Werte der experimentell bestimmten Wachstumsrate wurden aus Abbildung 4-39 übernommen. Die berechnete Wachstumsrate wurde, analog zu Kapitel 4.4.1 auf Basis der Gesamtzellkonzentration  $c_{X,ges}$  bestimmt. Sowohl der Verlauf der berechneten als auch der Verlauf der experimentellen Wachstumsrate wiesen das für die biologische Trägheit des Systems charakteristische, zeitverzögerte Maximum der Wachstumsrate auf. Die spezifische Wachstumsrate stieg kontinuierlich an und erreichte erst ca. 7 h nach dem Chargenwechsel ihr Maximum. Nach ca. 30 h fand kein Zellwachstum mehr statt. Das Verzugszeitmodell ist also in der Lage, die bei der semikontinuierlichen Betriebsweise auftretende biologische Trägheit zu berücksichtigen.



**Abbildung 4-43: Auftragung der spezifischen Zellwachstumsrate über der Kultivierungszeit für den Laborreaktor mit einem DHA-Schwellwert von 101 g/l. Die Werte der experimentell bestimmten Wachstumsrate wurden aus Abbildung 4-39 übernommen**

In Abbildung 4-44 ist die spezifische Produktbildungsrate von DHA über der Zeit aufgetragen. Die Produktbildungsrate hatte analog zur Wachstumsrate einen instationären Verlauf und erreichte nach ca. 7 h ihr Maximum. Die spezifische Produktbildungsrate wurde zur grafischen Darstellung aus geglätteten bekannten Messgrößen berechnet. Die spezifische Produktbildungsrate war wie folgt definiert:

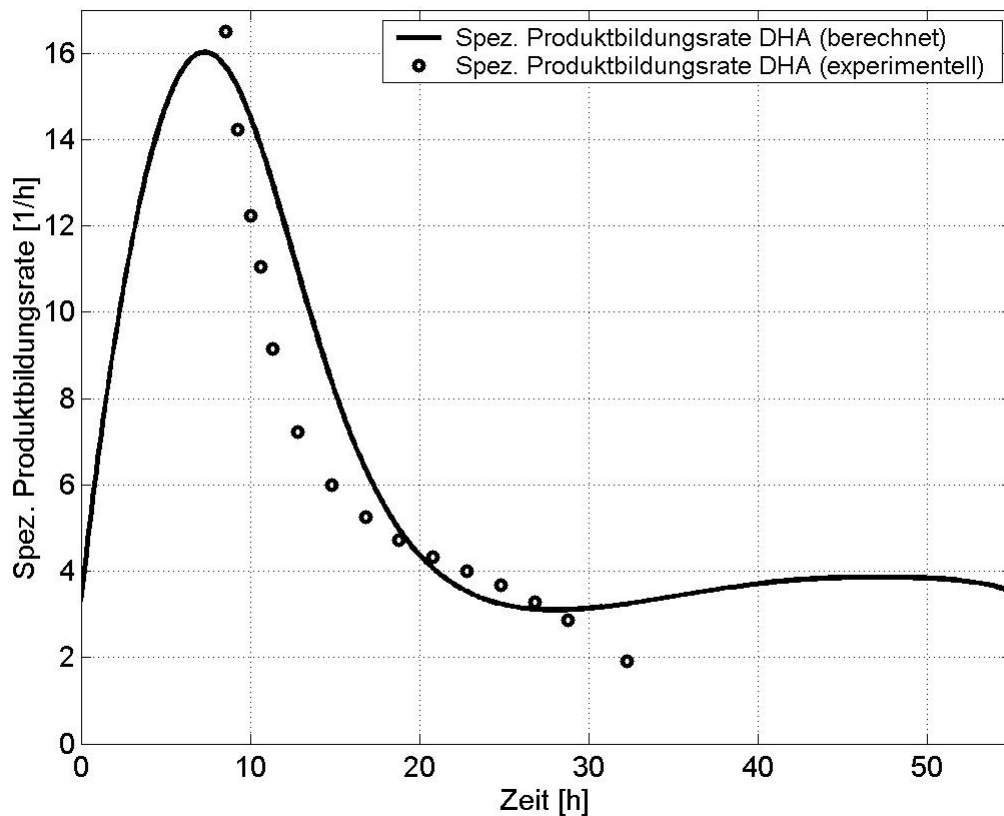
$$\pi = \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_P}{dt} \quad (4-4)$$

Die Berechnung erfolgte analog zu Gleichung (4-2):



$$\pi_{\text{exp}}(i+0,5) = \frac{2}{c_{X,\text{ges}}(i+1) + c_{X,\text{ges}}(i)} \cdot \frac{c_{\text{DHA}}(i+1) - c_{\text{DHA}}(i)}{t(i+1) - t(i)} \quad (4-5)$$

Analog zur Berechnung der experimentell bestimmten Wachstumsrate in Kapitel 4.4.1 ergab sich auch hier ein systematischer Fehler, da für die Berechnung die Gesamtzellkonzentration herangezogen wurde, welche auch tote, nicht produktbildende Zellen enthielt.



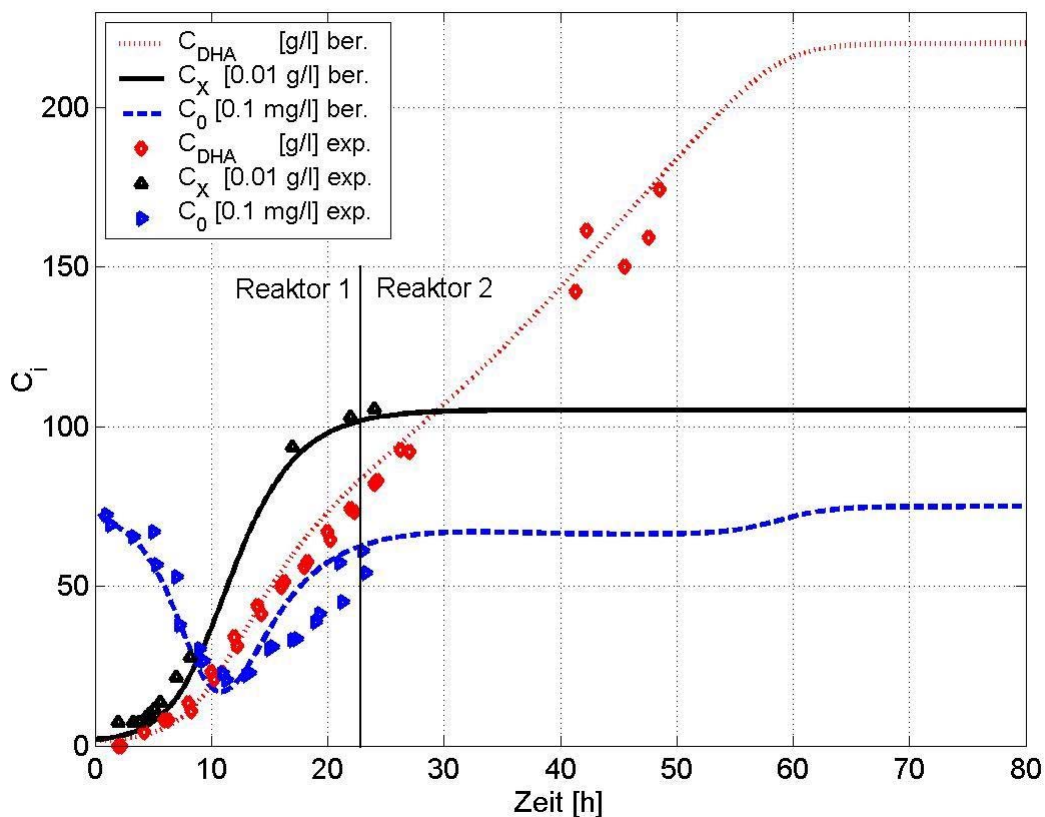
**Abbildung 4-44:** Auftragung der spezifischen Produktbildungsrate von DHA über der Kultivierungszeit für den Laborreaktor mit einem DHA-Schwellwert von 101 g/l

#### 4.4.4 Bestimmung der Güte des mathematischen Modells

Zur Anpassung des Parametersatzes für den Laborreaktor wurde ein experimenteller Datensatz, der bei einem DHA-Schwellwert von 101 g/l erhalten wurde, benutzt. Das Modell sollte nach seiner Anpassung an die gegebenen experimentellen Werte in der Lage sein, Messungen bei anderen Prozessbedingungen als zuvor korrekt nachvollziehen zu können. Deshalb wur-

den mit dem Modell und dem unveränderten Parametersatz die Konzentrationsprofile des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens für einen DHA-Schwellwert von 82 g/l berechnet. Da für diese DHA-Schwellwertkonzentration entsprechende experimentelle Daten zur Verfügung standen, konnte eine Güteabschätzung erfolgen.

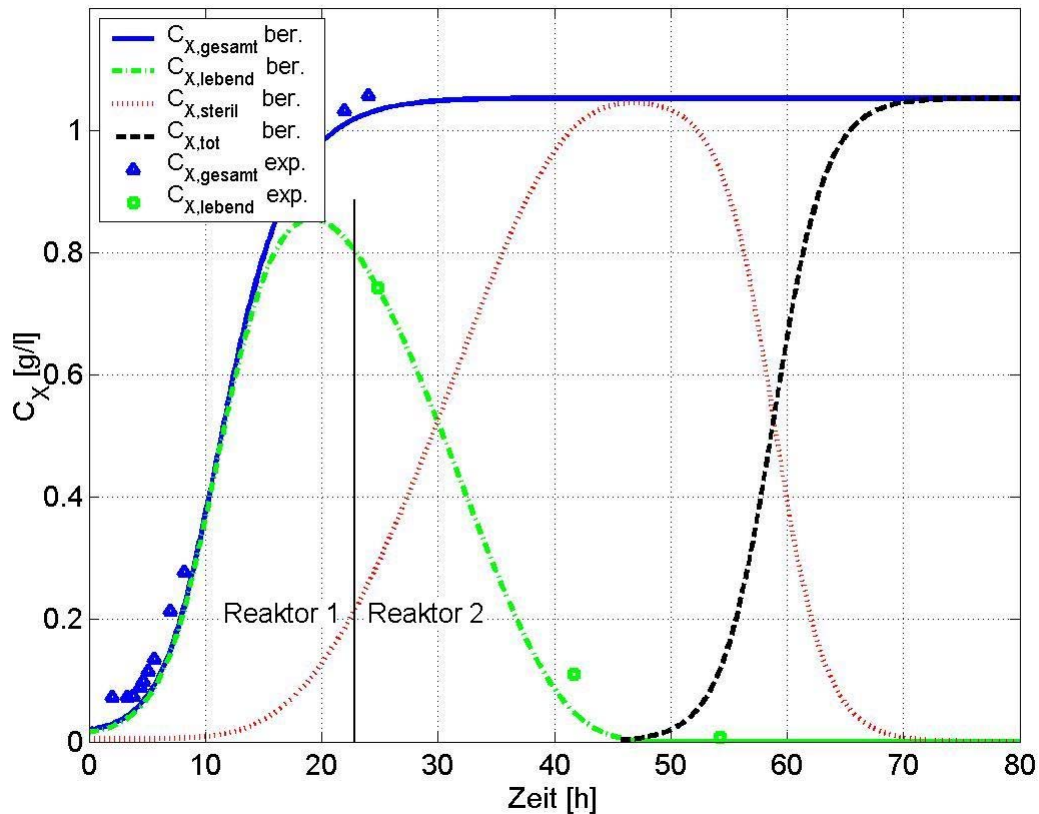
In Abbildung 4-45 sind für den Laborreaktor mit einem DHA-Schwellwert von 82 g/l die Konzentrationsprofile für DHA, Biomasse und Sauerstoff dargestellt. Die Verläufe der berechneten Konzentrationsprofile stimmten in guter Näherung mit den experimentellen Werten überein.



**Abbildung 4-45: Ergebnis für den Laborreaktor mit einem DHA-Schwellwert von 82 g/l. Die Messwerte stammen aus dem ersten und dritten Zyklus des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens aus Abbildung 4-31. Die Messungen erfolgten bis ca. 50 h nach dem Chargenwechsel. Die Messung der Biotrockenmassekonzentration und der DHA-Konzentration in Reaktor 2 erfolgte manuell**

Abbildung 4-46 und Abbildung 4-47 zeigen die berechneten und experimentellen Konzentrationsverläufe für die gesamte Biomasse und deren Fraktionen lebende, sterile und tote Zellen

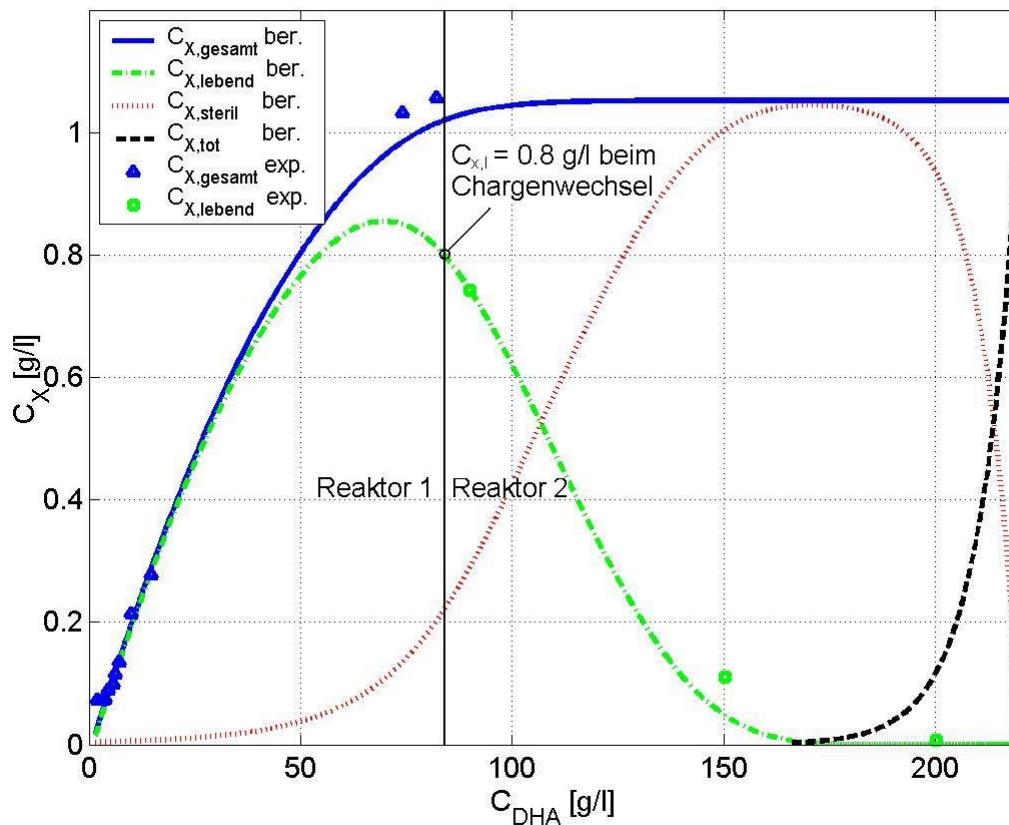
in Abhängigkeit von der Zeit und der DHA-Konzentration. Die berechneten Verläufe von  $c_{X,\text{gesamt}}$  und  $c_{X,\text{lebend}}$  stimmten in guter Näherung mit den experimentellen Werten überein.



**Abbildung 4-46: Auftragung der berechneten und experimentellen Werte der Gesamtzellkonzentration sowie der einzelnen Zelltypen über der Zeit für den Laborreaktor mit einem DHA-Schwellwert von 82 g/l. Die Gesamtzellkonzentration wurde mittels OD-Messung bestimmt und erfolgte manuell. Die Konzentration der lebenden Zellen wurde mit Hilfe des FISH-Tests bestimmt**

Betrachtet man die Zusammensetzung des Inokulates nach einem Chargenwechsel für einen DHA-Schwellwert von 82 g/l und 101 g/l, so lässt sich folgendes feststellen:

Nach einem Chargenwechsel bei 82 g/l befanden sich im Restvolumen zur Animpfung der nächsten Charge mehr teilungsfähige Zellen als bei dem entsprechenden Restvolumen des Betriebes mit einem DHA-Schwellwert von 101 g/l. Aus Abbildung 4-42 und Abbildung 4-47 lässt sich entnehmen, dass die Konzentration der lebenden Zellen im Restvolumen für einen DHA-Schwellwert von 101 g/l bei 0,62 g/l und für einen DHA-Schwellwert von 82 g/l bei 0,8 g/l lag. Somit enthielt das Restvolumen nach einem Chargenwechsel für einen DHA-Schwellwert von 82 g/l im Vergleich zu einem DHA-Schwellwert von 101 g/l ca. 29 % mehr lebende Zellen.



**Abbildung 4-47: Auftragung der gesamten Zellkonzentration sowie der einzelnen Zelltypen über der DHA-Konzentration für den Laborreaktor mit einem DHA-Schwellwert von 82 g/l**

Aufgrund der höheren Produktinhibition der Kultur bei einem DHA-Schwellwert von 101 g/l setzte das Wachstum im Vergleich zu einem DHA-Schwellwert von 82 g/l um ca. 2 h verzögert ein (siehe Abbildung 4-39). Die Ursache für dieses Verhalten war die biologische Trägheit des Systems. Zudem ist in Abbildung 4-39 erkennbar, dass die maximal erreichbare Wachstumsrate bei einem DHA-Schwellwert von 82 g/l einen um ca.  $0.04 \text{ h}^{-1}$  höheren Wert erreichte als bei einer Prozessführung mit einem DHA-Schwellwert von 101 g/l. Die höhere maximale Wachstumsrate für den niedrigeren DHA-Schwellwert von 82 g/l resultierte aus der zu Beginn des Zyklusses geringeren DHA-Konzentration im Reaktor 1. Die inhibierenden Einflüsse von DHA waren somit schwächer, sodass eine höhere maximale Wachstumsrate erreicht wurde. Beide Phänomene wurden durch das Modell qualitativ korrekt wiedergegeben (Abbildung 4-48). In Tabelle 4-24 sind die experimentellen und berechneten maximalen Wachstumsraten und ihre Verzugszeiten für einen DHA-Schwellwert von 82 g/l und 101 g/l zusammengefasst.

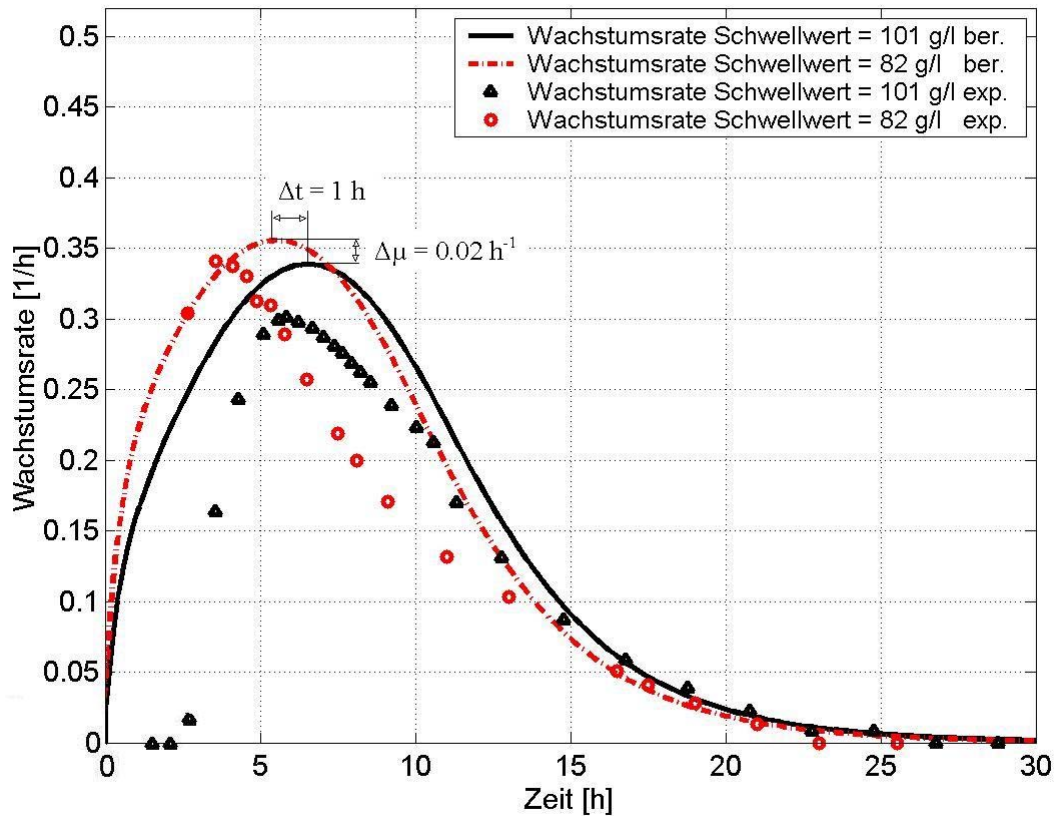


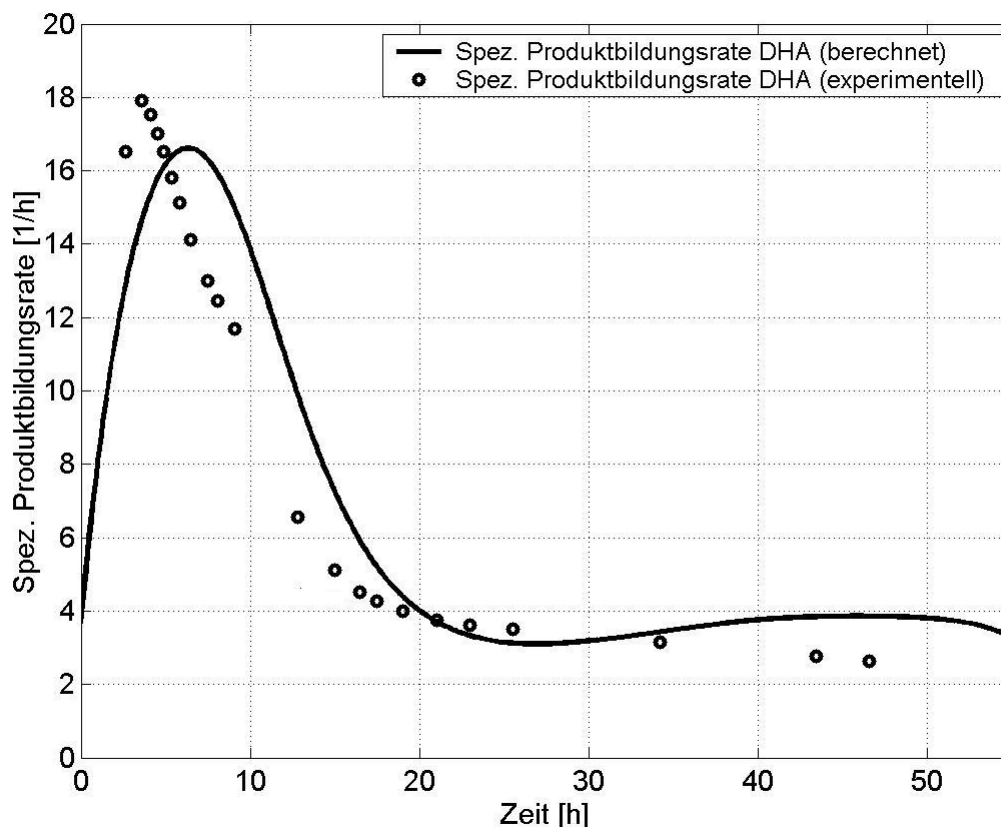
Abbildung 4-48: Auftragung der berechneten und experimentellen spezifischen Zellwachstumsrate über die Kultivierungszeit für den Laborreaktor mit DHA-Schwellwerten von 82 g/l und 101 g/l

Tabelle 4-24: Vergleich der experimentellen und berechneten maximalen Wachstumsraten und deren Verzugszeiten für DHA-Schwellwerte von 82 g/l und 101 g/l

	Maximale Wachstumsrate $\mu_{\max}$ [ $\text{h}^{-1}$ ]		Verzugszeit bis zum Erreichen von $\mu_{\max}$ [h]	
	experimentell	berechnet	experimentell	berechnet
DHA-Schwellwert = 82 g/l	0.34	0.36	3.5	5.5
DHA-Schwellwert = 101 g/l	0.3	0.34	6	6.5

Trotz der qualitativen Übereinstimmung wichen die berechneten Verläufe quantitativ von den experimentellen Verläufen ab, da eine bessere Anpassung an die Messungen nicht möglich war.

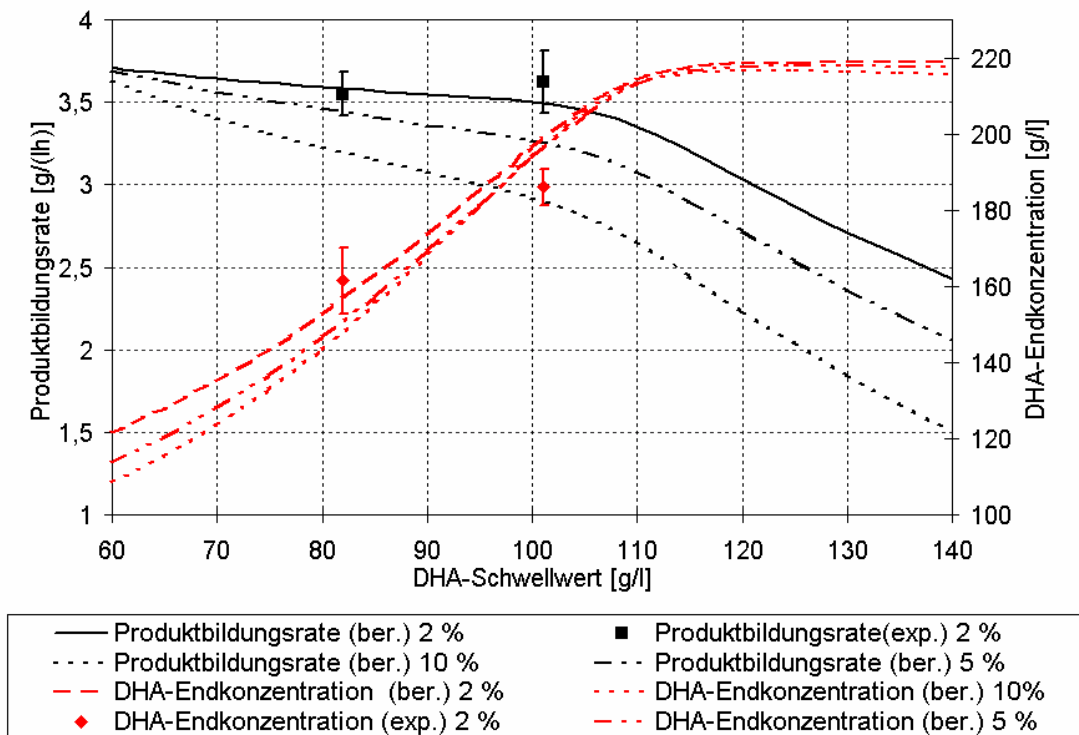
In Abbildung 4-49 ist die spezifische Produktbildungsrate von DHA über der Zeit aufgetragen. Die berechneten Werte wurden nach dem zuvor beschriebenen Verfahren bestimmt (S. 132). Die Produktbildungsrate hatte analog zur Wachstumsrate einen instationären Verlauf. Der berechnete Verlauf stimmte qualitativ mit dem experimentell ermittelten Verlauf überein. Die quantitative Abweichung des berechneten Verlaufes der Produktbildungsrate von den experimentellen Werten läßt sich wie zuvor damit erklären, dass eine bessere Anpassung von  $\pi$  an die Messungen nicht möglich war.



**Abbildung 4-49: Auftragung der spezifischen Produktbildungsrate von DHA über der Kultivierungszeit für den Laborreaktor mit einem DHA-Schwellwert von 82 g/l**

Abschließend wurden die im zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahren erzielbaren DHA-Endkonzentrationen und die Produktbildungsraten berechnet und mit den experimentell ermittelten Daten für einen DHA-Schwellwert von 82 g/l und 101 g/l verglichen. Da experimentelle Ergebnisse mit unterschiedlichen DHA-Schwellwerten nur unter einem erheblichen Zeitaufwand gewonnen werden konnten, wurde auf weitere DHA-Schwellwerteinstellungen verzichtet. An die Messwerte für einen DHA-Schwellwert von 101 g/l erfolgte die Anpassung. Anhand der Messwerte für einen DHA-Schwellwert von 82 g/l läßt sich erkennen, dass

die berechneten Verläufe gut mit den experimentell gewonnenen Ergebnissen übereinstimmen. In Abbildung 4-50 sind die Ergebnisse dargestellt. Es ist ersichtlich, dass mit steigendem DHA-Schwellwert die DHA-Endkonzentration zunahm und gleichzeitig die Produktbildungsrate abnahm. Das segregierte Verzugszeitmodell war daher hinreichend gut für die Beschreibung des semikontinuierlichen Verfahrens geeignet.



**Abbildung 4-50: Auftragung der Produktbildungsrate und der Produktendkonzentration über den DHA-Schwellwert für den 2-stufigen Laborreaktor mit einem Restvolumen von 2, 5 und 10 % beim Chargenwechsel**

#### 4.4.5 Vergleich des segregierten Verzugszeitmodells mit einem unsegregierten Modell mit stationärer Kinetik

Zur weiteren Beurteilung der Modellgüte wurde das segregierte Verzugszeitmodell mit einem einfachen unsegregierten Modell mit stationärer Kinetik (basierend auf Gleichung (2-3) bis Gleichung (2-8)) verglichen. Anhand dieses Vergleiches konnte die Relevanz der Segregation und der Beschreibung der Wachstums- und Produktbildungsrate mit Hilfe von Verzugszeitgleichungen hervorgehoben werden.

Die Anpassung des stationären Modells erfolgte äquivalent zum segregierten Verzugszeitmodell an die Läufe des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens mit einem DHA-Schwellwert von 101 g/l in Kapitel 4.2.6. Die Startwerte und Randbedingungen stimmten mit denen für das segregierte Verzugszeitmodell aus Tabelle 4-20 und Tabelle 4-22 überein. Das einfache stationäre Modell besitzt 22 Parameter. Die 5 Parameter analog zur Tabelle 4-18 wurden wie zuvor nicht optimiert. In Tabelle 4-25 ist der optimierte Parametersatz dargestellt.

**Tabelle 4-25: Optimierter Parametersatz für das stationäre, unsegregierte Modell für den Laborreaktor (17 Parameter)**

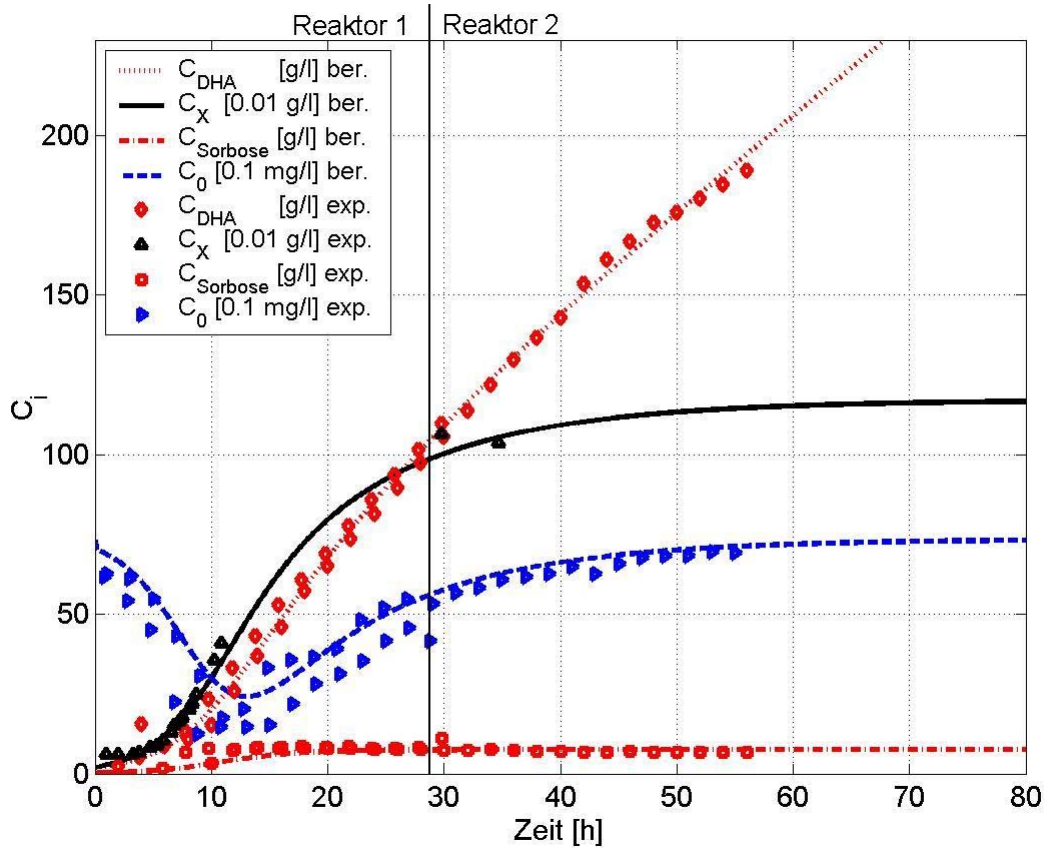
Kinetik			
$\mu_{\max, \text{Gly}} = 2.1 \cdot 10^{-1}$	[1/h]	$A_{\text{DHA}} = 9.9 \cdot 10^1$	[g/g]
$\mu_{\max, \text{Sorbit}} = 2.5 \cdot 10^{-1}$	[1/h]	$A_{\text{Sorbitose}} = 2.39 \cdot 10^1$	[g/g]
$K_{\text{O, Gly}} = 3.14 \cdot 10^{-2}$	[mg/l]	$B_{\max} = 2.55$	[g/(g·h)]
$K_{\text{O, Sorbit}} = 4.66 \cdot 10^{-2}$	[mg/l]	$K_{\text{b, Gly}} = 2.83 \cdot 10^{-1}$	[g/l]
$K_{\text{Sorbit}} = 5.28$	[g/l]	$K_{\text{b, O}} = 5.92 \cdot 10^{-3}$	[mg/l]
$K_{\text{DHA}} = 2.45 \cdot 10^{-2}$	[l/g]		
Stöchiometrie			
$Y_{\text{X, Gly}} = 9.70 \cdot 10^{-3}$	[g/g]	$Y_{\text{X, O, Sorbit}} = 6.7 \cdot 10^{-4}$	[g/g]
$Y_{\text{X, Sorbit}} = 5.31 \cdot 10^{-1}$	[g/g]	$Y_{\text{DHA, O}} = 1.30 \cdot 10^{-2}$	[g/g]
$Y_{\text{X, O, Gly}} = 4.9 \cdot 10^{-5}$	[g/g]	$Y_{\text{Sorbitose, O}} = 1.6 \cdot 10^{-1}$	[g/g]

In Abbildung 4-51 sind für den Laborreaktor mit einem DHA-Schwellwert von 101 g/l die Konzentrationsprofile für DHA, Biomasse, Sorbit und Sauerstoff dargestellt. Es ist ersichtlich, dass mit Hilfe des stationären Modells sowohl qualitativ als auch quantitativ eine gute Beschreibung für die Verläufe von DHA, Biomasse, Sauerstoff und Sorbitose erzielt wurde.

Ein Nachteil des stationären Modells war, dass beliebig hohe DHA-Konzentrationen vorhergesagt wurden. Dies stand allerdings im Widerspruch zu den experimentell ermittelten Ergebnissen. Zudem war das stationäre Modell nicht in der Lage, die experimentell beobachtete Schädigung von DHA auf die Kultur zu berücksichtigen, so dass die Kultur auch noch nach dem Erreichen von beliebig hohen DHA-Konzentrationen regenerationsfähig wäre. Erst durch



die Segregation in lebende, sterile und tote Zellen konnte die irreversible Schädigung von DHA auf *Gluconobacter oxydans* berücksichtigt werden.

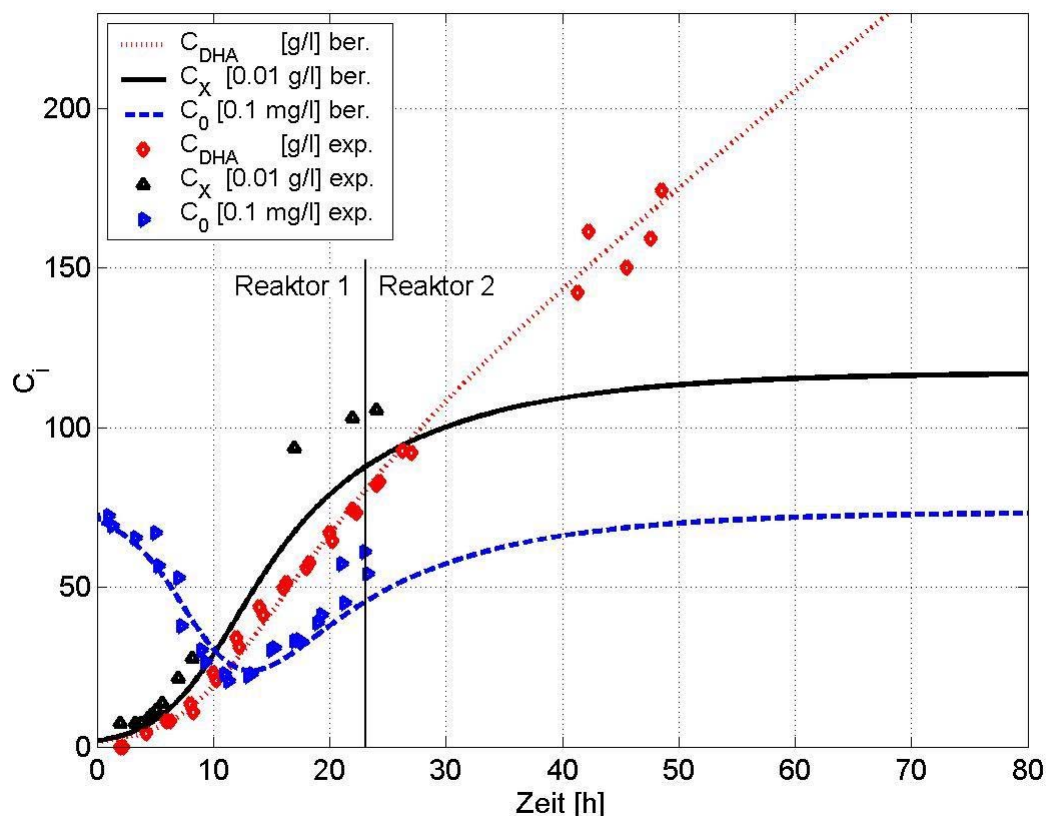


**Abbildung 4-51: Ergebnis der Anpassung des unsegregierten und unstrukturierten Modells für den Laborreaktor mit einem DHA-Schwellwert von 101 g/l an die Messwerte aus dem dritten und fünften Zyklus des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens aus Abbildung 4-32. Die Messungen erfolgten bis ca. 55 h nach dem Beginn der Zyklen. Die Messung der Biotrockenmassekonzentration erfolgte manuell**

In Abbildung 4-52 sind die berechneten Verläufe des stationären Modells für das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren mit einem DHA-Schwellwert von 82 g/l dargestellt. Die Konzentrationsverläufe von DHA und Sauerstoff wurden durch das stationäre Modell quantitativ gut wiedergegeben. Der Verlauf der Gesamtzellkonzentration in Abbildung 4-52 wurde hingegen nur unzureichend wiedergegeben. Dies lässt sich wie folgt erklären:

Ein Vergleich der experimentellen Biomasseverläufe bei einem DHA-Schwellwert von 82 g/l und 101 g/l zeigte, dass die Biomassebildung für den niedrigeren DHA-Schwellwert um ca. 2 h früher einsetzte als für den höheren DHA-Schwellwert. Ausschlaggebend für dieses Verhalten war der aktuelle Zustand des Inokulates, welcher von der Vorgeschichte der Kultur ab-

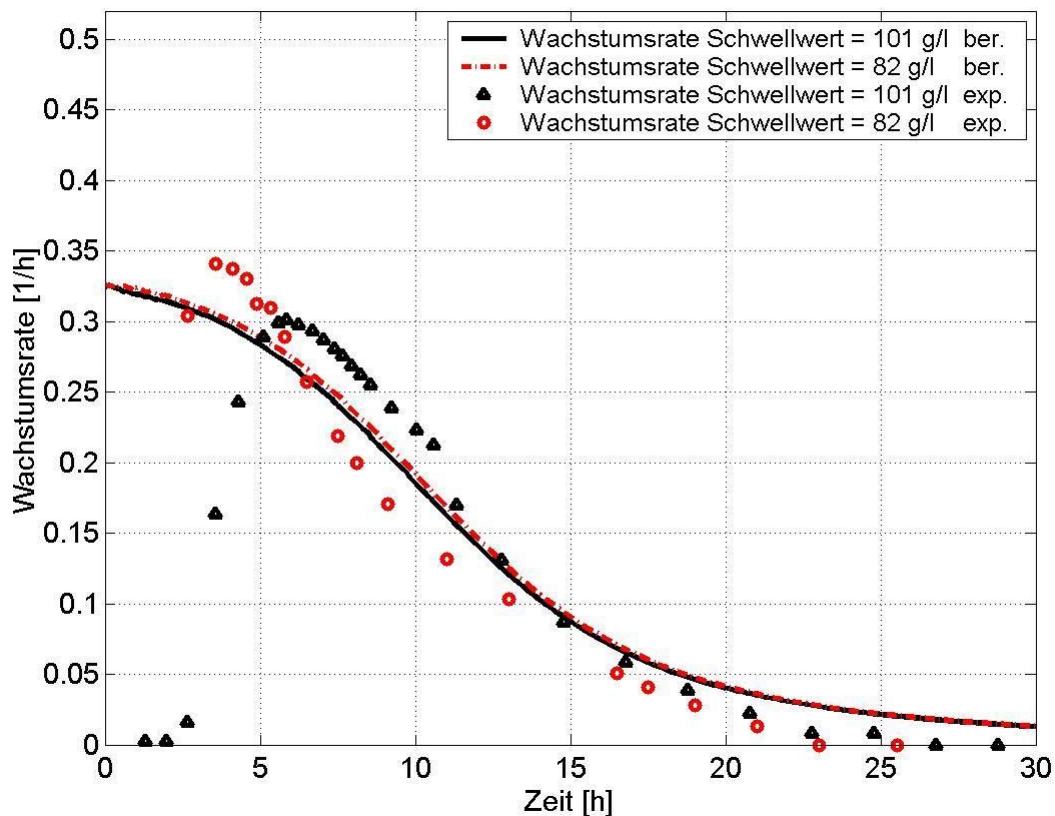
hängt. Dies traf allerdings nicht für die berechneten Biomasseverläufe zu, die beim stationären Modell nur von den aktuellen Milieubedingungen abhängen. Da die aktuellen Milieubedingungen nach einem Chargenwechsel bei 82 g/l und 101 g/l gleich waren, waren demnach auch die Biomasseverläufe gleich. Die Anpassung des stationären Modells erfolgte jedoch an die experimentellen Werte mit einem DHA-Schwellwert von 101 g/l. Da diese Werte einen niedrigeren Verlauf im Vergleich zu den experimentellen Läufen mit 82 g/l aufwiesen, lag der mit dem stationären Modell berechnete Verlauf unter den experimentellen Werten.



**Abbildung 4-52: Ergebnis für den Laborreaktor mit einem DHA-Schwellwert von 82 g/l. Die Messwerte stammen aus dem ersten und dritten Zyklus des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens aus Abbildung 4-31. Die Messungen erfolgten bis ca. 50 h nach dem Chargenwechsel. Die Messung der Biotrockenmassekonzentration und der DHA-Konzentration in Reaktor 2 erfolgte manuell**

Betrachtet man den Verlauf der Wachstumsrate  $\mu(t)$  in Abbildung 4-53, so lässt sich feststellen, dass sich die mit dem stationären Modell berechneten Wachstumsraten qualitativ und quantitativ grundsätzlich von den experimentellen Verläufen unterscheiden. Da die stationäre Wachstumsrate nur von den aktuellen Milieubedingungen abhing, nahm sie unmittelbar nach

einem Chargenwechsel ihren maximalen Wert an. Die experimentell bestimmten Wachstumsraten wiesen hingegen erst nach einer Verzugszeit von ca. 3.5 bzw. 6.0 h ihr Maximum auf. Zudem spielte es für den Verlauf der Wachstumsrate keine Rolle, ob der DHA-Schwellwert 82 g/l oder 101 g/l betrug. Das Fehlen der Verzugszeitgleichungen führte dazu, dass beide Wachstumsverläufe deckungsgleich waren. Dies steht im Widerspruch zu den experimentell bestimmten Raten, welche zeitversetzt zueinander verliefen. Beide Phänomene konnten durch das segregierte Verzugszeitmodell hingegen hinreichend berücksichtigt werden.



**Abbildung 4-53: Auftragung der experimentellen und der mit Hilfe des stationären Modells berechneten spezifischen Wachstumsrate über der Zeit für den Laborreaktor mit einem DHA-Schwellwert von 82 g/l und 101 g/l**

#### 4.4.6 Parametersatz für die Technikumsanlage

Zur Optimierung des zweistufigen Verfahrens wurde eine Anpassung des segregierten Verzugszeitmodells an den Technikumsbetrieb vorgenommen, da dieser auf den großtechnischen

Maßstab übertragbar ist. In Tabelle 4-26 bis Tabelle 4-28 sind die Startwerte und die Randbedingungen für die Lösung der acht gekoppelten Differentialgleichungen aufgeführt:

**Tabelle 4-26: Startwerte für Sauerstoff, Substrate und Produkte**

Anfangskonzentration des Sauerstoffes:	$c_{O,t=0} = 7.5$	[mg/l]
Anfangskonzentration des Substrates Glycerin:	$c_{Gly,t=0} = 15$	[g/l]
Anfangskonzentration des Substrates D-Sorbit:	$c_{Sorbit,t=0} = 10$	[g/l]
Anfangskonzentration des Produktes DHA:	$c_{DHA,t=0} = 0$	[g/l]
Anfangskonzentration des Produktes L-Sorbose:	$c_{Sorbose,t=0} = 0$	[g/l]
Anfangskonzentration der Bakterien:	$c_{X,ges,t=0} = 0.003$	[g/l]
Anfangskonzentration der lebenden Bakterien:	$c_{X,l,t=0} = 0.003$	[g/l]
Anfangskonzentration der sterilen Bakterien:	$c_{X,steril,t=0} = 0$	[g/l]
Anfangskonzentration der toten Bakterien:	$c_{X,tot,t=0} = 0$	[g/l]

**Tabelle 4-27: Startwerte für die Produktbildungs- und Wachstumsraten**

Anfangswert der inst. Produktbildungsrate für DHA:	$\pi_{inst,DHA,t=0} = 0$	[g/(gh)]
Anfangswert der inst. Produktbildungsrate für L-Sorbose:	$\pi_{inst,Sorbose,t=0} = 0$	[g/(gh)]
Anfangswert der inst. Wachstumsrate durch Glycerin:	$\mu_{inst,Gly,t=0} = 0$	[1/h]
Anfangswert der ersten Ableitung der inst. Wachstumsrate:	$\mu'_{inst,Gly,t=0} = 0$	[1/h <sup>2</sup> ]
Anfangswert der inst. Wachstumsrate durch D-Sorbit:	$\mu_{inst,Sorbit,t=0} = 0$	[1/h]
Anfangswert der ersten Ableitung der inst. Wachstumsrate:	$\mu'_{inst,Sorbit,t=0} = 0$	[1/h <sup>2</sup> ]

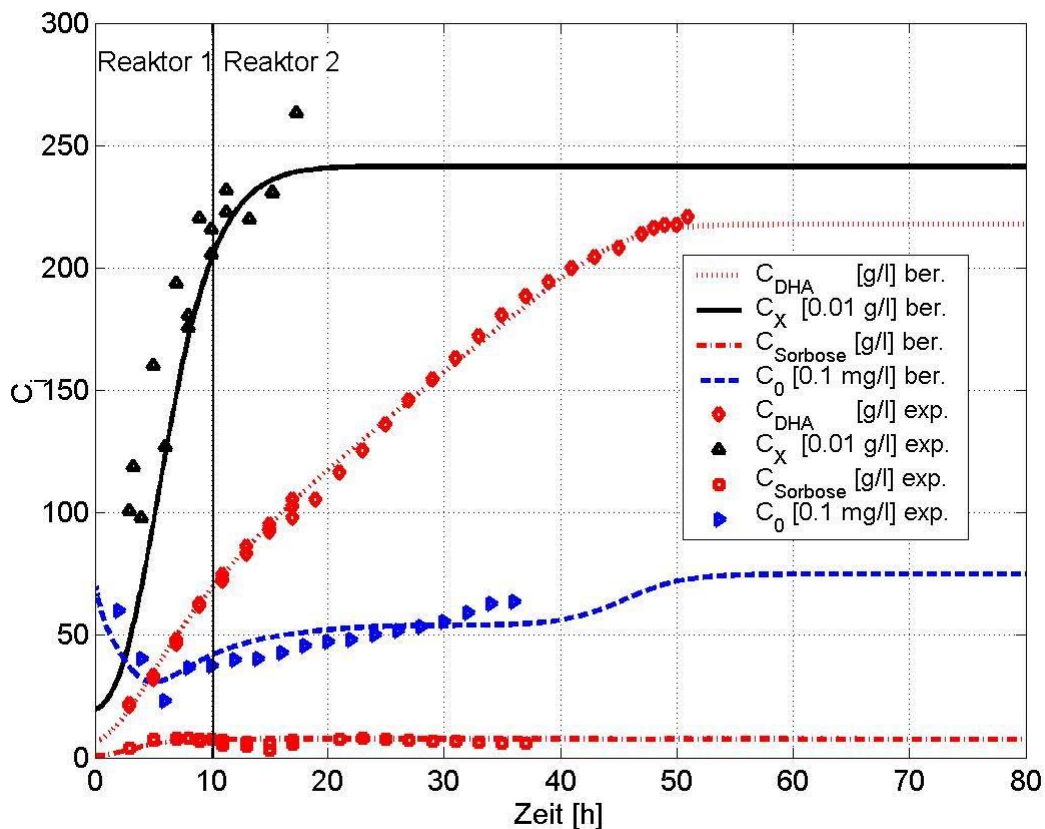
**Tabelle 4-28: Randbedingungen für die Technikumsanlage**

Reaktionsvolumen Reaktor 1:	$V_R = 27$	[l]
Restvolumen der Flüssigkeit nach der Entleerung:	$V_{Rest} = 2.7$	[l]
Schwellwert für den Chargenwechsel:	$c_{DHA} = 65$	[g/l]

Für den Technikumsbetrieb ergaben sich die in Tabelle 4-29 aufgeführten optimierten Parameter.

**Tabelle 4-29: Optimierter Parametersatz des segregierten Verzugszeitmodells für die Technikumsanlage (30 Parameter)**

Kinetik			
$\mu_{\max, \text{Gly}} = 7.20 \cdot 10^{-1}$	[1/h]	$A_{\text{DHA}} = 5.08 \cdot 10^1$	[g/g]
$\mu_{\max, \text{Sorbit}} = 7.34 \cdot 10^{-1}$	[1/h]	$A_{\text{Sorbitose}} = 1.36 \cdot 10^1$	[g/g]
$K_{\text{O, Gly}} = 2.58 \cdot 10^{-1}$	[mg/l]	$B_{\max} = 1.75$	[g/(g·h)]
$K_{\text{O, Sorbit}} = 1.33 \cdot 10^{-1}$	[mg/l]	$K_{\text{b, Gly}} = 2.80 \cdot 10^{-1}$	[g/l]
$K_{\text{Sorbit}} = 5.28$	[g/l]	$K_{\text{b, O}} = 6.63 \cdot 10^{-3}$	[mg/l]
$K_{\text{DHA}} = 5.23 \cdot 10^{-2}$	[l/g]		
Stöchiometrie			
$Y_{\text{X, Gly}} = 7.81 \cdot 10^{-4}$	[g/g]	$Y_{\text{X, O, Sorbit}} = 8.08 \cdot 10^{-1}$	[g/g]
$Y_{\text{X, Sorbit}} = 5.30 \cdot 10^{-1}$	[g/g]	$Y_{\text{DHA, O}} = 4.89 \cdot 10^{-3}$	[g/g]
$Y_{\text{X, O, Gly}} = 1.42 \cdot 10^{-3}$	[g/g]	$Y_{\text{Sorbitose, O}} = 7.73$	[g/g]
Verzugszeit			
$D_{\text{X, Gly}} = 4.31$	[-]	$T_{\text{DHA}} = 6.46 \cdot 10^{-1}$	[h]
$D_{\text{X, Sorbit}} = 4.24$	[-]	$T_{\text{Sorbitose}} = 7.04 \cdot 10^{-1}$	[h]
$T_{\text{X, Gly}} = 2.96 \cdot 10^{-1}$	[h]	$R_{\text{DHA}} = 6.93 \cdot 10^{-2}$	[l/(g·h)]
$T_{\text{X, Sorbit}} = 2.51 \cdot 10^{-1}$	[h]	$R_{\text{Sorbitose}} = 6.10 \cdot 10^{-2}$	[l/(g·h)]
Segregation			
$\mu_{\text{steril}} = 2.30 \cdot 10^{-3}$	[1/h]	$K_{\text{DHA, steril}} = 3.79 \cdot 10^{-2}$	[l/g]
$\mu_{\text{tot}} = 1.39 \cdot 10^{-10}$	[1/h]	$K_{\text{DHA, tot}} = 9.99 \cdot 10^{-2}$	[l/g]
$S = 1.62$	[1/h]		



**Abbildung 4-54: Ergebnis der Anpassung des segregierten Verzugszeitmodells für die Technikumsanlage mit einem DHA-Schwellwert von 65 g/l an die Messwerte aus dem zweiten, dritten und vierten Zyklus des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens aus Abbildung 4-26. Die Messungen erfolgten bis ca. 52 h nach dem Chargenwechsel. Die Messung der Biotrockenmassekonzentration erfolgte manuell**

In Abbildung 4-54 sind die Konzentrationsverläufe für die gesamte Biomasse, Sorbose, DHA und den Sauerstoff dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die berechneten Konzentrationsprofile eine relativ gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten aufzeigen. Nach einer Kultivierungsdauer von ca. 50 h wurde eine DHA-Endkonzentration von 220 g/l erreicht. Zugleich stieg die Gelöstsauerstoffkonzentration auf die maximal mögliche Luftsättigungskonzentration von ca. 7.5 mg/l bei 30 °C an.

Der Zusammenhang zwischen den verschiedenen Zellkonzentrationen und der Zeit sowie der DHA-Konzentration wird in Abbildung 4-55 und Abbildung 4-56 gezeigt. Ab einer DHA-Konzentration von ca. 80 g/l trat den Bedingungen aus Kapitel 4.1 entsprechend nur noch geringes Wachstum auf. Ab ca. 160 g/l DHA waren keine regenerationsfähigen Zellen mehr vorhanden und bei 220 g/l DHA waren nur noch tote Zellen im System vorhanden.

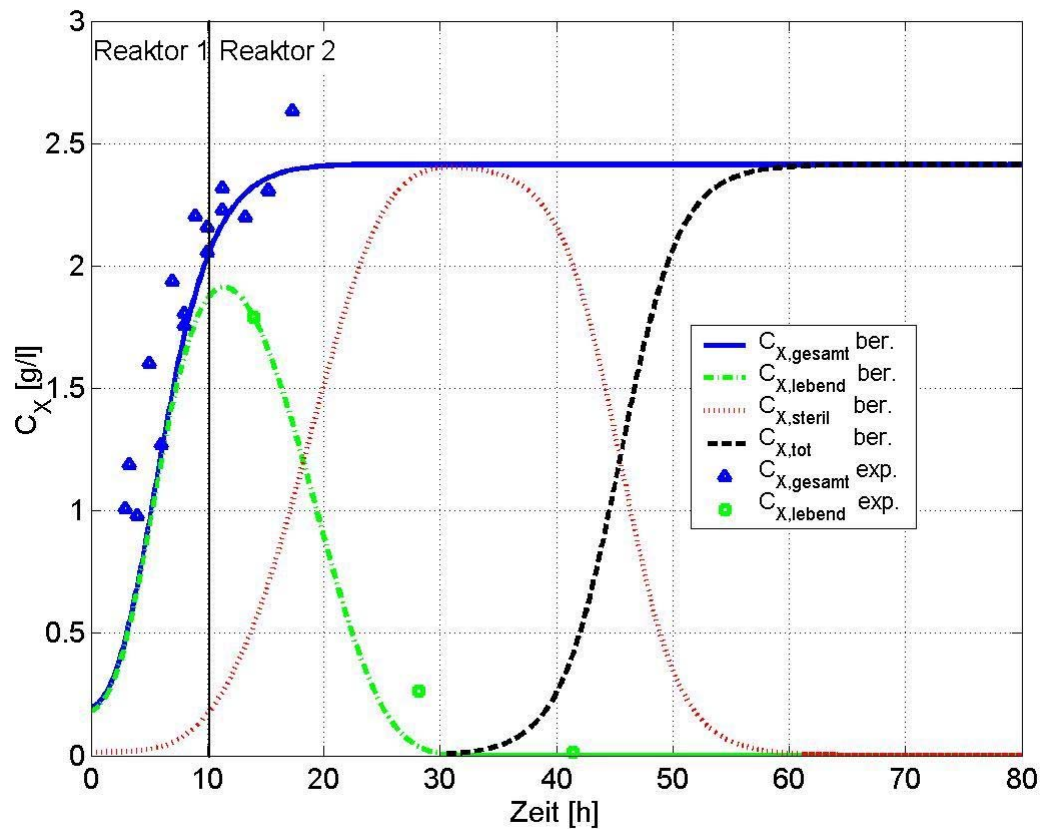
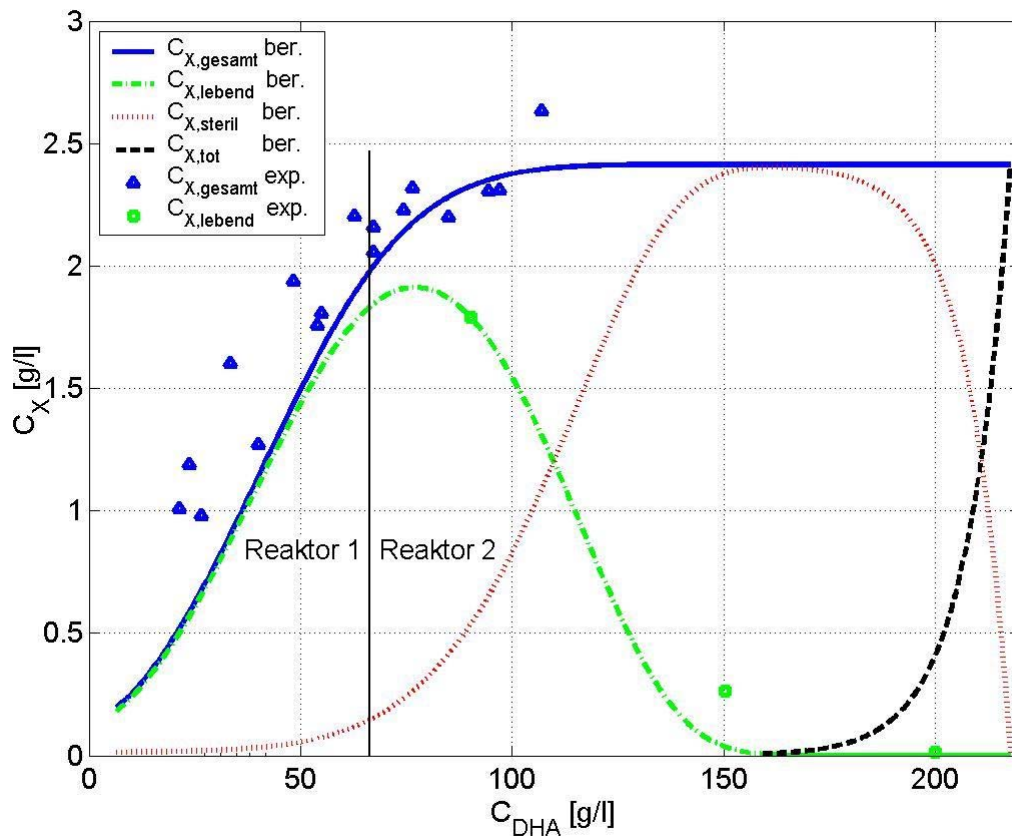


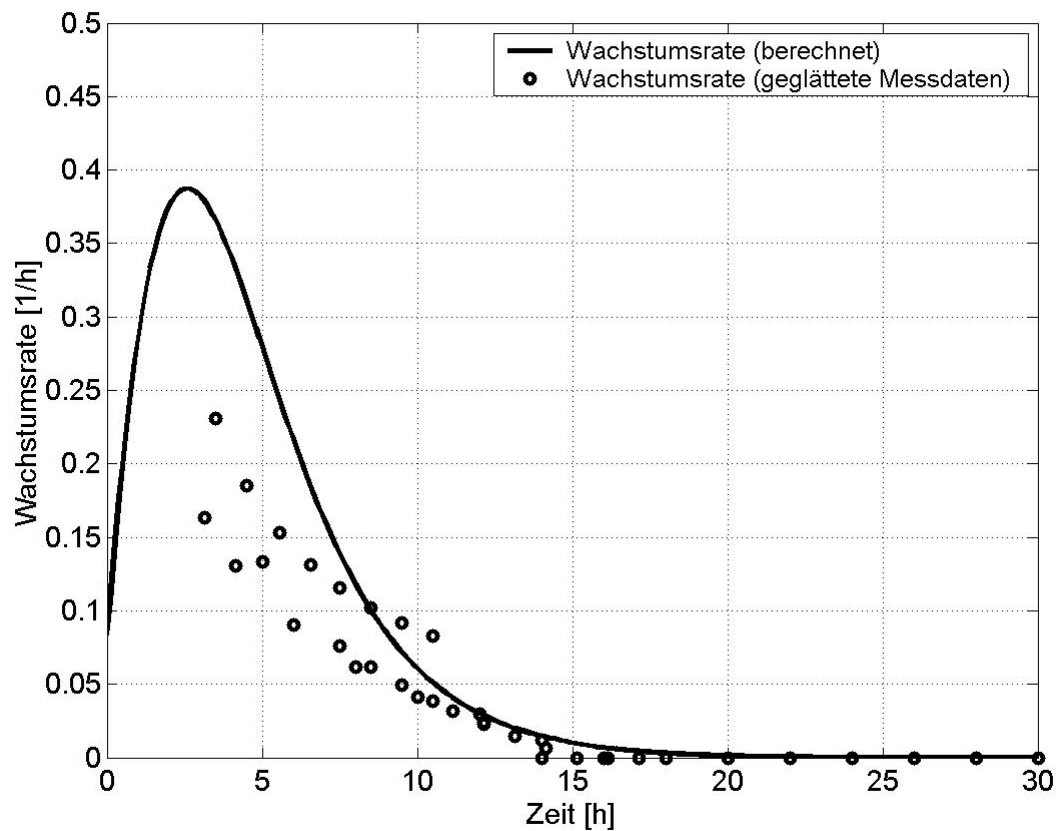
Abbildung 4-55: Auftragung der berechneten und experimentellen Werte der Gesamtzellkonzentration sowie der einzelnen Zelltypen über der Zeit für den Laborreaktor mit einem DHA-Schwellwert von 101 g/l. Die Gesamtzellkonzentration wurde mittels OD-Messung bestimmt und erfolgte manuell. Die Konzentration der lebenden Zellen wurde mit Hilfe des FISH-Tests bestimmt



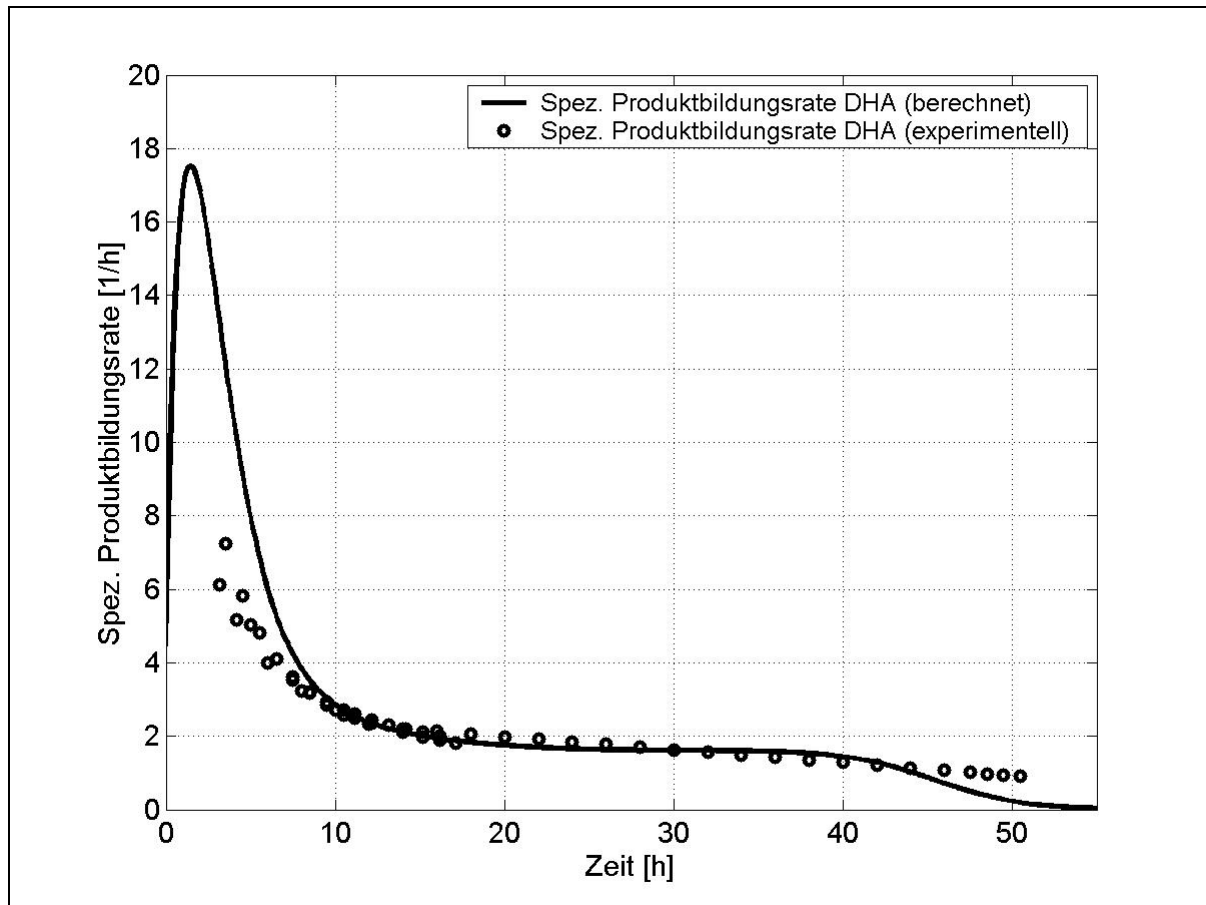
**Abbildung 4-56: Auftragung der berechneten und experimentellen Werte der Gesamtzellkonzentration sowie der einzelnen Zelltypen über der Zeit für die Technikumsanlage mit einem DHA-Schwellwert von 65 g/l**

In Abbildung 4-57 ist die spezifische Wachstumsrate über der Zeit aufgetragen. Abbildung 4-58 zeigt die spezifische Produktbildungsrate über der Zeit. Zur Ermittlung der experimentellen Werte für die Wachstums- und Produktbildungsrate wurde die Gesamtzellkonzentration herangezogen. Wie in Kapitel 4.4.1 bereits erwähnt, ergab sich dadurch ein systematischer Fehler. Die berechneten und experimentellen Verläufe stimmten qualitativ überein, wiesen jedoch für Zeiten kleiner als 10 h starke Abweichungen zu den experimentell bestimmten Raten auf. Da in diesem Zeitbereich nur relativ wenige BTM-Messungen innerhalb eines Zyklusses erfolgten, waren die experimentellen Wachstums- und Produktbildungsrate mit einem entsprechend großen Fehler behaftet.





**Abbildung 4-57:** Auftragung der spezifischen Wachstumsrate über der Zeit für die Technikumsanlage mit einem DHA-Schwellwert von 65 g/l. Die Messdaten für die Biomasse wurden aus dem zweiten bis vierten Zyklus in Abbildung 4-26 entnommen



**Abbildung 4-58:** Auftragung der spezifischen Produktbildungsrate von DHA über der Zeit für die Technikumsanlage mit einem DHA-Schwellwert von 65 g/l.

#### 4.4.7 Parametersensibilitätsanalyse

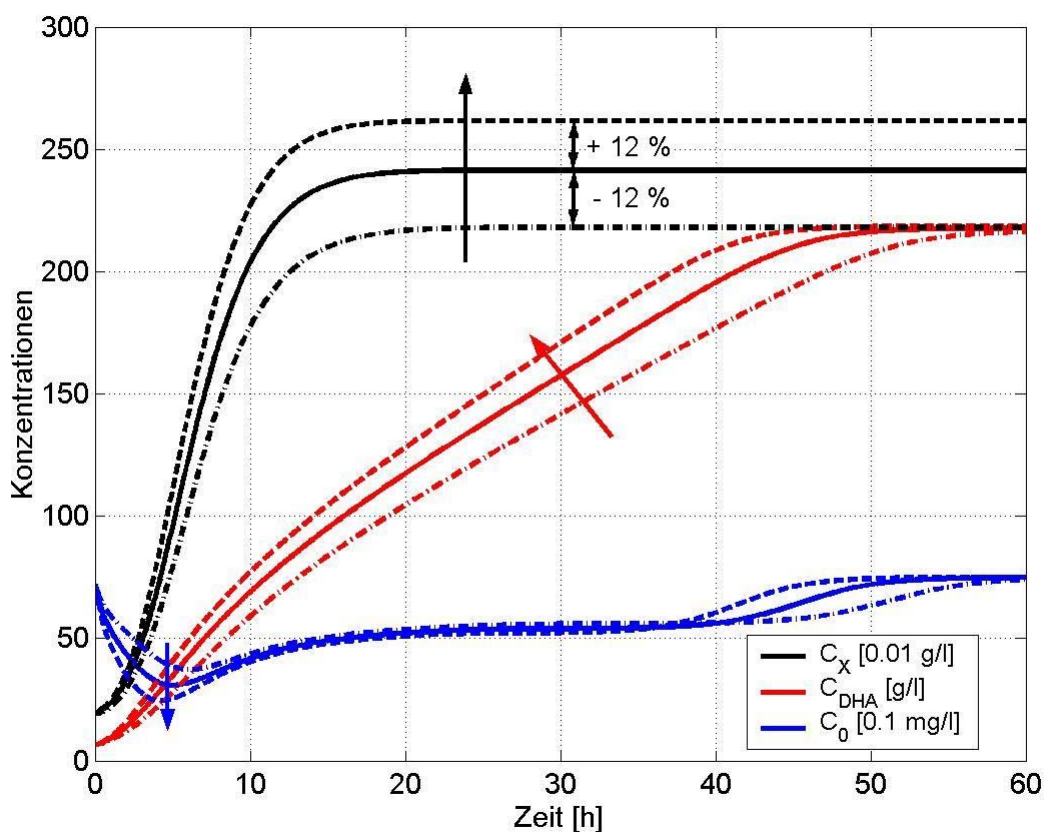
Mit dem optimierten Parametersatz aus Kapitel 4.4.6 wurde eine Parametersensibilitätsanalyse durchgeführt. Die Parametersensibilitätsanalyse gibt Aufschluss darüber, wie stark die einzelnen Parameter die Simulationsergebnisse beeinflussen. Das segregierte Verzugszeitmodell enthält 35 Parameter, die einen unterschiedlich starken Einfluss auf den Kultivierungsverlauf ausüben. Aufgrund der hohen Anzahl an Parametern wird in der Parametersensibilitätsanalyse nur der Einfluss derjenigen Parameter in graphischer Form dargestellt, die den Verlauf der Kultivierung signifikant verändern. Als entscheidende Prozessgrößen wurden die Konzentrationen der Biomasse, des Produktes Dihydroxacetone und des Sauerstoffes gewählt. Der Einfluss der weniger sensitiven Parameter wird im Text beschrieben.

Die Grafik wurde so aufbereitet, dass die durchgezogene Linie jeweils für den optimierten Parameter, die gestrichelte Linie für den vergrößerten Parameterwert und die Strichpunktlinie

für den verkleinerten Parameterwert galt. Der Pfeil zeigt die Tendenz in Richtung des größeren Parameterwertes an. Es wurden jeweils immer nur ein Parameter verändert und anschließend die Auswirkungen auf die Änderungen des Verlaufs der genannten Prozessgrößen beobachtet. Die einzelnen Parameter wurden, je nach der Stärke der Veränderungen, mit 25 %, 50 % oder 100 % ihres Eigenwertes variiert.

#### 4.4.7.1 Kinetik

In diesem Kapitel wurde für die 11 Parameter, die zur Berechnung der stationären Wachstums- und Produktbildungsraten in Gleichung (2-3) bis (2-8) auf Seite 31 nötig waren, eine Parametersensibilitätsanalyse durchgeführt.

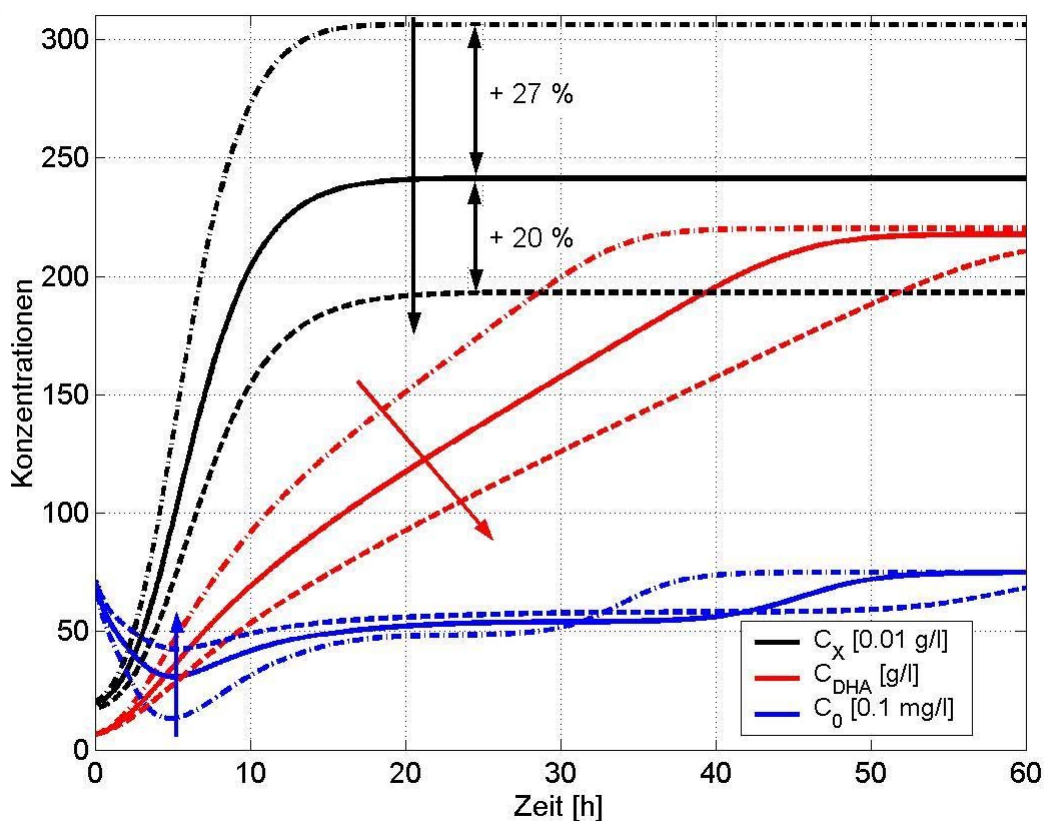


**Abbildung 4-59: Einfluss des Parameters  $\mu_{\max,Gly}$  (Variation: +/- 25 %)**

In Abbildung 4-59 wurde die maximale spezifische Wachstumsrate für Glycerin  $\mu_{\max,Gly}$  um  $\pm 25\%$  variiert (siehe Gleichung 2-3, Seite 31). Eine Erhöhung dieses Parameters um 25 % führte zu einer Erhöhung der Gesamtzellkonzentration um ca. 12 %. In der exponentiellen

Wachstumsphase wurde dadurch mehr Sauerstoff verbraucht. Durch die größere Gesamtzellkonzentration wurde zudem auch die Produktbildung beschleunigt. Einen ähnlichen Einfluss besaß die maximale spezifische Wachstumsrate  $\mu_{\max, \text{Sor}}$  für Sorbit (Gleichung (2-7), Seite 32). Da ihr Einfluss jedoch deutlich schwächer ausgeprägt war, wurde auf eine graphische Darstellung verzichtet.

Der Einfluss der Parameter  $K_{\text{O,Gly}}$  bzw.  $K_{\text{O,D-Sor}}$  aus Gleichung (2-3) und (2-7) war relativ gering. Umso größer diese sauerstofflimitierenden Parameter wurden, desto stärker wirkte sich eine Sauerstofflimitation auf das Wachstum aus. Diese stärkere Limitation führte zu einer geringeren Biomassebildung und zu einer verzögerten Produktbildung. Die Halbsättigungskonstante  $K_{\text{Sorbit}}$  aus Gleichung (2-7) beschreibt die Limitierung des Zellwachstums durch Sorbit. Je größer  $K_{\text{Sorbit}}$  wurde, desto geringer ist die Wachstumsrate und somit die Biomasse- und Produktbildung. Der Einfluss dieses Parameters auf die Biomassebildung war ebenfalls nicht sehr stark ausgeprägt.



**Abbildung 4-60: Einfluss des Parameters  $K_{\text{DHA}}$  (Variation: +/- 25 %)**

In Abbildung 4-60 ist der Einfluss der Produktinhibierungskonstante  $K_{\text{DHA}}$  wiedergegeben (Gleichung (2-3), Seite 31). Dieser Parameter übte einen großen Einfluss auf die Prozessdy-

namik aus, da er in die Kinetik exponentiell eingeht. Eine Erhöhung der Produktinhibierungskonstante um 25 % führte zu einem signifikant verringerten Zellwachstum und es wurde eine um 20 % geringere maximale Zellkonzentration erreicht. Ferner ergab sich eine weniger starke Produktbildung und ein verringerter Sauerstoffverbrauch. Konsequenterweise wurde dadurch auch erst deutlich später die maximal mögliche Produktkonzentration erreicht.

Der Proportionalitätsfaktor  $A_{DHA}$  koppelt die Produktbildung mit dem Wachstum (Gleichung (2-4), Seite 32). Eine Erhöhung dieses Faktors um 25 % bewirkte eine Senkung der maximalen Gesamtzellkonzentration von ca. 12 %. In Abbildung 4-61 ist dieser Zusammenhang dargestellt. Bei der Erhöhung des Faktors nahm die wachstumsabhängige Produktbildung der Kultur zu. Dies hatte zur Folge, dass eine geringere Zellmasse erforderlich war, um die gleiche Menge an DHA zu bilden. Während der ersten 10 h blieb deshalb die Produktkonzentration annähernd gleich, wobei das Zellwachstum niedriger war. Anschließend überwog der wachstumsunabhängige konstante Anteil  $B_{max}$  (Gleichung (2-5), Seite 32) der spezifischen Produktbildungsrate. Da die gebildete Biomasse nun geringer war, erfolgte eine langsamere Produktbildung und somit wurde die maximale Produktkonzentration erst später erreicht.

Mit dem Proportionalitätsfaktor  $A_{Sorbitose}$  (Gleichung (2-8), Seite 32) wird die Produktbildungsrate von Sorbose an das Wachstum gekoppelt. Wie bei  $A_{DHA}$  bewirkte eine Erhöhung dieses Faktors um 25 % eine Senkung der maximalen Gesamtzellkonzentration von ca. 5 %. Je größer  $A_{Sorbitose}$  war, umso schneller wurde das vorgelegte Sorbit verbraucht bis das Wachstum auf Sorbitbasis eingestellt wurde. Dies führte zu einer geringeren Biomasse im weiteren Prozessverlauf und somit zu einer verlangsamt wachstumsunabhängigen Produktbildung.

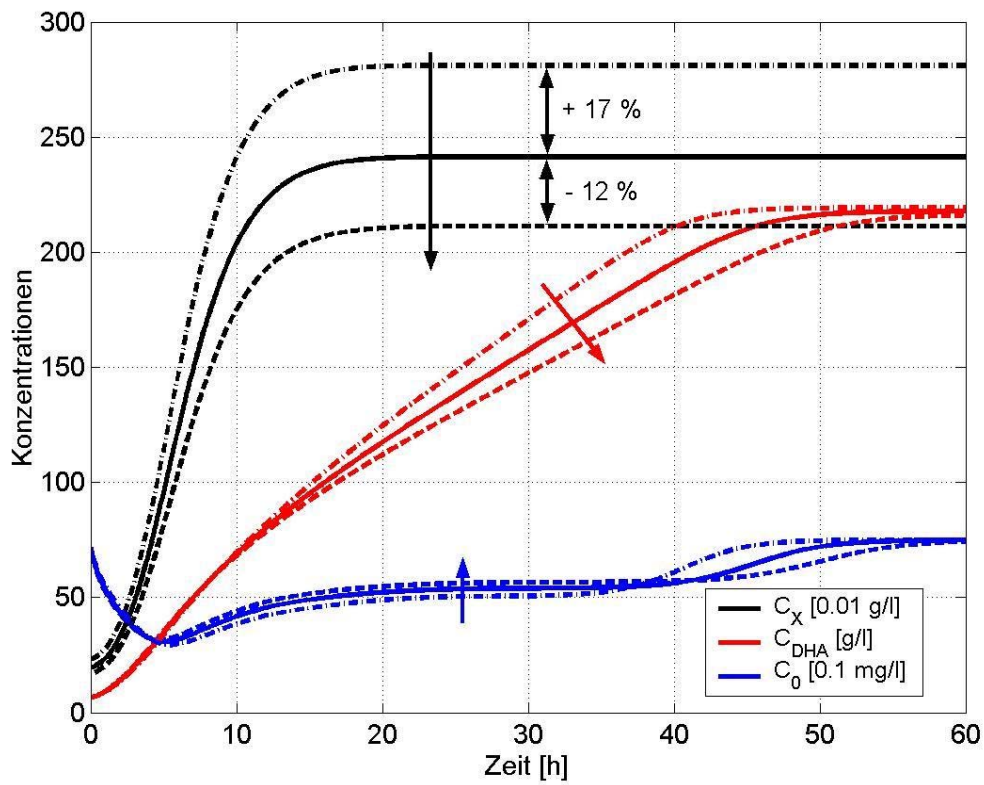


Abbildung 4-61: Einfluss des Parameters  $A_{DHA}$  (Variation:  $\pm 25\%$ )

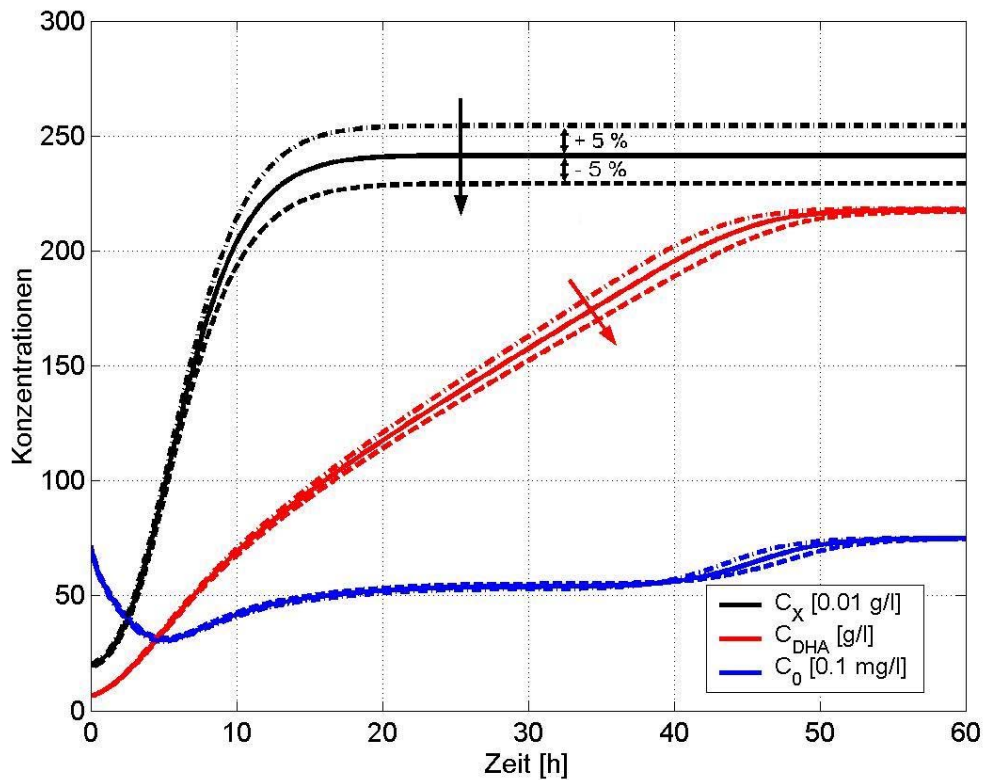
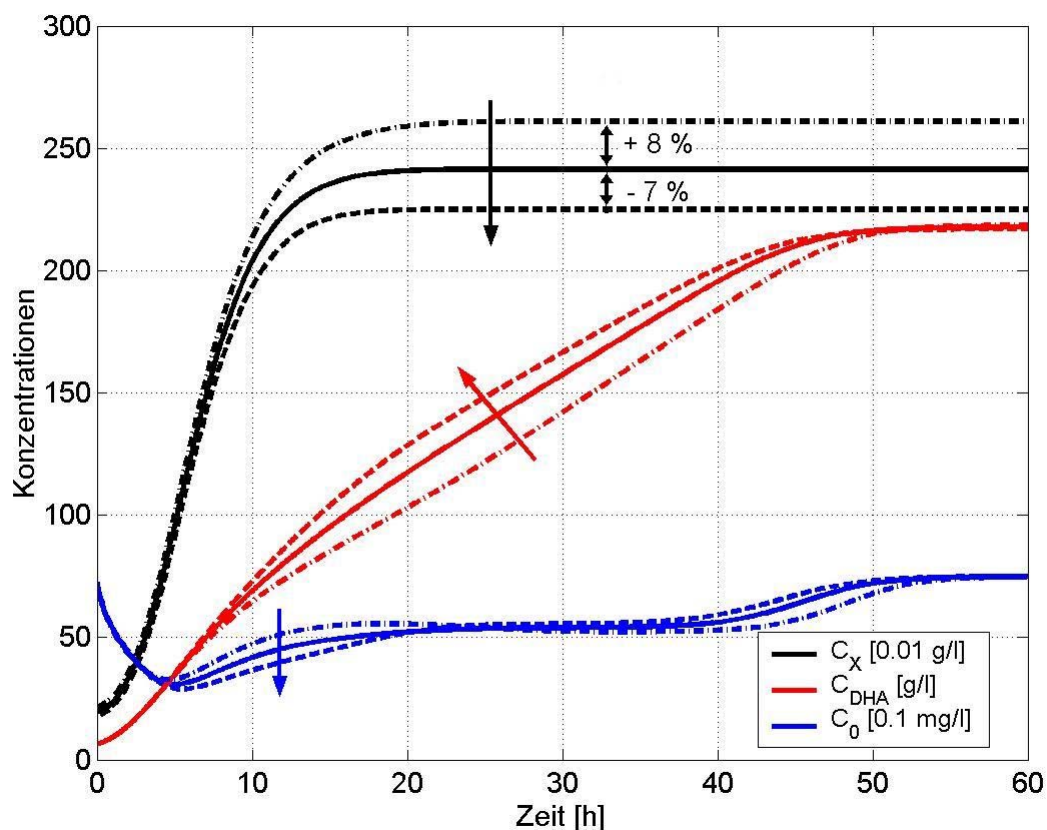


Abbildung 4-62: Einfluss des Parameters  $A_{Sorbose}$  (Variation:  $\pm 25\%$ )

In Abbildung 4-63 wird der Einfluss des Parameters  $B_{\max}$  (Gleichung (2-5), Seite 32) aufgezeigt, der den maximalen Wert des wachstumsunabhängigen Anteils der spezifischen Produktbildungsrate darstellt. Sein Einfluss kam erst ab einer Kultivierungsdauer von ca. 5 - 6 h zum Tragen, da die wachstumsabhängige Produktbildung erst zu diesem Zeitpunkt stark abnahm und der Anteil der wachstumsunabhängigen Produktbildung überwog. Umso größer der Wert von  $B_{\max}$  war, desto mehr DHA wurde wachstumsunabhängig gebildet. Die Konzentration der Biomasse nahm hingegen ab, da durch höhere Produktkonzentrationen zugleich auch die Inhibierungseinflüsse auf das Wachstum zunahmen. Eine Erhöhung von  $B_{\max}$  um 50 % führte zu einer um 7 % geringeren maximalen Zellkonzentration.



**Abbildung 4-63: Einfluss des Parameters  $B_{\max}$  (Variation: +/- 50 %)**

Die Parameter  $K_{b,0}$  und  $K_{b,Gly}$  aus Gleichung (2-5) stellen die Halbsättigungskonstanten von Sauerstoff bzw. Glycerin für den wachstumsunabhängigen Term der stationären Produktbildungsrate für Dihydroxyaceton dar. Ihr Einfluss auf den Prozessverlauf war sehr gering und konnte vernachlässigt werden, da zur wachstumsunabhängigen Produktbildung nach einer Kultivierungsdauer von 10 h ausreichend Sauerstoff und Glycerin zur Verfügung standen.

#### 4.4.7.2 Stöchiometrie

Die Ertragskoeffizienten (Gleichungen (2-32) bis (2-41), S. 39 bis S. 40) wurden jeweils um  $\pm 100\%$  variiert. Für die Variation der Parameter  $Y_{X,Gly}$ ,  $Y_{X,Sorbit}$ ,  $Y_{X,O,Gly}$ ,  $Y_{X,O,D-Sorbit}$ ,  $Y_{DHA,O}$  und  $Y_{Sorbit,O}$  ergab sich jedoch nur ein sehr geringer Einfluss auf die Konzentrationsverläufe des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens. Aufgrund der geringen Einflüsse der Ertragskoeffizienten wurde daher auf eine graphische Darstellung verzichtet.

#### 4.4.7.3 Verzugszeit

Die Parametersensibilitätsanalyse wurde für die 8 Parameter der Verzugszeitgleichungen (2-15) bis (2-18) auf Seite 35 durchgeführt. Eine Erhöhung der Zeitkonstante  $T_{X,Gly}$  (Gleichung (2-15)) der instationären spezifischen Wachstumsrate bewirkte eine größere biologische Trägheit der Kultur. So konnte länger exponentielles Wachstum erfolgen, da die Zellen auf die auftretende Produktinhibierung stärker verzögert reagierten. Eine Erhöhung der Zeitkonstante  $T_{X,Gly}$  um 50 % führte zu einer Erhöhung der maximalen Zellkonzentration um 15 % und zu einem schnelleren Erreichen der maximalen Produktendkonzentration. Die Sauerstoffkonzentration änderte sich hingegen nur gering (Abbildung 4-64). Das annähernd gleiche Verhalten zeigte sich bei einer Veränderung der Dämpfungskonstante  $D_{X,Gly}$  (Abbildung 4-65).

Für die Zeitkonstante  $T_{X,Sorbit}$  und die Dämpfungskonstante  $D_{X,Sorbit}$  (Gleichung (2-16), S. 35), welche in die instationäre spezifische Wachstumsrate für den Verbrauch des Substrats D-Sorbit eingehen, ergab sich ein analoger Einfluss wie für die instationäre spezifische Wachstumsrate bei Glycerin.



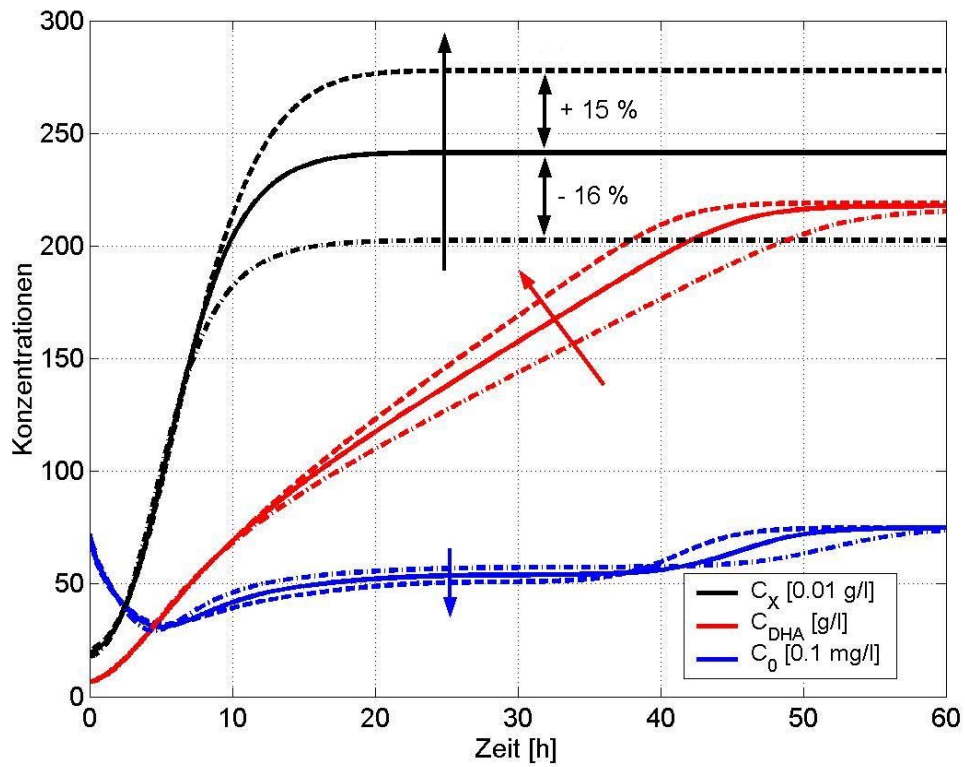


Abbildung 4-64: Einfluss des Parameters  $T_{X,Gly}$  (Variation:  $\pm 50\%$ )

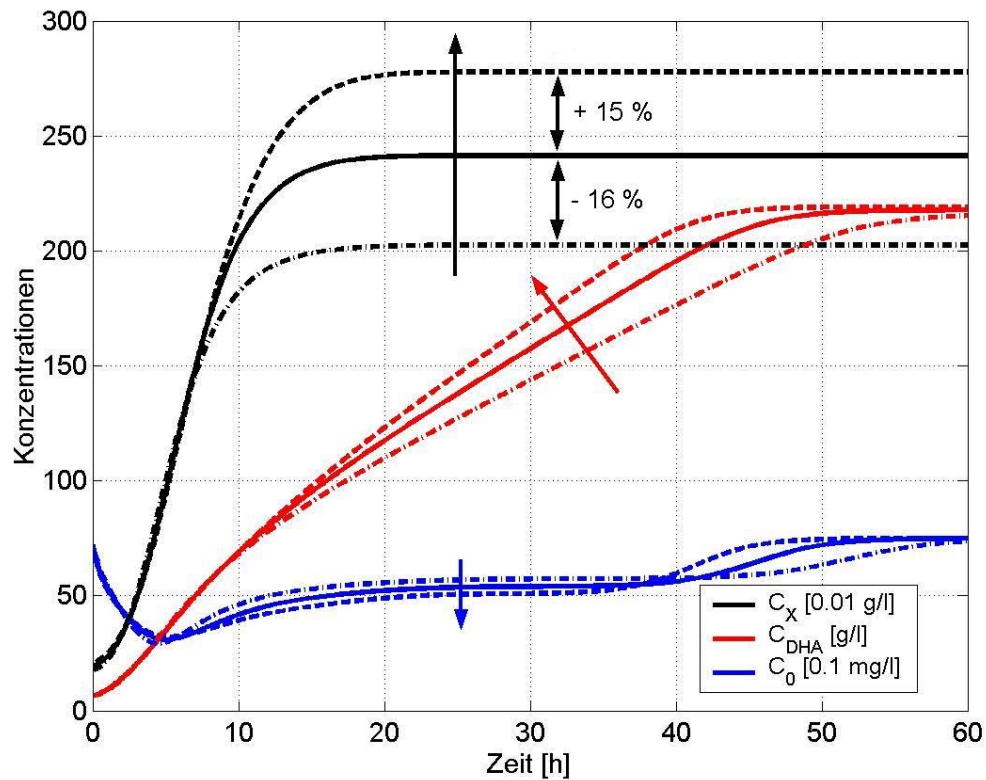
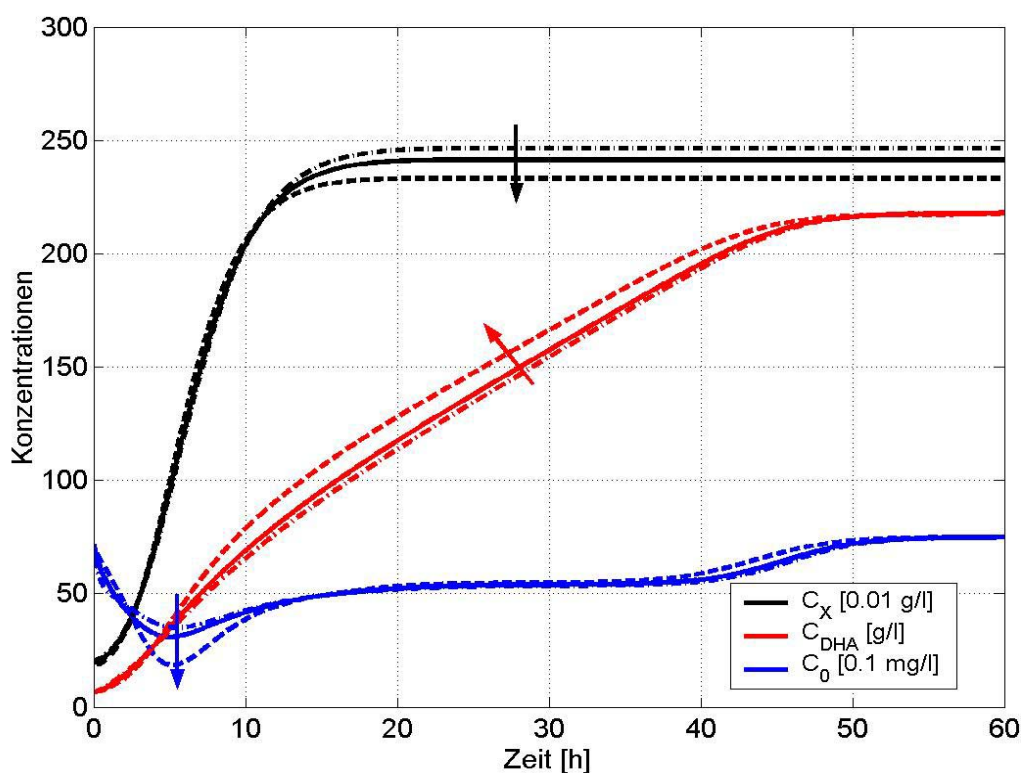


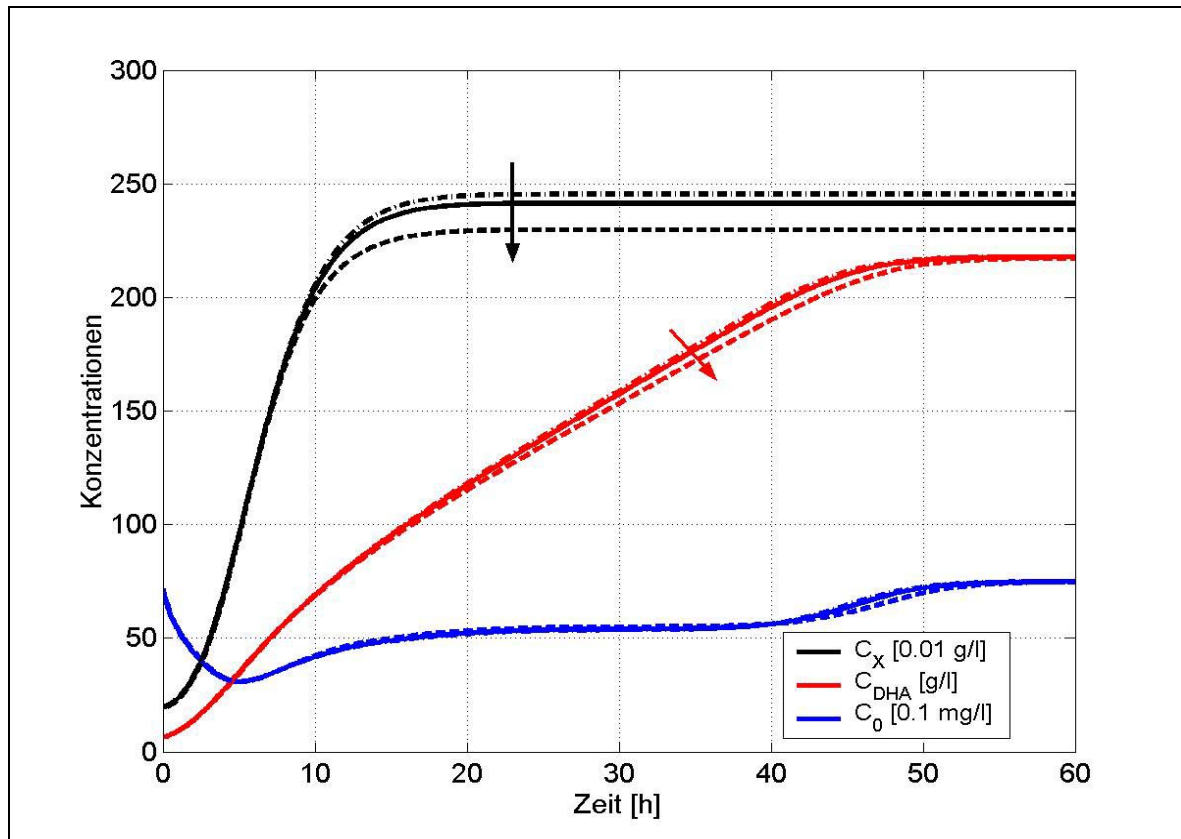
Abbildung 4-65: Einfluss des Parameters  $D_{X,Gly}$  (Variation:  $\pm 50\%$ )

Die Abbildung 4-66 gibt den Einfluss der Zeitkonstanten  $T_{DHA}$  (Gleichung (2-17), S. 35) bei der instationären Produktbildung für Dihydroxyaceton wieder. Der Parameter berücksichtigt die Trägheit des Systems im Bezug auf die inhibierende Wirkung von Dihydroxyaceton bei der Produktbildung. Bei höheren Parameterwerten konnte somit mehr Produkt und weniger Biomasse gebildet werden. Da weniger Inhibierung zur Zeit des exponentiellen Wachstums vorlag, nahm die Sauerstoffkonzentration in diesem Bereich ab.



**Abbildung 4-66: Einfluss des Parameters  $T_{DHA}$  (Variation: + 100 % / - 50 %)**

Die Zeitkonstante  $T_{Sorbitose}$  (Gleichung (2-18), S. 36) gibt die Trägheit des Systems im Bezug auf die inhibierende Wirkung von Dihydroxyaceton bei der instationären Produktbildung von L-Sorbitose wieder (Abbildung 4-67). Bei einer Vergrößerung des Wertes nahm die Biomasse- und die Produktkonzentration von Dihydroxyaceton ab.



**Abbildung 4-67: Einfluss des Parameters  $T_{Sorbose}$  (Variation: + 100 % / - 50 %)**

$R_{DHA}$  aus Abbildung 4-68 ist die Konstante die die aktuelle zeitliche Änderung der Produktkonzentration mit der zeitlichen Änderung der instationären spezifischen Produktbildungsrate für DHA in Beziehung setzt. Größere Werte bewirken einen geringfügigen Anstieg der Produktkonzentration und geringfügig niedrigere Zellkonzentrationen. Der Parameters  $R_{L-Sorbose}$  übt einen äquivalenten Einfluss auf die Konzentrationsverläufe aus.

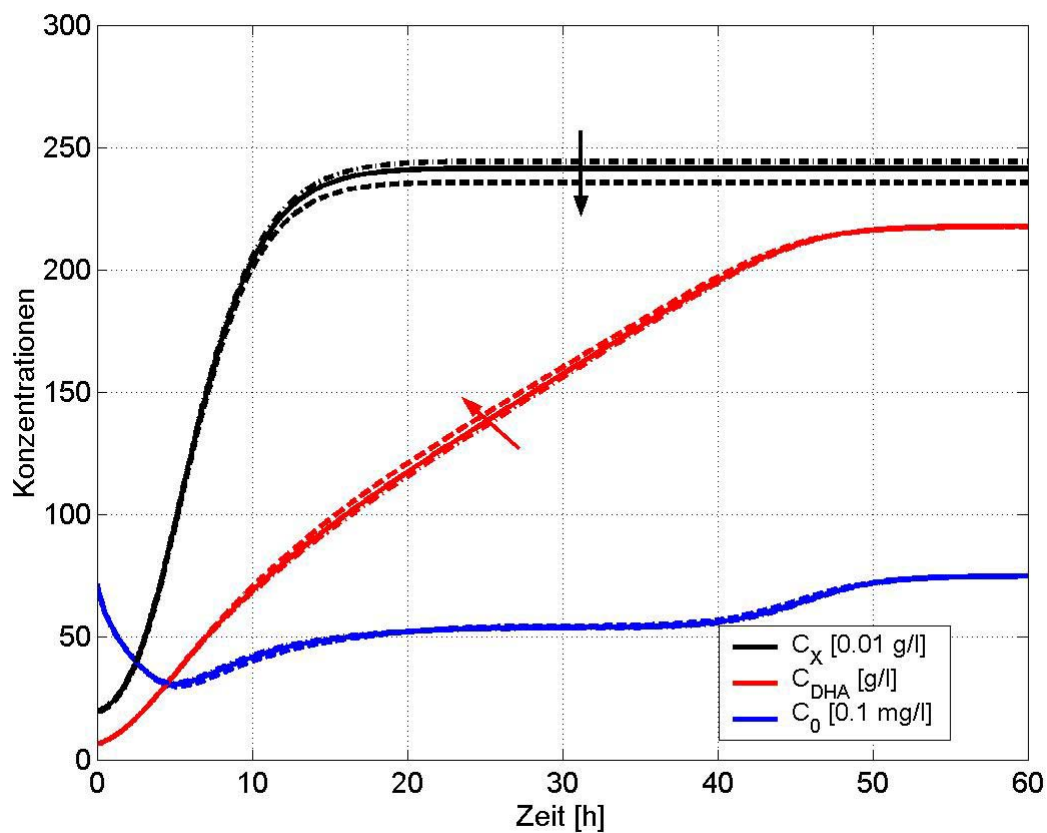


Abbildung 4-68: Einfluss des Parameters  $R_{DHA}$  (Variation: +100 % / - 50 %)

#### 4.4.7.4 Segregation

Um den Einfluss der 5 Parameter der Segregation aus den Gleichungen (2-19) bis (2-23) auf Seite 37 darstellen zu können, wurde als Auftragung die Gesamtzellkonzentration und deren Unterteilung in lebende, sterile und tote Zellen gegen die DHA-Konzentration gewählt. Die folgenden Darstellungen basieren auf dem Startwerte- und Modellparametersatz aus Tabelle 4-26 bis Tabelle 4-29 (siehe S. 143).

Der Parameter  $S$  (Gleichung (2-23), S. 37) stellt die Produktbildungsrate von Dihydroxyacetone für sterile Zellen dar. Da sterile Zellen erst im Laufe des Prozesses gebildet wurden, wirkte sich eine Variation von  $S$  erst ab einer DHA-Konzentration von circa 100 g/l aus. Je größer der Parameter  $S$  gewählt wurde, umso schneller erfolgte die Produktbildung durch sterile Zellen. Die maximale Produktendkonzentration wurde dadurch früher erreicht, ihr Wert änderte sich jedoch nicht (nicht dargestellt).

In Abbildung 4-69 wird der Einfluss der spezifischen Bildungsrate von sterilen Zellen  $\mu_{\text{steril}}$  (Gleichung (2-20), S. 37) dargestellt. Eine Erhöhung von  $\mu_{\text{steril}}$  um 100 % bewirkte eine schnellere Umwandlung von lebenden in sterile Zellen. Die maximale Konzentration von lebenden Zellen sank um ca. 12 % auf 1.7 g/l und die maximale DHA-Konzentration bis zu der lebende Zellen vorhanden waren sank um ca. 14 % auf eine DHA-Konzentration von 138 g/l. Abbildung 4-70 gibt den Zusammenhang mit der spezifischen Absterberate  $\mu_{\text{tot}}$  (Gleichung (2-21), S. 37) wieder. Der Einfluss spielte erst für hohe DHA-Konzentrationen eine signifikante Rolle. Eine Erhöhung der spezifischen Absterberate  $\mu_{\text{tot}}$  um 100 % führte zu einer um ca. 5 % geringeren DHA-Endkonzentration von 210 g/l. Die Sauerstoffsättigungskonzentration wurde früher erreicht, da die sterilen Zellen schneller in tote Zellen umgewandelt wurden (nicht gezeigt).

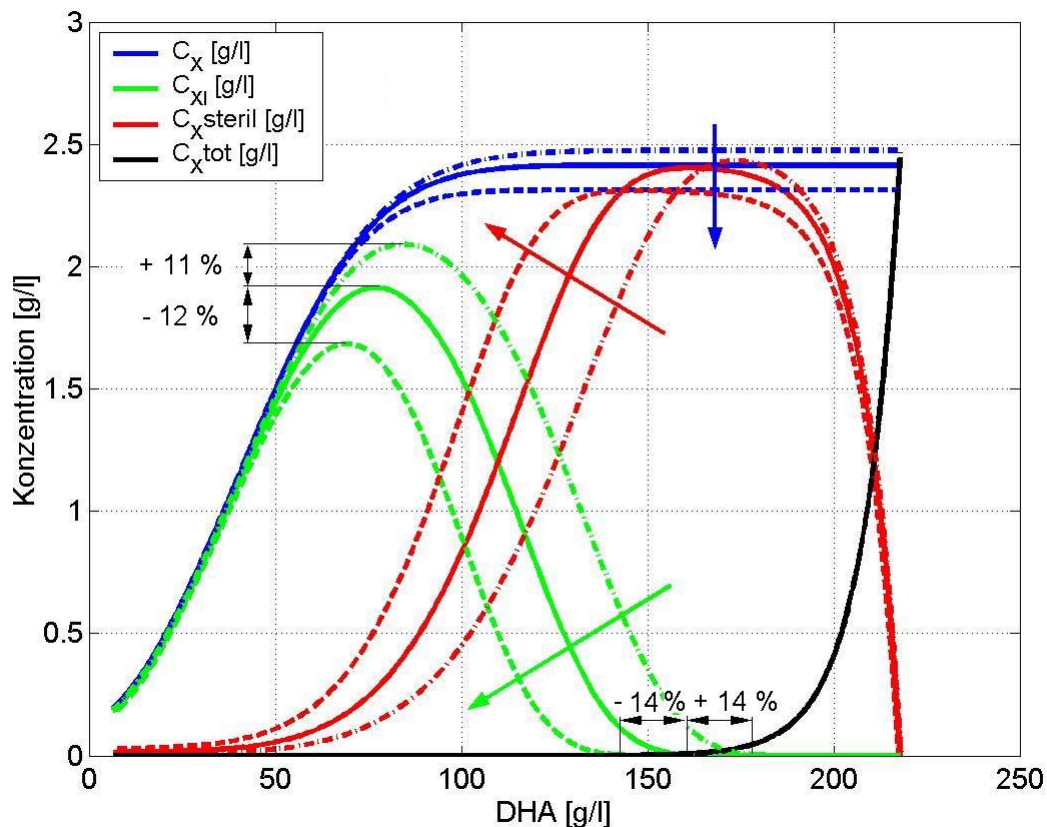
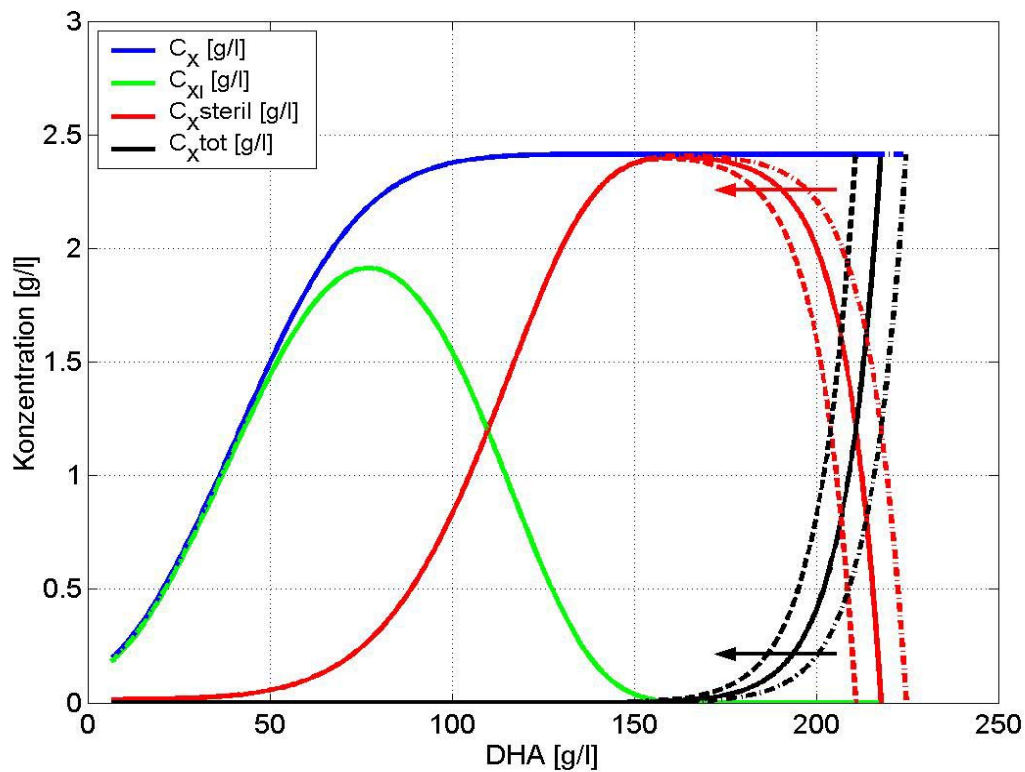


Abbildung 4-69: Einfluss des Parameters  $\mu_{\text{steril}}$  (Variation: +100 %/ -50 %)



**Abbildung 4-70: Einfluss des Parameters  $\mu_{tot}$  (Variation: +100 %/ -50 %)**

Der Parameter  $K_{DHA,steril}$  (Gleichung (2-20), S. 37) berücksichtigt den toxischen Einfluss von DHA auf die Kultur.  $K_{DHA,steril}$  ging in exponentieller Form in die Bildungsgeschwindigkeit der sterilen Zellen ein. Eine Erhöhung des Parameters  $K_{DHA,steril}$  um 25 % bewirkte eine Abnahme der maximalen Konzentration von lebenden Zellen um ca. 12 % auf 1.7 g/l. Die maximale DHA-Konzentration, bis zu der lebende Zellen vorhanden waren, sank um ca. 19 % auf eine DHA-Konzentration von 130 g/l (Abbildung 4-71).

Abbildung 4-72 gibt den Einfluss von  $K_{DHA,tot}$  (Gleichung (2-21), S. 37) wieder. Eine Anhebung des Parameters  $K_{DHA,tot}$  um 25 % bewirkte, dass die sterilen Zellen bereits bei geringeren Produktkonzentrationen in tote Zellen umgewandelt wurden. Dadurch sank die mögliche DHA-Endkonzentration um 20 % auf 175 g/l.

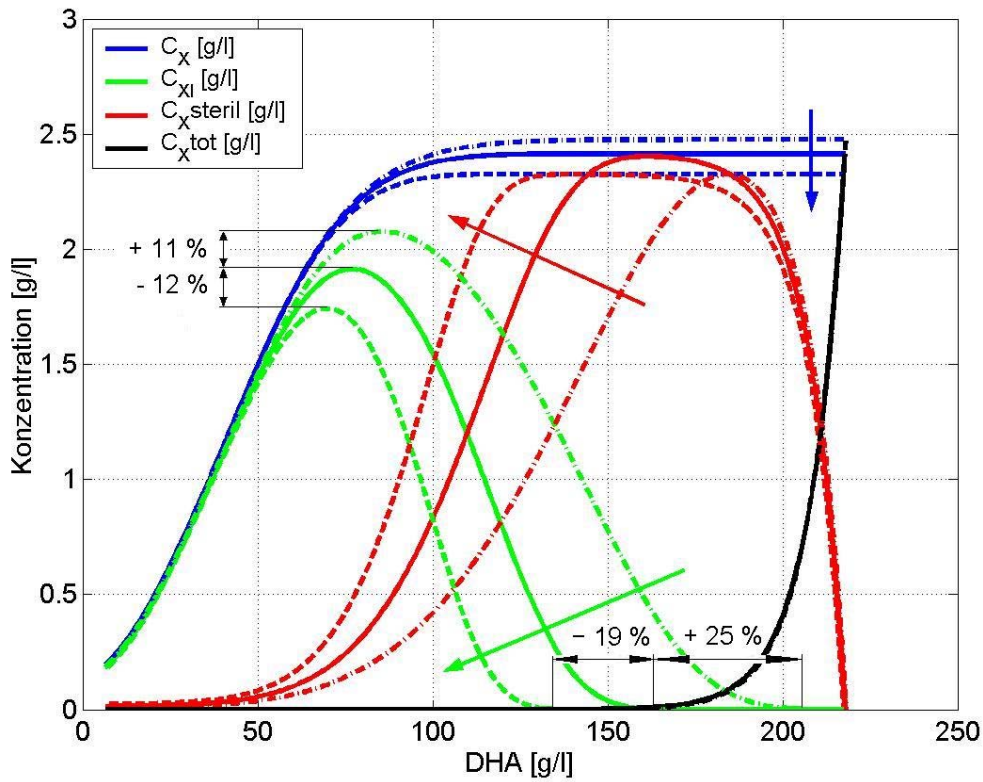


Abbildung 4-71: Einfluss des Parameters  $K_{DHA,steril}$  (Variation:  $\pm 25\%$ )

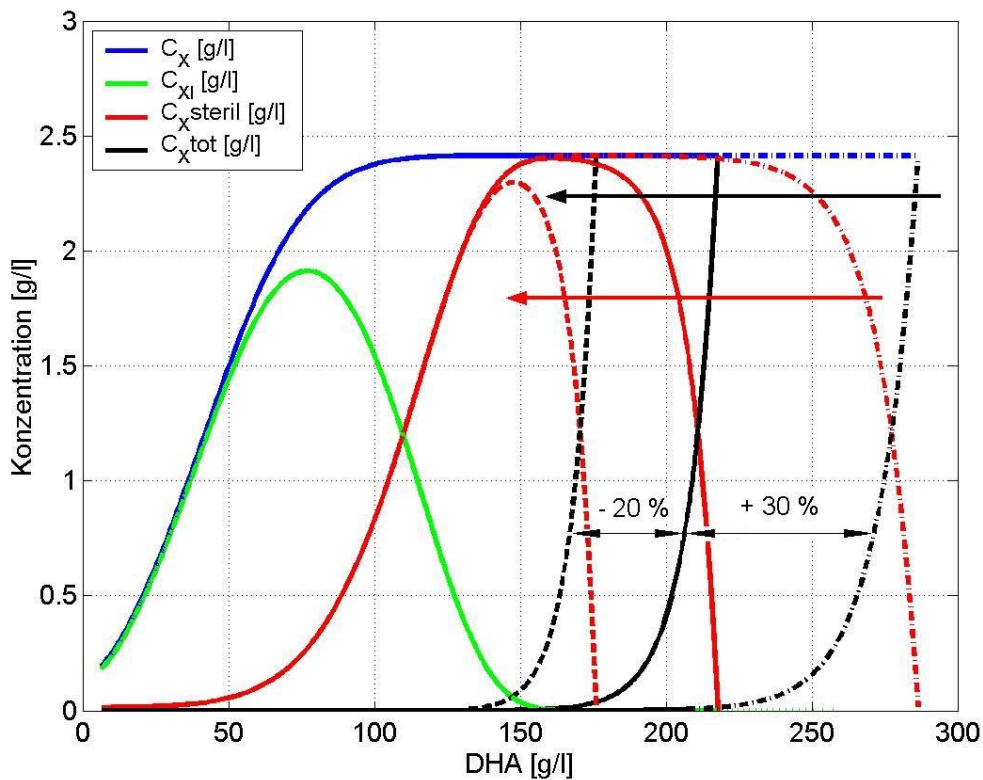


Abbildung 4-72: Einfluss des Parameters  $K_{DHA,tot}$  (Variation:  $\pm 25\%$ )

#### 4.4.7.5 Zusammenfassung der Parametersensibilitätsanalyse

Zusammenfassend läßt sich über den Einfluss der kinetischen Parameter feststellen, dass schon geringe Änderungen der kinetischen Parameter  $\mu_{\max, \text{Gly}}$ ,  $\mu_{\max, \text{Sor}}$ ,  $K_{\text{DHA}}$ ,  $A_{\text{DHA}}$ ,  $A_{\text{Sorbitose}}$  und  $B_{\max}$  großen Einfluss auf die Konzentrationsverläufe ausübten. Die Auswirkung der Parameter  $K_{\text{O, Gly}}$ ,  $K_{\text{O, Sorbit}}$ ,  $K_{\text{Sorbit}}$ ,  $K_{\text{b, Gly}}$  und  $K_{\text{b, O}}$  war hingegen gering. Der Einfluss der stöchiometrischen Parameter war ebenso als gering einzuschätzen. Einen ähnlichen Einfluss, wie die kinetischen Parameter übten die Verzugszeitparameter aus, da auch sie die Wachstums- und Produktbildungsraten des Modells deutlich beeinflussten. Besonders sensitiv reagierte das Modell dabei auf eine Änderung der Parameter für die Wachstumsrate  $T_{\text{X, Gly}}$ ,  $T_{\text{X, Sorbit}}$ ,  $D_{\text{X, Gly}}$  und  $D_{\text{X, Sorbit}}$ . Der Einfluss der Parameter für die Produktbildungsrate  $T_{\text{DHA}}$ ,  $T_{\text{Sorbitose}}$ ,  $R_{\text{DHA}}$  und  $R_{\text{Sorbitose}}$  war hingegen nicht so stark ausgeprägt.

Die Parameter der Segregation  $\mu_{\text{steril}}$ ,  $\mu_{\text{tot}}$ ,  $S$ ,  $K_{\text{DHA, steril}}$  und  $K_{\text{DHA, tot}}$  übten einen starken Einfluss auf das Modell aus. So unterschieden sich bei einer Variation der Parameter  $\mu_{\text{steril}}$  und  $K_{\text{DHA, steril}}$  die Zeit- und DHA-Spannen, innerhalb der die Kultur regenerationsfähig war, deutlich. Die maximal mögliche DHA-Endkonzentration wurde hingegen über die Parameter  $\mu_{\text{tot}}$  und  $K_{\text{DHA, tot}}$  stark beeinflusst.

#### 4.4.8 Rechnergestützte Optimierung des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens

Die Produktbildungsrate und die DHA-Endkonzentration des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens waren von verschiedenen betriebsspezifischen Faktoren abhängig. Eine besondere Rolle spielten dabei das Restvolumen und der DHA-Schwellwert, wie bereits in Kapitel 4.1 (S. 78) dargestellt. Eine experimentelle Optimierung dieser Betriebsparameter gestaltete sich aufgrund des enormen versuchstechnischen Aufwands als äußerst komplex und zeitaufwändig. Einen Ausweg bot deshalb die rechnergestützte Optimierung dieser beiden Schlüsselparameter mit Hilfe des segregierten Verzugszeitmodells.

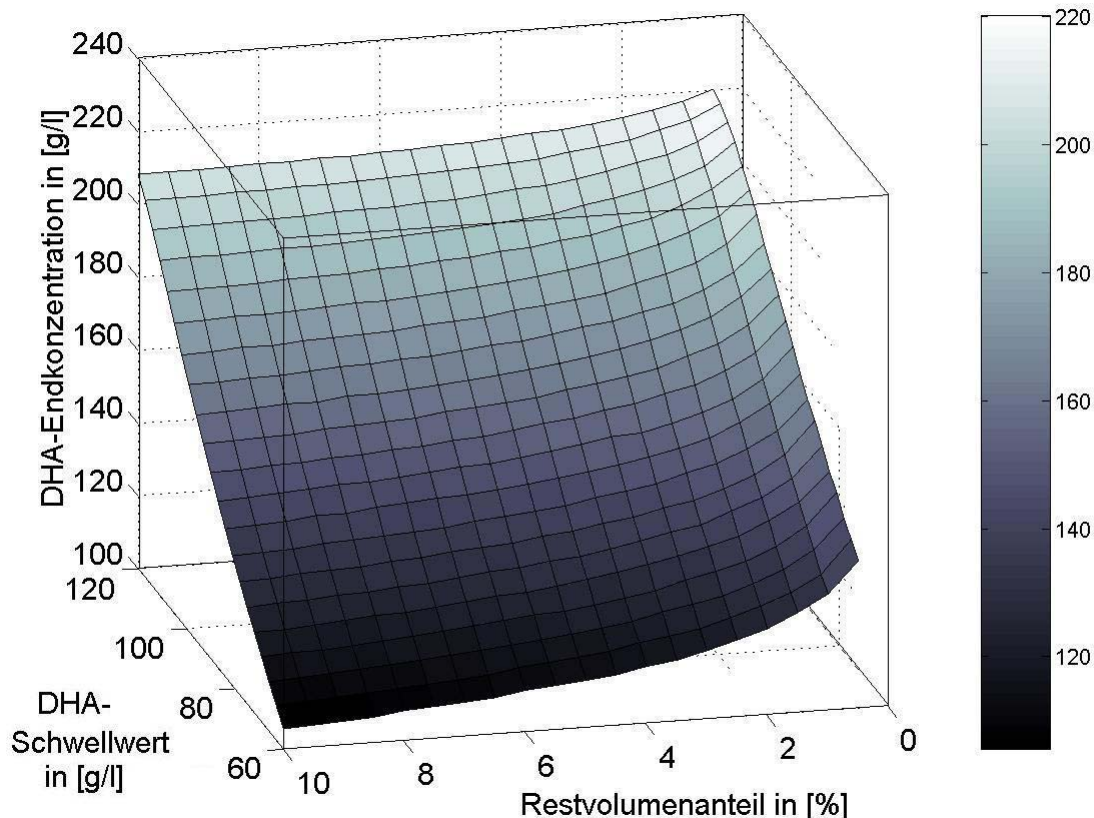
Zur Berechnung wurde der Startwerte- und Modellparametersatz für den Technikumsmaßstab aus Tabelle 4-26 bis Tabelle 4-29 (siehe S. 143 - 144) verwendet. Für die rechnergestützte Optimierung wurde der Restvolumenanteil in einem Bereich von 1 % bis 10 % variiert. Der DHA-Schwellwert wurde über einen Konzentrationsbereich von 60 g/l bis 120 g/l variiert. In der Abbildung 4-73 und Abbildung 4-74 ist das Ergebnis in graphischer Form dargestellt. Aus



Abbildung 4-73 lässt sich entnehmen, dass die DHA-Endkonzentration mit fallendem Restvolumenanteil und mit steigendem DHA-Schwellwert zunahm. Die Produktbildungsrate nahm hingegen nach Abbildung 4-74 mit fallendem Restvolumen zu und mit steigendem DHA-Schwellwert ab. In Tabelle 4-30 ist dieser Zusammenhang schematisch dargestellt.

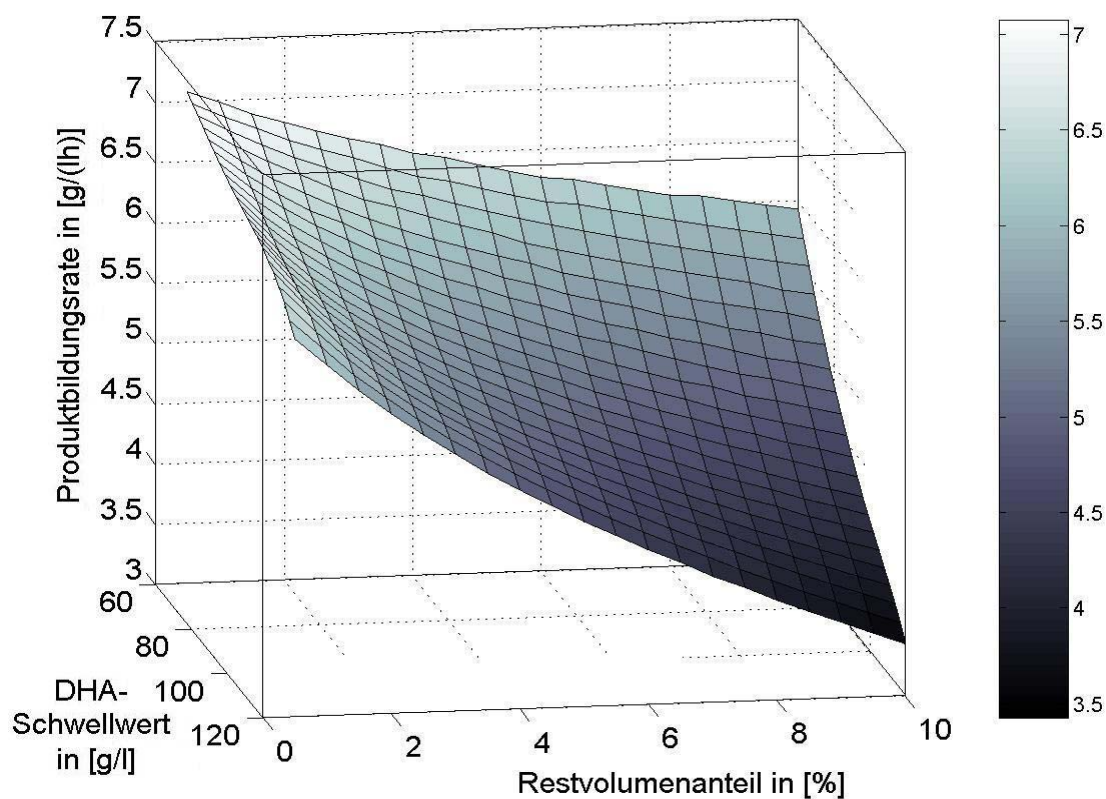
**Tabelle 4-30: Änderung der DHA-Endkonzentration und der Produktbildungsrate für das zweistufige zyklisch betriebenen Zulaufverfahren in Abhängigkeit des Restvolumens und des DHA-Schwellwertes. Legende: Zunahme ↑; Abnahme ↓**

	Restvolumenanteil ↓	DHA-Schwellwert ↓
DHA-Endkonzentration	↑	↓
Produktbildungsrate	↑	↑



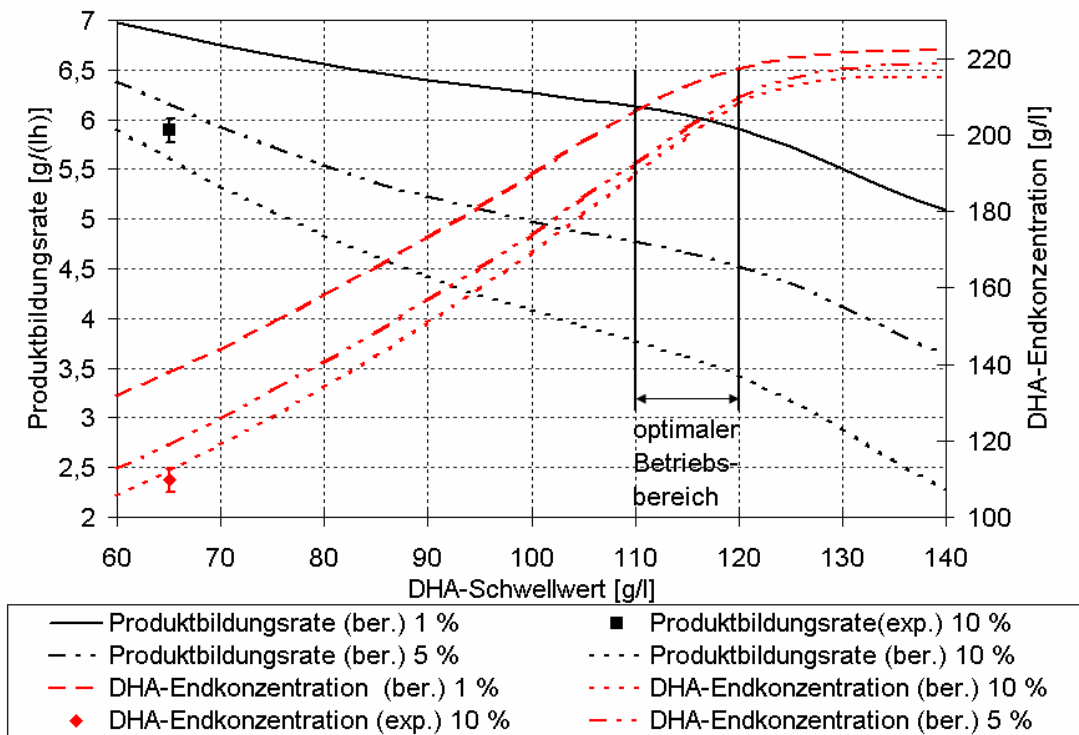
**Abbildung 4-73: Berechnung der DHA-Endkonzentration für das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren in Abhängigkeit des Restvolumenanteils und des DHA-Schwellwertes im Technikumsmaßstab**

Nach Tabelle 4-30 soll demnach der Restvolumenanteil so gering wie möglich sein, um sowohl eine hohe DHA-Endkonzentration als auch eine hohe Produktbildungsrate zu erzielen. Je niedriger der Restvolumenanteil bei einem Chargenwechsel war, umso niedriger war auch die DHA-Konzentration zu Beginn des neuen Zyklus. Dies hatte zur Folge, dass die Inhibition durch DHA geringer war und das Zeitfenster bis zum Erreichen des DHA-Schwellwertes länger war. In Reaktor 1 und 2 trug die daraus resultierende höhere Biomasse dazu bei, dass höhere DHA-Endkonzentrationen und höhere Produktbildungsraten erreicht wurden. Dieses Ergebnis ließ sich allerdings nur bedingt im Experiment umsetzen. Jeder Chargenwechsel stellte für die Mikroorganismen eine Belastung dar, da sich in kurzer Zeit die Milieubedingungen schlagartig änderten. Je größer dabei das Puffervolumen in Form eines größeren Restvolumens war, umso schonender konnte dieser Chargenwechsel für die Mikroorganismen durchgeführt werden. Daher war im Experiment das minimale Restvolumen auf 2 % (Laborreaktor) bzw. 10 % (Technikum) begrenzt.



**Abbildung 4-74: Berechnung der Produktbildungsrate für das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren in Abhängigkeit des Restvolumenanteils und des DHA-Schwellwertes im Technikumsmaßstab**

Eine Anhebung des DHA-Schwellwertes führte zu einer höheren DHA-Endkonzentration, aber auch zu einer fallenden Produktbildungsrate. Zur Verdeutlichung dieses Zusammenhanges wurde in der Abbildung 4-75 für Restvolumenanteile von 1 %, 5 % und 10 % die DHA-Endkonzentration und die Produktbildungsrate gegen den DHA-Schwellwert aufgetragen. Über den gesamten Bereich verhielten sich die Verläufe gegenläufig. Es ist jedoch zu erkennen, dass die Steigung der DHA-Endkonzentration überwiegend höher war als die der Produktbildungsrate. Deshalb wurde ein DHA-Schwellwert in einem Bereich von 110 - 120 g/l bei einem Restvolumen von 1 % als optimal angesehen. Die mit dieser Einstellung erzielte Produktbildungsrate betrug 5.90 bis 6.15 g/(lh) bei einer DHA-Endkonzentration von 207 - 218 g/l. Mit dem konventionellen Zulaufverfahren ließen sich nur geringfügig höhere DHA-Endkonzentrationen von 220 g/l erreichen (persönliche Mitteilung, E. Merck KGaA). Die erzielbare Raum-Zeit-Ausbeute bei dem Zulaufverfahren war allerdings aufgrund der in Kapitel 1 erwähnten Nachteile deutlich niedriger als bei der semikontinuierlichen Betriebsweise. Für die anschließende Produktaufarbeitung ist die Wahl der Betriebsweise (Zulaufverfahren oder zweistufiges zyklisch betriebenes Zulaufverfahren) nicht von Bedeutung. Für die Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses ist letztendlich eine Abwägung der relativen Kosten von Kultivierung und Produktaufarbeitung maßgebend. Hierbei gilt zumeist, dass eine möglichst hohe Produktendkonzentration vorteilhaft für die Aufarbeitung ist.



**Abbildung 4-75: Auftragung der Produktbildungsrate und der Produktendkonzentration über den DHA-Schwellwert für den 2-stufigen Technikumsbetrieb mit einem Restvolumen von 1, 5 und 10 % beim Chargenwechsel**

#### 4.4.9 Zusammenfassung der Simulationsergebnisse

Zur Simulation des semikontinuierlichen Verfahrens wurde ein segregiertes Verzugszeitmodell entwickelt, welches explizit auf den Ergebnissen der reaktionskinetischen Untersuchungen des DHA-Einflusses auf die Kultur aufbaute. Als Grundlage für die Simulationsrechnungen diente ein segregiertes instationäres mathematisches Modell, welches auf den entsprechenden Stoffbilanzen sowie den formalkinetischen Ansätzen für die Bioreaktion basierte. Zur Beschreibung des Einflusses der Produktinhibition auf das Wachstum wurde eine Segregation in drei mögliche Zellzustände vorgenommen. Hierbei wurde angenommen, dass sich teilungsfähige Zellen aufgrund des Einflusses der Produktinhibition in nur noch rein produktbildende Zellen bzw. katalytisch aktive Zelltrümmer umwandeln, die schließlich inaktiv werden. Experimentell wurde zuvor gezeigt, dass der Zustand der Zellen bei einer semikontinuierlichen Betriebsweise nicht nur vom aktuellen Milieu abhing sondern auch von der Vorgeschichte. Um dieses auch als biologische Trägheit bekannte Phänomen erfassen zu können,

fanden unterschiedliche Verzugszeitgleichungen Eintritt in die kinetischen Ansätze, welche damit auch phänomenologisch die Vorgeschichte der Bakterien mitberücksichtigten.

Mit Hilfe der Monte Carlo Methode und der Simplex Methode wurden die Modellparameter an Laborreaktor- und Technikumläufe angepasst. Ein Vergleich mit weiteren experimentell gewonnenen unabhängigen Laborreaktordaten bei einem unterschiedlichen DHA-Schwellwert (82 g/l statt 101 g/l) ergab eine hinreichend gute Übereinstimmung zwischen Modell und Experiment.

Die Modellierung des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens im Technikumsmaßstab mit dem entwickelten Modell zeigte, dass der Einfluss des Restvolumens mit zunehmendem Schwellwert an Bedeutung gewann, da das Wachstum aufgrund der stärkeren Inhibition durch höhere DHA-Startkonzentrationen in der ersten Stufe negativ beeinflusst wurde und somit zu einer niedrigeren Biomassekonzentration und einer verschlechterten Produktbildungsrate führte. Zudem führten höhere DHA-Schwellwerte zu niedrigeren Produktbildungsraten und höheren Produktendkonzentrationen. Die Simulation lieferte für einen optimalen Betriebsbereich bezüglich eines möglichst kleinen Restvolumens von ca. 1 % und eines DHA-Schwellwertes von ca. 110 g/l – 120 g/l eine Produktbildungsrate von ca. 5.9 g/(lh) bis 6.15 g/(lh) und eine DHA-Endkonzentration von ca. 207 g/l bis 218 g/l.

## 5 Zusammenfassung

Die Herstellung von Dihydroxyaceton (DHA) erfolgt großtechnisch üblicherweise durch die mikrobielle Umsetzung von Glycerin mittels *Gluconobacter oxydans* im Zulaufverfahren. Nachteile dieser Betriebsweise sind das zeit- und kostenintensive Reinigen, Sterilisieren und Neuinokulieren mit einer Vorkultur nach jedem Zyklus. Eine geeignete Alternative zu diesem Verfahren stellt das zyklisch betriebene Zulaufverfahren dar. Bei dem zyklisch betriebenen Zulaufverfahren wird ein Restvolumen an Kulturbrühe im Reaktor nach jedem Zyklus belassen, welches als Inokulat für den nächsten Zyklus dient. Da der Prozess durch eine ausgeprägte Produktinhibition, die bis zur irreversiblen Schädigung der Kultur führen kann, charakterisiert ist, ist das Erreichen hoher DHA-Konzentrationen im einstufigen Betrieb nicht möglich. Deswegen wurde das zyklisch betriebene Zulaufverfahren in einer zweistufigen Kaskade von Reaktoren realisiert. Die DHA-Produktion wird dabei in zwei räumlich getrennte Stufen aufgeteilt. Die erste Stufe dient der Bereitstellung und Bildung einer vitalen, regenerationsfähigen Kultur und die zweite Stufe dem Erreichen einer für die Produktaufarbeitung vorteilhaften hohen Produktendkonzentration.

Das semikontinuierliche zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren wurde erstmalig im Technikumsmaßstab durchgeführt. Der DHA-Schwellwert wurde auf 65 g/l festgelegt und das Restvolumen betrug 10 % des Gesamtvolumens. Über einen Zeitraum von fünf Tagen wurden über sieben Zyklen mit hoher Reproduzierbarkeit eine Produktbildungsrate von ca. 5 g/(lh) und eine DHA-Endkonzentration von 110 g/l gemessen. Der Ertragskoeffizient  $Y_{\text{DHA/Gly}}$  betrug ca. 0.8.

Zur weiteren Optimierung des Verfahrens wurden der ersten Reaktorstufe nach jedem Chargenwechsel diskontinuierlich 10 g/l Sorbit beziehungsweise 12 g/l Saccharose als zweite Kohlenstoffquelle zugegeben. Ziel dieser Optimierungsmaßnahme war es, die aktive Biomasse im System und somit die Produktbildung zu vergrößern. Die Umsetzung beider Kohlenstoffquellen erfolgte zeitgleich zur Glycerinumsetzung. Die Zugabe von Saccharose führte im Vergleich zum Referenzmedium zu einer Erhöhung der Biomasse um 26 %. Die Produktbildung nahm allerdings um 18.7 % ab. Die Zugabe von 10 g/l Sorbit wirkte sich sowohl auf die Biomassebildung als auch auf die Produktbildung förderlich aus. Hierbei konnte die Produktbildungsrate gegenüber dem Referenzmedium um 17 % von 5.03 g/(lh) auf 5.89 g/(lh) im gesamten Prozess gesteigert werden. Der erzielte Ertragskoeffizient  $Y_{\text{DHA/Gly}}$  blieb unverändert bei ca. 0.8. Die DHA-Endkonzentration betrug unverändert ca. 110 g/l. Bei den Versuchen in der zweistufigen Technikumsanlage wurde zudem beobachtet, dass ein Betrieb unter

hygienischen Bedingungen (ohne Sterilisation) im zweiten Reaktor aufgrund der hohen DHA-Konzentrationen, die auch auf andere Organismen inhibierend wirken, möglich war. Ferner konnten mögliche Kontaminationen aufgrund der im Reaktor 2 erreichten hohen Zelldichte an *Gluconobacter oxydans* in der verbleibenden Prozesslaufzeit nicht mehr durchschlagen.

Reaktionskinetische Untersuchungen des DHA-Einflusses auf *Gluconobacter oxydans* zeigten, dass die Zellen bis ca. 80 g/l DHA wachstumsfähig und im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren bis ca. 160 g/l DHA regenerationsfähig waren. Die Regenerationsfähigkeit der Zellen hing dabei von der DHA-Konzentration und der Einwirkdauer ab. In diesem Zusammenhang erfolgte eine erstmalige Quantifizierung des zeitlichen Einflusses der Produktinhibition im Laborreaktor. Die DHA-Konzentration von 80 g/l für die Grenze der Wachstumsfähigkeit der Kultur wurde im zyklisch betriebenen Zulaufverfahren nach ca. 22 h erreicht. Der DHA-Konzentrationsbereich von 80 g/l bis 160 g/l in dem die Kultur regenerationsfähig war, entsprach bei dem zyklisch betriebenen Zulaufverfahren einem Zeitfenster von ca. 24 h. Über einer DHA-Konzentration von 160 g/l konnten sich die Zellen nicht mehr in einen teilungsfähigen Zustand zurückentwickeln. Von 160 g/l bis 220 g/l DHA konnte noch Produkt gebildet werden. Diese DHA-Endkonzentration wurde nach weiteren 31 h erreicht. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden Messungen mit zwei unterschiedlichen DHA-Schwellwerten von 82 g/l und 101 g/l in einer zweistufigen Laborreaktoranlage durchgeführt. Hierbei wurden DHA-Endkonzentrationen von 161.5 g/l bzw. 186 g/l erreicht. Die Produktbildungsrate blieb jedoch mit ca. 3.6 g/(lh) für beide Einstellungen unter den Werten, welche im Technikumsmaßstab erreicht wurden.

Ein neuartiger Optimierungsansatz war die Erhöhung der aktiven Biomasse in der ersten Reaktorstufe mittels einer in-situ Immobilisierung von Zellen. Als Trägermatrix wurden silikonbeschichtete Raluringe eingesetzt. Die Vorteile dieser porösen Trägermatrix lagen im Schutz der Organismen vor Abrasion und in der Sauerstoffdurchlässigkeit der Silikonmatrix. In Laborreaktoruntersuchungen wurde während einer Kultivierungsdauer von 18 Tagen eine Erhöhung der Produktbildungsrate um 60 % von 3.5 g/(lh) auf 5.9 g/(lh) erzielt. Zudem wurde beobachtet, dass sich mit steigendem DHA-Schwellwert die Zunahme der Immobilisierung verlangsamte. Die Zunahme der Biomasse aufgrund der Immobilisierung führte schließlich zu einer Verkürzung der Prozesszeiten in Reaktor 1 und 2. Die erreichte DHA-Endkonzentration lag deshalb mit 137.5 g/l im Vergleich zu den Referenzläufen ohne Immobilisierung mit 161.5 g/l um 36 % niedriger. Um sowohl eine adäquate Immobilisierung als auch eine hohe DHA-Endkonzentration zu erreichen, wäre daher eine dritte Reaktorstufe erforderlich. Allerdings würde dies unverhältnismäßig hohe Investitionskosten mit sich führen.

Zur mathematischen Beschreibung des semikontinuierlichen Verfahrens wurde ein neuartiges segregiertes Verzugszeitmodell entwickelt, welches explizit auf den Ergebnissen der reaktionskinetischen Untersuchungen des DHA-Einflusses auf der Kultur aufbaute. Das instationäre mathematische Modell basierte auf den entsprechenden Stoffbilanzen sowie den formalkinetischen Ansätzen für die Bioreaktion. Zur Beschreibung des Einflusses der Produktinhibition wurde eine Segregation in drei mögliche Zellzustände vorgenommen. Hierbei wurde angenommen, dass sich regenerationsfähige Zellen aufgrund des Einflusses der Produktinhibition in nur noch rein produktbildende Zellen bzw. katalytisch aktive Zelltrümmer umwandeln, die schließlich inaktiv werden. Zur Beschreibung der Umwandlung in sterile und tote Zellen kamen erstmalig exponentielle Ansätze zum Einsatz. Experimentell konnte gezeigt werden, dass der Zustand der Zellen bei einer semikontinuierlichen Betriebsweise nicht nur vom aktuellen Milieu abhing sondern auch von der Vorgeschichte. Um dieses, auch als „biologische Trägheit“ bekannte Phänomen erfassen zu können, fanden unterschiedliche Verzugszeitgleichungen Eintritt in die kinetischen Ansätze, welche damit auch phänomenologisch die Vorgeschichte der Bakterien mitberücksichtigten.

Mit Hilfe gängiger Algorithmen wurden die Modellparameter an Laborreaktor- und Technikumläufe angepasst. Ein Vergleich mit separaten experimentellen Laborreaktordaten, die nicht zur Anpassung des Modells dienten, ergab eine hinreichend gute Übereinstimmung zwischen Rechnung und Experiment. Die Modellierung des zweistufigen zyklisch betriebenen Zulaufverfahrens im Technikumsmaßstab mit dem entwickelten Modell zeigte, dass der Einfluss des Restvolumens mit zunehmendem DHA-Schwellwert an Bedeutung gewann, da das Wachstum aufgrund der stärkeren Inhibition durch höhere DHA-Startkonzentrationen in der ersten Stufe negativ beeinflusst wurde und somit zu einer niedrigeren Biomassekonzentration und einer verschlechterten Produktbildungsrate führte. Zudem führten höhere DHA-Schwellwerte zu niedrigeren Produktbildungsraten und höheren DHA-Endkonzentrationen. Die Simulation lieferte für einen optimalen Betriebsbereich bezüglich des Restvolumens von 1 % und einem DHA-Schwellwert von 110 - 120 g/l eine Produktbildungsrate von 5.9 – 6.15 g/(lh) und eine DHA-Endkonzentration von 207 - 218 g/l. Derartig hohe DHA-Endkonzentrationen wurden bereits unter optimierten Bedingungen großtechnisch im Zulaufverfahren erreicht. Die erzielbare Raum-Zeit-Ausbeute bei dem Zulaufverfahren ist allerdings aufgrund der oben genannten Nachteile niedriger als bei der semikontinuierlichen Betriebsweise. Hierzu existieren jedoch keine quantitativen Angaben. Es ist jedoch zu erwarten, dass das zweistufige zyklisch betriebene Zulaufverfahren gegenüber dem konventionellen Zulaufverfahren deutliche Vorteile aufweist.



## 6 Literaturverzeichnis

[Adlercreutz et al., 1985] **Adlercreutz, P.; Holst, O.; Mattiasson, B.:** *Characterization of Gluconobacter oxydans immobilized in calcium alginate.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 1 – 7 (1985)

[Aiba et al., 1968] **Aiba, S.; Shoda, M.; Nagatani, M.:** *Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation.* Biotech. Bioeng. 10: 845 – 864 (1968)

[Albers, 1967] **Albers R.:** *Biochemical aspects of active transport.* Ann. Rev. Biochem. 36: 727-56 (1967)

[Amann et al, 1990] **Amann, R.; Krumholz, L.; Stahl, D.:** *Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology.* J. Bacteriol. 172: 762-770 ( 1990)

[Amann et al., 1995] **Amann, R.; Ludwig, W. and Schleifer, K.-H.:** *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.* Microbial. Rev. 59: 143-169 (1995)

[Ameyama et al., 1981] **Ameyama, M.; Matsushita, K.; Ohno, Y.; Shinagawa, E.; Adachi, O.:** *Existence of a novel prosthetic group, PQQ, in membrane-bound, electron transport chain-linked, primary dehydrogenases of oxidative bacteria.* FEBS Letters 130: 179 – 183 (1981)

[Andrews, 1968] **Andrews, J. F.:** *A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates.* Biotechnol. Bioeng. 10: 707 – 723 (1968)

[Bauer et al., 2003] **Bauer, R.; Neff, V.; Agerer, B.; Hekmat, D.:** *Experimentelle Untersuchung und Modellierung der prozessoptimierten mikrobiellen Wertstoffsynthese von Dihydroxyaceton.* Poster auf der 21. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Technische Universität München (2003)

[Bauer et al., 2004] **Bauer, R.; Varga, S.; Zavrel, M.; Hekmat, D.:** *Anwendung eines segregierten Verzugszeitmodells zur Optimierung eines zweistufigen repeated-fed-batch Verfahrens zur mikrobiellen Wertstoffsynthese von Dihydroxyaceton.* Poster auf der DECHEMA/GVC-Jahrestagung, Karlsruhe (2004)

[Bettin A., 2001] **Bettin, A.:** *Einschlussimmobilisierung von Nitrifikanten in Polycarbamoylsulfonathydrogel und Adsorptionsimmobilisierung von Nitritoxidierern auf porösen Silikonträgern: Entwicklung, Optimierung und mathematische Modellierung.* Dissertation, Technische Universität Braunschweig (2001)

[Bettin et al., 1996] **Bettin, A.; Kies, U.; Sommer, K.; Wethmar, M.:** *Bioproduktion und Schadstoffabbau in einem Dreiphasen-Wirbelschicht-Bioreaktor: Modellbildung.* Poster auf der DECHEMA-Jahrestagung (1996)

[Bonomi et al., 1992] **Bonomi, A.; Augusto, E.F.P.; Barbosa, N.S.; Mattes, M.N.; Magossi, L.P.; Santos, A.L.:** *Unstructured model proposal for the microbial oxidation of D-sorbitol to L-sorbose.* J. Biotech. 31: 39-59 (1992)

[Bories et al., 1991] **Bories, A.; Claret, C.; Soucaille, P.:** *Kinetic study and optimisation of the production of dihydroxyacetone from glycerol using Gluconobacter oxydans.* Proc. Biochem. 26: 243 - 248 (1991)

[Caperon, 1969] **Caperon, J.:** *Time lag in population response of Isochrysis galbana to a variable nitrate environment.* Ecology 50: 188- 192 (1969)

[Characklis et al., 1989 a] **Characklis, W.; Marshall, K.:** *Biofilms.* John Wiley, New York (1989)

[Characklis et al., 1989 b] **Characklis, W.G.; Wilderer, P.A.:** *Structure and function of biofilms.* John Wiley, New York: 5-17 (1989)

[Charney, 1978] **Charney:** *Process for the production of dihydroxyacetone.* Patent US 4076589 (1978)

- [Claret et al., 1994] **Claret, C.; Salmon, J.M.; Romieu, C.; Bories, A.:** *Physiology of Gluconobacter oxydans during dihydroxyacetone production from glycerol.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 359 – 365 (1994)
- [Claret et al., 1992] **Claret, C.; Bories, A.; Soucaille P.:** *Glycerol inhibition of growth and dihydroxyacetone production by Gluconobacter oxydans.* Cur. Microbiol. 25: 149 – 155 (1992)
- [Claret et al., 1993] **Claret, C.; Bories, A.; Soucaille, P.:** *Inhibitory effect of dihydroxyacetone on Gluconobacter oxydans: kinetic aspects and expression by mathematical equations.* J. Indust. Microbiol. 11: 105 – 112 (1993)
- [de Long et al., 1989] **de Long, E.F.; Wickham, G.S.; Pace, N.R.:** *Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells.* Science 243: 1360-1363 (1989)
- [de Meis und Vianna, 1979] **de Meis L., Vianna A.:** *Energy Interconversion by the Ca<sup>+</sup>-dependent ATPase of the Sarcoplasmic Reticulum.* Annu. Rev. Biochem. 48: 275-92 (1979)
- [Falbe, 1997] **J. Falbe; M. Regitz:** *Roempps Chemie Lexikon*, 10. Aufl., Franck Stuttgart, Band 2, 1997
- [Flemming, 1994] **Flemming H.-C.:** *Biofilme, Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen.* Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft, Band 129, Kommissionsverlag R. Oldenbourg, München (1994)
- [Flickinger und Perlman, 1977] **Flickinger, M.C.; Perlman, D.:** *Application of oxygen-enriched aeration in conversion of glycerol to dihydroxyacetone by Gluconobacter-melanogenus IFO-3293.* Appl. Environ. Microbiol. 33: 706 – 712 (1977)
- [Gehrer et al., 1993] **Gehrer, E.; Harder, W.; Knuth, B. Vogel, H.:** *Preparation of dihydroxyacetone by thiazolium ylide catalyzed condensation of paraformaldehyde.* Patent DE 4122669 (1993)

- [Giridhar und Srivastava, 2000] **Giridhar, R.; Srivastava, A.K.:** *Model based constant feed fed-batch L-sorbose production process for improvement in L-sorbose productivity.* Chem. Biochem. Eng. Q. 14: 133 – 140 (2000)
- [Giridhar und Srivastava, 2001, b] **Giridhar, R.; Srivastava, A.K.:** *Repeated fed-batch sorbose fermentation by Gluconobacter oxydans.* Chem. Biochem. Eng. Q. 15: 127 – 129 (2001)
- [Green et al., 1961] **Green, S.R.; Whalen, E.A.; Molokie E.:** *Dihydroxyacetone: Production and use.* J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng., 3, 4: 351 - 355 (1961)
- [Gupta und Singh, 2001] **Gupta, A.; Singh, K.:** *Gluconobacter oxydans: its biotechnological applications.* J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3: 445 - 456 (2001)
- [Hauge et al., 1954, a] **Hauge, J.G.; King, T.E.; Cheldelin, V.H.:** *Alternate conversion of glycerol to dihydroxyacetone in Acetobacter suboxydans.* J. Biol. Chem. 214: 1 – 9 (1954)
- [Hauge et al., 1954, b] **Hauge, J.G.; King, T.E.; Cheldelin, V.H.:** *Oxidation of dihydroxyacetone via the pentose cycle in Acetobacter suboxydans.* J. Biol. Chem. 214: 11 - 26 (1954)
- [Hekmat, 1990] **Hekmat, D.:** *Reaktionstechnische Untersuchungen des instationären Wachstums- und Produktbildungsverhaltens von Mikroorganismen.* Dissertation, Technische Universität München (1990)
- [Hekmat, 2001] **Hekmat, D.:** *Reaktionstechnik von instationären biologischen Prozessen.* Shaker Verlag, Aachen; zugl. Habilitation, Technische Universität München (2001)
- [Hekmat et al., 2003] **Hekmat, D.; Bauer, R.; Fricke, J.:** *Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with Gluconobacter oxydans.* Bioproc. Biosys. Eng. 26: 109-116 (2003)
- [Ito et al., 1991] **Ito T.; Sota, H.; Honda, H.; Shimizu, H.; Kobayashi, T.:** *Efficient acetic acid production by repeated fed-batch fermentation using two fermentors.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 295-299 (1991)

[Izuo et al., 1980] **Izuo, N.; Nabe, K. Yamada, S.; Chibata, I.:** *Production of dihydroxyacetone by continuous cultivation of Acetobacter suboxydans.* J. Ferment. Technol. 58: 221-226 (1980)

[Jerusalimsky, 1967] **Jerusalimsky, N.:** *Biochemical mechanisms of the regulation of the growth rate of microorganisms.* Mitteilungen der Akademie der Wissenschaften der UDSSR, Serie Biologie 3: 339-350 (1967)

[Katsikis, 2003] **Katsikis, N.:** *Entwicklung und Realisierung eines zweistufigen Verfahrens zur mikrobiellen Synthese von Dihydroxyaceton im Technikumsmaßstab.* Diplomarbeit am Lehrstuhl für Chemische Verfahrenstechnik, Technische Universität München (2003)

[Kruppa, 1997] **Kruppa, R. K.:** *Instationäre Wachstums- und Produktbildungskinetik von Essigsäurebakterien.* Dissertation, Technische Universität München (1997)

[Lehninger et al., 1994] **Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M.:** *Prinzipien der Biochemie.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1994)

[Levenspiel, 1980] **Levenspiel, O.:** *The monod equation: a revisit and a generalization to product inhibition situations.* Biotechnol. Bioeng 22: 1671-1687 (1980)

[Linn, 1999] **Linn, A.:** *Populationsdynamik und Abbauverhalten einer immobilisierten mikrobiellen Mischkultur im Rieselbettreaktor zur biologischen Abluftreinigung.* Dissertation, Technische Universität München (1999)

[Luedeking und Piret, 1959] **Luedeking, R.; Piret, E. L.:** *A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH.* J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng 1: 393 – 412 (1959)

[Lusta et al., 1998] **Lusta, K.; Reshetilov, A.:** *Physiological and biochemical features of Gluconobacter oxydans and prospects of their use in biotechnology and biosensor systems.* Appl. Biochem. Microbiol. 34: 307 - 320 (1998)

[Macauley et al., 2001] **Macauley, S.; McNeil, B.; Harvey, L.M.:** *The genus Gluconobacter and its applications in biotechnology.* Crit. Rev. Biotechnol. 21: 1 – 25 (2001)

[Makhotkina et al., 1981] **Makhotkina, T.A.; Pomortseva, N.V.; Lomova, I.E.; Nikolaev, P.I.:** *Transformation of glycerol into dihydroxyacetone by Gluconobacter oxydans cells in a polyacrylamide gel.* Appl. Biochem. Microbiol. 17: 80 – 84 (1981)

[Marshall et al., 1971] **Marshall, K.C.; Pomortseva, N.V.; Stout, R.; Mitchell, R.:** *Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces.* J. Gen. Microbiol. 68: 337 – 348 (1971)

[Molinari et al., 1995] **Molinari, F.; Villa, R.; Manzoni, M.; Aragozzini, F.:** *Aldehyde production by alcohol oxidation with Gluconobacter oxydans.* Appl. Biochem. Microbiol. 43: 989 - 994 (1995)

[Monod, 1942] **Monod, J.:** *Recherche sur la Croissance des Cultures Bactériennes.* Hermann et Cie, Paris (1942)

[Muscat, 1995] **Muscat, A.:** *Entwicklung und Charakterisierung von polymeren Träger- und Immobilisatmaterialien für eine verbesserte Sauerstoffversorgung.* Dissertation, Technische Universität Braunschweig (1995)

[Neff, 2002] **Neff, V.:** *Prozessintensivierung eines Fermentationsverfahrens durch in-situ Immobilisierung von Gluconobacter oxydans-Industriestämmen.* Diplomarbeit am Lehrstuhl für Chemische Verfahrenstechnik, Technische Universität München (2002)

[Neff et al., 2003] **Neff, V.; Bauer, R.; Hekmat, D.:** *Prozessintensivierung eines Fermentationsverfahrens durch in-situ Zellrückhaltung von Gluconobacter oxydans-Industriestämmen.* Jahrestagung der Biotechnologen, München (2003)

[Offhaus, 1965] **Offhaus, K.:** *Die Bewertung von Abwasser unter besonderer Berücksichtigung des biologisch abbaubaren Anteils und der Toxizität.* Die Wasserwirtschaft 55 (1965)

[Ohrem, 1994] **Ohrem, H.L.:** *Reaktionstechnische Untersuchung der Glycerinoxidation mit *Gluconobacter oxydans* zur Entwicklung eines kontinuierlichen Fermentationsverfahrens.*

Dissertation, Technische Hochschule Aachen (1994)

[Ohrem und Westmeier, 1995] **Ohrem, H.L.; Westmeier, F.:** *Microbial process for the preparation of dihydroxyacetone with recycling of biomass.* Patent US 5770411 (1995)

[Ohrem und Voß, 1996] **Ohrem, H.L.; Voß, H.:** *Process model of the oxidation of glycerol with *Gluconobacter oxydans*.* Proc. Biochem. 66: 295 – 301 (1996)

[Ohrem und Voß, 1994] **Ohrem, H.L.; Voß, H.:** *Untersuchung zur Kinetik der Oxidationen mit *Gluconobacter oxydans*.* Chem. Ing. Tech. 66: 1531 – 1533 (1994)

[Schlegel, 1976] **Schlegel, H.G.:** *Allgemeine Mikrobiologie.*

Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1976)

[Sommer, 1998] **Sommer, K.:** *Modellierung der Strömung und des Stofftransportes in Dreiphasen-Wirbelschicht-Bioreaktoren.* Dissertation, Shaker Verlag, TU-Braunschweig (1997)

[Sommer et al., 1998] **Sommer, K.; Bohlmann, U.; Bohnet, M.:** *Production of dihydroxyacetone in a three phase fluidized bed reactor using *Gluconobacter oxydans*.*

Chem. Eng. Technol. 21: 144 – 149 (1998)

[Stokes und Green, 2000] **Stokes, N.; Green, M.:** *Structure and function of the Calcium Pump.* Ann. Rev. Biophys. Biomolec. Structure., D., (2000)

[Storhas, 1994] **Storhas, W.:** *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen.*

Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden (1994)

[Svitel und Sturdik, 1994] **Svitel, J.; Sturdik, E.:** *Product yield and by-product formation in glycerol conversion to dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans*.* J. Ferment. Bioeng. 78:

351 – 355 (1994)

[Swings und De Ley, 1981] **Swings, J.; De Ley, J.:** *The Genera Gluconobacter and Acetobacter*. Aus "The Prokaryotes", Springer Verlag; Volume1, Chapter 64: 771 (1981)

[Underkofler und Fulmer, 1937] **Underkofler, L.A.; Fulmer, E.I.:** *The production of dihydroxyacetone by the action of Acetobacter suboxydans upon glycerol*. J. Am. Chem. Soc. 89: 301 – 302 (1937)

[Vogel und Angermann, 1984] **Vogel, G.; Angermann, H.:** *dtv-Atlas zur Biologie*. Deutscher Taschenbuch Verlag, München (1984)

[Wallner et al. 1993] **Wallner, G. R.; Amann, R.; Beisker, W.:** *Optimizing fluorescent in situ hybridisation of suspended cells with rRNA-targeted oligonucleotide probes for the flow cytometric identification of microorganisms*. Cytometry 14: 136-143 (1993)

[Wethmar, 1998] **Wethmar, M.:** *Kinetik und Energetik der Glycerinumsetzung durch Gluconobacter oxydans*. Cuvillier Verlag, Göttingen (1998)

[Wick et al., 1982] **Wick, M.; Kreis, G.; Freuzer, FH.:** *Silicone: Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie*. Chemie Verlag, Weinheim Bd. 21, 4. Auflage. (1982)

[Willaert et al., 1996] **Willaert, RG.; Baron, GV.; Backer, L.:** *Immobilised living cell systems. Modelling and experimental methods*. John Wiley Sons Ltd; (1996)

[Wise et al.; 1966] **Wise, DL.; Houghton, G.:** *The diffusion coefficients of ten slightly soluble gases in water at 10 – 60 °C*. Chem Eng Sci. 21: 999 – 1010 (1966)

[Woodward, 1988] **Woodward, J.:** *Methods of immobilisation of microbial cells*; J. Microbiol. Meth. 8: 91- 102 (1988)

[Woodward, 1985] **Woodward, J.:** *Immobilised cells and enzymes. A practical approach*. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN 37831, USA. IRL Press Limited (1985)



[Varga, 2004] **Varga, S.:** *Optimierung eines zweistufigen Verfahrens zur mikrobiellen Synthese von Dihydroxyaceton im Technikumsmaßstab*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Chemische Verfahrenstechnik, Technische Universität München (2004)

[Varga et al., 2004] **Varga S., Bauer R., Katsikis N., Hekmat D.:** *Optimierung der mikrobiellen Synthese von Dihydroxyaceton mit Gluconobacter oxydans-Industriestämmen im Technikumsmaßstab durch Anwendung einer innovativen Prozessführungsstrategie*. Poster auf der DECHEMA/GVC-Jahrestagung, Karlsruhe (2004)

[Yamada et al., 1979, a] **Yamada, S.; Nabe, K.; Izuo, N.; Wada, M.; Chibata, I.:** *Fermentative production of dihydroxyacetone by Acetobacter suboxydans ATCC 621*. J. Ferment. Technol. 57: 215 - 220 (1979)

[Yamada et al., 1979, b] **Yamada, S.; Nabe, K.; Izuo, N.; Chibata, I.:** *Enzymatic production of dihydroxyacetone by Acetobacter suboxydans ATCC 621*. J. Ferment. Technol. 57: 221 – 229 (1979)

[Zobell, 1943] **Zobell, C.:** *The effect of surfaces upon bacterial activity*. J. Bacteriol. 46: 39 – 56 (1943)

## 7 Abkürzungsverzeichnis

### Variablen und Konstanten (lateinische Symbole):

$A_{DHA}$	g/(g h)	Proportionalitätsfaktor zwischen Wachstum und Produktbildung (DHA)
$A_{R-Z}$	g/(l h)	Raum-Zeit-Ausbeute
$A_{Sorbitose}$	g/(g h)	Proportionalitätsfaktor zwischen Wachstum und Produktbildung (Sorbitose)
$B$	g/(g h)	Wachstumsunabhängiger Anteil der spezifischen Produktbildungsrate für DHA
$B_{max}$	g/(g h)	Maximaler wachstumsunabhängiger Produktbildungsparameter für DHA
$c_{DHA}$	g/l	Dihydroxyaceton-Konzentration
$c_{Gly}$	g/l	Glycerinkonzentration
$c_O$	g/l	Sauerstoffkonzentration
$c_{O,sat}$	g/l	Sättigungskonzentration des Sauerstoffs im Nährmedium
$c_{DHA,0}$	g/l	Anfangskonzentration von DHA
$c_S$	g/l	Substratkonzentration
$c_{Gly,feed}$	g/l	Glycerinkonzentration im Feedstrom
$c_{Sorbit}$	g/l	D-Sorbit-Konzentration
$c_{Sorbitose}$	g/l	L-Sorbitose-Konzentration
$c_X$	g/l	Bakterienkonzentration
$c_{X,ges}$	g/l	Gesamte Biomassekonzentration
$c_{X,l}$	g/l	Konzentration der lebenden Bakterien
$c_{X,l,0}$	g/l	Anfangskonzentration der lebenden Bakterien
$c_{X,steril}$	g/l	Konzentration der sterilen Bakterien
$c_{X,tot}$	g/l	Konzentration der toten Bakterien
$c_{X,tot,0}$	g/l	Anfangskonzentration der toten Bakterien

---

$D_{x,Gly}$	[-]	Dämpfungskonstante der instationären spezifischen Wachstumsrate
$D_{x,Sorbit}$	[-]	Dämpfungskonstante der instationären spezifischen Wachstumsrate
$i$	[-]	Zyklennummer, Laufparameter für die Messpunkte
$j$	[-]	Laufparameter für die Messgröße
$k$	[-]	Anzahl der Messgrößen
$k_{La}$	1/h	Stoffübergangskoeffizient multipliziert mit der flüssigvolumen-spezifischen Stoffaustauschfläche
$K_{b,Gly}$	g/l	Halbsättigungskonstante für die Limitierung der Produktbildung durch das Substrat
$K_{b,O}$	mg/l	Halbsättigungskonstante für die Limitierung der Produktbildung durch den Sauerstoff
$K_{DHA}$	l/g	Inhibierungskonstante des Zellwachstums durch Dihydroxyaceton
$K_{DHA,steril}$	l/g	Charakteristische Konstante für die Sterilisierung der lebenden Zellen durch DHA
$K_{DHA,tot}$	l/g	Charakteristische Konstante für die Umwandlung von sterilen Zellen in tote Zellen durch DHA
$K_{Gly}$	g/l	Halbsättigungskonstante für die Limitierung des Zellwachstums durch Glycerin
$K_{O,Gly}$	mg/l	Halbsättigungskonstante für die Limitierung des Zellwachstums durch den Sauerstoff
$K_{O,Sorbit}$	mg/l	Halbsättigungskonstante für die Limitierung des Zellwachstums durch den Sauerstoff
$K_{Sorbit}$	g/l	Halbsättigungskonstante für die Limitierung des Zellwachstums durch D-Sorbit
$M$	g/mol	Molare Masse
$n$	[-]	Charakteristischer Exponent, Anzahl der Messpunkte
$r_{DHA,l}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für die DHA-Bildung der lebenden Zellen
$r_{DHA,steril}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für die Produktbildung der sterilen Zellen

---

$r_{\text{Gly},X}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für den Glycerinverbrauch aufgrund von Wachstum
$r_{\text{Gly},\text{DHA}}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für den Glycerinverbrauch aufgrund von DHA-Bildung
$r_{\text{O},\text{DHA}}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für den Sauerstoffverbrauch aufgrund von DHA-Bildung
$r_{\text{O},\text{Sorbitose}}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für den Sauerstoffverbrauch aufgrund von Sorbosebildung
$r_{\text{O},\text{P},\text{ges}}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für den Sauerstoffverbrauch aufgrund von Produktbildung
$r_{\text{O},X,\text{ges}}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für den Sauerstoffverbrauch aufgrund von Wachstum
$r_{\text{O},X,\text{Gly}}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für den Sauerstoffverbrauch aufgrund von Wachstum auf Glycerinbasis
$r_{\text{O},X,\text{Sorbit}}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für den Sauerstoffverbrauch aufgrund von Wachstum auf Sorbitbasis
$r_{\text{Sorbit},\text{Sorbitose}}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für den Sorbitverbrauch aufgrund von Sorbosebildung
$r_{\text{Sorbit},X}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für den Sorbitverbrauch aufgrund von Wachstum
$r_{\text{Sorbitose},l}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für die Sorbosebildung der lebenden Zellen
$r_{X,l,\text{ges}}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für die Zunahme der lebenden Zellen
$r_{X,l,\text{Gly}}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für das Bakterienwachstum durch Glycerin
$r_{X,l,\text{Sorbit}}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für das Bakterienwachstum durch Sorbit
$r_{X,\text{steril}}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für die Zunahme der sterilen Zellen
$r_{X,\text{tot}}$	g/(lh)	Reaktionsgeschwindigkeit für die Zunahme der toten Zellen
$R_{\text{DHA}}$	g/(lh)	Charakteristische Zeitkonstante der instationären spezifischen Produktbildungsrate für DHA

---

$R_{\text{Sorbitose}}$	g/(lh)	Charakteristische Zeitkonstante der instationären spezifischen Produktbildungsrate für Sorbitose
S	1/h	Spezifische Produktbildungsrate der sterilen Zellen
t	h	Zeit
$T_{\text{O}}$	g/(lh)	Sauerstofftransportstrom
$T_{\text{DHA}}$	h	Charakteristische Zeitkonstante der instationären spezifischen Produktbildungsrate für DHA
$T_{\text{Sorbitose}}$	h	Charakteristische Zeitkonstante der instationären spezifischen Produktbildungsrate für Sorbitose
$T_{\text{X,Gly}}$	h	Charakteristische Zeitkonstante der instationären spezifischen Wachstumsrate für Glycerin
$T_{\text{X,Sorbit}}$	h	Charakteristische Zeitkonstante der instationären spezifischen Wachstumsrate für Sorbit
V	l	Reaktorvolumen
$V_{\text{R}}$	l	Reaktionsvolumen des ersten Reaktors
$V_{\text{rest}}$	l	Restvolumen der Flüssigkeit nach der Entleerung
$\dot{V}_{\text{fed}}$	l/h	Zugeführter Volumenstrom
W	g/l	Inhibierungskonstante des Zellwachstums durch das Substrat
$x_{ji}$	[-]	Berechneter Zahlenwert der Messgröße j am Messpunkt i
$Y_{\text{DHA,O}}$	[-]	Ertragskoeffizient für den Sauerstoffverbrauch aufgrund von DHA-Bildung
$Y_{\text{Sorbitose,O}}$	[-]	Ertragskoeffizient für den Sauerstoffverbrauch aufgrund von Sorbitosebildung
$Y_{\text{DHA,Glycerin}}$	[-]	Ertragskoeffizient für den Glycerinverbrauch aufgrund von DHA-Bildung
$Y_{\text{Sorbitose,Sorbit}}$	[-]	Ertragskoeffizient für den Sorbitverbrauch aufgrund von Sorbitosebildung
$Y_{\text{X,O,Gly}}$	[-]	Ertragskoeffizient für den Sauerstoffverbrauch aufgrund von Wachstum
$Y_{\text{X,O,Sorbit}}$	[-]	Ertragskoeffizient für den Sauerstoffverbrauch aufgrund von Wachstum
$Y_{\text{X,Gly}}$	[-]	Ertragskoeffizient für den Glycerinverbrauch aufgrund von Wachstum

---

$Y_{X,\text{Sorbit}}$	$[-]$	Ertragskoeffizient für den Sorbitverbrauch aufgrund von Wachstum
$y_{ji}$	$[-]$	Experimentell bestimmter Zahlenwert der Messgröße $j$ am Messpunkt $i$

### Variablen und Konstanten (griechische Symbole):

$\mu$	1/h	Spezifische Wachstumsrate
$\mu_{\text{exp}}$	1/h	Experimentell bestimmte spezifische Wachstumsrate
$\mu_{\text{instat}}$	1/h	Instationäre spezifische Wachstumsrate
$\mu_{\text{insta,Gly}}$	1/h	Instationäre spezifische Wachstumsrate auf Glycerin
$\mu_{\text{insta,Sorbit}}$	1/h	Instationäre spezifische Wachstumsrate auf Sorbit
$\mu_{\text{instat},0}$	1/h	Anfangswert der instationären spezifischen Wachstumsrate
$\mu'_{\text{instat}}$	1/h <sup>2</sup>	Erste Ableitung nach der Zeit von $\mu_{\text{instat}}$
$\mu'_{\text{instat},0}$	1/h <sup>2</sup>	Anfangswert der ersten Ableitung nach der Zeit von $\mu_{\text{instat}}$
$\mu_{\text{max}}$	1/h	Maximale spezifische Wachstumsrate
$\mu_{\text{Gly}}$	1/h	Maximale spezifische Wachstumsrate mit Glycerin als Substrat
$\mu_{\text{Sorbit}}$	1/h	Maximale spezifische Wachstumsrate mit D-Sorbit als Substrat
$\mu_{\text{stat}}$	1/h	Stationäre spezifische Wachstumsrate
$\mu_{\text{stat,Gly}}$	1/h	Stationäre spezifische Wachstumsrate für Glycerin
$\mu_{\text{stat,Sorbit}}$	1/h	Stationäre spezifische Wachstumsrate für Sorbit
$\mu_{\text{stat},0}$	1/h	Anfangswert der stationären spezifischen Wachstumsrate
$\mu_{\text{steril}}$	1/h	Spezifische Sterilisierungsrate
$\mu_{\text{tot}}$	1/h	Spezifische Absterberate
$\pi$	1/h	Spezifische Produktbildungsrate

---

$\pi_{\text{exp}}$	1/h	Experimentell ermittelte spezifische Produktbildungsrate
$\pi_{\text{instat}}$	1/h	Instationäre spezifische Produktbildungsrate
$\pi_{\text{instat,DHA}}$	1/h	Instationäre spezifische Produktbildungsrate für DHA
$\pi_{\text{instat,Sorbose}}$	1/h	Instationäre spezifische Produktbildungsrate für Sorbose
$\pi_{\text{instat},0}$	1/h	Anfangswert der instationären spezifischen Produktbildungsrate
$\pi_{\text{stat}}$	1/h	Stationäre spezifische Produktbildungsrate
$\pi_{\text{stat,DHA}}$	1/h	Stationäre spezifische Produktbildungsrate für DHA
$\pi_{\text{stat,Sorbose}}$	1/h	Stationäre spezifische Produktbildungsrate für Sorbose
$\pi_{\text{steril}}$	1/h	Spezifische Produktbildungsrate der sterilen Zellen
$\sigma_{y_{ji}}^2$	[–]	Zahlenwert der Varianz der Messgröße j am Messpunkt i
$\theta^*$	[–]	Parametervektor

### Abkürzungen:

ATP	Adenosintriphosphat
$A_{P/S}$	Ertragskoeffizient (Produkt/Substrat)
$A_{R/Z}$	Produktbildungsrate
$A_{X/S}$	Ertragskoeffizient (Biomasse/Substrat)
BTM	Biotrockenmasse
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DHA	Dihydroxyaceton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
FISH	Fluoreszenz In Situ Hybridisierung
FLUOS	5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxy-succinimidester
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography

---

OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PQQ	Pyrrolochinolinchinon
RNA	Ribonucleinsäure
R1	Reaktor 1
R2	Reaktor 2
SDS	Natriumdodecylsulfat
SW	Schwellwert für DHA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VE	vollentsalzt