

INSTITUT FÜR LEBENSMITTELTECHNOLOGIE

---

**Bioprozesstechnische Charakterisierung eines  
organophilen Pervaporation-Bio-Hybridreaktors  
am Beispiel einer Aromabiosynthese**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades

Doktor-Ingenieur  
(Dr.-Ing.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt am 24.02.2004

von Dipl.-Ing. Bernd Stefer

aus Bonn

**Referent:** Prof. Dr. Benno Kunz

**Korreferent:** Prof. Dr. Johannes Krämer

**Tag der mündlichen Prüfung:** 01.06.2004

**Gedruckt bei:** VDI Verlag GmbH

**Diese Dissertation ist 2009 auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.**

„... *sed vitae discimus!*“  
(„... sondern für das Leben lernen wir!“)

Titel einer Graduiertentagung des  
Cusanuswerkes im Jahre 2002.

*Meinen Eltern*

---

## **Bioprozesstechnische Charakterisierung eines organophilen Pervaporation-Bio-Hybridreaktors am Beispiel einer Aromabiosynthese**

Die wirtschaftliche Nutzung biotechnologischer Aromasyntheseverfahren scheidet häufig an deren Unwirtschaftlichkeit aufgrund geringer Produkterträge und –ausbeuten. Ursächlich hierfür ist insbesondere die starke Produktinhibierung der mikrobiellen Aromastoffbildung. Diese kann auf bioprozesstechnischem Weg durch eine In-situ-Produktabtrennung vermindert bzw. vermieden werden. Dabei werden die Aromastoffe zeitgleich zu ihrer Entstehung aus dem Bioreaktor abgetrennt. Für diese Aufgabe eignet sich in besonderer Weise die organophile Pervaporation.

Die technische Umsetzung der pervaporativen In-situ-Produktabtrennung erfolgt in der vorliegenden Arbeit durch die unmittelbare Integration der Trennoperation Pervaporation in den Pervaporation-Bio-Hybridreaktor. Ziel der Arbeit ist eine umfassende Charakterisierung des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses am Beispiel der Gewinnung eines Fruchtaromas unter Nutzung des Schimmelpilzes *Ceratocystis fimbriata* in Submerskultur.

Im ersten Abschnitt wird der Einfluss der Fermentationssubstrate und Betriebsparameter auf die Produktabtrennung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess quantifiziert und bewertet. Die unterschiedlichen Wirkungen der Fermentationssubstrate und Betriebsparameter fließen dabei in Direktiven für die Prozessführung ein. Der zweite Abschnitt der Arbeit befasst sich mit der Erörterung der Fermentationskinetik und der Trenncharakteristik des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses. Neben dem Wachstum und dem Substratabbau liegt der Untersuchungsschwerpunkt hierbei auf den Produktkonzentrationsverläufen im Bioreaktor und im Permeat. Gegenstand des dritten Abschnitts ist die Bewertung des Potenzials der Pervaporation-Bio-Hybridtechnik zur Effizienzsteigerung mikrobieller Aromastoffsynthesen. Dazu wird der Pervaporation-Bio-Hybridprozess mit einer klassischen Submersfermentation verglichen. Der vierte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines mathematischen Bioprozessmodells. Dieses eignet sich zur mathematischen Erfassung der Produktkonzentrationsverläufe im Pervaporation-Bio-Hybridprozess. Es ist in der Lage, den Einfluss der Güte des Produktaustrages auf die Produktbildung zu simulieren und stellt somit ein geeignetes Hilfsmittel bei der Entwicklung von Pervaporation-Bio-Hybridprozessen im Hinblick auf die Optimierung der Reaktorauslegung dar.

Diese Arbeit liefert umfassende Informationen zur Charakteristik von Pervaporation-Bio-Hybridprozessen für die Aromastoffgewinnung. Auf diese Weise wird ein wichtiger Beitrag zum Verständnis dieser Hybridtechnik geleistet. Die Ergebnisse der Arbeit können als Informationsgrundlage der Entwicklung, Planung und Umsetzung von Pervaporation-Bio-Hybridprozessen dienen und zeigen Wege zu einer optimalen Prozessführung auf. Darüber hinaus wird mit der Entwicklung eines Bioprozessmodells ein mathematisches Werkzeug zur Bestimmung einer optimalen Reaktorauslegung bereitgestellt.

---

## **Bioprocess Engineering Characterization of a Hybrid Organophilic Pervaporation-Bioreactor for the Production of Natural Aroma Compounds**

Biotechnological processes for the production of natural aroma compounds are of increasing interest due to the consumer demands for natural aroma additives in food. Research over the last decade has indicated high potential from the use of microorganisms for aroma production. The diversity of aroma compounds from microbial origin is apparently unlimited, but many of these processes are currently not economically feasible. In particular, product inhibition can limit the yield of bioreactions as metabolism of most microorganisms is only possible within a narrow range of metabolite concentrations. As product inhibition often results in a fermentation broth with a low concentration of products, large reactor volumes are required to meet production demands and the broth has to undergo costly downstream processing to recover the diluted product. Product inhibition can, however, be reduced or avoided by withdrawing inhibiting substances from the fermentation. This concept, often referred to as “*in situ* product removal“, requires a biocompatible separation operation that is highly selective for the inhibiting substances. These requirements can be met by the use of organophilic pervaporation membranes.

The present study looked at a hybrid pervaporation-bioreactor for *in situ* product removal of volatile flavor metabolites formed by the filamentous fungus *Ceratocystis fimbriata* during submerged fermentation. The aim of this work was to elaborate a comprehensive characterization of the hybrid pervaporation-bioreactor from a bioprocess engineering point of view. This was done in order to provide essential information for the optimization of their design and control. Hence, the interactions of fermentation kinetics and separation performance in a hybrid pervaporation-bioreactor were investigated.

Firstly, the effects of fermentation parameters and substrates on the pervaporation process were studied and the results translated into directives for the design and control of the hybrid pervaporation-bioreactor. Secondly, the process was characterized with regards to fermentation kinetics (i. e. biomass growth, substrate consumption and product formation), as well as to the behavior of the separation process during fermentation.

The third part of this thesis consists of comparative studies of the hybrid process and a conventional submerged fermentation. The Results show that space-time-yields, as well as substrate yields of the products, can be significantly increased by applying this hybrid technique. Finally, a mathematical bioprocess model was developed, which simulates the influence of separation performance on overall product formation. The model can, therefore, act as a useful tool for optimization of the process layout.

By providing a comprehensive characterization of a hybrid pervaporation-bioreactor, this research contributes to the development and implementation of this type of processes in industrial production of natural aroma compounds.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Vorwort</b> .....	<b>III</b>
<b>Kurzreferat</b> .....	<b>V</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VI</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Nomenklatur</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Pervaporation</b> .....	<b>3</b>
2.1.1 Grundlagen und Verfahrensbeschreibung .....	3
2.1.2 Lösungs-Diffusions-Modell .....	6
2.1.3 Betriebsweisen.....	10
2.1.4 Konzentrationspolarisation.....	11
2.1.5 Fouling.....	12
2.1.6 Leistungsparameter.....	12
<b>2.2 Aromastoffe</b> .....	<b>13</b>
2.2.1 Definition von Aromastoffen .....	13
2.2.2 Herstellung von Aromastoffen .....	15
2.2.3 Bananenaroma .....	16
2.2.4 Der Aromaverzehr in der Bundesrepublik Deutschland.....	16
<b>2.3 In-situ-Produktabtrennung</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4 Modellierung</b> .....	<b>22</b>
2.4.1 Bioprozessmodelle .....	22
2.4.2 Logistisches Wachstum .....	23
2.4.3 Gompertz-Gleichung .....	25
2.4.4 Produktbildung .....	27
2.4.5 Produktinhibierung .....	28
<b>3 ZIEL DER ARBEIT</b> .....	<b>29</b>
<b>4 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1 Material</b> .....	<b>31</b>
4.1.1 Pervaporation-Bio-Hybridreaktor.....	31
4.1.2 Pervaporationsmembran .....	33
4.1.3 Biokatalysator.....	34
4.1.4 Weitere Geräte.....	35

---

4.1.5	Substrate und Medienbestandteile .....	37
4.1.6	Weitere Chemikalien .....	39
<b>4.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>40</b>
4.2.1	Sterilisation.....	40
4.2.2	Stammhaltung.....	40
4.2.3	Vorkulturen und Inokulation .....	40
4.2.4	Pervaporation-Bio-Hybridprozess .....	41
4.2.5	Klassische Submersfermentation.....	43
4.2.6	Analytik .....	43
4.2.6.1	Bestimmung der Biomasse .....	45
4.2.6.2	Bestimmung des Substratabbaus .....	45
4.2.6.3	Bestimmung der Produktkonzentration .....	46
4.2.7	Untersuchung des Einflusses der Substrate und Betriebsparameter.....	47
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Einfluss der Substrate und Betriebsparameter .....</b>	<b>51</b>
<b>5.2</b>	<b>Pervaporation-Bio-Hybridprozess .....</b>	<b>57</b>
5.2.1	Fermentationsverlauf.....	57
5.2.2	Produktbildung .....	61
5.2.3	Trenncharakteristik.....	67
<b>5.3</b>	<b>Vergleichende Untersuchungen .....</b>	<b>74</b>
5.3.1	Fermentationsverlauf.....	75
5.3.2	Produktbildung .....	79
5.3.3	Glucoseertragskoeffizient.....	85
5.3.4	Raum-Zeit-Ausbeute .....	87
<b>5.4</b>	<b>Bioprozessmodell .....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>102</b>
<b>6.1</b>	<b>Substrat und Betriebsparameter.....</b>	<b>102</b>
<b>6.2</b>	<b>Pervaporation-Bio-Hybridprozess .....</b>	<b>107</b>
<b>6.3</b>	<b>Vergleichende Untersuchungen .....</b>	<b>120</b>
<b>6.4</b>	<b>Bioprozessmodell .....</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>131</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>133</b>



## Nomenklatur

Formelzeichen	Bedeutung	Einheit
$a$	Aktivität	–
$A$	Membranfläche	$\text{m}^2$
$b_0$	Koeffizient in Gleichung (5.1)	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
$b_1$	Koeffizient für die Wirkung von Malzextrakt	$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
$b_2$	Koeffizient für die Wirkung von Glucose	$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
$b_3$	Koeffizient für die Wirkung von Pepton	$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
$b_4$	Koeffizient für die Wirkung der Rührerdrehzahl	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$
$b_5$	Koeffizient für die Wirkung des pH-Wertes	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
$c$	Konzentration	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
$C_i^{\text{ges}}$	volumetrische Gesamtproduktbildung	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
$C_{\text{ges}}^{\text{End}}$	volumetrische Gesamtproduktbildung am Fermentationsende	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
$C_i^M$	molare Konzentration der Komponente $i$ in der Membran	$\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$
$C_i^p$	volumetrische Produktakkumulation im Permeat	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
$D$	Diffusionskoeffizient	$\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$
$e$	Eulerzahl	–
$grad$	Gradient	–
$H$	Henrykonstante	–
$\Delta H_{\text{verd}}$	Verdampfungsenthalpie	J
$I_p$	Produktinhibitionskoeffizient	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
$J$	Massenfluss	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
$k$	Stofftransportkoeffizient	$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
$l$	Membranstärke	m
$L$	phänomenologischer Koeffizient	$\text{mol}\cdot\text{J}^{-1}\cdot\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
$m$	Masse	kg
$M$	Produktmasse im Permeat	kg
$n$	Anzahl der Fermentationsprodukte	–
$p$	Druck	bar
$p$	Irrtumswahrscheinlichkeit	–
$p^*$	Sättigungsdampfdruck	bar

<b>Formelzeichen</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>Einheit</b>
$p_i$	Partialdruck	bar
$Q$	Wärmemenge	J
$R$	allgemeine Gaskonstante	$\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
$R$	Konzentrationsänderungsgeschwindigkeit	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$
$R^2$	Bestimmtheitsmaß	–
$RZA$	Raum-Zeit-Ausbeute	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$
$s$	partielle molare Entropie	$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$
$T$	Temperatur	K bzw. °C
$t$	Zeit	s
$U$	Glucoseverbrauch	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$
$V$	Fermentationsvolumen	$\text{m}^3$
$\bar{V}$	partielles molares Volumen	$\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$
$w_{exp}$	Expansionsarbeit	J
$x_1$	Malzextraktkonzentration	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
$x_2$	Glucosekonzentration	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
$x_3$	Peptonkonzentration	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
$x_4$	Drehzahl	$\text{s}^{-1}$
$x_5$	pH-Wert	–
$x_i$	Molenbruch der Komponente $i$ im Feed	–
$y$	Richtungskoordinate	–
$Y$	Ertragskoeffizient	–
$y_i$	Molenbruch der Komponente $i$ im Permeat	–

---

**Griechische Formelzeichen**


---

<b>Formelzeichen</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>Einheit</b>
$\alpha$	Trennfaktor	–
$\beta$	Anreicherungsfaktor	–
$\gamma$	Aktivitätskoeffizient	–
$\Delta$	Differenz	–
$\kappa$	Koeffizient in Gleichung (5.11)	–
$\lambda$	lag-Zeit	s
$\mu$	biomassespezifische Wachstumsgeschwindigkeit	s <sup>-1</sup>
$\mu_i$	Chemisches Potential der Komponente $i$	J·mol <sup>-1</sup>
$\rho$	Dichte	kg·m <sup>-3</sup>
$\varphi$	Fugazitätskoeffizient	–
$\chi$	biomassespezifischer Produktbildungskoeffizient	s <sup>-1</sup>
$\Pi$	relative Produktbildungssteigerung	–
$\phi$	volumetrischer Produktaustragskoeffizient	s <sup>-1</sup>
$\Phi$	volumetrischer Produktaustrag	kg·m <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup>

---

---

**Indexerklärung**


---

<b>Zeichen</b>	<b>Bedeutung</b>
<i>0</i>	Fermentationsbeginn
<i>End</i>	Fermentationsende
<i>exp</i>	experimentell
<i>f</i>	Feed
<i>ges</i>	Gesamt
<i>GS</i>	laminare Grenzschicht
<i>H<sub>2</sub>O</i>	Wasser
<i>i</i>	Substanz <i>i</i>
<i>j</i>	Substanz <i>j</i>
<i>M</i>	Membran
<i>max</i>	maximal
<i>mess</i>	Messwert
<i>p</i>	Permeat
<i>P</i>	Produkt
<i>Pr</i>	Summe aller Produkte
<i>reak</i>	im Reaktor
<i>S</i>	Substrat
<i>SP</i>	Scheitelpunkt
<i>WP</i>	Wendepunkt
<i>x</i>	Biomasse

---

**Verzeichnis der Abkürzungen**


---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
DZ	Rührerdrehzahl
GLC	Glucose
ME	Malzextrakt
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEP	Pepton
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute

---

## 1 Einleitung

Die Biotechnologie gilt als eine der Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts [216, 127]. Sie stellt heute einen der wachstumsstärksten Sektoren der chemischen, pharmazeutischen und der Lebensmittelindustrie dar [107, 50, 56]. In der Verfahrenstechnik wird die Biotechnologie zur Wertschöpfung eingesetzt, indem Mikroorganismen (Prokaryonten) und Zellkulturen (Eukaryonten) sowie genetisch veränderte Mikroorganismen und Enzyme als so genannte Biokatalysatoren zur Produktgewinnung verwendet werden [208, S. 1 - 2].

Die bewusste oder unbewusste Nutzung von Mikroorganismen zur Herstellung oder Veredelung von Lebensmitteln durch den Menschen lässt sich bis in antike Zeiten zurückverfolgen [56]. Jedoch wurden erst im 18. und 19. Jahrhundert u. a. durch Antoni van Leeuwenhoek und Louis Pasteur die wissenschaftlichen Grundlagen zum Verständnis und zur kontrollierten Anwendung von Fermentationen gelegt. Neben der alkoholischen Gärung waren es zuerst Substanzen wie Milchsäure, Aceton, Butanol, Zitronensäure und Gluconsäure, welche seit 1880 bewusst unter Nutzung biotechnologischer Verfahren gewonnen wurden [5]. Die erste industriell angewandte Fermentation in Deutschland bestand in der Gewinnung von Glycerin zur Sprengstoffherstellung während des Ersten Weltkrieges. Nach der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming 1928 begann in den frühen 1940er Jahren die rasante technologische Entwicklung biokatalysierter Syntheseverfahren, welche zur heute verfügbaren Vielfalt an biotechnologisch gewonnenen Substanzen wie Antibiotika und Vitaminen bis hin zu Aromastoffen führte [196]. Die Erfolge molekulargenetischer Forschung (Gentechnologie) erweiterten seit Mitte der 1970er Jahre das Potenzial für die Manipulation von Zellen und ganzen Organismen über die klassische Züchtung hinaus und führten erneut zu einem Wandel der Biotechnologie [127].

Im Bereich der Lebensmittelbiotechnologie gewinnt heute die mikrobielle Herstellung von Aromastoffen zunehmend an Bedeutung [25, 203, 64, 1]. Um mit herkömmlichen Herstellungsverfahren für Aromastoffe konkurrieren zu können, muss die biotechnologische Aromasynthese wirtschaftlichen Erfordernissen gerecht werden [55]. Dies scheidet jedoch häufig an zu niedrigen Produkterträgen und –ausbeuten der mikrobiellen Aromastoffbildung [34, 14, 216]. Vor diesem Hintergrund ist es eines der Hauptziele aktueller Forschung und Entwicklung in der Bioprozesstechnik, die volumetrische Produktivität von Bioprozessen zu maximieren und auf diese Weise die Kosten der Produktgewinnung zu reduzieren [107, 134, 135, 204, 134]. Ursache für die geringen Produktausbeuten bei der biotechnologischen Gewinnung von Aromastoffen besteht in der dabei auftretenden Inhibierung des mikrobiellen Stoffwechsels durch die gebildeten Aromastoffe selbst mit der Folge eines hochgradigen Rückgangs der Produktbildungsgeschwindigkeit [41; 137, 192; 20; 120; 189; 53; 113; S. 2-3].

Eine Umgehung der Produktinhibierung bei der Aromabiosynthese kann bioprozesstechnisch durch die so genannte In-situ-Produktabtrennung erfolgen [75]. Dies bedeutet die kontinuierliche Abtrennung der Aromastoffe zeitgleich zu ihrer Entstehung im Fermenter. Zu diesem Zweck bietet sich die organophile Pervaporation an, da sie eine kontinuierliche, effektive und selektive Abtrennung von Aromastoffen ermöglicht [13, 11, 188, 75, 129, 22, 187, 29, 156, 112, 186, 185, 206, 205, 204, 228]. Auf diese Weise können die Produktkonzentrationen in der Fermentationsbrühe reduziert und die negativen Auswirkungen der Produktinhibierung verringert werden.

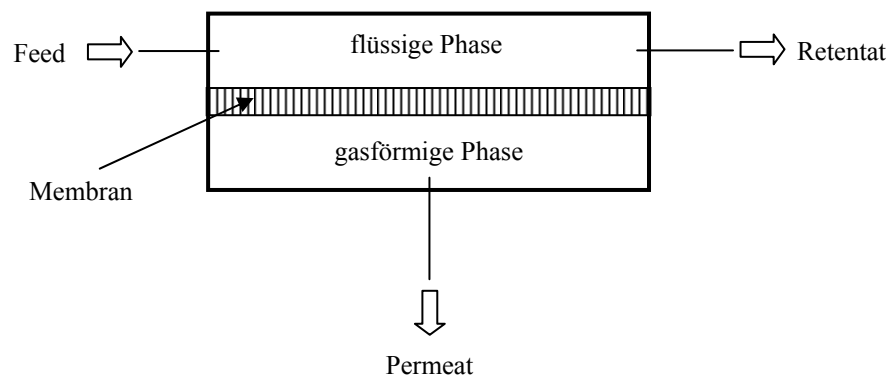
Die bioprozesstechnische Umsetzung der pervaporativen In-situ-Produktabtrennung erfolgt hier durch die Verknüpfung der Verfahren Pervaporation und Fermentation in Form eines Pervaporation-Bio-Hybridreaktors [205, 206]. In Bezug auf eine industrielle Nutzung dieser Technik bedarf es aus ingenieurwissenschaftlicher Sicht detaillierter Kenntnisse des Prozessverhaltens, um eine optimale Reaktorauslegung und Prozessführung zu ermöglichen. Dies leistet die vorliegende Arbeit, in dem sie eine umfassende bioverfahrenstechnische Charakterisierung des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses hinsichtlich des Prozessverhaltens und der Prozessführung vornimmt und mit der Entwicklung eines Bioprozessmodells ein wichtiges Hilfsmittel für die Reaktorauslegung bereitstellt. Als Modellfermentation dient dabei die biotechnologische Gewinnung eines Bananenaromas unter Nutzung des Schimmelpilzes *Ceratocystis fimbriata* in Submerskultur.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Pervaporation

#### 2.1.1 Grundlagen und Verfahrensbeschreibung

Die Pervaporation zählt zu den Membranverfahren [209]. Bei diesem Trennprozess wird ein flüssiges Gemisch (Feed) über einen partiellen Stofftransport durch eine homogene Membran (Permeation) aufgetrennt [111, 195, 173, 174]. Dabei vollziehen die permeierenden Stoffe (Permeanden) einen Phasenwechsel von flüssig nach gasförmig. Abgesehen von der Verdampfung durch poröse Membranen ist die Pervaporation das einzige Membrantrennverfahren, welches mit einem Phasenwechsel einhergeht [30]. Als Prozessergebnis der Pervaporation erhält man ein abgereichertes, flüssiges Retentat und ein gasförmiges Permeat, welches bei niedrigen Temperaturen kondensiert werden kann [212, 213]. Bild 2.1 veranschaulicht das Grundprinzip der Pervaporation.



**Bild 2.1:** Schematische Darstellung des Pervaporationsprinzips

Die Pervaporation eignet sich insbesondere zur Abtrennung von hoch verdünnten, flüchtigen Minderkomponenten eines Gemisches, wobei diese im Permeat angereichert werden [30, 227].

Der Begriff Pervaporation wurde von Kober im Jahr 1917 eingeführt. Er konnte beobachten, dass „eine Flüssigkeit in einer frei in der Luft hängenden Blase aus Zelluloseacetat verdampfte, obwohl die Blase dicht verschlossen war“ [114]. Die systematische Erforschung der Pervaporation begann erst in den späten 1950er Jahren und es dauerte noch bis in die 1980er Jahre, ehe erste industrielle Anlagen der hydrophilen Pervaporation zur Entwässerung von Lösungsmitteln in Betrieb genommen wurden [14, 172, 57, 152].

Das Trennprinzip der Pervaporation beruht nicht wie das der Destillation auf Dampfdruckunterschieden, sondern auf unterschiedlichen Löslichkeiten und Diffusionsgeschwindigkeiten in

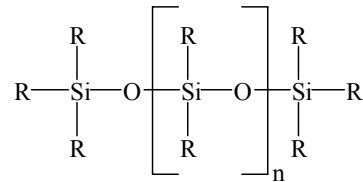
bzw. durch die Membran. Die Qualität der Trennung, d. h. die Selektivität, wird bei der Pervaporation durch die Zusammensetzung und den Aufbau der Membran bestimmt [21], wobei insbesondere die physikalisch chemischen Eigenschaften des Polymers der Selektivschicht maßgeblich und richtungsweisend sind [130]. Zur Veranschaulichung des Trennprinzips kann die Pervaporation als eine Extraktion unter Verwendung eines immobilisierten, festen Lösungsmittels (der Membran) aufgefasst werden. In Abhängigkeit vom Membranmaterial unterscheidet man zwei Grundrichtungen der Selektivität des Verfahrens [68, 152]:

1. die hydrophile Pervaporation
2. die organophile Pervaporation

Bei der hydrophilen Pervaporation permeieren bevorzugt Wasser und wasserähnliche (hydrophile) flüchtige Komponenten eines Gemisches durch die Membran und werden auf diese Weise im Permeat angereichert. Die hydrophile Pervaporation wird beispielsweise zur Entwässerung von Lösungsmitteln verwendet [14, 172, 57]. Dabei kommen hydrophile Membranen z. B. aus Polyvinylalkohol oder Zelluloseacetat zum Einsatz [120]. Bei der organophilen Pervaporation werden bevorzugt organophile (hydrophobe) flüchtige organische Komponenten eines Gemisches abgetrennt und im Permeat angereichert. Organophile Trennaufgaben, d. h. die Abtrennung flüchtiger organischer Komponenten aus wässrigen Gemischen, sind u. a. in der Abwasserbehandlung, in der Biotechnologie und in der Lebensmitteltechnologie anzutreffen [14, 152].

Die Pervaporation basiert auf der Verwendung makroskopisch dichter, porenfreier Membranen. Die Permeabilität dieser Membranen gegenüber bestimmten Gemischkomponenten ist nicht wie bei porösen Filtrationsmembranen das Ergebnis eines Siebeffektes, sondern beruht auf einem Lösungs-Diffusions-Mechanismus. Membranmaterialien für die organophile Pervaporation sind in der Regel hydrophobe Elastomere, die bevorzugt organische Verbindungen unter Quellung absorbieren [111, 15, 16]. Die Sorptionsisothermen der für die organophile Pervaporation in Frage kommenden Elastomere sind im Allgemeinen linear, d. h. diese Membranen absorbieren organische Komponenten proportional zu deren Konzentration im Feed [33]. Für die organophile Pervaporation werden überwiegend Silikonmembranen mit unterschiedlich substituierten Seitenketten wie beispielsweise Polydimethylsiloxan verwendet [20]. Bild 2.2 zeigt die allgemeine Strukturformel von Silikonen. Bei Polydimethylsiloxan bestehen die Seitenketten einheitlich aus Methylgruppen.

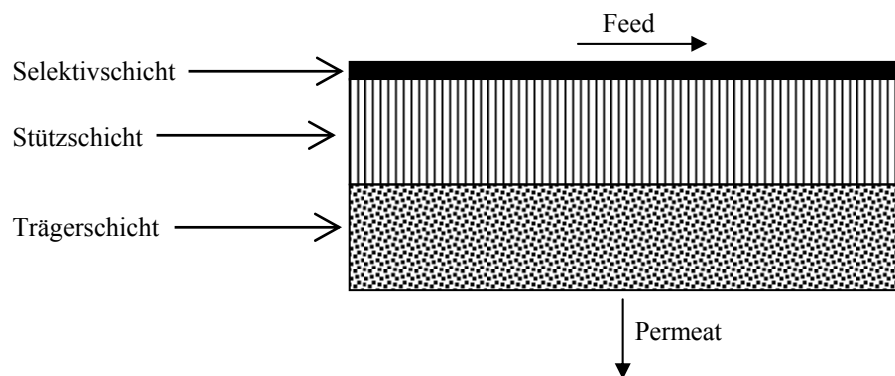




**Bild 2.2:** Allgemeine Strukturformel von Silikonen. Für Polydimethylsiloxan gilt  $\text{R} = \text{CH}_3$ .

Die erste gewerblich erhältliche organophile Membran aus Silikon (PDMS) kam 1988 auf den Markt [14]. Doch erst 1997 konnte über eine erste industrielle Anwendung der organophilen Pervaporation berichtet werden [6, 152].

Bezüglich ihrer Form bzw. ihres Aufbaus unterscheidet man bei Pervaporationsmembranen Schlauchmembranen, Hohlfasermembranen und Flachmembranen. Flachmembranen sind in der Regel Komposit- oder Verbundmembranen, die sich durch einen schichtweisen Aufbau auszeichnen (Bild 2.3).



**Bild 2.3:** Aufbau einer Kompositmembran

Um ausreichend hohe Permeatflüsse zu gewährleisten, weist die Selektivschicht einer Pervaporationsmembran nur sehr geringe Stärken von wenigen  $\mu\text{m}$  auf. Mit dieser geringen Stärke hält sie ohne eine weitere Stabilisierung den mechanischen Beanspruchungen einer prozesstechnischen Nutzung nicht stand. Deshalb wird die Selektivschicht bei Kompositmembranen mit Stütz- und Trägerschichten verbunden und ihr auf diese Weise mechanische Festigkeit verliehen. Die Stützschiichten bestehen aus Polymeren wie Polyacrylnitril oder Polyester und müssen durch eine entsprechende Dichte und Stärke eine ausreichende Stabilisierung der Selektivschicht garantieren. Gleichzeitig ist es notwendig, dass die Stützschiichten eine hinreichend poröse Beschaffenheit und entsprechende Durchlässigkeit aufweisen, um eine weitestgehend ungehinderte Abführung des Permeates zu ermöglichen [57].

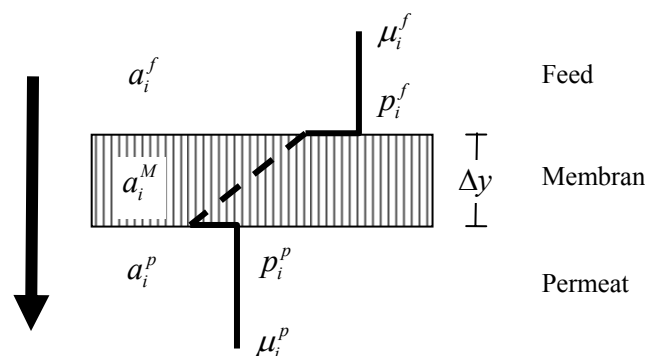
Pervaporationsmembranen zeigen im Betrieb ein ausgeprägtes Konditionierungsverhalten, d. h. eine langsame zeitabhängige Anpassung der Transporteigenschaften an veränderte Prozessbedingungen [175]. Das Erreichen eines Gleichgewichtszustandes des Stofftransportes bei der Pervaporation kann während der Konditionierungsphase mehrere Stunden in Anspruch nehmen und ist von der Zusammensetzung des Zulaufgemisches, dem Membranmaterial, den Prozessbedingungen sowie dem Ausgangszustand der Membran (trocken oder vorgequollen) abhängig [147].

### 2.1.2 Lösungs-Diffusions-Modell

Der Stofftransport bei der Pervaporation kann durch das Lösungs-Diffusions-Modell beschrieben werden. Dabei wird die Polymermembran vergleichbar einem Lösungsmittel als eine homogene Phase betrachtet, in der sich die Permeanden lösen und diffusiv entlang eines Konzentrationsgradienten transportiert werden. Das Lösungs-Diffusions-Modell unterteilt den Stofftransport einer Zielkomponente durch die Membran in drei Schritte [111, 133]:

1. Lösung bzw. Sorption in das Polymer an der Grenzfläche Feed/Membran
2. Diffusion durch das Polymer
3. Desorption aus dem Polymer an der Grenzfläche Membran/Permeat

Die treibende Kraft für den Stofftransport durch die Membran basiert auf einem Gradienten des chemischen Potentials  $grad \mu_i$  in Richtung des Permeats [129]. Bild 2.4 veranschaulicht den Verlauf dieses Gradienten durch die Membran.



**Bild 2.4:** Schematische Darstellung des Gradienten des chemischen Potentials bei der Pervaporation [239, S. 295]

Für den Permeatfluss  $J_i$  eines Permeanden  $i$  gilt mit dem phänomenologischen Koeffizienten  $L_i$  der lineare Zusammenhang:

$$J_i = L_i \cdot grad \mu_i \quad (2.1)$$

Das chemische Potenzial  $\mu_i$  einer Komponente  $i$  kann als eine Funktion der Zustandsvariablen Temperatur, Druck und Aktivität der Komponente  $i$  dargestellt werden [126]. In Verbindung mit Gleichung (2.1) führt dies zu:

$$J_i = L_i \frac{d}{dy} (-s_i T + \bar{V}_i p + RT \ln a_i^M) \quad (2.2)$$

In Gleichung (2.2) ist  $R$  die allgemeine Gaskonstante,  $T$  die absolute Temperatur,  $\bar{V}_i$  das partielle molare Volumen,  $p$  der Druck,  $s_i$  die partielle molare Entropie,  $a_i^M$  die Aktivität in der Membran und  $y$  die Richtungscoordinate senkrecht zur Membran. Bei der Pervaporation kann die Temperaturdifferenz zwischen der Feedseite der Membran und ihrer Permeatseite mit Ausnahme der Thermopervaporation vernachlässigt werden, sodass der Term  $\frac{d}{dy}(-s_i \cdot T)$  gleich null wird. Darüber hinaus sind die transmembranen Druckunterschiede im Vergleich zu druckgetriebenen Membranprozessen relativ gering ( $\leq 1 \text{ atm}$ ) und der Beitrag des Druckes zum chemischen Potenzial erheblich kleiner als der Beitrag der Aktivität der Komponente  $i$  [212]:

$$\bar{V}_i \cdot p \ll RT \ln a_i^M \quad (2.3)$$

Der Term  $\frac{d}{dy}(\bar{V}_i \cdot p)$  kann daher vernachlässigt werden. Folglich vereinfacht sich Gleichung (2.2) zu:

$$J_i = L_i \cdot R \cdot T \cdot \frac{d}{dy} (\ln a_i^M) \quad (2.4)$$

Die Triebkraft der Pervaporation beruht also im Wesentlichen auf einer Aktivitätsdifferenz orthogonal zur Membran [14].

Unter Berücksichtigung der ersten Ableitung des natürlichen Logarithmus ergibt sich aus Gleichung (2.4):

$$J_i = \frac{L_i \cdot RT}{a_i^M} \cdot \frac{da_i^M}{dy} \quad (2.5)$$

Geht man von einem linearen Verlauf des Aktivitätsgradienten innerhalb der Membran mit der Dicke  $l$  aus, erhält man

$$J_i = \frac{L_i \cdot RT}{a_i^M} \cdot \frac{\Delta a_i^M}{l}, \quad (2.6)$$

wobei  $a_i^M$  die mittlere Aktivität der Komponente  $i$  in der Membran bedeutet.  $\Delta a_i^M$  ist die Aktivitätsdifferenz der Komponente  $i$  zwischen der Feedseite und der Permeatseite der Membran.

Unter der Annahme eines Gleichgewichtszustandes zwischen der Membranoberfläche und den angrenzenden Phasen des Feeds und des Permeats kann die Aktivität der Komponente  $i$  in der Membran  $a_i^M$  mit der Konzentration bzw. dem Partialdruck der äußeren Phasen in Beziehung gesetzt werden [144]. Für die Phasengrenzfläche Feed/Membran gilt dann:

$$a_i^f = \gamma_i^f \cdot x_i^f = a_i^{M,f} \quad (2.7)$$

$\gamma_i^f$  ist der Aktivitätskoeffizient und  $x_i$  der Stoffmengenanteil der Komponente  $i$  im Feed. Für die Phasengrenzfläche Membran/Permeat gilt:

$$a_i^p = \frac{p_i^p \cdot \varphi_i^p}{p_i^*} = a_i^{M,p} \quad (2.8)$$

Dabei bedeuten  $p_i^p$  den Partialdruck,  $\varphi_i^p$  den Fugazitätskoeffizienten und  $p_i^*$  den Sättigungsdampfdruck der Komponente  $i$  im Permeat.

Durch die Kombination der Gleichungen (2.6), (2.7) und (2.8) erhält man einen mathematischen Ausdruck für den Fluss der Komponente  $i$  in Abhängigkeit von der Konzentration der Komponente  $i$  im Feed  $x_i^f$  und ihres Partialdruckes im Permeat  $p_i^p$ :

$$J_i = \frac{L_i \cdot RT}{a_i^M \cdot l} \cdot \frac{\gamma_i^f \cdot x_i^f \cdot p_i^* - p_i^p \cdot \varphi_i^p}{p_i^*} \quad (2.9)$$

Nach dem Fickschen Gesetz wird der Diffusionskoeffizient  $D_i^M$  der Komponente  $i$  in der Membran folgendermaßen definiert [210]:

$$D_i^M = \frac{L_i \cdot RT}{C_i^M} \quad (2.10)$$

Der Verteilungs- oder Sorptionskoeffizient  $S_i$  zwischen der Membran und den benachbarten Phasen der Feed- und der Permeatseite ist gegeben durch:

$$S_i = \frac{1}{H} = \frac{1}{\gamma_i^M \cdot p_i^* \cdot \bar{V}_i} \quad (2.11)$$

$H$  ist die Henrykonstante als Ausdruck der molaren Konzentration und des Druckes. Für die Aktivität der Komponente  $i$  in der Membran  $a_i^M$  gilt:

$$a_i^M = \gamma_i^M \cdot x_i^M = \gamma_i^M \cdot C_i^M \cdot \bar{V}_i \quad (2.12)$$

Durch Einsetzen der Beziehungen (2.10), (2.11) und (2.12) kann Gleichung (2.9) umgeschrieben werden zu:

$$J_i = \frac{D_i^M \cdot S_i}{l} \cdot (\gamma_i^f \cdot x_i^f \cdot p_i^* - p_i^p \cdot \phi_i^p) \quad (2.13)$$

Bei einem Druck von unter 10 bar ist der Fugazitätskoeffizient  $\phi$  konstant und gleich eins [4]. Weiterhin kann ausgehend vom Raoultischen Gesetz folgender Zusammenhang abgeleitet werden [187]:

$$p_i^f = x_i^f \cdot \gamma_i \cdot p_i^* \quad (2.14)$$

Damit vereinfacht sich Gleichung (2.13) zu:

$$J_i = \frac{D_i^M \cdot S_i}{l} \cdot (p_i^f - p_i^p) \quad (2.15)$$

Die Triebkraft für den Stofftransport bei der Pervaporation wird nach Gleichung (2.15) im Wesentlichen durch ein Partialdruckgefälle der permeierenden Komponente  $i$  vom flüssigen Zulauf (Feed) zum gasförmigen Permeat hervorgerufen. Nach dem Daltonschen Gesetz gilt für den Partialdruck der Komponente  $i$  im Permeat:

$$p_i^p = y_i^p \cdot p^p \quad (2.16)$$

Bei der Vakuumpervaporation beträgt der Druck im Permeat  $p^p$  weniger als  $10^{-2}$  bar. In der Praxis wird daher der Einfluss des Partialdrucks der Permeanden im Permeat auf die Pervaporation vernachlässigt. Damit ergibt sich eine für die Praxis hinreichend genaue Gleichung für den Permeatfluss  $J_i$ :

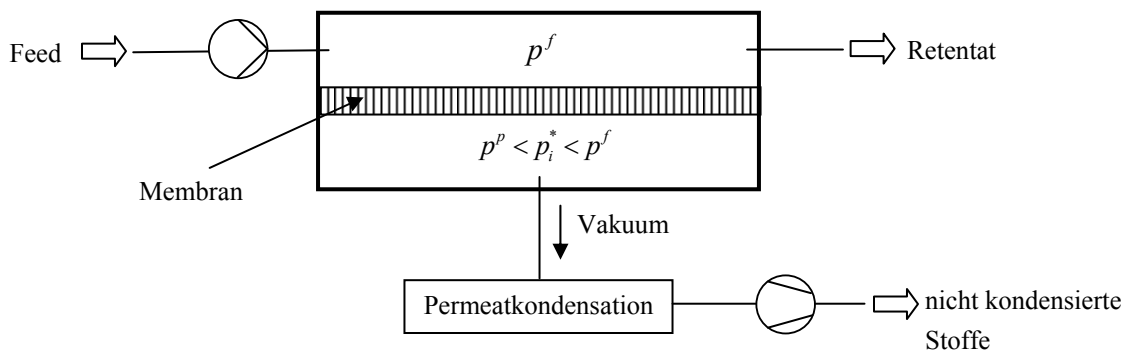
$$J_i = \frac{D_i^M \cdot S_i}{l} \cdot p_i^f = k_i \cdot c_i^f \quad (2.17)$$

Der Fluss einer Komponente  $J_i$  ist demzufolge näherungsweise direkt proportional zur Konzentration der Komponente im Feed  $c_i^f$ .

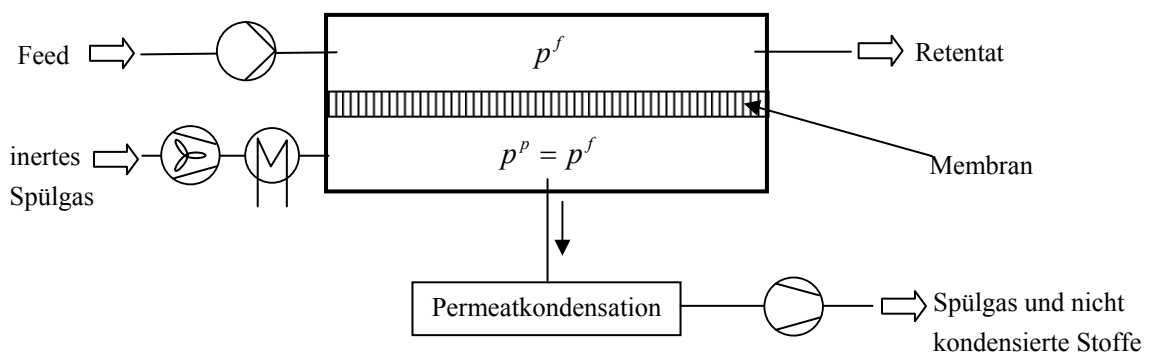
### 2.1.3 Betriebsweisen

Prozesstechnisch kann zur Aufrechterhaltung der Triebkraft bei der Pervaporation die Reduzierung des Partialdrucks der Permeanden auf der Permeatseite entweder durch das Anlegen eines Vakuums oder durch den Abtransport des Permeats mit einem inerten Spülgas erfolgen [159, 130]. Die sich daraus ergebenden zwei Betriebsweisen der Pervaporation sind in Bild 2.5 dargestellt.

#### 1. Vakuumpervaporation



#### 2. Spülgaspervaporation



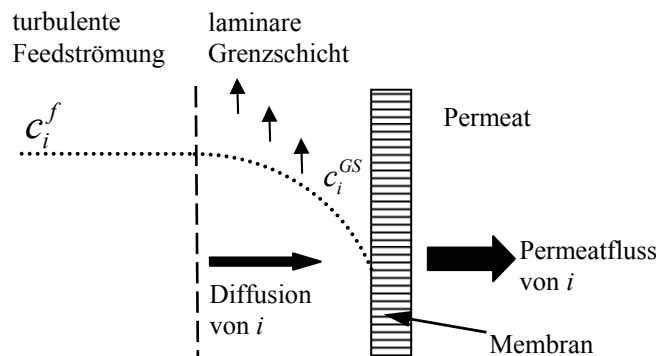
**Bild 2.5:** Betriebsweisen der Pervaporation

Im Allgemeinen versteht man unter Pervaporation die Vakuumpervaporation, da sie in der Mehrzahl der Fälle zur Anwendung kommt. Die Spülgaspervaporation wird nur dort eingesetzt, wo die Gewinnung des Permeates nicht Ziel des Verfahrens ist und das Permeat verworfen werden kann. Eine ökonomisch effiziente Rückgewinnung des Permeates bei der Spülgaspervaporation ist aufgrund der hohen Volumenströme des Spülgases und der damit ver-

bundenen Verdünnungseffekte nicht möglich [212]. Außerdem geht die Vakuumpervaporation im Vergleich zur Spülgaspervaporation mit höheren Permeatflüssen einher [14, 211].

#### 2.1.4 Konzentrationspolarisation

Die Trennleistung der Pervaporation kann durch das Auftreten von Konzentrationspolarisationen eingeschränkt werden [30, 49]. Das Phänomen der Konzentrationspolarisation tritt aufgrund der Existenz einer feedseitigen laminaren Grenzschicht an der Membran auf (Bild 2.6) [83].



**Bild 2.6:** Schematische Darstellung der Konzentrationspolarisation [22, modifiziert].

In laminaren Strömungen findet orthogonal zur Strömungsrichtung nahezu kein konvektiver Stofftransport statt. Jeglicher Stoffaustausch durch die laminare Grenzschicht sowohl in Richtung Membranoberfläche als auch in Richtung des Kerns der Feedlösung erfolgt ausschließlich durch Diffusion. Der Stofftransport bei der Diffusion ist im Vergleich zu konvektiven Strömungen jedoch ein sehr langsamer Prozess, sodass die Diffusion mitunter den pervaporativen Abtransport einer Komponente  $i$  aus der laminaren Grenzschicht nicht kompensieren kann. Dies gilt insbesondere für pervaporativ gut abtrennbare Komponenten. Daher kann es zu einer Abnahme der Konzentration hoch permeabler Komponenten in der laminaren Grenzschicht kommen. Dies führt zu einer Abnahme der Leistung der Pervaporation bis die Konzentration in der laminaren Grenzschicht durch Diffusion wieder zunimmt. Dieses Phänomen wird als Konzentrationspolarisation bezeichnet [111, 7]. Das Ausmaß der Konzentrationspolarisation ist eine Funktion der Strömungssituation an der Membran, der Membranpermeabilität und der transmembranen Triebkraft. Analog zur Konzentrationspolarisation entsteht durch den Entzug der Verdampfungs- und Expansionswärme bei der Vakuumpervaporation ebenso eine die Leistung mindernde Temperaturpolarisation [138, 199, 109]. Konzentrations- und Temperaturpolarisationen können durch eine Erhöhung der hydrodynamischen Turbulenz über der Membran verringert werden, da mit zunehmender Turbulenz die Dicke der laminaren Grenzschicht abnimmt [48].

### 2.1.5 Fouling

Unter Fouling versteht man allgemein den negativen Einfluss nicht permeabler Bestandteile der Feedlösung auf den Stofftransport der Permeanden [130]. Fouling tritt als Folge von Ablagerungs- bzw. Adsorptionsvorgängen kolloidaler und makromolekularer Bestandteile der Feedlösung an der Membranoberfläche auf. Foulingphänomene sind daher insbesondere bei komplex zusammengesetzten Feedlösungen wie beispielsweise Fermentationsbrühen zu erwarten. Zum Fouling zählt ebenso der mikrobielle Bewuchs der Membranoberfläche, der als „Biofouling“ bezeichnet wird [129]. Foulingscheinungen können in vielen Fällen durch geeignete Reinigungsverfahren rückgängig gemacht werden. Allerdings dringen beim Fouling mitunter Substanzen in die Selektivschicht der Membran ein. Dort werden diese Substanzen aufgrund ihrer nicht permeablen Eigenschaften immobilisiert und behindern auf sterische Weise den Transport der Permeanden durch die Membran [66]. Diese Art des Foulings ist irreversibel.

### 2.1.6 Leistungsparameter

Die Bewertung der Trennleistung der Pervaporation erfolgt über geeignete Leistungsparameter. Dazu haben sich die Größen Permeatgesamtfluss ( $J_{ges}$ ), Permeatpartialfluss ( $J_i$ ) sowie der Trennfaktor ( $\alpha_{i/j}$ ) und der Anreicherungsfaktor ( $\beta_i$ ) durchgesetzt [30]. Der Gesamt- und der Partialfluss beschreiben die Leistung des Trennprozesses in Bezug auf die anfallende Permeatmenge. Der Gesamtfluss ( $J_{ges}$ ) ist die pro Zeiteinheit und Membranflächeneinheit anfallende Masse des Permeates. Die Partialflüsse ( $J_i$ ) bedeuten die pro Zeiteinheit und Membranflächeneinheit permeierte Masse der Substanz  $i$ . Der Gesamtfluss ( $J_{ges}$ ) ist mit dem Partialfluss  $J_i$  der Substanz  $i$  über die Konzentration der Substanz  $i$  im Permeat ( $c_i^p$ ) und die Dichte des Permeates  $\rho^p$  verbunden:

$$J_i = c_i^p \cdot \rho^p \cdot J_{ges} \quad (2.18)$$

Der Trennfaktor und der Anreicherungsfaktor sind dimensionslose Kennzahlen für die Fähigkeit des Prozesses, zwei im flüssigen Feedgemisch vorhandene Substanzen  $i$  und  $j$  voneinander zu trennen. Sie beschreiben mithin die Selektivität des Trennprozesses. Der Anreicherungsfaktor wird als der Quotient aus Permeatkonzentration  $c_i^p$  und Feedkonzentration  $c_i^f$  der Komponente  $i$  berechnet:

$$\beta_i = \frac{c_i^p}{c_i^f} \quad (2.19)$$

Der Trennfaktor  $\alpha_{i/j}$  ist definiert als das Verhältnis der Anreicherungsfaktoren zweier Substanzen zueinander:



$$\alpha_{i|j} = \frac{c_i^p / c_i^f}{c_j^p / c_j^f} = \frac{c_i^p \cdot c_j^f}{c_i^f \cdot c_j^p} = \frac{\beta_i}{\beta_j} \quad (2.20)$$

Wird bei der Pervaporation keine Trennung zweier Substanzen erreicht, hat der entsprechende Trennfaktor den Wert eins. Je besser die Trennung der Substanzen  $i$  und  $j$ , desto größer wird der Trennfaktor  $\alpha_{i|j}$ . Für die vollständige Semipermeabilität der Membran in Bezug auf die Substanzen  $i$  und  $j$  nimmt der Trennfaktor einen unendlich großen Wert an. Im Regelfall beschreibt der Trennfaktor bei der organophilen Pervaporation die Trennung einer organischen Komponente von der wässrigen Phase. Liegen dabei hoch verdünnte Lösungen vor, nimmt der Anreicherungsfaktor für Wasser annähernd den Wert eins an:

$$c_{H_2O}^p \approx c_{H_2O}^f \Rightarrow \beta_{H_2O} \approx 1 \quad (2.21)$$

Damit geht der Trennfaktor  $\alpha_{i|H_2O}$  in den Anreicherungsfaktor  $\beta_i$  über:

$$\alpha_{i|j} \rightarrow \beta_i \quad (2.22)$$

Bei verdünnten Feedlösungen (Anteil der organischen Komponente unter 1 %) wie beispielsweise Fermentationsbrühen wird daher der Anreicherungsfaktor  $\beta_i$  zur Charakterisierung der Selektivität der Pervaporation herangezogen [14, 110].

## 2.2 Aromastoffe

### 2.2.1 Definition von Aromastoffen

Die Qualität von Lebensmitteln hängt weitgehend von deren sensorischen Eigenschaften, insbesondere von dem Aroma ab [178, S. 577; 148, S. 9]. Der Begriff des Aromas bezeichnet die gemeinsame sensorische Wahrnehmung des Geruchs und des Geschmacks [149, S. 24]. Wie die Marktforschung zeigt, ist die Güte des Aromas eines Lebensmittels ein wichtiges Entscheidungskriterium für den Kauf [46]. Bei der Beurteilung der Qualität eines Lebensmittels spielen neben den geruchlichen und geschmacklichen Merkmalen ebenfalls visuelle, haptische und akustische Sinneseindrücke eine wichtige Rolle. Beispielsweise bewertet der Verbraucher Obst u. a. nach der Farbe, Honig u. a. nach der Konsistenz und Salzgebäck u. a. nach den Kaugeräuschen. In der sensorischen Lebensmitteluntersuchung unterscheidet man deshalb vier Qualitätsmerkmale: das Aussehen, den Geruch, den Geschmack und die Textur, wobei akustische Wahrnehmungen in die Beurteilung der Textur eingehen. In der Sensorik wird also zwischen Geschmack und Geruch unterschieden. Die geschmackliche, d. h. gustatorische Wahrnehmung ist auf die vier Grundrichtungen süß, sauer, salzig und bitter beschränkt. Der menschliche Geruchssinn ist hingegen in der Wahrnehmung unterschiedlicher Gerüche

nahezu unbegrenzt, sodass eine Fülle den Geruch beschreibender Attribute Anwendung findet, darunter z. B. fruchtig, ätherisch, stechend, alkoholisch [73, S. 24 ff.].

Mitunter wird das charakteristische Aroma eines Lebensmittels durch eine oder wenige so genannte Schlüsselverbindungen geprägt [25, S. 2]. Von einer Schlüsselverbindung spricht man dann, wenn der entsprechende Aromaeindruck ohne diese Verbindung nicht entsteht [149, S. 32]. Beispielsweise ist Isoamylacetat die Schlüsselverbindung des Bananenaromas [165]. In vielen Fällen besteht das Aroma eines Lebensmittels jedoch aus einer Vielzahl unterschiedlicher Aromastoffe. So wurden bis heute beispielsweise in der Erdbeere ca. 400, im Apfel ca. 300 und im Kaffee mehr als 700 unterschiedliche Aromastoffe nachgewiesen [60].

In der Bundesrepublik Deutschland regelt die Aromenverordnung den Einsatz und die Kennzeichnung von Aromen und Aromastoffen. In der Aromenverordnung werden unter Aromastoffen chemisch definierte Einzelsubstanzen und unter Aromen komplex zusammengesetzte Erzeugnisse verstanden. Die Aromastoffe werden in der Aromenverordnung in drei Klassen eingeteilt:

1. natürliche Aromastoffe
2. naturidentische Aromastoffe
3. künstliche Aromastoffe

Natürliche Aromastoffe werden verstärkt nachgefragt, da sie beim Verbraucher auf eine höhere Akzeptanz stoßen als die naturidentischen oder künstlichen Aromastoffe [154]. Die Gründe für die erhöhte Verbraucherakzeptanz sind vielfältig. Beispielsweise gaben bei einer Umfrage in Großbritannien 92 % der Verbraucher an, dass die Bezeichnung „natürlich“ bei Lebensmitteln mit positiven Auswirkungen auf die Gesundheit verbunden ist [61]. Natürliche Aromastoffe besitzen aufgrund ihrer Beliebtheit bei dem Verbraucher einen Marktvorteil gegenüber künstlichen oder naturidentischen Aromastoffen und erzielen mitunter höhere Marktpreise [118, 40, 223, 165, 1, 20].

In den Begriffsbestimmungen der Anlage 1 der Aromenverordnung werden natürliche Aromastoffe definiert als: „Chemisch definierte Stoffe mit Aromaeigenschaften, gewonnen durch geeignete physikalische Verfahren (einschließlich Destillation und Extraktion mit Lösungsmitteln), durch enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus Ausgangsstoffen pflanzlicher oder tierischer Herkunft, die als solche verwendet oder mittels herkömmlicher Lebensmittelzubereitungsverfahren (einschließlich Trocknen, Rösten und Fermentieren) für den menschlichen Verzehr aufbereitet werden.“

Demzufolge zählen biotechnologisch gewonnene Aromastoffe in der Bundesrepublik Deutschland zu den „natürlichen Aromastoffen“. Die Kennzeichnung biotechnologisch gewonnener Aromastoffe als „natürlich“ findet darüber hinaus Anwendung in der Europäischen Union sowie den Vereinigten Staaten von Amerika und ist ebenso Bestandteil der Richtlinien der „International Organization of the Flavo(u)r Industry (I.O.F.I.)“ [40; 229, S. 645 ff.].

### 2.2.2 Herstellung von Aromastoffen

Aromastoffe werden technisch gewonnen, um sie letztendlich Lebensmitteln zuzufügen. Lebensmittel werden aromatisiert, um

- Aromaverluste auszugleichen, die bei der Herstellung, der Lagerung und dem Transport der Lebensmittel auftreten;
- natürliche, klimabedingte, regionale oder saisonale Schwankungen bei landwirtschaftlichen Rohstoffen auszugleichen;
- Aromaverluste auszugleichen, die bei neuartigen oder diätetischen Lebensmitteln durch Substitution von Zucker und Fett oder durch den Entzug anderer Inhaltsstoffe entstehen;
- eine große Anzahl preisgünstiger und geschmacklich ansprechender Lebensmittel anbieten zu können wie z. B. Fertigprodukte, Süßwaren, Speiseeis und Limonaden.

Zur Herstellung von Aromastoffen bzw. Aromen werden folgende Verfahren eingesetzt:

- physikalische Verfahren einschließlich Destillation und Extraktion mit Lösungsmitteln
- enzymatische oder mikrobiologische Verfahren
- herkömmliche Lebensmittelzubereitungsverfahren einschließlich Trocknen, Rösten und Fermentation
- chemische Synthese
- nicht enzymatische Bräunungsreaktionen (Maillard-Reaktion)
- Kondensation oder Absorption von Rauch, der bei den herkömmlichen Verfahren zum Räuchern von Lebensmitteln verwendet wird.

Aufgrund der verstärkten Nachfrage natürlicher Aromen seitens des Verbrauchers gewinnen in der Aromaherstellung biotechnologische, d. h. enzymatische und mikrobielle Verfahren, zunehmend an Bedeutung [25, 203, 64, 1]. Biotechnologisch hergestellte Aromastoffe werden auch als „Bioaromen“ bezeichnet. Der Begriff Bioaroma („Bioflavour“) wurde erstmalig 1987 als Titel eines internationalen Symposiums an der Universität Würzburg geprägt [191]. Bioaromen zeigen oft eine größere, sensorisch wahrnehmbare aromatische Vielfalt als chemisch synthetisierte Einzelsubstanzen, da Bioaromen oft komplexe Mischungen verschiedener Aroma bildender Metaboliten des produzierenden Mikroorganismus sind [25, 186, 187, 78].

Eine Auswertung von 50 Untersuchungen zur biotechnologischen Gewinnung von Aromastoffen in den Jahren 1990 bis 1995 ergab, dass in 80 % der Fälle Mikroorganismen, in 10 % der Fälle Enzyme und in 10 % der Fälle pflanzliche Zellkulturen zur Aromasynthese genutzt wurden [55]. Von den Mikroorganismen entfielen 60 % auf Schimmelpilze (höhere Pilze), 20 % auf Hefen und 20 % auf Bakterien. Ursache dieser Verteilung ist, dass höhere Pilze wie die Ascomyceten und die Basidiomyceten ein größeres Aromabiosynthesepotenzial als Bakterien und Hefen bieten [153, 2, 94, 117, 202]. Dies gilt nicht nur für die Synthese einzelner Aromastoffe, sondern insbesondere auch für die Bildung von Aromastoffgemischen und Komplexaromen. Die Aromaindustrie ist weniger am Verkauf einzelner Aromastoffe als vielmehr am Verkauf von Aromastoffgemischen und Komplexaromen interessiert [223]. Nach einer Prognose aus dem Jahre 2002 wird der weltweite Handel mit Duft- und Aromastoffen im Jahr 2005 mehr als 12 Mrd. US-\$ betragen, wobei biotechnologische Produkte einen Anteil von 10 % einnehmen werden [26].

### **2.2.3 Bananenaroma**

Bananen nehmen unter den direkt verzehrten Früchten einen hohen Stellenwert ein [229, S. 365]. Weltweit werden hiervon jährlich 48 Mio. Tonnen produziert [229, S. 365]. Das Aroma der Banane entwickelt sich während des Reifeprozesses von einem mild, leicht sauren und adstringierenden Charakter über eine fruchtig, frische, süße und für reife Bananen typische von Isoamylacetat dominierte Esternote, zu einem überreif süßen, cremig würzigen, vollaromatischen Estercharakter [229, S. 365]. Dabei stellt Isoamylacetat die Schlüsselverbindung des Bananenaromas dar. Neben dieser Schlüsselverbindung gelten einige weitere Ester und Alkohole als charakteristisch für das Aroma der Banane. Zu diesen Estern zählen Isobutylacetat, Ethylbutyrat, Propylacetat und Ethylacetat. Zu den Alkoholen gehören Ethyl-, Isoamyl- und Isobutylalkohol [215, 99, 38, 179, 82].

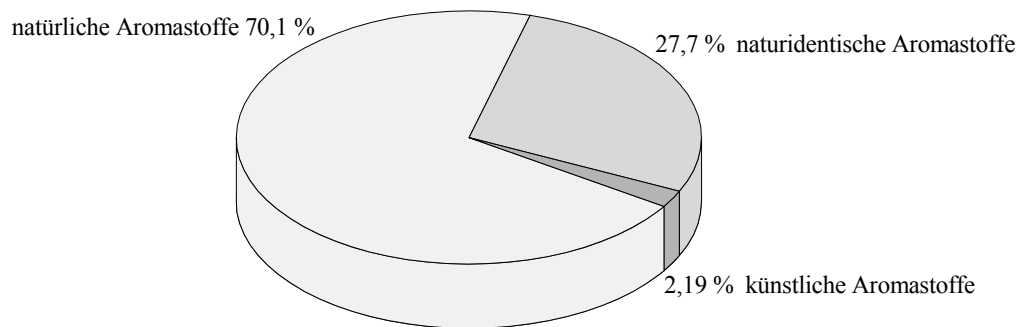
### **2.2.4 Der Aromaverzehr in der Bundesrepublik Deutschland**

Auf der Grundlage der verfügbaren Verzehrdaten des üblichen Lebensmittelkorbs wurde vom deutschen Verband der Aromenindustrie e.V. mit Bezug auf die in Deutschland geltenden lebensmittelrechtlichen Normen der jährliche Aromaverzehr kalkuliert. Dabei wurde von einer Gesamtbevölkerung der Bundesrepublik Deutschland von 81 Mio. Einwohnern ausgegangen. Der Tabelle 2.1 ist die Verzehrmenge aromatisierter Lebensmittel pro Kopf und Jahr in der Bundesrepublik Deutschland nach Lebensmittelklassen zu entnehmen.

**Tabelle 2.1: Verzehr aromatisierter Lebensmittel in Deutschland [60]**

<b>Aromatisierte Lebensmittel</b>	<b>Verzehrmenge pro Kopf und Jahr in kg</b>
Erfrischungsgetränke	66,795
Milcherzeugnisse	24,09
Wurstwaren	16,485
Speiseeis	9,125
Fertiggerichte	5,475
Schokoladenerzeugnisse	3,65
Feinkosterzeugnisse	2,555
Obst-, Gemüseerzeugnisse	2,555
Zuckerwaren	1,825
Dauerbackwaren	1,825
Liköre	1,095
Gemüsesäfte	0,365
Tee, Kräutertee	0,365
Aromatisierter Wein	0,365
Knabberartikel	0,365
Summe	136,935

Unter der Annahme einer durchschnittlichen Aromadosierung im Lebensmittel von 1 : 1000, d. h. 1,00 g Aroma je kg Lebensmittel, und einem Aromastoffanteil im zugesetzten Aroma von 11 %, d. h. 0,11 g Aromastoffe je kg Lebensmittel, entsprechen die in Tabelle 2.1 aufgeführten aromatisierten Lebensmittel einem Aromenverzehr pro Kopf und Jahr von 137 g. Die Verteilung des Aromenverzehrs auf natürliche, naturidentische und künstliche Aromastoffe ergibt sich aus Bild 2.7.



**Bild 2.7:** Aufteilung der in Deutschland pro Kopf und Jahr verzehrten Aromastoffe [70]

Hinsichtlich der wesentlichen Geschmacksnoten verteilt sich der Aromenverzehr wie folgt [60]:

- Fruchtig/süßliche Noten            80%
- Gewürz- und Kräuternoten        20%

### 2.3 In-situ-Produktabtrennung

Bei der mikrobiellen Aromastoffsynthese treten die Produkte in der Fermentationsbrühe in sehr geringen Konzentrationen (ppm) [187, 186] auf. Die geringen Produktkonzentrationen in der komplex zusammengesetzten Fermentationsbrühe bedeuten eine vielschichtige Trennaufgabe für das nachfolgende Downstream Processing und führen damit zu hohen Kosten der Produktisolierung und -reinigung. Letzteres stellt ein Haupthindernis bei der industriellen Umsetzung biotechnologischer Aromastoffsynthesen dar [34, 14]. Darüber hinaus wird der Produktertrag bzw. die Raum-Zeit-Ausbeute der mikrobiellen Aromastoffsynthese oftmals durch eine bereits bei geringen Produktkonzentrationen eintretende Produktinhibierung eingeschränkt [41, 137, 192, 20, 120]. Hierbei wird die Produktbildung und/oder das Wachstum der Mikroorganismen durch die Akkumulation der Produkte in der Fermentationsbrühe gehemmt. Die Folge ist ein hochgradiger Abfall der Produktbildungsgeschwindigkeit [189; 53; 113, S. 2-3]. Diese Nachteile erschweren den Wettbewerb biotechnologischer Verfahren mit verfügbaren chemischen Synthesen [56]. Ein erfolgreicher Ansatz, diese Schwierigkeiten biotechnologischer Produktionsverfahren zu überwinden, wurde Ende der 1970er/Anfang der 1980er Jahre aufgezeigt und beinhaltet die kontinuierliche Abtrennung der hemmenden Produkte zeitgleich zu ihrer Entstehung im Fermenter [75, 198, 204, 52]. Auf diese Weise können Beeinträchtigungen des Biokatalysators durch die Anwesenheit der Produkte in der Zell-

umgebung verhindert werden. Die fermentationssimultane Abtrennung von hemmenden Produkten aus der Fermentationsbrühe wird als „In-situ-Produktabtrennung“ oder „extraktive Fermentation“ bezeichnet [75, 139]. Die In-situ-Produktabtrennung beschränkt sich auf extrazellulär vorliegende Produkte, da die Gewinnung intrazellulärer Produkte ohne Zerstörung der produzierenden Zelle nicht möglich ist. Der Zweck der In-situ-Produktabtrennung ist die Steigerung des Produktertrages bzw. der Produktausbeute durch im Wesentlichen drei verschiedene Effekte [75]:

1. Minimierung der Beeinträchtigung der Biosynthese durch die Anhäufung der Produkte, d. h. die Ermöglichung einer andauernden Produktbildung mit maximaler Produktivität
2. Minimierung von Produktverlusten durch Folgereaktionen bzw. Remetabolisierung sowie von unkontrollierten prozessbedingten Produktverlusten wie z. B. Verdunstung in den Kopfraum oder Ausgasen mit der Luftzufuhr
3. Reduzierung der Verarbeitungsschritte und Kosten zur Isolierung, Konzentrierung und Reinigung der Produkte im anschließenden Downstream Processing.

Mithilfe der In-situ-Produktabtrennung können sowohl bestehende Bioprozesse verbessert als auch im Versuchsstadium befindliche wirtschaftlich und damit industriell umsetzbar gestaltet werden. Die In-situ-Produktentfernung beinhaltet alle Maßnahmen zur unmittelbaren Abtrennung eines oder mehrerer Produkte einer Fermentation oder Biotransformation aus der Umgebung des produzierenden Biokatalysators. Die Nutzung der In-situ-Produktabtrennung in der Bioprosesstechnik erfolgt durch Integration von Trennoperationen in den Bioprozess und führt somit zu veränderten Bioreaktorkonfigurationen und -prozessführungen. Bei der Auswahl geeigneter Methoden zur In-situ-Produktabtrennung ist die Produktkategorie maßgeblich, da die chemisch physikalischen Eigenschaften des Produktes die Anforderungen an den Trennprozess bestimmen [25]. Prinzipiell sind alle Aromastoffe flüchtige Verbindungen, da sie im Gegensatz zu Geschmacksstoffen olfaktorisch wahrgenommen werden. Daher beschränkt sich die Auswahl an Trennprozessen für Aromastoffe auf solche, die zur Abtrennung flüchtiger Verbindungen geeignet sind. Diese müssen darüber hinaus den Anforderungen der Biotechnologie genügen und dürfen beispielsweise die laufende Fermentation nicht beeinträchtigen. Ein Trennprozess zur In-situ-Abtrennung von Aromastoffen aus Fermentationsbrühen unterliegt somit den folgenden Anforderungen:

Der Trennprozess

- muss unter den Fermentationsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Atmosphärendruck etc.) betrieben werden können;
- muss stabil und leistungskonstant gegenüber der komplexen und sich ständig verändernden Zusammensetzung der Fermentationsbrühe sein;

- darf die Fermentation, d. h. den Stoffwechsel der Mikroorganismen, nicht beeinträchtigen;
- muss kontinuierlich für die Dauer der Fermentation betrieben werden können;
- darf nicht zu Kontaminationen der gewonnenen Aromastoffe oder der Fermentationsbrühe führen;
- muss die Rückgewinnung des gesamten Aromastoffgemisches ermöglichen;
- muss bei sehr geringen Aromastoffkonzentrationen (ppm-Bereich) wirksam sein;
- und muss gewährleisten, dass der Biokatalysator und die Substrate im Bioreaktor verbleiben.

Das deutsche Lebensmittelrecht schreibt in der Aromenverordnung die Verwendung ausschließlich physikalischer Trennmethoden einschließlich der Destillation und der Extraktion für die Rückgewinnung von natürlichen Aromastoffen vor [34]. Die gewonnenen Lebensmittelaromen dürfen keine gefährlichen chemischen oder biologischen Kontaminanten z. B. aus dem Prozess der Rückgewinnung enthalten. Traditionelle Trennprozesse zur Aromagewinnung wie Destillation, Adsorption und Lösungsmittlextraktion sind für die In-situ-Produktabtrennung von Aromastoffen nicht optimal, da sie bei erhöhten Temperaturen arbeiten, mit einem hohen Energieverbrauch verbunden sind oder chemische Zusatzstoffe wie Adsorbentien und Extraktionsmittel erfordern. Bei der Adsorption und bei der Extraktion muss das Produkt überdies nach der Abtrennung aus der Fermentationsbrühe zusätzlich vom Adsorptions- bzw. Lösungsmittel befreit werden [72, 190, 14]. Aus diesen Gründen wurden in den letzten Jahren zunehmend Trennverfahren untersucht, welche bei moderaten Temperaturen arbeiten und ohne chemische Hilfsstoffe auskommen. Zu diesen Verfahren zählen die Dialyse, die Ultra-, Mikro- und Nanofiltration, die Reversosmose, die Vakuumdestillation, das Gas-Stripping, die Perstraktion und insbesondere die Pervaporation [186, 192, 80, 81, 205, 62, 67, 163, 171].

Die Pervaporation bietet sich als Trennverfahren zur In-situ-Produktabtrennung von Aromastoffen an, da sie

- bei niedrigen Temperaturen arbeitet,
- keine chemischen Hilfsstoffe benötigt,
- kontinuierlich betrieben werden kann,
- besonders effektiv im Bereich niedriger Produktkonzentrationen ist
- und die Fermentation nicht beeinträchtigt [85, 14, 120, 212, 161, 68, 186, 72, 57, 33, 185, 187, 132, 131].

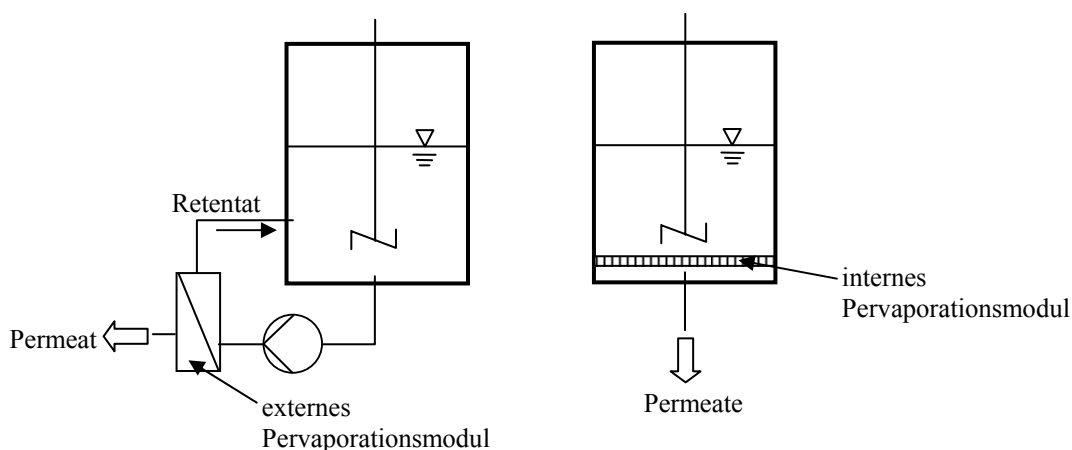
Wie ein Vergleich des Energieverbrauches unterschiedlicher Verfahren bei der Abtrennung von Aceton, Butanol und Ethanol in Tabelle 2.2 zeigt, geht die Pervaporation darüber hinaus mit einem relativ niedrigen Energieverbrauch einher.



**Tabelle 2.2:** Energieverbrauch für die In-situ-Produktabtrennung von Aceton, Butanol und Ethanol (ABE) [90]

Trennprozess	Energieverbrauch in MJ/kg
Pervaporation	9
Extraktion bzw. Perstraktion	14
Gas-Stripping	21
Adsorption	33

Zur technischen Realisierung der In-situ-Produktabtrennung mithilfe der Pervaporation in Form eines so genannten Pervaporation-Bio-Hybridprozesses können grundsätzlich zwei verschiedene Prozessalternativen umgesetzt werden [128, 152, 182]. Entweder ist die Pervaporation eine externe Prozesseinheit oder die Pervaporationseinheit wird direkt in den Reaktor integriert (s. Bild 2.8).

**Bild 2.8:** Alternativen des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses [67]

Der erste Versuch der In-situ-Produktabtrennung unter Nutzung der organophilen Pervaporation wurde 1984 von GROOT et al. bei einer Butanolfermentation durchgeführt [120]. Der Großteil der Forschungsarbeiten zur pervaporativen In-situ-Produktabtrennung in den 1980er und 1990er Jahren befasste sich mit Fermentationen zur Herstellung organischer Lösungsmittel wie Ethanol [93, 150, 112, 100, 156, 85, 194, 142, 146], Butanol [168, 167, 120, 79, 87, 124, 86, 88, 89] und Aceton/Butanol/Ethanol (ABE) [170, 171, 98, 76, 24, 142, 92, 93]. Erste allgemeine Untersuchungen der Eignung der Pervaporation zur Abtrennung von Aromastoffen begannen Ende der 1980er Jahre [19, 220]. DETTWILER et al. vollzogen im Bereich der Aromastoffe erstmalig den Schritt von der Modelllösung zum realen Fermentationssystem und koppelten im Jahr 1991 ein Pervaporationsmodul an eine Fermentation mit *Bacillus subtilis* zur Abtrennung von 2,3-Butandiol und Acetoin [59]. Bis heute wurden auf dem Ge-

biet der In-situ-Abtrennung von Aromastoffen mit der organophilen Pervaporation die in Tabelle 2.3 genannten Untersuchungen veröffentlicht. Dabei enthält Tabelle 2.3 nur solche experimentelle Arbeiten, bei denen die Aromastoffabtrennung zeitgleich zur Fermentation durchgeführt wurde. Die Mehrzahl der in der Literatur anzutreffenden Arbeiten auf dem Gebiet der Abtrennung von Aromastoffen mit der organophilen Pervaporation behandeln dagegen entweder Modelllösungen oder Fermentationsbrühen nach Abschluss der Fermentation [20, 13, 205, 108, 180, 200, 98].

**Tabelle 2.3: Veröffentlichungen zur In-situ-Produktabtrennung von Aromastoffen mithilfe der organophilen Pervaporation bei der Fermentation**

Mikroorganismus	Aromastoffe	Typ des Aromas	Membran-anordnung	Literatur	Jahr
<i>Bacillus subtilis</i>	2,3-Butandiol & Acetoin	Bestandteil vieler Aromen, u. a. Cheddar	extern	[59]	1991
<i>Trichoderma viride</i>	6-pentyl- $\alpha$ -pyron	Kokosaroma	extern	[22]	1992
<i>Bjerkandera adusta</i>	Benzaldehyd	Bittermandel, Sherry	extern	[201, 120]	1995
<i>Ceratocystis moniliformis</i>	verschiedene Ester & Terpene	Frucht, Zitrus	extern	[29]	2001
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	verschiedene Ester & Alkohole	Bananenaroma	intern	[206]	2003

## 2.4 Modellierung

### 2.4.1 Bioprozessmodelle

Ein Bioprozessmodell ist eine formale, verallgemeinernde Beschreibung wichtiger Kriterien eines Fermentationsprozesses, die das reale Prozessverhalten auf möglichst einfache mathematische Zusammenhänge zurückführt [145, S. 15; 197, S. 1].

Bei der Bioverfahrensentwicklung sind experimentelle Untersuchungen in Modellmaßstäben, d. h. im Labor- und Technikumsmaßstab, erforderlich. Diese Experimente sind oft mit hohen Kosten verbunden, die mit dem Maßstab mitunter exponentiell zunehmen. Deshalb wird versucht, einzelne Prozessstufen bis hin zum Gesamtprozess mithilfe mathematischer Modelle zu simulieren. Für eine wirklichkeitsnahe Simulation müssen verfügbare Informationen über das Prozessverhalten weitestgehend in die Modellstruktur integriert werden. Informationen dieser Art können wiederum nur durch experimentelle Untersuchungen erlangt werden, sodass ein mathematisches Modell die Laboruntersuchungen des Prozesses nie vollständig ersetzen kann. Ein Bioprozessmodell kann aber zu Kosteneinsparungen führen, indem es

gemeinsam mit den Experimenten die Kenntnisse über den Prozess erweitert und durch die Möglichkeit der Prozesssimulation unter Berücksichtigung veränderter Rahmenbedingungen schneller und kostengünstiger zum Ziel der optimalen Prozessauslegung führt [208, S. 377; 39].

Entsprechend der Komplexität bzw. der Detailtiefe des Modells wird zwischen unstrukturierten und strukturierten Modellen unterschieden [145; 197; 17, S. 52]. Unstrukturierte Modelle sind stark vereinfachte Abbildungen des Fermentationsprozesses, indem sie die zum Prozessergebnis führenden Vorgänge auf messbare makroskopische Größen zurückführen. Diese Größen sind in der Regel die Konzentrationen der Biomasse, des Substrates und der Produkte im Bioreaktor. Die Kinetik dieser Größen, d. h. das Wachstum, der Substratabbau und die Produktbildung, wird in unstrukturierten Modellen durch mathematische Abhängigkeiten der Reaktorkonzentrationen untereinander beschrieben. Dabei wird das Reaktionsvolumen als homogen, d. h. gradientenfrei betrachtet und auf eine örtliche Differenzierung der Eigenschaften des Bioreaktionssystems verzichtet. Im Gegensatz dazu berücksichtigen strukturierte Modelle einzelne enzymatische Reaktionen innerhalb des Stoffwechsels der Zelle und erfassen neben der Produktkonzentration auch die Konzentration von Edukten und intermediären Produkten. Strukturierte Modelle sind den unstrukturierten in Bezug auf eine möglichst wirklichkeitsnahe Abbildung der Reaktionsvorgänge überlegen. Sie erfordern jedoch detaillierte Kenntnisse über die Regulationsmechanismen des mikrobiellen Stoffwechsels und einen hohen Input von Informationen über den Zustand des Bioreaktionssystems für die Simulation.

#### 2.4.2 Logistisches Wachstum

Das Wachstum einer Mikroorganismenkultur, d. h. die zeitliche Veränderung ihrer Biomassekonzentration, kann mit der so genannten logistischen Gleichung dargestellt werden [183]. Diese Wachstumsbeziehung ist ein autonomes Zeitgesetz und beschreibt das Wachstum  $R_x(t)$  in Abhängigkeit von der Biomassekonzentration  $c_x(t)$ . Die logistische Gleichung entspricht der Modellvorstellung eines autolimitierten Wachstums und ist besonders dann geeignet, wenn das Wachstum unabhängig vom gemessenen Substratabbau erfolgt bzw. die Steuerungsmechanismen des Biomassewachstums unbekannt sind [224, S. 103; 145, S. 337]. Die logistische Gleichung bietet sich darüber hinaus zur Glättung von Messwerten für die Biomasse an und geht auf Verhulst [218], McKendrick und Pai [140] zurück.

Der formalkinetische Zusammenhang für das logistische Wachstum lautet:

$$R_x(t) = \frac{dc_x(t)}{dt} = \mu_{max} \cdot c_x(t) \cdot \left( 1 - \frac{c_x(t)}{c_{x,max}} \right) \quad (2.23)$$

Der Parameter  $\mu_{max}$  ist die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit des jeweiligen Mikroorganismusses. Das logistische Wachstum geht nach der exponentiellen Phase in die stationäre Phase über, in der sich die Biomassekonzentration asymptotisch dem Maximalwert  $c_{x,max}$  nähert (vgl. Bild 2.9).

Durch Umformung der Gleichung (2.23) erhält man einen Ausdruck für die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu$ :

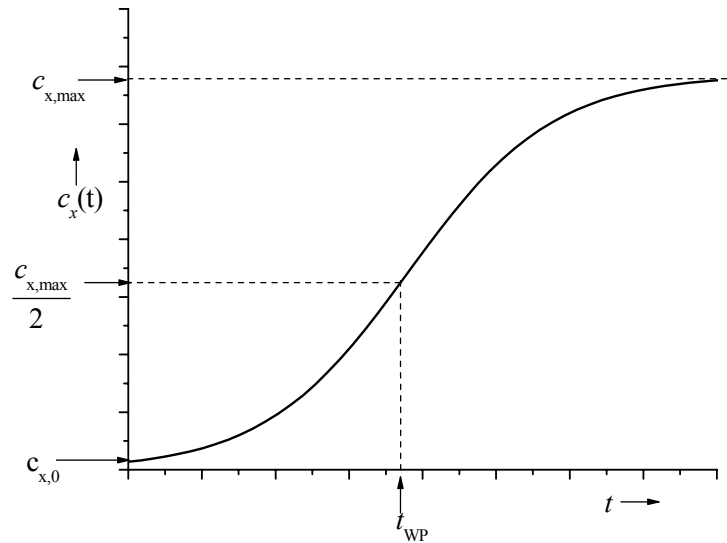
$$\frac{R_x(t)}{c_x(t)} = \mu(t) = \mu_{max} \cdot \left(1 - \frac{c_x(t)}{c_{x,max}}\right) \quad (2.24)$$

Demzufolge basiert die logistische Gleichung auf der Annahme, dass die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu$  linear mit der Biomasse abnimmt.

Durch Integration von Gleichung (2.23) ergibt sich das Zeitgesetz der logistischen Gleichung:

$$\int_0^t \mu_{max} \cdot c_x(t) \cdot \left(1 - \frac{c_x(t)}{c_{x,max}}\right) dt = c_x(t) = \frac{c_{x,max}}{1 + \left(\frac{c_{x,max}}{c_{x,0}} - 1\right) \cdot e^{-\mu_{max} \cdot t}} \quad (2.25)$$

Diese Form der logistischen Gleichung bietet sich zur Anpassung an experimentelle Wachstumsverläufe durch Optimierung der Parameter  $c_{x,max}$ ,  $c_{x,0}$  und  $\mu_{max}$  mittels nicht linearer Regression an [224, S. 107]. Der Parameter  $c_{x,0}$  stellt die Biomassekonzentration zu Beginn der Fermentation dar und ist somit ein Schätzwert für das Inokulum. Bild 2.9 zeigt die logistische Kurve in allgemeiner Form mit den Parametern  $c_{x,0}$  und  $c_{x,max}$ . Am Wendepunkt beträgt die Biomassekonzentration 50 % der maximalen Biomasse  $c_{x,max}$ . Die logistische Kurve ist also gegenüber ihrem Wendepunkt symmetrisch. Die Wachstumsgeschwindigkeit  $R_x$  erreicht im Wendepunkt ihr Maximum, wohingegen die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu$  zum Zeitpunkt  $t=0$  maximal ist.



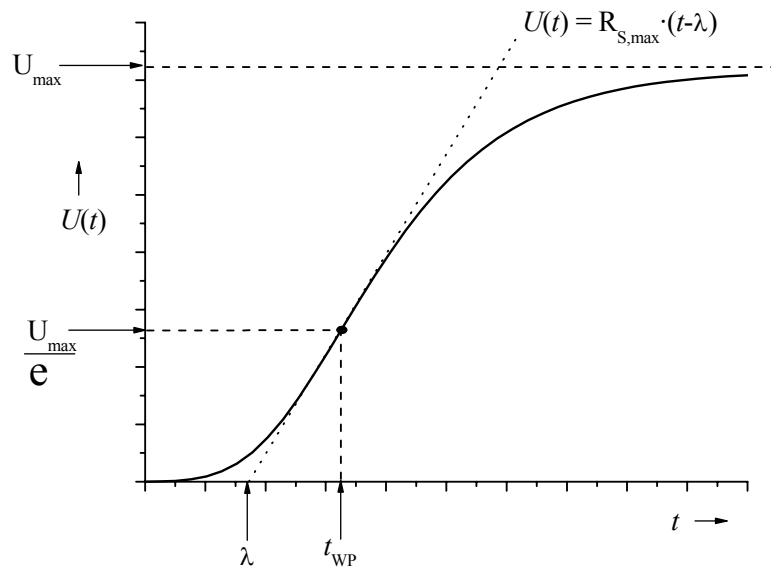
**Bild 2.9:** Allgemeine Darstellung der logistischen Wachstumskurve

### 2.4.3 Gompertz-Gleichung

Die Gompertz-Gleichung eignet sich im Gegensatz zur logistischen Gleichung zur mathematischen Beschreibung sigmoider Zeitreihen, welche asymmetrisch gegenüber ihrem Wendepunkt sind [74]. Bei der Gompertz-Kurve fällt die Periode zunehmender Steigung kürzer aus als die Periode abnehmender Steigung [219]. In der Mikrobiologie wird die Gompertz-Gleichung zur Modellierung solcher, asymmetrischer Verläufe des Wachstums, des Substratabbaus und damit verbundener Vorgänge verwendet [219, 106, 122, 125, 230, 3, 217, 36]. ZWIETERING et al. [230] gelang eine für die Mikrobiologie äußerst nützliche Umformung der ursprünglichen Gompertz-Gleichung mit biologisch interpretierbaren Parametern. Danach hat die Gompertz-Gleichung für den Glucoseverbrauch folgende Form:

$$U(t) = U_{max} \cdot e^{-e^{\left( R_{S,max} \cdot e^{-\frac{1}{U_{max}} \cdot (\lambda - t) + 1} \right)}} \quad (2.26)$$

Dabei ist  $U_{max}$  der maximale Glucoseverbrauch in g/l,  $R_{S,max}$  die maximale Glucoseverbrauchsgeschwindigkeit,  $\lambda$  die lag-Zeit in h und  $t$  die Fermentationszeit in h. Bild 2.10 zeigt den Verlauf der Gompertz-Kurve und veranschaulicht die Parameter der Gompertz-Gleichung.



**Bild 2.10:** Allgemeine Darstellung einer Gompertz-Kurve für den Glucoseverbrauch

Für die Zeit des Wendepunktes der Gompertz-Kurve  $t_{WP}$  gilt:

$$t_{WP} = \lambda + \frac{U_{max}}{R_{S,max} \cdot e} \quad (2.27)$$

Der Glucoseverbrauch im Wendepunkt beträgt

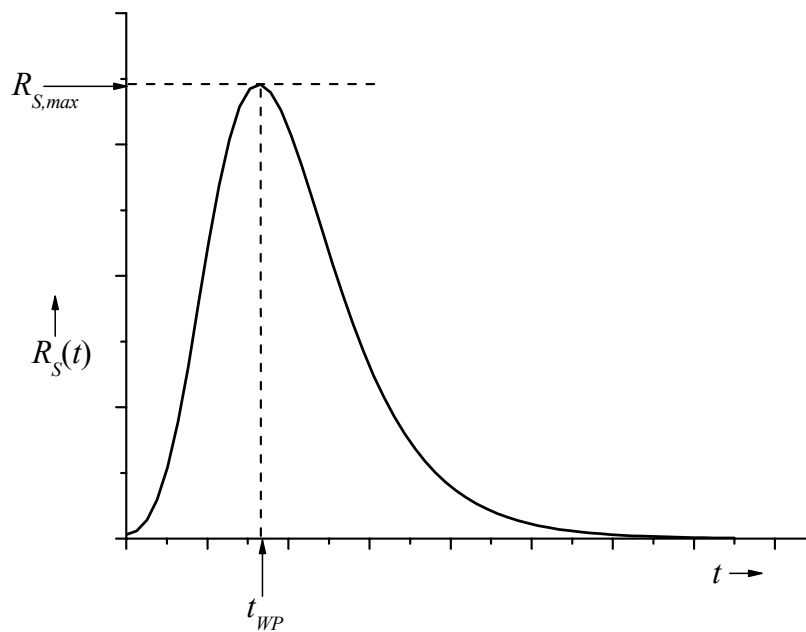
$$U(t_{WP}) = \frac{U_{max}}{e}, \quad (2.28)$$

sodass dieser im Wendepunkt der Gompertz-Kurve stets 36,8 % des maximalen Glucoseverbrauchs beträgt. Diese Gesetzmäßigkeit ist die Auswirkung der o. g. Asymmetrie der Gompertz-Kinetik und beruht darauf, dass bei der Gompertz-Gleichung von einer exponentiellen Abnahme der spezifischen Stoffänderungsgeschwindigkeit im Zeitverlauf ausgegangen wird.

Die Gleichung für die Glucoseverbrauchsgeschwindigkeit ergibt sich definitionsgemäß aus der ersten Ableitung der Gompertz-Gleichung für den Glucoseverbrauch:

$$\frac{dU(t)}{dt} = R_S(t) = U(t) \cdot \frac{R_{S,max} \cdot e}{U_{max}} \cdot e^{\left(\frac{R_{S,max} \cdot e}{U_{max}} \cdot (\lambda - t) + 1\right)} \quad (2.29)$$

In Bild 2.11 ist der allgemeine Verlauf der Glucoseverbrauchsgeschwindigkeit, d. h. der ersten Ableitung der Gompertz-Gleichung, dargestellt.



**Bild 2.11:** Allgemeine Darstellung der ersten Ableitung der Gompertz-Kurve für den Glucoseverbrauch

#### 2.4.4 Produktbildung

Mikroorganismen bilden ihre Stoffwechselprodukte in verschiedenen Stoffwechsel- und Wachstumsphasen. Deshalb gibt es für die Produktbildung keine allgemein gültigen Modelle. Nach einem Vorschlag von GADEN [77] werden die wichtigsten Fermentationsprodukte in drei Kategorien eingeteilt:

1. primäre Stoffwechselprodukte
2. indirekte Stoffwechselprodukte
3. sekundäre Stoffwechselprodukte

Um mathematische Gleichungen zur Beschreibung der Produktbildung formulieren zu können, muss die Einflussgröße bekannt sein, welche die Produktbildung direkt kontrolliert. In vielen Fällen ist der Verbrauch der Kohlenstoffquelle die dazu geeignete Größe [208, S. 362]. Darüber hinaus gibt es sekundäre Einflussgrößen bei der Produktbildung wie z. B. die Akkumulation von Hemmstoffen. GADEN [77] teilt den Zusammenhang von Produktbildung und Substratverbrauch in drei Klassen ein:

- Typ I: Die Produktbildung ist direkt vom Substratabbau abhängig und diesem weitgehend proportional. Das Produkt ist das Ergebnis des primären Energiestoffwechsels durch di-

rekte Umsetzung des Substrates. Die Reaktionsgeschwindigkeiten  $R_x$ ,  $R_S$ , und  $R_P$  zeigen im Zeitverlauf jeweils ein Maximum. Die Lage der Maxima sind nahezu gleich.

- Typ II: Die Produktbildung ist indirekt vom Substratabbau abhängig. Das Produkt entsteht indirekt aus dem primären Energiestoffwechsel. Die Reaktionsgeschwindigkeiten  $R_x$ ,  $R_S$ , und  $R_P$  durchlaufen zeitlich unterschiedliche und u. U. mehrere Maxima.
- Typ III: Die Produktbildung ist vom Substratabbau unabhängig. Diese Gruppe betrifft die Synthese komplexer Produkte wie z. B. Antibiotika oder Vitamine. Die Reaktionsgeschwindigkeiten  $R_x$  und  $R_S$  durchlaufen ein Maximum in der Wachstumsphase. Die Produktbildungsgeschwindigkeit  $R_P$  erreicht ihr Maximum in einer vom Wachstum entkoppelten Produktionsphase.

Auf dieser Einteilung der Produktbildungstypen beruht eine kinetische Klassifizierung, die wiederum auf einfachen, in der Praxis bewährten formalkinetischen Modellen basiert. Jeder Produktbildungstyp ist wie folgt mit einem formalkinetischen Zusammenhang verknüpft:

$$\text{Typ I: abhängig vom Substratabbau} \quad R_P(t) = Y \cdot R_S(t) \quad (2.30)$$

$$\text{Typ II: gemischte Kinetik} \quad R_P(t) = Y \cdot R_S(t) + \chi \cdot c_x(t) \quad (2.31)$$

$$\text{Typ III: unabhängig vom Substratabbau} \quad R_P(t) = \chi \cdot c_x(t) \quad (2.32)$$

#### 2.4.5 Produktinhibierung

Produkte, die eine ausreichend hohe Konzentration in der Fermentationsbrühe erreichen, können ihre eigene Bildung hemmen und u. U. gänzlich zum Erliegen bringen. Die Produktinhibierung kann innerhalb eines Bioprozessmodells durch die Einführung eines Produktinhibitionsterms in die formalkinetische Gleichung für die Produktbildung berücksichtigt werden. Unter der Annahme einer linearen Inhibitionskinetik ergibt sich somit für die gehemmte Produktbildung [197, S. 28]:

$$R_P(t) = \left(1 - \frac{c_P(t)}{I_P}\right) \cdot (Y \cdot R_S(t) + \chi \cdot c_x(t)) \quad (2.33)$$

Hierbei bedeutet  $I_P$  die maximal erreichbare Produktkonzentration in der Fermentationsbrühe.



### 3 Ziel der Arbeit

Entgegen des in der Literatur aufgezeigten hohen Potenzials und der vielfältigen Möglichkeiten der Nutzung von Schimmelpilzen, Hefen und Bakterien zur biotechnologischen Gewinnung natürlicher Aromastoffe beschränkt sich deren Anwendung zur Aromabiosynthese bisher überwiegend auf die Untersuchung ihres Stoffwechsels im Labormaßstab [127, 14, 20, 29, 222, 40, 104, 25, 28]. Die entscheidende Voraussetzung für die angestrebte industrielle Anwendung biotechnologischer Aromastoffsynthesen ist deren Wirtschaftlichkeit [193, 127, 134]. Die mikrobielle Bildung von Aromastoffen ist jedoch häufig durch geringe Produktkonzentrationen und damit verbunden geringe Raum-Zeit-Ausbeuten gekennzeichnet [29]. Die Ursache dafür ist häufig eine Inhibierung der Produktsynthese durch die Anwesenheit der gebildeten Aromastoffe selbst [41; 137, 192; 20; 120; 189; 53; 113; S. 2-3]. Die Produktinhibierung kann bioprozesstechnisch durch eine In-situ-Produktabtrennung aus dem Bioreaktor umgangen werden [75]. Zu diesem Zweck ist die organophile Pervaporation als Trennprozess geeignet [13, 11, 188, 75, 129, 22, 187, 29, 156, 112, 186, 185, 206, 205, 204, 228]. Im Gegensatz zur Produktabtrennung im Downstream Processing muss die Pervaporation für eine In-situ-Produktabtrennung unmittelbar mit der Fermentation verknüpft werden, um eine zeitgleiche Wirksamkeit beider Teilprozesse zu erreichen. Dies wird in der vorliegenden Arbeit durch die Integration der Pervaporation in den Bioreaktor realisiert und als Pervaporation-Bio-Hybridreaktor bezeichnet.

In diesem Pervaporation-Bio-Hybridprozess wird der Verfahrensschritt der Produktabtrennung vom Downstream Processing zeitlich und örtlich in Richtung Upstream verlagert und mit dem Fermentationsprozess verschmolzen. Eine Neuordnung der Teilprozesse im Ablauf des biotechnologischen Gesamtverfahrens ist die Folge. Dabei sind die entsprechenden prozessrelevanten Konzentrationsänderungen nicht mehr nur den Einzelprozessen zuzuordnen, sondern wirken wechselseitig aufeinander ein und führen auf diese Weise zu einem qualitativ und quantitativ neuen Ergebnis des Gesamt- bzw. Hybridprozesses. Hieraus resultiert ein komplexes Prozessverhalten des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors, das nicht auf Erfahrungswerte über die Einzelprozesse zurückgeführt werden kann. Beispielsweise wird die Fermentationskinetik durch die Produktabtrennung und diese wiederum durch Veränderungen der Fermentation beeinflusst. Darüber hinaus wirken bisher den Einzelprozessen zugeordnete Parameter im Pervaporation-Bio-Hybridprozess auf beide Teilprozesse gemeinsam ein, sodass deren optimale Einstellung unter Berücksichtigung des Gesamtprozesses erfolgen muss.

Als Voraussetzung für eine wirtschaftliche bzw. industrielle Nutzung des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses ist es daher von essenzieller Wichtigkeit, detaillierte Kenntnisse des Prozessverhaltens für eine optimale Reaktorauslegung und Prozessführung zu erlangen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, eine umfassende bioprozesstechnische Charakterisierung des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors unter besonderer Berücksichtigung der wechselseitigen Beeinflussung der Kinetik der Fermentation und der Pervaporation zu leisten.

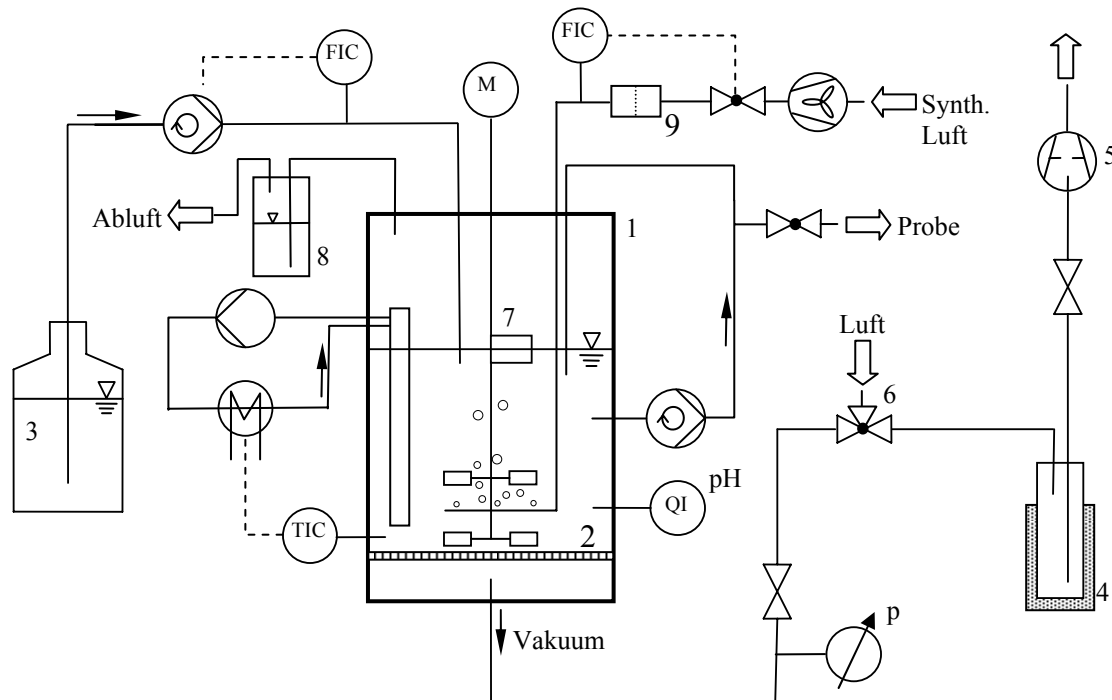
Dies geschieht am Beispiel der Synthese eines Bananenaromas unter Nutzung des Schimmelpilzes *Ceratocystis fimbriata* in Submerskultur. Die Prozesscharakterisierung schließt vergleichende Untersuchungen des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses und eines klassischen Submersprozesses ein. Dabei wird das Potenzial des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses zur Produktivitätssteigerung der Aromabiosynthese quantitativ erfasst und bewertet. Die gewonnenen Informationen zur Prozesscharakterisierung bilden zudem die Grundlage zur Entwicklung eines mathematischen Bioprozessmodells, welches die Simulation des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses unter Berücksichtigung der Güte des Produktaustrages ermöglichen soll.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Pervaporation-Bio-Hybridreaktor

Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit ist der in Bild 4.1 dargestellte Pervaporation-Bio-Hybridreaktor.



**Bild 4.1:** Verfahrensschema des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors; (1) Bioreaktor (1,5 - 2 l), (2) Pervaporationsmembran, (3) Feedtank (1 l), (4) Kühlfalle (Kühlmittel: flüssiger Stickstoff), (5) Vakuumpumpe, (6) Belüftungsventil, (7) Immersionsrührer, (8) Kontaminationssperre (16 % HCl), (9) Zuluftsterilfilter

Im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor ist der Bioreaktor mit dem Membrantrennverfahren Pervaporation verknüpft, indem der Kesselboden des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors als Flachmembranmodul ausgeführt ist. Auf diese Weise wird die Pervaporationsmembran direkt in den Bioreaktor integriert. Diese Konstruktion ermöglicht den unmittelbaren Kontakt der Fermentationsbrühe mit der Membran im Bioreaktor, sodass eine gesonderte Förderung der Fermentationsbrühe wie bei einem extern angeordneten Membranmodul entfällt.

Der Pervaporation-Bio-Hybridreaktor kann mit einem Fermentationsvolumen von 1 bis 2 Liter betrieben werden. Der Durchmesser des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors beträgt 12,5 cm. Die Pervaporationsmembran hat nach ihrer Aufnahme in das Flachmembranmodul eine wirksame Fläche von 117 cm<sup>2</sup>. Zur Regelung des Fermentationsprozesses können die Parameter Temperatur, Belüftung, Rührerdrehzahl und Zufütterung über eine externe Steue-

rungseinheit eingestellt werden. Durch eine in den Fermenter integrierte pH-Elektrode wird der pH-Wert der Fermentationsbrühe kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet.

Der durch die Belüftung der Fermentationsbrühe entstehende Abluftstrom verlässt den Bioreaktor durch eine Öffnung im Edelstahldeckel und wird zur Vermeidung einer Kontamination des Fermenters mit Mikroorganismen aus der Umgebung durch ein Salzsäurebad (16 % HCl) geführt.

Zur Dokumentation des Fermentationsverlaufes kann über eine gesonderte Leitungsschleife und mittels einer Schlauchpumpe eine Probe der Fermentationsbrühe entnommen werden.

Für einen effizienten Stofftransport bei der Pervaporation ist eine turbulente Überströmung der Membran erforderlich. Dies gewährleistet im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor das in einem Abstand von 0,5 cm über der Membranoberfläche installierte Fermenterrührwerk. Das Fermenterrührwerk besteht aus zwei 6-Blatt-Scheibenrührern, die in einem Abstand von 6 cm an der Rührerwelle angebracht sind. Die beiden Rührer haben einen Durchmesser von 5,2 cm. Die Möglichkeit eines effizienten Leistungseintrages ist mit der Bewehrung des Rührkessels durch die Einbauten zur Prozesssteuerung und Probenahme gegeben. In Höhe der Grenzfläche Fermentationsbrühe/Kopfraum befindet sich ein zusätzlicher Blattrührer. Dieser Rührer sorgt für die ständige Immersion der Schimmelpilzhyphen von der Oberfläche in die Fermentationsbrühe und verhindert auf diese Weise einen zusammenhängenden, dichten Bewuchs der Flüssigkeitsoberfläche. Ein solches Emerswachstum ist unerwünscht, da die Biomasse dann nicht optimal am Stoffaustausch teilnehmen kann.

Die Pervaporationseinheit des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors besteht aus einer Membranzelle, einer Kühlfalle und einer Drehschieber-Vakuumpumpe. Letztere erzeugt das für den Pervaporationsprozess erforderliche Vakuum im Permeatraum. Der permeatseitige Druck beträgt dabei stets weniger als 5 mbar. Die Kühlfalle zur Kondensation des Permeats arbeitet mit flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zwei Absperrhähne und ein Dreiwegehahn in der Permeatleitung ermöglichen die Belüftung der Kühlfalle zum Auflösen des Vakuums für die Probenahme. Ein Druckmessgerät zeigt kontinuierlich den Druck in der Permeatleitung an. Damit kann das permeatseitige Leitungssystem auf ein ausreichendes Vakuum und eventuelle Undichtigkeiten hin überprüft werden.

Der Stofftransport bei der Pervaporation erfordert Energie, insbesondere da er mit einem Phasenwechsel von flüssig nach gasförmig einhergeht. Diese Energie wird der Fermentationsbrühe über die Membran entzogen. Die dabei entzogene Wärmemenge  $Q$  ist die Summe aus der Verdampfungsenthalpie  $\Delta H_{\text{verd}}$  und der Expansionsarbeit im Vakuum  $w_{\text{exp}}$  aller ins Permeat übergehenden Substanzen. Diese Wärmemenge wird in der Kühlfalle an das Kühlmittel wieder abgegeben. Durch den Wärmeentzug wird die Fermentationsbrühe gekühlt.

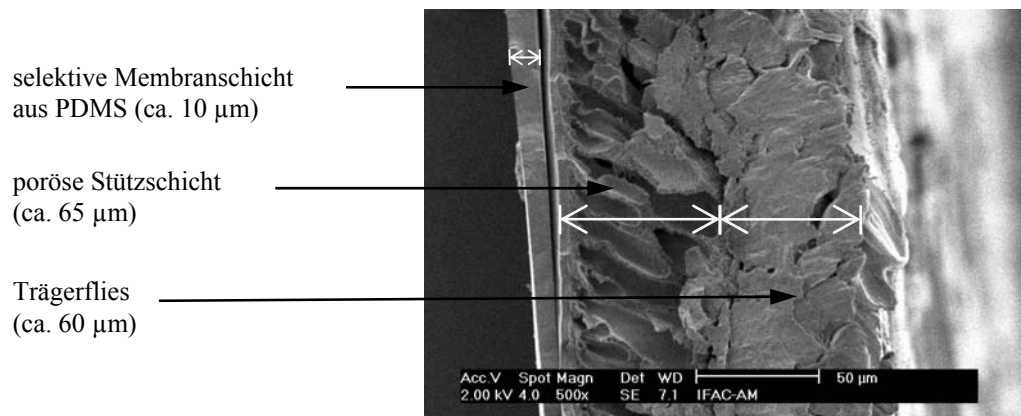
Dieses Wärmedefizit wird durch die Reaktorheizung sowie zu einem geringen Anteil durch die im Bioreaktor anfallende Reaktionswärme unter Konstanthaltung der Fermentationstemperatur ausgeglichen. Demzufolge nutzt die Pervaporation die Abwärme des Bioreaktors. Darüber hinaus ist eine Rückgewinnung der Wärme im Kondensator möglich. Tabelle 4.1 enthält die Komponenten des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors und ihre Hersteller.

**Tabelle 4.1: Komponenten des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors**

Komponente	Hersteller	Spezifikation
Einwandiger 2-l-Bioreaktor aus Glas mit Edelstahldeckel und Einbauten	B. BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL, Melsungen	Baureihe BIOSTAT A
Versorgungseinheit für die Belüftung, Zufütterung und Temperierung mit digitalem Mess- und Regelsystem DCU	B. BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL, Melsungen	Baureihe BIOSTAT ED
Drehzahlregeleinheit MCU-200 und Rührermotor	B. BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL, Melsungen	Baureihe BIOSTAT A
Temperatursensor	B. BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL, Melsungen	Baureihe BIOSTAT A
pH-Elektrode	METTLER-TOLEDO, Gießen	405-DPAS-SC-K8S/200 combi pH
Zuluftsterilfilter	SARTORIUS WERKE GmbH, Göttingen	Membranfilter 0,2 µm
Schlauchpumpe zur Probenahme	JANKE & KUNKEL IKA-Labortechnik, Staufen	PA-SF
Edelstahlzelle zur Aufnahme der Membran	GFT DEUTSCHE CARBONE/SULZER CHEMTECH, Neunkirchen	
Verbindung der Membranzelle mit dem Bioreaktor	Eigenbau bzw. -umbau des Instituts für Lebensmitteltechnologie der Universität Bonn	
Kühlfalle	KGW Isotherm, Karlsruhe	
Vakuumpumpe	RUDOLF BRAND, Wertheim/Main	VACUUBRAND RD4
Druckmessgerät	SASKIA HOCHVAKUUM & LABORTECHNIK, Ilmenau	LABOVAC PIZA 100

#### 4.1.2 Pervaporationsmembran

Bei der Pervaporation wurde mit einer Flachmembran des Typs CMX-GF-010-D der Firma CM-CELFA MEMBRANTECHNIK, Seewen, Schweiz gearbeitet. Die selektive Membranschicht besteht aus Polydimethylsiloxan (PDMS). Diese Membran ist eine Kompositmembran, d. h. die selektive Membranschicht aus PDMS ist zur Erlangung einer für die Anwendung ausreichenden mechanischen Festigkeit auf Trägerschichten aufgebracht. Bild 4.2 zeigt den Aufbau der Kompositmembran anhand einer Rasterelektronenmikroskopie ihrer Schnittfläche. Die PDMS-Membran zeigt hohe Selektivitäten gegenüber flüchtigen organischen Verbindungen wie z. B. Aromastoffen und ist sehr preisgünstig in der Herstellung.



**Bild 4.2:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der PDMS-Membran mit Ansicht der Schnittfläche

### 4.1.3 Biokatalysator

Als Modellorganismus für die Untersuchung des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses wurde der Schimmelpilz *Ceratocystis fimbriata*<sup>LBT312</sup> verwendet. Der Stamm LBT 312 ist ein Eigenisolat innerhalb der Stammsammlung des Instituts für Lebensmitteltechnologie. Tabelle 4.2 enthält die genaue Taxonomie der Gattung *Ceratocystis*.

**Tabelle 4.2:** Taxonomie der Gattung *Ceratocystis* [8]

Einheit	Bezeichnung
Klasse	Ascomycotina
Unterklasse	Pyrenomycetes
Ordnung	Sphaeriales
Familie	Ophiostomataceae
Gattung	<i>Ceratocystis</i>
Sektion	<i>Ceratocystis</i>

Der hier als Biokatalysator verwendete Schimmelpilz ist in der Phytomedizin als Holzschädling bekannt. *Ceratocystis fimbriata* bzw. *Ceratocystis fimbriata f. platani* verursacht eine Baumkrankheit, den Platanenkrebs [226]. Der Schimmelpilz verbreitet sich u. a. über Insekten. Beispielsweise lockt *Ceratocystis fagacearum*, der Erreger der Eichenwelke, durch den aromatisch fruchtigen Geruch von gebildetem Essigsäure-3-methylbutylester (Synonyme: Isopentylacetat, Isoamylacetat, 3-methylbutylacetat) Baumwunden aufsuchende Insekten an, die zur Verbreitung der Sporen beitragen [8]. Auch *Ceratocystis fimbriata* ist zur Synthese dieses Esters, der die Schlüsselverbindung des Bananenaromas darstellt, befähigt. Darüber hinaus werden noch weitere Aromastoffe gebildet, die zum Gesamteindruck des Aromas beitragen. Das von *Ceratocystis fimbriata* gebildete Komplexaroma setzt sich hauptsächlich aus Estern und Alkoholen zusammen. Neben der Schlüsselverbindung sind weitere Aroma-

stoffe wie z. B. Isobutylacetat und Isoamylalkohol für den Gesamteindruck verantwortlich [43, 42, 71, 35]. Bei der Kultivierung dieses Schimmelpilzes ist der angenehme, fruchtige Geruch deutlich wahrnehmbar. Tabelle 4.3 nennt wichtige aromawirksame Stoffwechselprodukte von *Ceratocystis fimbriata* einschließlich ihrer geruchlichen Ausprägung in verdünnter wässriger Lösung.

**Tabelle 4.3:** Wichtige von *Ceratocystis fimbriata* gebildete Aromastoffe [44; 42; 70, S. 31; 205]

Aromastoff	Geruchliche Ausprägung
Ethanol	alkoholisch, reife Frucht
Ethylacetat	stechend, ätherisch, Ananas, Weinbrand
Ethylbutyrat	fruchtig, butterig, süß, ätherisch, Banane-Ananas-Unterton
Isobutylalkohol	stechend, weinähnlich, Whiskey
Isobutylacetat	süß, fruchtig, ätherisch, Apfel-Banane, Ananas
Isoamylalkohol	Fuselöl, Whiskey
Isoamylacetat	fruchtig, Banane, süß, duftend, reife Frucht
Propylacetat	mild fruchtig, Birne, ätherisch

#### 4.1.4 Weitere Geräte

##### Autoklaven

- Sanoclav M-ECZ der Firma WOLF, Geislingen.
- Varioklav E der Firma H+P LABORTECHNIK, Oberschleißheim.

##### Brutschrank

- Schüttelinkubator GFL-3033 der Firma GESELLSCHAFT FÜR LABORTECHNIK mbH GFL, Burgwedel.
- Universalschrank UM-SM-BM 100-800 bzw. Universalschrank ULM-SLM 400-800 der Firma MEMMERT GmbH u. Co. KG, Schwabach.

**Gaschromatograph**

GC 6890N der Firma AGILENT TECHNOLOGIES, Böblingen.

- *Kapillarsäule:*  
Innowax 19091N-233 der Firma AGILENT TECHNOLOGIES, Böblingen  
(Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,50 µm).
- *Detektor:*  
Flammen-Ionisations-Detektor FID.
- *Automatischer Probengeber:*  
Combi PAL System der Firma CTC ANALYTICS AG, Zwingen, Schweiz.  
*Software:*  
GC Chem. Station Rev. A09.011206 und Cycle Composer 1.5.0 der Firma AGILENT TECHNOLOGIES, Böblingen.

**Impfbank**

Antair ZKB 4 der Firma STERIL S.P.A.

**Lichtmikroskop**

Diaplan-Mikroskop 020-437.035 der Firma ERNST LEITZ GmbH, Wetzlar.

**Membranfilter**

ME 25, 0,45 µm der Firma SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel.

**pH-Meter**

pH 537 der Firma WTW Weilheim.

**Photometer**

UV/VIS Spectrophotometer, Lambda 2 der Firma PERKIN-ELMER, Rodgau-Jügesheim.

**Präzisionswaage**

Waage 2842 der Firma SARTORIUS WERKE GmbH, Göttingen.

**Rasterelektronenmikroskop**

- *Mikroskop*  
XL 20 der Firma PHILIPS.
- *Sputter Coater*  
MED 020 der Firma BAL-TEC.



**Schüttelmaschine**

RO 10 der Firma C. GERHARDT, Königswinter.

**Trockenschrank**

T 5042 E der Firma HERAEUS, Hanau.

**Zentrifuge**

Labofuge 1 der Firma HERAEUS, Hanau.

**4.1.5 Substrate und Nährmedienbestandteile**

Als Substrate für die Kultivierung des Schimmelpilzes wurden die Kohlenstoffquellen Glucose und Malzextrakt sowie die Stickstoffquelle Pepton verwendet. Glucose wurde als Hauptquelle für Kohlenstoff ausgewählt, da sie zu den für Schimmelpilze am häufigsten nutzbaren Zuckern zählt [84, S. 134 f.]. Vorversuche mit Glucose als Kohlenstoffquelle ergaben gute Ergebnisse für die Produktbildung durch *Ceratocystis fimbriata*. Neben den genannten Substraten wurden zur Herstellung der Medien für die Submerskultivierung sowie für die Stammhaltung des Schimmelpilzes *Ceratocystis fimbriata* die in Tabelle 4.1 gelisteten Substanzen eingesetzt.

**Tabelle 4.1: Nährmedienbestandteile**

Substanz	Hersteller	Spezifikation
D-(+)-Glucose-Monohydrat	FLUKA	Pulver, > 99 %
Malzextrakt	EXTRAKT CHEMIE, DR. BRUNO STELLMACH GmbH & Co KG	Pulver, SP-1811/03, Extrakt aus 100 % gemälztem Gerstenkorn
Fleischpepton	C. E. ROEPER GmbH	Pulver, pankreatisch verdaut, Type 2/700.086
Agar Agar	MERCK	Pulver
Salzsäure	MERCK	HCl rein, 32 %
Chloramphenicol	FLUKA	Pulver, Antibiotikum
Aqua dest.	ILT	

Das getrocknete Malzextrakt enthält alle wasserlöslichen und durch Einwirkung der körnigen Enzyme gelösten Inhaltsstoffe des gemälzten Gerstenkorns. Es handelt sich dabei um ein bräunlich feines, homogenes Pulver mit amorpher Beschaffenheit und ausgeprägt süß malzigem organoleptischem Eindruck. Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über die durchschnittliche Zusammensetzung des Malzextraktes.

**Tabelle 4.2: Durchschnittswerte der Analyse der Zusammensetzung von Malzextrakt [65]**

<b>Bestandteil</b>	<b>Anteil</b>
Protein	5,0 %
Fett	0,0 %
Glucose	7,6 %
Fructose	0,7 %
Saccharose	4,9 %
Maltose	32,6 %
Maltotriose	7,7 %
Dextrine	34,4 %
Organische Säuren	1,1 %
Mineralstoffe	2,0 %
Feuchtigkeit	4,0 %

In Tabelle 4.3 sind chemische Parameter zur Zusammensetzung des pankreatischen Fleischpeptons aufgeführt.

**Tabelle 4.3: Chemische Parameter von Fleischpepton [37]**

<b>Chemischer Parameter</b>	
Nitrit-Test	negativ
Stickstoff total (Kjeldahl)	12,4 %
Amino-Stickstoff	4,9 %
Chloride (als NaCl)	1,4 %
Sulfatasche	10,5 %

Die natürlichen Substrate Malzextrakt und Pepton enthalten – über die in Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3 aufgeführten Komponenten hinaus – in ausreichenden Mengen die für das Wachstum des Schimmelpilzes erforderlichen essenziellen Nährstoffe wie Spurenelemente, Vitamine und Aminosäuren etc. Im Folgenden wird die quantitative Zusammensetzung der Nährmedien aufgeführt:

#### **Malzextrakt-Agar (MEA) für die Stammhaltung:**

20,0 g Malzextrakt,

2,0 g Pepton,

20,0 g Agar,

ad 1,0 Liter Aqua dest.,

pH-Wert 5,5-5,8.

**Nährmedium für die Submerskultivierung (Fermentation und Vorkultur):**

40,0 g Glucose,  
 20,0 g Malzextrakt,  
 4,0 g Pepton,  
 400 mg Chloramphenicol,  
 ad 1,0 Liter Aqua dest.,  
 Einstellung des pH-Werts auf 5 (mit HCl).

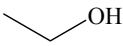
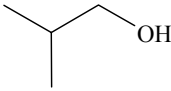
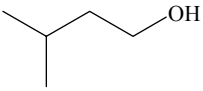
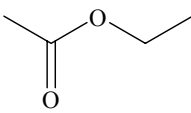
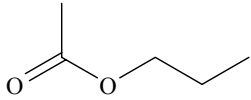
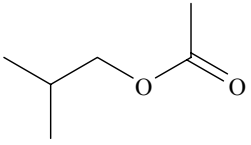
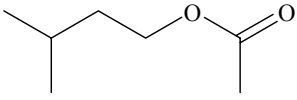
**Glucoselösung für den Fed-Batch-Betrieb:**

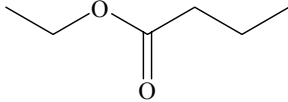
400,0 g Glucose,  
 ad 1 Liter Aqua dest.

**4.1.6 Weitere Chemikalien**

Für die quantitative Kalibrierung der gaschromatographischen Analyse wurden die Aromastoffe in chemisch synthetisierter Reinform verwendet. Tabelle 4.4 nennt den Reinheitsgrad sowie den Hersteller der verwendeten Substanzen und zeigt ihre Strukturformeln.

**Tabelle 4.4: Aromastoffe**

Substanz; Reinheitsgrad; Hersteller	Strukturformel
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O); z. A., > 99,8 %; MERCK	
Isobutanol (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O); z. A., > 99 %; MERCK	
Isoamylalkohol (C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O); z. A., > 99 %; MERCK	
Ethylacetat (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ); z. A., > 99,5 %; MERCK	
Propylacetat (C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> ); z. S., > 98 %; MERCK	
Isobutylacetat (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> ); > 99 %; FLUKA	
Isoamylacetat (C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> ); z. S., > 99 %; MERCK	

Substanz; Reinheitsgrad; Hersteller	Strukturformel
Ethylbutyrat (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> ); z. S., > 98 %; MERCK	

### Enzymatisches Testkit für die Glucosebestimmung

UV-Test D-Glucose/D-Fructose Nr. 0 139 106 der Firma BOEHRINGER MANNHEIM/R-BIOPHARM.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Sterilisation

Die Nährmedien und die Geräte für die Mikrobiologie wurden zur Sterilisation für eine Dauer von 15 Minuten und der Pervaporation-Bio-Hybridreaktor für eine Dauer von 30 Minuten bei einer Temperatur von 125 °C autoklaviert. Während des Autoklavierens wurde eine den Reaktor verlassende Leitung offen gelassen und mit einem Sterilfilter versehen. Alle anderen Leitungen blieben verschlossen. Auf diese Weise wurde ein Druckaufbau während des Erhitzens verhindert und ein Eindringen steriler Luft beim Abkühlen ermöglicht. Nach dem Autoklavieren wurden alle Geräte ausreichend abgekühlt, bevor sie mit Kulturmaterial in Berührung kamen.

### 4.2.2 Stammhaltung

Die Stammhaltung von *Ceratocystis fimbriata*<sup>LBT 312</sup> erfolgte auf Malzextrakt-Agarplatten. Die Kulturen lagerten im Kühlschrank bei einer Temperatur von 5 °C bis 8 °C. Die Stammkulturen wurden regelmäßig, spätestens alle vier Wochen, überimpft. Dazu wurde jeweils unter sterilen Bedingungen ein Agarwürfel mit Mycel und Sporen mit einer Kantenlänge von ungefähr 4 mm von einer bewachsenen auf eine neue Petrischale mit Malzextrakt-Agar überführt. Einmal im Jahr wurde eine Neuanzucht aus der bei einer Temperatur von -70 °C tiefgefrorenen Stammkultur des Instituts für Lebensmitteltechnologie der Universität Bonn vorgenommen.

### 4.2.3 Vorkulturen und Inokulation

Die Vorkulturen für die Fermentation im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor und im klassischen Submersreaktor wurden in einem Erlenmeyerkolben mit 100 ml Nährlösung bei einer Temperatur von 27 °C in einem Brutschrank über einen Zeitraum von 24 Stunden unter ständigem Schütteln angezogen. Die Erlenmeyerkolben wurden mit einer Sporensuspension beimpft und mit einem Wattestopfen und Aluminiumfolie verschlossen. Zur Sporenernte wurden vollständig bewachsene und sporulierte Agarplatten verwendet, die nicht älter als

sieben Tage waren. Die Sporenernte erfolgte über die Zugabe von 10 ml steriler, isotonischer Kochsalzlösung und anschließender Suspendierung der Sporen durch vorsichtiges Abschaben der Schimmelpilzoberfläche mit einer sterilen Impföse. Zur Inokulation wurde 1 ml dieser Sporensuspension unter sterilen Bedingungen in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml Nährlösung pipettiert.

Der Bioreaktor wurde beimpft, indem unter sterilen Bedingungen der Inhalt eines bebrüteten Erlenmeyerkolbens (Inoculum) durch eine Öffnung im Edelstahldeckel des Reaktors und mithilfe eines Trichters in die Nährlösung (1,5 Liter) überführt wurde.

#### 4.2.4 Pervaporation-Bio-Hybridprozess

Der Pervaporation-Bio-Hybridprozess wurde mit einem Fermentationsvolumen von 1,6 Litern (1,5 Liter Nährlösung und 0,1 Liter Inoculum) betrieben. Die Fermentationstemperatur betrug 27 °C. Schimmelpilze sind während ihres natürlichen Wachstums im Boden, auf Pflanzen oder Lebensmitteln oft schwankenden Temperaturen ausgesetzt. Sie können sich daher nur durchsetzen, wenn sie in einem weiten Temperaturbereich wachsen können [176, S. 48 f.]. Man bezeichnet diese Eigenschaft als Mesophilie. Für das Mycelwachstum liegt die Minimaltemperatur meist um 0 °C, die Optimaltemperatur bei 25 °C bis 35 °C und die Maximaltemperatur zwischen 30 °C und 40 °C [160]. In Vorversuchen wurde für die Produktbildung von *Ceratocystis fimbriata* eine Optimaltemperatur von 27 °C ermittelt. Im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor beeinflusst die Temperatur der Fermentationsbrühe nicht nur die mikrobielle Stoffumwandlung sondern auch den Pervaporationsprozess. Der Permeatfluss steigt mit zunehmender Temperatur, d. h. höhere Temperaturen führen zu einer verbesserten Trennleistung. Allerdings muss sich die Fermentationstemperatur in erster Linie nach den Erfordernissen des jeweiligen Biokatalysators richten, da die Produktbildung und damit die Produktausbeute stark temperaturabhängig ist. Folglich können die Temperatureffekte auf die Pervaporation bei der Suche nach einem Temperaturoptimum für den Pervaporation-Bio-Hybridprozess keine maßgebliche Berücksichtigung finden.

Das Nährmedium wurde vor dem Autoklavieren auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt. Schimmelpilze bevorzugen im Gegensatz zu Bakterien, von Ausnahmen wie den Milchsäurebakterien abgesehen, ein leicht saures Milieu mit einem optimalen pH-Wert um 5,0 [221]. In Vorversuchen dieser Arbeit wurde für den pH-Wert des Fermentationsmediums zu Beginn der Fermentation ein Optimalbereich von pH 4 bis pH 5 ermittelt. Für die Pervaporation ist ein pH-Wert möglichst nahe am Neutralpunkt (pH 7) günstig (s. Bild 5.4, S. 56). Aufgrund dessen und der Tatsache, dass der Schimmelpilz im Fermentationsverlauf seine Umgebung weiter ansäuert, wurde für den pH-Wert die obere Grenze des gemessenen Optimalbereiches eingestellt. Während der Fermentation fand keine Regelung des pH-Wertes statt. Seine zeitli-

che Veränderung durch die Ausscheidung von Metaboliten des Schimmelpilzes wurde mithilfe eines pH-Messgerätes aufgezeichnet.

Die Fermentationsbrühe wurde für den Sauerstoffeintrag mit synthetischer Luft begast. Die Fermentationsführung erfolgte unter mikroaeroben Verhältnissen, d. h. mit einer schwachen Belüftung von 0,04 vvm. Vorversuche ergaben hohe Produktbildungsraten in geschüttelten Erlenmeyerkolben. Der Sauerstoffeintrag in geschüttelten Erlenmeyerkolben ist im Vergleich zu direkt belüfteten und gerührten Fermentationsbrühen gering. Um einen vergleichbaren Sauerstoffeintrag und damit eine ebenfalls entsprechend gute Produktbildung zu erreichen, wurde die Fermentationsbrühe im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor mit dem geringen Volumenstrom von 0,04 vvm belüftet. Auf diese Weise konnte darüber hinaus der Verlust an Aromastoffen in den Kopfraum des Fermenters mit der Luftzufuhr minimiert werden.

Das Rührwerk des Bioreaktors arbeitete während der Fermentation bei einer Drehzahl von 150 Upm. Die Primäraufgaben eines Rührers in einem Bioreaktor sind

1. das Homogenisieren (d. h. das Durchmischen des Reaktorinhaltes zum Temperatur- und Konzentrationsausgleich),
2. das Suspendieren (d. h. die Gleichverteilung der Mikroorganismen) und
3. das Dispergieren (d. h. das Eintragen der Luft in die Fermentationsbrühe) [207, S. 28-40].

Im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor muss der Rührer darüber hinaus für eine turbulente Überströmung der Pervaporationsmembran sorgen. Ein turbulentes Strömungsregime verringert die negativen Effekte von Konzentrationspolarisationen an der Membran und führt somit zu höheren Flüssen bei der Pervaporation. Die Erfüllung der o.g. Aufgaben eines Rührers gelingt bei hohen Drehzahlen besonders gut. Allerdings lassen sich hohe Drehzahlen nicht immer mit der Physiologie des Schimmelpilzes in Einklang bringen. Die mechanischen Belastungen des Schimmelpilzes durch die Scherkräfte der Turbulenzwirbel in der Nähe des Rührers können zu Zellschädigungen bis hin zur Zerstörung der Zellen führen. Hingegen kann eine gewisse Scherbelastung bei der Submerskultivierung von Schimmelpilzen erwünscht sein: Schimmelpilzkulturen wachsen mycelartig zu immer größer werdenden Agglomeraten. Dabei besteht die Gefahr, dass das Innere dieser Zellverbände nicht mehr ausreichend am Stoffaustausch teilnehmen kann und so z. B. mit Substrat oder Sauerstoff unterversorgt ist. In diesen Fällen lässt sich über angemessene Scherbelastungen die Bildung gleichmäßig kleiner Pellets steuern und ein optimales Submerswachstum des Schimmelpilzes erzwingen. Aus den genannten Gründen darf die Rührerdrehzahl weder zu niedrig noch zu hoch sein. Vorversuche haben gezeigt, dass mit einer Rührerdrehzahl von 150 Upm eine ausreichende Trennleistung der Pervaporation sowie ein schnelles Submerswachstum des Schimmelpilzes in homogen kleinen Pellets sichergestellt ist.

Der Pervaporation-Bio-Hybridprozess wurde unter Zufütterung von Glucose im Fed-Batch-Betrieb geführt. Durch eine entsprechend angepasste Zufütterung wurde die Glucosekonzentration innerhalb eines Konzentrationsbereiches von mindestens 10 g/l und maximal 40 g/l eingestellt. Auf diese Weise wurden sowohl Glucoselimitierungen ( $< 10$  g/l) als auch Glucoseüberschüsse ( $> 40$  g/l) verhindert. Zwar tolerieren Schimmelpilze im Allgemeinen hohe Zuckerkonzentrationen, jedoch kann eine erhöhte Konzentration von Glucose in der Fermentationsbrühe zu einer Verlangsamung des Schimmelpilzwachstums führen. Außerdem wirken sich hohe Glucosekonzentrationen negativ auf den Pervaporationsprozess aus (s. Bild 5.3).

Die Pervaporation wurde unmittelbar nach der Inokulation des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors gestartet und bis zum Ende der Fermentation kontinuierlich betrieben. Das permeatseitige Vakuum betrug hierbei stets weniger als 5 mbar.

#### **4.2.5 Klassische Submersfermentation**

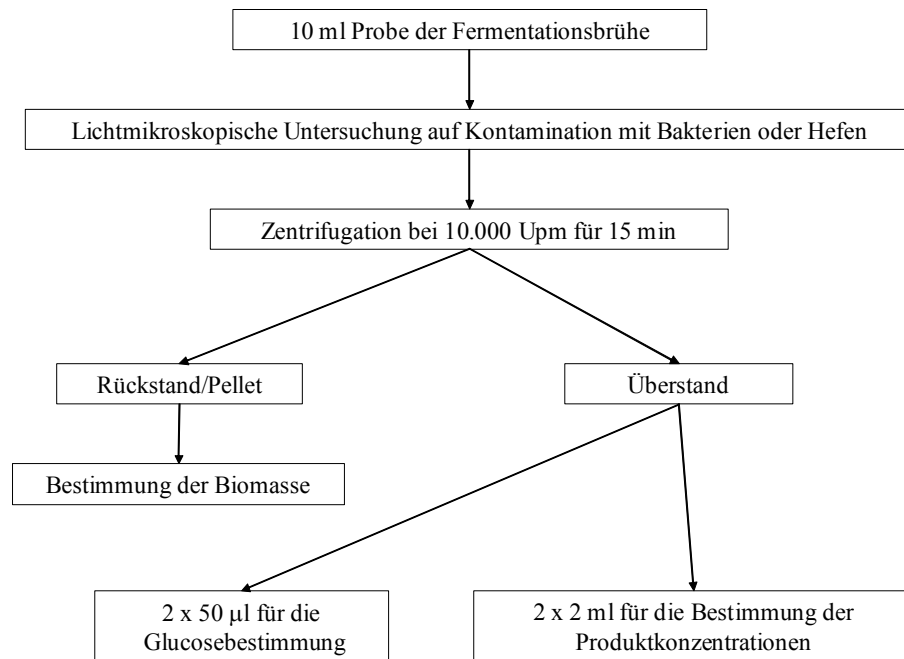
Zur Bewertung des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses in Bezug auf den Fermentationsverlauf und die Produktbildung im Vergleich zu einer klassischen Submersfermentation wurde ein Vergleichsprozess durchgeführt. Dazu wurde die Membran im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor durch eine Gummidichtung ersetzt und auf diese Weise die Produktabtrennung unterbunden. Die klassische Submersfermentation fand dadurch unter denselben geometrischen Verhältnissen des Bioreaktors statt wie der Pervaporation-Bio-Hybridprozess. Ebenso waren die Fermentationsparameter bei beiden Fermentationen identisch und entsprachen den in Kapitel 4.2.4 für den Pervaporation-Bio-Hybridprozess beschriebenen Einstellungen. Auf diese Weise wurden die Voraussetzungen für einen korrekten Vergleich beider Fermentationen erfüllt.

#### **4.2.6 Analytik**

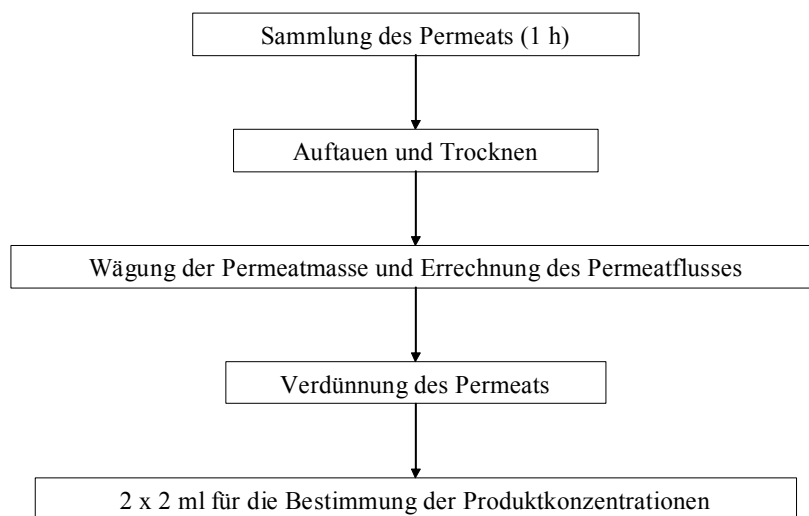
Die Probenahme aus der Fermentationsbrühe und aus dem Permeat erfolgte regelmäßig alle vier Stunden. Zur Analyse der Glucosekonzentration, des Schimmelpilzwachstums und der Produktbildung wurde dem Fermenter eine Probe von 10 ml der Fermentationsbrühe über die Probenahmeschleufe und unter sterilen Bedingungen, d. h. unter Vermeidung einer Kontamination der Probenahmeschleufe, entnommen. Diese Probe wurde gemäß Bild 4.3 verarbeitet und den einzelnen Analyseschritten zugeführt.

Zur Ermittlung des Permeatflusses und der Produktkonzentration im Permeat wurde das Permeat jede vierte Stunde über einen Zeitraum von einer Stunde in der Kühlfalle gesammelt und als Permeatprobe entnommen. Die in einem Glaskolben verschlossene Probe des Permeats wurde unter fließendem Wasser aufgetaut. Nach gründlicher Trocknung des Probengefäßes wurde dieses gewogen und durch Abzug des Leergewichtes die Permeatmasse be-

stimmt. Der Permeatfluss konnte durch Division des Probengewichtes  $m$  durch die Proben-sammeldauer  $t$  errechnet werden. Zur Bestimmung der Produktkonzentration im Permeat wurde die Permeatprobe 1:10 verdünnt. Anschließend wurden  $2 \times 2$  ml der verdünnten Permeatprobe für die Headspace-Gaschromatographie vorbereitet. Die Verarbeitung der Permeatproben ist als Übersicht in Bild 4.4 dargestellt.



**Bild 4.3:** Verarbeitung der Fermentationsprobe



**Bild 4.4:** Verarbeitung der Permeatprobe



#### 4.2.6.1 Bestimmung der Biomasse

Die Konzentration der Biomasse wurde gravimetrisch nach BAST [10] bestimmt. Zunächst wurde die Probe der Fermentationsbrühe (10 ml) für 15 Minuten bei einer Drehzahl von 15.000 Upm zentrifugiert und die Biomasse abgetrennt. Der Rückstand der Zentrifugation bestehend aus verdichtetem Mycel und einem Restanteil Fermentationsbrühe wurde mit Aqua dest. ausgespült und durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm unter Vakuum auf der Filtratseite filtriert. Anschließend wurde der Membranfilter mit dem Mycelrückstand in einem Trockenschrank bei einer Temperatur von 105 °C für eine Dauer von 24 Stunden getrocknet und zur Abkühlung in einen Exsikkator verbracht. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurde das Gewicht des Membranfilters einschließlich des Mycelrückstands auf einer Feinwaage ( $\pm 1$  mg) bestimmt. Um das Trockengewicht des Mycelrückstands berechnen zu können, wurde zuvor das Leergewicht der Membranfilter bestimmt. Dazu wurden die Membranfilter ebenso in einem Trockenschrank bei 105 °C über einen Zeitraum von 24 Stunden getrocknet und anschließend zur Abkühlung in einen Exsikkator überführt. Das Gewicht der Membranfilter wurde schließlich mit einer Feinwaage ( $\pm 1$  mg) ermittelt.

#### 4.2.6.2 Bestimmung des Substratabbaus

Stellvertretend für den Substratabbau wurde in der vorliegenden Arbeit der Verbrauch der Kohlenstoffquelle Glucose herangezogen. Glucose stellte das mengenmäßig wichtigste Substrat der Fermentation dar. Außerdem ist eine analytische Erfassung der komplex zusammengesetzten Substrate Malzextrakt und Pepton nicht möglich.

Die Glucosekonzentration in der Fermentationsbrühe wurde mithilfe eines Enzymtests der Firma BOEHRINGER MANNHEIM/R-BIOPHARM bestimmt. Bei diesem Test wird D-Glucose durch das Enzym Hexokinase und Adenosin-5-Triphosphat (ATP) zu D-Glucose-6-Phosphat (G-6-P) unter gleichzeitiger Bildung von Adenosin-5-Diphosphat (ADP) phosphoryliert. In Gegenwart des Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase wird G-6-P von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP) zu D-Gluconat-6-Phosphat oxidiert. Es entsteht reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH). Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der D-Glucose-Menge äquivalent. NADPH ist die Messgröße des Enzymtests und wird aufgrund seiner Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm photometrisch bestimmt [155].

Für den Enzymtest wurde jeweils  $2 \times 50$  µl (Doppelbestimmung) des Überstandes der Zentrifugation der Fermentationsprobe genutzt (s. Bild 4.3, S. 44). Der Enzymtest wurde gemäß der dem Test beiliegenden Anleitung durchgeführt.

### 4.2.6.3 Bestimmung der Produktkonzentration

Die Konzentrationen der Produkte Ethanol, Isobutanol, Isoamylalkohol, Ethylacetat, Propylacetat, Isobutylacetat, Isoamylacetat und Ethylbutyrat in der Fermentationsbrühe bzw. im Permeat wurden mit der Headspace-Gaschromatographie bestimmt. Die Headspace-Gaschromatographie erfasst nur die aufgrund ausreichender Flüchtigkeit in der Gasphase über der Probe vorliegenden Verbindungen. Daher kommt diese Technik ohne jegliche Aufarbeitung der zu untersuchenden Probe aus. Bei der Headspace-Gaschromatographie wird die Gasphase über einer Probe in einem geschlossenen Gefäß untersucht. Dabei stellt sich während eines ausreichend langen Zeitraumes (Equilibrierungszeit) ein Gleichgewicht zwischen der flüssigen Probe und der Gasphase ein. Aus diesem System wird dann mit einer gasdichten Spritze ein Aliquot entnommen und gaschromatographisch analysiert [9, S. 93].

Es wurden jeweils  $2 \times 2$  ml (Doppelbestimmung) der zellfreien Fermentationsbrühe (s. Bild 4.3, S. 44) bzw. der verdünnten Permeatprobe (s. Bild 4.4, S.44) verwendet. Die Proben wurden in Headspace-Gefäße pipettiert und mit einem Septum gasdicht verschlossen. Sodann wurden sie zunächst bei  $-18\text{ °C}$  tiefgefroren und erst nach Abschluss der Fermentation nacheinander gaschromatographisch analysiert. Auf diese Weise konnten Veränderungen der Konzentrationen aufgrund fortschreitender enzymatischer Reaktionen unterbunden werden. Vor der gaschromatographischen Analyse wurden die Proben zum Zwecke des Equilibrierens über einen Zeitraum von 10 Minuten bei  $60\text{ °C}$  temperiert. Mithilfe eines automatischen Probengebers wurde 1 ml des Gasgemisches im Kopfraum (Headspace) der Gefäße entnommen und zur Analyse in den Gaschromatographen injiziert. Die Einstellungen des Gaschromatographen für die Headspace-Analyse sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

**Tabelle 4.5: Einstellungen des Gaschromatographen für die Headspace-Analyse**

Parameter	Einstellung
Equilibrierungstemperatur/-zeit	$60,0\text{ °C}/10,0\text{ min}$
Injektionstemperatur	$250,0\text{ °C}$
Injektionsvolumen	1,0 ml
Trägergas	Stickstoff
Trägergasdruck/-fluss	$0,5\text{ bar}/0,5\text{ ml/min}$
Splitverhältnis	3:1
Trennsäule	AGILENT INNOWAX 19091N-233
Detektor/Detektortemperatur	FID/ $250,0\text{ °C}$
Temperaturprogramm	Anfangstemperatur/Zeit $70,0\text{ °C}/8,00\text{ min}$ Heizrate $10,00\text{ °C/min}$ Endtemperatur/Zeit $190\text{ °C}/4,00\text{ min}$

Die qualitative Analyse, d. h. die Identifizierung der Fermentationsprodukte, erfolgte durch den Vergleich ihrer Retentionszeiten mit den Retentionszeiten geeigneter Standards. Zur Absicherung der Identifizierung der Fermentationsprodukte wurden die Ergebnisse der qualitativen Analyse mithilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) verifiziert.

Zur quantitativen Kalibrierung der gaschromatographischen Analyse wurden jeweils drei wässrige Standardlösungen eines Aromastoffes mit unterschiedlichen, aber definierten Konzentrationen unter identischen Bedingungen wie die Proben gaschromatographisch analysiert. Die für die Standardlösungen gewählten Aromastoffkonzentrationen deckten dabei die Schwankungsbreite der Konzentration der Aromastoffe sowohl in der Fermentationsbrühe als auch in dem verdünnten Permeat ab. Die Zuordnung der gemessenen Peakflächen zu den bekannten Konzentrationen der Standards erfolgte über eine lineare Regression. Als Ergebnis der linearen Regression wurde für jede der acht Substanzen jeweils eine Eichgerade erhalten. Mit den Geradengleichungen konnte die gaschromatographische Analyse der Proben durch Umrechnung der resultierenden Peakflächen in Produktkonzentrationen quantifiziert werden.

#### 4.2.7 Untersuchung des Einflusses der Substrate und Betriebsparameter

Der Einfluss der Substrate Glucose, Malzextrakt und Pepton sowie der Betriebsparameter pH-Wert und Rührerdrehzahl auf die Pervaporation der Aromastoffe wurde anhand von Modelllösungen untersucht. Für die Untersuchungen dieser fünf Faktoren wurde mittels statistischer Versuchsplanung (SVP) unter Verwendung der Software DESIGN-EXPERT 6.0.5, STAT-EASE, INC., Minneapolis, USA ein Box-Behnken-Versuchsplan erstellt. Die Wahl des Box-Behnken-Designs erfolgte aufgrund des dabei erheblich reduzierten Versuchsaufwandes: Im Gegensatz zu einem vollständigen  $3^5$ -Faktorenversuchsplan mit 243 Versuchspunkten entsteht beim Box-Behnken-Design durch alleinige Aufnahme der Faktorstufenkombinationen der 0. Sphäre und der 2. Sphäre ein Plan mit 41 Versuchspunkten, wobei sich durch sechsmalige Ausführung des Versuches im Zentralpunkt eine Zahl von 46 Versuchen ergibt [162, S. 154]. Die Faktoren und die Faktorstufen sind in Tabelle 4.6 aufgelistet.

**Tabelle 4.6: Faktoren und Faktorstufen**

Faktoren	Faktorstufen		
	-1	0	+1
Glucose in g·l <sup>-1</sup>	0,0	25,0	50,0
Malzextrakt in g·l <sup>-1</sup>	0,0	25,0	50,0
Pepton in g·l <sup>-1</sup>	0,0	3,0	6,0
pH-Wert	3,5	5,0	6,5
Rührerdrehzahl in Upm	100	350	600

Die Faktorstufen der Substrate Glucose, Malzextrakt und Pepton wurden den für die Fermentation relevanten Konzentrationsbereichen angepasst. Ebenso wurden die Faktorstufen des Faktors pH-Wert entsprechend dem Wachstumsbereich des Schimmelpilzes eingestellt. Da die Trennleistung der Pervaporation wesentlich von den Strömungsverhältnissen über der Membran bestimmt wird, wurde die Rührerdrehzahl als weiterer Faktor in den Versuchsplan aufgenommen.

Als Zielgrößen zur Bewertung der Versuchsergebnisse dienten die Permeatflüsse der Aromastoffe bei der Pervaporation  $J_i$ . Diese können mit der Konzentration der Aromastoffe im Permeat  $c_i^p$ , der während der Versuchsdauer  $t$  anfallenden Permeatmasse  $m^p$  der Membranfläche  $A$  und der Dichte des Permeates  $\rho^p$  berechnet werden:

$$J_i = \frac{c_i^p \cdot m^p}{A \cdot \rho^p \cdot t} \quad (4.1)$$

Der Versuchsplan umfasste insgesamt 46 Einzelversuche. Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte ebenfalls mit der Software Software DESIGN-EXPERT 6.0.5, STAT-EASE, INC., Minneapolis, USA. Tabelle 4.7 zeigt den Box-Behnken-Versuchsplan mit den Faktorstufenkombinationen der Einzelversuche.

**Tabelle 4.7: Box-Behnken-Versuchsplan**

Standard	Versuchs-Nr. (randomisiert)	Malzextrakt in g/l	Glucose in g/l	Pepton in g/l	Rührerdrehzahl in Upm	pH
1	44	0,0	0,0	3,0	350,0	5,0
2	27	50,0	0,0	3,0	350,0	5,0
3	13	0,0	50,0	3,0	350,0	5,0
4	26	50,0	50,0	3,0	350,0	5,0
5	16	25,0	25,0	0,0	100,0	5,0
6	23	25,0	25,0	6,0	100,0	5,0
7	29	25,0	25,0	0,0	600,0	5,0
8	6	25,0	25,0	6,0	600,0	5,0
9	32	25,0	0,0	3,0	350,0	3,5
10	11	25,0	50,0	3,0	350,0	3,5
11	36	25,0	0,0	3,0	350,0	6,5
12	34	25,0	50,0	3,0	350,0	6,5
13	8	0,0	25,0	0,0	350,0	5,0
14	40	50,0	25,0	0,0	350,0	5,0
15	2	0,0	25,0	6,0	350,0	5,0
16	17	50,0	25,0	6,0	350,0	5,0

Standard	Versuchs-Nr. (randomisiert)	Malzextrakt in g/l	Glucose in g/l	Pepton in g/l	Rührerdrehzahl in Upm	pH
17	43	25,0	25,0	3,0	100,0	3,5
18	38	25,0	25,0	3,0	600,0	3,5
19	41	25,0	25,0	3,0	100,0	6,5
20	12	25,0	25,0	3,0	600,0	6,5
21	4	25,0	0,0	0,0	350,0	5,0
22	14	25,0	50,0	0,0	350,0	5,0
23	31	25,0	0,0	6,0	350,0	5,0
24	1	25,0	50,0	6,0	350,0	5,0
25	19	0,0	25,0	3,0	100,0	5,0
26	20	50,0	25,0	3,0	100,0	5,0
27	33	0,0	25,0	3,0	600,0	5,0
28	3	50,0	25,0	3,0	600,0	5,0
29	28	25,0	25,0	0,0	350,0	3,5
30	39	25,0	25,0	6,0	350,0	3,5
31	37	25,0	25,0	0,0	350,0	6,5
32	30	25,0	25,0	6,0	350,0	6,5
33	10	0,0	25,0	3,0	350,0	3,5
34	9	50,0	25,0	3,0	350,0	3,5
35	45	0,0	25,0	3,0	350,0	6,5
36	35	50,0	25,0	3,0	350,0	6,5
37	46	25,0	0,0	3,0	100,0	5,0
38	7	25,0	50,0	3,0	100,0	5,0
39	15	25,0	0,0	3,0	600,0	5,0
40	22	25,0	50,0	3,0	600,0	5,0
41	5	25,0	25,0	3,0	350,0	5,0
42	24	25,0	25,0	3,0	350,0	5,0
43	21	25,0	25,0	3,0	350,0	5,0
44	42	25,0	25,0	3,0	350,0	5,0
45	18	25,0	25,0	3,0	350,0	5,0
46	25	25,0	25,0	3,0	350,0	5,0

Die Untersuchung der Einflussfaktoren gemäß der im Versuchsplan vorgegebenen Faktorstufenkombinationen geschah an wirklichkeitsnahen Modelllösungen. Diese enthielten neben den versuchsplanmäßig vorgelegten Substraten die Fermentationsprodukte Ethanol, Isobutanol, Isoamylalkohol, Ethylacetat, Propylacetat, Isobutylacetat, Isoamylacetat und Ethylbutyrat in konstanter Konzentration von 100 ppm (v/v). Der pH-Wert der Modelllösung wurde entsprechend der geforderten Faktorstufe mit 1-N-Salzsäure eingestellt. Damit entsprach die

Zusammensetzung der Modelllösung weitgehend dem Substrat- und Produktspektrum der Fermentationsbrühe.

Jeweils 1,5 Liter der auf diese Weise hergestellten Lösungen wurden im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor unter Anwendung der vorgegebenen Rührerdrehzahl dem Pervaporationsprozess unterzogen. Die Temperatur entsprach mit 27 °C der Fermentationstemperatur. Das permeatseitige Vakuum betrug weniger als 5 mbar. Die Probenahme und –analyse bei der Durchführung des Versuchsplanes erfolgte auf die gleiche Art und Weise wie bei den Fermentationsversuchen (s. Abschnitt 4.2.6).

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Einfluss der Substrate und Betriebsparameter

Der Einfluss der Substrate Malzextrakt (ME), Glucose (GLC) und Pepton (PEP) sowie der Betriebsparameter Rührerdrehzahl (DZ) und pH-Wert (pH) auf die Abtrennung der Aromastoffe im Pervaporation-Bio-Hybridprozess wurde entsprechend einem Box-Behnken-Versuchsplan anhand von Modelllösungen untersucht (s. Abschnitt 4.2.7, S. 47).

Die Abtrennung der Alkohole Ethanol und Isobutanol bei der Pervaporation wurde durch die versuchsplanmäßige Variation der fünf Faktoren *nicht* beeinflusst. Für die Ester Ethylacetat, Propylacetat, Isobutylacetat, Isoamylacetat und Ethylbutyrat sowie für den Alkohol Isobutanol wurden lineare Faktorwirkungen gemessen. Zur mathematischen Erfassung der gemessenen Faktorwirkungen im untersuchten Wertebereich der Faktorstufen wurde ein Polynom an die Experimentaldaten angepasst. Damit konnten die Permeatflüsse der Aromastoffe in Abhängigkeit beliebiger Einstellungen der Faktoren (innerhalb der Grenzen des Versuchsraumes) berechnet werden. Da keine Faktorwirkungen höherer Ordnung und keine Wechselwirkungen der Faktoren auftraten, wurde dafür ein Polynom ersten Grades ausgewählt:

$$J_i = b_{i,0} + b_{i,1} \cdot x_1 + b_{i,2} \cdot x_2 + b_{i,3} \cdot x_3 + b_{i,4} \cdot x_4 + b_{i,5} \cdot x_5 \quad (5.1)$$

Die abhängige Variable  $J_i$  in Gleichung (5.1) ist der Permeatfluss der Substanz  $i$ . Die Einstellungen der fünf Faktoren werden durch die unabhängigen Variablen  $x_1$  bis  $x_5$  wiedergegeben, die Koeffizienten  $b_{i,1}$  bis  $b_{i,5}$  bedeuten die Richtung und die Stärke der jeweiligen Faktorwirkung auf den Permeatfluss der Substanz  $i$ .

Die statistische Signifikanz der Faktorwirkungen wurde durch eine Signifikanzanalyse unter Vorgabe einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 5\%$  überprüft. Tabelle 5.8 zeigt die Ergebnisse der Signifikanzanalyse anhand des Konfidenzniveaus. Die Ergebnisse der Signifikanzanalyse beziehen sich auf den Unterschied der Faktorwirkungen zwischen den Faktorstufen -1 und +1 (s. Tabelle 4.6, S. 47). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von maximal  $5\%$  entspricht einem Konfidenzniveau von mindestens  $95\%$ . In Tabelle 5.8 sind Konfidenzniveaus über  $95\%$  durch Fettdruck hervorgehoben.

Tabelle 5.8: Ergebnisse der Signifikanzanalyse

$J_i$	Konfidenzniveau in % zwischen Faktorstufe -1 und +1					Modell
	$x_1$ (ME)	$x_2$ (GLC)	$x_3$ (PEP)	$x_4$ (DZ)	$x_5$ (pH)	
<b>Ethylacetat</b>	90,44	<b>99,52</b>	77,73	<b>99,96</b>	74,12	<b>99,97</b>
<b>Propylacetat</b>	76,20	<b>97,42</b>	41,94	<b>99,97</b>	89,23	<b>99,89</b>
<b>Isobutylacetat</b>	82,66	<b>99,18</b>	51,28	<b>99,99</b>	76,50	<b>99,99</b>
<b>Isoamylacetat</b>	77,65	<b>99,50</b>	27,13	<b>99,99</b>	81,90	<b>99,99</b>
<b>Ethylbutyrat</b>	75,87	<b>99,06</b>	48,17	<b>99,99</b>	71,00	<b>99,99</b>
<b>Ethanol</b>	14,87	67,33	84,91	91,28	58,56	74,87
<b>Isobutanol</b>	85,69	79,74	11,35	<b>99,02</b>	85,50	<b>96,58</b>
<b>Isoamylalkohol</b>	77,51	77,06	11,90	<b>97,15</b>	86,02	91,37

Wie aus Tabelle 5.8 hervorgeht, haben im untersuchten Wertebereich der Faktoren nur die Glucosekonzentration und die Rührerdrehzahl im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor eine statistisch signifikante Wirkung auf die Permeatflüsse bestimmter Substanzen. Dies trifft für alle untersuchten Ester zu. Für die Gruppe der Alkohole sind bis auf den Einfluss der Rührerdrehzahl bei Isobutanol und Isoamylalkohol keine statistisch signifikanten Effekte aufgetreten. Die Anpassung durch das Polynom ersten Grades ist mit Ausnahme der Alkohole Ethanol und Isoamylalkohol für alle Substanzen signifikant. Die Permeatflüsse von Ethanol und Isoamylalkohol konnten durch Angabe eines Mittelwertes als über den gesamten Versuchsraum konstant angegeben werden, was die Unabhängigkeit der Permeatflüsse dieser Alkohole von den fünf Faktoren verdeutlicht.

Die durch nicht lineare Regression ermittelten Koeffizienten der Polynomgleichungen sind in Tabelle 5.9 aufgeführt. Die Koeffizienten der statistisch signifikanten Einflüsse sind fett gedruckt. Ein negatives Vorzeichen der Koeffizienten bedeutet eine negative Wirkungsrichtung des jeweiligen Faktors, d. h. eine Senkung des Permeatflusses bei Erhöhung des Faktorwertes. Ein positives Vorzeichen der Koeffizienten steht für eine den Permeatfluss erhöhende Wirkung des jeweiligen Faktors mit steigendem Faktorwert. Der Betrag der Koeffizienten gibt die Höhe der Permeatflussveränderung in  $g/(m^2 \cdot h)$  bei einer Erhöhung des Faktorwertes um eine Einheit an. Die Erhöhung um eine Einheit entspricht für die Substrate Malzextrakt, Pepton und Glucose der Erhöhung ihrer Konzentration um 1 g/l. Für den pH-Wert bedeutet eine Einheit eine pH-Wert-Differenz von eins und für die Rührerdrehzahl eine Beschleunigung bzw. Verlangsamung um eine Umdrehung pro Minute (1 Upm).

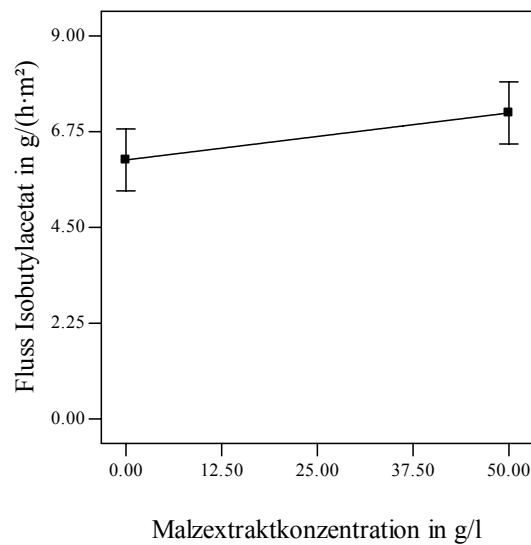


Tabelle 5.9: Regressionskoeffizienten der Polynome

$J_i$	$b_0$	$b_1$ (ME)	$b_2$ (GLC)	$b_3$ (PEP)	$b_4$ (DZ)	$b_5$ (pH)
<b>Ethylacetat</b>	1,9409	0,010397	<b>-0,018206</b>	-0,062888	<b>0,002371</b>	0,11631
<b>Propylacetat</b>	2,1420	0,014140	<b>-0,027338</b>	-0,054804	<b>0,004638</b>	0,32377
<b>Isobutylacetat</b>	3,1756	0,022085	<b>-0,044292</b>	-0,093105	<b>0,007698</b>	0,32015
<b>Isoamylacetat</b>	2,3966	0,015270	<b>-0,036693</b>	-0,035939	<b>0,005824</b>	0,28022
<b>Ethylbutyrat</b>	1,9235	0,007283	<b>-0,016703</b>	-0,033260	<b>0,002947</b>	0,10945
<b>Isobutanol</b>	0,1752	0,000601	-0,000521	-0,000482	<b>0,000109</b>	0,00997

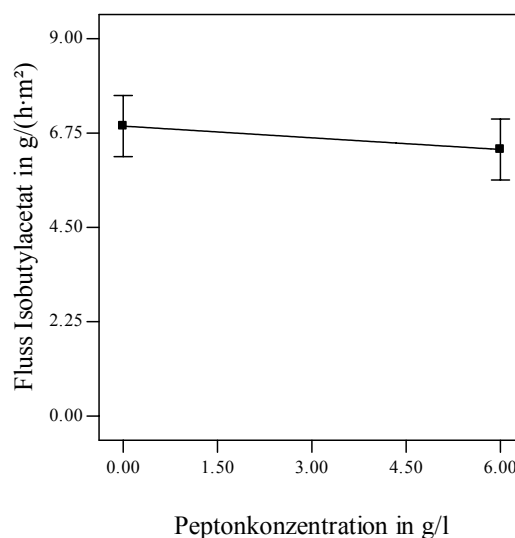
Anhand der Vorzeichen der Koeffizienten in Tabelle 5.9 sind einheitliche Tendenzen für die Wirkungsrichtung aller Faktor-Substanz-Kombinationen erkennbar. Dies gilt auch für die statistisch nicht signifikanten Faktorwirkungen: Die Koeffizienten der Faktoren Malzextraktkonzentration und pH-Wert besitzen für alle Substanzen positive Vorzeichen während die Vorzeichen der Koeffizienten des Faktors Peptonkonzentration negativ ausfallen. Zwar konnte der Einfluss dieser vorgenannten drei Faktoren bei der Signifikanzanalyse nicht statistisch bestätigt werden. Die Übereinstimmung der Vorzeichen der Koeffizienten dieser Faktoren für alle der untersuchten Substanzen erlaubt jedoch eine Interpretation ihrer tendenziellen Wirkungsrichtung.

Alle im Folgenden dargestellten Ergebnisgrafiken beruhen auf berechneten Werten. Die Berechnung erfolgte auf der Grundlage der durch nicht lineare Regression erhaltenen Polynomgleichungen (s. Gleichung (5.1) und Tabelle 5.9). Der Einfluss der einzelnen Faktoren wird stellvertretend am Beispiel der Ergebnisse für die Substanz Isobutylacetat aufgezeigt. Dabei werden die Veränderungen des Isobutylacetatflusses zwischen den Faktorstufen -1 und +1 wiedergegeben. Die Konfidenzintervalle ( $p = 5\%$ ) für die Höhe der Permeatflüsse bei den Faktorstufen -1 und +1 sind als vertikale Balken eingezeichnet.



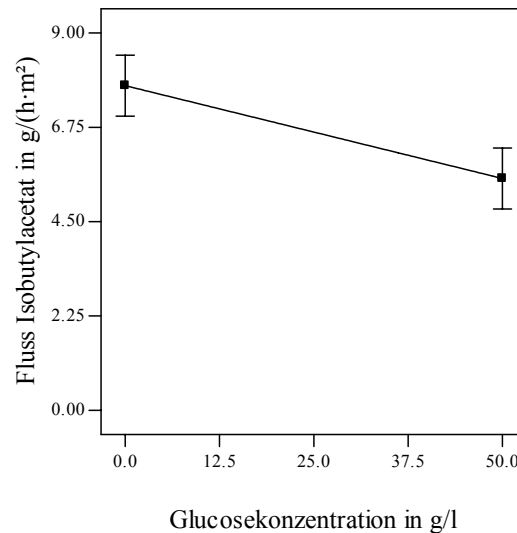
**Bild 5.1:** Abhängigkeit des Flusses von Isobutyrlacetat von der Malzextraktkonzentration in der Fermentationslösung (Einstellung der übrigen Faktoren: Glucose 25 g/l, Pepton 3 g/l, pH-Wert 5, Rührerdrehzahl 350 Upm)

Wie Bild 5.1 zeigt, übt das Substrat Malzextrakt im untersuchten Konzentrationsbereich einen tendenziell positiven Effekt auf den Fluss von Isobutyrlacetat aus. Die den Permeatfluss erhöhende Wirkung ergibt sich aus der positiven Steigung der Regressionsgeraden. Jedoch ist die gemessene Änderung des Flusses von Isobutyrlacetat durch die Zugabe von 50 g/l Malzextrakt bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % statistisch nicht signifikant und kann somit lediglich als Richtungstendenz der Beeinflussung interpretiert werden.



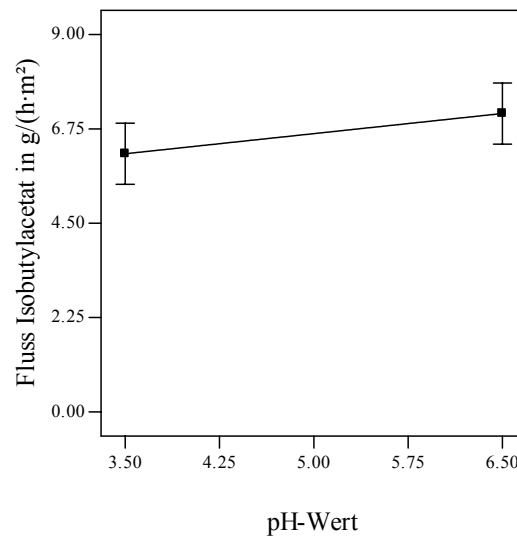
**Bild 5.2:** Abhängigkeit des Flusses von Isobutyrlacetat von der Peptonkonzentration (Einstellung der übrigen Faktoren: Malzextrakt 25 g/l, Glucose 25 g/l, pH-Wert 5, Rührerdrehzahl 350 Upm)

Ebenso konnte für die Stickstoffquelle Pepton kein statistisch signifikanter Einfluss auf den Fluss der Substanz Isobutylacetat bei einer Konzentrationsdifferenz für Pepton von 6 g/l festgestellt werden. Wie aus Bild 5.2 hervorgeht, ist eine negative Tendenz der Beeinflussung des Isobutylacetatflusses durch die Zugabe von 6 g/l Pepton zur Modelllösung erkennbar.



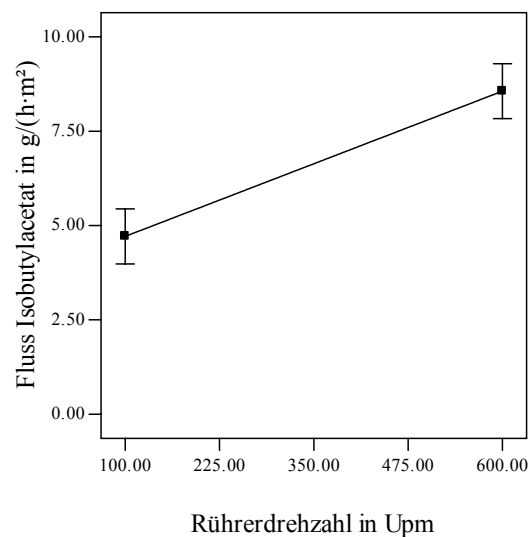
**Bild 5.3:** Abhängigkeit des Flusses von Isobutylacetat von der Glucosekonzentration (Einstellung der übrigen Faktoren: Malzextrakt 25 g/l, Pepton 3 g/l, pH-Wert 5, Rührerdrehzahl 350 Upm)

Im Gegensatz zu Pepton zeigt die Kohlenstoffquelle Glucose zwischen ihren Faktorstufen -1 und +1, d. h. bei einem Konzentrationsunterschied von 50 g/l, eine mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % statistisch signifikante Wirkung auf den Permeatfluss von Isobutylacetat. Die Wirkungsrichtung ist dabei negativ (vgl. Bild 5.3).



**Bild 5.4:** Abhängigkeit des Flusses von Isobutylacetat vom pH-Wert (Einstellung der übrigen Faktoren: Malzextrakt 25 g/l, Glucose 25 g/l, Pepton 3 g/l, Rührerdrehzahl 350 Upm)

Für den pH-Wert der Feedlösung wurde eine positive Wirkungstendenz auf den Fluss von Isobutylacetat bei einer Verschiebung des pH-Wertes in Richtung des Neutralpunktes gemessen (vgl. Bild 5.4). Der Einfluss des pH-Wertes auf den Permeatfluss war bei der untersuchten maximalen pH-Wert-Differenz von 3 Einheiten statistisch nicht signifikant.



**Bild 5.5:** Abhängigkeit des Flusses von Isobutylacetat von der Rührerdrehzahl (Einstellung der übrigen Faktoren: Malzextrakt 25 g/l, Glucose 25 g/l, Pepton 3 g/l, pH-Wert 5)

Aus Bild 5.5 geht hervor, dass mit steigender Rührerdrehzahl der Permeatfluss von Isobutylacetat steigt. Dabei übt die Rührerdrehzahl den stärksten Einfluss aller untersuchten Faktoren auf den Permeatfluss aus. Ihre Wirkung ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % statistisch signifikant.

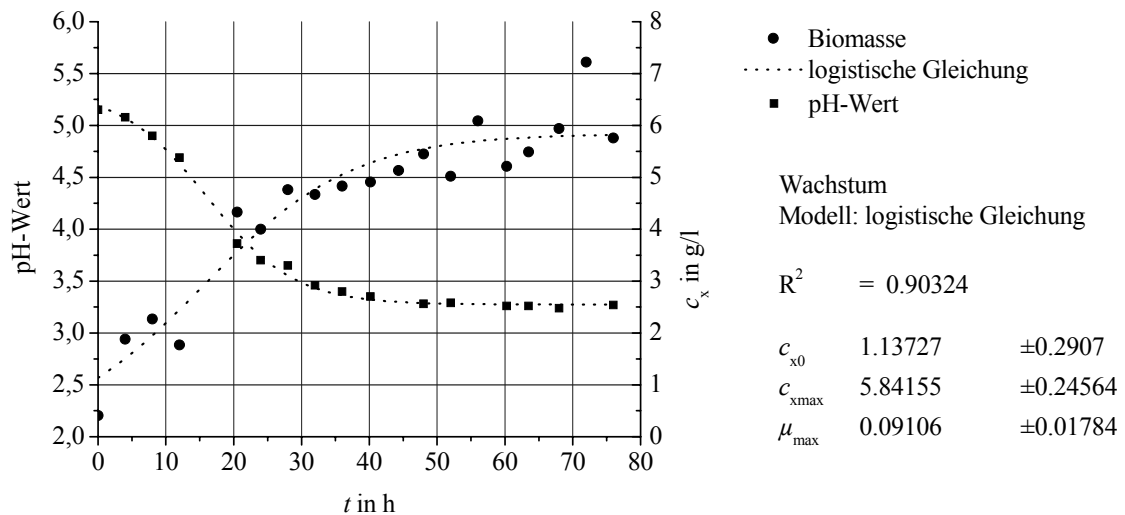
Die am Beispiel der Substanz Isobutylacetat aufgezeigten Ergebnisse gelten in gleicher Weise für die Ester Isoamylacetat, Propylacetat, Ethylacetat und Ethylbutyrat sowie für den Alkohol Isobutanol. Allerdings wurden keine Faktorwirkungen auf die Permeatflüsse der Alkohole Ethanol und Isoamylalkohol nachgewiesen.

## 5.2 Pervaporation-Bio-Hybridprozess

Eine Fermentation im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor unterscheidet sich von einer klassischen Submersfermentation durch die Produktabtrennung. Dies führt zu veränderten Konzentrationsverläufen im Reaktor. Zusätzlich zum Produkt in der Fermentationsbrühe erhält man im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor das bei der Pervaporation abgetrennte und im Permeat akkumulierte Produkt. Somit ist die Gesamtproduktbildung im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor die Summe aus dem Produktanteil in der Fermentationsbrühe und dem Permeat. Eine Charakterisierung des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses muss neben der Produktbildung die Trennoperation Pervaporation berücksichtigen. Die zeitliche Entwicklung des Permeatflusses sowie mögliche fermentationssynchrone Veränderungen der Selektivität des Membranverfahrens sind für das Prozessergebnis maßgebend. Als Fermentationsmodell zur Charakterisierung des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses diene eine Aromabiosynthese unter Nutzung des Schimmelpilzes *Ceratocystis fimbriata* (s. Abschnitt 1). Die Ergebnisse des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses werden im Folgenden dargestellt.

### Fermentationsverlauf

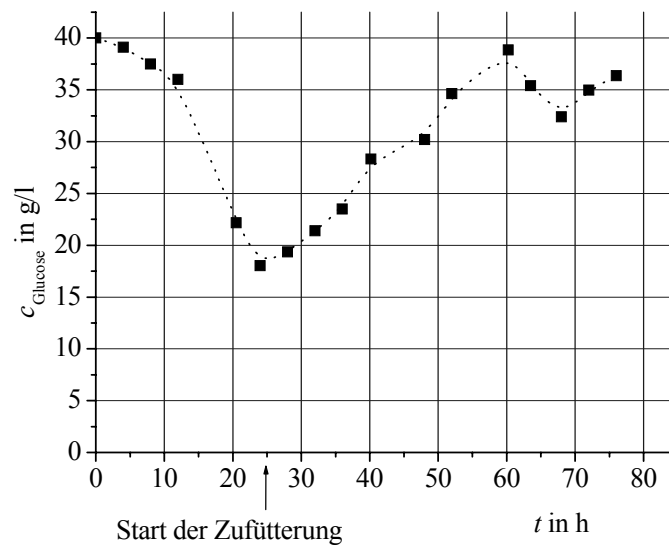
Bild 5.6 zeigt den Verlauf des Wachstums und des pH-Wertes der Fermentationsbrühe während der Fermentation im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor.



**Bild 5.6:** Wachstum und pH-Wert-Verlauf

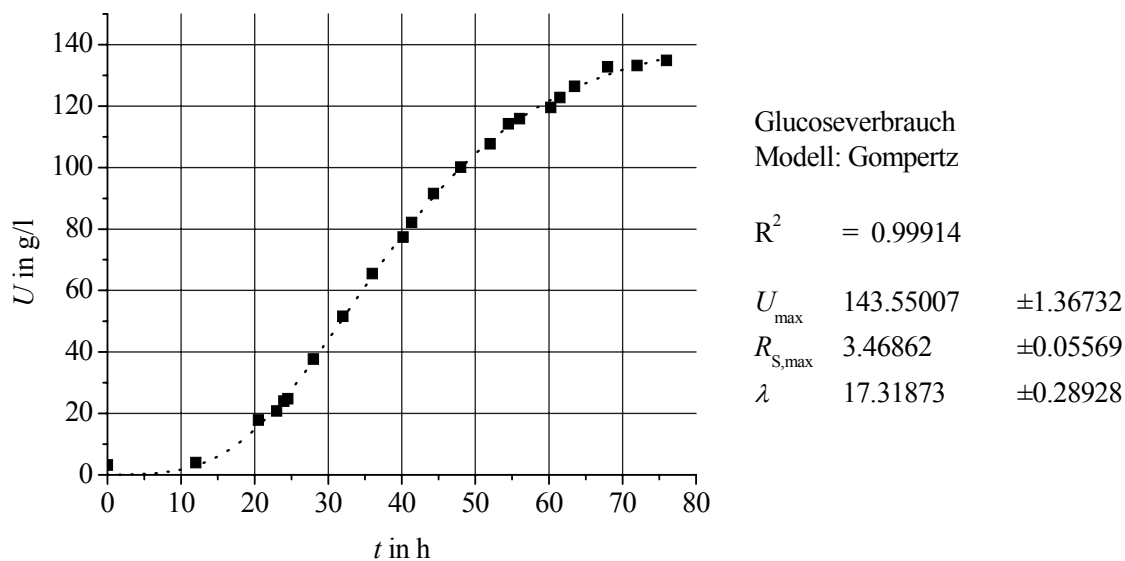
Die Werte für die Biomasse verlaufen aufgrund der Messwertstreuung unstetig. Dennoch ist eine Phase exponentiellen Wachstums erkennbar, die in eine abklingende Phase übergeht. Dieser typische sigmoide Verlauf wird durch die Glättung der Messwerte mittels der logistischen Gleichung besonders deutlich. Das Wachstum zeigt keine ausgeprägte lag-Phase. Es wird eine Endkonzentration der Biomasse von  $c_{x,\max} = 5,8$  g Trockensubstanz pro Liter Fermentationsbrühe erreicht. Die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{\max}$  beträgt  $0,091 \text{ h}^{-1}$ . Nach einer Prozessdauer von ca. 32 Stunden lässt die Wachstumsgeschwindigkeit deutlich nach. Ein analoger Verlauf ist auch für den pH-Wert festzustellen. Der pH-Wert der Fermentationsbrühe sinkt innerhalb von 40 Stunden von pH 5,2 auf pH 2,5 ab. Ähnlich dem Wachstumsverlauf verlangsamt sich die Absenkung des pH-Wertes nach einer Prozessdauer von 32 Stunden deutlich.

In Bild 5.7 ist der Verlauf der Glucosekonzentration der Fermentationsbrühe während des Fed-Batch-Betriebes des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors dargestellt. Die Glucosekonzentration sinkt zu Beginn der Fermentation von 40 g/l innerhalb von 24 Stunden auf einen Wert von 18 g/l ab. Als Folge der Zugabe eines Glucoseüberschusses steigt die Glucosekonzentration im Reaktor an. Durch eine entsprechend angepasste Zufütterung wurde die Glucosekonzentration innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 10 g/l bis 40 g/l eingestellt (s. Abschnitt 4.2.4).



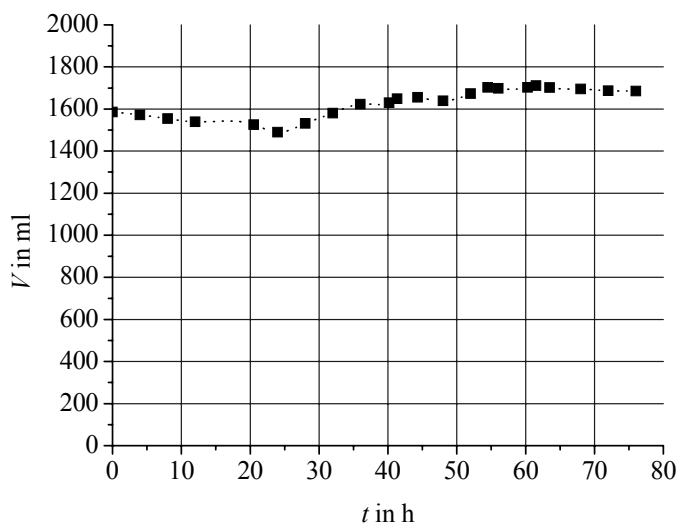
**Bild 5.7:** Zeitlicher Verlauf der Glucosekonzentration

Die Glucosekonzentration im Reaktor gibt Auskunft über das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit der Kohlenstoffquelle Glucose. Innerhalb der vorgegebenen Grenzen 10 g/l und 40 g/l ist ihr Verlauf jedoch nicht fermentationsrelevant. Im Gegensatz dazu ist der Glucoseverbrauch für den Fermentationsprozess charakteristisch und kann aus der Glucosekonzentration im Reaktor und der Zufütterungsrate errechnet werden. Bild 5.8 zeigt den zeitlichen Verlauf des Glucoseverbrauchs im Pervaporation-Bio-Hybridprozess. Der Glucoseverbrauch zeigt analog zum Wachstum einen sigmoiden Verlauf. Die mathematische Erfassung der Messwerte mit der Gompertz-Gleichung gelingt mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,999$  sehr gut. Anhand des Gompertz-Parameters  $\lambda$  wird die Existenz einer ausgeprägten lag-Phase von  $\lambda = 17,3 \text{ h}$  deutlich. Nach einer Prozessdauer von 75 Stunden wurden rund 130 g/l Glucose biokatalytisch umgesetzt. Die Gompertz-Gleichung gibt einen maximalen Glucoseverbrauch für  $t \rightarrow \infty$  von  $U_{\max} = 143,6 \text{ g/l}$  und eine maximale Glucoseverbrauchsgeschwindigkeit von  $R_{S,\max} = 3,47 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  an. Der Wendepunkt des Glucoseverbrauchs liegt bei rund 32 Stunden. Danach geht die Glucoseverbrauchsgeschwindigkeit zurück.



**Bild 5.8:** Glucoseverbrauch

Die Zufütterung der Glucoselösung führt zu einer Zunahme und die regelmäßige Probenahme zu einer Abnahme des Fermentationsvolumens. Die zeitliche Entwicklung des Fermentationsvolumens ist in Bild 5.9 dargestellt. Zufütterung und Probenahme kompensieren sich, sodass das Fermentationsvolumen nahezu konstant bleibt. Das Fermentationsvolumen kann näherungsweise mit 1,6 Litern angegeben werden.



**Bild 5.9:** Zeitliche Entwicklung des Fermentationsvolumens



### 5.2.1 Produktbildung

Bei der Fermentation mit dem Schimmelpilz *Ceratocystis fimbriata* im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor wurden acht Aromastoffe als Fermentationsprodukte identifiziert und analytisch erfasst. Im Gegensatz zum klassischen Submersprozess liegen die Produkte nicht ausschließlich im Bioreaktor vor, sondern gehen durch die zeitgleiche pervaporative Abtrennung auch in das Permeat über. Die Produktbildung setzt sich daher aus dem Produktanteil im Bioreaktor und dem Produktanteil im Permeat zusammen. Zur Berechnung der volumetrischen Produktakkumulation im Permeat wurde die zum Zeitpunkt  $t$  im Permeat akkumulierte Masse  $M_i$  des Produktes  $i$  durch das Fermentationsvolumen dividiert. Die im Permeat zum Zeitpunkt  $t$  akkumulierte Produktmenge  $M_i$  ergibt sich aus dem Permeatfluss einer Substanz  $J_i$  und der Membranfläche  $A$ :

$$M_i(t) = A \cdot \int_0^t J_i(t) \cdot dt \quad (5.2)$$

Durch Division mit dem Fermentationsvolumen erhält man die volumetrische Produktakkumulation im Permeat  $C_i^P$ :

$$C_i^P(t) = \frac{M_i(t) \cdot t}{\int_0^t V(t) \cdot dt} \quad (5.3)$$

Betrachtet man das Fermentationsvolumen näherungsweise als konstant, vereinfacht sich Gleichung (5.3) zu:

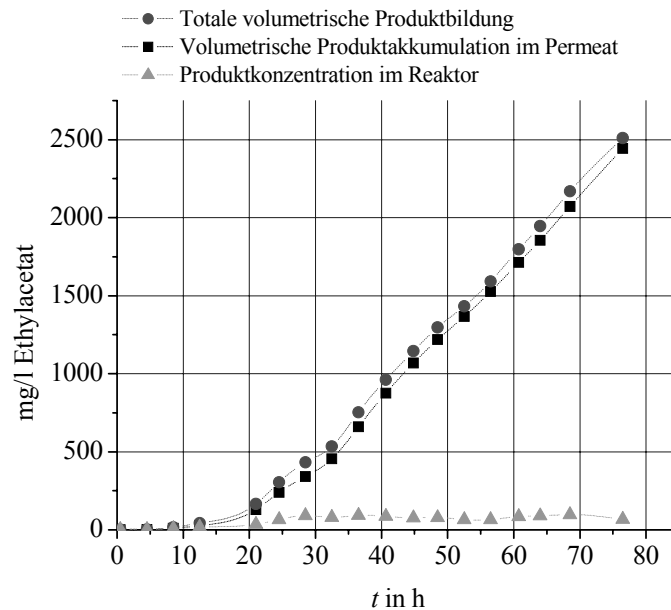
$$C_i^P(t) = \frac{M_i(t)}{V} \quad (5.4)$$

Die Gesamtproduktbildung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess  $C_i^{Ges}(t)$  ist die Summe aus der Produktkonzentration im Bioreaktor  $c_i(t)$  und der volumetrischen Produktakkumulation im Permeat  $C_i^P(t)$ :

$$C_i^{Ges}(t) = C_i^P(t) + c_i(t) \quad (5.5)$$

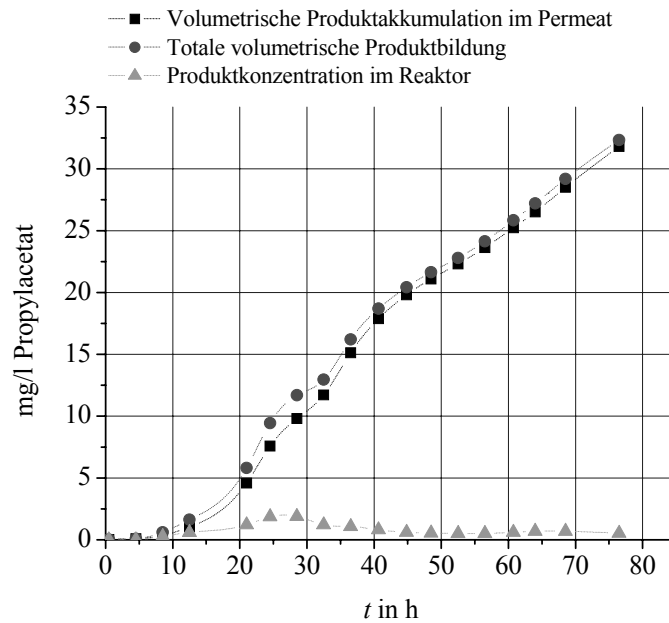
Der zeitliche Verlauf der Gesamtproduktbildung, der Produktkonzentration im Bioreaktor und der volumetrischen Produktakkumulation im Permeat ist für die jeweiligen Fermentationsprodukte in Bild 5.10 bis Bild 5.17 dargestellt.

In Bild 5.10 ist die Ethylacetatbildung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess abgebildet. Der Produktanteil im Permeat überwiegt den Produktanteil im Bioreaktor deutlich. Die Bildung von Ethylacetat beginnt nach einer Prozessdauer von rund 15 Stunden und erreicht nach 76 Stunden einen Wert von 2,5 g/l. Ein Erliegen bzw. eine Verlangsamung der Ethylacetatbildung ist nicht erkennbar. Die Ethylacetatkonzentration im Bioreaktor bleibt nach einem anfänglichem Anstieg auf einem konstanten Niveau.



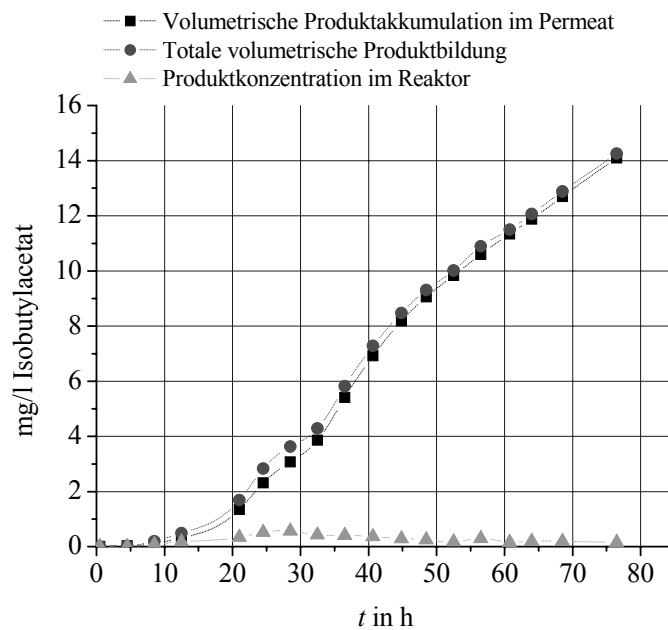
**Bild 5.10: Ethylacetatbildung**

Die Bildung von Propylacetat ist in Bild 5.11 dargestellt. Nach rund 10 Stunden der Fermentation setzt die Propylacetatbildung ein. Der Hauptanteil des Produktes geht in das Permeat über. Nach einer Prozessdauer von 76 Stunden erreicht die Propylacetatbildung einen Wert von 32 mg/l. Eine Verlangsamung der Produktbildung gegen Ende der Fermentation ist nicht erkennbar. Die Propylacetatkonzentration im Bioreaktor zeigt ein Maximum bei 25 Stunden und fällt dann auf einen nahezu konstant bleibenden Wert ab.



**Bild 5.11: Propylacetatbildung**

Die Bildung des Aromastoffes Isobutylacetat ist in Bild 5.12 wiedergegeben.

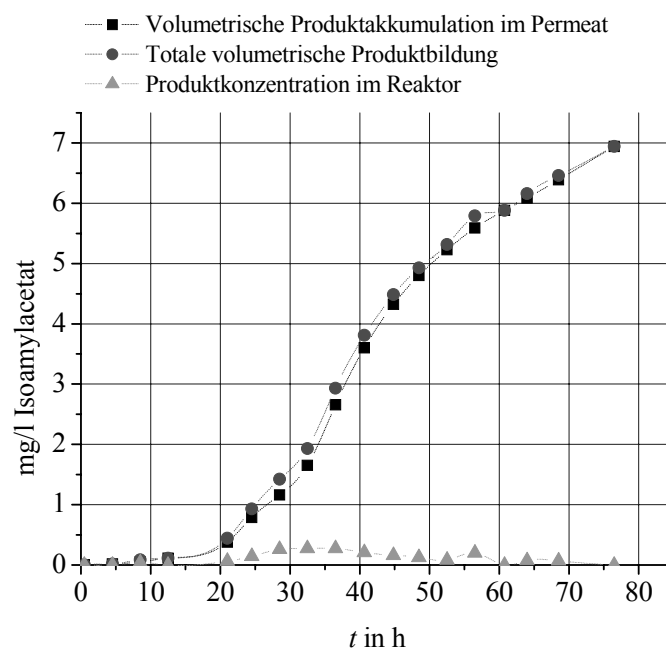


**Bild 5.12: Isobutylacetatbildung**

Die Isobutylacetatbildung zeigt einen Wendepunkt nach einer Prozessdauer von 35 Stunden und erreicht nach 76 Stunden einen Wert von 14,5 mg/l. Das Fermentationsprodukt Isobutyla-

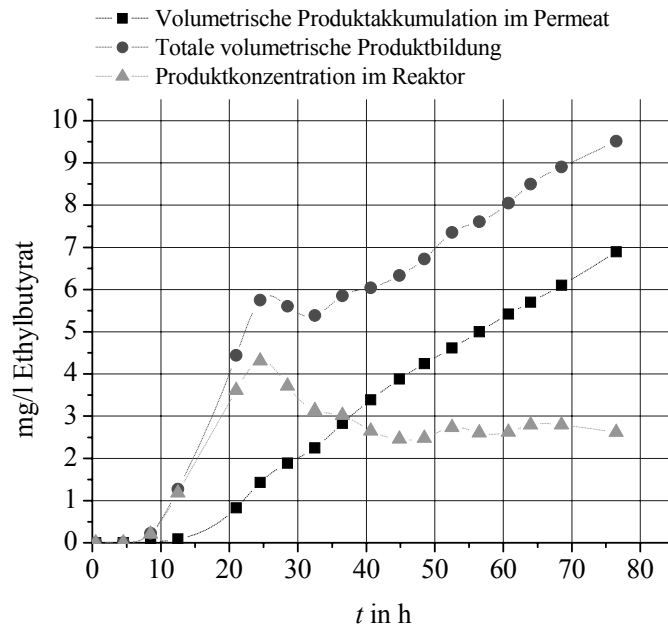
acetat geht im Pervaporation-Bio-Hybridprozess nahezu vollständig in das Permeat über. Der Produktanteil im Bioreaktor ist daher gering.

Wie aus Bild 5.13 hervorgeht, setzt die Bildung des Aromaesters Isoamylacetat nach einer Prozessdauer von 15 Stunden ein und zeigt bei 35 Stunden einen Wendepunkt. Nach 76 Stunden erreicht die Isoamylacetatbildung einen Wert von 7 mg/l. Isoamylacetat wurde im Pervaporation-Bio-Hybridprozess fast vollständig aus der Fermentationsbrühe abgetrennt, sodass der Produktanteil im Bioreaktor gering ausfällt. Die Isoamylacetatkonzentration in der Fermentationsbrühe erreicht ein Maximum nach einer Prozessdauer von 35 Stunden und nimmt im weiteren Verlauf ab.



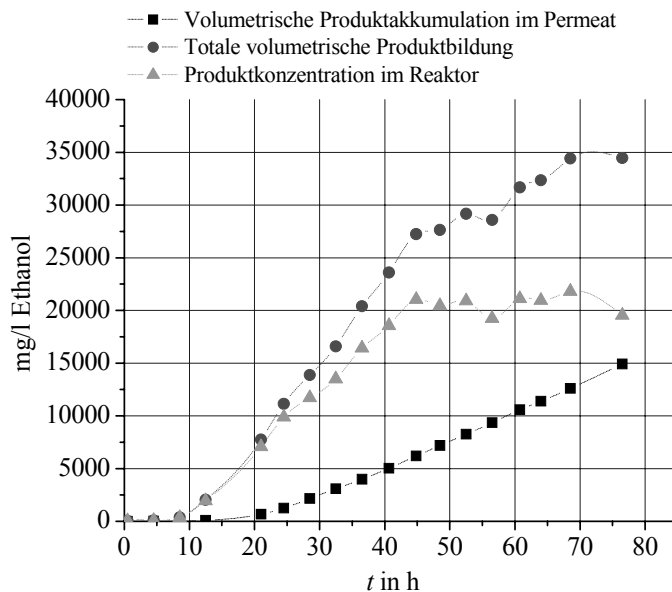
**Bild 5.13: Isoamylacetatbildung**

Bild 5.14 zeigt den zeitlichen Verlauf der Ethylbutyratbildung. Ethylbutyrat wird im Pervaporation-Bio-Hybridprozess nicht vollständig aus dem Bioreaktor entfernt. Nach einer Prozessdauer von 76 Stunden befinden sich noch 25 % des Ethylbutyrats in der Fermentationsbrühe. Die Produktkonzentration in der Fermentationsbrühe erreicht ein Maximum nach einer Prozessdauer von 25 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt weist ebenfalls die Produktbildungskurve ein lokales Maximum auf. Nach 76 Stunden der Fermentation wurden insgesamt 9,5 mg/l Ethylbutyrat gebildet.



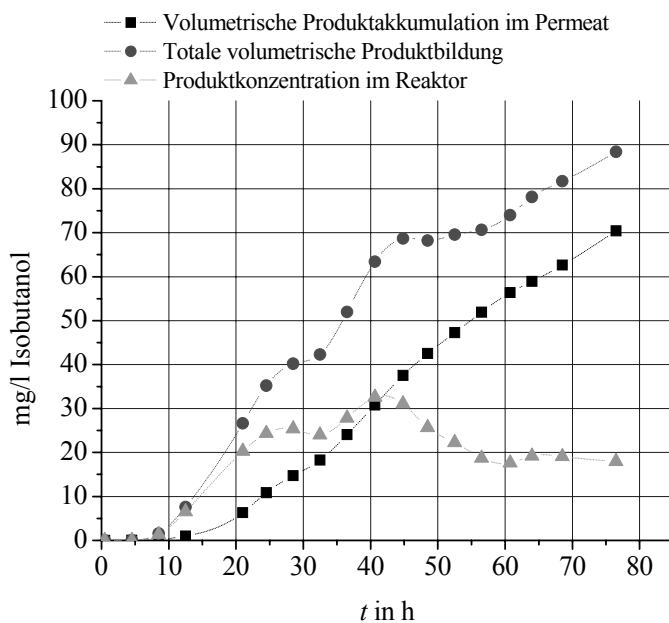
**Bild 5.14: Ethylbutyratbildung**

In Bild 5.15 ist die Ethanolbildung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess abgebildet. Die Ethanolbildung beginnt nach 10 Stunden. Der Produktanteil im Bioreaktor überwiegt den Produktanteil im Permeat. Nach einer Prozessdauer von 76 Stunden liegen noch über 50 % des Ethanols im Bioreaktor vor. Die Ethanolkonzentration in der Fermentationsbrühe steigt bis zur 45. Stunde an und bleibt im weiteren Verlauf auf einem konstanten Niveau. Nach einer Prozessdauer von 76 Stunden erreicht die Ethanolbildung einen Wert von rund 35 g/l.



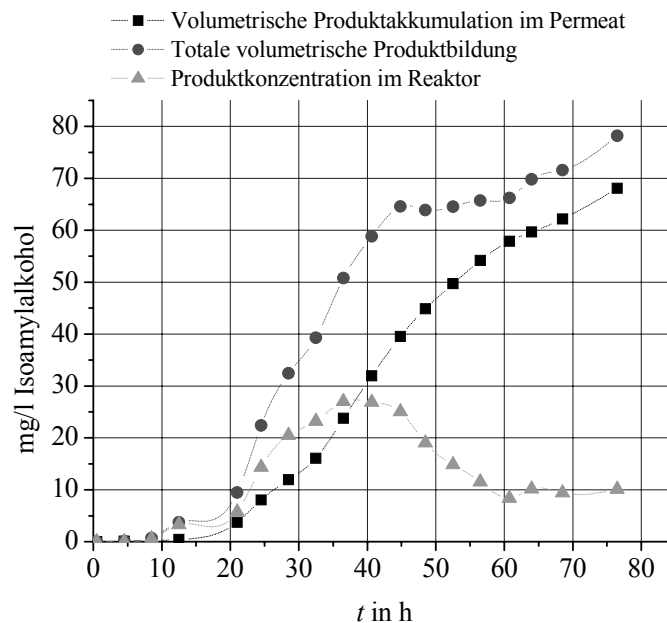
**Bild 5.15: Ethanolbildung**

Bild 5.16 zeigt die Isobutanolbildung. Isobutanol wird im Pervaporation-Bio-Hybridprozess nicht vollständig aus der Fermentationsbrühe entfernt, sodass nach einer Prozessdauer von 76 Stunden ein Produktanteil von rund 20 % im Bioreaktor verbleibt.



**Bild 5.16: Isobutanolbildung**

Die Isobutanolkonzentration im Bioreaktor zeigt ein ausgeprägtes Maximum nach einer Prozessdauer von 40 Stunden und nimmt im weiteren Verlauf der Fermentation bis zur 55. Stunde ab. Die Isobutanolbildung erreicht einen Wert von rund 90 mg/l.



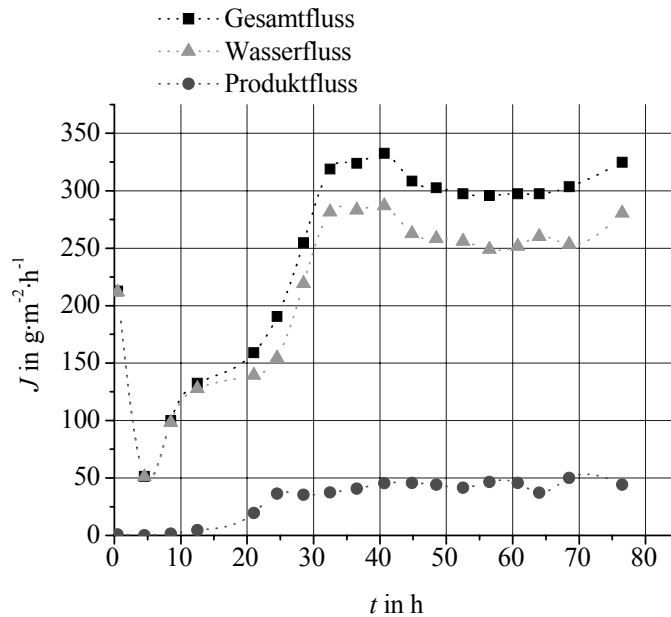
**Bild 5.17:** Isoamylalkoholbildung

Wie aus Bild 5.17 hervorgeht, setzt die Bildung von Isoamylalkohol nach einer Prozessdauer von 20 Stunden ein und erreicht nach 45 Stunden ein lokales Maximum. Im weiteren Verlauf nimmt die Produktbildungsgeschwindigkeit ab. Nach einer Prozessdauer von 76 Stunden erreicht die Isoamylalkoholbildung einen Wert von 78 mg/l. Die Reaktorkonzentration von Isoamylalkohol ist nach 35 Stunden maximal und nimmt sodann bis zur 60. Stunde ab.

### 5.2.2 Trenncharakteristik

Der Einsatz der Pervaporation im Bereich der Biotechnologie, insbesondere zur fermentations-simultanen Abtrennung von Aromastoffen, unterscheidet sich grundlegend von der Pervaporation technischer Lösungen. Im Pervaporation-Bio-Hybridprozess stellt die Fermentationsbrühe die Feedlösung für die Pervaporation dar. Eine Fermentationsbrühe ist in Bezug auf ihre Zusammensetzung im Gegensatz zu technischen Gemischen nicht statisch sondern hoch dynamisch. Durch Wachstum, Substratabbau und Produktbildung ändern sich die Bedingungen für den Pervaporationsprozess ständig. Die fermentations-synchrone Entwicklung von Trennleistung und Selektivität der Pervaporation muss daher bei der bioprozesstechnischen Charakterisierung des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses berücksichtigt werden. Das Verhalten der Pervaporation während des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses wurde anhand

folgender charakteristischer Größen erfasst: Zur Bewertung der Trennleistung wurden die Permeatflüsse der Fermentationsprodukte  $J_i$  herangezogen, zur Bewertung der Selektivität des Trennprozesses gegenüber einer Substanz  $i$  wurde der Anreicherungsfaktor  $\beta_i$  verwendet. Bild 5.18 zeigt die zeitlichen Verläufe des Gesamtpermeatflusses  $J_{ges}$ , des Wasserflusses  $J_{H_2O}$  und des Produktflusses  $J_{pr}$  im Pervaporation-Bio-Hybridprozess.



**Bild 5.18:** Zeitlicher Verlauf der Permeatflüsse

Der Gesamtpermeatfluss wurde bei der Probenahme gravimetrisch bestimmt. Der Produktfluss ist die Summe der Einzelflüsse aller Fermentationsprodukte:

$$J_{pr} = \sum_{i=1}^n J_i \quad (5.6)$$

Für den Wasserfluss gilt:

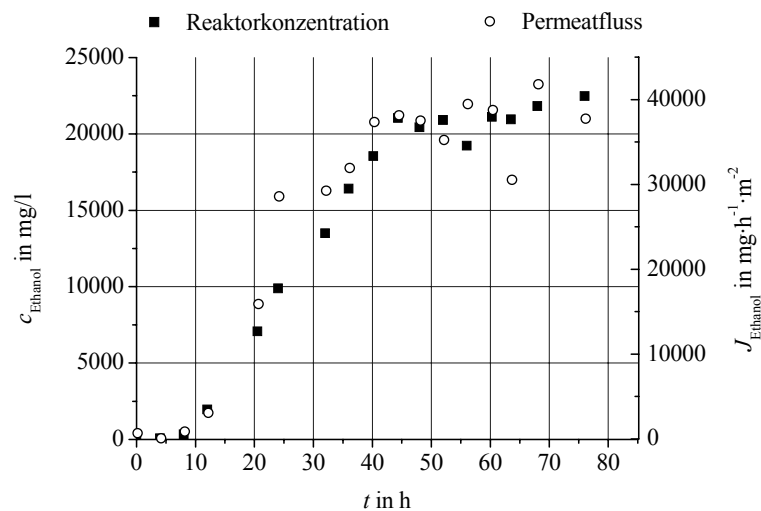
$$J_{H_2O} = J_{ges} - J_{pr} \quad (5.7)$$

Wie Bild 5.18 zeigt, verlaufen der Gesamt- und der Wasserfluss parallel. Der Anteil des Wassers am Gesamtfluss überwiegt deutlich den Produktanteil. Zu Beginn der Fermentation sinken der Gesamt- und der Wasserfluss von einem anfänglich hohen Wert auf ein Minimum bei 8 Stunden ab und steigen sodann wieder an, bis sie nach 35 Stunden der Fermentation einen Maximalwert erreichen, der bis zum Ende der Fermentation nahezu konstant bleibt. Die fermentationssynchrone Entwicklung des Produktflusses zeigt einen anderen Verlauf. Zu



Beginn der Fermentation ist der Produktfluss gleich null. Erst nach 20 Stunden der Fermentation erhöht er sich und erreicht nach 30 Stunden der Fermentation einen konstant bleibenden Wert. Durch Integration der Permeatflüsse über die Zeit und anschließende Multiplikation mit der Membranfläche des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors ergeben sich die über die gesamte Dauer des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses permeierten Stoffmengen: Nach einer Prozessdauer von 76,5 Stunden sind insgesamt 220 g Permeat angefallen. Das Permeat setzt sich aus 191 g Wasser und 29 g Produkt zusammen. Der Produktanteil im Permeat beträgt 13 %. Davon entfallen ca. 10 % auf Ethanol. Die übrigen Fermentationsprodukte bilden einen Anteil im Permeat von 3 %.

Im Folgenden wird der Frage nachgegangen, inwieweit die Höhe der Produktflüsse bei der Pervaporation von der Produktkonzentration im Reaktor abhängt. Dazu wird in Bild 5.19 stellvertretend für die Gruppe der Alkohole der zeitliche Verlauf des Ethanolflusses dem zeitlichen Verlauf der Ethanolkonzentration im Bioreaktor gegenübergestellt. Wie aus Bild 5.19 hervorgeht, stimmen die Verläufe des Permeatflusses und der Reaktorkonzentration von Ethanol – abgesehen von der Messwertstreuung – qualitativ überein.



**Bild 5.19:** Zeitliche Verläufe der Reaktorkonzentration und des Permeatflusses von Ethanol

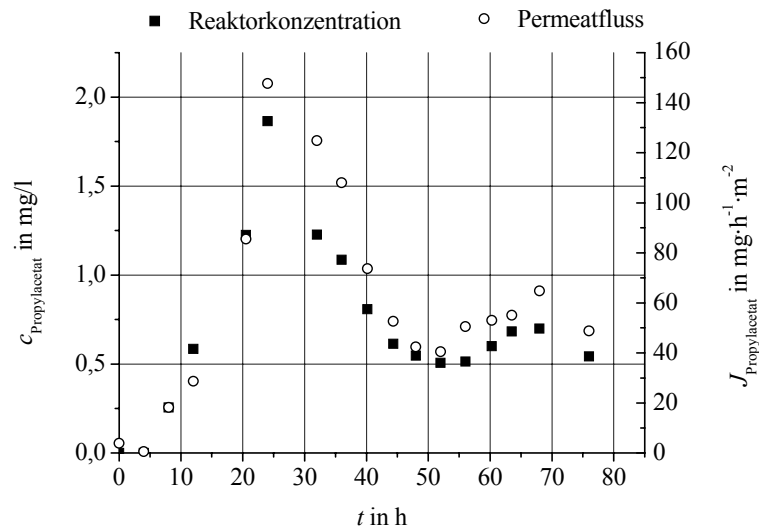
In Bild 5.20 wurde stellvertretend für die Gruppe der Ester der Fluss und die Reaktorkonzentration der Substanz Propylacetat gegenübergestellt. Auch bei Propylacetat zeigen der Fluss und die Konzentration im Reaktor parallele Verläufe (s. Bild 5.20).

Die Übereinstimmung der Verläufe von Permeatfluss und Reaktorkonzentration deutet darauf hin, dass eine Abhängigkeit des Permeatflusses von der Reaktorkonzentration besteht. Zur Überprüfung dieser Vermutung sind in Bild 5.21 bzw. Bild 5.22 die Flüsse von Ethanol bzw.

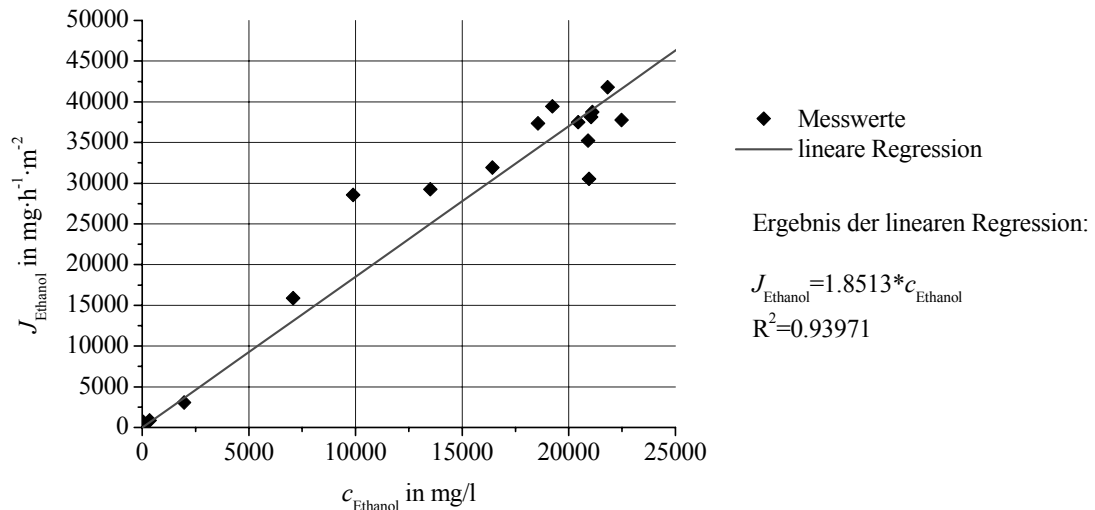
Propylacetat gegen ihre Reaktorkonzentration aufgetragen. Die Bestimmtheitsmaße der linearen Regression von  $R^2 = 0,94$  für Ethanol und  $R^2 = 0,93$  für Propylacetat bestätigen starke lineare Zusammenhänge. Die Steigung der Regressionsgeraden entspricht dem Stofftransportkoeffizienten  $k_i$ , für den der folgende Zusammenhang gilt (s. Gleichung (2.17)):

$$k_i \sim \frac{D_i^M \cdot S_i}{l} \quad (5.8)$$

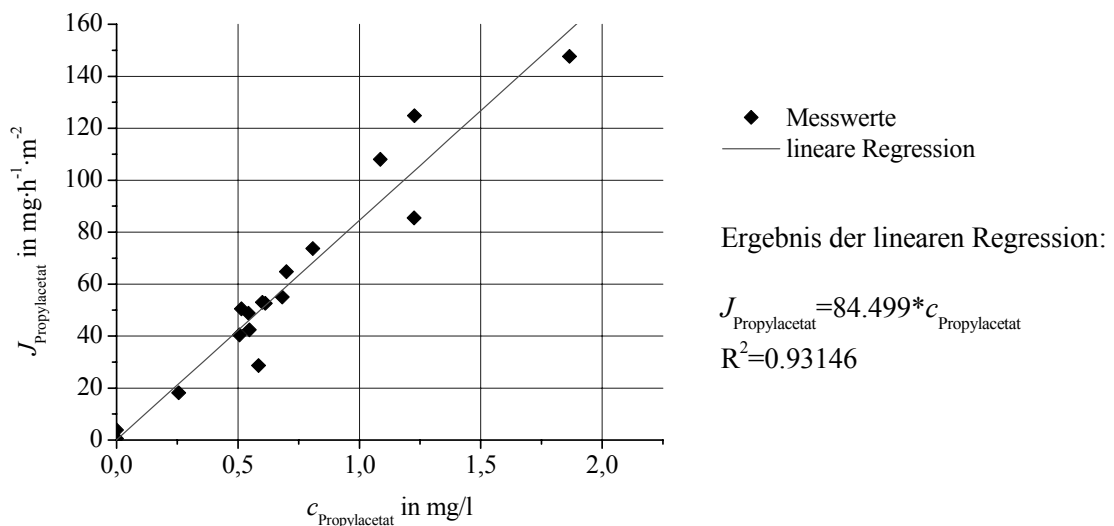
Die Stofftransportkoeffizienten der Fermentationsprodukte sowie die Bestimmtheitsmaße der linearen Regression sind in Tabelle 5.10 aufgeführt. Daneben enthält Tabelle 5.10 die maximalen gemessenen Permeatflüsse der Fermentationsprodukte.



**Bild 5.20:** Zeitliche Verläufe der Reaktorkonzentration und des Permeatflusses von Propylacetat

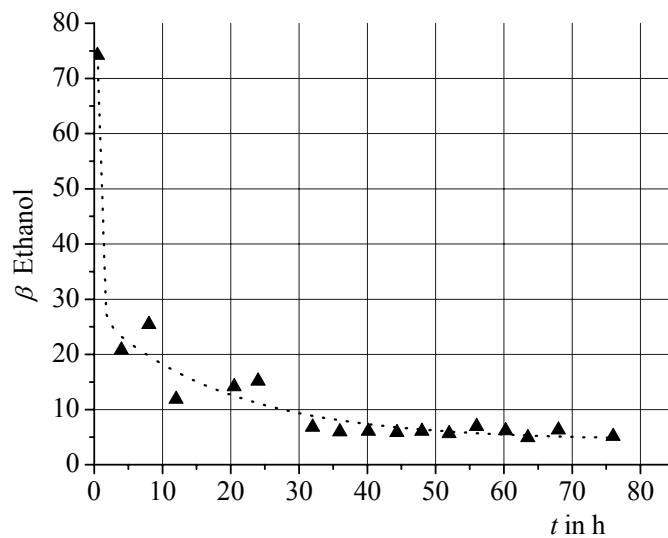


**Bild 5.21:** Abhängigkeit des Permeatflusses von der Reaktorkonzentration für Ethanol



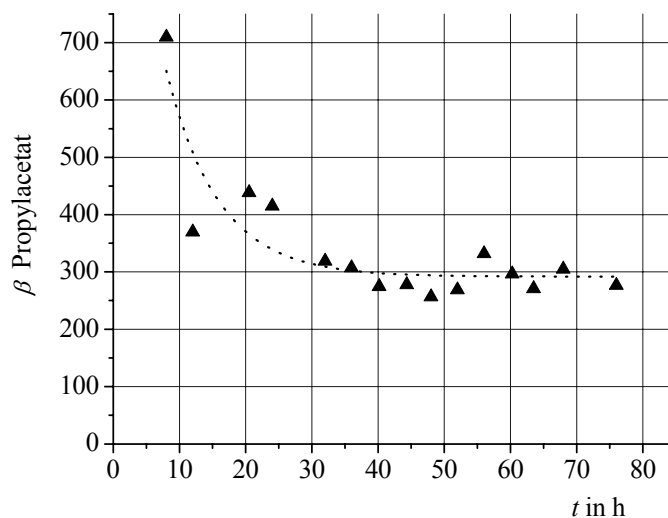
**Bild 5.22:** Abhängigkeit des Flusses von der Reaktorkonzentration für Propylacetat

Neben den Permeatflüssen wurden ebenso die Anreicherungs-faktoren der Fermentationsprodukte im Pervaporation-Bio-Hybridprozess bestimmt. Mit den Anreicherungs-faktoren  $\beta_i$  kann die Affinität des verwendeten Membranmaterials zu den Aromakomponenten und damit die Eignung der Membran für die untersuchte Trennaufgabe bewertet werden. Der zeitliche Verlauf der Anreicherungs-faktoren im Pervaporation-Bio-Hybridprozess stimmt bei allen Fermentationsprodukten qualitativ überein. Stellvertretend für die Gruppe der Alkohole zeigt Bild 5.23 den zeitlichen Verlauf des Anreicherungs-faktors für Ethanol.



**Bild 5.23:** Zeitlicher Verlauf des Anreicherungsfaktors für Ethanol

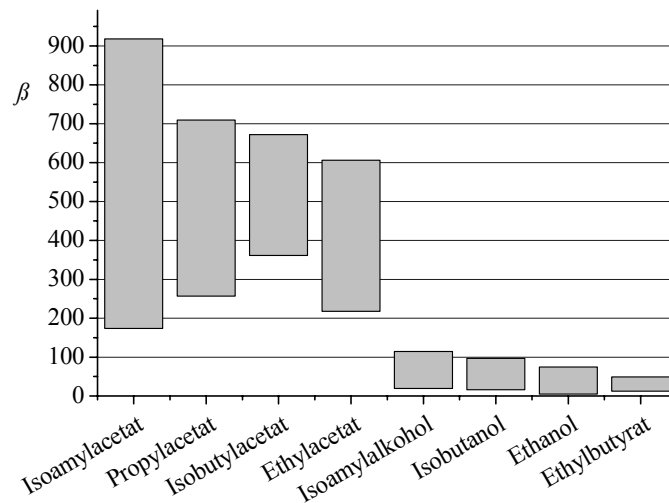
Bild 5.24 zeigt stellvertretend für die Stoffgruppe der Ester den zeitlichen Verlauf des Anreicherungsfaktors für Propylacetat im Pervaporation-Bio-Hybridprozess.



**Bild 5.24:** Zeitlicher Verlauf des Anreicherungsfaktors für Propylacetat

Aus Bild 5.23 und Bild 5.24 geht der Verlauf der Anreicherungsfaktoren der Fermentationsprodukte im Pervaporation-Bio-Hybridprozess hervor. Der am Beispiel von Ethanol und Propylacetat aufgezeigte Verlauf der Anreicherungsfaktoren ist für alle Fermentationsprodukte ähnlich: Von einem anfänglich hohen Wert nehmen die Anreicherungsfaktoren exponentiell ab und erreichen nach einer Prozessdauer von 30 Stunden ein konstantes Niveau.

In Bild 5.25 ist die gemessene Schwankungsbreite der Anreicherungsfaktoren für die Fermentationsprodukte dargestellt.



**Bild 5.25:** Schwankungsbreite der Anreicherungsfaktoren

Die durchschnittlichen Anreicherungsfaktoren  $\bar{\beta}_i$  wurden folgendermaßen berechnet:

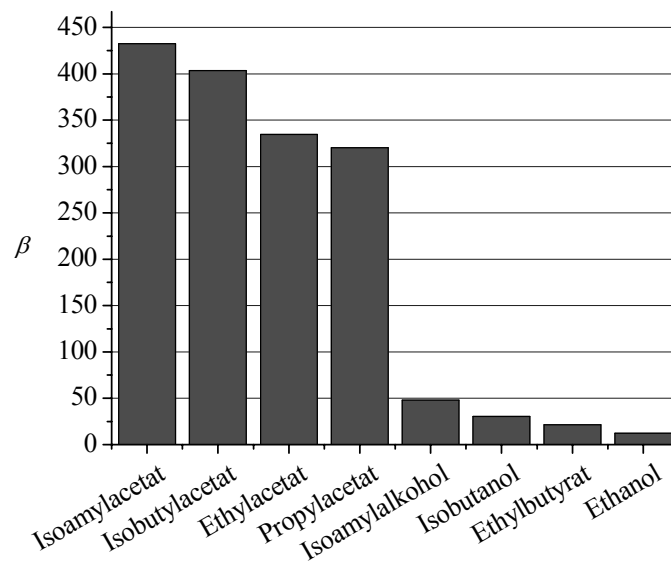
$$\bar{\beta}_i(t) = \frac{1}{t} \int_0^t \beta_i(t) \cdot dt \quad (5.9)$$

Der Verlauf des Anreicherungsfaktors zwischen zwei benachbarten Werten wurde dabei vereinfachend als linear angenommen. Die durchschnittlichen Anreicherungsfaktoren sind Tabelle 5.10 zu entnehmen.

**Tabelle 5.10:** Gemessene maximale Permeatflüsse, Stofftransportkoeffizienten und mittlere Anreicherungs-faktoren

Produkt $i$	$J_{i,mess}^{max}$ in $mg \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$	$k_i$ in $l \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$	$R^2$	$\bar{\beta}_i$
Ethanol	41785,2	1,851	0,9397	12,3
Isobutanol	237,3	7,182	0,9335	30,4
Isoamylalkohol	269,4	10,395	0,8943	47,9
Ethylacetat	7361,1	76,081	0,9588	334,7
Propylacetat	147,6	84,501	0,9314	320,2
Isobutylacetat	53,9	110,970	0,8435	403,3
Isoamylacetat	35,4	119,870	0,7737	432,5
Ethylbutyrat	27,2	5,540	0,9070	21,3

Bild 5.26 zeigt die durchschnittlichen Anreicherungs-faktoren im Pervaporation-Bio-Hybridprozess in absteigender Reihenfolge.



**Bild 5.26:** Mittlere Anreicherungs-faktoren der Fermentationsprodukte

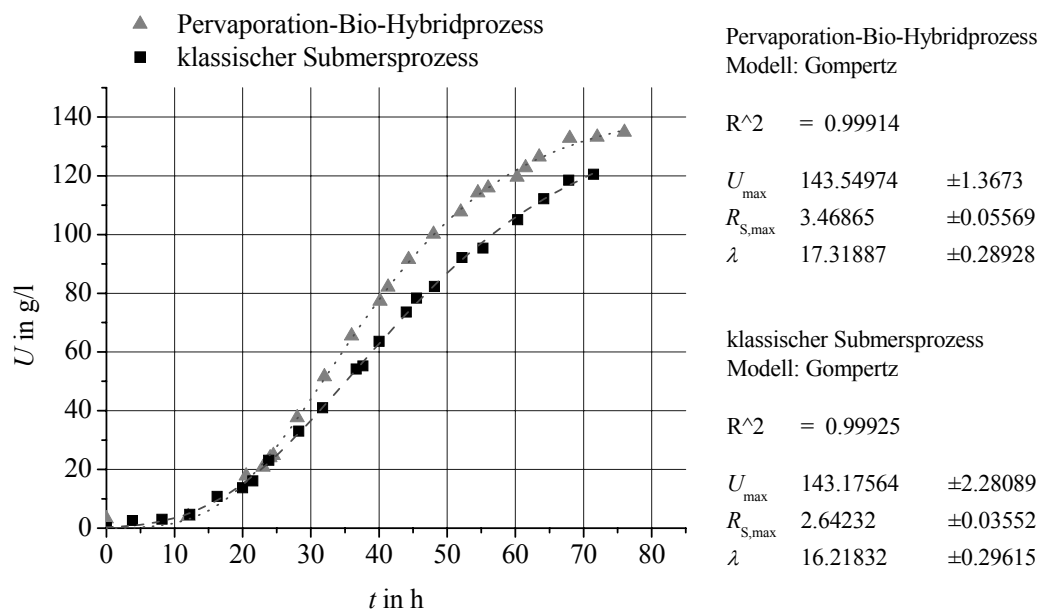
### 5.3 Vergleichende Untersuchungen

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Aromabiosynthese im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor mit den Ergebnissen der Aromabiosynthese im klassischen Submersverfahren, d. h. ohne In-situ-Produktabtrennung, verglichen. Das Ziel der Pervaporation-Bio-

Hybridtechnik ist die Effizienzerhöhung der fermentativen Aromagewinnung mit dem bioprozesstechnischen Mittel der In-situ-Produktabtrennung. Damit die Vergleichsfermentation unter exakt gleichen Bedingungen ablaufen konnte, wurde die Membran im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor durch eine Gummidichtung ersetzt und auf diese Weise die Fermentation in demselben Bioreaktor ohne Produktabtrennung durchgeführt (s. Abschnitt 4.2.5). Die Ergebnisse beider Verfahren werden im Folgenden anhand der Fermentationsverläufe, der Produktbildungskurven sowie der fermentationscharakteristischen Größen Ertragskoeffizient und Raum-Zeit-Ausbeute gegenübergestellt.

### Fermentationsverlauf

Bild 5.27 zeigt den Glucoseverbrauch im klassischen Submersprozess und im Pervaporation-Bio-Hybridprozess.



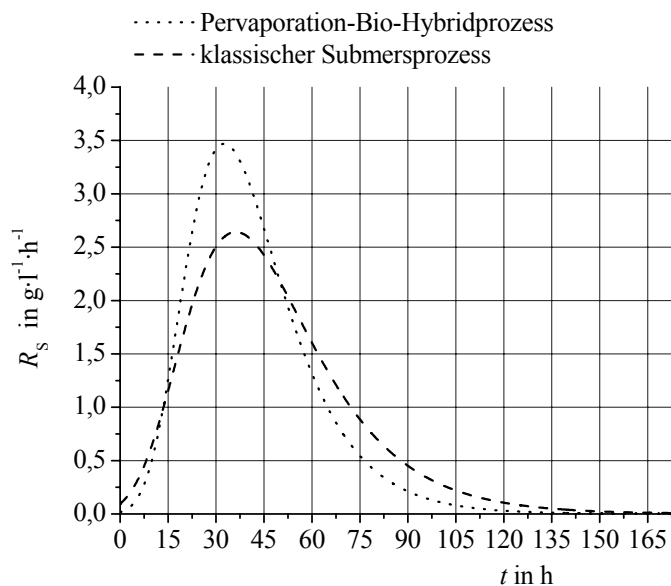
**Bild 5.27:** Vergleich des Glucoseverbrauchs

Der Glucoseverbrauch beider Fermentationen stimmt bis zu einer Prozessdauer von 30 Stunden überein. Im weiteren Verlauf übersteigt der Glucoseverbrauch im Pervaporation-Bio-Hybridprozess den Glucoseverbrauch der Vergleichsfermentation und erreicht nach einer Prozessdauer von 70 Stunden einen Wert von 135 g/l. Im klassischen Submersprozess sind nach 70 Stunden 120 g/l Glucose verbraucht worden, d. h. die Substratnutzung ist hierbei um 12,5 % geringer.

Die Anpassung der Gompertz-Gleichung an die Messwerte ist mit einem Bestimmtheitsmaß von in beiden Fällen  $R^2 > 0,999$  sehr gut (s. Bild 5.27). Im Pervaporation-Bio-Hybridprozess

beträgt die Dauer der lag-Phase  $\lambda = 17,3 \text{ h}$ . Im klassischen Submersprozess ist eine lag-Phase von  $\lambda = 16,2 \text{ h}$  zu beobachten. Die Fermentation im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor erreicht eine um 30 % höhere maximale Glucoseverbrauchsgeschwindigkeit von  $R_{S,\max} = 3,47 \frac{\text{g}}{\text{l} \cdot \text{h}}$ . Im Fall der klassischen Submersfermentation beträgt die maximale Glucoseverbrauchsgeschwindigkeit  $R_{S,\max} = 2,64 \frac{\text{g}}{\text{l} \cdot \text{h}}$ . Der maximale Glucoseverbrauch ( $U_{\max}$ ) für  $t \rightarrow \infty$  beträgt für beide Prozesse 143 g/l.

Die Glucoseverbrauchsgeschwindigkeiten im Pervaporation-Bio-Hybridprozess und im klassischen Submersprozess sind in Bild 5.28 gegenübergestellt. Die Glucoseverbrauchsgeschwindigkeiten wurden mit der ersten Ableitung der Gompertz-Gleichung berechnet. Die Glucoseverbrauchsgeschwindigkeit im Pervaporation-Bio-Hybridprozess erreicht einen höheren Maximalwert als im Vergleichsprozess. Im weiteren Verlauf bis zum Ende der Fermentation wird die Glucose im Pervaporation-Bio-Hybridprozess langsamer verstoffwechselt als im klassischen Submersprozess und der Glucoseverbrauch unterschreitet 15 Stunden früher einen Wert von  $0,5 \text{ g/(l} \cdot \text{h)}$ . Die Unterschreitung dieses Wertes war bei den Fermentationen das Kriterium zum Abbruch.

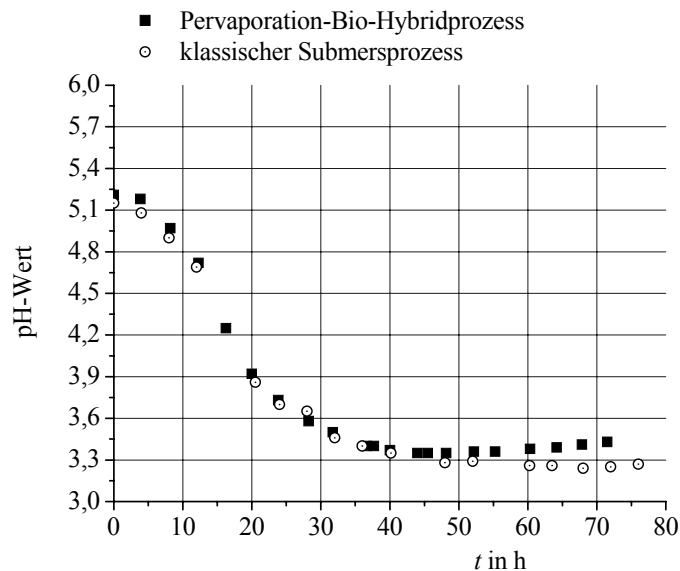


**Bild 5.28:** Vergleich der Glucoseverbrauchsgeschwindigkeit

Die zeitliche Entwicklung des pH-Wertes der Fermentationsbrühe im Pervaporation-Bio-Hybridprozess sowie im klassischen Submersprozess geht aus Bild 5.29 hervor. Die pH-Wertverläufe sind bis zu einer Prozessdauer von 40 Stunden identisch: Von einem Wert von

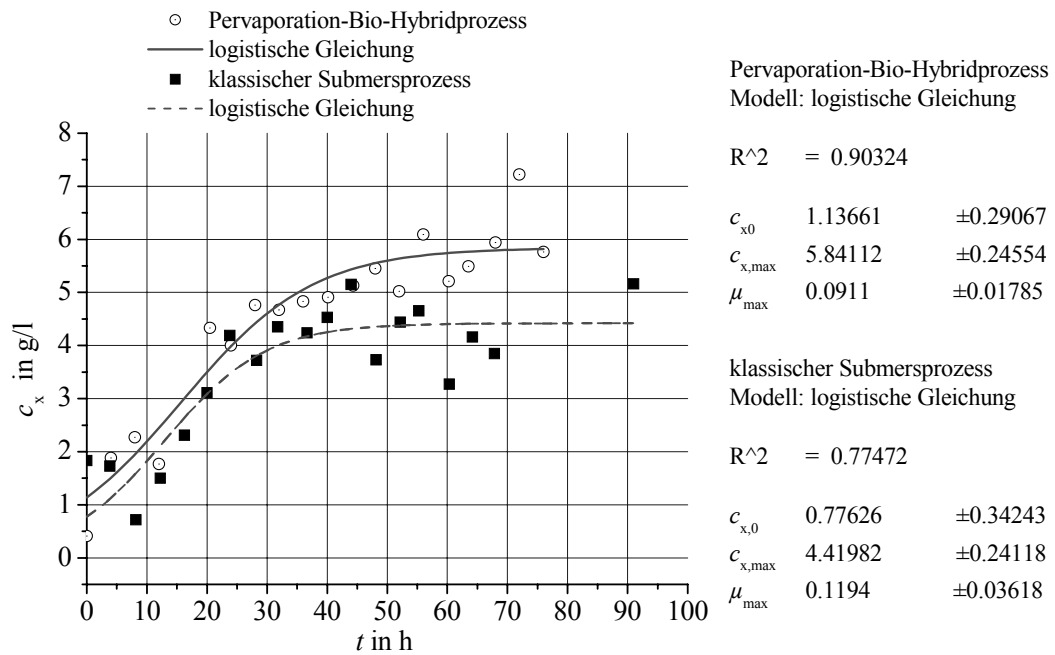


pH 5,2 zu Prozessbeginn fällt der pH-Wert der Fermentationsbrühe innerhalb von 40 Stunden auf einen Wert von pH 3,4. Im weiteren Verlauf sinkt der pH-Wert der Fermentationsbrühe im klassischen Submersprozess weiter, während der pH-Wert der Fermentationsbrühe im Pervaporation-Bio-Hybridprozess wieder leicht ansteigt.



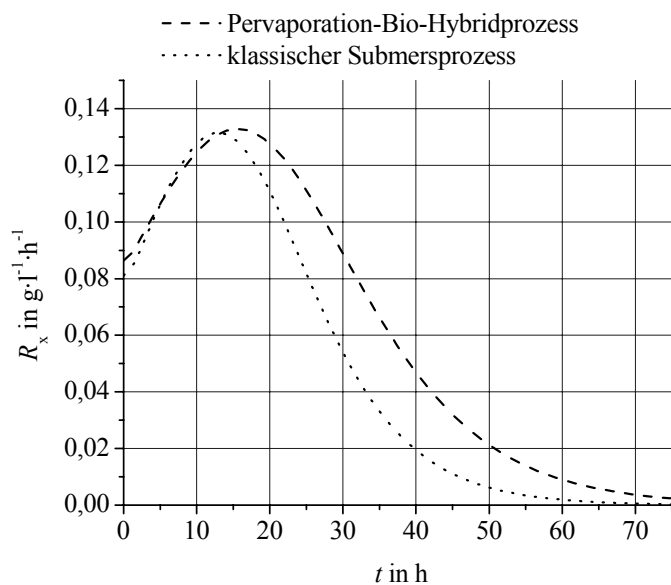
**Bild 5.29:** Vergleich des pH-Wertverlaufs

Bild 5.30 zeigt das Wachstum des Schimmelpilzes im Pervaporation-Bio-Hybridprozess und im klassischen Submersprozess sowie die Glättung der Messwerte mittels der logistischen Gleichung. Die Messwerte für die Biomasse streuen stark mit der Folge un stetiger Wachstumsverläufe. Die logistische Gleichung gibt die Biomasse zu Fermentationsbeginn für den Pervaporation-Bio-Hybridprozess mit einem Wert von  $c_{x0} = 1,13 \text{ g/l}$  und für den klassischen Submersprozess mit einem Wert von  $c_{x0} = 0,77 \text{ g/l}$  an. Der Zellgehalt der zum Animpfen verwendeten Vorkulturen war demzufolge unterschiedlich. Die Herstellung der Vorkultur erfolgte in beiden Fällen auf die gleiche Art und Weise (s. Abschnitt 4.2.3). Die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit ist im Pervaporation-Bio-Hybridprozess mit  $\mu_{\max} = 0,09 \text{ h}^{-1}$  geringer als im klassischen Submersprozess ( $\mu_{\max} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ ). Aus Bild 5.30 geht hervor, dass die maximale Biomasse im Pervaporation-Bio-Hybridprozess  $c_{x,\max} = 5,8 \text{ g/l}$  und im klassischen Submersprozess  $c_{x,\max} = 4,4 \text{ g/l}$  beträgt. Im Pervaporation-Bio-Hybridprozess wurde folglich eine höhere Zelldichte erreicht.



**Bild 5.30:** Vergleich des Wachstums

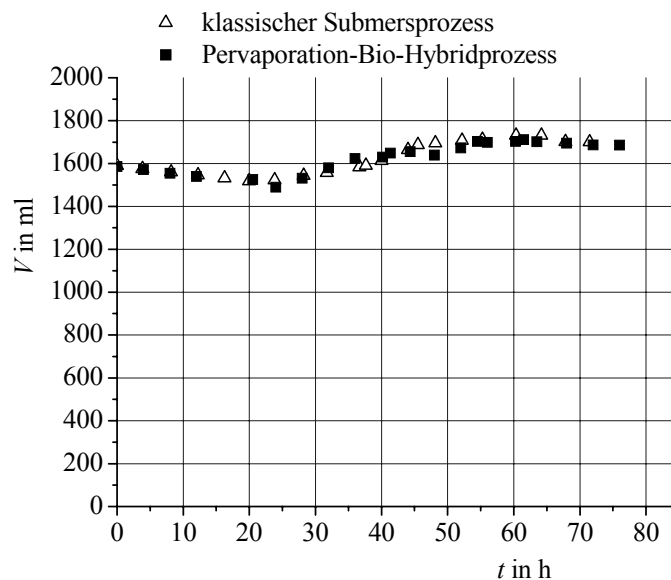
Bild 5.31 zeigt die Wachstumsgeschwindigkeit des Schimmelpilzes in den genannten Prozessen. Die Wachstumsgeschwindigkeiten wurden mit der ersten Ableitung der logistischen Gleichung berechnet.



**Bild 5.31:** Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit

Eine Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeiten nach dem Differenzenverfahren ist aufgrund der starken Streuung der Messwerte nicht möglich. Bis zu einer Prozessdauer von 15 Stunden unterscheiden sich die Wachstumsgeschwindigkeiten beider Fermentationen nicht. Die Wachstumsgeschwindigkeit erreicht bei beiden Prozessen einen Maximalwert von  $0,13 \text{ g}/(\text{l}\cdot\text{h})$ . Im Vergleich zum klassischen Submersprozess wächst der Schimmelpilz im Pervaporation-Bio-Hybridprozess ab der 15. Stunde mit einer höheren Geschwindigkeit.

Der zeitliche Verlauf des Fermentationsvolumens im Pervaporation-Bio-Hybridprozess und im klassischen Submersprozess ist in Bild 5.32 wiedergegeben. Das Fermentationsvolumen verändert sich aufgrund der Zufütterung und der Probenahme.



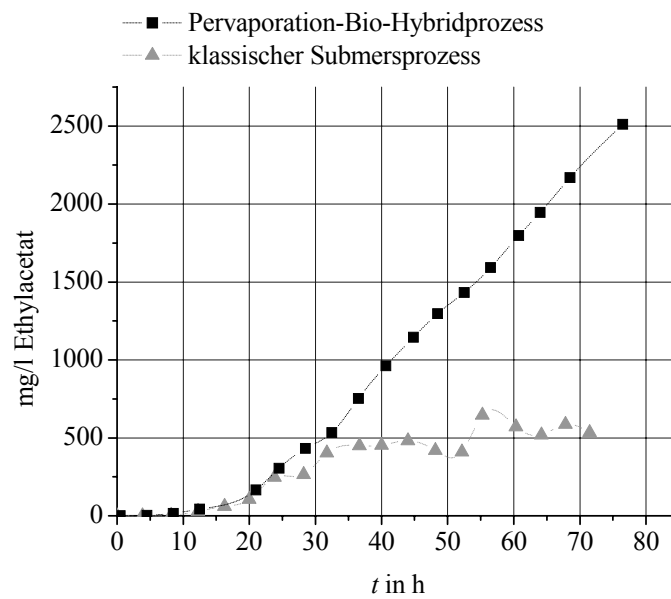
**Bild 5.32:** Vergleich des Fermentationsvolumens

Das Fermentationsvolumen kann sowohl für die klassische Submersfermentation als auch für den Pervaporation-Bio-Hybridprozess mit einem Mittelwert von 1,6 Litern näherungsweise konstant angenommen werden.

### Produktbildung

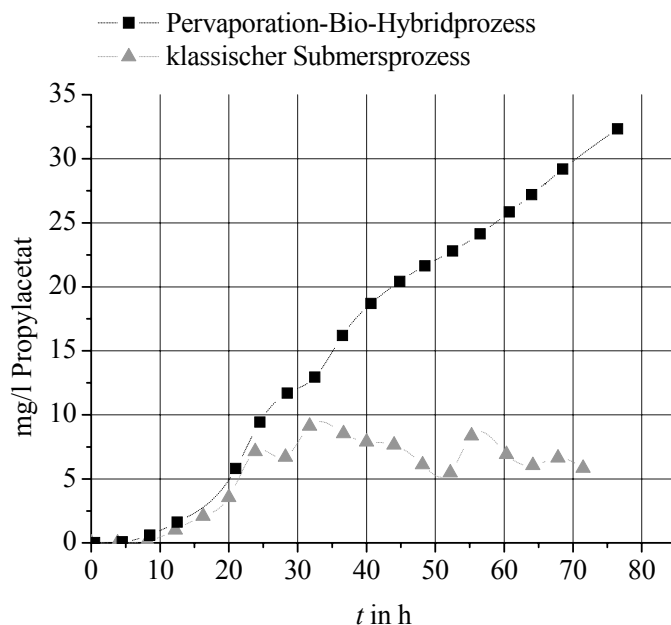
Bild 5.33 bis Bild 5.40 enthalten die Gegenüberstellung der Produktbildung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess und im klassischen Submersprozess. Die Produktbildung verläuft in beiden Prozessen bis zu einer Fermentationsdauer von 30 Stunden für alle Fermentationsprodukte gleich. Erst nach einer Prozessdauer von mehr als 30 Stunden übersteigt die Produktbildung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess diejenige im klassischen Submersprozess. Mit Ausnahme der Produkte Ethanol (Bild 5.38) und Ethylbutyrat (Bild 5.37) endet die Produkt-

bildung im klassischen Submersprozess nach 40 Stunden mit der Folge stagnierender Reaktorkonzentrationen.



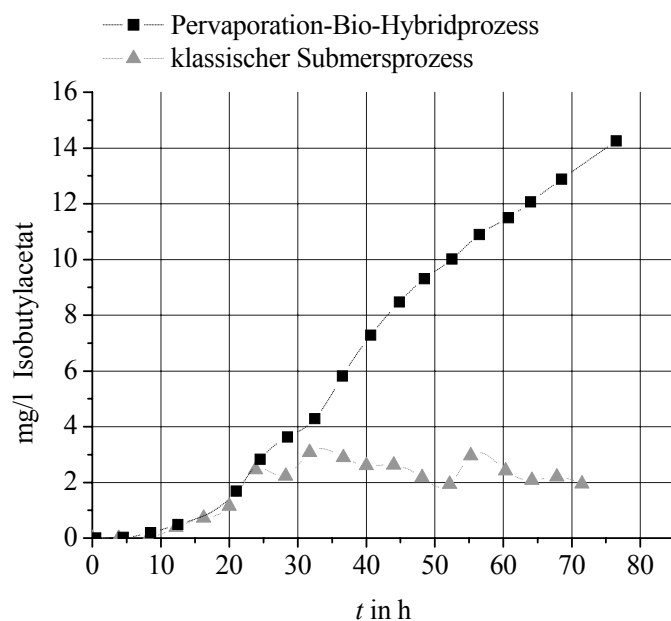
**Bild 5.33:** Vergleich der Ethylacetatbildung

Wie aus Bild 5.33 hervorgeht, beträgt die Ethylacetatkonzentration im klassischen Submersprozess 500 mg/l. Im Pervaporation-Bio-Hybridprozess steigt die Ethylacetatbildung um 400 % auf das Fünffache (2500 mg/l) an.



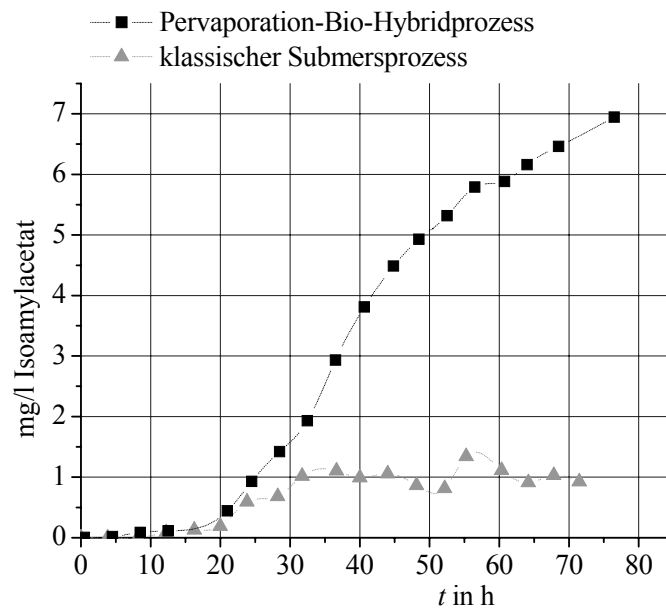
**Bild 5.34: Vergleich der Propylacetatbildung**

Ebenso ist für Propylacetat eine deutliche Steigerung der Produktbildung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess zu erkennen (s. Bild 5.34). Die Propylacetatbildung steigt um 250 %. Die maximale Konzentration von Propylacetat beträgt im klassischen Submersprozess 9 mg/l. Im Pervaporation-Bio-Hybridprozess wird eine volumetrische Produktbildung von 33 mg/l erreicht.



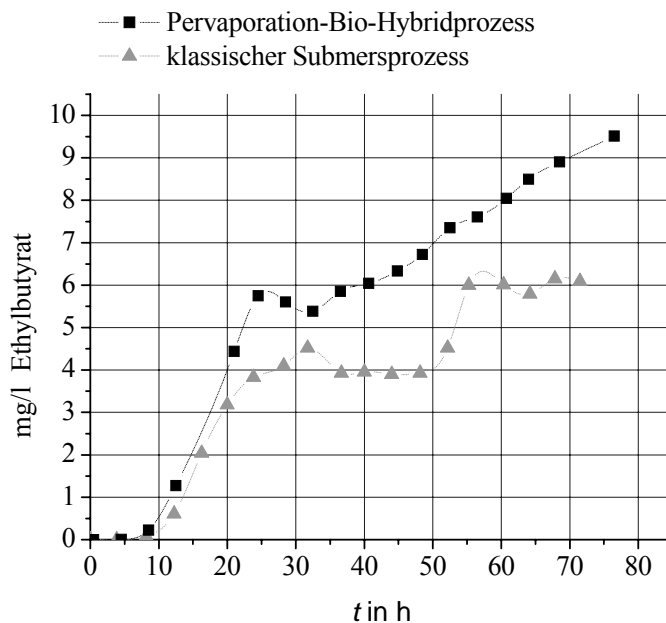
**Bild 5.35: Vergleich der Isobutylacetatbildung**

Bild 5.35 zeigt die Isobutylacetatbildung im klassischen Submersprozess im Vergleich zum Pervaporation-Bio-Hybridprozess. Die Bildung von Isobutylacetat steigt um 460 % von 2,5 mg/l im klassischen Submersprozess auf 14 mg/l im Pervaporation-Bio-Hybridprozess.



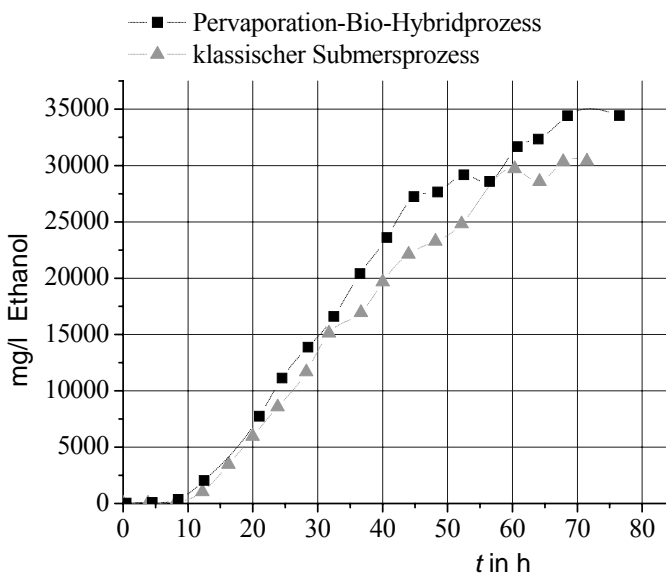
**Bild 5.36:** Vergleich der Isoamylacetatbildung

Anhand von Bild 5.36 ist erkennbar, dass im Pervaporation-Bio-Hybridprozess eine Steigerung der Bildung von Isoamylacetat um 600 % erreicht wird. Im klassischen Submersreaktor wird eine maximale Isoamylacetatkonzentration von 1 mg/l gemessen, während die volumetrische Produktbildung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess 7 mg/l beträgt.



**Bild 5.37: Vergleich der Ethylbutyratbildung**

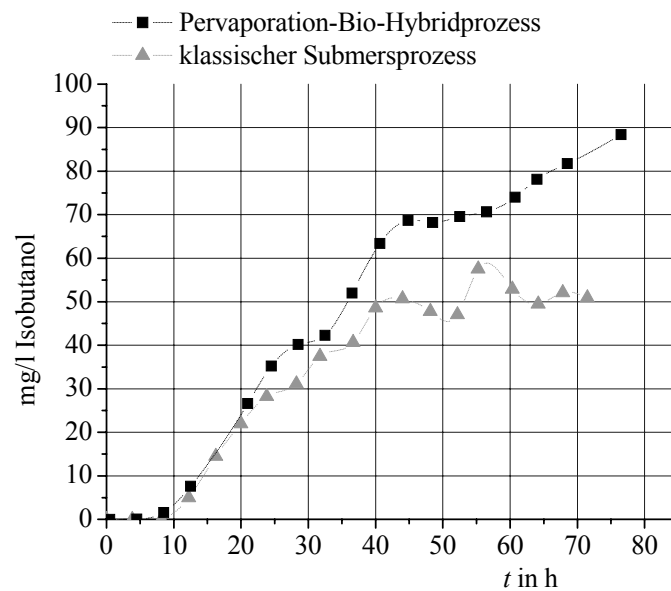
Wie aus Bild 5.37 hervorgeht, ist die Ethylbutyratbildung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess um 50 % höher als im klassischen Submersprozess.



**Bild 5.38: Vergleich der Ethanolbildung**

In Bild 5.38 ist die Ethanolbildung im klassischen Submersprozess sowie während des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses dargestellt. Die Ethanolbildung ist im Pervaporation-Bio-Hybridprozess um 16 % höher als im klassischen Submersprozess.

Bild 5.39 enthält die Produktbildungskurven beider Verfahren für Isobutanol. Die Zunahme der Isobutanolbildung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess im Vergleich zum klassischen Submersprozess beträgt 80 %.



**Bild 5.39:** Vergleich der Isobutanolbildung

Die Bildung des Fermentationsproduktes Isoamylalkohol bei den zwei untersuchten Verfahren lässt sich Bild 5.40 entnehmen. Im klassischen Submersprozess beträgt die Endkonzentration von Isoamylalkohol 45 mg/l, während die volumetrische Produktbildung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess einen Wert von 75 mg/l erreicht. Dies entspricht einem Anstieg der Isoamylalkoholbildung um 65 %.



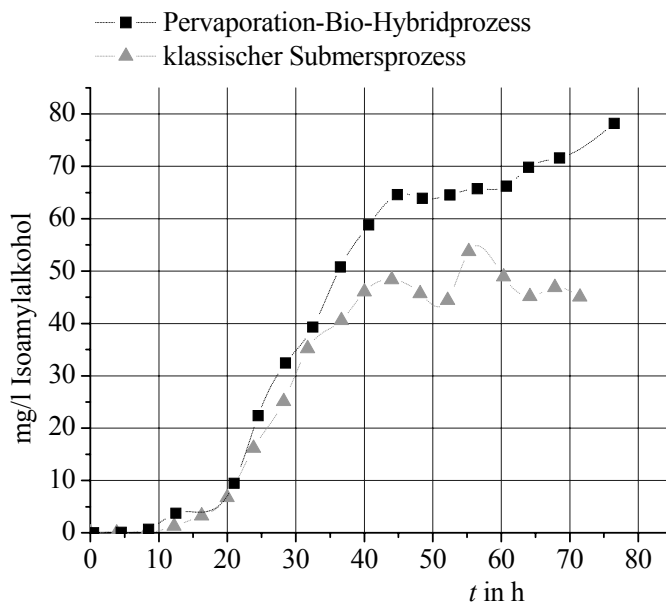


Bild 5.40: Vergleich der Isoamylalcoholbildung

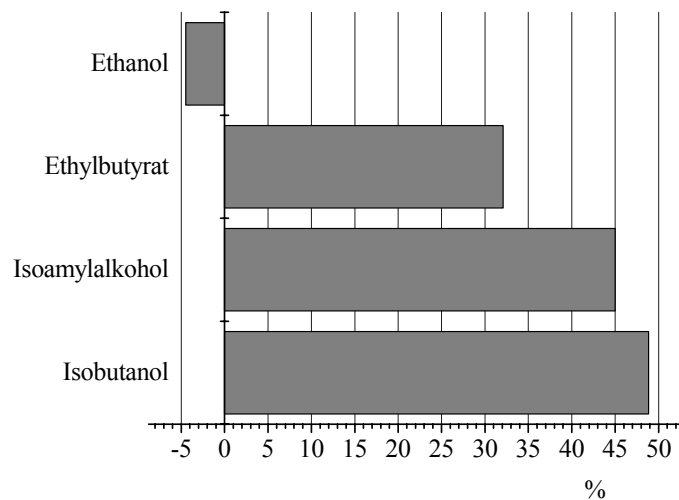
### 5.3.1 Glucoseertragskoeffizient

Zur Bewertung der Fermentationen im klassischen Submersreaktor und im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor sind in Tabelle 5.11 die zum Ende der Fermentation durchschnittlichen Glucoseertragskoeffizienten  $Y$  der Fermentationsprodukte aufgeführt. Der Glucoseertragskoeffizient gibt an, wie viel mg/l des Produktes durchschnittlich pro g/l verbrauchter Glucose gebildet wurden.

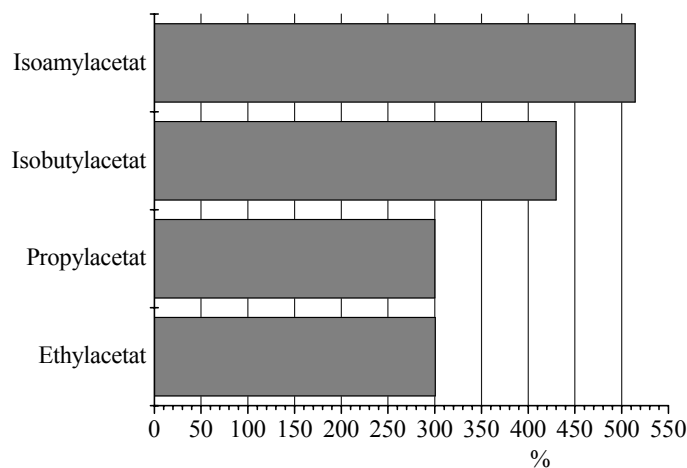
Tabelle 5.11: Glucoseertragskoeffizienten

	$Y$ in mg/g Klassischer Submersprozess	$Y$ in mg/g Pervaporation-Bio- Hybridprozess
<b>Ethanol</b>	267,10	255,14
<b>Isobutanol</b>	0,44	0,655
<b>Isoamylalcohol</b>	0,40	0,58
<b>Ethylacetat</b>	4,64	18,59
<b>Propylacetat</b>	0,06	0,24
<b>Isobutylacetat</b>	0,02	0,106
<b>Isoamylacetat</b>	0,0083	0,051
<b>Ethylbutyrat</b>	0,053	0,07

Mit Ausnahme des Produktes Ethanol konnte der Glucoseertragskoeffizient der Fermentationsprodukte im Pervaporation-Bio-Hybridprozess gesteigert werden. Die prozentuale Veränderung des Glucoseertragskoeffizienten im Pervaporation-Bio-Hybridprozess im Vergleich zum klassischen Submersprozess enthalten Bild 5.41 und Bild 5.42.



**Bild 5.41:** Prozentuale Änderung des Glucoseertragskoeffizienten im Pervaporation-Bio-Hybridprozess (Teil 1)



**Bild 5.42:** Prozentuale Änderung des Glucoseertragskoeffizienten im Pervaporation-Bio-Hybridprozess (Teil 2)

Der Glucoseertragskoeffizient von Ethanol nimmt im Pervaporation-Bio-Hybridprozess um 5 % ab. Die Glucoseertragskoeffizienten der übrigen Fermentationsprodukte sind im Pervapo-

ration-Bio-Hybridprozess um 33 % (Ethylbutyrat) bis 500 % (Isoamylacetat) höher als im klassischen Submersprozess.

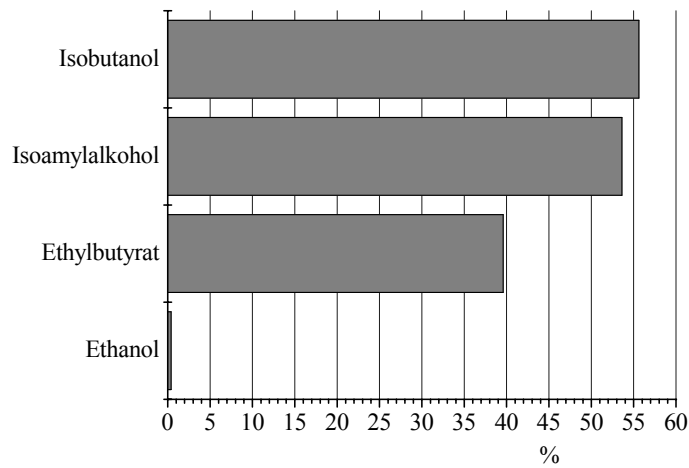
### 5.3.2 Raum-Zeit-Ausbeute

Eine wichtige Größe zur Beurteilung der Wirtschaftlichkeit bei der biotechnologischen Produktgewinnung ist die Raum-Zeit-Ausbeute. Die Raum-Zeit-Ausbeute ist der Quotient aus Produktkonzentration und Fermentationsdauer und gibt an, wie viel mg/l des Produktes durchschnittlich pro Stunde der Fermentation gebildet wurden. In Tabelle 5.12 sind die Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) der Fermentationsprodukte aufgeführt.

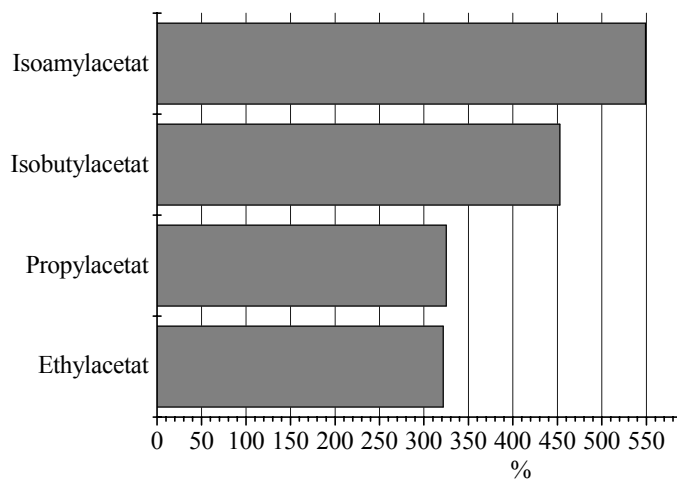
**Tabelle 5.12: Vergleich der Raum-Zeit-Ausbeute**

	RZA in $mg \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$	
	Klassischer Submersprozess	Pervaporation-Bio- Hybridprozess
<b>Ethanol</b>	448,2937	450,2458
<b>Isobutanol</b>	0,7426	1,1556
<b>Isoamylalkohol</b>	0,6655	1,0219
<b>Ethylacetat</b>	7,7818	32,8102
<b>Propylacetat</b>	0,0994	0,4228
<b>Isobutylacetat</b>	0,0337	0,1864
<b>Isoamylacetat</b>	0,0140	0,0908
<b>Ethylbutyrat</b>	0,0891	0,1244

Wie aus Tabelle 5.12 hervorgeht, konnten die Raum-Zeit-Ausbeuten der Fermentationsprodukte im Pervaporation-Bio-Hybridprozess erheblich gesteigert werden. Die prozentualen Zunahmen der Raum-Zeit-Ausbeuten im Pervaporation-Bio-Hybridprozess sind in Bild 5.43 sowie in Bild 5.44 dargestellt.



**Bild 5.43:** Prozentuale Zunahme der Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) im Pervaporation-Bio-Hybridprozess (Teil 1)



**Bild 5.44:** Prozentuale Zunahme der Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) im Pervaporation-Bio-Hybridprozess (Teil 2)

Die Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeuten reichen von einem Minimalwert von 0,4 % für Ethanol bis zu einem Maximalwert von 549 % für Isoamylacetat.

## 5.4 Bioprozessmodell

Um die Auslegung des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors charakterisieren und optimieren zu können, wurde ein Bioprozessmodell entwickelt. Ein solches Bioprozessmodell muss die wesentlichen Merkmale des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses erfassen, um das Prozessergebnis in bestimmten Grenzen berechnen und damit vorhersagen zu können. Dabei wird das Prozessverhalten auf möglichst einfache mathematische Gesetzmäßigkeiten zurückgeführt.

Das wesentliche Merkmal des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses ist die Produktabtrennung durch die Pervaporation. Das Prozessziel und -ergebnis ist die Produktbildung, die sich im Pervaporation-Bio-Hybridprozess aus der Reaktorkonzentration des Produktes und der volumetrischen Akkumulation des Produktes im Permeat zusammensetzt. Demzufolge muss das Bioprozessmodell die Reaktorkonzentration und die Produktakkumulation im Permeat berücksichtigen. Dies erfordert die gesetzmäßige Erfassung der Kinetik der Produktbildung bei der Fermentation sowie der Kinetik des Produktaustrages bei der Pervaporation. Darüber hinaus muss das Modell die Inhibierung der Produktbildung durch die Anwesenheit der Produkte in der Fermentationsbrühe einbeziehen. Mithilfe eines solchen Bioprozessmodells kann das Verhalten des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses über die Prozessbedingungen in den experimentellen Arbeiten hinaus berechnet werden. Dies ermöglicht die Charakterisierung und Optimierung der Auslegung des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors unter Berücksichtigung der Güte des Produktaustrages und führt zu einer tieferen Einsicht in die Zusammenhänge von Produktaustrag, Produktbildung und Produktinhibierung.

Das Pervaporation-Bio-Hybridprozessmodell beruht auf folgenden Annahmen:

1. Der Glucoseverbrauch folgt der Gompertz-Kinetik.
2. Die Produktbildung ist direkt proportional zur Glucoseverbrauchsgeschwindigkeit.
3. Der Produktaustrag ist direkt proportional zur Reaktorkonzentration des Produktes.
4. Die Inhibitionskinetik der Produktbildung ist linear.
5. Produktverluste durch Remetabolisierung und Belüftung werden vernachlässigt.

Im Folgenden werden die mathematischen Zusammenhänge für die Produktbildung, die Produktkonzentration im Reaktor, den Produktaustrag und die Produktakkumulation im Permeat erläutert.

Für die Produktbildungsgeschwindigkeit im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor  $R_p$  wurde unter der Annahme einer linearen Inhibitionskinetik mit dem Inhibitionskoeffizienten  $I_p$  und

mit der inhibitorisch wirksamen Reaktorkonzentration  $c_{reak}$  der folgende formalkinetische Zusammenhang unterstellt:

$$R_p(t) = \frac{dC_{ges}(t)}{dt} = Y_{max} \cdot R_S(t) \cdot \left(1 - \frac{c_{reak}(t)}{I_p}\right) \quad (5.10)$$

In Gleichung (5.10) wird ein linearer Zusammenhang zwischen der ungehemmten Produktbildung und der Glucoseverbrauchsgeschwindigkeit  $R_S$  angenommen. Dieser Modellierungsansatz entspricht dem Produktbildungstyp I nach Gaden (vgl. Abschnitt 2.4.4). Untersuchungen von FISCHBACH [70, S. 119] zeigten, dass die Aromastoffsynthese bei *Ceratocystis fimbriata* dem Produktbildungstyp I nach Gaden entspricht.

Die Glucoseverbrauchsgeschwindigkeit  $R_S$  ergibt sich aus der ersten Ableitung der Gompertz-Gleichung für den Glucoseverbrauch (Gleichung (2.29)) und es gilt:

$$R_S(t) = \frac{dU(t)}{dt} = U(t) \cdot \frac{R_{S,max} \cdot e}{U_{max}} \cdot e^{\left(\frac{R_{S,max} \cdot e}{U_{max}} \cdot (\lambda - t) + 1\right)} \quad (2.29)$$

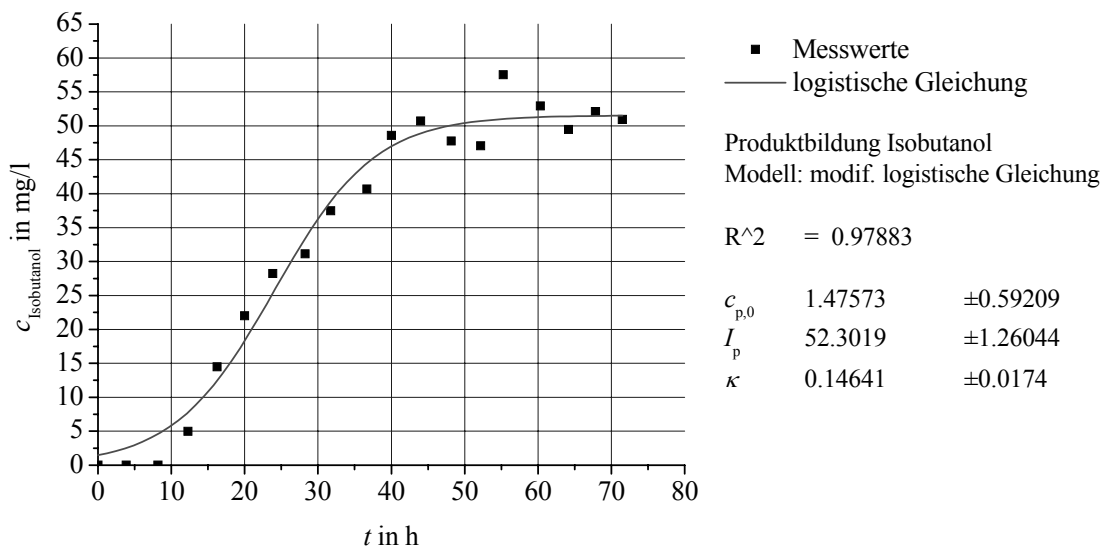
Der Faktor  $Y_{max}$  ist der theoretische Glucoseertragskoeffizient bei vollständig ungehemmter Produktbildung. Die Werte des theoretischen Glucoseertragskoeffizienten  $Y_{max}$  für die Fermentationsprodukte wurden durch Parameteroptimierung innerhalb des Differenzialgleichungssystems (5.19) ermittelt und finden sich in Tabelle 5.13.

Durch Multiplikation mit dem linearen Produktinhibitionsterm  $\left(1 - \frac{c_{reak}(t)}{I_p}\right)$  in Gleichung (5.10) wird die theoretische, d. h. ungehemmte Produktbildung zur realen Produktbildung  $R_p$ .

Der Wert des Inhibitionskoeffizienten  $I_p$  wurde mit den experimentellen Ergebnissen der klassischen Submersfermentation ermittelt. Dazu wurde der Inhibitionsterm innerhalb einer modifizierten logistischen Gleichung mittels nicht linearer Regression an die experimentellen Produktbildungsdaten der Submersfermentation angepasst. Die modifizierte logistische Gleichung lautet:

$$R_p(t) = \frac{I_p}{1 + \left(\frac{c_{p0}}{I_p} - 1\right) \cdot e^{K \cdot t}} \quad (5.11)$$

Im klassischen Submersprozess dauert die Produktbildung nicht bis zum Ende der Fermentation an sondern kommt vorher mit der Folge stagnierender Reaktorkonzentrationen zum Erliegen (s. Bild 5.33 bis Bild 5.40). Da im Fed-Batch-Betrieb keine Substratlimitierung für dieses Verhalten verantwortlich ist, kann die dabei erreichte Maximalkonzentration als die Konzentration einer 100%igen Produktinhibition der Produktbildung verstanden werden. Der durch Anpassung der modifizierten logistischen Gleichung an die Experimentaldaten der Submersfermentation ermittelte Wert der maximalen Produktkonzentration ist folglich gleich dem Inhibitionskoeffizient  $I_p$  und wird in Gleichung (5.10) für die Modellbildung verwendet. Bild 5.45 zeigt am Beispiel Isobutanol das Ergebnis der Anpassung des Inhibitionsterms innerhalb der modifizierten logistischen Gleichung an die Isobutanolbildung im klassischen Submersprozess. Die Parameteroptimierung durch nicht lineare Regression ergab eine maximale Produktkonzentration von  $I_p = 51,54 \text{ mg/l}$ . Die auf diese Weise ermittelten Werte der Inhibitionskoeffizienten der Fermentationsprodukte sind in Tabelle 5.13 aufgeführt.



**Bild 5.45:** Ermittlung des Inhibitionskoeffizienten  $I_p$  durch Anpassung einer modifizierten logistischen Gleichung an die Messwerte für die Produktbildung der klassischen Submersfermentation

Für die modellmäßige Erfassung des volumetrischen Produktaustrages  $\Phi_i(t)$  bei der Pervaporation gilt:

$$\Phi_i(t) = \frac{dc_{i,reak}}{dt} = \frac{dC_{i,perm}}{dt} = J_i(t) \cdot \frac{A}{V} \quad (5.12)$$

Der Fluss  $J_i(t)$  kann durch folgenden linearen Zusammenhang berechnet werden:

$$J_i(t) = k_i \cdot c_{i,reak}(t) \quad (5.13)$$

Bei dem Faktor  $k_i$  in Gleichung (5.13) handelt es sich um den Stofftransportkoeffizient (s. Tabelle 5.10). Nach Einsetzen von Gleichung (5.13) in Gleichung (5.12) gilt für den volumetrischen Produktaustrag:

$$\Phi_i(t) = k_i \cdot c_{i,reak}(t) \cdot \frac{A}{V} \quad (5.14)$$

Führt man den volumetrischen Produktaustragskoeffizienten  $\phi_i$  mit

$$\phi_i = k_i \cdot \frac{A}{V} \quad (5.15)$$

ein, so vereinfacht sich Gleichung (5.14) zu

$$\Phi_i(t) = \phi_i \cdot c_{i,reak}(t) \quad (5.16)$$

Der volumetrische Produktaustragskoeffizient  $\phi_i$  ist nach Gleichung (5.15) das Produkt des Stofftransportkoeffizienten  $k_i$  und des Volumen-Membranfläche-Verhältnisses  $\frac{V}{A}$ . Da die Stofftransportkoeffizienten der Fermentationsprodukte in Abschnitt 5.2.2 durch lineare Regression bestimmt worden sind und das Volumen-Membranfläche-Verhältnis bekannt ist, können die volumetrischen Produktaustragskoeffizienten nach Gleichung (5.15) berechnet werden. Die Werte der volumetrischen Produktaustragskoeffizienten  $\phi_i$  sind Tabelle 5.13 zu entnehmen.

Die Reaktorkonzentration im Pervaporation-Bio-Hybridprozess wird durch die Produktbildung und den Produktaustrag bestimmt. Durch Kombination der Gleichungen für die Produktbildung (5.10) und für den Produktaustrag (5.16) erhält man folgenden Zusammenhang für die Reaktorkonzentration eines Produktes  $i$  im Pervaporation-Bio-Hybridprozess:

$$\frac{dc_{i,reak}}{dt} = R_{P,i}(t) - \phi_i \cdot c_{i,reak}(t) \quad (5.17)$$

Die mathematische Erfassung der volumetrischen Akkumulation des Produktes  $i$  im Permeat ist gegeben durch:

$$C_{i,perm}(t) = \phi_i \cdot \int_0^t c_{i,reak}(t) \cdot dt \quad (5.18)$$



Durch Kombination der Gleichungen (5.10), (5.16) und (5.17) ergibt sich ein System zweier gekoppelter Differenzialgleichungen:

$$R_p(t) = Y_{max} \cdot R_S(t) \cdot \left(1 - \frac{c_{reak}(t)}{I_p}\right)$$

$$\frac{dc_{reak}}{dt} = Y_{max} \cdot R_S(t) \cdot \left(1 - \frac{c_{reak}(t)}{I_p}\right) - \phi_i \cdot c_{reak}(t)$$
(5.19)

mit

$$R_S(t) = U(t) \cdot \frac{R_{S,max} \cdot e}{U_{max}} \cdot \exp\left(\frac{R_{S,max} \cdot e}{U_{max}} \cdot (\lambda - t) + 1\right)$$
(2.29)

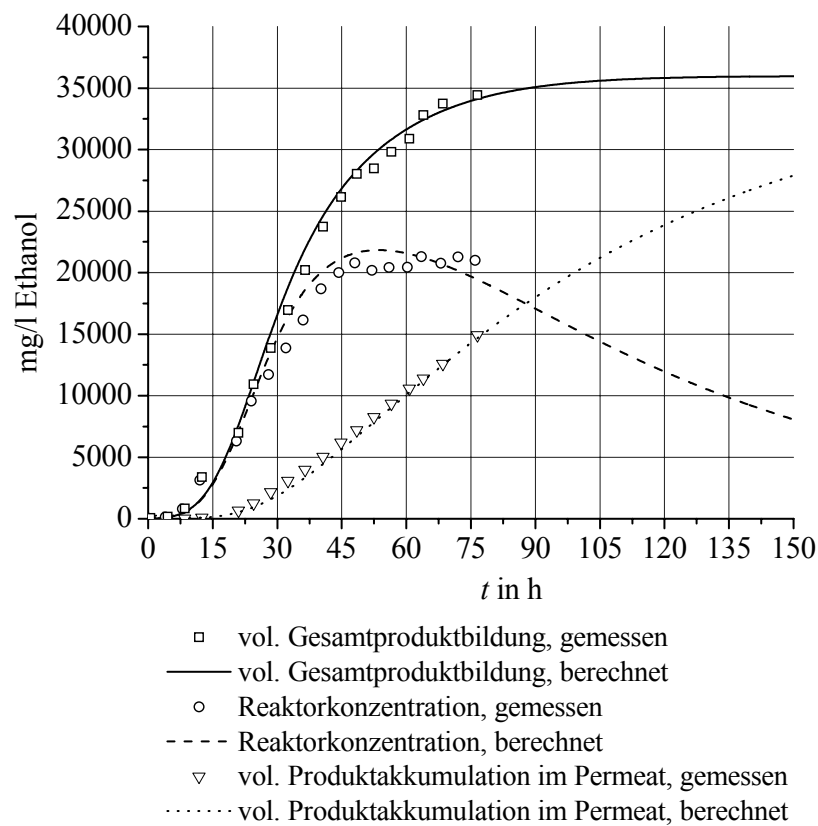
Die Lösung des Differenzialgleichungssystems (5.19) erfolgte numerisch unter Nutzung der Software MATHCAD 2001i PROFESSIONAL.

Tabelle 5.13 enthält die Koeffizienten des Modells für die Fermentationsprodukte einschließlich der Bestimmtheitsmaße der Modellanpassung an die Experimentaldaten (s. Bild 5.46 bis Bild 5.53).

**Tabelle 5.13: Koeffizienten und Bestimmtheitsmaße des Bioprozessmodells**

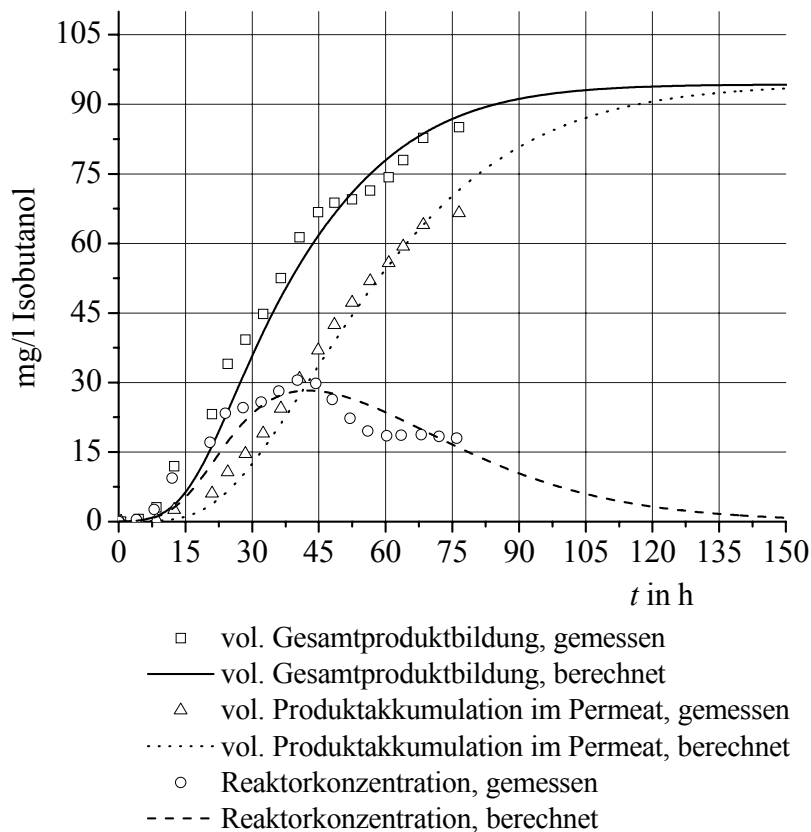
	$Y_{max}$ in mg/g	$I_p$ in mg/l	$\phi_i$ in h <sup>-1</sup>	$R^2$ ( $c_{ges}$ )	$R^2$ ( $c_{reak}$ )	$R^2$ ( $c_{perm}$ )
<b>Ethanol</b>	510,22933	31805,73064	0,013538	0,996	0,984	0,998
<b>Isobutanol</b>	1,11080	52,30190	0,052520	0,984	0,876	0,992
<b>Isoamylalkohol</b>	0,81607	47,58449	0,076013	0,976	0,830	0,992
<b>Ethylacetat</b>	18,97452	546,67232	0,556342	0,962	0,458	0,966
<b>Propylacetat</b>	0,25814	7,13393	0,617913	0,990	0,555	0,992
<b>Isobutylacetat</b>	0,11268	2,44143	0,811468	0,996	0,841	0,996
<b>Isoamylacetat</b>	0,05755	1,02102	0,876549	0,994	0,903	0,992
<b>Ethylbutyrat</b>	0,11022	7,29288	0,040511	0,916	0,514	0,968

In Bild 5.46 bis Bild 5.53 sind die Modellergebnisse in Form einer Gegenüberstellung der gemessenen und berechneten Konzentrationsverläufe der Fermentationsprodukte dargestellt. Die berechneten Produktkonzentrationsverläufe wurden bis zum Zeitpunkt  $t = 150$  Stunden extrapoliert.



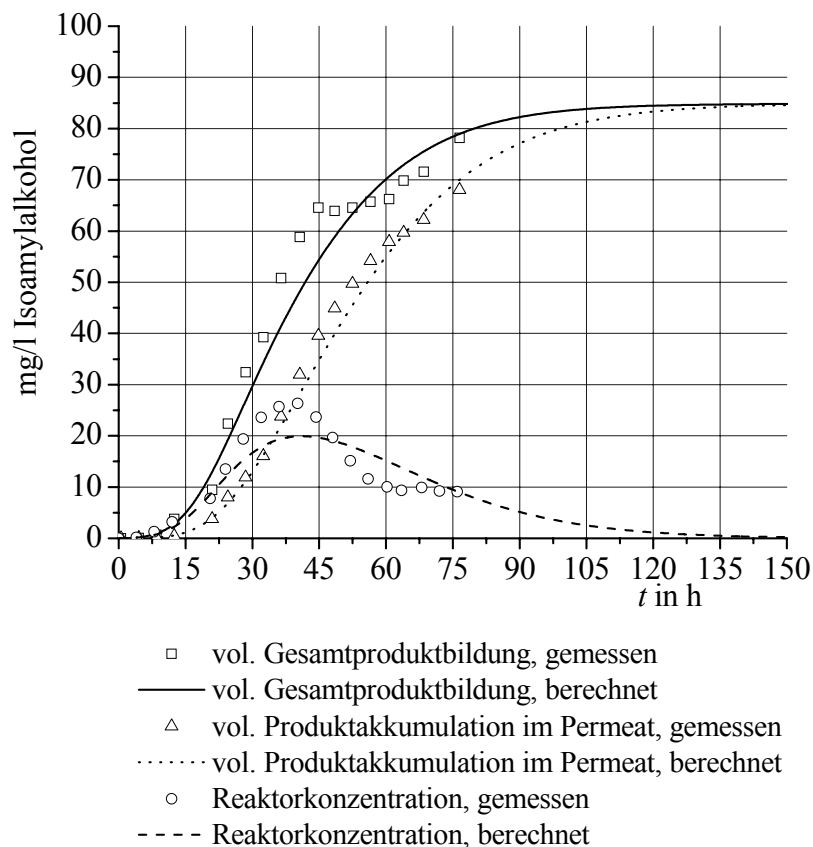
**Bild 5.46: Modellergebnis für die Ethanolbildung**

Bild 5.46 zeigt die mit dem Bioprozessmodell berechneten Werte für die Ethanolbildung und die dazugehörigen Messwerte. Das Bestimmtheitsmaß für die Übereinstimmung der berechneten Werte mit den Messwerten beträgt für die Reaktorkonzentration  $R^2 = 0,984$ , für die Produktakkumulation im Permeat  $R^2 = 0,998$  und für die Gesamtproduktbildung  $R^2 = 0,996$ . Anhand von Bild 5.46 ist erkennbar, dass eine Weiterführung des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses zu keiner Zunahme der Gesamtmenge des Ethanols führt, aber weiteres Ethanol aus dem Reaktor in das Permeat übergeht. Eine vollständige Abtrennung des Ethanols im Pervaporation-Bio-Hybridprozess erfordert eine Prozessdauer von mehr als 150 Stunden.



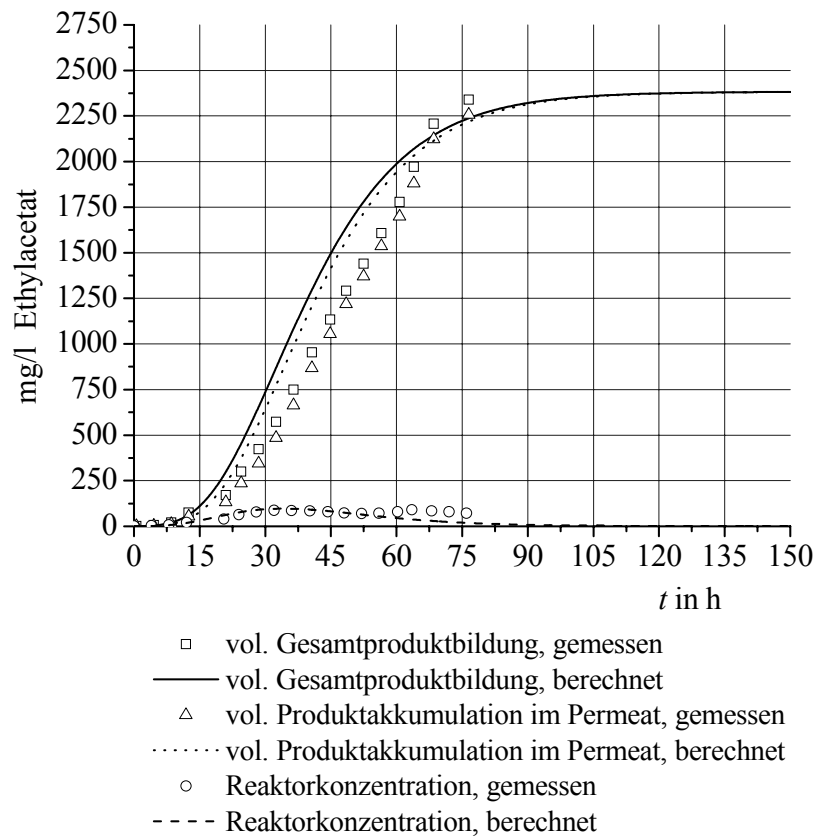
**Bild 5.47: Modellergebnis für die Isobutanolbildung**

In Bild 5.47 sind die Modellergebnisse sowie die Messwerte für die Bildung von Isobutanol dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß der Korrelation der Wertepaare beträgt für die Gesamtproduktbildung  $R^2 = 0,984$  und für die Produktakkumulation im Permeat  $R^2 = 0,992$ . Die gemessenen Werte der Reaktorkonzentration weichen geringfügig von den berechneten Werten ab. Die Modellwerte und die Messwerte der Reaktorkonzentration korrelieren mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,876$ . Wie Bild 5.47 zu entnehmen ist, nimmt die vollständige Überführung des Produktanteils in der Fermentationsbrühe in das Permeat eine Prozessdauer von 150 Stunden in Anspruch.



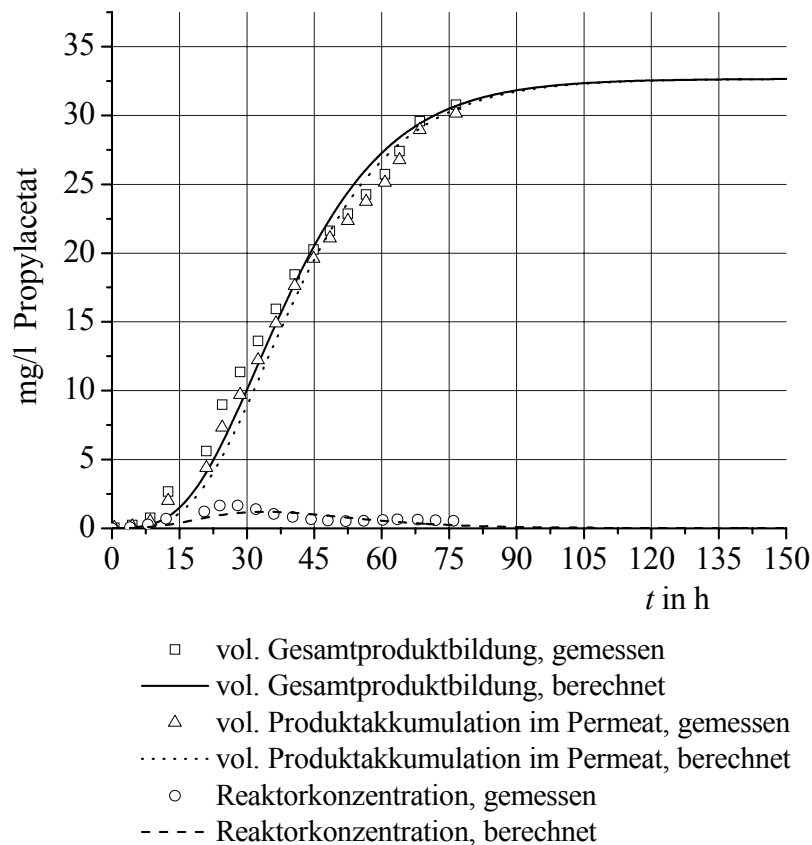
**Bild 5.48:** Modellergebnis für die Isoamylalkoholbildung

Bild 5.48 vergleicht das Modellergebnis für die Isoamylalkoholbildung mit den dazugehörigen Messwerten. Die berechneten und die experimentellen Ergebnisse der Reaktorkonzentration von Isoamylalkohol korrelieren mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,830$ . Das Modell unterschätzt die maximale Reaktorkonzentration und weicht im weiteren Verlauf von den Messwerten ab. Das Bestimmtheitsmaß für die Korrelation der gemessenen und berechneten Reaktorkonzentrationen beträgt  $R^2 = 0,962$ . Die gemessenen und berechneten Werte für die Produktakkumulation korrelieren mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,966$ . Die Extrapolation der Modellwerte über den Versuchszeitraum hinaus zeigt, dass nach einer Prozessdauer von 135 Stunden das Fermentationsprodukt Isoamylalkohol zu 100 % aus der Fermentationsbrühe abgetrennt ist.



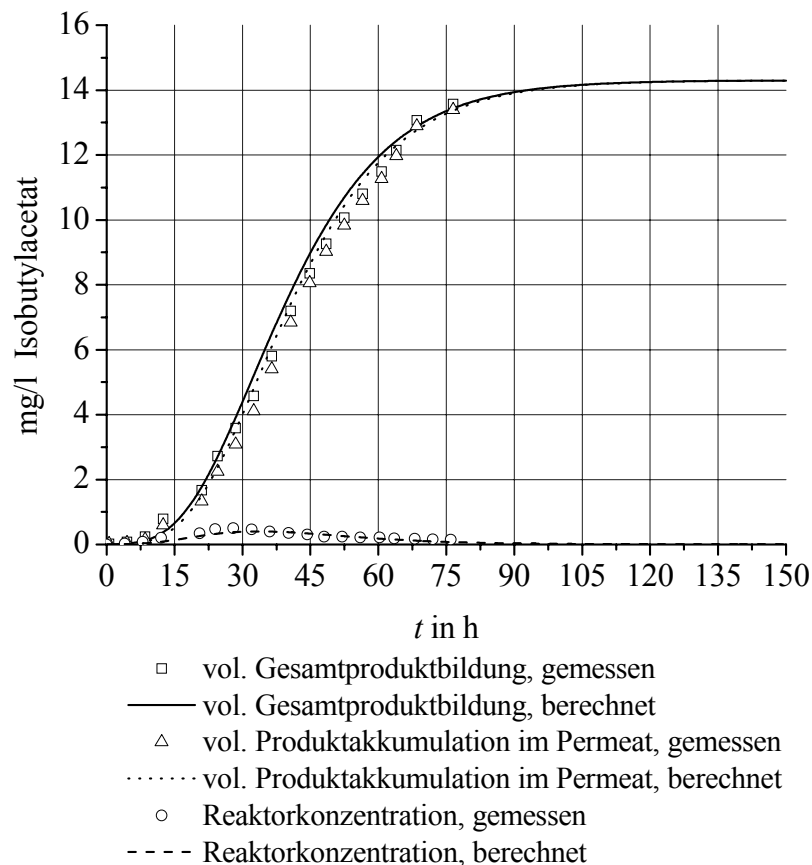
**Bild 5.49:** Modellergebnis für die Ethylacetatbildung

Aus Bild 5.49 geht hervor, dass das Bioprozessmodell die gemessenen Reaktorkonzentrationen von Ethylacetat bis zur 45. Stunde der Fermentation korrekt wiedergibt. Im weiteren Verlauf weicht das Modell jedoch von den Messwerten ab und gibt geringere Reaktorkonzentrationen an. Dies resultiert in einem nicht befriedigenden Bestimmtheitsmaß für die Korrelation der berechneten und gemessenen Werte von  $R^2 = 0,458$ . Die Produktakkumulation im Permeat wird durch das Modell von der 15. bis zur 65. Stunde der Fermentation um durchschnittlich 250 mg/l zu hoch berechnet. Dies wirkt sich negativ auf die Übereinstimmung der Wertepaare bei der Gesamtproduktbildung aus. Im Fall der Gesamtproduktbildung ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,962$  und im Fall der volumetrischen Produktakkumulation von  $R^2 = 0,966$ . Die Extrapolation des Bioprozessmodells zeigt, dass nach einer Prozessdauer von 90 Stunden die Produktentfernung aus der Fermentationsbrühe vollständig abgeschlossen ist.



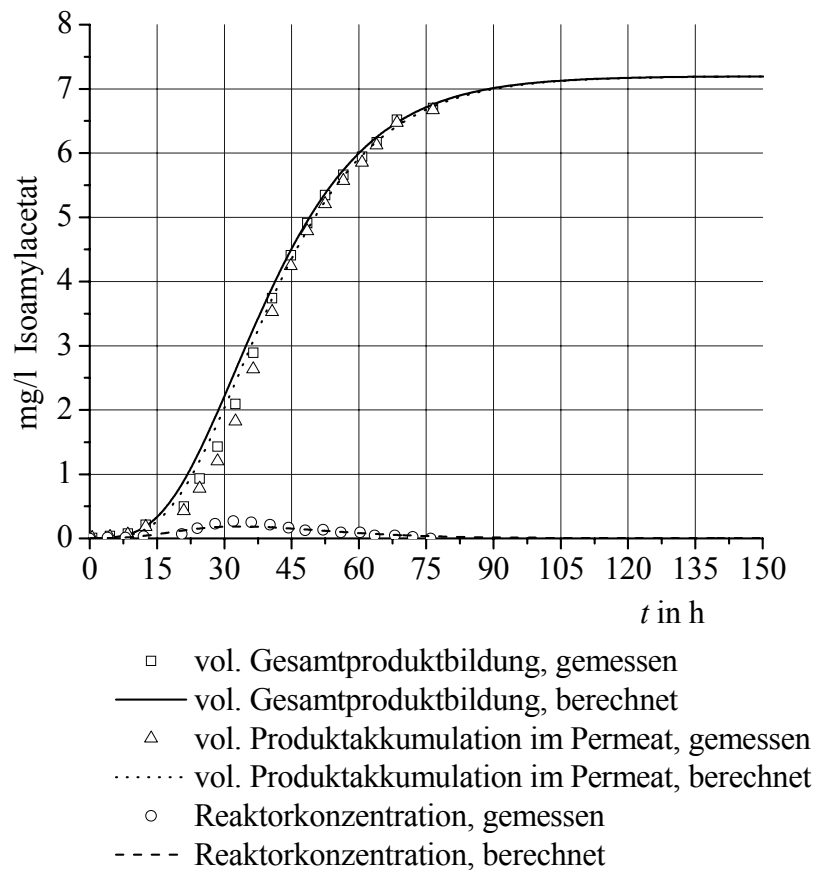
**Bild 5.50: Modellergebnis für die Propylacetatbildung**

Bild 5.50 zeigt die mit dem Bioprozessmodell berechneten Werte für die Produktbildung von Propylacetat sowie die dazugehörigen Messwerte. Die berechneten Werte stimmen mit den Messwerten für die Gesamtproduktbildung und für die Produktakkumulation im Permeat weitgehend überein. Das Bestimmtheitsmaß für die Korrelation der berechneten Werte und der Messwerte für die Produktakkumulation im Permeat beträgt  $R^2 = 0,992$  und für die Gesamtproduktbildung  $R^2 = 0,990$ . Die mit dem Bioprozessmodell berechneten Reaktorkonzentrationen weichen vom experimentellen Verlauf der Reaktorkonzentration mit der Folge eines Bestimmtheitsmaßes von  $R^2 = 0,555$  ab. Aus Bild 5.46 ergibt sich, dass das Fermentationsprodukt Propylacetat nach einer Prozessdauer von 80 Stunden vollständig aus der Fermentationsbrühe abgetrennt ist.



**Bild 5.51: Modellergebnis für die Isobutyrylacetatbildung**

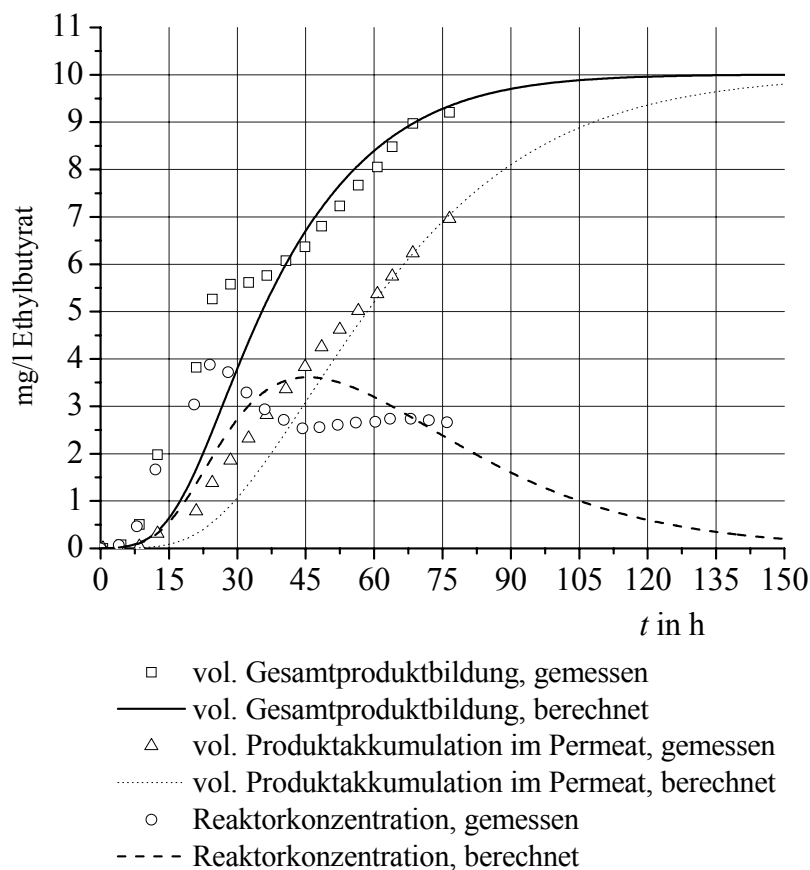
In Bild 5.51 sind die Modellergebnisse und die Messwerte für die Produktbildung von Isobutyrylacetat dargestellt. Mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,996$  für die Wertepaare der Gesamtproduktbildung und von  $R^2 = 0,996$  für die Wertepaare der Produktakkumulation im Permeat korrelieren die experimentellen Werte und die Modellwerte sehr gut. Zwischen der 30. und der 65. Stunde werden die Messwerte der Gesamtproduktbildung und der Produktakkumulation im Permeat durch das Modell um durchschnittlich 0,5 mg/l zu hoch angegeben. Die Anpassung des Bioprozessmodells an die gemessenen Reaktorkonzentrationen zeigt ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,841$ . Wie aus Bild 5.47 hervorgeht, dauert die vollständige Überführung des Isobutyrylacetats aus der Fermentationsbrühe in das Permeat 80 Stunden.



**Bild 5.52: Modellergebnis für die Isoamylacetatbildung**

In Bild 5.52 sind die Ergebnisse des Bioprozessmodells sowie die experimentellen Daten für die Isoamylacetatbildung gegenübergestellt. Die Bestimmtheitsmaße für die Korrelation der berechneten Werte mit den Messwerten betragen für die Gesamtproduktbildung  $R^2 = 0,994$ , für die Produktakkumulation im Permeat  $R^2 = 0,903$  und für die Reaktorkonzentration  $R^2 = 0,903$ . Die volumetrische Produktakkumulation im Permeat wird durch das Bioprozessmodell zwischen der 20. und der 40. Stunde um rund 0,5 mg/l zu hoch berechnet. Nach einer Prozessdauer von 80 Stunden ist das Fermentationsprodukt Isoamylacetat vollständig in das Permeat übergegangen.





**Bild 5.53: Modellergebnis für die Ethylbutyratbildung**

Bild 5.53 enthält das Modellergebnis und die Messwerte für die Ethylbutyratbildung. Die Messwerte und die Modellwerte der Reaktorkonzentration weichen stark voneinander ab. Das Bioprozessmodell ist nicht in der Lage, den experimentellen Verlauf der Reaktorkonzentration abzubilden. Die Messwerte der Reaktorkonzentration bleiben nach einer Prozessdauer von 45 Stunden auf einem konstanten Niveau, wohingegen die Modellwerte für die Reaktorkonzentration nach einer Prozessdauer von 45 Stunden kontinuierlich abnehmen. Die volumetrische Produktakkumulation im Permeat wird durch das Bioprozessmodell unbefriedigend wiedergegeben und um bis zu 1 mg/l ( $t=30$  h) zu niedrig berechnet. Das Bestimmtheitsmaß beträgt für die Anpassung des Modells an die Messwerte der Gesamtproduktbildung  $R^2=0,916$ , der Reaktorkonzentration  $R^2=0,514$  und der volumetrischen Produktakkumulation im Permeat  $R^2=0,994$ . Eine 100%ige Produktabtrennung aus der Fermentationsbrühe wird nach einer Prozessdauer von mehr als 150 Stunden erreicht.

## 6 Diskussion

### 6.1 Substrat und Betriebsparameter

Im Pervaporation-Bio-Hybridprozess muss die Trennoperation Pervaporation mit ausreichender und konstanter Selektivität und Stofftransportleistung gewährleisten, dass die Konzentration der Fermentationsprodukte im Bioreaktor während der Produktbildung auf einem nicht inhibitorischen Niveau bleibt. Voraussetzung für die Leistungskonstanz der Pervaporation im Pervaporation-Bio-Hybridprozess ist die Stabilität des Trennprozesses gegenüber auftretenden Veränderungen der Fermentationsbrühe. Naturgemäß ist eine Fermentationsbrühe in der Phase biokatalytischer Aktivität ständigen Veränderungen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung (z. B. durch den Substratabbau und die Produktbildung) sowie ihrer Eigenschaften (z. B. bezüglich ihres pH-Wertes) unterworfen. Um einen Pervaporation-Bio-Hybridprozess stabil betreiben und damit technisch nutzbar machen zu können, sind daher aus ingenieurwissenschaftlicher Sicht detaillierte Kenntnisse über den Einfluss der Komponenten des jeweiligen Fermentationsmediums sowie dessen Eigenschaften auf den pervaporativen Produktaustrag unentbehrlich. Diese Informationen müssen fermentationsrelevante Konzentrations- und Wertebereiche abdecken. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Substrate Glucose, Malzextrakt und Pepton sowie der Betriebsparameter pH-Wert und Rührerdrehzahl auf die Pervaporation der Aromastoffe anhand von Modelllösungen und unter Anwendung der statistischen Versuchsplanung untersucht (s. Abschnitt 4.2.7).

Die Ergebnisse des statistischen Versuchsplanes zeigen, dass von den Substraten Malzextrakt, Pepton und Glucose nur die Glucose einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Pervaporation der Ester Ethylacetat, Propylacetat, Isobutylacetat, Isoamylacetat und Ethylbutyrat ausübt (s. Tabelle 5.8). Die Erhöhung der Glucosekonzentration in der Feedlösung führte zu einer Verringerung des Produktaustrages der Ester. Im Gegensatz dazu wurden die Permeatflüsse der Alkohole Ethanol, Isobutanol und Isoamylalkohol nicht von der Glucosekonzentration beeinflusst (s. Tabelle 5.9).

Der Permeatfluss der Ester sank nach Zugabe von 50 g/l Glucose um ca. 40 % (s. Bild 5.3). Einen solchen degressiven Effekt der Glucose auf die Pervaporation stellten auch IKEGAMI et al. [101] fest. In dieser Studie hatte die Zugabe von 55 g/l Glucose zur Feedlösung eine 60-prozentige Abnahme des Permeatflusses zur Folge. Ebenfalls empfehlen O'BRIEN und CRAIG [156] niedrige Glucosekonzentrationen bei der Pervaporation, um ihre stark flussmindernde Wirkung zu minimieren. WOOD et al. [225] berichten über eine Verringerung des Permeatflusses und der Selektivität bei der Pervaporation nach der Zugabe von Fructose zu einem Ethanol-Wasser-Gemisch. Demzufolge könnte eine flussmindernde Wirkung für Mono-

saccharide im Allgemeinen in Betracht kommen. Das vermuteten auch BAUDOT et al. [13]. Sie untersuchten den Einfluss von Lactose auf die Abtrennung von S-Methyl-Thiobutyrat, einem Aromastoff des Blumenkohls. Dabei war trotz akkumulierter Zugabe von Lactose im fermentationsrelevanten Konzentrationsbereich keine signifikante Veränderung des Flusses oder der Selektivität feststellbar. BAUDOT et al. [13] begründen dieses Ergebnis mit der geringen Lactosekonzentration von maximal 6 g/l.

IKEGAMI et al. [101] führen die flussmindernde Wirkung der Glucose bei der Pervaporation auf die Konkurrenz der Komponenten der Feedlösung um freie Adsorptionsplätze an der Membranoberfläche zurück. Die Adsorption ist der erste Schritt des Stofftransportes bei der Pervaporation. In weiteren Studien wird ein Eindringen der Monosaccharide in die obersten Schichten der Membran vermutet, wo sie durch sterische Effekte die Diffusion von organischen Molekülen behindern [96, 225]. Für diesen Mechanismus prägten FADEEV et al. [66] den Begriff des *internen Foulings*.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine erhöhte Glucosekonzentration in der Feedlösung eine verminderte Trennleistung der Pervaporation von Aromastoffen zur Folge hat. Für den Betrieb des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses ergibt sich daraus die Direktive, die Glucosekonzentration im Bioreaktor insbesondere während der Produktbildung auf einem niedrigen Niveau zu halten. Dies wird z. B. durch die Führung der Fermentation im Fed-Batch-Betrieb erreicht, indem durch eine entsprechende Zufütterung hohe Glucosekonzentrationen im Bioreaktor vermieden werden.

Für den Einflussfaktor Rührerdrehzahl im Pervaporation-Bio-Hybridprozess wurde eine statistisch signifikante und positive Wirkung auf die Pervaporation der Aromastoffe festgestellt (s. Bild 5.5 & Tabelle 5.8). Die Geschwindigkeit des Rührwerks bestimmt den Strömungszustand des Feedgemisches an der Membran. Mit steigender Drehzahl wird die hydrodynamische Turbulenz des Feeds verstärkt. Damit verringert sich die feedseitige laminare Grenzschicht an der Membran und somit auch die flussmindernde Wirkung der dort auftretenden Konzentrations- und Temperaturpolarisationen. Dies führt zu einer Verbesserung der Trennleistung der Pervaporation [51, 138, 14]. Eine Steigerung der Drehzahl um 100 Upm hatte in der vorliegenden Untersuchung eine Steigerung der Trennleistung um 10 % bis 17 % in Abhängigkeit von der Zielsubstanz zur Folge. Bild 5.5 zeigt diesen Effekt am Beispiel der Substanz Isobutylacetat. Ebenso fanden SAMPRANPIBOON et al. [180] eine Steigerung von Selektivität und Fluss bei der Pervaporation von Estern mit steigender Strömungsgeschwindigkeit des Feeds an der Membran.

Der Permeatfluss der Ester wird in stärkerem Maße durch die Rührerdrehzahl beeinflusst als der Permeatfluss der Alkohole (s. Tabelle 5.9). Ester werden durch Polydimethylsiloxan-

Membranen im Vergleich zu Alkoholen bevorzugt absorbiert. Dies führt bei Estern zu einer stärker ausgeprägten Konzentrationspolarisation [20, 157]. Aus diesem Grund beeinflusst eine Veränderung der Rührerdrehzahl die Pervaporation der Ester in höherem Maße.

Die Einstellung der Rührerdrehzahl ist neben der Regelung des permeatseitigen Vakuums eine Möglichkeit der Einflussnahme auf die Produktabtrennung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess [158, 214]. Wie die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigen, sind hohe Rührerdrehzahlen mit einem guten Pervaporationsergebnis verbunden. Allerdings erzeugen hohe Rührerdrehzahlen hohe Scherkräfte in unmittelbarer Nähe des Rührers. Die Rührerdrehzahl ist daher durch die Scherempfindlichkeit der Schimmelpilze nach oben begrenzt.

Neben der Glucose als definierter Einzelsubstanz wurden innerhalb des statistischen Versuchsplanes ebenso die Einflüsse der komplex zusammengesetzten, natürlichen Substrate Malzextrakt und Pepton untersucht. Dabei stand die Frage im Vordergrund, ob diese häufig bei Fermentationen eingesetzten Substrate aufgrund ihrer heterogenen Zusammensetzung den Pervaporationsprozess beeinträchtigen. Die Zusammensetzung dieser Stoffe kann Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3 entnommen werden. Die Signifikanzanalyse der Faktorwirkungen ergab, dass weder Malzextrakt noch Pepton in fermentationsüblichen Konzentrationen den Pervaporationsprozess mit statistischer Signifikanz beeinflussen (s. Tabelle 5.8). Indes zeigten die Regressionskoeffizienten der Faktoren Malzextraktkonzentration und Peptonkonzentration jeweils bei allen Aromastoffen gleiche Vorzeichen (s. Tabelle 5.9). Das Vorzeichen des Regressionskoeffizienten steht für die Wirkungsrichtung des jeweiligen Faktors. Danach wirken steigende Malzextraktkonzentrationen tendenziell positiv auf die Permeatflüsse der Fermentationsprodukte, wohingegen steigende Peptonkonzentration in der Tendenz zu einer Verringerung der Permeatflüsse der Aromastoffe führen (s. Bild 5.1 & Bild 5.2).

Malzextrakt ist ein getrocknetes Extrakt aus reinem Gerstenmalz, das alle wasserlöslichen und durch Einwirkung der korneigenen Enzyme gelösten Inhaltsstoffe des gemälzten Gerstenkorns enthält. Malzextrakt besteht zu 88 % aus Kohlenhydraten. Oligosaccharide (Dextrine) (34,4 %) und Disaccharide (32,6 % Maltose, 5 % Saccharose) bilden den Hauptanteil der Kohlenhydratfraktion. Weiterhin enthält Malzextrakt zu 8,3 % Monosaccharide (7,6 % Glucose, 0,7 % Fructose) und zu 7,7 % das Trisaccharid Maltotriose. Neben den Kohlenhydraten beinhaltet Malzextrakt 5 % Proteine und 2 % Mineralstoffe (s. Tabelle 4.2).

Der Anteil der Monosaccharide in Malzextrakt ist mit 8,3 % verhältnismäßig gering. Wie erläutert, kommen die Monosaccharide Glucose und Fructose ursächlich für eine Flussminderung bei der Pervaporation in Frage (s. o.). Ebenso negativ wirken Proteine auf die Trennleistung der Pervaporation [101]. Doch auch die Proteine stellen mit einem Anteil von 5 % eine

Minderkomponente des Malzextrakts dar. Die größte Fraktion des Malzextrakts bilden mit insgesamt 79,6 % Di-, Tri- und Oligosaccharide, die demzufolge in erster Linie für die Wirkung von Malzextrakt bei der Pervaporation verantwortlich sind. Das Ergebnis einer zwar nicht statistisch signifikanten aber tendenziell positiven Wirkung des Malzextrakts (s. Bild 5.1) lässt den Schluss zu, dass Di-, Tri- und Oligosaccharide im Gegensatz zu Monosacchariden den Pervaporationsprozess nicht negativ beeinflussen bzw. in geringem Maße positiv wirken. Aufgrund ihrer Molekülgröße sind Di-, Tri- und Oligosaccharide den hydrodynamischen Kräften über der Membran stärker ausgesetzt als Monosaccharide, sodass die Adsorption dieser Stoffe an der Membranoberfläche erschwert ist. Ein Konkurrenzeffekt um freie Adsorptionsplätze, wie bereits für die flussmindernde Wirkung der Glucose herangezogen, ist im Falle der Di-, Tri- und Oligosaccharide daher unwahrscheinlich. Ebenso ist ein Eindringen der Mehrfachzucker in die obersten Schichten des Membranmaterials durch sterische Hinderung aufgrund ihrer Molekülgröße erschwert. Die negativen Wirkmechanismen der Monosaccharide sind also nicht unmittelbar auf Di-, Tri- und Oligosaccharide übertragbar. Indessen könnten die Oligosaccharide (Dextrine) für die tendenziell positive Wirkung des Malzextrakts verantwortlich sein, da sie Wassermoleküle unter Ausbildung von Hydrathüllen an sich binden und auf diese Weise die Aktivität des Lösungsmittels Wasser relativ zu den Aktivitäten der gelösten Aromastoffe herabsetzen. Eine Aktivitätserniedrigung des Wassers begünstigt die Pervaporation der Aromastoffe. In der Literatur finden sich Berichte über die positive Wirkung der Zugabe von Zuckern zu Ethanol-Wasser-Gemischen bei der Pervaporation [225]. Danach erhöht die Anwesenheit der Zucker die Aktivität bzw. den Dampfdruck von Ethanol und erniedrigt den Dampfdruck von Wasser.

Zwar wird eine Erniedrigung der Wasseraktivität auch Salzen zugeschrieben und als *Aussalzeffekt* bezeichnet. Das bedeutet, dass die Aktivität von Nicht-Elektrolyten in wässrigen Lösungen durch die Zugabe von Salzen erhöht wird, was zu einer relativen Erniedrigung der Aktivität des Lösungsmittels Wasser in der Membran führt [32, 136, 130]. Jedoch kann der geringe Salzgehalt des Malzextrakts von 2 % für eine positive Wirkung nicht in Betracht kommen.

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist allerdings festzustellen, dass Malzextrakt im fermentationsrelevanten Konzentrationsbereich keine negativen Auswirkungen auf die Trennleistung der Pervaporation hat (s. Bild 5.1). Der Einsatz von Malzextrakt als Fermentationssubstrat im Pervaporation-Bio-Hybridprozess ist daher als unproblematisch einzustufen.

Als Stickstoffquelle wurde vorliegend pankreatisches Fleischpepton verwendet. Pankreatisches Fleischpepton besteht im Wesentlichen aus Aminosäuren, Peptiden und Proteinen. Stickstoffquellen werden zur Einhaltung optimaler C/N-Verhältnisse im Nährmedium regelmäßig in weitaus geringeren Konzentrationen eingesetzt als Kohlenstoffquellen. Für Pepton

ergibt sich im vorliegenden Fall ein fermentationsrelevanter Konzentrationsbereich von 0 g/l bis 6 g/l. Innerhalb dieser Grenzen wurde kein statistisch signifikanter Einfluss der Peptonkonzentration auf den Produktfluss bei der Pervaporation gemessen (s. Tabelle 5.8). Tendenziell wurde eine negative Wirkungsrichtung deutlich (vgl. Bild 5.2). Dies stimmt mit einer Studie von IKEGAMI et al. [101] überein, in der eine Verringerung des Flusses der Pervaporation in Anwesenheit von Proteinen in der Feedlösung gemessen wurde. Die Autoren begründen dieses Verhalten mit einer Konkurrenz der Proteine und der Permeanden um freie Adsorptionsplätze auf der Membran sowie der Immobilisierung von Permeanden durch Adsorption an die makromolekularen Proteine. Von einem negativen Effekt durch die Anwesenheit von Schwebstoffen und Makromolekülen bei der Pervaporation wurde ebenso in anderen Studien berichtet [142, 169].

Wie bereits erwähnt, hat Pepton in einem Konzentrationsbereich von 0 g/l bis 6 g/l keine statistisch signifikante Wirkung auf den Pervaporationsprozess ausübt. Der Einsatz von Pepton als Stickstoffquelle im Pervaporation-Bio-Hybridprozess ist daher möglich.

Weiterhin wurde der Einfluss des pH-Wertes der Fermentationsbrühe auf die Pervaporation der Aromastoffe untersucht. Dabei wurde keine statistisch signifikante Wirkung des pH-Wertes auf die Pervaporation der Aromastoffe festgestellt (s. Tabelle 5.8). In der Tendenz verbesserte sich die Abtrennung der Aromastoffe bei einer Verschiebung des pH-Wertes in Richtung des Neutralpunktes. Dies zeigen die einheitlich positiven Regressionskoeffizienten in Tabelle 5.9. Eine Erhöhung des pH-Wertes um eins hatte eine Zunahme des Permeatflusses um 4 % bis 7 % in Abhängigkeit des Aromastoffes zur Folge (s. Bild 5.4). Dieses Ergebnis steht im Zusammenhang mit den Dissoziationsgleichgewichten funktioneller Gruppen innerhalb der Moleküle der Aromastoffe. Die Dissoziation der funktionellen Gruppen im sauren pH-Bereich führt zu einer verstärkten Polarisierung der Moleküle [95, S. 132]. Polare Moleküle permeieren in geringerem Maße durch das hydrophobe Membranmaterial. Demzufolge sinken die Permeatflüsse der Aromastoffe mit abnehmendem pH-Wert. Für den Pervaporation-Bio-Hybridprozess sind daher pH-Werte in der Nähe des Neutralpunktes günstig. Jedoch muss sich die Einstellung des pH-Wertes im Pervaporation-Bio-Hybridprozess in erster Linie nach den Erfordernissen des Schimmelpilzes hinsichtlich des Wachstums und der Produktbildung richten.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sich eine Fermentationsbrühe als komplex zusammengesetztes Feedgemisch bei der Pervaporation nicht nachteilig auf die Abtrennung von Aromastoffen auswirkt. KOLLERUP und DAUGULIS [115] haben experimentell nachgewiesen, dass die Extraktion von Alkoholen aus Fermentationsbrühen – mit Zellen, Zellbestandteilen, Substratbestandteilen, Metaboliten und Salzen – besser ist als aus reinem Wasser. Dieses Phänomen wurde in anderen Studien bestätigt und auf Aktivitätsveränderungen der Kompo-

zenten im Feed zurückgeführt [14, 59]. QURESHI und BLASCHEK [169] untersuchten den Einfluss zweier natürlicher Substrate auf die Pervaporation: Die kommerziell erhältlichen Substrate P2 und CSL (Corn steep liquor) hatten in Modelllösungen keinen signifikanten Effekt auf den Fluss und die Selektivität bei der Pervaporation von Butanol. In der gleichen Studie wurde die pervaporative Abtrennung von Butanol aus der Fermentationsbrühe nach Abschluss der Fermentation untersucht, um den möglichen Einfluss der gestiegenen Viskosität und der Anwesenheit von Bakterienzellen und Zellrückständen zu messen. Dabei wurde keine Verschlechterung der Pervaporationsleistung im Vergleich zu den Modelllösungen festgestellt, sondern eine geringfügig bessere Abtrennung des Butanols beobachtet. Die Autoren begründen dies damit, dass weitere organische Metaboliten, die während der Fermentation gebildet worden waren, wie z. B. Aceton, Ethanol, Buttersäure und Essigsäure durch Quellungs- oder Kopplungseffekte in der Membran den Permeatfluss verbessern [169].

Ahand der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass sich der Pervaporationsprozess stabil bzw. leistungskonstant gegenüber Veränderungen der Zusammensetzung und der Eigenschaften der Fermentationsbrühe verhält. Aufgrund dessen ist zusammenfassend festzuhalten, dass die Pervaporation zur In-situ-Produktabtrennung bei der mikrobiellen Aromagewinnung geeignet ist.

## 6.2 Pervaporation-Bio-Hybridprozess

Der Aufbau des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors wurde bereits in Abschnitt 4.1.1 erläutert. Bild 4.1 zeigt, dass die Verknüpfung von Trennoperation Pervaporation und Bioreaktor in der vorliegenden Arbeit *intern*, d. h. durch Integration des Pervaporationsmoduls in den Bioreaktor, erfolgte. Das Pervaporationsmodul kann grundsätzlich auch *extern* mit einem Bioreaktor verbunden werden (s. Bild 2.8). Bei der internen Anordnung des Pervaporationsmoduls steht die Fermentationsbrühe in direktem Kontakt mit der Membran, wohingegen sie bei einer externen Pervaporationseinheit durch eine Leitungsschleife gepumpt werden muss. Bei der Förderung der Fermentationsbrühe durch das externe Membranmodul und insbesondere in der Pumpe selbst treten unerwünschte Scherbelastungen auf, da eine turbulente Überströmung der Membran gewährleistet sein muss [107]. Die mechanische Belastung durch auftretende Scherkräfte kann insbesondere bei den dafür empfindlichen Schimmelpilzen zu Zellschädigungen bis hin zur Zerstörung der Zellen führen. Darüber hinaus kann es außerhalb des Bioreaktors in Abhängigkeit von der Verweilzeit zu Sauerstofflimitierungen und veränderten Umgebungsbedingungen wie z. B. der Temperatur kommen [204]. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit eine interne Membrananordnung bevorzugt.

Ein charakteristisches Merkmal des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses ist das Verhältnis der Trennleistung der Pervaporation zum Fermentationsvolumen, da es zum erfolgreichen Betrieb

eines Pervaporation-Bio-Hybridprozesses eines ausreichend hohen Produktaustrages bedarf. Die Höhe des Produktaustrages wird maßgeblich durch die Eigenschaften und die Ausmaße der Membran bestimmt. Eine Erhöhung der Trennleistung kann durch den Einsatz einer leistungsfähigeren Membran erreicht werden. Ansonsten ist eine wesentliche Verbesserung des Produktaustrages jedoch nur über eine Vergrößerung der Membranfläche möglich. Das Verhältnis des Fermentationsvolumens zur Membranfläche  $\left(\frac{V}{A}\right)$  ist folglich eine leistungsbestimmende Kennzahl des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses. Das V/A-Verhältnis ist bei einer in den Boden des Bioreaktors integrierten Flachmembran durch die Füllhöhe der Fermentationsbrühe festgelegt, denn für das Volumen eines Zylinders gilt:

$$V = A \cdot h \Leftrightarrow \frac{V}{A} = h \quad (6.1)$$

Dieser Zusammenhang führt bei einem Scale-up des Prozesses zu folgendem Problem: Eine Vergrößerung des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors mit einem gegebenen V/A-Verhältnis ist nur durch die Erweiterung der Grundfläche des Bioreaktors unter Konstanthaltung der Füllhöhe möglich. Unter dieser Voraussetzung ist ein wirtschaftliches Scale-up des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses nicht durchführbar. Dieses gelingt nur bei einer flächenintensiveren Einbettung der Membran in den Bioreaktor.

BENGTSON und BÖDDEKER [20] schlagen dazu das Eintauchen von Schlauchmembranen in die Fermentationsbrühe vor. Bei Schlauchmembranen aus Silikon kann jedoch nur mit der Spülgaspervaporation gearbeitet werden, da ein permeatseitiges Vakuum zum Zusammenfallen der Schlauchmembranen führen würde. Die leistungsfähigere Vakuumpervaporation kann nur mit mechanisch unterstützten Membranen betrieben werden. Eine Schlauchmembran ist herstellungsbedingt und aus Stabilitätsgründen mit einer Stärke von in der Regel mehr als 200  $\mu\text{m}$  rund 20-mal dicker als eine Flachmembran. Dies führt zu erheblich geringeren Flüßsen bei der Pervaporation. GENG und PARK [79] nutzten in die Fermentationsbrühe gelegte Schlauchmembranen bei einer Butanolfermentation mit *Clostridium acetobutylicum* B18 und erreichten dabei ein günstiges V/A-Verhältnis mit einer Membranfläche von 0,17  $\text{m}^2$  und einem Fermentationsvolumen von 2 Litern. Jedoch war die dabei eingesetzte Schlauchmembran mit einer Stärke von 240  $\mu\text{m}$  bei einem Außendurchmesser von 1,95 mm um den Faktor 24 dicker als eine entsprechende Flachmembran. Dadurch wurde der Zugewinn an Membranfläche bereits überkompensiert. Bei der Spülgaspervaporation mit einem Luftstrom von in diesem Fall 8 l/min entstanden hoch verdünnte Abluftströme. Eine wirtschaftliche Rückgewinnung der Produkte aus den Abluftströmen der Spülgaspervaporation ist nicht ohne weiteres möglich. Bei engmaschig verlegten Schlauchmembranen kommt es darüber hinaus zur Immobilisierung der Schimmelpilzpellets in den Schlauchzwischenräumen und in der Folge



zu einem zusammenhängenden Wachstum des Schimmelpilzes in Form großflächiger Agglomerate. Ein solches Wachstum beeinträchtigt den Stoffaustausch sowohl bei der Fermentation als auch bei der Pervaporation. Es ist erkennbar, dass eine interne Einbettung der Pervaporationsmembran in den Pervaporation-Bio-Hybridreaktor mit einer für das Scale-up günstigen spezifischen Oberfläche prozesstechnische Schwierigkeiten bereitet. Die Scale-up-Problematik des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses muss Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein.

Der Pervaporation-Bio-Hybridprozess wurde am Beispiel einer Aromabiosynthese mit dem Schimmelpilz *Ceratocystis fimbriata* untersucht. Der Schimmelpilz *Ceratocystis fimbriata* besitzt ein großes Biosynthesepotenzial und eine gute Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Umgebungsbedingungen [70, S. 98]. Seit Anfang der 1960er Jahre ist das hohe Biosynthesepotenzial der Gattung *Ceratocystis* bekannt [123, 47]. Stämme der Gattung *Ceratocystis* sind in der Lage, ein großes Spektrum an Fruchtaromen zu produzieren. In Abhängigkeit vom Stamm und den Fermentationsparametern werden geruchliche Ausprägungen wie Pfirsich, Banane, Birne, Rose und Zitrone wahrgenommen. Neben *Ceratocystis moliniformis* wird *Ceratocystis fimbriata* ein besonders großes Biosynthesepotenzial zugesprochen [44, 43, 45].

Das Ziel der Modellfermentation im Pervaporation-Bio-Hybridprozess ist die Gewinnung eines Bananenaromas. Die Schlüsselverbindung des Bananenaromas ist Isoamylacetat. Isoamylacetat stellt ebenso die aromaprägende Substanz des von *Ceratocystis fimbriata* gebildeten Komplexaromas dar. Fruchtaromen wird heute ein besonders hoher Stellenwert in der Aromaindustrie zugemessen, denn 80 % aller heute verzehrten Aromen sind Fruchtaromen (s. Abschnitt 2.2.4). Aus den Ergebnissen in Bild 5.6 und in Bild 5.10 bis Bild 5.17 geht hervor, dass *Ceratocystis fimbriata* im Hinblick auf das Wachstum und die Produktbildung als Modellorganismus für die Charakterisierung des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses geeignet ist.

Für die Aromabiosynthese im Pervaporation-Bio-Hybridprozess wurden Glucose, Malzextrakt und Pepton als Substrate genutzt. Mit diesen Bestandteilen ist das Nährmedium einfach in der Herstellung und preiswert. Zwar kann durch die Verwendung optimierter synthetischer Medien eine verbesserte Produktbildung erreicht werden, jedoch ist deren Verwendung mit einem erheblichen Mehraufwand an Arbeit und Kosten verbunden. Vor dem Hintergrund des Projektzieles der Erhöhung der ökonomischen Effizienz bei der Aromabiosynthese wurde auf ein Vorlegen von Vorläufersubstanzen verzichtet und auf das einfache und kostengünstige Nährmedium zurückgegriffen. Die Nutzung natürlicher Substrate ohne Zugabe bestimmter Vorläufersubstanzen wird in Abgrenzung zur Biotransformation bzw. –konversion als *de-novo-Biosynthese* bezeichnet [29].

In Bild 5.6 ist das Wachstum des Schimmelpilzes *Ceratocystis fimbriata* bei der Aromabiosynthese im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor dargestellt. Das Wachstum Schimmelpilzes setzt nach der Inokulation übergangslos, d. h. ohne ausgeprägte lag-Phase, ein. Dies zeigt die gute Anpassung der Vorkultur an die Umgebungsbedingungen im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor. Die stark streuenden Messwerte für die Biomasse führen zu einem unstetigen Wachstumsverlauf (s. Bild 5.6). Dies liegt an den natürlichen Schwankungen der Messmethode, d. h. der Arbeitsschritte Zentrifugation, Filtration, Trocknung und Wägung. Darüber hinaus resultiert dieser unregelmäßige Verlauf der Messwerte aus der Schwierigkeit der repräsentativen Probenahme für die Biomasse. Die Größe der Schimmelpilzpellets steht in einem ungünstigen Verhältnis zum geringen Probenahmenvolumen von 10 ml. Im Gegensatz zur homogenen Verteilung von Bakterien- und Hefezellen in Fermentationsbrühen, herrscht bei der Submerskultur von Schimmelpilzen eine heterogene Verteilung der verhältnismäßig großen Pellets in der Fermentationsbrühe vor. Dies führt zu Stichproben mit einem für den Reaktorinhalt nicht repräsentativen Zellgehalt und damit zu Schwankungen der Messwerte.

Der tatsächliche Wachstumsverlauf kann durch Anpassung der logistischen Gleichung abgeschätzt werden. Die Koeffizienten der logistischen Gleichung geben die aus der Menge des Inokulums resultierende Biomasse zu Fermentationsbeginn ( $c_{x0} = 1,1 \text{ g/l}$ ), die maximale spezifische Wachstumsrate ( $\mu_{\max} = 0,09 \text{ h}^{-1}$ ) sowie die maximale Konzentration der Biomasse ( $c_{x,\max} = 5,8 \text{ g/l}$ ) an. Zur Inokulation wurde eine Vorkultur mit einem Volumen von 100 ml genutzt (s. Abschnitt 4.2.3, S. 40). Der durch die logistische Gleichung angegebene Wert von  $c_{x0} = 1,1 \text{ g/l}$  entspricht mit einem Fermentationsvolumen von 1,6 l einer Biomasse in der Vorkultur ( $V=0,1 \text{ l}$ ) von 17,6 g/l Trockenmasse. Eine derart hohe Biomasse ist selbst unter Berücksichtigung des im Schüttelkolben auftretenden Oberflächenwachstums unwahrscheinlich. Die logistische Gleichung überschätzt demnach bei ihrer Anpassung an die experimentellen Daten die Startkonzentration der Biomasse. Die durch die logistische Gleichung ermittelte maximale Biomasse von  $c_{x,\max} = 5,8 \text{ g/l}$  ist realistisch. Der dritte Koeffizient der logistischen Gleichung ist die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{\max}$ . Dieser Parameter bedeutet den Zuwachs an Biomasse bezogen auf die Zeit und die vorhandene Biomasse. Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit ist im Hinblick auf einen Vergleich zweier Fermentationen nicht eindeutig, da ihr Wert stark von der durch die logistische Gleichung abgeschätzten Anfangskonzentration der Biomasse abhängt. Für einen Vergleich zweier Fermentationen kann hingegen die absolute Wachstumsgeschwindigkeit  $R_x$  herangezogen werden (s. Bild 5.31, S. 78). Die absolute Wachstumsgeschwindigkeit resultiert aus der ersten Ableitung der logistischen Gleichung für das Wachstum (s. Gleichung (2.23)).

Der Verlauf des pH-Wertes in Bild 5.6 zeigt eine lag-Phase von ungefähr 5 Stunden. Nach der lag-Phase fällt der pH-Wert innerhalb von 25 Stunden unter einen Wert von pH 3,5 und verändert sich im weiteren Verlauf nur noch geringfügig. Im Gegensatz dazu sind die Produktbildung (s. Bild 5.10 bis Bild 5.17) und der Glucoseverbrauch (s. Bild 5.8) durch lag-Phasen mit einer Dauer von 15 bis 20 Stunden gekennzeichnet. Die Gompertz-Gleichung für den Glucoseverbrauch gibt eine lag-Phase von  $\lambda = 17,3$  Stunden an. Das Wachstum des Schimmelpilzes erfolgte ohne ausgeprägte lag-Phase (Bild 5.6). Die zeitliche Entwicklung des pH-Wertes, des Glucoseverbrauchs und des Wachstums sind demzufolge in Bezug auf die Dauer der lag-Phase verschieden. Diese Beobachtung steht mit dem pH-Wert der Fermentationsbrühe in Zusammenhang: Der pH-Wert der Fermentationsbrühe beeinflusst den mikrobiellen Stoffwechsel. Der optimale pH-Bereich für das Wachstum von Schimmelpilzen liegt bei Werten von pH 4,5 bis pH 6,5, also im leicht sauren Milieu. Maximalwerte liegen meist bei pH 8 bis pH 9, während manche Pilze noch bei einem pH-Wert von 2 und darunter wachsen [116, S. 106 ff.]. Allerdings ist zu beobachten, dass viele Schimmelpilze durch Ausscheidung von Stoffwechselprodukten den pH-Wert ihrer Umgebung verändern können und auf diese Weise günstige pH-Verhältnisse, beispielsweise für die Produktbildung, schaffen [176, S. 56 ff.]. So ist das Wachstum vieler Schimmelpilze in einem weiten Bereich möglich, während die Produktsynthese stark pH-abhängig ist [176, S. 57 f. u. 145]. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass vorliegend die Produktbildung erst nach 15 bis 20 Stunden einsetzt. Zu diesem Zeitpunkt der Fermentation ist der pH-Wert der Fermentationslösung durch die Ausscheidung saurer Metaboliten um eine Einheit auf unter pH 4,5 gesunken. Die Produktsynthese des Schimmelpilzes *Ceratocystis fimbriata* wird demzufolge durch pH-Werte der Zellumgebung von unter pH 4,5 begünstigt.

Die mathematische Beschreibung des Glucoseverbrauchs mithilfe der Gompertz-Gleichung (s. Bild 5.8) kann über die Ermittlung der lag-Zeit  $\lambda$  hinaus dazu genutzt werden, den Zeitpunkt des Fermentationsendes abzuschätzen. Der Pervaporation-Bio-Hybridprozess wurde nach 80 Stunden abgebrochen. Das Kriterium für den Abbruch der Fermentation war die Verlangsamung des Glucoseverbrauchs unter einen Wert von  $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Zu diesem Zeitpunkt wurden durch den Schimmelpilz bereits ungefähr 135 g/l Glucose umgesetzt (s. Bild 5.8). Die Gompertz-Gleichung gibt den maximalen Glucoseverbrauch mit  $U_{max} = 143,5 \text{ g/l}$  an. Demzufolge war die Fermentation zum Zeitpunkt des Abbruches noch nicht vollständig zum Erliegen gekommen und weitere 8 g/l Glucose wären bei einer Weiterführung der Fermentation verbraucht worden. Der vorzeitige Abbruch der Fermentation erklärt den Verlauf der Produktbildung gegen Ende der Fermentation: Die Produktbildung in Bild 5.10 bis Bild 5.17 erfolgte bis auf Ethanol für alle Fermentationsprodukte stetig bis zum Ende der Fermentation, ohne dass ein Erliegen bzw. eine Verlangsamung der Produktbildung zu erkennen ist. Lediglich die Bildung von Ethanol verlangsamt sich gegen Ende der Fermentation (s. Bild 5.15, S. 66). Dies lässt den Schluss zu, dass die Produktbildung unter Verbrauch weiterer Glucose

angedauert hätte. Allerdings ist der mit der Gompertz-Gleichung bestimmte Restverbrauch von 8 g/l gering, sodass seine Vernachlässigung das quantitative Ergebnis der Fermentation nicht wesentlich beeinträchtigt.

Die Gesamtproduktbildung im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor ist die Summe aus der volumetrischen Produktakkumulation im Permeat und der Reaktorkonzentration. In Abhängigkeit von der Substanz gelangen bei der Pervaporation unterschiedliche Anteile der Gesamtproduktmenge in das Permeat. Der Permeatanteil hängt von der Affinität der Membran zur jeweiligen Substanz, d. h. von ihrer Selektivität, ab. Die Selektivität der Pervaporation wird durch den Anreicherungsfaktor  $\beta$  quantifiziert. In Bild 5.26 sind die mittleren Anreicherungsfaktoren im Pervaporation-Bio-Hybridprozess dargestellt. Die Fermentationsprodukte sind dabei absteigend gemäß ihrem Anreicherungsfaktor geordnet. Diese Reihenfolge gilt auch bezüglich des Permeatanteils der Fermentationsprodukte. Während die Ester Ethylacetat, Propylacetat, Isobutylacetat und Isoamylacetat (s. Bild 5.10 bis Bild 5.13) fast vollständig aus der Fermentationslösung abgetrennt und in das Permeat überführt wurden, gelangten die übrigen Substanzen in Abhängigkeit ihres mittleren Anreicherungsfaktors zu geringeren Anteilen in das Permeat, sodass nicht unerhebliche Produktmengen im Bioreaktor verblieben (s. Bild 5.14 bis Bild 5.17). Die Produktverteilung zwischen Bioreaktor und Permeat ist bei gegebener Reaktorkonfiguration für das jeweilige Produkt konstant und von der Produktbildungsrate unabhängig. Beispielsweise führt der Einsatz eines Schimmelpilzes mit verbesserter Stoffwechsellleistung oder Produkttoleranz zu unveränderten Anteilen der Fermentationsprodukte im Permeat. Der Grund dafür ist die lineare Abhängigkeit des Produktaustrages von der Reaktorkonzentration. Die Konstanz der Produktverteilung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess wurde anhand von Berechnungen mit dem Bioprozessmodell (s. Abschnitt 5.4) durch Einsetzen unterschiedlicher Werte für den theoretischen Glucoseertragskoeffizienten  $Y_{\max}$  bzw. für die Inhibitionskonstante  $I_p$  bestätigt.

Der Schimmelpilz *Ceratocystis fimbriata* bildete als Hauptprodukt den Alkohol Ethanol. Ethanol erreichte eine Endkonzentration von fast 35 g/l (s. Bild 5.15). Das entspricht einem Alkoholgehalt von 3,5 %. Ethanol trägt als Reifenote zum Gesamteindruck des Bananenaromas bei. Die Endkonzentrationen der höheren Alkohole und der Ester sind im Gegensatz dazu äußerst gering. Die Substanz Ethylacetat erreicht eine Endkonzentration von 2,5 g/l (s. Bild 5.10). Die übrigen Aromastoffe werden mit einer Endkonzentration von unter 100 mg/l gebildet. Beispielsweise lag Isoamylacetat, die Schlüsselsubstanz des Bananenaromas, in einer Endkonzentration von 7 mg/l vor (s. Bild 5.13). Auch BLÜMKE und SCHRADER [29] fanden bei einer Fermentation mit *Ceratocystis moniliformis* und zeitgleicher Produktabtrennung in einem externen Pervaporationsmodul Endkonzentrationen von Estern und Terpenen unter 100 mg/l. Die Fermentationsbrühe weist dennoch einen bananenartigen und fruchtigen Geruch

auf, da die Geruchsschwellen der Aromastoffe bei sehr geringen Konzentrationen liegen. Beispielsweise wird die Geruchsschwelle für Isoamylacetat schon bei einer Konzentration von 1,6 mg/l erreicht [165, 177].

Im Pervaporation-Bio-Hybridprozess werden flüchtige Fermentationsprodukte unter Nutzung der organophilen Pervaporation aus der Fermentationsbrühe abgetrennt. Die organophile Pervaporation ist hoch selektiv gegenüber flüchtigen organischen Komponenten wie Aromastoffen und reichert diese im Permeat an. Dabei permeiert stets auch Wasser durch die Membran. Bei verdünnten wässrigen Feedlösungen wie Fermentationsbrühen stellt Wasser den Hauptbestandteil des Permeates dar. Der Gesamtfluss bei der Pervaporation setzt sich somit aus dem Wasserfluss und dem Produktfluss zusammen. In Bild 5.18 ist der zeitliche Verlauf von Gesamt-, Wasser- und Produktfluss während des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses dargestellt. Der Produktfluss verläuft fermentationssynchron und setzt mit der Produktbildung ein. Der Produktfluss beträgt zwischen  $0,15 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  zu Beginn und  $50 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  gegen Ende der Fermentation und bleibt nach einer Phase des Anstiegs zwischen der 15. und der 25. Stunde bis zum Ende der Fermentation konstant. Der Wasserfluss beträgt zum Zeitpunkt der ersten Probenahme ( $t=0,5$  Stunden) mehr als  $200 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ . Dieser vergleichsweise hohe Wert zu Beginn der Fermentation ist auf das Eindringen von Wasserdampf in das Pervaporationsmodul während des Autoklavierens zurückzuführen. Im Autoklaven herrscht während des Sterilisationsvorganges eine gesättigte Wasserdampf Atmosphäre, ein Druck von 2 bar bis 3 bar sowie eine Temperatur von  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  bis  $130 \text{ }^\circ\text{C}$  vor. Unter diesen Bedingungen ist die absolute Dichtigkeit der Apparatur nicht gegeben. Mit einsetzender Pervaporation wird das in das Membranmodul eingedrungene Wasser durch das permeatseitige Vakuum in den gasförmigen Zustand überführt, gelangt in die Kühlfalle und wird auf diese Weise bei der Probenahme als Permeatfluss erfasst. Das Pervaporationsmodul wird somit in der ersten Phase der Pervaporation getrocknet. Wie aus Bild 5.18 hervorgeht, sinkt dabei der Wasserfluss innerhalb von 4 Stunden auf einen Wert von  $50 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ .

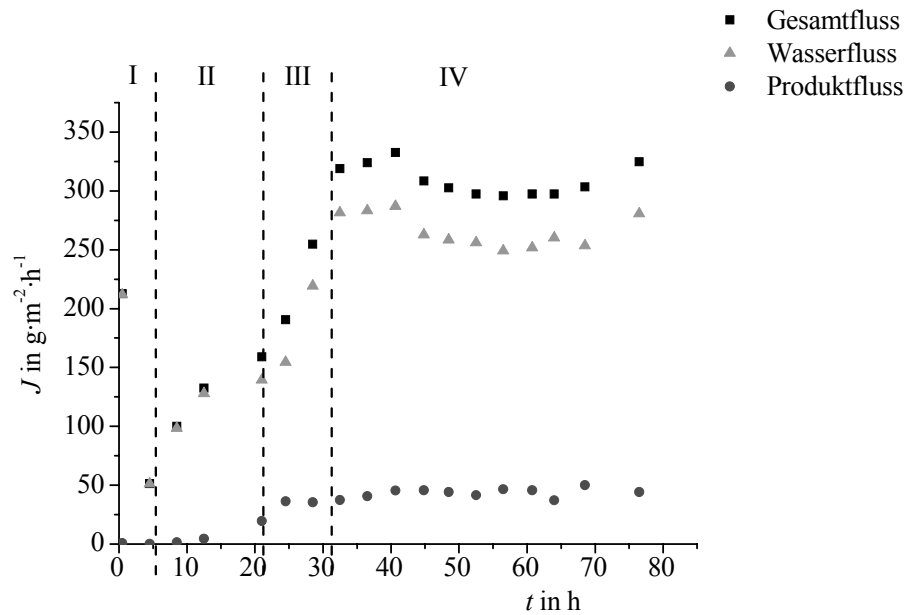
Nach der Trocknungsphase nahm der Wasserfluss während der Konditionierungsphase zu (s. Bild 6.1). Pervaporationsmembranen zeichnen sich aufgrund ihrer flexiblen Polymerstruktur durch ein ausgeprägtes Konditionierungsverhalten aus. Das bedeutet, dass die Membran durch Quellungsvorgänge in der Selektivschicht in einen Gleichgewichtszustand übergeht bis ihre Transporteigenschaften stabil sind. Mit dem Aufbau des Vakuums auf der Permeatseite beginnt die Pervaporation und damit die Sorption und Diffusion der Permeanden in bzw. durch die Membran. Das Eindringen der Permeanden in die Membran führt zu Quellungsvorgängen in der Selektivschicht. Mit zunehmender Quellung der Selektivschicht steigt der Stoffmengenfluss durch die Membran, da dabei das freie Volumen im Polymer zunimmt. Gleichzeitig sinkt die Selektivität der Membran gegenüber organischen Komponenten der Feedlösung

[68]. Das bedeutet, dass von den Quellungsvorgängen während der Konditionierungsphase vor allem der Wasserfluss betroffen ist [23]. Dies ist ebenfalls in Bild 5.18 ersichtlich.

Die Dauer der Konditionierungsphase entspricht der Dauer des Anstiegs des Wasserflusses in Bild 5.18 und beträgt im vorliegenden Fall ca. 25 Stunden. Konditionierungszeiten von 10 Stunden und mehr sind nicht ungewöhnlich [164, 159]. Im Pervaporation-Bio-Hybridprozess ist die Konditionierungsphase mit 25 Stunden deutlich länger, weil sich die Zusammensetzung der Fermentationsbrühe mit Einsetzen der Produktbildung zwischen der 20. und der 30. Stunde in Bezug auf den Aromastoffgehalt verändert. Als Konsequenz setzt eine weitere Konditionierungsphase ein, da die Produktbildung den Gleichgewichtszustand des Stofftransportes in der Membran stört und eine erneute Anpassung an die veränderten Produktkonzentrationen in der Fermentationsbrühe beginnt. Dieses zweistufige Konditionierungsverhalten ist in Bild 5.18 anhand des Verlaufes des Wasserflusses erkennbar. Dieser zeigt den Übergang von der ersten zur zweiten Konditionierungsphase zwischen der 10. und der 20. Stunde.

Um den Einfluss der Konditionierungsphase auf das Trennverhalten in Pervaporationsexperimenten auszuschalten, wird die Membran in der Regel vor der eigentlichen Messung mit der zu untersuchenden Lösung unter den Versuchsbedingungen konditioniert. Erst danach wird das eigentliche Pervaporationsexperiment durchgeführt. Auf diese Weise werden nicht die Transporteigenschaften der Membran während der Konditionierungsphase sondern im stabilen Gleichgewichtszustand erfasst. Im Fall des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses können die Trocknungsphase und die erste Konditionierungsphase vor der Animpfung des Reaktors, d. h. nach der Sterilisation des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors, erfolgen. Die zweite Konditionierungsphase hängt mit der Produktbildung zusammen und muss daher beim Betrieb eines Pervaporation-Bio-Hybridprozesses in jedem Fall Berücksichtigung finden.

Die Phasen der Pervaporation im Pervaporation-Bio-Hybridprozess sind in Bild 6.1 dargestellt.



**Bild 6.1:** Phasen der Pervaporation im Pervaporation-Bio-Hybridprozess: I Trocknungsphase, II Konditionierungsphase 1, III Konditionierungsphase 2, IV Gleichgewichtsphase

Wie aus Bild 6.1 hervorgeht, bleiben nach der zweiten Konditionierungsphase sowohl der Wasserfluss als auch der Produktfluss bis zum Ende des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses auf einem nahezu konstanten Niveau. Diese Konstanz des Permeatflusses über eine Zeitspanne von 50 Stunden zeigt, dass im Pervaporation-Bio-Hybridprozess trotz der Fermentationsvorgänge und insbesondere trotz des Schimmelpilzwachstums keine flussmindernden Foulingerscheinungen auftraten. Ein mikrobielles Fouling oder die Ablagerung von Schwebstoffen und Makromolekülen an der Membranoberfläche werden durch die Eigenschaften des Membranmaterials verhindert. Die in dieser Arbeit eingesetzte Silikonmembran ist porenfrei, hat eine glatte Oberfläche und besteht aus dem hydrophoben Material Polydimethylsiloxan. Die Hydrophobizität der Membran erschwert die Adsorption der in wässriger Lösung befindlichen Zellen, Schwebstoffen und Makromolekülen an der Membranoberfläche. Die Adsorption der Zellen an der Membran ist Voraussetzung für einen Bewuchs der Membranoberfläche [87, 91]. Die hydrophobe Eigenschaft des Silikons wird ebenfalls in der Medizintechnik genutzt. Dabei werden Blutentnahmeröhrchen innenseitig mit Silikon beschichtet, um das Anhaften der Blutzellen am Glas zu unterbinden. Über die Hydrophobizität des Membranmaterials hinaus erschwert die turbulente Strömung über der Membran Fouling erzeugende Ablagerungen auf der Membranoberfläche.

Die Abwesenheit von Foulingerscheinungen bei der organophilen Pervaporation wurde auch von BENGTON et al. [22] beobachtet: In der genannten Untersuchung wurde 6-pentyl- $\alpha$ -pyron, eine Schlüsselverbindung des Kokosnussaromas, aus der Fermentationsbrühe des

Schimmelpilzes *Trichoderma viride* mit der organophilen Pervaporation abgetrennt. Auch LIPNIZKI et al. [129] berichten nach Untersuchungen zur Pervaporation von Fermentationsbrühen, dass selbst über einen Zeitraum von mehreren Wochen kein Fouling festgestellt werden konnte. QURESHI et al. [171] führten Experimente zur pervaporativen Abtrennung von Aceton, Butanol und Ethanol sowohl aus wässrigen Lösungen als auch aus der Fermentationsbrühe mit dem Bakterium *Clostridium acetobutylicum* durch. Dabei wurde keine Beeinträchtigung des Flusses und der Selektivität der Pervaporation der Fermentationsbrühe im Vergleich zur Pervaporation der wässrigen Lösungen beobachtet. Ebenso fanden HUANG und MEAGHER [98] keine Flussminderung von Butanol bei der Pervaporation einer Fermentationsbrühe über einen Zeitraum von 120 Stunden. GUDERNATSCH et al. [91] berichten, dass der Permeatfluss der Pervaporation bei einer Ethanolfermentation mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* über eine Fermentationsperiode von 28 Tagen unverändert blieb. Im Gegensatz dazu wurden bei anderen in der Literatur beschriebenen Pervaporationsexperimenten unter Anwesenheit von Hefezellen sinkende Flüsse gemessen und dieses Ergebnis auf die Ablagerung von Hefezellen auf der Membran zurückgeführt [101, 146]. In der Literatur findet sich ebenfalls ein Bericht über Membranfouling bei der Pervaporation einer Ethanolfermentation mit *Clostridium thermohydrosulfuricum* [142]. Allerdings wurden die genannten Studien mit externen Pervaporationsmodulen und mit Modulen verschiedener Bauart durchgeführt. Darüber hinaus fanden unterschiedliche Membranmaterialien Verwendung. Diese zum Teil widersprüchlichen Ergebnisberichte zeigen, dass das Auftreten von Fouling bei der Pervaporation von der verwendeten Membran, der Bauart des Moduls und der Zusammensetzung der Fermentationsbrühe abhängt und ein direkter Vergleich mehrerer Studien des Membranverhaltens nicht ohne weiteres möglich ist [169].

Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist festzustellen, dass jedenfalls im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor bei der organophilen Pervaporation unter Verwendung einer Polydimethylsiloxan-Membran zur Abtrennung von Aromastoffen bei einer Schimmelpilzfermentation keine flussmindernden Foulingvorgänge auftreten.

Zur Charakterisierung des Trennverhaltens der Pervaporation im Pervaporation-Bio-Hybridprozess muss ferner der Einfluss der Reaktorkonzentration der Fermentationsprodukte auf ihre Permeatflüsse geklärt werden. Dazu sind in Bild 5.19 bzw. in Bild 5.20 die Permeatflüsse der Substanzen Ethanol bzw. Propylacetat ihren jeweiligen Reaktorkonzentrationen gegenübergestellt. Ethanol bzw. Propylacetat stehen dabei stellvertretend für die Gruppe der Alkohole bzw. der Ester. Sowohl für den Alkohol Ethanol als auch für den Ester Propylacetat sind abgesehen von Messwertschwankungen qualitativ identische Verläufe des Permeatflusses und der Reaktorkonzentration erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass der Permeatfluss der Fermentationsprodukte im Pervaporation-Bio-Hybridprozess mit deren jeweiligen Reaktorkonzentration korreliert. Nach Gleichung (2.17) ist dieser Zusammenhang linear.



Die lineare Abhängigkeit von Permeatfluss und Feedkonzentration wurde in Untersuchungen der Pervaporation mit Modelllösungen experimentell bestätigt [105, 120]. Es gilt zu prüfen, ob ein solcher linearer Zusammenhang auch für den Pervaporation-Bio-Hybridprozess gilt. Im Pervaporation-Bio-Hybridprozess ist die Feedlösung eine Fermentationsbrühe. Im Gegensatz zu einer wässrigen Modelllösung ist eine Fermentationsbrühe komplex zusammengesetzt. Außerdem verändern sich die Zusammensetzung und die Eigenschaften der Fermentationslösung mit fortschreitender Fermentation. Zur Überprüfung der direkten Proportionalität von Permeatfluss und Reaktorkonzentration im Pervaporation-Bio-Hybridprozess wurde in Bild 5.21 bzw. Bild 5.22 der Permeatfluss von Ethanol bzw. von Propylacetat gegen die Reaktorkonzentration aufgetragen und einer linearen Regression unterzogen. Die lineare Regression liefert mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2=0,94$  für Ethanol und  $R^2=0,93$  für Propylacetat gute lineare Zusammenhänge von Permeatfluss und Reaktorkonzentration. Die Steigung der Regressionsgeraden entspricht dem Stofftransportkoeffizienten  $k$  (s. Gleichung (2.17)). Tabelle 5.10 enthält die Stofftransportkoeffizienten sowie die Bestimmtheitsmaße der linearen Korrelation von Permeatfluss und Reaktorkonzentration für die untersuchten Fermentationsprodukte. Der lineare Zusammenhang von Permeatfluss und Reaktorkonzentration ist nicht bei allen Fermentationsprodukten eindeutig belegbar. Beispielsweise wurde für die Substanz Isoamylacetat mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2=0,77$  eine schwache Abhängigkeit des Permeatflusses von der Reaktorkonzentration festgestellt. Dennoch stützen diese Ergebnisse in Anbetracht der Komplexität und Dynamik der Fermentationsbrühe die These der direkten Proportionalität von Permeatfluss und Reaktorkonzentration. Eine einfache mathematische Erfassung der Abhängigkeit von Permeatfluss und Reaktorkonzentration ist für die Modellierung des Produktaustrages im Pervaporation-Bio-Hybridprozess unentbehrlich. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit von einem konstanten Stofftransportkoeffizienten  $k_i$  ausgegangen und der Produktaustrag im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor über einen linearen Ansatz modelliert (s. Abschnitt 5.4). Diese Vorgehensweise wird durch LAMER et al. [120] gestützt, die bei der pervaporativen Abtrennung von Benzaldehyd aus einer Fermentationsbrühe ebenfalls einen linearen Zusammenhang zwischen Permeatfluss und Reaktorkonzentration beobachteten. Ebenso setzten DETTWILER et al. [58] konstante Stofftransportkoeffizienten bei der Modellierung des pervaporativen Produktaustrages ein.

Während die Trennleistung der Pervaporation durch die Stoffmengenflüsse repräsentiert wird, ist der Anreicherungsfaktor  $\beta$  ein Maß für die Selektivität des Verfahrens gegenüber den Komponenten der Feedlösung. Die zeitliche Veränderung der Selektivität des Membranverfahrens im Pervaporation-Bio-Hybridprozess ist beispielhaft anhand der Anreicherungsfaktoren für Ethanol bzw. für Propylacetat in Bild 5.23 bzw. Bild 5.24 dargestellt. Für den Alkohol Ethanol und in gleicher Weise für den Ester Propylacetat sinkt der Anreicherungsfaktor von einem hohen Wert zu Beginn der Fermentation auf einen konstant bleibenden Wert ab. Das konstante Niveau wird nach ungefähr 30 Stunden erreicht. Dieser charakteristische Verlauf

des Anreicherungsfaktors wurde bei allen Fermentationsprodukten beobachtet. Zur Erklärung dieses charakteristischen Verlaufs wird der Wasserfluss herangezogen (Bild 5.18). Der Wasserfluss erreicht erst nach der beschriebenen zweistufigen Konditionierungsphase, d. h. nach 30 Stunden, ein stabiles Niveau. Während der Konditionierung steigt der Wasserfluss im Vergleich zum Produktfluss besonders stark an. Dies beeinflusst die Anreicherungsfaktoren der Fermentationsprodukte, denn ein Anstieg des Wasserflusses führt bei gleich bleibendem bzw. nur geringfügig verändertem Produktfluss zu einer Verdünnung des Permeates und damit zu verringerten Permeatkonzentrationen der Fermentationsprodukte. In der Folge nimmt der Wert des Anreicherungsfaktors ab, da dieser als der Quotient aus Permeat- und Feedkonzentration definiert ist. Darüber hinaus ist der Anreicherungsfaktor in Abhängigkeit von der Feedkonzentration einer Substanz keine Konstante. Vielmehr werden bei sehr niedrigen Feedkonzentrationen überproportional hohe Anreicherungsfaktoren erreicht [102, 31, 156, 171, 169, 184, 141, 166]. Vor allem zu Beginn der Fermentation liegen die Aromastoffe in äußerst geringen Konzentrationen vor, was zu hohen Anreicherungsfaktoren in dieser Phase der Fermentation führt.

Die zeitliche Variation des Anreicherungsfaktors im Pervaporation-Bio-Hybridprozess ist bei den Fermentationsprodukten unterschiedlich stark ausgeprägt. Der gemessene Wertebereich für die Anreicherungsfaktoren der Fermentationsprodukte, d. h. ihre Schwankungsbreite, ist in Bild 5.25 dargestellt: Je höher der maximal gemessene Anreicherungsfaktor, desto größer ist seine Schwankungsbreite. Die mittleren Anreicherungsfaktoren der untersuchten Aromastoffe sind in Bild 5.26 in absteigender Reihenfolge gegenübergestellt. Die mittleren Anreicherungsfaktoren reichen von einem Minimalwert von 12 für Ethanol bis zu einem Maximalwert von 432 für Isoamylacetat. Isoamylacetat wird also beim Übergang von der Fermentationsbrühe in das Permeat im Mittel um den Faktor 432 und Ethanol um den Faktor 12 angereichert. Erwartungsgemäß ist die organophile Polydimethylsiloxan-Membran für Ester deutlich selektiver als für Alkohole. Der Selektivitätsunterschied ist auf die stärker ausgeprägte Polarität bzw. Hydrophilie der Alkohole zurückzuführen und wurde in gleicher Weise in anderen Studien festgestellt [120, 18, 119]. LAMER et al. [121] untersuchten die pervaporative Abtrennung von Aromastoffen mit Polydimethylsiloxan-Membranen und ermittelten für Ester Anreicherungsfaktoren zwischen 98 und 264. BENGTSON et al. [18, 19] maßen bei der Pervaporation mit Polydimethylsiloxan-Membranen Anreicherungsfaktoren von mehreren hundert für Ester und von 2 bis 22 für Alkohole.

Der Ester Ethylbutyrat nimmt unter den Estern in Bezug auf seine Anreicherung im Permeat eine Sonderstellung ein. Im Gegensatz zu den mit Werten zwischen 320 und 430 relativ hohen Anreicherungsfaktoren der Ester Propyl-, Ethyl-, Isobutyl- und Isoamylacetat wurde der Ester Ethylbutyrat mit einem relativ geringen Anreicherungsfaktor von 21 bei der Pervaporation abgetrennt (s. Bild 5.26). Die Selektivität organophiler Membranen resultiert aus vielfältigen

Wechselwirkungen des Membranpolymers mit den Permeanden. Dabei spielt die Molekülstruktur der Permeanden eine ebenso wichtige Rolle wie ihre physikalisch chemischen Eigenschaften. Die Ursache für die Sonderstellung des Esters Ethylbutyrat kann allerdings anhand der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung nicht zweifelsfrei geklärt werden. Die Ergebnisse sind aber ein Hinweis darauf, dass die Selektivität der Polydimethylsiloxan-Membran gegenüber der Stoffklasse der Ester durch die Kettenlänge der veresterten Carbonsäure und damit durch die Stellung der Esterbindung innerhalb des Moleküls beeinflusst wird. Aus den vorliegenden Ergebnissen geht hervor, dass die Ester der Essigsäure (Acetate) bei der organophilen Pervaporation mit Polydimethylsiloxan-Membranen besser abgetrennt werden als die Ester der Buttersäure (Butyrate).

Die hohen Werte der Anreicherungsfaktoren zeigen, dass die Pervaporation eine starke Aufkonzentrierung der Fermentationsprodukte im Permeat bewirkt. Ferner werden die Fermentationsprodukte bei der Pervaporation isoliert und aufgereinigt, da neben den Fermentationsprodukten ausschließlich Wasser in das Permeat gelangt. Die Isolierung, Konzentrierung und Aufreinigung von Fermentationsprodukten (Downstream Processing) sind wesentliche Prozessschritte eines biotechnologischen Produktionsprozesses und stellen einen nicht unerheblichen Kostenfaktor dar [20]. Die Integration dieser Verfahrensschritte in den Pervaporation-Bio-Hybridprozess senkt die Kosten der Produktgewinnung, da das Downstream Processing in technischer und energetischer Hinsicht unter reduziertem Aufwand erfolgen kann [69, 75].

Wie bereits erläutert ist das Ziel des in dieser Arbeit untersuchten Pervaporation-Bio-Hybridprozesses die Gewinnung eines natürlichen, bananenartigen Komplexaromas. Dabei wird davon ausgegangen, dass der Schimmelpilz *Ceratocystis fimbriata* die Komponenten dieses Aromas in einem für die geruchliche Ausprägung sehr günstigen Verhältnis zueinander produziert. Es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es im Pervaporation-Bio-Hybridprozess aufgrund der unterschiedlichen Anreicherungsfaktoren der Aromastoffe beim Übergang von der Fermentationsbrühe in das Permeat zu einer Aromaprofilverschiebung kommt. Dadurch kann der originäre Aromaeindruck nicht allein durch eine Rückverdünnung des Permeats wieder hergestellt werden. Es ist daher darauf hinzuweisen, dass vor dem Einsatz im Lebensmittel die Mengenverhältnisse der Aromastoffe im Aromagemisch neu eingestellt werden müssen. Die sensorische Beurteilung des Permeats und ggf. die Ermittlung geeigneter Verfahren zur Einstellung des gewünschten Aromaprofils muss Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

Die Dauer des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses betrug 80 Stunden (s. Bild 5.6 & Bild 5.18). Während dieser Zeit fielen insgesamt 137 g/l Permeat an. 18 g/l davon entfielen auf die Summe Fermentationsprodukte und 119 g/l auf Wasser. Das entspricht einer Produktkonzentration im Permeat von 13 %. Alleine 10,8 % des Permeats entfielen auf das Hauptprodukt

Ethanol. Eine Erhöhung der Permeatanteile der wertvolleren und aromaintensiveren, höher siedenden Ester und Alkohole kann durch eine zweistufige Kondensation des Permeats erreicht werden: Eine erste Stufe bei einer Temperatur von wenig unter 0 °C zur Kondensation des Wassers und der niedrig siedenden Alkohole und eine zweite Kondensationsstufe bei wesentlich niedrigeren Temperaturen mit Trockeneis oder flüssigem Stickstoff zur Kondensation der höher siedenden Ester und Alkohole. In der zweiten Kondensationsstufe wird auf diese Weise ein an höher siedenden Aromastoffen reiches Kondensat gewonnen [12]. Ein solches System erhöht die Anreicherungs-faktoren der höher siedenden Substanzen aufgrund der partiellen Wasserentfernung im ersten Kondensator um das Fünffache und senkt die Kosten der Kondensation [63, 97]. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Kondensation der Aromastoffe mit flüssigem Stickstoff bei -196 °C. Im industriellen Maßstab ist es jedoch oft nicht realisierbar, die Kondensationseinheit bei derartig niedrigen Temperaturen zu betreiben, da die Kühlung mit flüssigem Stickstoff hohe Kosten verursacht und ein Ausfrieren des Permeats wegen resultierender Förderschwierigkeiten nicht erwünscht ist [110]. Auch aus diesen Gründen ist eine zweistufige Kondensation sinnvoll und muss daher Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

### 6.3 Vergleichende Untersuchungen

Wie bereits ausgeführt, wird mit dem Pervaporation-Bio-Hybridprozess das Ziel der Ausbeuteerhöhung bei der fermentativen Aromastoffgewinnung verfolgt. Das bioprozesstechnische Prinzip ist dabei die In-situ-Produktabtrennung unter Nutzung der organophilen Pervaporation. Durch die In-situ-Produktabtrennung wird die Produktinhibierung der Produktsynthese und des Wachstums verringert bzw. unterbunden. Darüber hinaus vermindert die In-situ-Produktabtrennung Produktverluste durch die Belüftung des Bioreaktors und durch enzymatischen Abbau. Enzyme wie Esterasen und Lipasen sind beispielsweise am Abbau von Estern in der Fermentationsbrühe beteiligt [1, 165, 103].

Durch einen Vergleich des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses mit einem klassischen Submersprozess kann das Erreichen des o. g. Prozesszieles überprüft und quantifiziert werden. Die Bewertung der Vergleichsprozesse im Hinblick auf ihre Effizienz erfolgt im Wesentlichen anhand der Produktbildung sowie der fermentationstechnischen Kenngrößen Substratetragskoeffizient und Raum-Zeit-Ausbeute. Voraussetzung für den Vergleich der Produktbildung zweier Fermentationen sind übereinstimmende Fermentationsbedingungen und vergleichbare Fermentationsverläufe. Vor diesem Hintergrund werden zunächst die Fermentationsverläufe der klassischen Submersfermentation und des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses gegenübergestellt. Dabei stehen der Abbau der Kohlenstoffquelle Glucose, die zeitliche Veränderung des pH-Wertes und das Wachstum des Schimmelpilzes im Vordergrund.

Die Metabolisierung der Kohlenstoffquelle Glucose beim Wachstum und bei der Produktbildung des Schimmelpilzes wurde als Glucoseverbrauch gemessen und mithilfe der Gompertz-Gleichung mathematisch erfasst (s. Bild 5.27). Die durch den Gompertz-Parameter  $\lambda$  angegebene lag-Zeit ist für beide Fermentationen mit  $\lambda_{klassisch} = 16,2$  h und  $\lambda_{PBHP} = 17,3$  h nahezu gleich. Die Produktbildung setzt bei beiden Fermentationen nach einer lag-Phase gleicher Dauer ein (s. Bild 5.33 bis Bild 5.40). Hingegen beginnt das Wachstum in beiden Fällen ohne eine ausgeprägte lag-Phase (s. Bild 5.30). Die bei dem Glucoseverbrauch gemessene lag-Phase ist demzufolge auf das verzögerte Einsetzen der Produktbildung nach entsprechender Absenkung des pH-Wertes zurückzuführen.

Wie aus Bild 5.27 hervorgeht, stimmen die Gompertz-Parameter  $U_{max}$  trotz des unterschiedlichen Glucoseverbrauchs in beiden Verfahren mit einem Wert von rund 143 g/l überein. Dieser Wert steht für den volumetrischen Glucoseverbrauch am Ende der Fermentation. Die Übereinstimmung dieses Wertes für beide Fermentationen ist bemerkenswert, da im Pervaporation-Bio-Hybridprozess wegen der verminderten Produktinhibierung mit einem höheren Glucoseverbrauch gerechnet werden konnte. Dass beide Fermentationen dennoch zu einem Zeitpunkt gleichen Glucoseverbrauchs zum Erliegen kommen, hängt mit der ausschließlichen Zufütterung von Glucose zusammen, da es dabei zu einer Limitierung essenzieller Nährstoffe kommt. Zu Beginn der Fermentation wurden 20 g/l Malzextrakt und 4 g/l Pepton vorgelegt. Diese natürlichen Substrate liefern neben Kohlenstoff- und Stickstoffträgern alle für den Stoffwechsel des Schimmelpilzes essenziellen Nährstoffe wie Vitamine, Aminosäuren und Spurenelemente. Da diese essenziellen Nährstoffe in begrenzter Menge vorliegen, kommt es nach einer gewissen Zeit der Fermentation zu einer Substratlimitierung. Der Gompertz-Parameter  $U_{max} = 143$  g/l kann demnach als der Wert des Glucoseverbrauchs interpretiert werden, bei der die Stoffwechselaktivität des Schimmelpilzes aufgrund der Limitierung eines oder mehrerer essenzieller Bestandteile des Malzextrakts bzw. des Peptons endet. Vor diesem Hintergrund ist es evident, dass beide Fermentationen gleiche Werte für den maximalen Glucoseverbrauch ( $U_{max}$ ) aufweisen müssen. Die Substratlimitierung kann durch eine entsprechende Zufütterung verhindert werden. Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass es bei der Zufütterung komplexer natürlicher Substrate zu einer Inhibierung der Fermentation durch Akkumulation von nicht metabolisierbaren Substratnebenkomponenten kommen kann [107, 143].

Neben den o. g. Gründen kommt ebenso eine Akkumulation von toxischen und im Pervaporation-Bio-Hybridprozess nicht abtrennbaren Metaboliten wie z. B. Carbonsäuren als Ursache für das Erliegen der Fermentationsaktivität in Betracht. Während des Wachstumsprozesses produziert der Schimmelpilz organische Säuren und gibt sie in die Fermentationsbrühe ab. Falls die Konzentration der physiologisch wirksamen, undissoziierten Säuren außerhalb der

Zellen zu hoch ist, werden die gebildeten Carbonsäuren nicht mehr ausgeschieden. Sie verbleiben in der Zelle und stören den intrazellulären pH-Wert. Es kommt zu einer physiologischen Schädigung der Mikroorganismen, die bis zum Absterben der Zellen führen kann. Die toxische Wirkung der Säuren kann durch In-situ-Säureabtrennung verhindert werden. Zur In-situ-Säureabtrennung eignen sich die Fällung, die Lösungsmittlextraktion, die Elektrodialyse, der Ionenaustausch und die Kristallisation [192, 113].

Weitere Informationen zur Charakteristik des Glucoseverbrauchs liefert eine Betrachtung der Glucoseverbrauchsgeschwindigkeit. Die Glucoseverbrauchsgeschwindigkeit kann entweder mithilfe des Differenzenverfahrens aus den Messwerten oder mit der ersten Ableitung der Gompertz-Gleichung berechnet werden. In Bild 5.28 sind die Glucoseverbrauchsgeschwindigkeiten beider Fermentationen anhand der ersten Ableitung der Gompertz-Gleichung dargestellt. Die Glucoseverbrauchsgeschwindigkeit erreicht im Pervaporation-Bio-Hybridprozess ein höheres Maximum ( $R_{S,\max}=3,47 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) als bei der Vergleichsfermentation ( $R_{S,\max}=2,64 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Das Maximum der Glucoseverbrauchsgeschwindigkeit wird im Pervaporation-Bio-Hybridprozess früher erreicht: Im Pervaporation-Bio-Hybridprozess liegt das Maximum bei  $t = 32$  Stunden und im klassischen Submersreaktor bei  $t = 36$  Stunden. Dies zeigt, dass die Glucose im Pervaporation-Bio-Hybridprozess aufgrund der verminderten Produktinhibierung schneller umgesetzt wird. Die Stoffwechselaktivität wurde also durch die In-situ-Produktabtrennung verbessert. Das zeigt sich ebenso im stärkeren Wachstum des Schimmelpilzes im Pervaporation-Bio-Hybridprozess (s. Bild 5.30). Mit der erhöhten Stoffwechselaktivität kommt es im Pervaporation-Bio-Hybridprozess früher zu einer Substratlimitierung und damit auch früher zum Erliegen der Fermentation. Dieses Verhalten zeigt sich in Bild 5.28 durch die geringere Glucoseverbrauchsgeschwindigkeit im Pervaporation-Bio-Hybridprozess gegen Ende der Fermentation.

In Bild 5.29 ist der zeitliche Verlauf des pH-Wertes der Fermentationsbrühe beider Fermentationsprozesse dargestellt. Die pH-Wertverläufe sind bis zur 45. Stunde identisch. Jenseits der 45. Stunde weist die Fermentationsbrühe im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor einen geringfügig höheren pH-Wert auf als die Fermentationsbrühe im klassischen Submersreaktor. Ursächlich hierfür ist die gesteigerte Synthese der Essigsäureester im Pervaporation-Bio-Hybridprozess (s. Bild 5.33 bis Bild 5.37). Bei der Bildung von Essigsäure-Estern werden Alkohole mit Acetyl-Coenzym A verestert [151, 165]. Acetyl-Coenzym A ist eine energiereiche Verbindung, die sich durch Veresterung der SH-Gruppe von Coenzym A mit Essigsäure ableitet. Auf diese Weise wird der Fermentationsbrühe während der Esterbildung Essigsäure entzogen. Dies führt zu einer Anhebung des pH-Wertes und erklärt den höheren pH-Wert der Fermentationsbrühe gegen Ende des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses.

Bild 5.30 zeigt den Vergleich des Wachstums im klassischen Submersprozess und im Pervaporation-Bio-Hybridprozess. Die Parameteroptimierung der logistischen Gleichung durch nicht lineare Regression lieferte Werte für das Inokulum im Pervaporation-Bio-Hybridprozess von  $c_{x0} = 1,1 \text{ g/l}$  und im klassischen Submersreaktor von  $c_{x0} = 0,8 \text{ g/l}$ . Demzufolge war das Inokulum im Pervaporation-Bio-Hybridprozess um 46 % größer. Damit waren die Startbedingungen für die Fermentation im Pervaporation-Bio-Hybridprozess günstiger als im klassischen Submersprozess. Trotzdem ist die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit im Pervaporation-Bio-Hybridprozess geringer ( $\mu_{max} = 0,09 \text{ h}^{-1}$ ) als bei der klassischen Submersfermentation ( $\mu_{max} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ ). Der Wert für die maximale Biomasse  $c_{x,max}$  ist im Pervaporation-Bio-Hybridprozess mit  $5,8 \text{ g/l}$  um 32 % höher als im klassischen Submersprozess ( $c_{x,max} = 4,4 \text{ g/l}$ ). Es gilt zu klären, ob die höhere maximale Biomasse im Pervaporation-Bio-Hybridprozess verfahrensbedingt oder ausschließlich auf das größere Inokulum zurückzuführen ist. Dazu werden in Bild 5.31 die Wachstumsgeschwindigkeiten  $R_x$  beider Prozesse miteinander verglichen. Die Wachstumsgeschwindigkeit  $R_x$  ergibt sich dabei aus der ersten Ableitung der logistischen Gleichung (vgl. Abschnitt 2.4.2). Im Gegensatz zur spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  ist die absolute Wachstumsgeschwindigkeit  $R_x$  nicht von der Biomassekonzentration abhängig. Die absolute Wachstumsgeschwindigkeit gibt die absolute Zunahme der Biomassekonzentration pro Stunde an. Bis zum Ende der lag-Phase von ca. 16 Stunden sind die Wachstumsgeschwindigkeiten beider Prozesse gleich und erreichen ein Maximum von in beiden Fällen  $R_{x,max} = 0,13 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Die größere Inokulummenge im Pervaporation-Bio-Hybridprozess führte somit nicht zu Wachstumsvorteilen. Erst mit Einsetzen der Produktbildung weichen die Wachstumsgeschwindigkeiten beider Prozesse voneinander ab. Der Schimmelpilz wächst im weiteren Verlauf im Pervaporation-Bio-Hybridprozess schneller. Ursächlich hierfür ist die im Pervaporation-Bio-Hybridprozess verminderte Produktinhibition des Wachstums. Das stärkere Wachstum führt zu einer Zunahme der Aromabiosynthese, da die Bildungsgeschwindigkeit der Aromastoffe positiv mit der Wachstumsgeschwindigkeit und der Biomasse korreliert [123, 29].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die In-situ-Produktabtrennung mit der organophilen Pervaporation die Fermentation nicht beeinträchtigt, sondern zu einer erhöhten Stoffwechselaktivität des Biokatalysators führt. SCHÄFER et al. [187] stellten bei der Pervaporation eines Weinaromas aus einer Traubenmost-Fermentation mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ebenfalls keine Beeinträchtigung der Stoffwechselleistung des Biokatalysators fest. Die Pervaporation ist für die In-situ-Produktabtrennung aus Fermentationen besonders gut geeignet, da sie ohne chemische Hilfs- und Zusatzstoffe auskommt.

Bild 5.33 bis Bild 5.40 enthalten eine Gegenüberstellung der Produktbildung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess und im klassischen Submersprozess. Nach 30 Stunden der Fermentation ist die Produktbildung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess höher als im Vergleichspro-

zess. Dies liegt daran, dass die Produktinhibierung bei fortgeschrittener Produktbildung einsetzt und sich die In-situ-Produktabtrennung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess erst dann positiv auf die Produktbildung auswirkt. Die Steigerung der Produktbildung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess ist bei den Estern Ethylacetat, Propylacetat, Isobutylacetat und Isoamylacetat am stärksten ausgeprägt (s. Bild 5.33 bis Bild 5.36). Die Zunahme der Bildung von Ethanol, Isobutanol, Isoamylalkohol und Ethylbutyrat im Pervaporation-Bio-Hybridprozess fällt dagegen geringer aus (s. Bild 5.37 bis Bild 5.40). Letztere Substanzen werden bei der Pervaporation in einem geringeren Maße abgetrennt; dies zeigen die Anreicherungsfaktoren in Bild 5.26. Damit verbleibt ein nicht unerheblicher Anteil dieser Substanzen im Bioreaktor und ist weiterhin inhibitorisch wirksam. Im Hinblick auf das Hauptprodukt Ethanol wurde die Produktbildung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess nur geringfügig verbessert. Aufgrund der geringen Selektivität der Polydimethylsiloxan-Membran gegenüber Ethanol ist der Ethanolaustrag im Pervaporation-Bio-Hybridprozess für eine Produktivitätssteigerung nicht ausreichend.

Die Sonderstellung des Ethanols spiegelt sich auch in dessen Glucoseertragskoeffizienten wider. In Tabelle 5.11 sind die Glucoseertragskoeffizienten im Pervaporation-Bio-Hybridprozess und im klassischen Submersprozess aufgeführt und in Bild 5.41 und Bild 5.42 grafisch dargestellt. Mit Ausnahme von Ethanol nahm der Glucoseertragskoeffizient der Fermentationsprodukte im Pervaporation-Bio-Hybridprozess zu. Die Steigerungen reichen von einem Minimalwert von 32 % für Ethylbutyrat bis zu einem Maximalwert von über 500 % für Isoamylacetat. Einzig der Glucoseertragskoeffizient der Substanz Ethanol verringerte sich um 4,5 %. Diese negative Veränderung liegt in der Natur des Ertragskoeffizienten: Steigt bei konstanter Ethanolbildung der Glucoseverbrauch, sinkt der Glucoseertragskoeffizient für Ethanol. Die Glucoseertragskoeffizienten der übrigen Fermentationsprodukte wurden zulasten des Ethanols gesteigert. Dieser Effekt ist nicht unerwünscht, da auf diese Weise die Bildung der aromaintensiven Ester und höheren Alkohole begünstigt wird.

Abschließend wird die Raum-Zeit-Ausbeute der Produktsynthese betrachtet. Wie die Werte in Tabelle 5.12 zeigen, wurden im Pervaporation-Bio-Hybridprozess im Vergleich zum klassischen Submersprozess höhere Raum-Zeit-Ausbeuten erreicht. Die prozentuale Änderung der Raum-Zeit-Ausbeute der Fermentationsprodukte ist in Bild 5.43 und Bild 5.44 dargestellt. Die höchsten Ausbeutesteigerungen wurden für die bei der Pervaporation gut abgetrennten Ester gemessen. Die Reihenfolge der Ausbeutesteigerung der Fermentationsprodukte entspricht genau derjenigen der Anreicherungsfaktoren (s. Bild 5.26). Die Höhe des Produktaustrages ist somit für den Erfolg des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses maßgeblich.

Es ist darauf hinzuweisen, dass die organophile Pervaporation in Abhängigkeit des Membranmaterials zur Abtrennung verschiedenster flüchtiger organischer Verbindungen geeignet



ist. Folglich ist der Pervaporation-Bio-Hybridprozess nicht nur für die Aromabiosynthese einsetzbar, sondern für die fermentative Gewinnung flüchtiger organischer Verbindungen im Allgemeinen. Dies umfasst z. B. ebenso die Gewinnung organischer Lösungsmittel. Die Einsatzmöglichkeit von Pervaporation-Bio-Hybridprozessen hängt von der Verfügbarkeit ausreichend selektiver und leistungsfähiger Pervaporationsmembranen für die in Frage kommenden Fermentationsprodukte ab.

Trotz der erreichten Produktivitätssteigerung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess sind die absolut gebildeten Produktmengen bei der Modellfermentation dieser Arbeit äußerst gering. Allerdings konnte am Beispiel der Aromabiosynthese mit dem Schimmelpilz *Ceratocystis fimbriata* gezeigt werden, dass der Pervaporation-Bio-Hybridprozess ein geeignetes bioprozesstechnisches Mittel zur Effizienzsteigerung der fermentativen Gewinnung von Aromastoffen darstellt. Zum Erreichen der Wirtschaftlichkeit bedarf es über den in dieser Arbeit vorgestellten bioprozesstechnischen Ansatz hinaus Anstrengungen weiterer Disziplinen der Biowissenschaften. Beispielsweise kann mit den Methoden der modernen Molekularbiologie die Entwicklung von Hochleistungsstämmen für die Aromabiosynthese gelingen.

Im Ergebnis ist somit festzustellen, dass durch die Anwendung des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses eine erhebliche Steigerung der Produktbildung bei der Aromabiosynthese erreicht werden kann. Die In-situ-Produktabtrennung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess führt über drei verschiedene Mechanismen zum Anstieg der Produktmengen:

1. Die Produktinhibierung der Produktsynthese wird vermindert
2. Die Produktinhibierung des Wachstums wird verringert
3. Produktverluste mit der Luftzufuhr sowie durch Remetabolisierung werden minimiert.

#### **6.4 Bioprozessmodell**

In Abschnitt 5.4 wurde ein so genanntes unstrukturiertes Modell des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses entwickelt. Wie Bild 5.46 bis Bild 5.53 zeigen, ist das Bioprozessmodell in der Lage, die experimentellen Konzentrationsverläufe der Produktbildung und der Produktabtrennung bei der Modellfermentation im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor mathematisch zu beschreiben. Darüber hinaus kann es dazu genutzt werden, den Einfluss der Güte des Produktaustrages bei der In-situ-Produktabtrennung auf die Produktbildung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess zu simulieren. Auf diese Weise ist es möglich, die Auslegung des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors hinsichtlich eines ausreichenden Produktaustrages zu charakterisieren und gegebenenfalls zu optimieren.

Das Bioprozessmodell verknüpft die Produktbildung entsprechend des Produktbildungstyps I nach GADEN mit dem Glucoseverbrauch des Mikroorganismusses (s. Abschnitt 2.4.4). In vielen Fällen kann die Produktbildung ebenso über das Wachstum des Mikroorganismusses modelliert werden. Im Fall eines Schimmelpilzes in Submerskultur ist die messtechnische Erfassung des Wachstums jedoch nicht eindeutig. Dies liegt an der Schwierigkeit der repräsentativen Probenahme aus dem Fermenter, da die Größe der Wachstumseinheiten des Schimmelpilzes, der so genannten Pellets, in einem ungünstigen Verhältnis zu dem relativ geringen Probenahmenvolumen von 10 ml steht. Darüber hinaus kann die Bestimmung des Schimmelpilzwachstums nicht wie bei Bakterien und Hefen über das Zählen Kolonie bildender Einheiten im Ausplattierungsverfahren erfolgen, sondern ausschließlich durch Wägung des Biomassegehaltes in der Probe. Dabei werden mit dem Gewicht der Biomasse auch tote und biokatalytisch inaktive Zellen erfasst. Biokatalytisch inaktive Zellen finden sich beispielsweise im Zentrum der Pellets, wo sie nicht mehr ausreichend am Stoffaustausch der Fermentation teilnehmen können. Aus diesem Grund ist die gravimetrisch bestimmte Biomassekonzentration des Schimmelpilzes kein Maß für dessen biokatalytische Aktivität. Im Gegensatz dazu wird die biokatalytische Aktivität des Schimmelpilzes eindeutig durch den Glucoseverbrauch  $U(t)$  repräsentiert (s. Bild 5.8). Aus diesem Grund wurde die Produktbildung vorliegend linear mit dem Glucoseverbrauch verknüpft.

Für die Charakterisierung der Reaktorauslegung wird der Einfluss der Güte des Produktausstrages auf die Produktbildung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess simuliert. Die Simulation unterschiedlicher Produktausträge kann über die Variation des volumetrischen Produktausstragskoeffizienten  $\phi$  innerhalb des Differenzialgleichungssystems (5.19) erfolgen, wobei die übrigen Koeffizienten des Bioprozessmodells unverändert bleiben. Die Definition des volumetrischen Produktausstragskoeffizienten lautet:

$$\phi_i = k_i \cdot \frac{A}{V} \quad (5.15)$$

Demzufolge kann beispielsweise eine Erhöhung des volumetrischen Produktausstragskoeffizienten prozesstechnisch im Wesentlichen durch

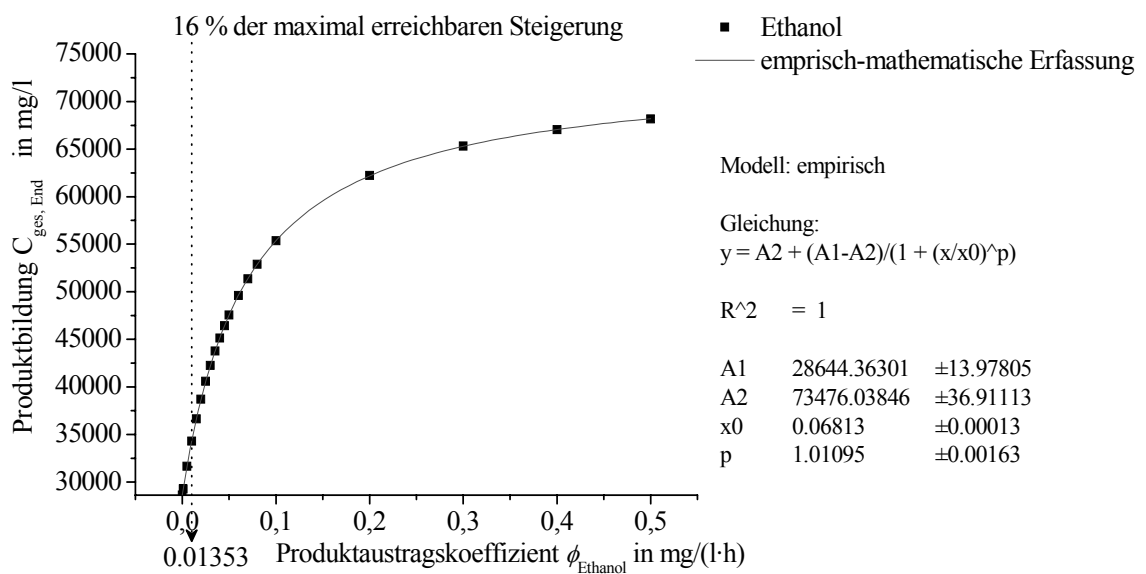
- eine Verringerung des Fermentationsvolumens,
- eine Vergrößerung der Membranfläche und
- die Verwendung einer leistungsfähigeren Membran

sowie in geringerem Maße durch

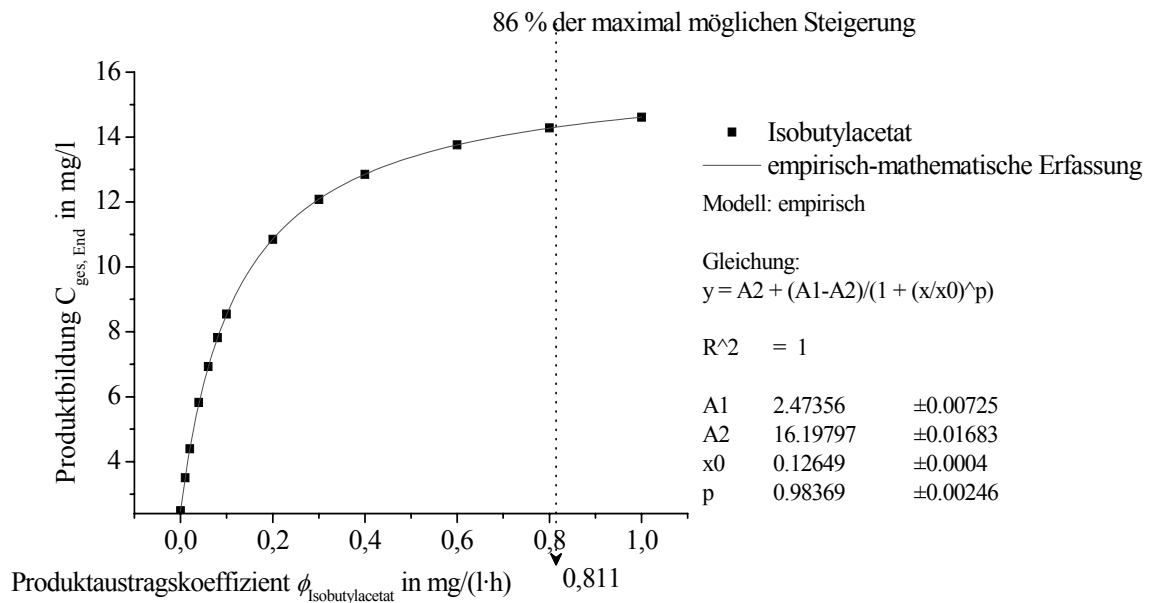
- eine Verstärkung des permeatseitigen Vakuums und
- eine Verstärkung der hydrodynamischen Turbulenz über der Membran

erreicht werden.

Die Lösung des Differenzialgleichungssystems liefert für jeden der eingesetzten volumetrischen Produktaustragskoeffizienten eine Funktion für die volumetrische Produktbildung  $C_{ges}(t)$ . Die volumetrische Produktbildung am Ende der Fermentation  $C_{ges}^{End} = C_{ges}(t = 150\text{ h})$  bildet mit dem entsprechenden volumetrischen Produktaustragskoeffizienten  $\phi_i$  ein Wertepaar  $(C_{ges}^{End} / \phi_i)$ . Die Auftragung der Wertepaare in einem Diagramm liefert eine Darstellung der Abhängigkeit beider Variablen. Bild 6.2 und Bild 6.3 zeigen das Ergebnis dieser Auftragung beispielhaft für den Alkohol Ethanol bzw. für den Ester Isobutylacetat.



**Bild 6.2:** Abhängigkeit der maximalen Produktbildung vom Wert des volumetrischen Produktaustragskoeffizienten  $\phi$  für Ethanol



**Bild 6.3:** Abhängigkeit der maximalen volumetrischen Produktbildung vom Wert des volumetrischen Produktaustragskoeffizienten  $\phi$  für Isobutylacetat

Um eine mathematische Gleichung für die Abhängigkeit der maximalen Produktbildung von dem Produktaustragskoeffizienten zu erhalten, wurde eine empirische Gleichung der Form

$$y = a_2 + \frac{a_1 - a_2}{1 + (x/x_0)^{a_3}} \quad (6.2)$$

an die Wertepaare von  $C_{ges}^{End}(\phi)$  gegen  $\phi$  angepasst. Die Koeffizienten der Gleichung (6.2) haben folgende Bedeutung:

$$y = C_{ges}^{End}(\phi)$$

$$x = \phi$$

$$x_0 = \phi_{SP}, \text{ d. h. } \phi \text{ am Scheitelpunkt der Kurve}$$

$$a_1 = C_{ges}^{End}(\phi \rightarrow \infty), \text{ d. h. die Produktbildung bei vollständiger In-Situ-Produktabtrennung}$$

$$a_2 = C_{ges}^{End}(\phi = 0), \text{ d. h. die Produktbildung ohne In-Situ-Produktabtrennung}$$

$$a_3 = \text{empirischer Koeffizient}$$

Damit ergibt sich die modifizierte Gleichung der Form:

$$C_{ges}^{End}(\phi) = C_{ges}^{End}(0) + \frac{(C_{ges}^{End}(\infty) - C_{ges}^{End}(0))}{1 + \left(\frac{\phi}{\phi_{SP}}\right)^{a_3}} \quad (6.3)$$

Die Anpassung dieser Gleichung an die Daten gelang in allen Fällen mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 1$ .

Bei einer Charakterisierung und für eine Bewertung der Reaktorauslegung ist das Verhältnis der experimentell erreichten Steigerung der Produktbildung zur theoretisch möglichen Steigerung bei vollständiger Produktabtrennung ( $\phi \rightarrow \infty$ ), im Folgenden „relative Produktbildungssteigerung  $\Pi_i$ “ genannt, von Interesse. Die relative Produktbildungssteigerung ist produktspezifisch und wird wie folgt berechnet:

$$\Pi_i = \frac{C_{i,ges}^{End}(\phi_{exp}) - C_{i,ges}^{End}(\phi = 0)}{C_{i,ges}^{End}(\phi \rightarrow \infty) - C_{i,ges}^{End}(\phi = 0)} \cdot 100\% \quad (6.4)$$

In Bild 6.2 und Bild 6.3 markieren gestrichelt dargestellte Hilfslinien die Lage des *experimentellen* volumetrischen Produktaustragskoeffizienten  $\phi_{exp}$ . Die Beschriftungen der Hilfslinien nennen die im Experiment prozentual erreichte Produktbildungssteigerung  $\Pi$ . Tabelle 6.14 fasst die Ergebnisse der Charakterisierung der Reaktorauslegung für die Fermentationsprodukte zusammen.

**Tabelle 6.14 Ergebnisse der Charakterisierung der Reaktorauslegung**

Produkt $i$	$C_{i,ges}^{End}(\phi = 0)$ in mg/l	$C_{i,ges}^{End}(\phi_{exp})$ in mg/l	$C_{i,ges}^{End}(\phi \rightarrow \infty)$ in mg/l	$\Pi_i$ in %
<b>Ethanol</b>	28620,0	35980,0	73476,0	16,41
<b>Isobutanol</b>	49,8	94,3	160,0	40,41
<b>Isoamylalkohol</b>	43,5	84,9	117,1	56,20
<b>Ethylacetat</b>	541,7	2233,0	2568,8	83,43
<b>Propylacetat</b>	7,1	32,7	37,2	85,04
<b>Isobutylacetat</b>	2,4	14,3	16,2	86,26
<b>Isoamylacetat</b>	1,0	7,2	8,3	84,88
<b>Ethylbutyrat</b>	6,5	10,0	15,8	37,87

Die Bewertung der Auslegung des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors anhand der Werte  $\Pi_i$  in Tabelle 6.14 macht es notwendig, einen Optimalwert für  $\Pi$  festzulegen. Dieser Wert muss sich nach ökonomischen Gesichtspunkten richten. Bei einer Wirtschaftlichkeitsbetrachtung der Reaktorauslegung in Bezug auf  $\Pi$  müssen die Kosten einer verbesserten Produktabtren-

nung dem Zugewinn durch die verbesserte Produktbildung gegenübergestellt werden. Die Ermittlung solcher ökonomischer Zusammenhänge ist nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit und muss in zukünftigen Studien Berücksichtigung finden. Wird indessen ein einheitlicher mittlerer Wert für  $II$  von 50 % als optimal zugrunde gelegt, kann abschließend festgestellt werden, dass der Produktaustrag im vorliegenden Pervaporation-Bio-Hybridreaktor für die Gewinnung der Substanzen Isoamylalkohol, Ethylacetat, Propylacetat, Isobutylacetat und Isoamylacetat über dem Optimalwert liegt, wohingegen der Produktaustrag der Substanzen Ethanol, Isobutanol und Ethylbutyrat unzureichend ausfällt. Dies zeigt, dass die Reaktorauslegung in Bezug auf einen optimalen Austrag des gesamten Produktspektrums der Fermentation nur möglich ist, wenn Membranen mit einem entsprechenden Selektivitätsprofil verfügbar sind. Die Trenneigenschaften der Pervaporationsmembran im Pervaporation-Bio-Hybridprozess müssen demzufolge auf das in Frage kommende Spektrum der Fermentationsprodukte zugeschnitten sein. Folglich ist der wirtschaftliche Erfolg von Pervaporation-Bio-Hybridprozessen unmittelbar mit entsprechenden Fortschritten auf dem Gebiet der Membranentwicklung bzw. der Membranmaterialforschung verbunden.

## 7 Zusammenfassung

Das hohe Potenzial biotechnologischer Produktsyntheseverfahren hat in Verbindung mit der steigenden Nachfrage nach natürlichen Aromastoffen zu einer verstärkten Forschungstätigkeit auf dem Gebiet der biotechnologischen Aromastoffgewinnung geführt. Die industrielle Umsetzung der dabei aufgezeigten Vielfalt an mikrobiellen Aromasyntheseverfahren scheidet jedoch häufig an deren Unwirtschaftlichkeit aufgrund geringer Produkterträge und – ausbeuten. Vor diesem Hintergrund ist es ein Anliegen der Bioprozesstechnik, die biotechnologischen Produktionsprozesse für Aromastoffe wirtschaftlich zu gestalten.

Der Grund für die begrenzte Produktivität der Aromabiosynthese ist neben den genetischen Eigenschaften des produzierenden Stammes vor allem die Produktinhibierung der mikrobiellen Aromastoffbildung. Diese kann auf bioprozesstechnischem Weg durch eine so genannte In-situ-Produktabtrennung vermindert bzw. vermieden werden. Dabei werden die Aromastoffe zeitgleich zu ihrer Entstehung aus dem Fermenter abgetrennt. Für diese Aufgabe eignet sich in besonderer Weise die organophile Pervaporation. Bei diesem Trennverfahren werden die Aromastoffe über eine Polymermembran selektiv aus der Fermentationsbrühe abgetrennt und unter starker Aufkonzentrierung und Reinigung in das Permeat überführt.

In der vorliegenden Arbeit erfolgt die technische Umsetzung der pervaporativen In-situ-Produktabtrennung durch die unmittelbare Integration des Trennprozesses Pervaporation in den Bioreaktor. Ziel ist eine umfassende bioprozesstechnische Charakterisierung des Pervaporation-Bio-Hybridreaktors. Diese wird am Beispiel der Gewinnung eines Fruchtaromas unter Nutzung des Schimmelpilzes *Ceratocystis fimbriata* in Submerskultur durchgeführt. Die Arbeit ist entsprechend der Untersuchungsschwerpunkte in vier Abschnitte gegliedert.

Im ersten Abschnitt wird der Einfluss der Fermentationssubstrate und Betriebsparameter auf die Produktabtrennung im Pervaporation-Bio-Hybridprozess quantifiziert und bewertet. Die unterschiedlichen Wirkungen der Fermentationssubstrate und Betriebsparameter fließen dabei in Direktiven für die Prozessführung ein. Durch die Beachtung der aufgezeigten Direktiven beim Betrieb eines Pervaporation-Bio-Hybridprozesses kann eine leistungsstabile Produktabtrennung erreicht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Pervaporation zur Produktabtrennung aus komplex zusammengesetzten Fermentationsbrühen geeignet ist.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit folgt sodann die Erörterung der Fermentationskinetik und der Trenncharakteristik des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses. Neben dem Wachstum und dem Substratabbau liegt der Untersuchungsschwerpunkt hierbei auf den Produktkonzentrationsverläufen im Bioreaktor und im Permeat. Im Pervaporation-Bio-Hybridreaktor setzt sich die Produktbildung aus der Produktkonzentration im Bioreaktor und der volumetrischen Produkt-

akkumulation im Permeat zusammen. Dabei ergeben sich in Abhängigkeit des Produktes und des verwendeten Membranmaterials unterschiedliche Permeat- und Reaktoranteile. Die Ergebnisse legen dar, dass die Permeatflüsse der Produkte in einem linearen Verhältnis zu deren Konzentration im Bioreaktor stehen. Der Permeatfluss des Wassers weist im Pervaporation-Bio-Hybridprozess einen charakteristischen Verlauf auf. Dieser zeitliche Verlauf des Wasserflusses bei der Pervaporation wird in vier charakteristische Phasen eingeteilt und interpretiert.

Gegenstand des dritten Abschnitts ist die quantitative und qualitative Bewertung des Potenzials der Pervaporation-Bio-Hybridtechnik zur Effizienzsteigerung mikrobieller Aromastoffsynthesen. Dazu werden der Pervaporation-Bio-Hybridprozess mit einer klassischen Submersfermentation verglichen und die Fermentationsverläufe beider Fermentationen anhand des Wachstums, des Substratverbrauchs und der Produktbildung gegenübergestellt. Das Wachstum wird mithilfe der logistischen Gleichung modelliert und der Substratabbau mit der Gompertz-Gleichung mathematisch erfasst. Aus den Untersuchungen geht hervor, dass die Anwendung der Pervaporation-Bio-Hybridtechnik mit einer deutlichen Steigerung der Produktbildung einhergeht und zu erhöhten Raum-Zeit-Ausbeuten und Produkterträgen führt. Darüber hinaus wird im Pervaporation-Bio-Hybridprozess das Wachstum des Schimmelpilzes begünstigt und der Substratabbau beschleunigt.

Der vierte Teil der Arbeit befasst sich mit der Entwicklung eines mathematischen Bioprozessmodells. Dieses eignet sich zur mathematischen Erfassung der Produktkonzentrationsverläufe des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses. Es ist in der Lage, den Pervaporation-Bio-Hybridprozess bezüglich des Einflusses der Güte des Produktaustrages auf die Produktbildung zu simulieren und stellt somit ein geeignetes Hilfsmittel bei der Entwicklung von Pervaporation-Bio-Hybridprozessen im Hinblick auf die Optimierung der Reaktorauslegung dar.

Die vorliegende Arbeit liefert somit umfassende Informationen über das Verhalten und die Charakteristik von Pervaporation-Bio-Hybridprozessen zur Aromastoffgewinnung. Auf diese Weise wird ein wichtiger Beitrag zum Verständnis dieser Art von Prozessen geleistet. Die Ergebnisse der Arbeit können als Informationsgrundlage der Entwicklung, Planung und Umsetzung von Pervaporation-Bio-Hybridprozessen dienen und zeigen Wege zu einer optimalen Prozessführung auf. Darüber hinaus wird mit der Entwicklung eines Bioprozessmodells ein mathematisches Werkzeug zur Bestimmung einer optimalen Reaktorauslegung bereitgestellt. Es werden sowohl das hohe Potenzial des Pervaporation-Bio-Hybridprozesses als auch prozesstechnische Schwierigkeiten und Hürden aufgezeigt. Somit dient diese Arbeit einer zielgerichteten und effektiven Anwendung von Pervaporation-Bio-Hybridprozessen im industriellen Umfeld.



## 8 Literatur

- [1] ABBAS, H.; COMEAU, L.: Aroma Synthesis by Immobilized Lipase from *Mucor* sp. In: *Enzyme and Microbial Technology* 32 (2003), 589-595
- [2] ABRAHAM, B.; KRINGS, U.; BERGER, R. G.: Biotechnologische Produktion von Aromastoffen durch Basidiomyceten (Ständerpilze). In: *GIT: Labor-Fachzeitschrift* 4 (1994), 370-375
- [3] ANNADURAI, G.; RAJESH BABU, S.; SRINIVASAMOORTHY, V. R.: Development of Mathematical Models (Logistic, Gompertz and Richards models) Describing the Growth Pattern of *Pseudomonas putida* (NICM 2174). In: *Bioprocess Engineering* 23 (2000), 607-612
- [4] ATKINS, P. W.: *Physikalische Chemie*. Weinheim: Wiley-VCH, 1988
- [5] AUSTIN, G. Z.: *Shreve's Chemical Process Industries*. 5. Aufl., Singapore: McGraw-Hill, 1986
- [6] BAKER, R. W.: *Abstracts of the International Symposium Euromembrane 97*. University of Twente, The Netherlands, June 23-27, 1997, 313 ff.
- [7] BAKER, R. W.; WIJMANS, J. G.; ATHAYDE, A.L.: The Effect of Concentration Polarisation on the Separation of Volatile Organic Compounds from Water by Pervaporation. In: *Journal of Membrane Science* 137 (1997), 159-172
- [8] BALDER, H.: Zur Verbreitung aggressiver Welkeerreger der Gattung *Ceratocystis* in Europa. In: *Gesunde Pflanzen* 47 (1995), Nr. 3, 83-93
- [9] BALTES, W. (Hrsg.): *Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen*. 2. Aufl., Hamburg: Behr's Verlag, 1995
- [10] BAST, E.: *Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1999
- [11] BAUDOT, A.; MARIN, M.: Dairy aroma compounds recovery by pervaporation. In: *Journal of Membrane Science* 120 (1996), 207-220
- [12] BAUDOT, A.; MARIN, M.: Improved Recovery of an Ester Flavor Compound by Pervaporation Coupled with a Flash Condensation. In: *Industrial & Engineering Chemistry Research* 38 (1999), 4458-4469
- [13] BAUDOT, A.; MARIN, M.; SPINLER, H. E.: The Recovery of Sulfur Aroma Compounds of Biological Origin by Pervaporation. In: *Flavour Science: Recent Developments*. Royal Society of Chemistry: Special publication 197 (1996), 301-304
- [14] BEAUMELLE, D.; MARIN, M.; GIBERT, H.: Pervaporation with organophilic membranes: State of the Art. In: *Transactions of the Institution of Chemical Engineers* 71 (1993), Issue June, Part C, 77-89
- [15] BELL, C.-M.; GERNER, F. J.; STRATHMANN, H.: (1988): Selection of Polymers for Pervaporation Membranes. In: *Journal of Membrane Science* 31 (1988), 259-271
- [16] BELL, C.-M.; GERNER, F. J.; STRATHMANN, H.: Selection of Polymers for Pervaporation Membranes. In: *Journal of Membrane Science* 36 (1998), 315-329
- [17] BELLGARDT, K.-H.: Bioprocess Models. In: SCHÜGERL, K.; BELLGARDT, K.-H.: *Bioreaction Engineering – Modelling and Control*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag (2000)
- [18] BENGTON, E.; TRÄGARDH, G.; HALLSTRÖM, B.: Concentration of Apple Juice Aroma from Evaporator Condensate Using Pervaporation. In: *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 25 (1992), 29-34

- [19] BENGTON, E.; TRÄGARDH, G.; HALLSTRÖM, B.: Recovery and Concentration of Apple Juice Aroma Compounds by Pervaporation. In: *Journal of Food Engineering* 10 (1989), 65-71
- [20] BENGTON, G.; BÖDDEKER, K. W.: Extraction of Bioproducts with Homogeneous Membranes. In: ETIEVANT, P.; SCHREIER, P.: *Bioflavour 95, February 14-17, Dijon, France*. Les Colloques 75, Paris: INRA, 1995, 393-403
- [21] BENGTON, G.; BÖDDEKER, K. W.: Pervaporation von Hochsiedern bei hoher Membranquellung. In: *Chemie Ingenieur Technik* 62 (1990), Nr. 11, 937-939
- [22] BENGTON, G.; BÖDDEKER, K. W.; HANSEN, H.-P.; URBASCH, I.: Recovery of 6-pentyl-alpha-pyrone from *Trichoderma viride* Culture Medium by Pervaporation. In: *Biotechnology Techniques* 6 (1992), No. 1, 23-26
- [23] BENGTON, G.; BÖDDEKER, K. W.: Pervaporation of a High Boiling Lactone from a Life Fermenter. In: BAKISH, R. (Ed.): *Proceedings of the Sixth International Conference on Pervaporation Processes in the Chemical Industry: Ottawa, Canada, September 27-30, 1992*. Englewood: Bakish Materials Corporation, 1992, 430-437
- [24] BENGTON, G.; PINGEL, H.; BÖDDEKER, K. W.; CRESPO, J. P. S. G.; KRONER, K. H.: Recovery of A.B.E. Fermentation Products by Integrated Pervaporation. In: BAKISH, R. (Ed.): *Proceedings of Fifth International Conference on Pervaporation Processes in the Chemical Industry: Heidelberg, Germany, March 11-15, 1991*. Englewood: Bakish Materials Corporation, 1991, 508-510
- [25] BERGER, R. G.: *Aroma Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1995
- [26] BERGER, R. G.; KRINGS, U.; ZORN, H.: Biotechnological Flavour Generation. In: TAYLOR, A. J.: *Food flavour technology*, Sheffield Academic Press, 2002, 60-91
- [27] BERGSTEDT, U.; SCHULTZ, H. J.; DEERBERG, G.; FAHLENKAMP, H.: Ein Beitrag zur Modellierung und Simulation von Prozessen in gerührten Bioreaktoren. In: *Chemie Ingenieur Technik* 75 (2003), Nr. 8, 1143-1144
- [28] BIGELIS, R.: Flavor Metabolites and Enzymes from Filamentous Fungi. In: *Food Technology* 46 (1992), No. 11, 151-161
- [29] BLUEMKE, W.; SCHRADER, J.: Integrated bioprocess for enhanced production of natural flavors and fragrances by *Ceratocystis moniliformis*. In: *Biomolecular Engineering* 17 (2001), 137-142
- [30] BÖDDEKER, K. W.: Terminology in Pervaporation. In: *Journal of Membrane Science* 51 (1990), 259-272
- [31] BÖDDEKER, K. W.: Recovery of Volatile Bioproducts by Pervaporation. In: CRESPO, J. G.; BÖDDEKER, K. W. (Ed.): *Membrane Processes in Separation and Purification*. (Proceedings of the NATO Advanced Study Institute, Curia, Portugal, March 21--April 2, 1993), Kluwer Academic Publishers, 1994, Chapter 1.10
- [32] BÖDDEKER, K. W.; BENGTON, G.: Pervaporation of Isomeric Butanols. In: *Journal of Membrane Science* 53 (1990), 1-12
- [33] BÖDDEKER, K. W.; BENGTON, G.: Selective Pervaporation of Organics from Water. In: HUANG, R. Y. M. (Ed.): *Pervaporation Membrane Separation Processes*, Amsterdam: Elsevier 1991, 437-460
- [34] BÖDDEKER, K. W.; GATFIELD, J. L.; JÄHNIG, J.; SCHORM, C.: Pervaporation at the Vapor Pressure Limit: Vanillin. In: *Journal of Membrane Science* 137 (1997), 155-158

- [35] BRAMORSKI, A.; SOCCOL, C. R.; CHRISTEN, P.; REFAH, S.: Fruity Aroma Production by *Ceratocystis Fimbriata* in Solid Cultures from Agroindustrial Wastes. In: *Revista de Microbiologia* 28 (1998), 208-212
- [36] BUCHANAN, R. L.; WHITING, R. C.; DAMERT, W. C.: When is Simple Good Enough: A Comparison of the Gompertz, Baranyi, and Three-Phase Linear Models for Fitting Bacterial Growth Curves. In: *Food Microbiology* 14 (1997), 313-326
- [37] C. E. ROEPER GmbH, Hamburg: *Analysenzertifikat*, Produkt Fleischpepton pankreatisch verdaut, Type 2, Type 700.086, Batch 70.027, Produktionsdatum 02/2003, 22.07.2003
- [38] CANO, M. P. ET AL.: Differences Among Spanish and Latin-American Banana Cultivars: Morphological, Chemical and Sensory Characteristics. In: *Food Chemistry* 59 (1997), No. 3, 411-419
- [39] CHANDRASHEKAR, K.; FELSE, P. A.; PANDA, T.: Optimization of Temperature and Initial pH and Kinetic Analysis of Tartaric Acid Production by *Gluconobacter suboxydans*. In: *Bioprocess Engineering* 20 (1999), 203-207
- [40] CHEETHAM, P. S. J.: Combining the Technical Push and the Business Pull for Natural Flavours. In: *Advances in biochemical engineering, biotechnology* 55 (1997), 1-49
- [41] CHMIEL, H.: Integration of Membrane Separation Processes in Continuous Bioprocesses. In: *Chemie Ingenieur Technik* 65 (1993), Nr. 7, 848-852
- [42] CHRISTEN, P.; MEZA, J. C.; REVAH, S.: Fruity Aroma Production in Solid State Fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: Influence of the Substrate Type and the Presence of Precursors. In: *Mycological Research* 101 (1997), No. 8, 911-919
- [43] CHRISTEN, P.; RAIMBAULT, M.: Optimization of Culture Medium for Aroma Production by *Ceratocystis fimbriata*. In: *Biotechnology Letters* 13 (1991), No. 7, 521-526
- [44] CHRISTEN, P.; RAIMBAULT, M.; MEZA, J. C.; VILLEGAS, E.; REVAH, S.: Production of Fruit-Like Flavours by the Fungus *Ceratocystis fimbriata*. In: ETIEVANT, P.; SCHREIER, P.: *Bioflavour 95, February 14-17, Dijon, France*. Les Colloques 75, Paris: INRA, 1995, 279-282
- [45] CHRISTEN, P.; VILLEGAS, E.; REVAH, S.: Growth and Aroma Production by *Ceratocystis fimbriata* in Various Fermentation Media. *Biotechnology Letters* 16 (1994), No. 11, 1183-1188
- [46] CLARK, J. E.: Taste and flavour: Their Importance in Food Choice and Acceptance. In: *Proceedings of the Nutrition Society* 57 (1998), 639-643
- [47] COLLINS, R. P.; MORGAN, M. E.: Identity of Fruit-Like Aroma Substances Synthesized by Endoconidial-Forming Fungi. *Phytopathology* 52 (1962), 407-409
- [48] COLMAN, D. A.; MITCHELL, W. S.: Enhanced Mass Transfer for Membrane Processes. In: *Transactions of the Institution of Chemical Engineers* 69 (1991), Issue June, Part C, 91 ff.
- [49] CÔTÉ, P.; LIPSKI, C.: Mass Transfer Limitations in Pervaporation for Water and Waste Water Treatment. In: Bakish, R. (Ed.), *Proceedings of the Third International Conference on Pervaporation Processes in the Chemical Industry*. Englewood: Bakish Materials Corporation, 1988, 449-462
- [50] CROCKER, G. (Ed.): *Ernst & Young's Eighth Annual European Life Sciences Report 2001*, Cambridge UK: Ernst & Young International Ltd., April 2001
- [51] CURCIO, S.; CALABRÓ, V.; IORIO, G.; DE CINDIO, B.: Fruit Juice Concentration by Membranes: Effect of Rheological Properties on Concentration Polarization Phenomena. *Journal of Food Engineering* 48 (2001), 235-241
- [52] CYSEWSKI, G. R., WILKE, C. R. *Biotechnology & Bioengineering* 19 (1977), 1125

- [53] DAUGULIS, A. J.: Integrated Reaction and Product Recovery in Bioreactor Systems. In: *Biotechnology Progress* 4 (1988), No. 3, 113-122
- [54] DECKWER, W.-D.: Bioreaktoren – derzeitiger Stand und erkennbare Entwicklungen. In: *Chemie Ingenieur Technik* 60 (1988), Nr. 8, 583-590
- [55] DELEST, P.: Natural Flavours: Biotech Limited ... or Unlimited? In: ETIEVANT, P.; SCHREIER, P.: *Bioflavour 95*, Paris: INRA, 1995, 13-19
- [56] DEMAÏN, A. L.: Microbial Technology. *Trends in Biotechnology* 18 (2000), 26-31
- [57] DENYER, M.: Progress in Pervaporation. In: *Processing* 1991, Issue October, 13-14
- [58] DETTWILER, B.; DUNN, I. J.; HEINZLE, E.; PRENOSIL, J. E.: A Simulation Model for the Continuous Production of Acetoin and Butanediol Using *Bacillus subtilis* with Integrated Pervaporation Separation. In: *Biotechnology and Bioengineering* 41 (1993), 791-800
- [59] DETTWILER, B.; DUNN, I. J.; PRENOSIL, J. E.: Bioproduction of Acetoin and Butanediol: Product Recovery by Pervaporation. In: BAKISH, R. (Ed.): *Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Conference on Pervaporation Processes in the Chemical Industry*, Heidelberg, Germany, March 11-15, 1991, Englewood: Bakish Materials Corporation, 1991, 301-318
- [60] DEUTSCHER VERBAND DER AROMENINDUSTRIE e.V.: <http://www.aromenhaus.de>, letzte Aktualisierung: 29.06.2001
- [61] DREW, K.: Consumer Perceptions of Natural Foods. In: PIGGOTT, J. R.: *Understanding natural flavours*, London: Blackie Acad. & Professional, 1994, 164-177
- [62] DREWS, A.; KRAUME, M.: Einfluss einer kontinuierlichen Prozessführung im Membranbioreaktor auf die Ferrichromproduktion von *Ustilago maydis*. In: *Chemie Ingenieur Technik* 75 (2003), Nr. 5, 623-628
- [63] ESCOUDIER, J. L.; LE BOUAR, M.; MOUTOUNET, M.; JOURET, C.; BARILLERE, J. M.: Application and Evaluation of Pervaporation for the Production of Low Alcohol Wines. In: BAKISH, R. (Ed.): *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Conference on Pervaporation Processes in the Chemical Industry*, Englewood: Bakish Materials Corporation, 1988, 387-397
- [64] ETSCHMANN, M. M. W.; BLUEMKE, W.; SELL, D.; SCHRADER, J.: Biotechnological Production of 2-Phenylethanol. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 59 (2002), 1-8
- [65] EXTRAKT CHEMIE GMBH & CO. KG, Stadthagen: *Spezifikation Malzextraktpulver SP-1811/03*, 2003
- [66] FADEEV, A. G.; KELLEY, S. S.; McMILLAN, J. D.; SELINSKAYA, Y. A.; KHOTIMSKY, V. S.; VOLKOV, V. V.: Effect of Yeast Fermentation by-Products on Poly[1-(Trimethylsilyl)-1-Propyne] Pervaporative Performance. In: *Journal of Membrane Science* 214 (2003), 229-238
- [67] FANE, A.; CHANG, S.: Membrane bioreactors: Design & operational options. In: *Filtration & Separation* 39 (2002), No. 5, 26-29
- [68] FENG, X.; HUANG, R. Y. M.: Liquid Separation by Membrane Pervaporation: A Review. In: *Industrial & Engineering Chemistry Research* 36 (1997), 1048-1066
- [69] FERNANDES, P.; PRAZERES, D. M. F.; CABRAL, J. M. S.: Membrane-Assisted Extractive Bioconversions. In: VAN DER WIELEN, L.; VON STOCKAR, U. (eds.): *Process Integration in Biochemical Engineering, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 80 (2003), Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2003, 115-148

- [70] FISCHBACH, R.: *Grundlegende Untersuchungen zur Prozesscharakterisierung der Solid State Fermentation für komplexe Stoffsysteme*. Dissertation Universität Bonn 2001. Fortschritt-Berichte, Reihe 14 Landtechnik/Lebensmitteltechnik, Nr. 106, Düsseldorf: VDI-Verlag, 2002
- [71] FISCHBACH, R.; LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.: Generation of Natural Flavours by Solid-State Fermentation Using Food Industry Waste. In: *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Universiteit Gent* 63 (1998), 1543-1544
- [72] FLEMING, H. L.: Consider Membrane Pervaporation. In: *Chemical Engineering Progress* 1992, No. 7, 46-52
- [73] FLIEDNER, I.: *Grundlagen und Prüfverfahren der Lebensmittelsensorik*, 2. Aufl., Hamburg: Behr's-Verlag, 1993
- [74] FRANSES, P. H.: Fitting a Gompertz Curve. In: *Journal of the Operational Reserach Society* 45 (1994), No. 1, 109-113
- [75] FREEMAN, A.; WOODLEY, J. M.; LILLY, M. D.: In Situ Product Removal as a Tool for Bioprocessing. In: *Bio-Technology* 1993, No. 11, 1007-1012
- [76] FRIEDL, A.; QURESHI, N.; MADDOX, I. S.: Continuous Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Fermentation Using Immobilized Cells of *Clostridium acetobutylicum* in a Packed Bed Reator and Integration with Product Removal by Pervaporation. In: *Biotechnology and Bioengineering* 38 (1991), 518-527
- [77] GADEN, E. L. JR.: Fermentation Process Kinetics. In: *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* 1 (1959), No. 4, 413-429
- [78] GATFIELD, I.: Production of Flavor and Aroma Compounds by Biotechnology. In: *Food Technology* 42 (1988), No. 10, 110-169
- [79] GENG, Q.; PARK, C.-H.: Pervaporative Butanol Fermentation by *Clostridium Acetobutylicum* B18. In: *Biotechnology and Bioengineering* 43 (1994), 978-986
- [80] GIORNO, L.: Membrane Bioreactors. In: BÉLAFI-BAKÓ, K.; GUBICZA, L.; MULDER, M. (Eds.): *Integration of Membrane Processes into Bioconversions*, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000, 187-199
- [81] GIORNO, L.; DRIOLI, E.: Biocatalytic Membrane Reactors: Applications and Persepctives. In: *Trends in Biotechnology* 18 (2000), No. 8, 339-349
- [82] GRAB, W.: The Flavour of Natural Fruits. In: ZIEGLER, E.; ZIEGLER, H. (Eds.): *Flavourings*, Weinheim: Wiley-VCH, 1998, 363-370
- [83] GREF, R.; NGUYEN, T.; NÉEL, J.: Influence of Membrane Properties on System Performances in Pervaporation Under Concentration Polarization Regime. *Separation Science & Technology* 27 (1992), 467-491
- [84] GRIFFIN, D. H.: *Fungal Physiology*, New York: Wiley-LISS, 1994
- [85] GROOT W. J.; KRAAYENBRINK, M. R.; WALDRAM, R. H.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; LUYBEN, K. CH. A. M.: Ethanol Production in an Integrated Process of Fermentaion and Ethanol Recovery by Pervaporation. In: *Bioprocess Engineering* 8 (1992), 99-111.
- [86] GROOT, W. J., LUYBEN, K. CH. A. M.: Continuous Production of Butanol from a Glucose/Xylose Mixture with an Immobilized Cell System Coupled to Pervaporation. In: *Biotechnology Letters* 9 (1987), No. 12, 867-870

- [87] GROOT, W. J.; DEN REYER, M. C. H.; BAART DE LA FAILLE, T.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; LUYBEN, K. CH. A. M.: Integration of Pervaporation and Continuous Fermentation with Immobilized Cells: 1 Experimental Results. In: *The Chemical Engineering Journal* 46 (1991), No. 1, B1-B10
- [88] GROOT, W. J.; SHOUTENS, G. H.; VAN BEELEN, P. N.; VAN DEN OEVER, C. E.; KOSSEN, N. W. F.: Increase of Substrate Conversion by Pervaporation in the Continuous Butanol Fermentation. In: *Biotechnology Letters* 6 (1984), No. 12, 789-792
- [89] GROOT, W. J.; VAN DEN OEVER, C. E.; KOSSEN, N. W. F.: Pervaporation for Simultaneous Product Recovery in the Butanol/Isopropanol Batch Fermentation. In: *Biotechnology Letters* 6 (1984), No. 11, 709-714
- [90] GROOT, W. J.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; LUYBEN, K. CH. A. M.: Technologies for Butanol Recovery Integrated with Fermentations. In: *Process Biochemistry* 27 (1992), 61-75
- [91] GUDERNATSCH, W.; KIMMERLE, K.; STROH, N.; CHMIEL, H.: Recovery and Concentration of High Vapour Pressure Bioproducts by Means of Controlled Membrane Separation. In: *Journal of Membrane Science* 36 (1988), 331-342
- [92] GUDERNATSCH, W.; MUCHA, H.; HOFMANN, TH.; STRATHMANN, H.; CHMIEL, H.: Use of Pervaporation in the Continuous Fermentation of Acetone, Butanol and Ethanol. In: *Berichte der Bunsengesellschaft für Physik und Chemie* 93 (1989), 1032-1033
- [93] GUDERNATSCH, W.-N.: *Integration des pervaporativen Produktaustrages in die Fermentation von organischen Lösungsmitteln*. Dissertation Universität Stuttgart, 1989
- [94] HÄDRICH-MEYER, S.: *Optimierung der Aromastoffproduktion in Submerskulturen von Basidiomyceten*. Dissertation Technische Universität München, 1989
- [95] HAUSMANN, S.: *Organophile Pervaporation wäßriger Mehrkomponentensysteme*. Dissertation Universität Bonn, 1999. Fortschritt-Berichte, Reihe 3 Verfahrenstechnik, Nr. 622, Düsseldorf: VDI-Verlag, 1999
- [96] HEISLER, E. G.; HUNTER, A. S.; SICILIANO, J.; TREADWAY, R. H.: Solute and Temperature Effects in the Pervaporation of Aqueous Alcohol Solutions. In: *Science* July 13 1956, 77-78
- [97] HICKEY, P. J.; GOODING, C. H.: The Economic Optimization of Spiral Wound Membrane Modules for the Pervaporative Removal of VOCs from Water. In: *Journal of Membrane Science* 97 (1994), 53-70
- [98] HUANG, J.; MEAGHER, M. M.: Pervaporative Recovery of n-Butanol from Aqueous Solutions and ABE Fermentation Broth Using Thin-Film Silicalite-Filled Silicone Composite Membranes. In: *Journal of Membrane Science* 192 (2001), 231-242
- [99] IBÁÑEZ, E.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, S.; RAMOS, E.; TABERA, J.; REGLERO, G.: Analysis of Volatile Fruit Components by Headspace Solid-Phase Microextraction. In: *Food Chemistry* 63 (1998), No. 2, 281-286
- [100] IKEGAMI, T.; YANAGISHITA, H.; KITAMOTO, D.: Production of Highly Concentrated Ethanol in a Coupled Fermentation/Pervaporation Process Using Silicalite Membranes. In: *Biotechnology Techniques* 11 (1997), No. 12, 921-924
- [101] IKEGAMI, T.; YANAGISHITA, H.; KITAMOTO, D.; HARAYA, K.; NAKANE, T.; MATSUDA, H.; KOURA, N.; SANO, T.: Highly Concentrated Aqueous Ethanol Solutions by Pervaporation Using Silicalite Membrane: Improvement of Ethanol Selectivity by Addition of Sugars to Ethanol Solution. In: *Biotechnology Letters* 21 (1999), 1037-1041

- [102] INAL, M.; KORKUT, S.; KARAKAS, G.; YILMAZ, L.: Ethyl Lactate Production by Hybrid Processes: Evaluation of Performance of Hydrophilic Pervaporation Membranes for Ethyl Lactate-Water-Ethanol Mixtures. In: *Supplementary Book of Abstracts of the International Congress on Membranes and Membrane Processes*, 7-12 July 2002, Toulouse, France, 105 ff.
- [103] INOUE, Y.; FUKUDA, K.; WAKAI, Y.; SUDSAI, T.; KIMURA, A.: Ester Formation by a Yeast *Hansenula mrakii* IFO 0895: Contribution of Esterase for Isoamylacetate Production in Saké Brewing. In: *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 27 (1994), 189-193
- [104] JANSSENS, L.; DE POOTER, H. L.; SCHAMP, N. M.; VANDAMME, E. J.: Production of Flavours by Microorganisms. In: *Process Biochemistry* 27 (1992), 195-215
- [105] JONQUIÈRES, A.; FANE, A.: Filled and Unfilled Composite GFT PDMS Membranes for the Recovery of Butanols from Dilute Aqueous Solutions: Influence of Alcohol Polarity. In: *Journal of Membrane Science* 125 (1997), 245-255
- [106] JUÁREZ TOMÁS, M. S.; DE LABANDA, E. B.; DE RUIZ HOLGADO, A. P.; NADER-MACÍAS, M. E.: Estimation of Vaginal Probiotic Lactobacilli Growth Parameters with the Application of the Gompertz model. In: *Canadian Journal of Microbiology* 48 (2002), 82-92
- [107] KARAFFA, L.: Membrane fermentors. In: BÉLAFI-BAKÓ, K.; GUBICZA, L.; MULDER, M. (EDS.): *Integration of Membrane Processes into Bioconversions*, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000, 223-229
- [108] KARLSSON, H. O. E.; LOUREIRO, S.; TRÄGARDH, G.: Aroma Compounds Recovery with Pervaporation: Temperature Effects During Pervaporation of a Muscat Wine. In: *Journal of Food Engineering* 26 (1995), 177-191
- [109] KARLSSON, H. O. E.; TRÄGARDH, G.: Heat Transfer in Pervaporation. In: *Journal of Membrane Science* 119 (1996), 295-306
- [110] KARLSSON, H. O. E.; TRÄGARDH, G.: Applications of Pervaporation in Food Processing. In: *Trends in Food Science & Technology* 7 (1996), No. 3, 78-83
- [111] KARLSSON, H. O. E.; TRÄGARDH, G.: Pervaporation of Dilute Organic-Water Mixtures: A Literature Review on Modelling Studies and Applications to Aroma Compound Recovery. In: *Journal of Membrane Science* 76 (1993), 121-146
- [112] KASENO, I. M.; KOKUGAN, T.: Effect of Product Removal by a Pervaporation on Ethanol Fermentation. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86 (1998), No. 5, 488-493
- [113] KLOSE, M. C.: *Fermentation mit In situ-Extraktion*. Dissertation Technische Universität München, 2000
- [114] KOBER, P.A.: Pervaporation, Perstillation and Percrystallization. In: *Journal of the American Chemical Society* 39 (1917), 944-948
- [115] KOLLERUP, F.; DAUGULIS, A. J.: *Process for Extractive Fermentation*. U.S. Patent 4,865,973 Sept. 12, 1989
- [116] KRÄMER, J.: *Lebensmittelmikrobiologie*. 2. Aufl., Stuttgart: Ulmer-Verlag, 1992
- [117] KRINGS, U.; ABRAHAM, B. G.; BERGER, R. G.: Plant Impact Volatiles from Higher Fungi: A Biotechnological Perspective. In: *Perfumer & Flavorist* 20 (1995), No. 5, 79-86
- [118] KRINGS, U.; BERGER, R.G.: Biotechnological Production of Flavors and Fragrances. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 49 (1998), No. 1, 1-8

- [119] LAMER, T.; ROHART, M. S.; VOILLEY, A.; BAUSSART, H.: Influence of Sorption and Diffusion of Aroma Compounds in Silicone Rubber on Their Extraction by Pervaporation. In: *Journal of Membrane Science* 90 (1994), 251-63
- [120] LAMER, T.; SPINNLER, H. E.; SOUCHON, I.; VOILLEY, A.: Extraction of Benzaldehyde from Fermentation Broth by Pervaporation. In: *Process Biochemistry* 31 (1996), No. 6, 533-542
- [121] LAMER, T.; VOILLEY, A.: Influence of Different Parameters on the Pervaporation of Aroma Compounds. In: BAKISH, R. (Ed.): *Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Conference on Pervaporation Processes in the Chemical Industry*. Englewood: Bakish Materials Corporation, 1991, 110-122
- [122] LANGSTON, S. W.; ALTMAN, N. S.; HOTCHKISS, J. H.: Within and Between Sample Comparisons of Gompertz Parameters for *Salmonella enteritidis* and Aerobic Plate Counts in Chicken Stored in Air and Modified Atmosphere. In: *International Journal of Food Microbiology* 18 (1993), 43-52
- [123] LANZA, E.; KO, K.-H.; PALMER, J.-K.: Aroma Production by Cultures of *Ceratocystis moniliformis*. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24 (1976), No. 6, 1247-1250
- [124] LARRAYOZ, M. A.; PUYJANER, L.: Study of Butanol Extraction Through Pervaporation in Acetobutylic Fermentation. In: *Biotechnology & Bioengineering* 30 (1987), 692-696
- [125] LAVRENCIC, A.; MILLS, C. R.; STEFANON, B.: Application of the Gompertz Model to Describe the Fermentation Characteristics of Chemical Components in Forages. In: *Animal Science* 66 (1998), 155-161
- [126] LEE, C. H.: Theory of Revers Osmosis and Some Other Membrane Permeation Operations. In: *Journal of Membrane Science* 19 (1975), 83-95
- [127] LEIB, T. M.; PEREIRA, C. J.; VILLADSEN, J.: Bioreactors: A Chemical Engineering Perspective. In: *Chemical Engineering Science* 56 (2001), 5485-5497
- [128] LIPNIZKI, F.; FIELD, R. W.; TEN, P.-K.: Pervaporation-Based Hybrid Process: A Review of Process Design, Applications and Economics. In: *Journal of Membrane Science* 153 (1999), 183-210
- [129] LIPNIZKI, F.; HAUSMANN, S.; LAUFENBERG, G.; FIELD, R.; KUNZ, B.: Use of Pervaporation-Bioreactor Hybrid Processes in Biotechnology. In: *Chemical Engineering & Technology* 23 (2000), No. 7, 569-577
- [130] LIPNIZKI, F.; HAUSMANN, S.; TEN, P.-K.; FIELD, R. W.; LAUFENBERG, G.: Organophilic Pervaporation: Prospects and Performance. In: *Chemical Engineering Journal* 73 (1999), 113-129
- [131] LIPNIZKI, F.; OLSSON, J.; TRÄGARDH, G.: Scale-up of Pervaporation for the Recovery of Natural Aroma Compounds in the Food Industry. Part 1: Simulation and Performance. In: *Journal of Food Engineering* 54 (2002), 183-195
- [132] LIPNIZKI, F.; OLSSON, J.; TRÄGARDH, G.: Scale-up of Pervaporation for the Recovery of Natural Aroma Compounds in the Food Industry. Part 2: Optimisation and Integration. In: *Journal of Food Engineering* 54 (2002), 197-205
- [133] LIPNIZKI, F.; TRÄGARDH, G.: Modelling of Pervaporation: Models to Analyze and Predict the Mass Transport in Pervaporation. In: *Separation and Purification Methods* 30 (2001), No. 1, 49-125
- [134] LÜBBERT, A.; JORGENSEN, S. B.: Bioreactor Performance: A More Scientific Approach for Practice. In: *Journal of Biotechnology* 85 (2001), 187-212
- [135] LYE, G. J.; WOODLEY, J. M.: Application of in situ Product-Removal Techniques to Biocatalytic Processes. In: *Trends in Biotechnology* 17 (1999), No. 10, 395-402
- [136] MALINOWSKI, J. J.; DAUGULIS, A. J.: Salt Effects in Extraction of Ethanol, 1-Butanol and Acetone from Aqueous Solutions. In: *AIChE Journal* 40 (1994), No. 9, 1459-1465



- [137] MALTZAHN, B.; BLÜMKE, W.: In-situ-Pervaporation: Ein leistungsfähiges Verfahren zur biotechnologischen Produktion natürlicher Aromastoffe. In: *Tagungsband der 19. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Leipzig (D), 13.-15.03.2001*, 111 - 113.
- [138] MARTÍNEZ-DÍEZ, L.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, M. I.: Temperature and Concentration Polarization in Membrane Distillation of Aqueous Salt Solutions. In: *Journal of Membrane Science* 156 (1999), 265-273
- [139] MATTIASSON, B.; HOLST, O. (EDS.): *Extractive Bioconversions*. New York: Marcel Dekker Inc., 1990
- [140] MCKENNDRICK, A. G.; PAI, M. C.: The Rate of Multiplication of Microorganisms: A Mathematical Study. In: *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 1911, 649-655
- [141] MEAGHER, M. M.; QURESHI, N.; HUTKINS, R. W.: *US Patent* 5,755,967 (1998)
- [142] MORI, Y.; INABA, T.: Ethanol Production from Starch in a Pervaporation Membrane Bioreactor Using *Clostridium Thermohydrosulfuricum*. In: *Biotechnology & Bioengineering* 36 (1990), 849-853
- [143] MULDER, M. V. H.; SMOLDERS, C. A.: Continuous Ethanol Production Controlled by Membrane Processes. In: *Process Biochemistry* 1986, No. 4, 35-39
- [144] MULDER, M.: *Basic Principles of Membrane Technology*. 2. Aufl., Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996
- [145] MUTTZALL, K.: *Modellierung von Bioprozessen*. Hamburg: Behr's Verlag, 1994
- [146] NAKAO, S. I.; SAITOH, F.; ASAKURA, T.; TODA, K.; KIMURA S.: Continuous Ethanol Extraction by Pervaporation from a Membrane Bioreactor. In: *Journal of Membrane Science* 30 (1987), 273-287
- [147] NÉEL, J.: Introduction to Pervaporation. In: HUANG, R. Y. M. (Ed.): *Pervaporation Membrane Separation Processes*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1991
- [148] NEUKOM, H.: Einführung. In: SOLMS, J.; NEUKOM, H.: *Aroma- und Geschmacksstoffe in Lebensmitteln*, Zürich: Forster, 1967, 9-10
- [149] NEY, K. H.: *Lebensmittelaromen*. Hamburg: Behr's Verlag, 1987
- [150] NOMURA, M.; BIN, T.; NAKAO, S.: Selective Ethanol Extraction from Fermentation Broth Using a Silicalite Membrane. In: *Separation and Purification Technology* 27 (2002), 59-66
- [151] NORDSTRÖM, K.: Formation of Ethyl Acetate in Fermentation with Brewers Yeast: III. Participation of Acetyl Coenzyme A. In: *Journal of the Institute of Brewing* 68 (1962), 398-407
- [152] NUNES, S. P.; PEINEMANN, K. V.: *Membrane Technology in the chemical Industry*. Weinheim: Wiley-VCH, 2001
- [153] O. V.: Facts and Fiction (Teil 2) – GDL-Symposium Lebensmittel- und Biotechnologie in Bremerhaven. In: *Lebensmitteltechnik* 11 (1995), 54-57
- [154] O. V.: Natürliche Aromastoffe immer stärker gefragt. In: *Die Zeitschrift für die Lebensmittelwirtschaft : ZFL* 50 (1999), Nr. 3, 30-32
- [155] O. V.: *Testanleitung zum UV-Test D-Glucose/D-Fructose*. Boehringer Mannheim/R-Biopharm, 2002
- [156] O'BRIEN, D. J.; CRAIG, J. C. JR.: Ethanol Production in a Continuous Fermentation/Membrane Pervaporation System. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 44 (1996), 699-704

- [157] OLSSON, J.; TRÄGARDH, G.: Influence of Feed Flow Velocity on Pervaporative Aroma Recovery from a Model Solution of Apple Juice Aroma Compounds. In: *Journal of Food Engineering* 39 (1999), 107-115
- [158] OLSSON, J.; TRÄGARDH, G.: Pervaporation of Volatile Organic Compounds from Water: I Influence of Permeate Pressure on Selectivity. In: *Journal of Membrane Science* 187 (2001), 23-37
- [159] OLSSON, J.; TRÄGARDH, G.; LIPNIZKI, F.: The Influence of Permeant and Membrane Properties on Mass Transfer in Pervaporation of Volatile Organic Compounds from Dilute Aqueous solutions. In: *Separation Science and Technology*, 37 (2002), No. 6, 1199-1223
- [160] PANASENKO, V. T.: The Ecology of Microfungi. In: *Botanical Reviews* 33 (1967), 189-215
- [161] PAUL, D.; OHLROGGE, K.: Membrane Separation Processes for Clean Production. In: *Environmental Progress* 17 (1998), No. 3, 137
- [162] PETERSEN, H.: *Grundlagen der statistischen Versuchsplanung*. Landsberg/Lech: Ecomed, 1991
- [163] PIERRE, F. X.; SOUCHON, I.; MARIN, M.: Recovery of Sulfur Aroma Compounds Using Membrane-Based Solvent Extraction. In: *Journal of Membrane Science* 187 (2001), 239-253
- [164] PING, Z. H.; NGUYEN, Q. T.; CLEMENT, R.; NEEL, J.: Time-Dependent Phenomena in Pervaporation: Influence of the Crystallinity of Dense Poly(vinylalcohol) Membranes on their Pervaporation Performance. In: BAKISH, R. (Ed.): *Proceedings of the Third International Conference on Pervaporation Processes in the Chemical Industry*. Englewood: Bakish Materials Corporation, 1988, 231 ff.
- [165] QUILTER, M. G.; HURLEY, J. C.; LYNCH, F. J.; MURPHY, M. G.: The Production of Isoamyl Acetate from Amyl Alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Journal of The Institute of Brewing* 109 (2003), No. 1, 34-40
- [166] QURESHI, N.: *Ph. D. Dissertation*, University of Nebraska, Lincoln, NE, 1997
- [167] QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P.: Butanol Production Using *Clostridium beijerinckii* BA101 Hyper-Butanol Producing Mutant Strain and Recovery by Pervaporation. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84-86 (2000), 225-235
- [168] QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P.: Evaluation of Recent Advances in Butanol Fermentation, Upstream, and Downstream Processing. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 24 (2001), 219-226
- [169] QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P.: Fouling Studies of a Pervaporation Membrane with Commercial Fermentation Media and Fermentation Broth of Hyper-Butanol-Producing *Clostridium beijerinckii* BA101. In: *Separation Science and Technology* 34 (1999), No. 14, 2803-2815
- [170] QURESHI, N.; BLASCHEK, H.P.: Recent Advances in ABE Fermentation: Hyper-Butanol Producing *Clostridium beijerinckii* BA101. In: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 27 (2001), 287-291
- [171] QURESHI, N.; MEAGHER, M. M.; HUANG, J.; HUTKINS, R. W.: Acetone Butanol Ethanol (ABE) Recovery by Pervaporation Using Silicalite-Silicone Composite Membrane from Fed-Batch Reactor of *Clostridium acetobutylicum*. In: *Journal of Membrane Science* 187 (2001), 93-102
- [172] RAPIN, J. L.: The Bethenville Pervaporation Unit: The First Large-Scale Productive Plant for the Dehydration of Ethanol, In: BAKISH, R. (Ed.): *Proceedings of the Third International Conference on Pervaporation Processes in the Chemical Industry*. Englewood: Bakish Materials Corporation, 1988, 364-378
- [173] RAUTENBACH, R.; ALBRECHT, R.: The Separation Potential of Pervaporation Part 2: Process Design and Economics. In: *Journal of Membrane Science* 25 (1985), No. 1, 25-54

- [174] RAUTENBACH, R.; DAHM, W.; HERION, C.: Membranverfahren zur Fraktionierung von Gemischen mit organischen Komponenten. In: *Chemie Ingenieur Technik* 61 (1989), Nr. 7, 535-544
- [175] RAUTENBACH, R.; HÖMMERICH, U.: Experimental Study of Dynamic Mass-Transfer Effects in Pervaporation. In: *AIChE Journal* 44 (1998), No. 5, 1210-1215
- [176] REIB, J.: *Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung*. Berlin: Springer-Verlag, 1998
- [177] RENGER, R. S.; VAN HATEREN, S. H.; LUYBEN, K. CH. A. M.: The Formation of Esters and Higher Alcohols During Brewery Fermentations: the Effect of Carbon Dioxide Pressure. In: *Journal of the Institute of Brewing* 98 (1992), 509-513
- [178] RUTTLOFF, H.; ROTHE, M.: Aromen und Geschmacksstoffe (Kap. 12). In: RUTTLOFF, H. (Ed.): *Lebensmittelbiotechnologie: Entwicklungen und Aspekte*. Berlin: Akademie-Verlag, 1991, 577-597
- [179] SALMON, B.; MARTIN, G. J.; REMAUD, G.; FOUREL, F.: Compositional and Isotopic Studies of Fruit Flavours Part 1: The Banana Aroma. In: *Flavour and Fragrance Journal* 11 (1996), No. 6, 353-359
- [180] SAMPRANPIBOON, P.; JIRARATANANON, R.; UTTAPAP, D.; FENG, X.; HUANG, R. Y. M.: Separation of Aroma Compounds from Aqueous Solutions by Pervaporation Using Polyoctylmethyl Siloxane (POMS) and Polydimethyl Siloxane (PDMS) Membranes. In: *Journal of Membrane Science* 174 (2000), 55-65
- [181] SAMPRANPIBOON, P.; JIRARATANANON, R.; UTTAPAP, D.; FENG, X.; HUANG, R. Y. M.: Pervaporation Separation of Ethyl Butyrate and Isopropanol with Polyether Block Amide (PEBA) Membranes. In: *Journal of Membrane Science* 173 (2000), 53-59
- [182] SANCHEZ MARCANO, J. G.; TSOTSIS, T. T.: *Catalytic Membranes and Membrane Reactors*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002
- [183] SANGSURASAK, P.; NOPARATANA, M.; MITCHELL, D. A.: Mathematical Modeling of the Growth of Filamentous Fungi in Solid State Fermentation. In: *Journal of Scientific & Industrial Research* 55 (1996), 333-342
- [184] SANO, T.; YANAGISHITA, H.; KIYOZUI, Y.; MIZUKAMI, F.: Separation of Ethanol/Water Mixture by Silicalite Membrane on Pervaporation. In: *Journal of Membrane Science* 95 (1994), No. 3, 221-228
- [185] SCHÄFER, T.; BENGTON, G.; PINGEL, H.; BÖDDEKER, K. W.; CRESPO, J. P. S. G.: Recovery of Aroma Compounds from a Wine-Must Fermentation by Organophilic Pervaporation. In: *Biotechnology and bioengineering* 62 (1999), No. 4, 412-421
- [186] SCHÄFER, T.; CRESPO, J. G.: Extraction of Aromas from Active Fermentation Reactors by Pervaporation. In: BÉLAFI-BAKÓ, K.; GUBICZA, L.; MULDER, M. (Eds.): *Integration of Membrane Processes into Bioconversions*, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000, 177-186
- [187] SCHÄFER, T.; CRESPO, J. G.: Recovery of Aroma Compounds from Fermentation by Pervaporation. In: *Environment Protection Engineering* 25 (1999), No. 1-2, 73-85
- [188] SCHIRG, P.; WALDBURGER, R. M.; WIDMER, F.: Entwicklung membranunterstützter Reaktionsprozesse. In: *Chemie Ingenieur Technik* 68 (1996), 1264-1271
- [189] SCHMIDT, S. L.; MYERS, M. D.; KELLEY, S. S.; MCMILLAN, J. D.; PADUKONE, N.: Evaluation of PTMSP Membranes in Achieving Enhanced Ethanol Removal from Fermentations by Pervaporation. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 63-65 (1997), 469-482
- [190] SCHREIBER, W. L.; SCHARPF, L. G. JR.; KATZ, I.: Flavors and Fragrances: The Chemistry Challenges. In: *Chemtech* 1997, No. 3, 58-62

- [191] SCHREIER, P. (Ed.): *Bioflavour 87: Analysis, Biochemistry, Biotechnology : Proceedings of the International Conference Würzburg*. Berlin, New York: Walter de Gruyter, 1988
- [192] SCHÜGERL, K.; KRETZMER, G.; FREITAG, R.; SCHEPER, T.: Integrierte biotechnologische Produktionsprozesse. In: *Chemie Ingenieur Technik* 66 (1994), Nr. 12, 1585-1592
- [193] SCHÜTTE, R.; RUDEK, M.; MARKOWZ, G.; EMIG, G.; KLEM, E.: Von der Reaktionstechnik zur Prozessgestaltung: Neue Technologien zur Prozessintensivierung im chemischen Anlagenbau – Diskussion von Chancen und Hemmnissen an Beispielen. In: *Chemie Ingenieur Technik* 75 (2003), Nr. 8, 1023-1024
- [194] SHABTAL, Y.; CHAIMOVITZ, S.; FREEMAN, A.; KATCHALSKI-KATZIK, E.; LINDER, C.; NEMAS, M.; PERRY, M.; KEDEM, O.: Continuous Ethanol Production by Immobilized Yeast Factor Coupled with Membrane Pervaporation Unit. In: *Biotechnology & Bioengineering* 38 (1991), 869-876
- [195] SHIH-YUAN LU; CHUNG-PING CHIU; HSIANG-YUAN HUANG: Pervaporation of Acetic Acid/Water Mixtures Through Silicalite Filled Polydimethylsiloxane Membranes. In: *Journal of Membrane Science* 176 (2000), 159-167
- [196] SHULER M. L.; KARGI, F.: *Bioprocess Engineering*. New Jersey: Prentice Hall, 1992
- [197] SINCLAIR, C. G.; KRISTIANSEN, B.; BU'LOCK, J. D.: *Fermentationsprozesse*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1993
- [198] SIRKAR, K. K.; SHANBHAG, P. V.; KOVVALI, A. S.: Membrane in a Reactor: A Functional Perspective. In: *Industrial & Engineering Chemistry Research* 38 (1999), 3715-3737
- [199] SONG, K. M.; HONG, Y. K.; YU, J.; HONG, W. Y.: Influence of Temperature Drop by Phase Transition on Pervaporation Processes in Vapor Phase Feed. In: *Korean Journal of Chemical Engineering* 19 (2002), No. 2, 290-295
- [200] SOUCHON, I.; FONTANINI, C.; VOILLEY, A.: Extraction of Aroma Compounds by Pervaporation. In: *Flavour Science: Recent Developments*, Royal Society of Chemistry: Special publication 197 (1996), 305-310
- [201] SOUCHON, I.; LAMER, T.; SPINLER, H. E.; VOILLEY, A.: Pervaporation: An Efficient Process for Benzaldehyde Recovery in Fermentation Broth. In: INRA, Paris (Ed.): *Les Colloques* 75 (1995), *Bioflavour* 95, Dijon (France), February 14-17, 1995, 409-414
- [202] SPRECHER, E.; HANSEN, H.P.: Flüchtige Stoffwechselprodukte aus Pilzen: Ein mögliches Potential für die industrielle Gewinnung von Aromen und Riechstoffen. In: *Forum Mikrobiologie* 8 (1985), 17-21
- [203] STARK, D.; KORNMANN, H.; MÜNCH, T.; SONNLEITNER, B.; MARISON, I. W.; VON STOCKAR, U.: Novel Type of In Situ Extraction: Use of Solvent Containing Microcapsules for the bioconversion of 2-Phenylethanol From L-Phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biotechnology and Bioengineering* 83 (2003), No. 4, 376-385
- [204] STARK, D.; VON STOCKAR, U.: In Situ Product Removal (ISPR) in Whole Cell Biotechnology During the Last Twenty Years. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 80 (2003), 149-175
- [205] STEFER, B.; KUNZ, B.: Prozesstechnische Untersuchungen eines organophilen Pervaporation-Bio-Hybridreaktors. In: *Chemie Ingenieur Technik* 74 (2002), Nr. 7, 1029-1034

- [206] STEFER, B.; SCHILLING, M.; KUNZ, B.: A Pervaporation-Bio-Hybridreactor (PBHR) for Improved Aroma Biosynthesis with Submerged Culture of *Ceratoscystis fimbriata*. In: DEBERGH, P.; MARTENS, L.; STEURBAUT, W.; STEVENS, M.; VAN CLEEMPUT, O.; VANDAMME, E. (Eds): *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 68/2(a) 2003, 247-252
- [207] STORHAS, W.: *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen: Ein Leitfadens für die Hochschulausbildung, für Hersteller und Anwender*. Braunschweig, Wiesbaden: Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, 1994
- [208] STORHAS, W.: *Bioverfahrensentwicklung*. Weinheim: Wiley-VCH, 2003
- [209] STRATHMANN, H.: Membrane Processes for Sustainable Industrial Growth. In: *Membrane Technology* 1999, No. 113, 9-11
- [210] STRATHMANN, H.: *Trennung von molekularen Mischungen mithilfe synthetischer Membranen*. Darmstadt: D. Steinkopff Verlag, 1979
- [211] STRATHMANN, H.; GUDERNATSCH, W.: Pervaporation in Biotechnology. In: HUANG, R. Y. M. (Ed.): *Pervaporation Membrane Separation Processes*. Amsterdam: Elsevier 1991, 363-389
- [212] STRATHMANN, H.; MCDONOGH, R. M.: The Use of Pervaporation in Biotechnology. In: HOWELL, J.A.; SANCHEZ, V., FIELD, R. W.: *Membranes in bioprocessing: Theory and Applications*. 1. Ed. London [u.a.]: Chapman & Hall, 1993, Chapter 9, 293-328
- [213] STÜRKEN, K.: *Organophile Pervaporation: Ein Membranverfahren zur Aufarbeitung verdünnter wäßrig-organischer Lösungen*. Dissertation Technische Universität Hamburg Harburg, 1994
- [214] TEN, P. K.; FIELD, R. W.: Organophilic Pervaporation: An Engineering Science Analysis of Component Transport and the Classification of Behaviour with Reference to the Effect of Permeate Pressure. In: *Chemical Engineering Science* 55 (2000), 1425-1445
- [215] TRESSL, R.; DRAWERT, F.; HEIMANN, W.; EMBERGER, R.: Über die Biogenese von Aromastoffen bei Pflanzen und Früchten. In: *Lebensmitteluntersuchung und Forschung* 144 (1970), Nr. 4, 4-12
- [216] ULBER, R.; HITZMANN, B.; SCHEPER, T.: Innovative Bioprozessanalytik: Neue Wege zum besseren Verständnis biotechnologischer Prozesse. In: *Chemie Ingenieur Technik* 73 (2001), Nr. 1 & 2, 19-26
- [217] VANDEPITTE, V.; QUATAERT, P.; DE ROORE, H.; VERSTRAETE, W.: Evaluation of the Gompertz Function to Model Survival of Bacteria Introduced Into Soils. In: *Soil Biology & Biochemistry* 27 (1995), No. 3, 365-372, 1995
- [218] VERHULST, P. F. Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. In: *Correspondance Mathematique et Physique* 10 (1838), 113-121
- [219] VERSCHUERE, L.; FIEVEZ, V.; VAN VOOREN, L.; ROMBAUT, G.; VERSTRAETE, W.: Modeling the Color Development in Biolog Microtiter Plates by the Gompertz Function. In: *Systematic And Applied Microbiology* 21 (1998), 609-617
- [220] VOILLEY, A.; SCHMIDT, B.; SIMATOS, D.; BAUDRON, S.: Extraction of Aroma Compounds by the Pervaporation Technique. In: BAKISH, R. (Ed.): *Proceedings of the Third International Conference on Pervaporation Processes in the Chemical Industry*. Englewood: Bakish Materials Corporation, 1988, 429-438
- [221] WEIDENBÖRNER, M.: *Lebensmittel-Mykologie*. Hamburg: Behr's Verlag, 1999
- [222] WELSH, F. W.; MURRAY, W. D.; WILLIAMS, R. E.: Microbiological and Enzymatic Production of Flavor and Fragrance Chemicals. In: *Critical Reviews in Biotechnology* 9 (1989), No. 2, 105-168

- [223] WHITEHEAD, I. A.: Challenges to Biocatalysis from Flavour Chemistry. In: *Foodtechnology* 52 (1998), No. 2, 40-46
- [224] WOLF, K. H.: *Berechnungsbeispiele zur Bioverfahrenstechnik*. Hamburg: Behr's Verlag, 1991
- [225] WOOD, M.; MATSUURA, T.; DUVNAJAK, Z.: Effect of the Addition of Fructose on the Pervaporation of Ethanol/Water Mixtures by Silicone-Rubber-Coated Polyethersulfone Membranes. In: *Separation Science & Technology* 29 (1994), No. 12, 1609-1619
- [226] WULF, A.: Gefährdung der Platane durch zunehmende Ausbreitung des Krebsserregers *Ceratocystis fimbriata*. In: *Gesunde Pflanzen* 47 (1995), No. 1, 12-15
- [227] WYNN, N.: Pervaporation Comes of Age. In: *Chemical Engineering Progress* 97 (2001), No. 10, 66-72
- [228] ZHANG, S. Q.; MATSUURA, T.: Recovery and Concentration of Flavour Compounds in Apple Essence by Pervaporation. In: *Journal of Food Process Engineering* 14 (1991), 291-296
- [229] ZIEGLER, E., ZIEGLER, H.: *Flavourings*. Weinheim: Wiley-VCH, 1998
- [230] ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN T'RIET, K.: Modeling of the Bacterial Growth Curve. In: *Applied Environmental Microbiology* 56 (1990), 1875-1881