

Wipa Roikaew

**Biologische Denitrifikation von Molkekonzentrat
mit nativen und immobilisierten Zellen von
*Paracoccus denitrificans***

**Biologische Denitrifikation von Molkekonzentrat
mit nativen und immobilisierten Zellen von
*Paracoccus denitrificans***

Dem Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik
der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur (Dr. Ing.)

genehmigte

Dissertation

von

Frau

Dipl.-LMChem. Wipa Roikaew

aus Bangkok, Thailand

Datum der mündlichen Prüfung 27.11.2017

Dekan	Prof. Dr. Ing. Jörg Seewig
Prüfungsvorsitzender	Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. Hans-Jörg Bart
Berichterstatter	Prof. Dr. rer. nat. Roland Ulber
	Prof. Dr. rer. nat. Elke Richling

Kaiserslautern, 2017

D386

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich nachstehenden Personen besonderen danken.

Prof. Dr Roland Ulber, meinem Doktorvater, danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und Verständnis.

Prof. Dr. Thomas Scheper am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover danke ich für Finanzierung des Projekts an der TU Kaiserslautern.

Für die Motivation, wissenschaftliche Diskussion und gute Zusammenarbeit während der Forschungsarbeit danke ich Nils Tippkötter (z.Z. Prof. Dr.-Ing). Dank gilt auch Prof. Dr.-Ing Kai Muffler für die fachlichen wissenschaftlichen Diskussionen.

Danke Herr Hans-Jörg Denzler bei Biolac GmbH für die Lieferung der großen Mengen an Molkekonzentrat und vieler Informationen über Analytik im Betrieb. Für Unterstützung des Crossflow modulls und der Anlage danke ich der Firma Novasep. Für gute Zusammenarbeit danke ich hier Frau Daniela Keller, meine Diplomandin und Frau Zhang Zhibin, meiner Studentin für die Studienarbeit.

Danke alle Mitarbeitern des Lehrstuhls Biosverfahrenstechnik für die gute Zusammenarbeit, Freundschaften, Aufmerksamkeit und allen Mitarbeitern beim Lehrstuhl für Konstruktion im Maschinen- und Apparatebau (KIMA) danke ich für nette Freundschaften und mein Büros während meiner Doktorarbeit.

Die folgenden wichtigen Personen danke ich für Korrekturlesen und für Hilfe bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit Dr. Anja Nussner, Dr. Christof Huber, Daniel Stein, Theerapong Sompetch und Arunya Phokhakul.

Für die wissenschaftliche Diskussion danke ich herzlich Dr. Paul Haase-Aschoff und danken möchte ich Herr Dr. Klaus Haase-Aschoff und Dr. Inge Haase-Aschoff für die hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit.

Großer Dank gilt Robert Westphal, der immer für Korrekturlesen da ist.

Für die Anregung in Deutschland zu studieren möchte ich mich bei meiner Schwester Ratchanee Roikaew Heß und ihrem Mann Reinhard Sigmund Heß herzlich bedanken, sowie auch für deren jedwedliche Unterstützung.

Für mein gutes Vorbild und meine Kraftquelle danke ich meiner lieben Mutter und für Geduld und Sorge während meines Studiums in Deutschland danke ich meiner kleinen Schwester Nethnapha Roikaew und meinem Bruder Piched Roikaew.

“ท่านใดถึงพร้อมด้วยความพยายาม โดยธรรม
ไม่จมลงในห้วงมหรรณพ ซึ่งประมาณไม่ได้
เห็นปานนี้ ด้วยกิจ คือความเพียรของบุรุษ
ท่านนั้น จงไปในสถานที่ ที่ใจของท่านยินดีนั้นเถิด”

เรื่อง พระมหาชนก

พระราชนิพนธ์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชฯ

English translation:

“Anyone who is so full of righteous patience
will never founder in the vast ocean that has no bounds.
With this manly perseverance
you will be able to go wherever you wish.”

The Story of Mahajanaka

By His Majesty King Bhumibol Adulyadej

Kurzfassung

Molke gilt als Rohstoff, der in großen Mengen anfallendes Nebenprodukt der Käseindustrie ist. In den vergangenen Jahrzehnten wurde die wirtschaftliche Nutzung durch Wertschöpfung dieses kostengünstigen aber wertvollen Produktes intensiviert. Zu den drei wichtigsten Bestandteilen von Molke gehören Mineralien, Eiweiß und Lactose. Gerade der hohe physiologische Nährwert von Molke bei fast vollständiger Abwesenheit von Fett legt eine Anwendung in der Lebensmittelindustrie nahe. So werden inzwischen Bestandteile von Molke in Süßigkeiten, Diätetika, Tablettenfüllstoffen, Verdickungsmitteln und Säuglingsernährung verwendet.

Vor der Verwendung von mikrobiellem Lab, welches keine Spätblähung mehr verursacht, gab es ein Problem mit Nitratbelastung in der Molke durch Zugabe von Kalium- bzw. Natriumnitrat während der Käseherstellung zur Inhibition von Fehlgärungen. Bei Kleinkindern droht Lebensgefahr durch innere Erstickung, da das aus Nitrat gebildete Nitrit (durch Bakterien der Darmflora) Hämoglobin oxidiert. Daher wurden die Molkereien gezwungen sich mit dem Thema zu beschäftigen, um dieses Problem zu lösen. Für Erwachsene ist dies aber ungefährlich.

In dieser Arbeit wurde die Denitrifikation von Molkekonzentrat mit nativen Zellen und mit immobilisierten Zellen von *Paracoccus denitrificans* durchgeführt. Die indirekte Anwendung von dem Bakterium zur Nitratentfernung aus Molkekonzentrat befasst sich mit der Integration der Regeneration des Eluenten in den Prozess nach dem chromatographischen Verfahren. Das im Eluenten enthaltene Nitrat wird auch in Gegenwart von Natriumchlorid über mehrere Zwischenstufen zu elementarem Stickstoff reduziert. Somit wird der Eluent für eine weitere Regeneration wiederverwendbar und das Wasseraufkommen des Gesamtprozesses stark reduziert. Eine kontinuierliche Denitrifikation des Eluenten mit einer Natriumchloridkonzentration von 35 g/L wurde durch native Zellen realisiert. Als geeignete Denitrifikationsbedingungen wurden eine Temperatur von 37 °C, ein pH-Wert von 7,5 und die Zugabe von Acetat als Elektronendonator ermittelt.

Kontinuierliche Denitrifikationen mit nativen Zellen wurden in einer Laboratoriums- und Pilotanlage in Bioreaktoren mit einem Volumen von 5 L bzw. 25 L durchgeführt. Die Abtrennung der nativen Zellen zur Rückführung des Eluenten in die chroma-

tographische Stufe erfolgte durch Cross-Flow-Filtration. Die vollständige Entfernung von Nitrat in Molkekonzentrat ist bis zu 450 Liter pro Tag im Pilotmaßstab möglich.

Im Falle immobilisierter Zellen wird die Zellabtrennung vereinfacht, da die Immobilisate 1,5-5 mm groß sind. Die Immobilisate konnten somit durch ein einfaches grobmaschiges Sieb zurückgehalten werden. Die Immobilisierung der Mikroorganismen *Paracoccus denitrificans* wurde mit Hilfe des LentiKats® der Fa. genialLab GmbH hergestellt. Mit dem immobilisierten Verfahren wurde Nitrat im Eluent bzw. direkt in Molkekonzentrat denitrifiziert. Die Entfernung von Nitrat im Eluent ist bei gleichen Bedingungen wie mit nativen Zellen möglich. Allerdings zeichnen sich immobilisierte Mikroorganismen durch eine geringere Aktivität im Vergleich zu nativen Zellen aufgrund der Diffusionslimitierung, aus. So wurde durch immobilisierte Zellen eine Abbaugeschwindigkeit von $v = 22,2 \text{ mg}_{\text{Nitrat}} \text{ h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{BTM}}$ im kontinuierlichen Betrieb erreicht, während durch Verwendung nativer Zellen Abbauraten von bis zu $32,4 \text{ mg}_{\text{Nitrat}} \text{ h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{BTM}}$ realisiert werden konnten. Der direkte Nitratabbau im Molkekonzentrat wurde bei Temperaturen von 10 °C bis zu 30 °C durchgeführt. Nach 1 h bei 30 °C konnte 90 mg/L Nitratkonzentrat vom Molkekonzentrat entfernt werden. Eine Akkumulierung von Nitrit ist nicht aufgetreten. Bei niedrigeren Temperaturen wurde der Nitratabbau geringer. Bei einer Temperatur von 10 °C ist es nicht mehr möglich Nitrat abzubauen. Die Untersuchung der wichtigen Inhaltstoffe, wie Protein, Mineralstoffe, Lactose, Glucose und Galactose im Molkekonzentrat wurde nach der Denitrifikation durchgeführt. Eine Änderung der Konzentration konnte nicht nachgewiesen werden.

Schlagworte: Molke, Molkeproteine, Denitrifikation, Nitrat, Immobilisierung, *Paracoccus denitrificans*

Abstract

Whey is a by-product of the manufacturing process of cheese or casein. It contains proteins, lactose, vitamins, and minerals along with traces of fat. Whey proteins primarily consist of α -lactalbumin and β -lactoglobulin. It is used as an additive in many processed foods, including breads, crackers and commercial pastries, as well as animal foods. In addition, whey is used as a basic material for baby food because of its high content of physiologically valuable proteins. Likewise, potassium nitrate is often added to the milk during the process of cheese production. In fact, this nitrate remains in the whey and still poses a risk for health of small children.

In this work, a process, that can be used to remove nitrate from whey concentrate by the combination of ion exchange and biological denitrification, is presented. This work shows all processes of biological denitrification. The regeneration of the ion exchange resin using sodium chloride is investigated particularly with regard to the salt concentration of 35 g/L in the presence of which a biological denitrification is possible. The applied bacterium *Paracoccus denitrificans* is capable of reducing the nitrate ions through several intermediate stages to harmless nitrogen. After removing of nitrate, the cells of *P. denitrificans* were separated by a membrane filter. To this research, the scale-up of bioreactors from 5 liters to 25 liters was worked in a laboratory. In the pilot plant, the regeneration of the eluent in more than 36 process cycles was shown. By those combined processes, a complete removal of nitrate from 450 liters of whey concentrate per day was significantly possible.

In this study, immobilized cells of *P. denitrificans* were examined with regards to their ability to remove nitrate in the ion exchanger eluent as well as directly in whey concentrate. In addition, a modification of whey proteins during denitrification was investigated. To immobilize *P. denitrificans* cells, a commercial preparation kit (Lentikats®) is used; it reduces nitrate in the ion exchanger eluent and in whey concentrate. With this technique the bacteria can be separated without the need of a crossflow microfiltration.

The denitrification in the eluent are showed under the conditions of 37 °C, pH 7.5 and using 250 mg/L of acetate as electron donor. However, the activity of immobilized cells in the eluent is lower than in the whey concentrate because of the decreased activity of cells with this salt concentration. The direct denitrification in whey concentrate by immobilized cells at 30 °C is more effective than at 15 °C. In addition, the activity of

immobilized cells decreases with storage time. However, whey proteins are not modified during the direct denitrification in whey concentrate by immobilized cells.

Keywords: biological denitrification; whey concentrate; whey proteins, non-immobilized cells of *P. denitrificans*, immobilized cells of *P. denitrificans*

Abkürzungsverzeichnis

μ	Wachstumsrate
τ	mittlere hydrodynamische Verweilzeit
Θ	Einheitszeit
α	Verlustfaktor
[S]	Substratkonzentration
Ac ⁻	Acetat
<i>c</i>	Konzentration
<i>D</i>	Zelldichte
<i>D</i> ₀	Anfangszelldichte
<i>D</i> _{max}	theoretisch berechnete Zelldichte für eine maximale Abbaurrate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E</i>	Extinktion
<i>E</i> ₆₆₀	Extinktion bei einer Wellenlänge von 660 nm
g	Gramm
h	Stunden
<i>K</i> _m	Michaelis-Konstante
L	Liter
M	Molar
<i>m</i>	Masse
mg	Milligramm
U min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
mL	Milliliter
<i>N</i>	Zellzahl
<i>N</i> ₀	Anfangszellzahl
nm	Nanometer
R ²	Bestimmtheitsmaß
<i>t</i> ₁	Anlaufzeit
<i>t</i> _d	Verdopplungszeit oder Generationszeit
<i>TM</i>	Zelltrockenmasse
<i>U</i>	Umsatz
<i>V</i>	Volumen
\dot{V}	Volumenstrom
\dot{V}_z	Volumenstrom der Zellsuspension
<i>v</i>	Nitratabbaurrate bzw. Reaktionsgeschwindigkeit
<i>v</i> _m	mittlere Nitratabbaurrate
<i>v</i> _z	Nitratabbaurrate, auf die Zelltrockenmasse bezogen
VSS	Volatile Suspended Solids
<i>X</i>	Ertrag an Zelltrockenmasse

Inhaltverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1-3
2	Theoretische Grundlagen	4
2.1	Molke und Molkenkonzentrat	4-6
2.2	Produktion und Marktsituation für Molke	6-8
2.3	Nitrat	8
2.3.1	Gesundheitliche Bedeutung von Nitrat	8-9
2.3.2	Nitrat in Molke	9
2.3.3	Verfahren zur Nitratbereicherung	10
2.4	Biologische Denitrifikation	10-12
2.4.1	<i>Paracoccus denitrificans</i>	12-14
2.4.2	Grundlagen der Enzymkinetik	14-16
2.5	Angewandte Immobilisierungsverfahren	16-19
2.6	Nitrat- und Nitritanalytik	20
2.6.1	Reflektometrische Nitrat- und Nitritanalytik	20-21
2.6.2	Nitrat- und Nitritanalytik nach DIN 38405	21
3	Untersuchung des Wachstums von <i>Paracoccus denitrificans</i>	22
3.1	Stammhaltungen	22
3.2	Durchführung der Kultivierung	22-23
3.3	Bestimmung der Biomassekonzentration	23-24
3.4	Optimierung der Zellwachstumsbedingungen	24
3.4.1	Einfluss von Sauerstoff	24-25
3.4.2	Einfluss von Temperatur, Rührgeschwindigkeit, und Peptonarten	26
3.4.3	Einfluss der Glucosekonzentration	27-28
3.4.4	Einfluss unterschiedlicher Verhältnisse und Konzentration von Kaliumnitrat und Glucose auf die Biomasse	28-31
3.4.5	Einfluss der Salzkonzentration	31-32
3.5	Zusammenfassung	32-34
4	Biologische Denitrifikation mittels nativen Zellen von <i>P.denitrificans</i>	35

4.1	Vorbereitung der Zellen für die Denitrifikation	36
4.1.1	Kultivierung von <i>P.denitrificans</i>	36
4.1.2	Zellernte für die Denitrifikation	36
4.2	Durchführung der Denitrifikation unter anaeroben Bedingungen	36
4.3	Biologische Denitrifikation in einer Versuchslösung mit einer Salzkonzentration von 35 g/L	37
4.3.1	Einfluss des pH-Werts auf den Nitratabbau	37-38
4.3.2	Einfluss der Wachstumsbedingungen auf den Nitratabbau	38
4.3.2.1	Nitratabbau mit aerob und anaerob gewachsenen Zellen von <i>P.denitrificans</i>	39-40
4.3.2.2	Nitratabbaurrate mit Zellen von <i>P.denitrificans</i> in unterschiedlichen Medien	40-41
4.3.3	Kinetik des biologischen Nitratabbaus durch native Zellen	41-43
4.3.4	Vorversuch einer kontinuierlichen biologischen Denitrifikation für die Kombination biologischer und chromatographischer Stufe	43-47
4.4	Entwicklungen einer Technikumsanlage für die Kombination aus biologischer und chromatographischer Stufe	47-49
4.4.1	Aufbau einer Technikumsanlage	49-51
4.4.1.1	Mini-Pilotanlage	51-55
4.4.1.2	Kontinuierliche Denitrifikation im Pilotmaßstab	55-58
4.4.1.3	Vitalität der Zellen während Denitrifikation im Pilotmaßstab	58-59
4.4.2	Einfluss der Mikrobiologie auf die Anlagenkomponenten	59
4.5	Reaktorauslegung einer biologischen Stufe im Technikumsmaßstab	60-61
4.6	Zusammenfassung	61-63
5	Biologische Denitrifikation mittels immobilisierter Zellen	64
5.1	Immobilisierung der Zellen in Lentikats	64-65
5.2	Einfache Untersuchungen zur Stoffdiffusion für Nitrat	65-66
5.3	Einfache Untersuchungen der Durchlässigkeit der Immobilisationsmatrix im Bezug auf Molkeproteine	66-68
5.4	Kontinuierliche Denitrifikation des Eluenten im Biostat Q (CSTR)	68-70

5.5	Direkte Verwendung immobilisierter Zellen von <i>P. denitrificans</i> zur Nitratanreicherung in Molkekonzentrat	70
5.5.1	Nitratabbau in Molkekonzentrat bei verschiedenen Temperaturen im Batchversuch	70-72
5.5.2	Kontinuierlicher Nitratabbau von Molkekonzentrat im Biostat Q (CSTR)	73-74
5.6	Kinetik des biologischen Nitratabbaus mit immobilisierten Zellen von <i>Paracoccus denitrificans</i>	74-77
5.7	Untersuchung der Molkeproteine in der zellfreien Immobilisationsmatrix	77-79
5.8	Stabilität der immobilisierten Zellen	79-80
5.9	Wachstum von Mikroorganismen in Molkekonzentrat während der kontinuierlichen Denitrifikation	80
5.10	Zusammenfassung	81-82
6	Untersuchung der Inhaltstoffe in Molkekonzentrat während Denitrifikation	83
6.1	Untersuchungen des Mineralstoffgehalts mittels Aschegehaltbestimmung	83
6.2	Proteinzusammensetzung im Molkekonzentrat	84-86
6.3	Bestimmung der Proteingehalte mittels Kjeldahl	87-89
6.4	Bestimmungen der Lactose-, Glucose-, und Galactosegehalte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	89-91
6.5	Zusammenfassung	91-93
7	Zusammenfassung und Ausblick	94-96
8	Anhang	97
8.1	Zusammensetzungen des Mediums	97
8.2	Cross-Flow Anlage	97
8.3	Lösung für Coomassie-Färbungs-Methode	98
8.4	Bestimmung der Lactose-, Glucose- und Galactosegehalte mittels HPLC	99
8.5	SDS-PAGE	99-100
8.6	Bestimmung der Biomassekonzentration	100-101
8.7	Wachstumskurve von Mikroorganismen	101-103
9	Abbildungsverzeichnis	104-108

10	Tabellenverzeichnis	109
11	Literaturverzeichnis	110-117
12	Angaben zur Person	118
12.1	Betreute Studien- und Diplomarbeiten	118
12.2	Veröffentlichungen	118-119
13.3	Lebenslauf	119-120

1 Einleitung und Zielsetzung

Molke ist ein landwirtschaftliches Restprodukt, das in Deutschland jährlich in erheblichen Mengen bei der Käse- und Caseinherstellung anfällt und ihre Inhaltsstoffe gehören zu den wertgebenden Bestandteilen der Milch, die nicht in den Käse übergehen, wie z.B. Lactose, viele Vitamine und physiologisch wertvolles Eiweiß (Molkeproteine) [1]. Dadurch stellt Molke einen geeigneten Grundstoff für die Säuglingsernährung dar. Molke gilt als ein billiger Rohstoff heutzutage [2] und wird in zahlreichen Bereichen verwendet. Am meisten wird sie in der Lebensmittelbranche verwendet, wie zum Beispiel für die Herstellung von Molkeerzeugnissen Molkepulver und Molkerahm und außerdem für die Gewinnung von Lactose und Molkeproteinkonzentrate [2]. Auf Grund ihrer wertvollen Bestandteile lassen sich Molkeprodukte als Viehfutter, als Füllstoff bei der Tablettenherstellung und als Basis für Molkedrinks in der Getränkeindustrie verwenden [2].

Durch Zugabe von bis zu 250 mg Kalium- oder Natriumnitrat pro Liter in die Käsereimilch zur Herstellung von Schnittkäse kommt es zur Hemmung des Wachstums von anaeroben Sporenbildnern, wodurch der Fermentationsfehler der Spätblähung nicht stattfindet [3]. Auf Grund der sehr gut wasserlöslichen Eigenschaft von Nitrat bleibt dieses fast vollständig in der Molke. In der Folge liegen die Nitratkonzentration bei bis zu 250 mg/L in der Molke [4]. Dies könnte bei den verkaufsfertigen Molke-Trockenprodukten zu Nitratgehalten von bis zu 40 g/kg unter Berücksichtigung einer Molke Trockenmasse von 6 % führen. Ein solcher Nitratgehalt in Molke, die als Lebensmittelzusatz verwendet wird, kann besonders bei Säuglingen und Kleinkindern gesundheitsschädigend wirken. Daher besteht die Notwendigkeit, ein Verfahren zur Eliminierung des Nitrates zu entwickeln, um diesen Markt und neue Märkte für Molke und Molkeerzeugnisse zu bedienen [2].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das biologische Verfahren zur Denitrifikation mit nativen Zellen und immobilisierten Zellen von *P. denitrificans* untersucht werden. Ein erstes geplantes Verfahrenskonzept zur Denitrifikation von Molke und Molkekonzentrat war eine Kombination aus einer chromatographischen und einer biologischen Stufe. Die beiden Verfahren wurden parallel durchgeführt. Die chromatographischen Verfahren wurden in der Doktorarbeit von Tippkötter beschrieben [5]; die Entwicklung einer biologischen Stufe war Gegenstand dieser Arbeit. Beim biologischen Verfahren wurden Nitrate im Eluent der

chromatographischen Stufe durch sowohl native Zellen als auch immobilisierte Zellen denitrifiziert. Im zweiten Teil der Arbeit sollte der direkte Einsatz immobilisierter Mikroorganismen zur Denitrifikation von Molkekonzentrat untersucht werden. Durch die Denitrifikation des Molkekonzentrats sollte eine Wertsteigerung dieses Nebenproduktes der Käseherstellung erreicht werden.

Des Weiteren sollten die wirtschaftlich nutzbaren Inhaltsstoffe der Molke wie Molkeproteine und Lactose nach der Denitrifikation untersucht werden, um festzustellen, ob diese Bestandteile verändert werden. Für den Projekterfolg spielt nicht nur das Funktionieren der Denitrifikation eine wichtige Rolle, sondern auch die Erhaltung der wertgebenden Bestandteile der Molke. Sie sollten während des Prozesses keine oder nur geringfügige Veränderungen erfahren. Darüber hinaus sollte die Qualität der Molke durch den kombinierten Denitrifikationsprozess mittels chromatographischer und biologischer Stufe nicht beeinträchtigt werden und es sollten keine Nachteile auf Grund von Mikroorganismeneintrag oder Foulingprozessen in der Molke stattfinden [2].

Es ergaben sich folgende Arbeitspakete:

- Optimierung der Zusammensetzung des Kultivierungsmediums für *P. denitrificans*
- Optimierung des Nitrat-Abbaus mit nativen Zellen bzw. immobilisierten Zellen
- Untersuchung der biologischen Denitrifikation mit immobilisierten Zellen mit dem anfallenden nitratreichen Eluent aus der chromatographischen Stufe
- Untersuchung der biologischen Denitrifikation direkt in Molkekonzentrat mit immobilisierten Zellen
- Scale-Up des Bioreaktors bei der Kombination des chromatographischen Nitrat-Abbaus in Molkekonzentrat und der mikrobiellen Denitrifikation des Eluats aus der Regeneration der Anionenaustauscherstufe mit Hilfe von Cross Flow Filtration zur Zellrückhaltung
- Erfassung möglicher Veränderungen von Inhaltsstoffen des Molkekonzentrates wie Lactose, Molkeproteinen und Mineralstoffen durch die Denitrifikation

Abschließend sollten Untersuchungen bezüglich der Mikrobiologie und Säulenstabilität durchgeführt werden, um zu klären, ob Anreicherungen von Mikroorganismen

(Biofouling) in der Austauschersäule während der chromatographischen Stufe auftreten. Im Fall eines Biofouling sollten verschiedene Reinigungslösungen getestet werden, die die vorhandenen Mikroorganismen abtöten. Dabei ist darauf zu achten, dass deren Konzentrationen gering sind, um nicht die Kapazität des Austauscherharzes zu sehr zu verringern. [2]

Hierzu sollten folgende Verfahren durchgeführt werden [2]:

- Bestimmung der Gesamtkeimzahl (Koloniebildende Einheiten - KBE) im Austauscherharz und in der Molke
- Untersuchung einsetzbarer Reinigungsmittel und optimaler Reinigungsmittelkonzentrationen für das Austauscherharz

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Molke und Molkekonzentrat

Molke ist die wässrige grünlich-gelbe Restflüssigkeit bei der Käseherstellung und ist fast vollständig fettfrei [6]. Sie besteht aus 94 % Wasser, 4-5 % Milchzucker, Milchsäure, Mikronährstoffe wie Vitamine, Mineralstoffe und 0,6-1 %, Molkeprotein, welches von großer wirtschaftlicher Bedeutung ist. In Tabelle 2.1 sind die Nährstoffe von Molke im Vergleich zu Vollmilch aufgeführt. Es werden zwei Sorten Molke unterschieden, Süßmolke und Sauermolke.

Tabelle 2.1: Nährstoffgehalte pro 100 g Süß- und Sauermolke im Vergleich zu Vollmilch [7]

Nährstoff	Gehalt pro 100 g		
	Vollmilch	Süßmolke	Sauermolke
Energie	64 kcal	25 kcal	23 kcal
Protein	3,3 g	0,8 g	0,6 g
Fett	3,5 g	0,2 g	0,2 g
Kohlenhydrate	4,8 g	4,7 g	4,2 g
Natrium	50 mg	45 mg	50 mg
Kalium	150 mg	130 mg	140 mg
Calcium	120 mg	60 mg	100 mg
Jod	7,5 µg	8 µg	8 µg
Vitamin A	30 µg	0 µg	0 µg
Vitamin B₁	40 µg	40 µg	40 µg
Vitamin B₂	170 µg	140 µg	140 µg
Vitamin B₆	46 µg	50 µg	50 µg
Vitamin B₁₂	0,4 µg	0,2 µg	0,2 µg
Pantothersäure	350 µg	400 µg	400 µg

Molke und Molkekonzentrat werden durch die Trockenmasse unterschieden. Molke hat einen Trockenmassegehalt von 6 %; nach Konzentrierung der Molke auf 31% spricht man von Molkekonzentrat [1,8].

Die Süßmolke entsteht bei der Käseherstellung durch Anwendung von Lab zum Dicklegen und wird darum auch Labmolke genannt. Verwendet man bei der

Käseherstellung Milchsäurebakterien, so spricht man von Sauermolke [9]. Aus 100 kg Milch kann man 8 kg Hartkäse oder 12 kg Weichkäse herstellen [10], d.h. dass 88 kg bzw. bis zu 92 kg Molke entstehen. Im Jahr 2015 wurden 2,5 Millionen Tonnen Käse in Deutschland hergestellt [11], dies entspricht bis zu 30 Millionen Tonnen Molke.

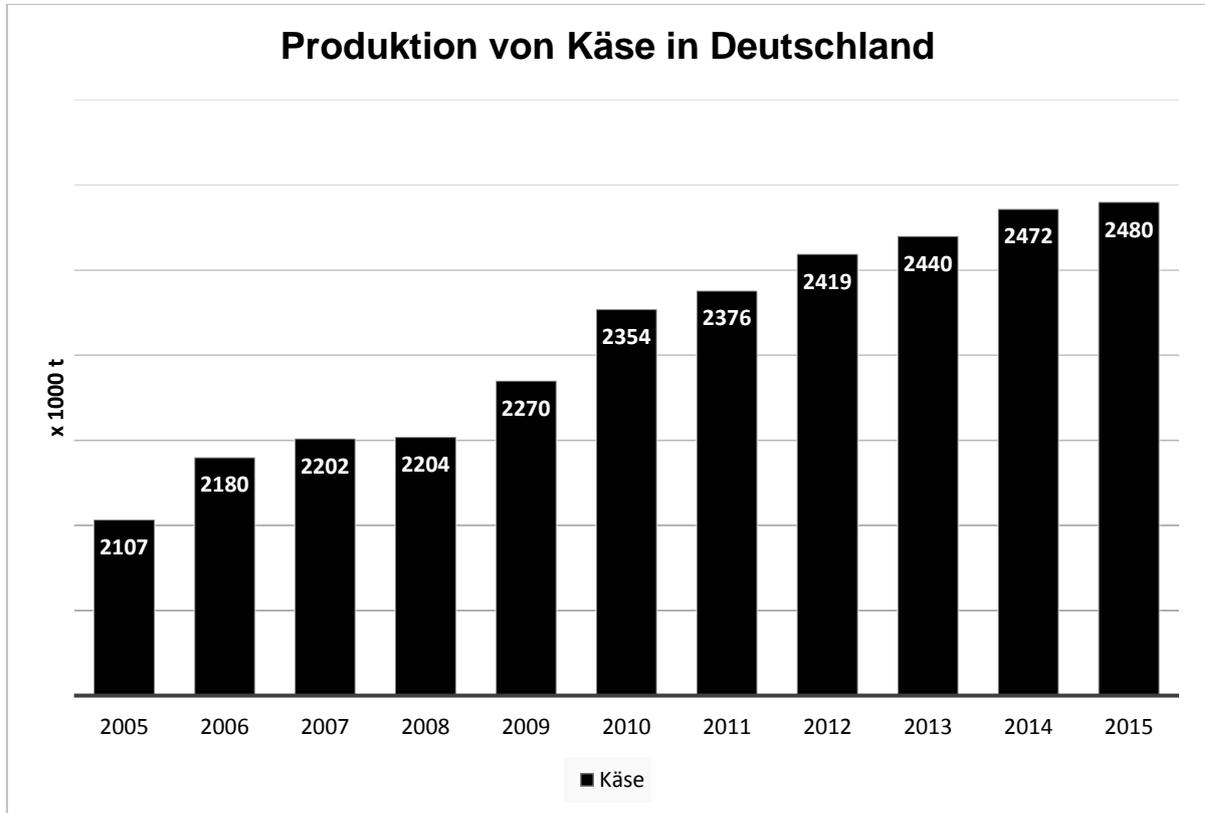


Abbildung 2.1: Produktion von Käse in Deutschland [11]

Abbildung 2.1 zeigt die letzten zehn Jahre der Käseproduktion in Deutschland. Man erkennt, dass die Käseherstellung im Zeitraum von 2005 bis 2015 um fast 18% angestiegen ist [11]. Dies bedeutet, dass die anfallende Molkemenge im selben Zeitraum um ebenfalls fast 18% gestiegen sein muss.

Molke wird nicht als Abfall der Käseherstellung bezeichnet, sondern stellt wertvolle Rohstoffe bereit, die in verschiedenen Bereichen, wie der Landwirtschaft, in der Käseherstellung, der Getränkeindustrie als auch zur sonstigen Nutzung der Ernährung und industriell Verwendung findet [8]: in flüssiger Form wie Molkekonzentrat, Milchserum und auch in Pulverform wie z.B. Molkepulver, Molkeprotein oder Lactose. In der Landwirtschaft wird Molke heute hauptsächlich in der Schweinezucht verwendet, vor allem als Molkepulver. Die Käserei verarbeitet auch Molke zu Käse; die bekannten Molkenkäse sind Ricotta, Ziger, der korsische Broccui oder der norwegische Braunkäse. Sie entstehen nach dem Erhitzen von Süßmolke und setzt sich an der Oberfläche ab [8].

Unter Milchserum versteht man eine beinahe farblose Flüssigkeit, die durch Abtrennen der noch vorhandenen Eiweiße in der Molke gewonnen wird. Milchserum enthält nur die wasserlöslichen Bestandteile der Milch, wie Lactose, Mineralstoffe und wasserlösliche Vitamine. Deshalb wird Milchserum in verschiedenen Erfrischungsgetränken zugesetzt, beispielsweise Rivella. Aus Molke stellen verschiedene Getränkehersteller auch Cola, Apfelschorle und Orangenlimonaden her [8].

Ende des 19. Jahrhunderts wurde Molke verwendet, um Zivilisationskrankheiten zu heilen, dies führte zur Molkekur im Programm der damaligen Lebensreform-Bewegung [8]. Außerdem verwenden viele Kraftsportler das Molkeprotein für den Muskelaufbau. Da es aufgrund der schnellen Verdauung dem Körper schnell zur Verfügung steht, wird es häufig in Post-Workout-Shakes eingesetzt. Es gibt noch zahlreiche weitere Bereiche, in denen Molke verwendet wird wie z. B. in der Kosmetik, in Bäckereien, bei der Fertignahrungsherstellung, als Dünger, als Komplexmedium (C-Quelle), in der Biotechnologie und als Stickstoffträger in der Bauindustrie. In Notzeiten wurde auch Bier aus Molke gebraut [8].

2.2 Produktion und Marktsituation für Molke

Wie schon beschrieben, fielen im Jahr 2015 circa 30 Millionen Tonnen Molke in Deutschland an; die Tendenz ist steigend um jährlich bis zu 1,8 %. In Norddeutschland werden jährlich etwa eine Million Tonnen Molke in der Molkerei Fa. Biolac GmbH verarbeitet. 2014 betrug der Umsatz circa 75 Mio. € [12]. Hier wird ausschließlich Süßmolkekonzentrat verwendet, um Lactose und Molkeprotein durch Ultrafiltrationsverfahren herzustellen [13]. 18 Unternehmen verwenden Molke, auch gesüßt, in Form von Pulver und Granulat; andere Arten von Molke werden in 43 Unternehmen genutzt [14]. In Deutschland liegt der geschätzte jährliche Gesamtumsatz von Milchproduktunternehmen bei mehr als eine Milliarde Euro.

In Abbildung 2.2 ist eine Zunahme der Herstellung von Molkepulver von 2015 im Vergleich zu 2014 von circa 1,8 % dargestellt. Für die Herstellung anderer Molkeprodukte wie Milchzucker und Molkeprotein wurden keine Daten für das Jahr 2015 und 2014 angegeben. Jedoch wurde 2013 im Vergleich zu 2012 die Produktion von Molkeprotein um 4,17 % und von Milchzucker um 8,32 % gesteigert.

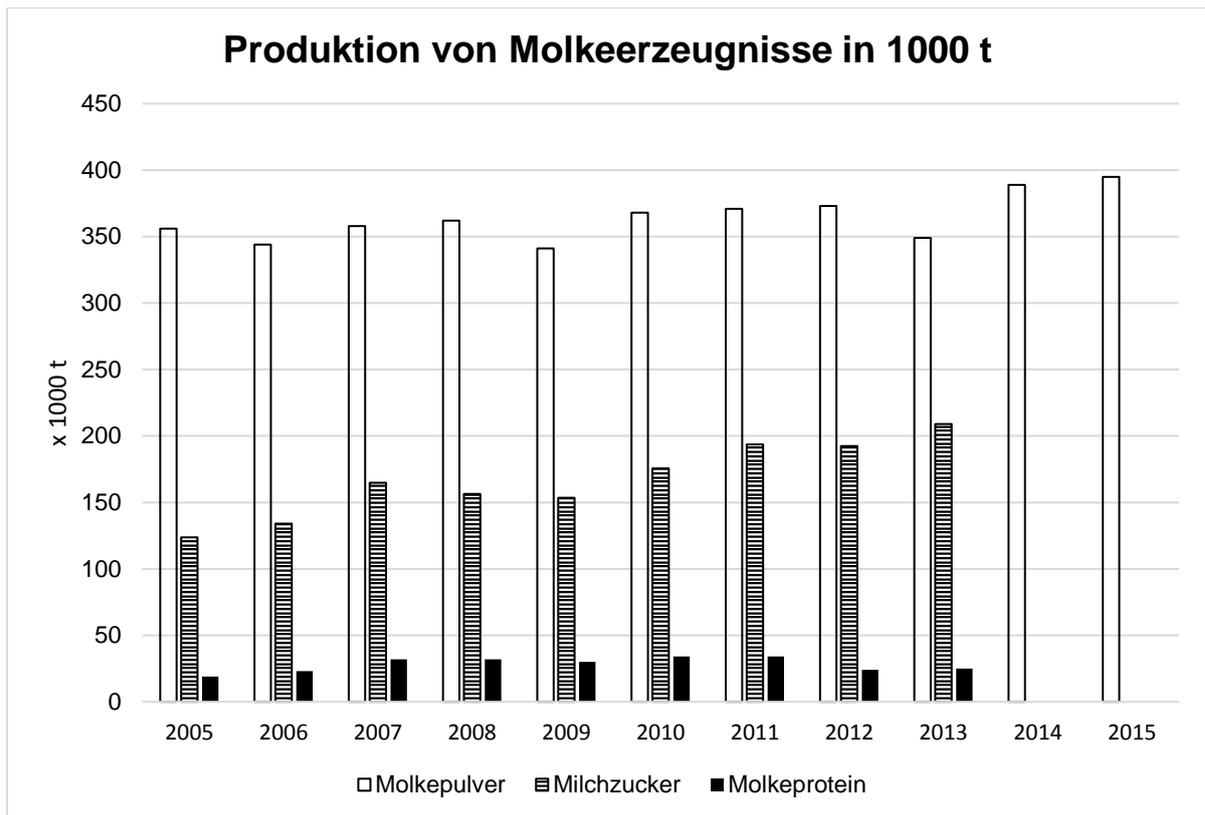


Abbildung 2.2: Produktion von Molkeerzeugnisse [11]

Der Export der Milchprodukte von Deutschland der letzten drei Jahre ist in Tabelle 2.2 dargestellt. Im Jahr 2014 wurde mehr Molkepulver in die EU und in Drittländer als im Vergleich zum Jahr 2013 verkauft. Dasselbe gilt auch für den Verkauf von Molke und Molkekonzentrat in Drittländer im Jahr 2014. Im Gegensatz dazu sank der Export der Produkte in die EU. Zeitgleich wurden weniger Käseprodukte als vorher in die EU als auch in Drittländer exportiert.

Im Vergleich zur Herstellung in Deutschland wurden weniger Molkeprodukte exportiert, doch wurden sie bereits vielseitig in Deutschland in verschiedenen Bereichen verwendet, wie bereits beschrieben.

Tabelle 2.2: Export der Milchprodukte aus der Bundesrepublik Deutschland in t [15,16]

Produkte \ Jahr	2013		2014		2015	
	in EU	in Drittländer	in EU	in Drittländer	in EU	in Drittländer
Molkepulver	271837	58432	276902	61509	256974	79965
Molke & Molkekonzentrat	204614	10	197112	11	143165	13
Hartkäse	178689		153045	7168	144695	9528
Schnitt-und halbf. Schnittkäse	442134		393720	49230	398551	48493

2.3 Nitrat

Unter Nitrat versteht man das Anion (NO_3^-) der Salpetersäure, welches mit den meisten Metallkationen in Wasser gut lösliche Salze bildet. Es ist weit verbreitet in der Umwelt und kommt im Grundwasser wie auch in Pflanzen vor. Nitrat wird über die Wurzeln von Pflanzen als Stickstoffquelle aufgenommen, weshalb es in der Landwirtschaft in Form von Kunstdünger oder als organischer Dünger verwendet wird [17]. Eine Anreicherung von Nitrat im Grundwasser kann durch Überdüngung zustande kommen. Im September 2016 wurde eine Nitratbelastung über dem EU-Grenzwert von 50 mg/L im Grundwasser von einem Drittel der Fläche der Bundesrepublik durch „Zeit Online“ berichtet [18].

2.3.1 Gesundheitliche Bedeutung von Nitrat

Die Primärtoxizität von Nitrat ist fast unbedenklich. Die letale Dosis (LD_{50}) beträgt für Ratten 2660 mg/kg Körpergewicht bei oraler Applikation und mehr als 2000 mg/kg Körpergewicht bei dermalen Applikation [2, 19]. Ein gesundheitsgefährdendes Potential von Nitrat beginnt erst nach Reduktion zu Nitrit. Die Reduktion findet direkt im Lebensmittel durch Mikroorganismen oder später im menschlichen Organismus durch Entzündungen im Darm- oder Harntrakt statt. Durch die Reaktion vom endogen gebildeten Nitrit mit sekundären Aminen im Magen-Darm-Trakt entstehen Nitrosamine (N-Nitrosoverbindungen), welche als kanzerogen gelten [2, 19]. Die bekannten akuten Nitritvergiftungen sind Gefäßerweiterung und Blutdrucksenkung [2]. Außerdem führt Nitrit besonders zur Bildung von Methämoglobin aus Hämoglobin und verhindert

dadurch den weiteren Sauerstoff-Transport. Deshalb kommt es zu Sauerstoffmangel bei Anwesenheit von Nitrit. Die Symptome einer Methämoglobinämie treten ab etwa 20% Methämoglobin im Gesamt-Hb auf. Beträgt der Methämoglobinspiegel des Blutes 60-80%, kommt es zum Tod durch „inneres Ersticken“ [19]. Bei gesunden Erwachsenen wird Methämoglobin möglicherweise in den Erythrocyten durch eine Reduktase in Hämoglobin umgewandelt. Daher ist Nitrat für gesunde Erwachsene unbedenklich. Die große Gefahr besteht für Säuglinge und Kleinkinder, da sie nur verringerte Reduktase-Aktivität haben. Außerdem sind sie auf Grund ihres geringeren Gewichtes und der schnelleren Oxidation fetalen Hämoglobins anders wie Erwachsene stärker gefährdet [2]. Ein Grenzwert von 50 mg/L Nitrat wird in der Trinkwasserverordnung festgelegt. Der Empfehlungswert der WHO liegt bei einer Obergrenze von 25 mg/L [20]. In der Diätverordnung findet man eine Obergrenze von 10 mg/L für Säuglingsnahrung [21].

2.3.2 Nitrat in Molke

Mit dem Begriff „Spätblähung“ war ein gravierender Fermentationsfehler bei der Herstellung von Hart- und Schnittkäsen gemeint, der Anfang 2000 auftrat. Darunter versteht man eine Buttersäure-Gärung, da Mikroorganismen während der Käsureifung Milchsäure in Buttersäure umsetzen wobei noch Essigsäure, Kohlendioxid und Wasserstoff entstehen [2]. Zu den anaeroben Sporenbildner, welche Spätblähung auslösen, gehören *Clostridium butyrium* und *Clostridium tyrobutyricum*. In 1 L Kesselmilch sind bereits 200 anaerobe, lactatvergärende Sporenbildner vorhanden [2]. Abtötung der Sporen durch die Pasteurisierung der Milch ist nicht möglich. Um das Wachstum von *Clostridium tyrobutyricum* zu unterdrücken, werden 20 g Salpeter (NaNO_3 bzw. KNO_3) je 100 L Kesselmilch in der Schnittkäserei zugegeben. Bei der Herstellung von Hartkäsen darf kein Nitrat verwendet werden, da die zur Herstellung notwendige Propionsäure-Gärung unterdrückt wird. Man findet die Fehlgärung nach Herstellung des Käses, wenn es reifungsbedingt zu dessen Entsäuerung kommt. Damit kann man etwa vier bis fünf Wochen nach Herstellung rechnen. Da Nitrat sehr gut wasserlöslich ist, bleibt es fast vollständig nach Abscheidung des Käsebruchs in der Molke, wodurch es zu den hohen Nitratkonzentrationen (bis zu 60 mg/L) in der Molke kommt [2].

2.3.3 Verfahren zur Nitratbreicherung

Bei dem Stichwort „nitrate removal“ bzw. „Nitratbreicherung“ handelt es sich zumeist um den Nitratabbau in Wasser, sei es Grund-, Trink-, oder Abwasser. Die Arbeitsgruppe von Professor Schubert in Karlsruhe berichtete in mehreren Veröffentlichungen über das Thema des mikrobiellen Nitratabbaus in flüssigen Lebensmitteln. Allerdings wurde in dieser Arbeitsgruppe die Denitrifikation mittels *P.denitrificans* DSM 65 nicht direkt in flüssigen Lebensmitteln durchgeführt, sondern in Modelllösungen, die neben Kaliumnitrat noch Phosphatpuffer sowie auch Glucose bzw. eine Zuckermischung enthielten [1].

Die bekannten Verfahren zur Nitratbreicherung sind in Tabelle 2.3 dargestellt. Es gibt eine Vielzahl von Arbeiten und auch großtechnische Anlagen, die meisten wurden für die Nitratentfernung aus Trinkwasser entwickelt bzw. veröffentlicht.

Nur eine Kombination von Ionenaustausch- und biologischer Denitrifikation ist zur Entfernung von Nitrat aus Trinkwasser ein durchführbares und praktisches Verfahren [22]. In der Arbeit von Schnitzmeier wurde diese Verfahrenskombination auch verwendet um Nitrat aus Molke zu entfernen [23].

Tabelle 2.3: Verfahren zur Abreicherung von Nitrat

Verfahren	Literatur
Umkehrosroseverfahren	[24, 25]
chemische Denitrifizierung	[24, 25]
Elektrodialyseverfahren	[24, 25]
katalytische Denitrifizierung	[1]
Anionenaustauschverfahren	[24, 25]
biologische Denitrifikation	[24, 25]
Kombination Ionenaustausch- und biologische Denitrifikation	[1, 26,27,28]
Kombination Ionenaustausch- und katalytische Denitrifikation	[1]

2.4 Biologische Denitrifikation

Unter biologischer Denitrifikation versteht man den Abbau von Nitrat zu Stickstoff durch bestimmte Mikroorganismen, die Denitrifikanten genannt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird die technische Umsetzung dieser Methode durch Inkubation mit nativen Zellen und immobilisierten Zellen in nitrathaltiger Molke durchgeführt. Nur unter anoxischen Bedingungen wird Nitrat durch eine enzymkatalysierte Reaktion zu

Stickstoff umgewandelt. Die Umstellung ihres Stoffwechsels auf Nitratatmung ist vielen anaeroben, strikt atmenden Bakterien möglich, wie z.B. *Pseudomonas denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans* und *Paracoccus denitrificans* [2].

Paracoccus denitrificans ist ein viel genutzter Model Organismus für die Erforschung der Atmungskette von Prokaryoten [29]. *P. denitrificans* haben einen sehr flexiblen Stoffwechsel und können dadurch unter aeroben und anaeroben Bedingungen leben. *P. denitrificans* ist ein Mikroorganismus, dessen Denitrifikationsweg bekannt ist und der die vier wichtigen Reduktaseenzyme Nitratreduktase, Nitritreduktase, NO-Reduktase und N₂O-Reduktase besitzt (s. Abbildung 2.3). Die optimale Umstellung von aerober Atmung auf den Denitrifikationssignalweg ist daher eine Schlüsselvoraussetzung für die Flexibilität des Organismus, und die Koordination der vier Reduktasen wird bereit auf der Transkriptionsebene streng kontrolliert [29].

Paracoccus denitrificans DSM413 ist nicht als typischer aerober Denitrifikant bekannt, allerdings ist seine Fähigkeit N₂O, unter hohem Sauerstoffdruck und bei niedrigen N₂O-Konzentrationen, zu reduzieren bemerkenswert [30].

Abbildung 2.3 zeigt schematisch die bei der biologischen Denitrifikation ablaufenden Prozesse.

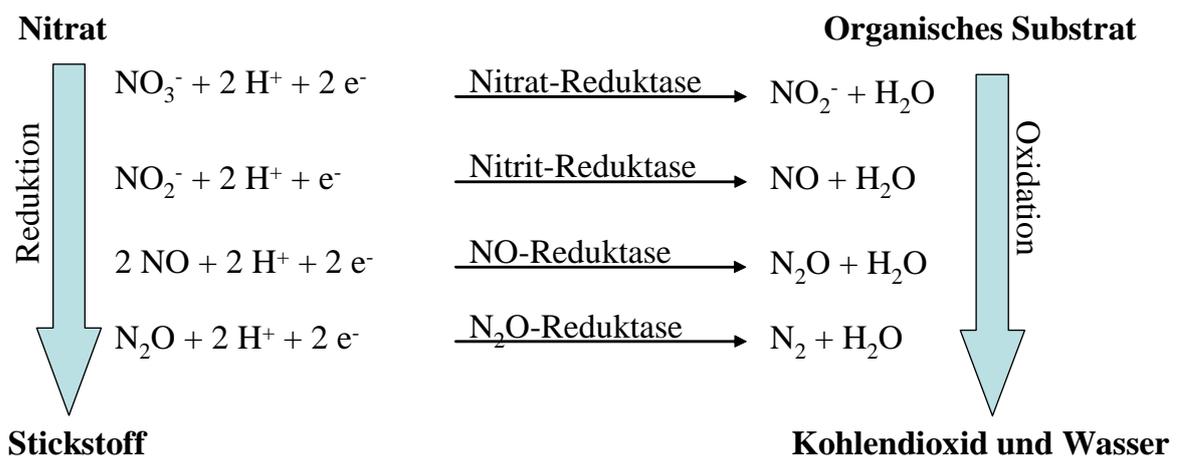


Abbildung 2.3: Schematischer Verlauf der mikrobiellen Nitratreduktion [2]

Die Denitrifikation besteht aus vier Teilschritten, wobei in jedem Schritt ein charakteristisches Enzym vorkommt. In dem ersten Schritt sorgt die Nitrat-Reduktase, ein in der Zellwand lokalisiertes Enzym, für die Umwandlung von Nitrat zu Nitrit. Im

nächsten Schritt reagiert das entstehende Nitrit weiter durch ein ebenfalls membrangebundenes Enzym, der Nitrit-Reduktase, zu Stickstoffoxid. Danach wird Stickstoffoxid durch die Stickstoffmonoxid-Reduktase über Distickstoffoxid und anschließend weiter mit Hilfe der Distickstoffoxid-Reduktase zu Stickstoff reduziert. Hier wird der natürliche Stickstoffkreislauf nach dem letzten Reduktionsschritt geschlossen [2].

Die Anwendung der biologischen Denitrifikation findet man häufig zur Nitratentfernung in Abwasser [2]. Auf Grund einer Kontaminationsgefahr von Trinkwasser mit Mikroorganismen wird dieses biologische Verfahren zur Trinkwasseraufbereitung vermieden [2]. Die Rückhaltung von Mikroorganismen oder Enzymen bereits in den Bioreaktoren spielt eine wichtige verfahrenstechnische und ökonomische Rolle für dieses Verfahren. Obwohl die Immobilisierung von Enzymen bereits großtechnisch häufig zum Einsatz kommt, gibt es bislang noch keinen Erfolg zur Verbesserung der Qualität von Lebensmitteln [2]. Durch die Nitratproblematik in Molke vom Anfang 2000 wurde der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Denitrifikant *Paracoccus denitrificans* näher untersucht.

2.4.1 *Paracoccus denitrificans*

1910 hatten Beijerinck und Minnmann *Paracoccus denitrificans* zum ersten Mal aus Gartenerde isoliert und es wurde zuerst der Stamm DSM 65 klassifiziert [31]. Im Jahr 1957 wurde der *P. denitrificans* Stamm DSM 413 isoliert [32]. Es handelt sich um ein gramnegatives Bakterium in verschiedenen Formen, welches entweder kugelförmig mit einem Durchmesser von 1,1–1,3 µm oder als kurze Stäbchen mit der Länge von 0,9–1,2 µm auftritt [2, 33].

Es ist allseits bekannt, dass die verschiedenen Subspezies von *Paracoccus denitrificans* extrem anpassungsfähiger Organismen darstellen, da diese eine Vielzahl an Substraten verwerten können [34]. Es ist ein fakultativ autotrophes Bakterium, welches entweder Sauerstoff verwertet oder in der anaeroben Lage mit einem terminalen Elektronenakzeptor wie Nitrat, Nitrit oder Distickstoffmonoxid zur Energiegewinnung nutzen kann (Abbildung 2.4.) [2, 32]. Unter fakultativ autotrophen Bakterien versteht man, dass die Bakterien neben den organischen Kohlenstoffquellen auch Kohlendioxid zum Aufbau ihrer Zellsubstanz verwenden können [35].

P. denitrificans gehört zu dieser Gruppe. Weiterhin zählt *P. denitrificans* zu den Knallgasbakterien, dank seiner Fähigkeit molekularen Wasserstoff zu oxidieren [2].

In Abbildung 2.4 sind die verschiedenen Wachstumsbedingungen mit verschiedenen Energiequellen von *P. denitrificans* dargestellt.

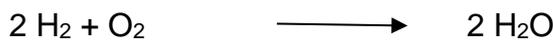
a) aerob heterotroph



b) anaerob heterotroph



c) aerob chemolithoautotroph



d) anaerob chemolithoautotroph

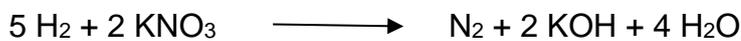


Abbildung 2.4 verschiedene Energiequellen bei verschiedenen Wachstumsbedingungen von *Paracoccus denitrificans* [32]

Abbildung 2.5 zeigt den Elektronentransport in *P. denitrificans*. Der Transport der Elektronen unter aeroben und anaeroben Bedingungen in *P. denitrificans* gelingt mittels einem chemiosmotischen Gradienten durch die Zellmembran [1] und startet mit der NADH- und Succinat-Dehydrogenase. Bei aerobem Wachstum werden Elektronen über Ubiquinon, dem bc1-Komplex und Cytochrom c zur aa3-Typ Oxidase weitergeleitet. Es ist auch möglich, dass die Elektronen durch Verzweigen von Ubiquinon zur o-Typ Oxidase übertragen werden. Im Falle des anaeroben Wachstums verläuft der Elektronentransport über Ubiquinon zur Nitratreduktase. Im

Cytoplasma wird Nitrat zu Nitrit umgewandelt und über Nitrat/Nitrit-Antiporter ins Periplasma transportiert. Von dort wird Nitrit bis zum Stickstoff reduziert [1].

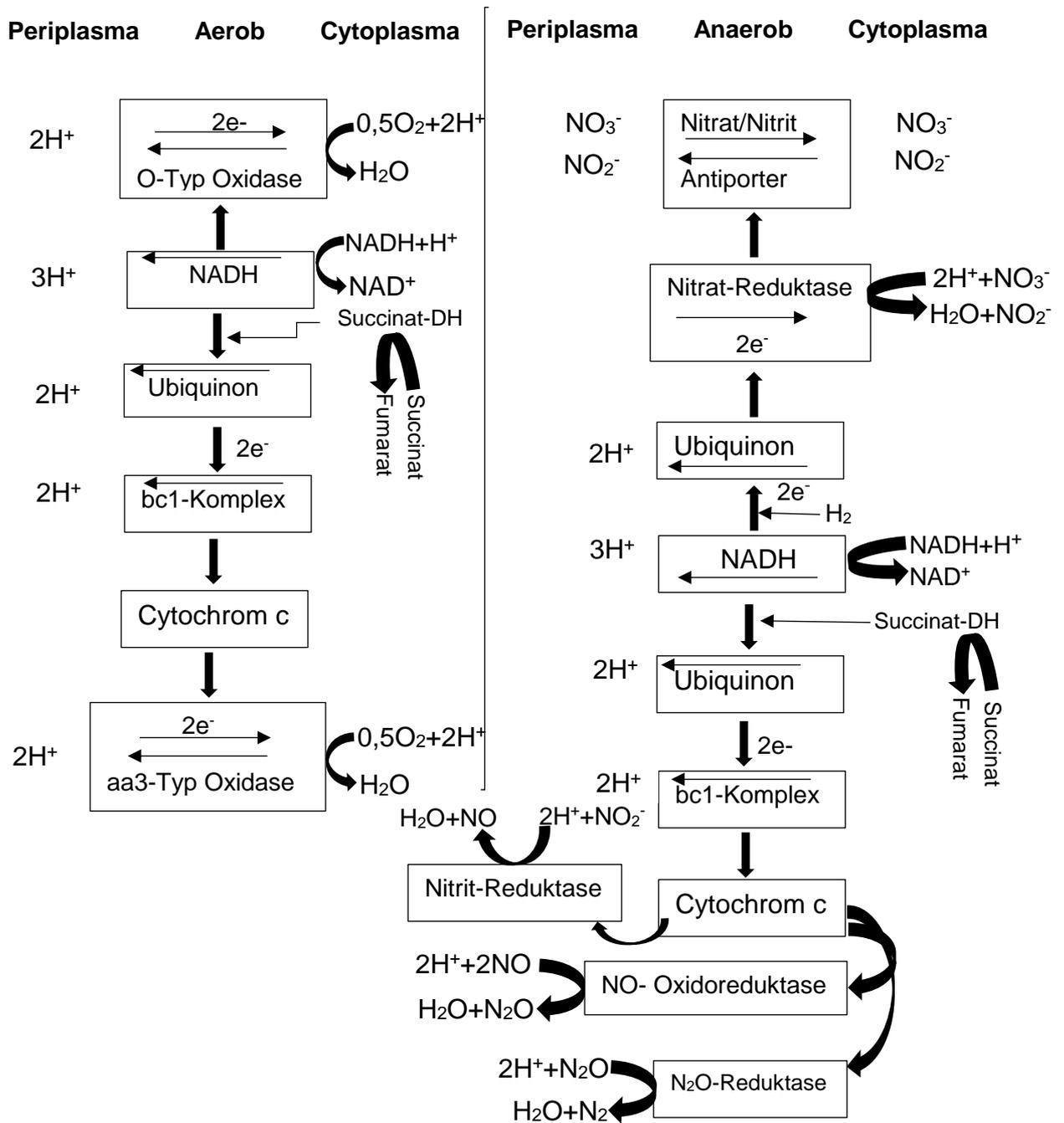


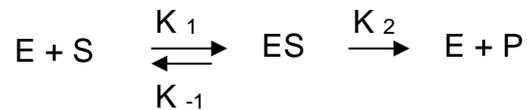
Abbildung 2.5 Elektronentransport im Cytoplasma von *Paracoccus denitrificans* bei aerober und anaerober Atmungskette [1]

2.4.2 Grundlagen der Enzymkinetik

Mit der Michaelis-Menten-Kinetik kann man die Geschwindigkeit einer einfachen enzymkatalysierten Umsetzung eines Substrates S in ein Produkt P beschreiben.

Durch den Ausgang der folgenden Reaktionssequenz wird die Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion hergeleitet. Hier wird das Substrat S in das Produkt P umgewandelt [36].

Reaktionssequenz:



E = Enzym

S = Substrat

ES = Enzym-Substrat-Komplex

P = Produkt

unter der Annahme eines *stationären Zustandes* ($\frac{d[ES]}{dt} = 0$) ergibt sich die folgende

Beziehung [1]:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = v_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

v = Reaktionsgeschwindigkeit

v_{\max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit

[P] = Produktkonzentration

[S] = Substratkonzentration

K_m = Michaelis-Konstante

Unter einer hohen Michaelis-Menten-Konstante versteht man, dass eine hohe Substratkonzentration benötigt wird, um die Hälfte des Enzyms zu sättigen. Dies bedeutet, dass das Substrat keine große Affinität zum Enzym hat. Im Gegensatz dazu ist bei einer niedrigen Michaelis-Menten-Konstante die Affinität groß. Dies bedeutet, dass das Enzym bereits bei geringer Substratkonzentrationen halb gesättigt ist [37].

Wenn die Substratkonzentrationen hoch sind, kann man K_m gegenüber [S] vernachlässigen. Dadurch verläuft der Reaktion nach einer Kinetik nullter Ordnung (Siehe Gl. 2.2) [37]:

$$v \approx v_{\max} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

Wenn die Konzentration an Substrat dagegen sehr gering ist, kann man sie gegenüber der Michaelis-Konstante vernachlässigen und Gl.2.1 ändert sich zu [37]:

$$v \approx \frac{v_{\max}}{K_m} \cdot [S] \quad (\text{Gl. 2.3})$$

Aus den experimentellen Werten wie Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration kann man die kinetischen Parameter v_{\max} und K_m über eine grafische Auswertung bestimmen. In der Abbildung 2.6 wird $[S]/v$ gegen $[S]$ aufgetragen, was als Hanes-Woolf-Darstellung bekannt ist. Hieraus lässt sich die Steigung $1/v_{\max}$ und der Ordinatenabschnitt K_m/v_{\max} bestimmen. Die Ermittlung von K_m gelingt durch feststellen des Schnittpunkts der Gerade mit der Abszisse [36].

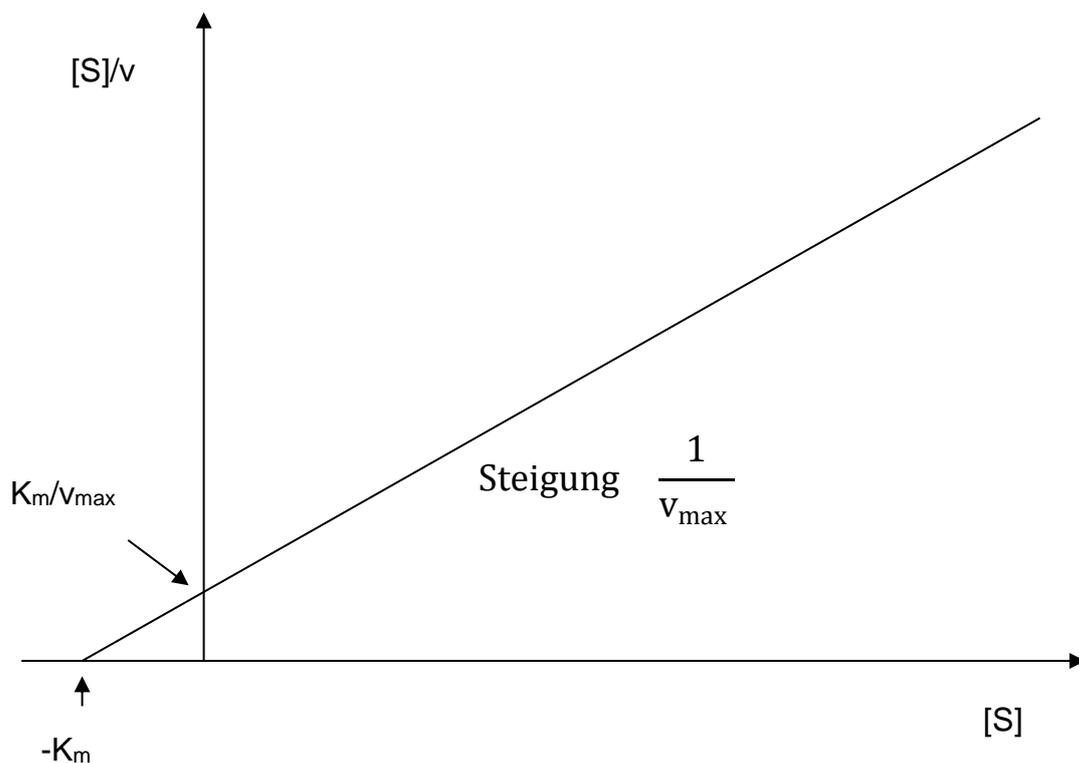


Abbildung 2.6: Hanes-Woolf-Darstellung der Michaelis-Menten-Gleichung [36]

2.5 Angewandte Immobilisationsverfahren

Unter Immobilisierung von Bakterien, Zellen oder Enzymen versteht man deren räumliche Fixierung in Gelpartikeln, Kapseln oder auch in umgrenzten Reaktionsräumen [38].

Die Immobilisierung von Biokatalysatoren wird immer häufiger in biotechnologischen Prozessen aus ökonomischen oder prozesstechnischen Gründen eingesetzt.

Folgende Gründe sind wichtig für eine Immobilisierung [39]:

- problemlose Separation der Biomasse und Verhindern der Auswaschung
- einfachere kontinuierliche Prozessführung bei einfacher Prozessautomation und Verwendung leistungsfähiger Reaktortypen
- Wiederholte Anwendungsmöglichkeit des Biokatalysators
- Hohe Biomassedichte und eine daraus folgende hohe Zeit-Raum-Ausbeute
- Verhinderung des Verlusts der Biokatalysatoraktivität durch Scherkräfte
- Abwendung des Anwachsens an Reaktorteilen
- Leichte Handhabung.

In Abbildung 2.7 sind die verschiedenen Methoden der Immobilisierung nach verschiedenen Kriterien dargestellt [38].

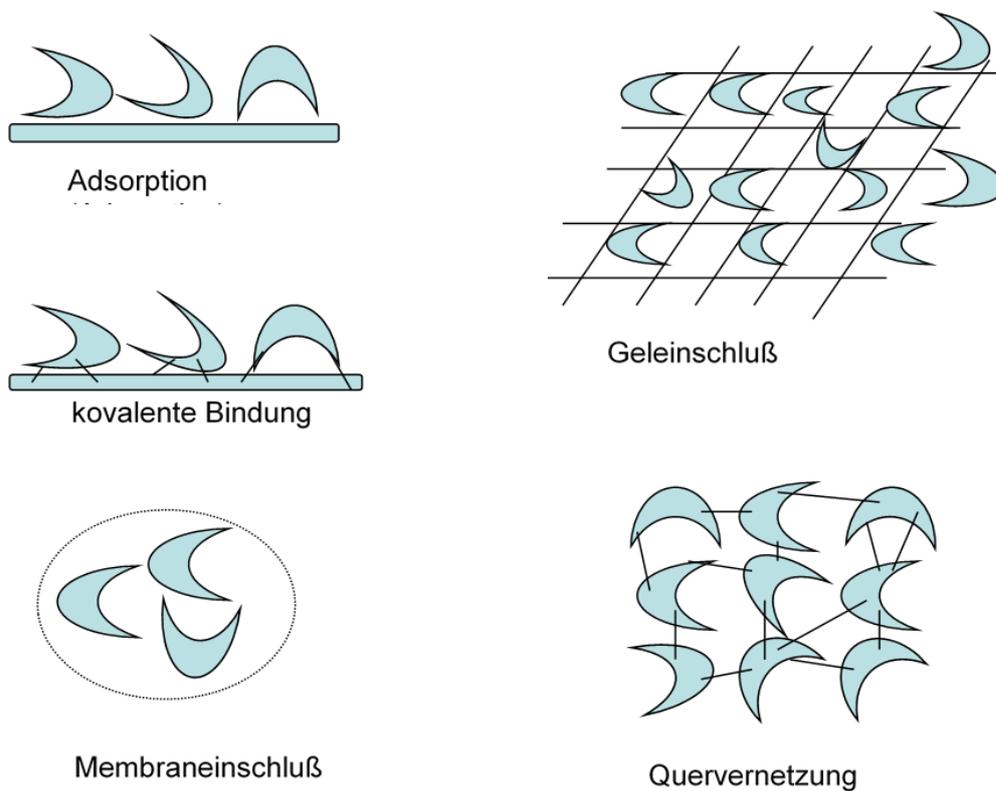


Abbildung 2.7: Methoden der Immobilisierung von Biokatalysatoren [40, 41]

Entweder ist sie durch Bindung an einen Träger möglich, oder die Biokatalysatoren werden in Matrices bzw. auch Membranen eingeschlossen.

Die Bindung eines Biokatalysators an einen Träger, wie z.B. Adsorption bzw. über eine kovalente Bindung ist ein einfaches Immobilisierungsverfahren. Allerdings ist sie nicht für alle Katalysatoren geeignet und die Bindung ist oft nur schwach [42].

Unter Quervernetzung versteht man eine Vernetzung des Biokatalysators entweder direkt mit sich selbst oder mit einem geeigneten Träger. Diese Methode ist nicht für lebende Zellen geeignet und wird nur für die Immobilisierung von Enzymen oder abgetöteten Zellen mit intaktem Enzymsystem verwendet. Beim Membraneinschluß wird ein Biokatalysator von einer Membran eingeschlossen. Dazu gehören zwei unterschiedliche Verfahren wie Membranreaktoren und Hohlkugeln [42]. Der Aufwand für die Kultivierung bei Hohlkugeln ist im Vergleich zu den Membranreaktoren geringer. Allerdings ist die Stabilität der Membranreaktoren besser. Im Membranreaktor werden die Enzyme wie z.B. Amidasen, Hydantoinasen und Racemasen schon länger mit Erfolg eingesetzt [43]. Ein wichtiges Immobilisierungsverfahren ist der Einschluss von Biokatalysatoren. Reaktortypen für dieses Verfahren sind in Abbildung 2.8 dargestellt.

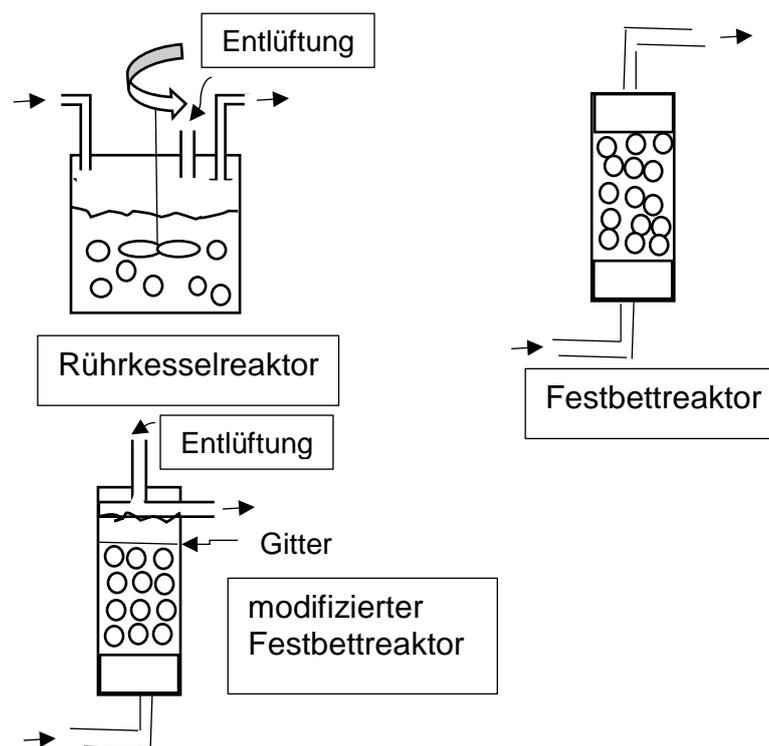


Abbildung 2.8: Reaktortypen für den Einschluss von Biokatalysatoren [40]

Unter Einschlussverfahren versteht man, dass Biokatalysatoren in eine Matrix eingebettet werden, wobei sie den Zutritt von Substraten und das Abfließen der gebildeten Produkte zulässt [42]. Es können viele Materialien für den Einschluss von

Biokatalysatoren verwendet werden, wie beispielsweise Polyurethane, Polyvinylalkohol (PVA), Alginat, Agar, Pektin, κ -Carrageenan und Chitosan. Allerdings sind Gele auf Basis von PVA und Polyurethanen, z.B. Polycarbamoylsulfonat, mechanisch deutlich stabiler im Vergleich zu den übrig genannten. Diese Einschlussverfahren sind für die Immobilisierung von lebenden Zellen sehr gut geeignet [42].

In dieser Arbeit wurde *P. denitrificans* mittels sogenannter LentiKats[®] eingeschlossen. Diese Methode ließ sich bei *P. denitrificans* bereits erfolgreich anwenden [44] und wird oft zur Nitrifikation und Denitrifikation verwendet [45]. LentiKats[®] besteht aus Polyvinylalkohol [46]. Als immobilisierendes Material ist eine Matrix aus Polyvinylalkohol geeignet, da sie dem Abbau durch Mikroorganismen widersteht. Durch die Linsenform der LentiKats[®] ergibt sich eine geringere Diffusionslimitierung und zudem lassen sie sich leicht durch Absieben vom Medium trennen. Deshalb sind sie sehr geeignet zum Einsetzen in kontinuierlichen Verfahren und Wiederholungsverfahren [45, 47]. In Abbildung 2.9 ist die schematische Abbildung von LentiKats[®] -Träger dargestellt.

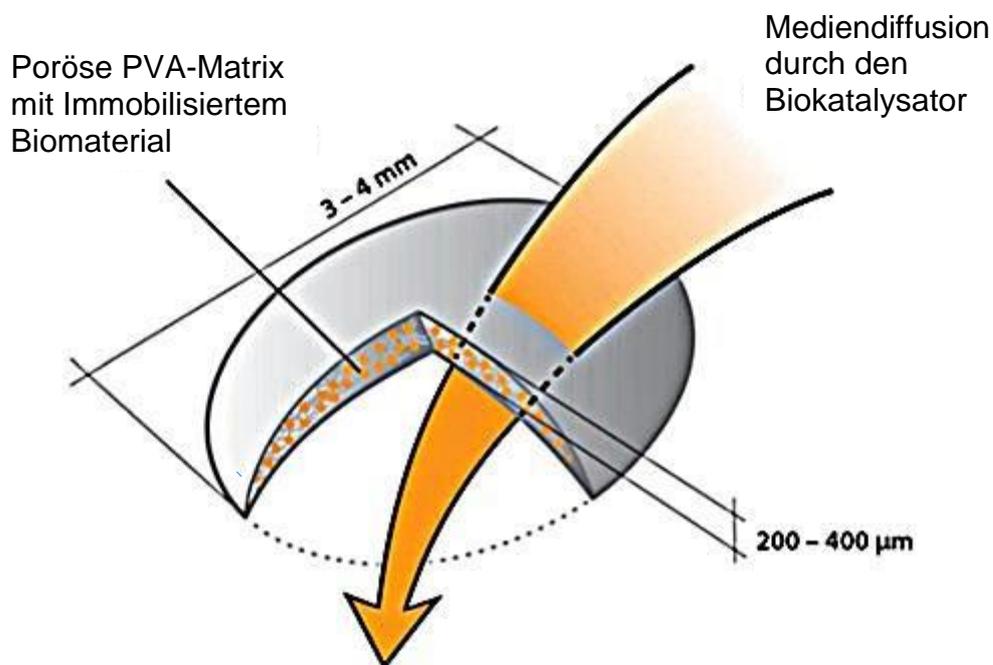


Abbildung 2.9 Schematische Abbildung von LentiKats[®] Träger.[45]

2.6 Nitrat- und Nitritanalytik

2.6.1 Reflektometrische Nitrat- und Nitritanalytik

In der Arbeit wurden alle Nitrat- und Nitritkonzentrationen mit dem analytischen Fertigtest Reflektoquant® der Firma Merck KGaA gemessen. Durch die Konzentration des gebildeten violetten Farbstoffes auf dem Teststreifen wird Nitrit reflektometrisch mit dem zugehörigen Reflektometer RQflex® der Firma Merck KGaA bestimmt. Der Farbstoff wird durch Azokupplung eines Diazoniumsalzes, welches durch Reaktion von Nitrit mit einem aromatischen Amin entsteht, mit N-(1-Naphtyl)-ethylenamin gebildet [2].

Im Fall der Nitratbestimmung ist es notwendig Nitrit zuerst zu entfernen, da diese Methode Nitrat in einem vorgeschalteten Reduktionsschritt bereits auf dem Teststreifen in Nitrit überführt. Durch Zugabe von 2 bis 3 Tropfen Amidosulfonsäure (10 %ig) wird Nitrit zerstört. Dies Verfahren ist geeignet für Nitratkonzentrationen zwischen 3 und 90 mg/L, im Falle von Nitrit zwischen 0,5 und 25 mg/L. Die Probevolumina von 2 mL werden für die Bestimmung der Nitrat- und Nitritkonzentrationen benötigt [2, 48]. Laut Herstellerangaben muss im Falle der Nitrat- und Nitritbestimmungen in Molke der ermittelte Wert mit einem Korrekturfaktor multipliziert werden (siehe in Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: Korrekturfaktoren für die Nitrat- und Nitritanalytik mit Merck Reflektoquant® in verschiedenen Medien [1]

Medium	Konzentration	Korrekturfaktor	
		Nitrat	Nitrit
Molke	6% Trockenmasse	1,4	1,36
Molkenkonzentrat	31% Trockenmasse	3,3	1,4
NaCl-Lösung	9 g/l	1,7	1,14
	25 g/l	2,7	1,16
	35 g/l	3,1	1,22
	45 g/l	3,4	1,25

2.6.2 Nitrat- und Nitritanalytik nach DIN 38405

Im unteren Messbereich wurde zur Nitrat- bzw. Nitritkonzentrationsbestimmung zusätzlich zu der reflektometrischen Methode (Kap. 2.6.1) die Methode nach DIN 38405 angewandt [49].

Die Nitrat-Konzentration wird mit Hilfe des Farbstoffs 4-Nitro-2,6-dimethylphenol bei 324 nm photometrisch bestimmt. Der Farbstoff entsteht durch Reaktion von Nitrat-Ionen mit 2,6-Dimethylphenol in schwefel- und phosphorsaurer Lösung innerhalb einer Reaktionszeit von etwa 5 min. Der Messbereich von Nitrat liegt zwischen 2,21 mg/L bis etwa 25 mg/L [49].

Zur Bestimmung von Nitrit-Ionen wird ein roter Farbstoff bei 540 nm photometrisch gemessen. Der rote Farbstoff bildet sich in saurer Lösung durch Reaktion von Nitrit mit Sulfanilamid und anschließender Azokupplung mit N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin. Das Verfahren ist geeignet für Nitritkonzentrationen von 0,016-32,86 mg/L [49].

3 Untersuchung des Wachstums von *Paracoccus denitrificans* (DSM 413)

3.1 Stammhaltungen

Die Bakterien wurden in gefriergetrockneter Form von der DSMZ bezogen. Die Kultivierung erfolgte in einem komplexen Medium, welches als Hauptbestandteile Pepton und Fleischextrakt enthält [50]. Der pH-Wert wurde dabei mit Hilfe eines Phosphatpuffers auf 7,5 eingestellt. Um Agarplatten zur Stammhaltung herzustellen, wurde das Medium vor dem Sterilisieren mit 16 g/L Agar versetzt. Nach dem Beimpfen wurden die Agarplatten bei 30°C zwei Tage lang inkubiert. Hiernach wurden sie bei 4°C gelagert, um nach etwa vier Wochen neue Agarplatten damit zu beimpfen. In Tabelle 3.1 wird die grundsätzliche bzw. ursprüngliche Zusammensetzung für Medium bzw. Agarplatten aufgeführt.

Tabelle 3.1 Grundsätzliche bzw. ursprüngliche Zusammensetzung von Medium bzw. Agarplatten zur Kultivierung [1]

Bestandteil	Konzentration [g/L]
Pepton	5
Fleischextrakt	3
KH ₂ PO ₄	0,5
Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	2,94
KNO ₃ (nur anaerobe Kulturen)	5

3.2 Durchführung der Kultivierung

Es ist bekannt, dass *P. denitrificans* zu den Denitrifikanten gehört und ein fakultativ anaerobes Bakterium ist. Anaerobes Wachstum ist nur möglich, wenn Nitrat zur Verfügung steht [51]. Die Kultivierung der für den Nitratabbau benötigten Biomassen erfolgte unter anaeroben Bedingungen, da in diesem Fall sämtliche Enzymsysteme für die Denitrifikation aktiv sind [52]. Für alle Kultivierungen unter anaeroben Bedingungen wurde den Medien außerdem Kaliumnitrat zugegeben.

Zum Sterilisieren wurden die Medien bei 121°C für 20 min im Autoklav (V-150 der Firma Systec GmbH) eingestellt. Um die notwendige Biomasse für eine Durchführung der Denitrifikation zu erzeugen, wurden die Agarkulturen zum Anlegen von Vorkulturen

verwendet, welche in sterilen 10 ml Röhren über 20 h bei 37°C und 120 rpm im Inkubationsschüttler bebrütet wurden. Die so gewonnenen Zellsuspensionen dienten zum Animpfen neuer Schüttelkulturen. Das hierzu verwendete Volumen betrug ein Hundertstel des zu kultivierenden Volumens.

Als Kulturgefäße wurden Schüttelkolben mit Schikanen verwendet. Für Kultivierungen unter anaeroben Bedingungen wurden die Schüttelkolben vollständig mit Medium gefüllt und anschließend luftdicht verschlossen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche Wachstumsbedingungen im Hinblick auf den Einsatz der Bakterien in einer Denitrifikation besser geeignet sind. Zur Optimierung der Wachstumsbedingungen wurde der Einfluss folgender Parameter untersucht: Sauerstoff, Temperatur, Rührgeschwindigkeit, Peptonarten, Konzentration von Glucose, Kaliumnitrat bzw. Salz (NaCl).

3.3 Bestimmung der Biomassekonzentration

In dieser Arbeit wurde eine indirekte Messmethode für die Bestimmung der Biomassekonzentration verwendet. Der Zusammenhang zwischen der mit dem Photometer messbaren Extinktion und der Zellkonzentration ist durch das Lambert-Beersche-Gesetz (Gl.8.1 in Anhang 8.6) gegeben [1, 53].

Zur Bestimmung der Biofeucht- und Biotrockenmasse wurde die Zellsuspension 15 min. bei 3500 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abdekantiert und die Biofeuchtmasse (BFM) durch Differenzwägung bestimmt. Diese setzte sich aus Zellmasse und anhaftendem Wasser zusammen. Durch Trocknung der Biofeuchtmasse über 24 h bei 105 °C und Differenzwägung der gewichtskonstanten Zentrifugengefäße konnte die Biotrockenmasse (BTM) ermittelt werden.

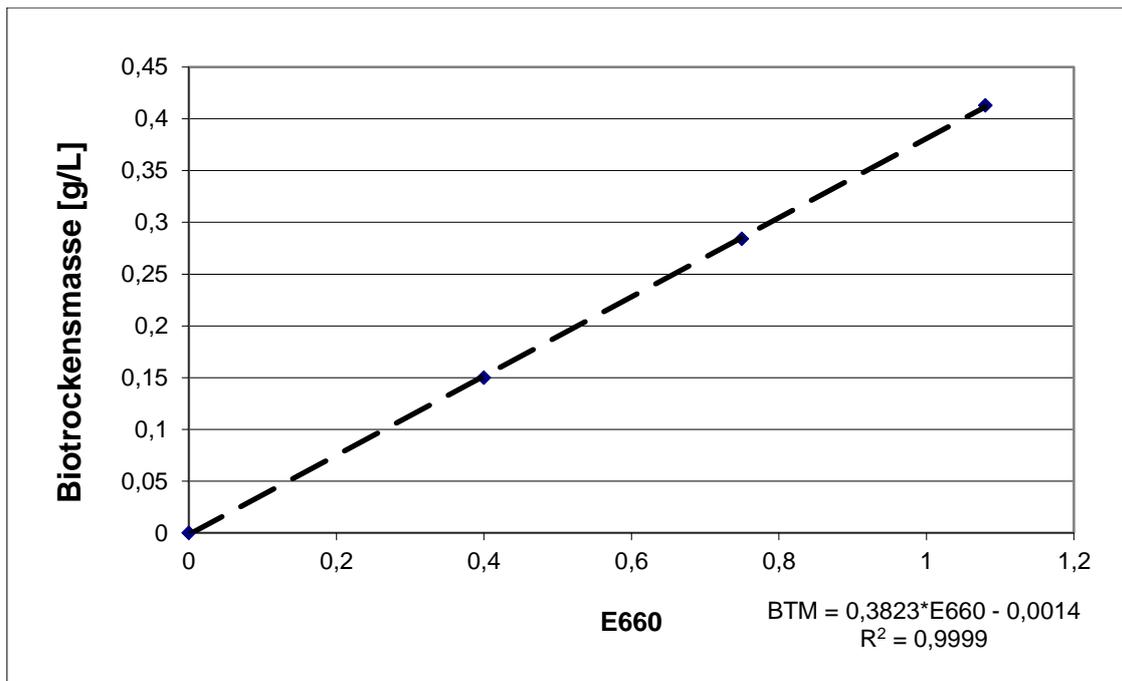


Abbildung 3.1: Kalibrierung für die Bestimmung der Biotrockenmasse von *P. denitrificans* aus der Extinktion bei 660 nm, n=1

Die Abbildung 3.1 zeigt die Linearregression, die sich als Ausgleichsgerade $BTM = 0,3823 E_{660} - 0,0014$ bei einem Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,9999 ergab. In der Arbeit wurden alle in den Versuchen berechneten Biotrockenmassen mit dieser Ausgleichsgerade aus der E_{660} bestimmt.

3.4 Optimierung der Zellwachstumsbedingungen

3.4.1 Einfluss von Sauerstoff

Zur Untersuchung des Einflusses von Sauerstoff auf das Zellwachstum wurde das Kultivierungsmedium nach Tabelle 3.1 zusammen mit Anaerocult® A verwendet. Zur Sichtbarmachung des Sauerstoffgehaltes wurde ein Anaerotest-Streifen eingesetzt. Anaerocult® A besteht aus Komponenten, die Sauerstoff in kurzer Zeit chemisch vollständig binden und ein O₂-freies (anaerobes) Milieu herstellen einschließlich der Erzeugung einer CO₂-Atmosphäre. Das sauerstofffreie Milieu wird durch die Änderung der Farbe des Anaerotest®- Streifens von Blau nach Weiß nach etwa 4 h angezeigt [54].

Die Kultivierung wurde unter anaeroben Bedingungen wie in Kapitel 3.2 beschrieben durchgeführt. Für die Kultivierung mit Anaerocult® A wurde ein befeuchtetes

Anaerocult® A mit einem Anaerotest in dem Kultivierungssystem ohne Kontakt zum Medium befestigt, bevor das Kulturgefäß luftdicht verschlossen wurde.

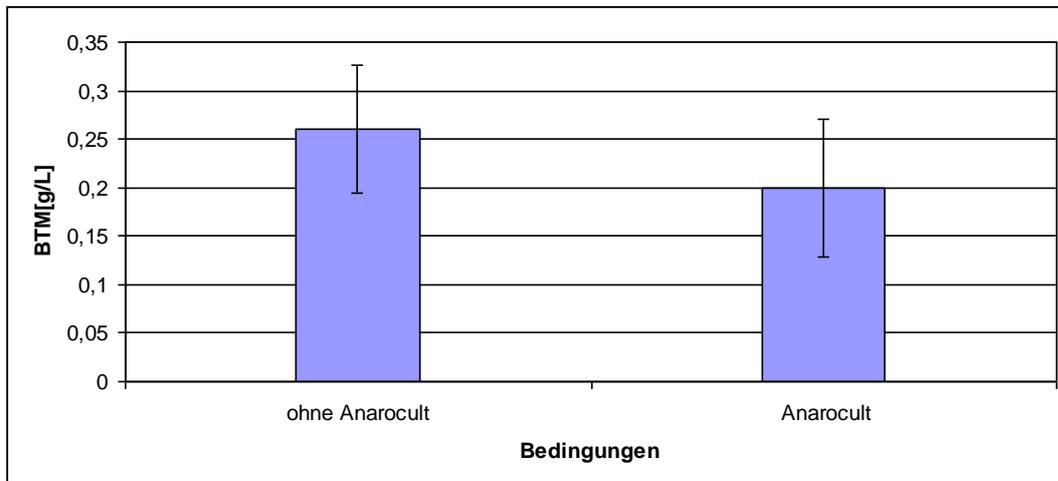


Abbildung 3.2: Zelldichte bei der Anwendung von Anaerocult® A für anaerobe Bedingungen nach 20 h Kultivierungszeit, T = 37°C, n = 3

Die Bakterienkulturen erreichten nach etwa 20 h ihre maximale Extinktion. Das Wachstum ohne Verwendung von Anaerocult® A unter fakultativ anaeroben Bedingungen zeigt eine signifikant höhere Biomasse im Vergleich zu der strikt anaeroben Kultivierung mit Anaerocult® A (s. Abbildung 3.2).

P. denitrificans ist ein fakultativ anaerobes Bodenbakterium. Es kann sowohl in Gegenwart von Sauerstoff als auch bei Abwesenheit von Sauerstoff mit alternativen terminalen Elektronen-Akzeptoren wie z.B. Nitrat als Energiequelle wachsen [34, 51]. Dadurch ergab sich eine höhere Biomasse von *P. denitrificans* bei einer Kultivierung unter anaeroben Bedingungen ohne Hilfe von Anaerocult® A. Da das System mit Anaerocult® A nach etwa 4 h keinen Sauerstoff mehr enthält und sich die Bakterien zu dieser Zeit gerade in der Lag-Phase zur Adaption befinden, zeigte sich eine geringere Biomasse bei Anwendung von Anaerocult® A im Vergleich zur Anwendung unter anaeroben Milieubedingungen.

Hierdurch konnte man feststellen, dass diese Bakterien in der Lag-Phase des Wachstums noch Sauerstoff verwenden können und sich danach zum Wachstum auf eine anaerobe Atmung umstellen, wo Nitrat für die Zellatmung zur Verfügung steht. Für die Erzeugung hoher Biomassen unter anaeroben Bedingungen ist somit der Einsatz von Anaerocult® A nicht notwendig.

3.4.2 Einfluss von Temperatur, Rührgeschwindigkeit und Peptonarten

Bei einer Untersuchung des Einflusses von Peptonarten auf das Zellwachstum wurde Pepton aus Soja und Bacto-Pepton verwendet. Bacto-Pepton [55] wird enzymatisch aus Fleisch hergestellt. Pepton aus Soja [56] enthält im Vergleich zu Bacto-Pepton zahlreiche Vitamine und Kohlenhydrate. Das komplexe Medium wurde wie in Tabelle 3.1 dargestellt, hergestellt.

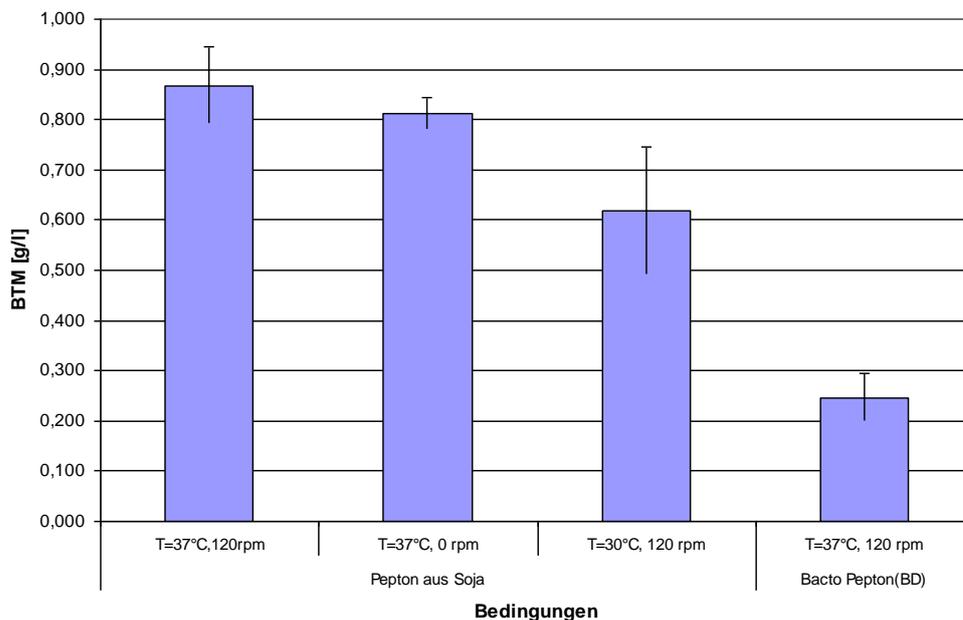


Abbildung 3.3: Biomasse nach 20 h Kultivierungszeit bei verschiedenen Temperaturen, Rührgeschwindigkeiten und Peptonarten, n = 3

Abbildung 3.3 zeigt, dass sowohl verschiedene Peptonarten als auch die Temperatur und Rührgeschwindigkeit einen deutlichen Einfluss auf das Zellwachstum haben. Das Kultivierungsmedium mit Pepton aus Soja zeigt eine um etwa 80% höhere Biomasseausbeute im Vergleich zum Bacto-Pepton. Eine Temperaturerhöhung von 30°C auf 37°C resultiert in einer Erhöhung der Biomasse um 44%. Das geringere Zellwachstum bei 0 rpm kann auf die Inhomogenität des Mediums während der Kultivierung zurückgeführt werden. Die Anwendung von Pepton aus Soja für die Kultivierung liefert die höchste Biomasseausbeute bei 37°C mit einer Rührgeschwindigkeit von 120 rpm, deshalb ist es sinnvoll diese Bedingungen für weitere Kultivierungen zu verwenden.

3.4.3 Einfluss der Glucosekonzentration

Als C-Quelle zum Zellwachstum wurde Glucose verwendet. Dabei wurde untersucht, inwiefern sich die Zugabe von Glucose als Kohlenstoffquelle auf das Wachstum von *P. denitrificans* auswirkt. Für die Optimierung der Glucosekonzentration wurden dem Basismedium (siehe in Tabelle 3.1) zusätzlich 2, 5 bzw. 10 g/L Glucose zugesetzt und mit einem Phosphat-Puffer auf pH 7,5 eingestellt. Zur Vermeidung der Maillard-Reaktion wurde die Glucose-Lösung getrennt autoklaviert. Diese Kultivierung wurde bei einer Temperatur von 37°C über 20 h durchgeführt.

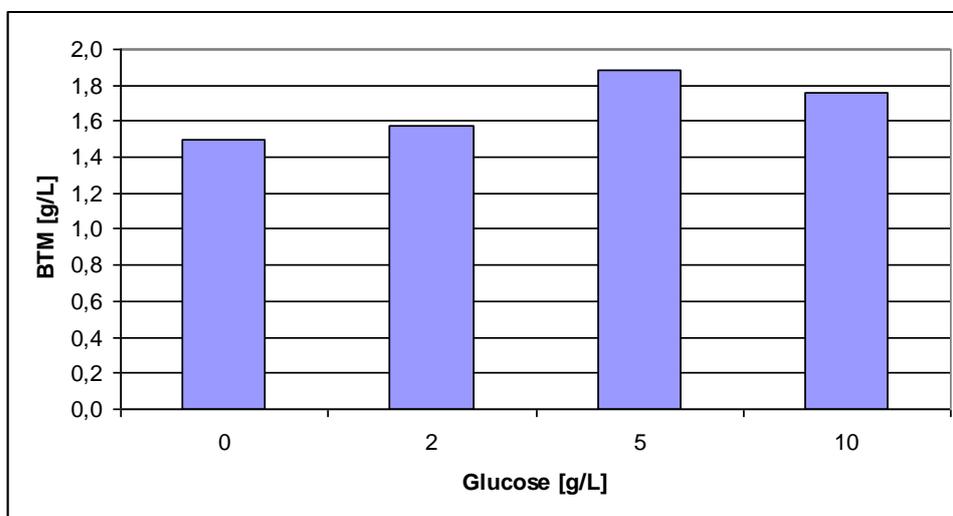


Abbildung 3.4: Biomasse nach 20 h Kultivierungszeit bei verschiedenen Konzentrationen von Glucose, T = 37°C, pH = 7,5 , c (KNO₃) = 5 g/L

Abbildung 3.4 zeigt eine höhere Biomasseausbeute der mit Glucose versetzten Kultivierungen im Vergleich zur Referenz ohne Glucose bei einer gleichen Konzentration von KNO₃ von 5 g/L. Die Biomasse nahm nur bis zu einer Glucosekonzentration von 5 g/L zu und bei einer Glucosekonzentration von 10 g/L ab. Eine geringere Biomasse bei erhöhter Glucosekonzentration könnte durch eine Vergiftung durch Abbauprodukte sowie von Nitrit herrühren. Aus der Literatur [32] ist bekannt, dass zur stöchiometrischen Umsetzung von 5 Mol Glucose 24 Mol Kaliumnitrat unter anaeroben Bedingungen notwendig sind (siehe Reaktionsgleichung). Dennoch muss man immer darauf achten, dass eine Hemmung des Wachstums aus verschiedenen Gründen stattfinden kann, wie zum Beispiel bei einer Konzentrationsüberschreitung von Substrat- oder Produktmasse.

Reaktionsgleichung [32]:



In [53] ist beschrieben, dass bei einer Reihe von Kohlenstoffquellen, wie Acetat, Formiat, Oxalat, Benzoat oder Phenol oder bei N-Quellen, wie Nitrit oder Ammoniak, schon bei geringeren Konzentrationen eine Hemmung des Wachstums beobachtet wird. Dies führt bei Batch-Kulturen zu einer Verlängerung der Lag-Phase und einer Reduktion der Wachstumsrate [53].

Hier ist es notwendig, die Konzentration von Kaliumnitrat bzw. Glucose in dem Medium für eine anaerobe Kultivierung zu optimieren um eine hohe Bakterienbiomasse zu produzieren.

3.4.4 Einfluss unterschiedlicher Verhältnisse und Konzentrationen von Kaliumnitrat und Glucose

Wie bereits zuvor erwähnt, ist *P. denitrificans* in der Lage, sowohl unter anaeroben als auch aeroben Bedingungen zu wachsen (s. Kapitel 2.4.1). Die zu Denitrifikationszwecken notwendigen Enzyme werden allerdings nur unter anaeroben bzw. mikroaeroben Bedingungen gebildet. Um anaerobes Wachstum zu ermöglichen, muss dem Mikroorganismus ein externer Elektronenakzeptor zur Verfügung stehen. In der vorliegenden Arbeit wurde Kaliumnitrat als externer Elektronenakzeptor verwendet. In den durchgeführten Kultivierungen wurde untersucht, wie sich eine Verminderung der Kaliumnitrat- sowie eine Erhöhung der Glucosekonzentration mit Kaliumnitrat im Massenverhältnis 1:1 oder im Molverhältnis 8,8 : 5 auf das Wachstum von *P. denitrificans* auswirkt (s. Abbildung 3.5).

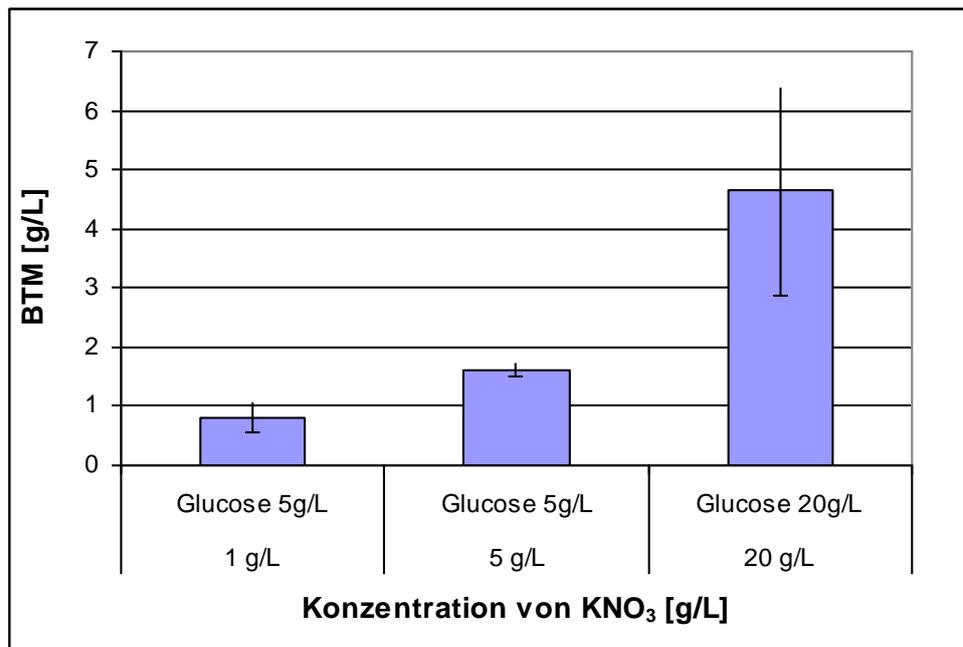


Abbildung 3.5: Biomasse nach 20 h Kultivierungszeit bei verschiedenen Konzentrationen von Kaliumnitrat und Glucose, T = 37°C, pH-Wert = 7,5, n = 3

Bei einer Kaliumnitratkonzentration von 1 g/L zeigte sich eine um 40 % verringerte Biomasseausbeute im Vergleich zum Zellwachstum im Medium mit einer Kaliumnitratkonzentration von 5 g/L. Da die Kultivierungen unter mikroaeroben Bedingungen, d.h. bei geringen Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt wurden, muss Mikroorganismen *P. denitrificans* zum Wachstum auf anaerobe Atmung umstellen. Bei der anaeroben Atmung werden die Elektronen der Atmungskette auf einen externen Elektronenakzeptor übertragen, da Sauerstoff nicht zur Verfügung steht. Die Verwendung von Nitrat als Elektronenakzeptor während der Anzucht bietet sich an, da *P. denitrificans* nach der Kultivierung zum biologischen Nitratabbau eingesetzt wurde. Die Biomasseausbeute nimmt mit steigender Nitratkonzentration zu. Die Erhöhung der Glucose- und Kaliumnitrat-Konzentration auf je 20 g/L liefert eine maximale Biomasseausbeute von 4,8 g/L Trockenmasse. Dies entspricht einer fünffachen Massezunahme.

Das Zellwachstum wird graphisch als Biotrockenmasse (BTM) gegen die Zeit in Abbildung 3.6 dargestellt. Daraus werden die Parameter für das Wachstum von *P. denitrificans* bestimmt.

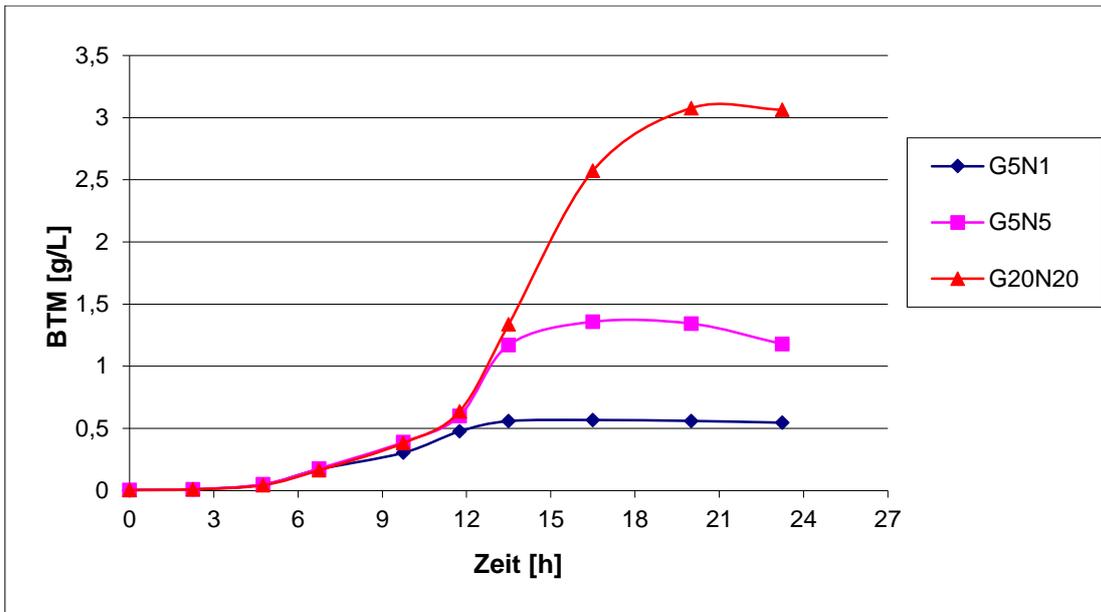


Abbildung 3.6: Zellwachstumskurve von *P. denitrificans* bei verschiedenen Konzentration von Kaliumnitrat und Glucose (G: Glucose [g/L], N: KNO₃ [g/L]; z.B. G5N1: Glucose 5 g/L, KNO₃ 1 g/L)

Die Parameter für das Wachstum von *P. denitrificans* bei unterschiedlichen Verhältnissen und Konzentrationen von Kaliumnitrat und Glucose wurden aus der Wachstumskurve in Abbildung 3.6 in logarithmierter Form bestimmt [53] und sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.2: Parameter des anaeroben Wachstums von *P. denitrificans* (G: Glucose [g/L], N: KNO₃ [g/L]; z.B. G5N1: Glucose 5 g/L, KNO₃ 1 g/L)

		G5N1	G5N5	G20N20	Literatur [1]
		anaerob	anaerob	anaerob	anaerob
μ	[h ⁻¹]	0,45	0,44	0,44	0,34
t_d	[h]	1,55	1,58	1,58	2,04
X	[g _{BTM} /L]	0,55	1,18	3,06	0,48

Tabelle 3.2 zeigt, dass bei allen drei verwendeten Medien die durchschnittliche Wachstumsrate ca. 0,44 h⁻¹ liegt. Die höchste Biotrockenmasse konnte mit einem Medium erzielt werden, welches 20 g/L Glucose und 20 g/L Kaliumnitrat enthält. Die Verdopplungszeit beträgt nur etwa drei Viertel im Vergleich zur Literatur [1]. Unter Verdopplungszeit versteht man die Zeit, die eine Kolonie braucht um ihre Zellzahl zu verdoppeln. Die in den drei Medien unter anaeroben Bedingungen gezogenen

Bakterienkulturen zeigten höhere Wachstumsraten und Biomasseausbeuten, als die in der Literatur erwähnten [1]. Dies ist vermutlich auf die Zugabe von Glucose zurückzuführen, welche dort [1] nicht eingesetzt wurde. Es wurde bereits berichtet [32], dass *P. denitrificans* bei anaerobem heterotrophen Wachstum Glucose und Kaliumnitrat im Molverhältnis 5 : 24 benötigt (s. Abbildung 2.4 b). In der vorliegenden Arbeit wurde das optimale Molverhältnis von Glucose zu Kaliumnitrat von 8,8 : 5 ermittelt.

In einer 2015 veröffentlichten Arbeit zur Kultivierung von *P. denitrificans* in einem Medium mit Glucose als C-Quelle wurde gezeigt, dass Glucose eine wichtige Rolle für die Elektronentransportkette und das Zellwachstum bei Denitrifikanten zukommt [57].

3.4.5 Einfluss der Salzkonzentration

Zur Untersuchung des Einflusses der Salzkonzentration auf das Zellwachstum wurden Natriumchlorid-Konzentrationen von 15 g/L, 25 g/L, 35 g/L, 50 g/L, 75 g/L und 100 g/L in einem komplexen Medium (s. Tabelle 3.1) eingesetzt. Als Referenz wurde ein Medium ohne Zugabe von Natriumchlorid verwendet. Die Kultivierungen der Bakterien wurden bei einer Temperatur von 30°C und mit einer Rührgeschwindigkeit von 120 rpm über 20 h durchgeführt.

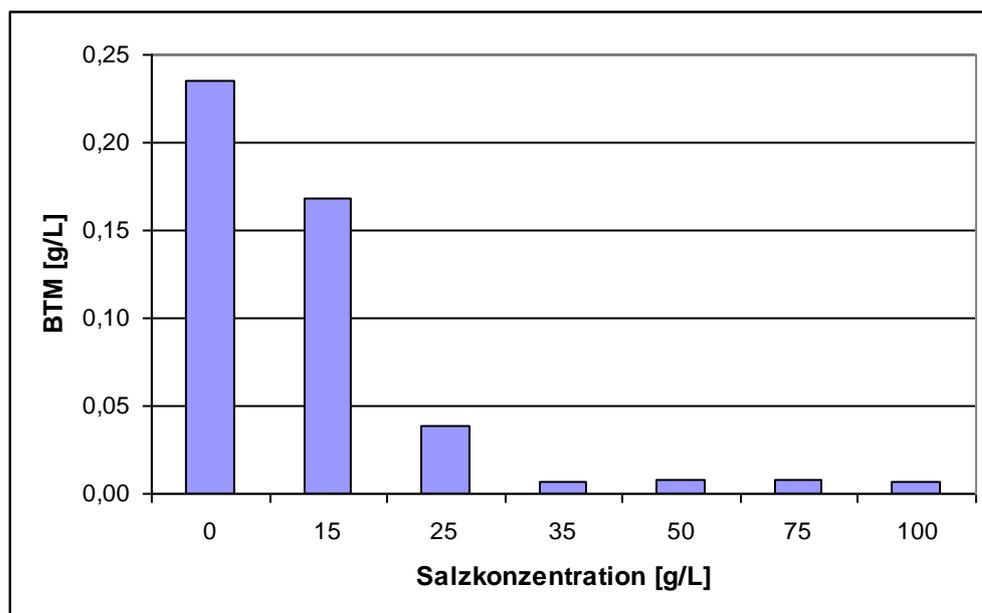


Abbildung 3.7: Biomasse nach 20 h Kultivierungszeit bei verschiedenen Konzentrationen von NaCl, T = 30°C

Abbildung 3.7 zeigt, dass bereits Salzgehalte von 15 g/L einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum ausüben. Deshalb wurden die Kultivierungen im Weiteren ohne Zusatz von Natriumchlorid durchgeführt. Gemäß [33] wachsen diese Mikroorganismen bei Konzentrationen ab 50 g/L Natriumchlorid nur noch geringfügig [33].

3.5 Zusammenfassung

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war, eine möglichst hohe Ausbeute an Mikroorganismen zu erhalten, die die notwendigen Enzyme enthalten, um Nitrat abzubauen. Nach der Untersuchung des Zellwachstums unter Variierung der Parameter Sauerstoff, Zusammensetzung des Mediums, Temperatur, Rührgeschwindigkeit, Peptonarten, Glucosekonzentration und Salzkonzentration konnte ein optimales Medium sowie optimale Bedingungen zur Kultivierung von *P. denitrificans* für Nitratabbau hergeleitet werden.

Die Kultivierung erfolgte in einem komplexen Medium, welches als Hauptbestandteile Pepton und Fleischextrakt enthält. Der pH-Wert wurde dabei mit Hilfe eines Phosphatpuffers auf 7,5 eingestellt. Als optimierte Kultivierungsbedingung stellt sich eine Temperatur von 37°C und eine Schüttelgeschwindigkeit von 120 rpm für 20 h Inkubationszeit heraus. Zur Vermeidung der Maillard-Reaktion wurde die Glucoselösung getrennt autoklaviert. Das optimale komplexe Medium ist in Tabelle 3.3 dargestellt.

Es zeigte sich, dass Salzkonzentrationen ab 15 g/L einen hemmenden Einfluss auf das Zellwachstum der Mikroorganismen ausüben und bei einer Salzkonzentration von 35 g/L wurde nahezu keine Biotrockenmasse mehr nachgewiesen.

Tabelle 3.3: optimales komplexes Medium für die Kultivierung von *P. denitrificans*

Bestandteil	Konzentration [g/L]
Pepton aus Soja	5
Fleischextrakt	3
KH ₂ PO ₄	0,5
Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	2,94
KNO ₃	20
Glucose	20

Eine Erhöhung der Nitratkonzentration im Medium führt zu einer Zunahme der Biomasseausbeute. Allerdings ist es wichtig zu beachten, dass Kaliumnitrat und Glucose im Massenverhältnis 1 : 1 oder im Molverhältnis 8,8 : 5 stehen müssen, damit eine maximale Biomasseausbeute erzielt werden kann. Dies wurde ermittelt, gleichwohl in [32] zu lesen ist, dass das theoretische Molverhältnis 24 : 5 ist. Dies mag dadurch verursacht sein, dass die Mikroorganismen einen Teil der Glucose benötigen, um ihren Stoffwechsel aufzubauen. Trotzdem sollte man beachten, dass das Zellwachstum durch das Substrat selbst bzw. Produkte wie Nitrit gehemmt werden kann. Dies zeigt sich z.B. in Abbildung 3.4, wo eine Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 g/L bei einer konstanten Nitratkonzentration von 5 g/L zu geringeren Biomasseausbeuten führt. Nitrat- und Glucosekonzentration sind daher getrennt auf höchste Biomasseausbeute hin zu optimieren. In dieser Arbeit ergab sich die höchste Biomassenausbeute von *P. denitrificans* bei einer Konzentration von Glucose und Kaliumnitrat von je 20 g/L im komplexen Medium. Dies bedeutet, dass das Medium genügend Nährstoffe für optimales Zellwachstum enthalten muss um eine hohe Biomasseausbeute zu liefern.

P. denitrificans ist ein fakultativ anaerobes Bodenbakterium. Es kann sowohl in Gegenwart von Sauerstoff als auch bei Abwesenheit von Sauerstoff mit alternativen terminalen Elektronen-Akzeptoren wie z.B. Nitrat als Energiequelle wachsen [34, 51]. Für ein anaerobes Milieu mit Hilfe von Anaerocult® A ergab sich eine geringere Biomasseausbeute im Vergleich zur mikroaeroben Bedingungen, da das System mit Anaerocult® A nach etwa 4 h keinen Sauerstoff mehr enthält. Nach dieser Zeit befinden sich die Bakterien gerade in der lag-Phase auf dem Weg zur Adaption. Dadurch ist eine Nutzung von Anaerocult® A für die Erzeugung eines anaeroben Milieus um eine höhere Biomasseausbeute zu erzielen nicht notwendig.

Die in dieser Arbeit bestimmten optimalen Wachstumsbedingungen sind denen der genannten Literatur sehr ähnlich, insbesondere bzgl. Temperatur und pH-Wert. Im Jahr 1981 veröffentlichte Talaat-Harb optimale Bedingungen zum Wachstum von *P. denitrificans* in verschiedenen Stämmen [32]. Diese wurden auch für den Stamm DSM413 bestimmt. Zellwachstum wurde im Lactat-Mineral Medium bei Temperaturen von 10°C - 40°C beobachtet. Optimal für das Wachstum der Mikroorganismen war eine Temperatur von 36°C. Für eine Optimierung des pH-Werts wurden Medien zwischen pH 6 bis pH 10 eingesetzt. In einem Medium mit einem pH-Wert von 7,6 ließ sich die höchste Biomasse züchten. Die Vermehrung der Bakterien *P. denitrificans* in

Kochsalzlösung ist ebenfalls möglich. Allerdings war die Toleranzgrenze für Natriumchlorid bzgl. Zellwachstum von *P. denitrificans* (DSM 413) mit einer Konzentration von 3% (30 g/L) erreicht [32].

4. Biologische Denitrifikation mittels nativen Zellen von *P. denitrificans*

Die biologische Denitrifikation in einer hohen Salzkonzentration von 35 g/L durch *Paracoccus denitrificans* (DSM 413) und *Paracoccus pantotrophus* (DSM 65) wurden in der Arbeit von Schnitzmeier untersucht [1]. Es zeigte sich, dass der verwendete Mikroorganismus *P. denitrificans* geeigneter als *P. pantotrophus* ist und er berichtete bereits über die optimalen Denitrifikationsbedingungen. Es stellte sich heraus, dass diese bei einem pH-Wert von 7,5, einer Temperatur von 37°C und einer Zugabe von Acetat als Kohlenstoffquelle erreicht werden [1]. In der Arbeit von Yang-Hee wurde dieser optimale pH-Wert von 7,5 für biologische Denitrifikation durchgeführt [58]. Ungepufferte Systeme und gealterte Zellen zeichneten sich durch eine verstärkte Neigung zur Nitritakkumulation aus. Die Salzkonzentration hatte einen deutlichen Einfluss auf die Denitrifikationsgeschwindigkeit. Eine effiziente Denitrifikation erschien noch bei einer Salzkonzentration von 45 g/L mit einer Temperatur von 37°C. Eine Abbaurate bei einer Salzkonzentration von 35 g/L mit einer Temperatur von 37°C war noch vergleichbar mit der Abbaurate in physiologischer Kochsalzlösung bei Raumtemperatur. Der Nitratabbau durch anaerob gewachsene Zellen verläuft nahezu linear und deutlich schneller als durch aerob gewachsene Zellen. Die geringe Nitratbaugeschwindigkeit durch aerobe Zellen ist wahrscheinlich auf eine Vergiftung der Zellen bzw. eine Hemmung der Denitrifikation durch Nitrit zurück zu führen [59], da die Expression der Nitritreduktase mit Verzögerung erfolgt. Die Hemmung der mikrobiellen Denitrifikation von *P. denitrificans* durch Nitrit mit einer Konzentration von 493 mg/L wurde bei Van Versefeld berichtet [60]. Beccari berichtete, dass der Einfluss des pH-Wertes auf eine Hemmung der biologischen Denitrifikation durch Nitrit möglich ist und dass Nitritkonzentrationen von 20 – 25 mg/L NO_2^- -N bei einem pH-Wert von 7-8 und einer Biomassenkonzentration von 500- 1000 mg/L VSS vollständig entfernt werden [61]. Durch einen Biofilm könnte Nitrit mit einer Konzentration bis zu 2000 mg/L NO_2^- -N bei pH-Werten von 8 - 8,9 abgebaut werden [62].

In dieser Arbeit wurde eine biologische Denitrifikation durch einen kombinierten Prozess zur Nitratbereicherung in Molkekonzentrat mittels Anionentauscherharzen und mikrobieller Denitrifikation entwickelt, ein Kombinationsverfahren welches bereits bei Schnitzmeier realisiert wurde [1]. Eine effektive Regeneration des Anionentauscherharzes erschien bei Salzkonzentration von 35 g/L möglich. Deshalb wurden die

Denitrifikationsbedingungen für *P. denitrificans*, insbesondere die Denitrifikationsbedingungen in Salzkonzentration von 35 g/L, weiter untersucht.

Um eine optimale Bedingung zur Denitrifikation zu erreichen, ist es wichtig, den Einfluss von pH-Wert, Wachstumsbedingungen, Temperatur und der Zusammensetzung des Mediums zu untersuchen. Die Vorbereitung der Zellen von *P. denitrificans* und die Durchführung der Denitrifikation unter anaeroben Bedingungen wird in den folgenden Kapiteln beschrieben.

4.1 Vorbereitung der Zellen für die Denitrifikation

4.1.1 Kultivierung von *P. denitrificans*

Die Zellen wurden unter anaeroben Bedingungen kultiviert, damit sie die nötigen Enzymsysteme für die anschließende Denitrifikation bilden können. Zur Kultivierung unter anaeroben Bedingungen wurden Kulturgefäße vollständig mit einem Medium gefüllt und dicht verschlossen. Ein Komplexmedium für die Kultivierung ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Für die aerobe Kultur wurden die Kulturgefäße nur zu einem Drittel mit dem Medium befüllt. Im Vergleich zu dem Medium für die anaerobe Kultivierung wurde kein Kaliumnitrat beim aeroben Kultivierungsmedium zugesetzt.

4.1.2 Zellernte für die Denitrifikation

Nach 20 h Kultivierungsdauer wurden die Zellen von *P. denitrificans* geerntet. Die Zellsuspension wurde bei 3500 rpm für 15 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal durchgeführt und anschließend wurden die Zellen für die Denitrifikationsversuche verwendet.

4.2 Durchführung der Denitrifikation unter anaeroben Bedingungen

Um eine Denitrifikation unter anaeroben Bedingungen zu ermöglichen, erfolgte die Durchführung in einer mit Silicoseptum verschlossenen Schottflasche. Zur Vermeidung von Sauerstoffzufuhr während der Probenahme wurde jede Probe mit Hilfe einer Spritze durch das Silicoseptum genommen.

4.3 Biologische Denitrifikation in einer Versuchslösung mit einer Salzkonzentration von 35 g/L

4.3.1 Einfluss des pH-Wertes auf den Nitratabbau

Die Aktivität der Nitrat- bzw. Nitritreduktase ist stark vom pH-Wert abhängig. Dabei wird die Nitratreduktionsgeschwindigkeit stärker vom pH-Wert beeinflusst, als die Nitritreduktionsgeschwindigkeit. In einem pH-Bereich zwischen 8-9 ist die Nitratreduktase weniger aktiv als die Nitritreduktase. Die Nitratreduktase hat ein Aktivitätsmaximum im neutralen pH-Bereich um pH 7 und ist erheblich aktiver als die Nitritreduktase. Im diesen Fall kommt es zu einer Nitritakkumulation. Im basischen pH-Bereich oberhalb von 9 wird die Nitritabbaugeschwindigkeit wiederum geringer als die Nitratabbaugeschwindigkeit. Dabei hat die Nitrat- bzw. Nitritreduktase nur noch ein Viertel bzw. ein Drittel ihrer maximal möglichen Aktivität [63]. Eine Studie zeigte, dass Nitrat direkt zu Stickstoff durch *P. denitrificans* bei pH-Wert von 8,5 umgewandelt werden kann [64].

Die Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf die Denitrifikation wurde in Versuchslösungen mit Salzkonzentration von 35 g/L bei verschiedenen pH-Werten, die durch Zugabe eines Phosphatpuffers eingestellt wurden, durchgeführt.

Die benötigte Biomasse wurde unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Die Vorbereitung der Zellen für den Versuch ist in Kapitel 4.1 beschrieben. Die Denitrifikation erfolgte unter anaeroben Bedingungen wie in Kapitel 4.2 beschrieben und der zeitliche Verlauf der Nitratabreicherung ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

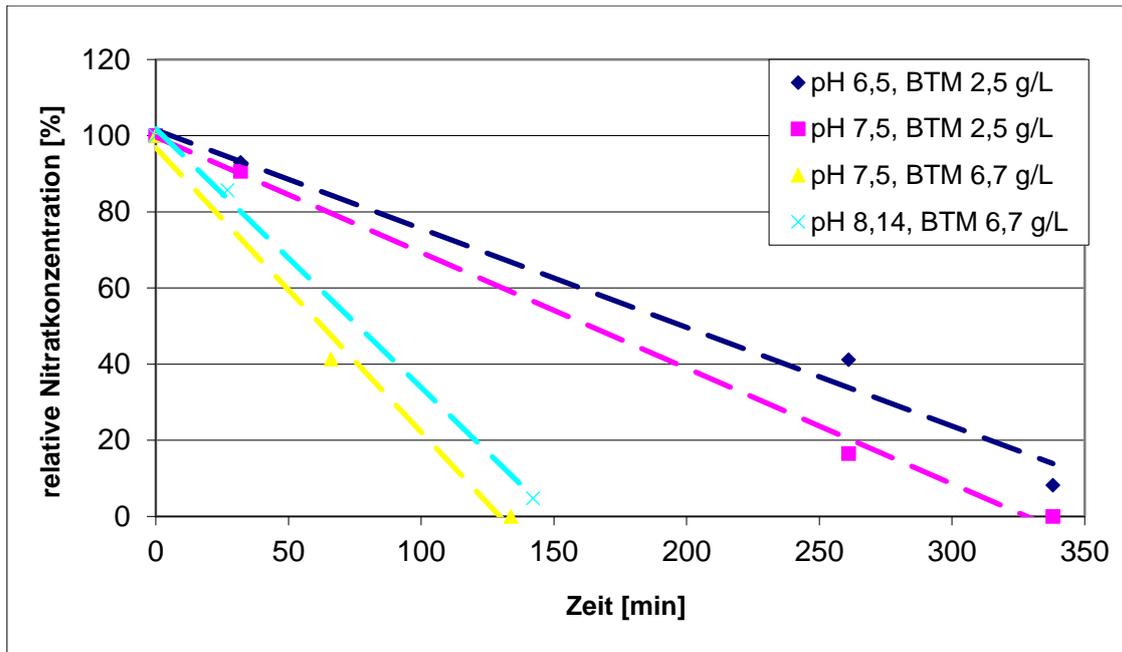


Abbildung 4.1: Zeitverlauf der Nitratkonzentrationen während des Nitratabbaus bei verschiedenen Biotrockenmassen und verschiedenen pH-Werten ($T = 37\text{ °C}$), $n=1$.

Es ist in Abbildung 4.1 zu erkennen, dass der Nitratabbau bei den verschiedenen Biotrockenmassen bei pH 7,5 rascher erfolgt, als bei pH-Werten die sich darunter oder darüber befinden. Weiterhin nimmt das Nitrat bei pH-Wert von 7,5 mit einer höheren Biotrockenmasse schneller als mit einer geringeren Biotrockenmasse ab. Nitrit konnte während der Denitrifikation nicht detektiert werden. Ein pH-Wert von 7,5 ist somit optimal nicht nur für den Nitrat- sondern auch den Nitritabbau. In der Literatur wurde bereits die autotrophe Denitrifikation von *P. denitrificans* mit Wasserstoff auf ein unterschiedliches Verhalten von Nitrat- und Nitritreduktase beschrieben [65]. Hier wurde für den Nitratabbau ein geeigneter pH-Wert von 5,8 bis 8,9 beschrieben. Ein schnellerer Verlauf der Nitritreduktion zeigte sich bei pH-Werten zwischen 7,2 bis 8,7, bei denen keine Nitritakkumulation mehr stattfand. Für den Nitratabbau durch das in der Arbeit von Yang-Hee und Schnitzmeier verwendete Bakterium *P. denitrificans* wird ein optimaler pH-Wert von 7,5 angegeben [1, 58].

4.3.2 Einfluss der Wachstumsbedingungen auf den Nitratabbau

Neben den beschriebenen Wachstumsbedingungen in Kapitel 3 sollte ihr Einfluss auf die Denitrifikation beobachtet werden. Zum Einfluss der Wachstumsbedingungen für nitratabbauende Bakterien wurde bereits in der Arbeit von Schnitzmeier gezeigt, dass die Biomasse unter aeroben Wachstumsbedingungen schneller zunimmt als bei

anaeroben Kulturen. Allerdings stehen die entsprechenden Enzymsysteme für die Denitrifikation bei der Verwendung dieser aerob kultivierten Zellen nicht sofort zur Verfügung [1]. In dieser Arbeit wurde der Nitratabbau unter diesen Wachstumsbedingungen auch untersucht. Diesbezüglich wurde der Einfluss von verschiedenen Kaliumnitratkonzentrationen im Medium auf die Bakterien untersucht um zu erkennen, ob sie die Expression der entsprechenden Enzymsysteme der Denitrifikation beeinflusst.

4.3.2.1 Nitratabbau mit aerob und anaerob gewachsenen Zellen von *P. denitrificans*

Der Einfluss der aeroben und anaeroben Zellwachstumsbedingungen von *P. denitrificans* auf den Nitratabbau wurde untersucht und die verwendeten Biomassen wurden wie in Kap. 4.1.1 beschrieben hergestellt.

Der Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentrationen ist in Abbildung 4.2 darstellt.

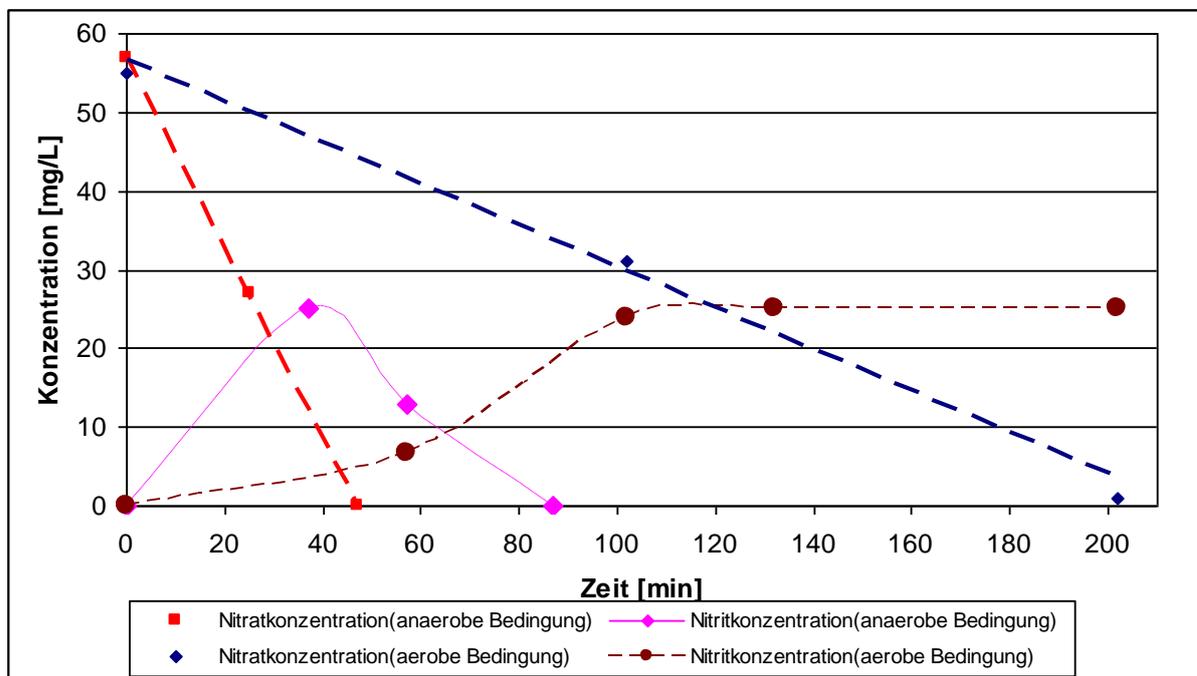


Abbildung 4.2: Nitrat- und Nitritkonzentration bei der Denitrifikation mit aerob und anaerob gewachsenen Zellen bei 30°C mit Acetat als Elektronendonator und physiologischer Kochsalzlösung (9 g/L), pH 7,5, n=1

Es ist zu erkennen, dass die Nitratkonzentration durch anaerob gewachsene Zellen schneller linear abnimmt als im Vergleich zu den aeroben Zellen. Als Erklärung hierzu kann man anführen, dass die Zellen unter anaeroben Bedingungen die zum Nitratabbau notwendigen Enzyme schneller bilden. Im Fall der aerob kultivierten Zellen zeigte sich eine deutlich geringere Abnahmegeschwindigkeit der Nitratkonzentration. Dies ist wahrscheinlich der Hemmung durch das akkumulierte Nitrit geschuldet, was bedeutet, dass die Expression der Nitritreduktase nicht erfolgreich stattfand [1]. Zum Erreichen der in dieser Arbeit gesteckten Ziele ist daher eine Verwendung von aerob kultivierten Zellen nicht möglich.

4.3.2.2 Nitratabbaurate mit Zellen von *P. denitrificans* in unterschiedlichen Medien

Zur Untersuchung des Einflusses der Kaliumnitratkonzentration im Nährmedium auf die Nitratabbaugeschwindigkeit wurde *P. denitrificans* in verschiedenen Medien mit unterschiedlichen Kaliumnitratkonzentrationen kultiviert (s. Kapitel 3.4.4). Nach der Zellernte wurde deren Nitratabbaugeschwindigkeit in den Versuchslösungen untersucht. In Abbildung 4.3 sind die Denitrifikationsraten dargestellt.

Eine Verminderung der Kaliumnitratkonzentration im Nährmedium wirkt sich nicht nur auf das Wachstum von *P. denitrificans*, sondern auch auf die Denitrifikation aus. Abbildung 4.3 zeigt, dass man die geringste Abbaurate bei einer KNO_3 -Konzentration von 1 g/L und die maximale Abbaurate bei 20 g/L erhält. Nitrit konnte nicht nachgewiesen werden. Diese erhöhte Fähigkeit zur Denitrifikation ist auf die Expression der entsprechenden Enzymsysteme für den Nitratabbau zurückzuführen.

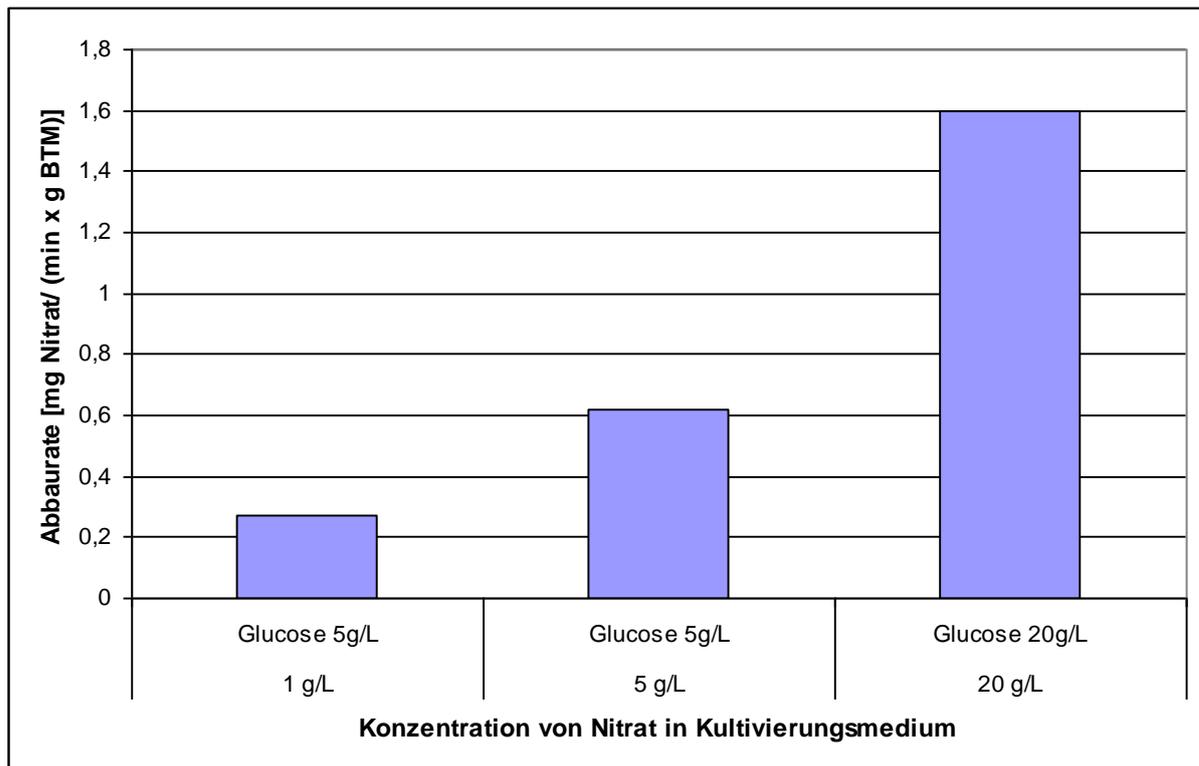


Abbildung 4.3: Abbauraten für Nitrat mit anaerob gewachsenen Zellen in einem Medium mit verschiedenen KNO_3 -Konzentrationen bei 37°C und Acetat als Elektronendonator in einer Kochsalzlösung von 35 g/L.

4.3.3 Kinetik des biologischen Nitratabbaus durch native Zellen

Die Kinetik der mikrobiellen Denitrifikation durch *P. denitrificans* wurde untersucht. K_m und v_{max} der Nitratreduktion durch *Paracoccus denitrificans* wurden durch die Auftragung von $[S]/v$ gegen $[S]$ mittels Hanes-Woolf-Darstellung bestimmt [66].

Da *P. denitrificans* bei der Kultivierung mit dem optimalen komplexen Medium (s. Tabelle 3.3) nicht nur die höchste Biomasse, sondern auch die höchste Abbaurrate zeigte, wurde die Kinetik der Denitrifikation bei diesen Bedingungen bestimmt. Für die Kinetik-Untersuchung wurde die Denitrifikation mit verschiedenen Nitratkonzentrationen (30, 49,6, 186, 195,3, 254,2 und 300,7 mg/L) und mit verschiedenen Biotrockenmassen (4 g/L und 3,5 g/L) untersucht. Die Denitrifikation von *P. denitrificans* erfolgte bei einer hohen Salzkonzentration von 35 g/L, bei einer Temperatur von 37 °C, einem pH - Wert von 7,5 und Acetat als Elektronendonator. Die Reaktionsgeschwindigkeit v wird durch lineare Regression der ermittelten Geradensteigung bezogen auf die Biotrockenmasse [g/L] bestimmt (siehe Gl. 4.1) [66, 67, 68, 69, 70].

$$v = \frac{\text{Steigung der linearen Regression}}{\text{BTM}} \quad \text{Gl. 4.1}$$

v = Nitratbaugeschwindigkeit [$\text{mg}_{\text{Nitrat}}\text{L}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$]

BTM = Biotrockenmasse [g/L]

Der Nitratabbau durch *P. denitrificans* verläuft bei verschiedenen Nitratkonzentrationen annähernd linear, was auf eine sehr kleine Michaelis-Konstante (K_m) in der Enzymkinetik von Menten und Michaelis schließen lässt. Im betrachteten Konzentrationsbereich kann der Abbau daher als Reaktion nullter Ordnung beschrieben werden [1]. Zur Ermittlung von K_m und v_{\max} wurde $[S]/v$ gegen $[S]$ in Abbildung 4.4 aufgetragen.

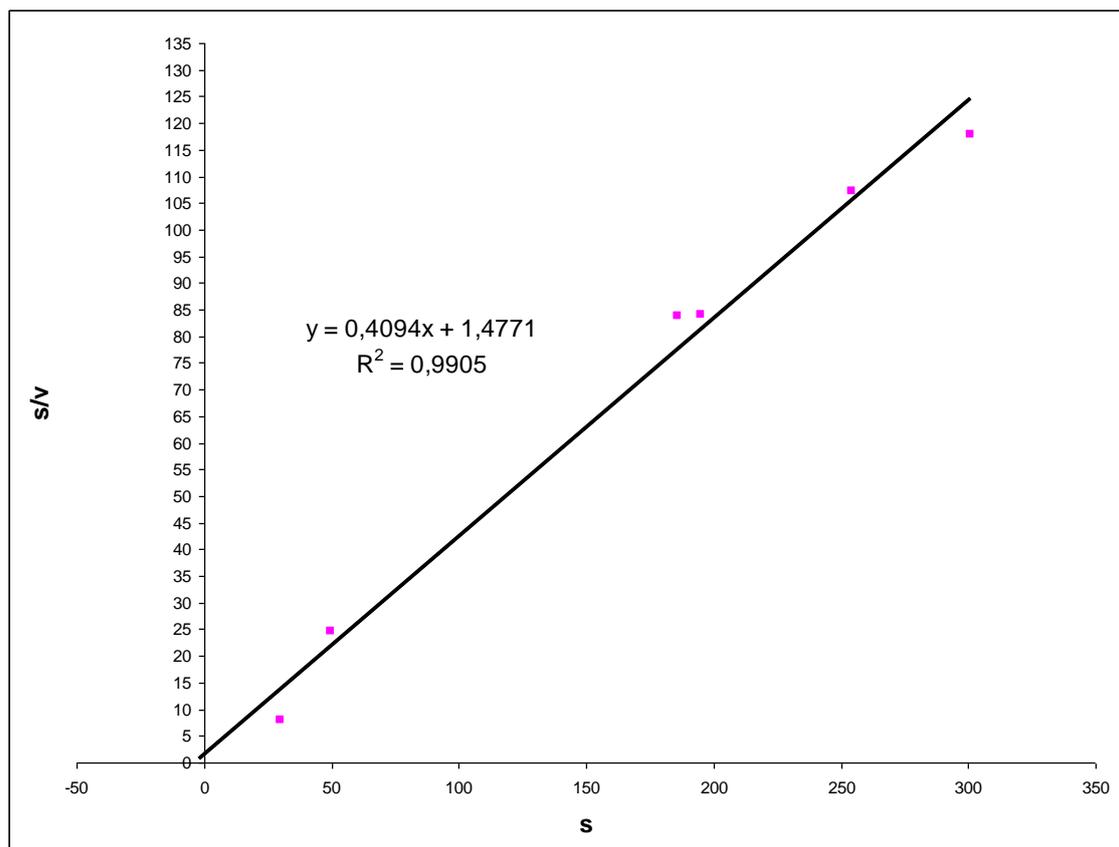


Abbildung 4.4: Bestimmung von v_{\max} und K_m durch Auftragung von $[S]/v$ gegen $[S]$ nach Hanes-Woolf-Darstellung der Michaelis-Menten-Gleichung

Hier ist die Steigung durch $1/v_{\max}$ und der Ordinatenabschnitt durch K_m/v_{\max} gegeben [66]. Aus dem Graph ergibt es sich, dass die maximale Geschwindigkeit

der heterotrophen Denitrifikation von Mikroorganismen *Paracoccus denitrificans* bei $2,44 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}\text{L}^{-1}\text{min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ liegt. Der K_m – Wert beträgt $3,6 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}/\text{L}$ ($58 \mu\text{M}$) und liegt somit unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Analysensystems von $6 \text{ mg}/\text{L}$ [1]. Dies zeigte, dass bei den eingesetzten hohen Substratkonzentrationen K_m gegenüber $[S]$ vernachlässigt werden kann; folglich handelt es sich um eine Reaktion nullter Ordnung [37].

$$v \approx v_{\max} \quad (\text{Gl. 4.2})$$

Eine Literatur [71] beschreibt den K_m - Wert (Nitrat) von *P.denitificans* mit weniger als $5 \mu\text{M}$. In der Enzymdatenbank von Brenda reichen K_m - Werte von $0,013 \text{ mM}$ bis $0,283 \text{ mM}$ bei verschiedenen Elektronendonoren [72]. In dieser Arbeit wurde für den Nitratabbau mittels lebender Zellen von *P. denitrificans* bei einer Salzkonzentration von $35 \text{ g}/\text{L}$ und einer Temperatur von 37°C ein K_m - Wert (Nitrat) von $58 \mu\text{M}$ ermittelt. Der K_m - Wert liegt in der Mitte der Literaturwerte nach Brenda.

4.3.4 Vorversuch einer kontinuierlichen biologischen Denitrifikation für die Kombination aus biologischer und chromatographischer Stufe

Eine Untersuchung zum kontinuierlichen biologischen Nitratabbau wurde im Biostat Q durchgeführt. Zur Abtrennung der Mikroorganismen wurde eine Ray Flow Querstrom Ultrafiltrationseinheit (Crossflow) (Abbildung 4.5) mit einer 200 cm^2 PVDF- Membran und 40 kDa Porendurchmesser eingesetzt.

In der Bioverfahrenstechnik wendet man das Prinzip der Cross-Flow-Filtration (CFF) oder der Querstromfiltration vielseitig an. Durch die Kontrolle der Filtrationswiderstände, welche mittels einer besonderen Strömungsführung erreicht wird, wird es ermöglicht auch Systeme mit hohen spezifischen Kuchenwiderständen oder kompressiblem Verhalten zu filtrieren. Dies tritt bei biotechnologischen Suspensionen des Öfteren auf. Die Charakterisierungen der Querstromfiltration sind wie folgt [73]:

- Abscheidung des Feststoffes an der Oberfläche
- Kein Eindringen des Feststoffes in die Filtermatrix
- Deckschichtbildung statt Kuchenbildung
- Nur Aufkonzentrierung möglich

Der Aufbau des Ray Flow Moduls ist in der Abbildung 4.5 dargestellt. Um die Abbaurrate von Nitrat bei kontinuierlichem Betrieb mit Zellrückhaltung durch das Crossflow Modul zu bestimmen, wurden Nitratmassen von 0,54, 0,58 und 0,75 mg/min pro Gramm Biotrockenmasse zugeführt. Nach dem Start des Crossflow Moduls mit einem Retentatvolumenstrom von 350 L/h wurde das Nitrat mit Hilfe einer Pumpe in den Bioreaktor geleitet und die Permeate wurden in einem Fraktionensammler gesammelt. Der Versuchsaufbau ist in der Abbildung 4.6 dargestellt. Die Versuchslösung enthielt die entsprechende Nitratkonzentration mit Salzkonzentration von 35 g/L und 250 mg/L Acetat. Vor Beginn des Versuches wurde sie auf 37°C temperiert. Die Denitrifikation erfolgte bei einer Temperatur von 37°C, Zugabe von 250 mg/L Acetat als Elektronendonator und pH-Wert von 7,5, welche durch Biostat Q geregelt wird.

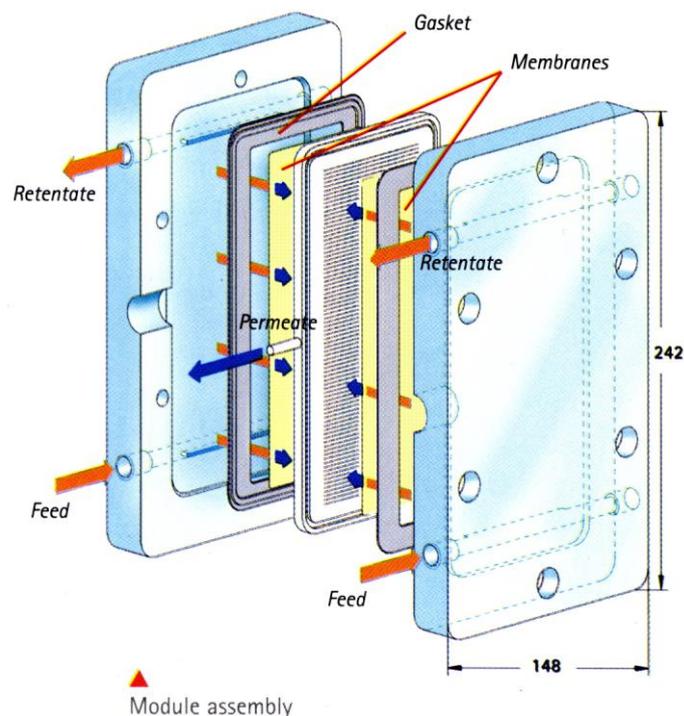


Abbildung 4.5: Aufbau von Ray Flow Modul der Firma Applexion [74]

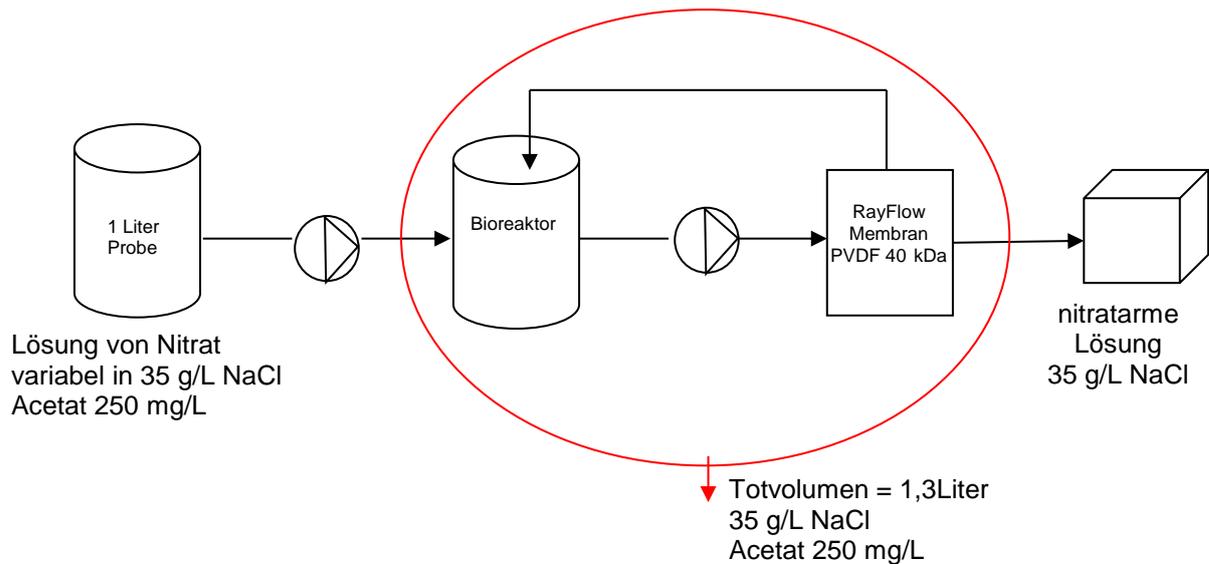


Abbildung 4.6: Versuchsaufbau des kontinuierlichen biologischen Nitratabbaus in Salzkonzentration von 35 g/L, T= 37 °C, pH = 7,5

In Tabelle 4.1 ist das Ergebnis des kontinuierlichen Nitratabbaus mit verschiedenen Nitratmassen dargestellt. Der Versuch 1 zeigt, dass bei kontinuierlicher Zugabe von Nitrat mit einem Massenstrom von $0,54 \text{ mg/min} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}$ im Bioreaktor für 4 h 44 min keinerlei Nitrat detektiert werden kann. Die Abbaurrate von Nitrat bei kontinuierlichen Betrieb liegt bei $0,54 \text{ mg/min} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}$. Im Vergleich zum Batch-Versuch mit einer Abbaurrate von $2,44 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}/\text{min} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}$ ist sie fünffache geringer. Hier könnte durch den Einfluss von Scherkräften im Bereich der Crossflow Membran die Aktivität der Biokatalysatoren (Mikroorganismen, Enzyme) beeinflusst werden.

Dadurch ist es notwendig je nach Auslegung eines Bioreaktors die Abbaugeschwindigkeit zu beachten. Bei der Abtrennung der Zellen durch eine Ray Flow Membran könnten maximal $6,45 \text{ g/L}$ Biotrockenmasse gefiltert werden, da es darüber zu einer Druckdifferenz kommt, die die Apparatur undicht werden lässt.

Tabelle 4.1 Kontinuierlicher Nitratabbau bei verschiedenen Nitratmasse

Versuch	Versuchdauer	Nitrat [$\text{mg/min} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}$]	Nitrit-Test	Nitrat-Test
1	4h 44min	0,54	<0,5 mg/L	<3 mg/L
2	2h 19min	0,58	> 0,5 mg/L	> 3 mg/L
3	2h 28min	0,75	> 0,5 mg/L	> 3 mg/L

Der kontinuierliche Nitratabbau mit Nitratmasse von $0,52 \text{ mg/min} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}$ wurde bei gleichen Bedingungen wiederholt um die Abbaurrate und die Zellaktivität zu prüfen. Der Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentrationen ist in der Abbildung 4.7 dargestellt.

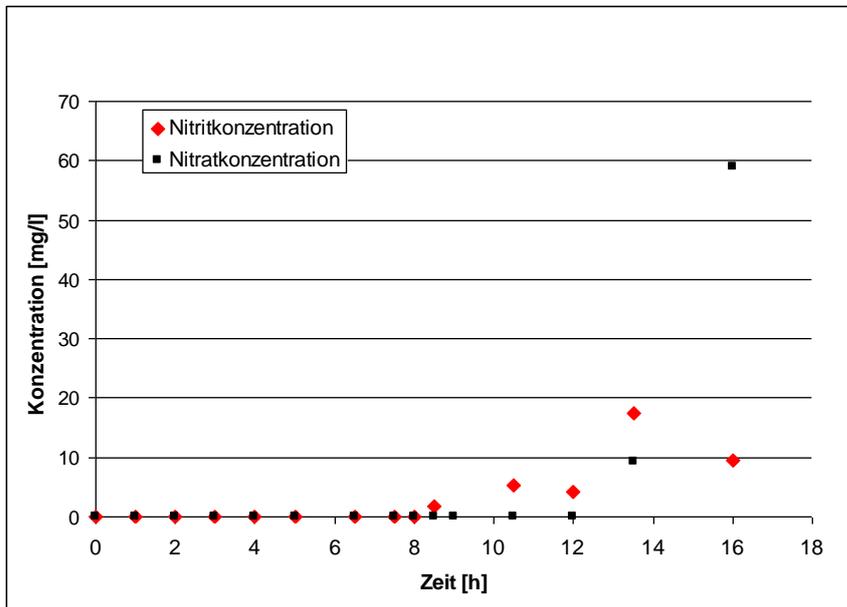


Abbildung 4.7: native Zellen, kontinuierliche Denitrifikation, in Kochsalzlösung (35 g/L NaCl), Ray Flow Membran PVDF 40 kDa ($c(\text{Nitrat}) = 200 \text{ mg/L}$, Flussrate = 10 mL/min), BTM 3,88 g/L, bei einer Temperatur von 37°C , $\text{pH} = 7,5$, $c(\text{Acetat}) = 250 \text{ mg/L}$

Aus Abbildung 4.7 geht hervor, dass der kontinuierliche Nitratabbau mit einer Abbaurrate von etwa $0,54 \text{ mg/min} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}$ bis zu 12 h mit dem zuvor beschriebenen Experiment möglich ist. Dabei wurden 1440 mg Nitrat bei Zugabe von 250 mg Acetat vollständig denitrifiziert. Ein Auftreten von Nitrit nach 10 h bzw. Nitrat nach 13,8 h könnte mit dem mangelnden Acetatgehalt in der Versuchslösung erklärt werden. Im Jahr 2015 haben Liu, C. et al. berichtet, dass bei einer Salzkonzentration von 2 g/L während einer Denitrifikation eine Akkumulation von Nitrit gefunden wurde und dass durch Erhöhung der Acetatkonzentration eine Denitrifikation auch bei hohen Salzkonzentration bis zu 35 g/L erfolgreich durchgeführt werden konnte [75]. Es wurde nur eine geringe Akkumulierung von Nitrit nachgewiesen [75]. Bei der eingesetzten Salzkonzentration ist normalerweise nicht nur eine Hemmung des Zellwachstums (siehe Abbildung 3.7 in Kap. 3.4.5), sondern auch eine Abnahme der Aktivität zu beobachten. In der Literatur wurde eine Abnahme der Abbaurrate von Nitrat bei zunehmender Salzkonzentration beschrieben [1].

Bei hier durchgeführten Experimenten wurde festgestellt, dass kontinuierliche Denitrifikation unter optimalen Bedingungen mit Nitrat-Abbauraten von etwa 0,54 mg/min•gBTM mittels nativen *P. denitrificans* ohne Akkumulierung von Nitrit möglich ist. Um 1440 mg Nitrat vollständig zu denitrifizieren, wurden 250 mg Acetat benötigt. Diese Abbauraten wurden auch für Maßstabübertragung berücksichtigt (s. Kap. 4.4).

4.4 Entwicklungen einer Technikumsanlage für die Kombination aus biologischer und chromatographischer Stufe

Das Ziel dieses Verfahrens ist die vollständige Entfernung von Nitrat aus dem Molkekonzentrat durch dessen Umwandlung in Stickstoff. Das Verfahren besteht aus einer Kombination von chromatographischem Nitratabbau in Molkekonzentrat mittels stark basischer Anionenaustauscherharze und der biologischen Denitrifikation des Eluats aus der chromatographischen Stufe. Bei dem Anionenaustauscherharz XA 455 handelt es sich um einen makroporösen stark basischen Anionenaustauscher mit quartären Ammoniumverbindungen, welches speziell zur selektiven Nitratentfernung aus Trinkwasser entwickelt wurde und in der Lage ist Nitrat vor Sulfaten mit einer höheren Kapazität als konventionelle Austauscherharze zu entfernen [76].

Bei diesem Verfahren ist vorgesehen, das Eluat erneut zur Regeneration des Anionenaustauscherharzes in der chromatographischen Stufe des Prozesses einzusetzen. Der Vorteil eines solchen Verfahrens ist die Vermeidung des direkten Kontaktes zwischen den denitrifizierenden Bakterien und der Molke (Lebensmitteln). In Abbildung 4.8 ist die Kombination aus chromatographischer Nitratentfernung und biologischer Denitrifikation dargestellt.

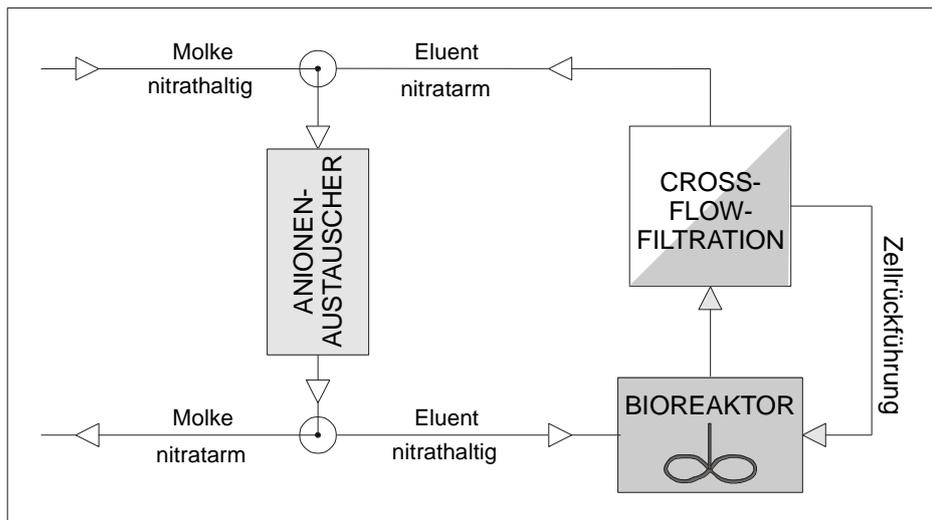


Abbildung 4.8 Schematische Darstellung der Kombination von Anionenaustauscher und Denitrifikation zur Nitratentfernung aus Molke [3]

Die Entwicklung einer Technikumsanlage für die Kombination aus biologischer und chromatographischer Stufe erfolgt zur Maßstabsübertragung für die Denitrifikation. Die Maßstabsübertragung stellt in der Biotechnologie im Vergleich zur chemischen Reaktionstechnik weitgreifende Anforderungen. Diese sind hauptsächlich in der Empfindlichkeit der Biokatalysatoren (Mikroorganismen, Enzyme) im Bezug auf mangelnde Substratversorgung (z.B. Sauerstoff), mechanischer Belastungen und Inhomogenitäten begründet. Die Kriterien aus der chemischen Reaktionstechnik wie Reynoldszahl, Mischzeit, Leistungsdichte, Stofftransportkoeffizienten u.a.m. sind in Bezug auf Biokatalysatoren nur begrenzt anwendbar, da sie eher indirekten Einfluss auf die Biologie haben [77].

In der Literatur wird gezeigt, dass die Kombination der chromatographischen Nitratentfernung aus Molkekonzentrat und der anschließenden mikrobiellen Denitrifikation des nitratbelasteten Eluats im Labormaßstab durchgeführt werden konnte [1]. Dabei müssen die Probleme des Up-Scalings wie ein automatisierbares Verfahren zur Nitratanalytik, Verblocken der Ionenaustauschersäule und eine geeignete Cross-Flow-Filtrationsanlage zur Zellseparation beachtet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit standen die drei folgenden Cross-Flow-Module der Firma Applexion – Orelis (Deutschland) für die Maßstabsübertragung (Up-Scaling) zur Verfügung, welche eine unterschiedliche Membranfläche bzw. Porengröße zur Zellabtrennung aufweisen. Durchmischung im Bioreaktor wird durch eine Pumpe erreicht.

- Ray Flow Modul (siehe Abbildung 4.5)
- Eine keramische 1-kanalige Membran mit einer Fläche von 80 cm² und einem Porendurchmesser von 0,1µm
- Eine 19-kanalige Keramikmembran mit einem Cutt-off von 300 kDa und einer Filtrationsfläche von 800 cm²

4.4.1 Aufbau der Technikumsanlage

Die Entwicklung der Technikumsanlage wurde in Zusammenarbeit mit Nils Tippkötter im Rahmen einer parallel durchgeführten Promotion [5] erreicht. In der Arbeit wurden ein Bioreaktor und eine Anlage mit zwei Anionenaustauscher-Säulen gekoppelt, welche gemäß [5] konstruiert und für einen längeren kontinuierlichen Betrieb programmiert wurde [5]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die benötigten Mikroorganismen zum Nitratabbau in ausreichender Menge hergestellt, und der Bioreaktor damit beschickt, welcher zuvor für beste Zellwachstumsbedingungen und Nitratabbau optimiert wurde (s. Kapitel 3). Ein Komplexmedium zum Erreichen einer hohen Biomasseausbeute ist in Tabelle 3.3 dargestellt. Als optimale Kulturbedingungen eigneten sich eine Temperatur von 37°C und ein pH-Wert von 7,5. Die vollständige Ausführung dieser Kombination wurde bereits in der Arbeit von Tippkötter, insbesondere zur chromatographischen Stufe beschrieben [5]. In dieser Arbeit werden die Durchführung bzw. Ergebnisse des Kombinationverfahrens zusammengefasst, die vor allem im Zusammenhang mit der biologischen Stufe stehen. Im Anschluss wurden die mikrobiologische Stufe und die 160 mL Chromatographiesäulen mit einem 5 L Bioreaktor verbunden. Die Pumpen- und Ventilsteuerung wurde in der nächsten Stufe für Langzeituntersuchungen automatisiert. Die Anlage konnte im Abschluss auf ein Anionenaustauschervolumen von 2.300 mL mit einem Bioreaktor von 28 L skaliert werden. Ein Verfahrensfließbild ist in Abbildung 4.9 dargestellt [5].

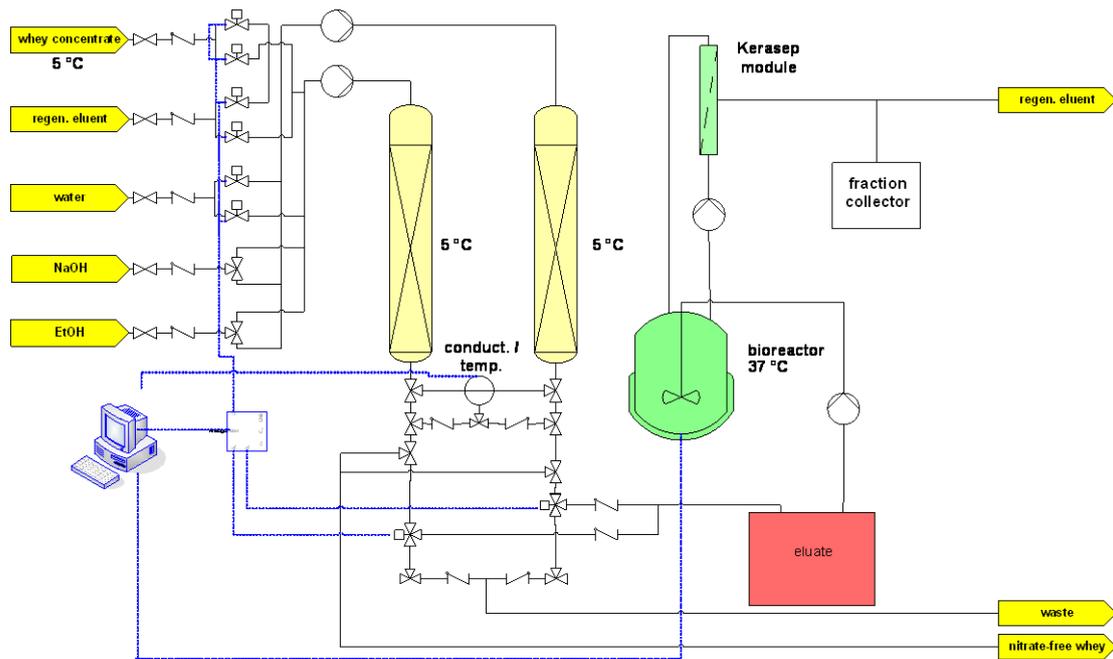


Abbildung 4.9: Ein Verfahrensfliessbild der Anlage im Technikum [5, 78]

In Abbildung 4.9 links wird die chromatographische Stufe gezeigt, die aus zwei Ionentauschersäulen, zwei Pumpen und fünf Vorratsgefäßen die mit Molkekonzentrat, Eluent, Wasser und bei Bedarf Natronlauge und EtOH gefüllt sind, besteht. Zwei Pumpen steuern jeweils eine der Säule an. Durch je 2 2/2-Ventile werden die Vorratsgefäße in die beiden Kreisläufe eingebunden. Eine Durchströmung der beiden Säulen sowohl von oben als auch von unten wird durch entsprechendes Schalten der Ventile geregelt. Über eine Messkammer mit Leitwert- und Temperatursensor kann jeder ausgehende Stoffstrom gesteuert werden. Dadurch, dass sich zwei Säulen in Reihe schalten lassen, kann nach Beladen der einen Säule weiteres nitratthaltiges Waschwasser über die zweite noch regenerierte Säule geleitet werden. Der Abstrom lässt sich wahlweise in einen beheizbaren Sammelbehälter für das Eluat, einen gekühlten Vorratsbehälter für die nitratfreie Molke oder in einen Abflusssammelbehälter leiten. Das nitratthaltige Eluat wird zwischengelagert und bei Bedarf in geeigneter Menge zur Bakteriensuspension gegeben, um eine ständige Versorgung der Zellen mit Nitrat auch während der Regenerationspausen zu gewährleisten. Dadurch dass das Eluat in einen Auffangbehälter gelangt, wird das Konzentrationsmaximum während der Regeneration ausgeglichen (verdünnt), sodass der Bioreaktor kleiner dimensioniert werden kann [5].

In Abbildung 4.9 rechts geht es um die biologische Stufe, die aus zwei wichtigen Teilen wie einem Bioreaktor und einem Cross Flow Modul zur Zellenabtrennung besteht und welche an einen Eluentenauffangbehälter angeschlossen ist. Der Betrieb der Anlage beginnt mit der Beladung der Anionenaustauschersäule durch gekühltes nitrathaltiges Molkekonzentrat. Hiernach wird die nitratbeladene Säule mit Kochsalzlösung einer Konzentration von 35 g/L, die man Eluent nennt, eluiert. Das so gewonnene nitratreiche Eluat wird in den Bioreaktor weitergeleitet, wo Nitrat zu Stickstoff reduziert wird. Das nun nitratarme Eluat wird weiter als Eluent verwendet, um den nitrathaltigen Anionenaustauscher zu eluieren. Diese Kreisläufe laufen kontinuierlich. Um eine ständige Versorgung des Bioreaktors mit Eluat zu gewährleisten, werden zwei Anionenaustauschersäulen eingesetzt, die während des Versuchs automatisch wechselnd schaltbar sind [5].

4.4.1.1 Mini – Pilotanlage

Bei einer kontinuierlichen Denitrifikation über einen langen Zeitraum (Abbildung 4.10) und eine Vielzahl von Regenerationszyklen wurde eine Mini-Pilotanlage der Fa. Novasep verwendet.

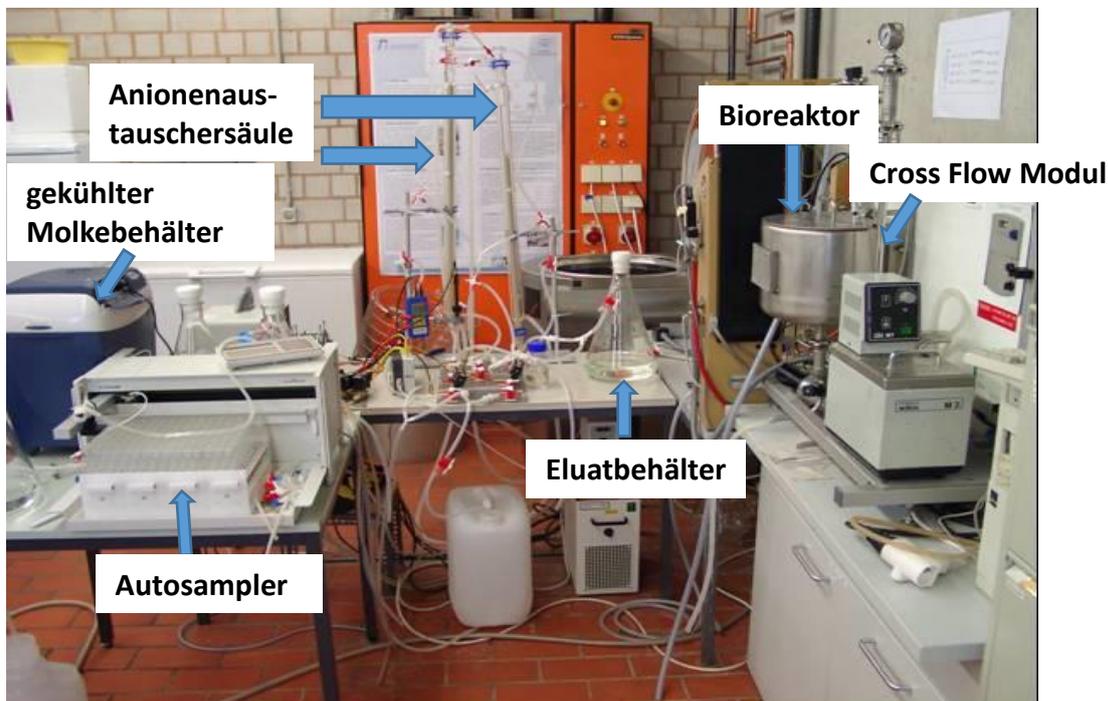


Abbildung 4.10: Anlage für die Kombination der chromatographischen und biologischen Stufe zur Denitrifikation von Molkekonzentrat [5]

Die Anlage bestand aus einem 5 L Vorratsbehälter (Bioreaktor) mit Doppelmantel, der durch einen Thermostat temperierbar war (Abbildung 4.11). Der pH-Wert wurde durch einen Labfors-Fermenter gesteuert. Zur Filtration stand eine einkanalige Keramikmembran mit einer Fläche von 80 cm² zur Verfügung. Die Durchführung erfolgte unter Verwendung von Ionenaustauschersäulen mit einer Harzfällung von 160 mL. Des Weiteren wurde eine chromatographische Stufe mit zwei Säulen und automatisierter Ventil- und Pumpensteuerung betrieben [5].

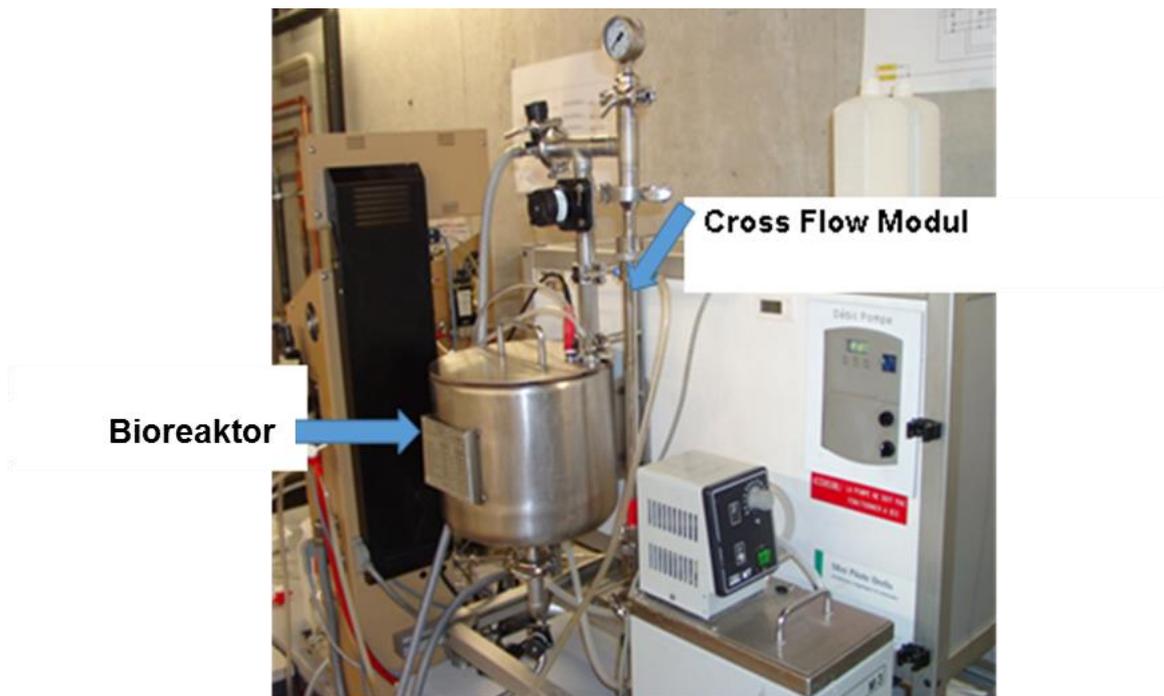


Abbildung 4.11: Mini Pilotanlage der Fa. Novasep für die biologische Denitrifikation mittels *P. denitrificans*

Die Filtrationseigenschaften der Membran in dieser Anlage sind bereits in der Arbeit von Tippkötter [5] vollständig beschrieben worden. Aus Sicherheitsgründen ist eine Reinigung der Membran mit heißer Natronlauge im laufenden Betrieb des gewählten Versuchsaufbaus nicht möglich [5]. Daher wurde untersucht, ob die Membran nach mehreren Tagen Betrieb mit einfacher Wasserspülung zu reinigen ist [5].

Die veränderten Bedingungen für die Mikroorganismen in einem Crossflow-System (wie z.B. Scherstress und örtliche Temperaturerhöhungen), welche in einer temperierten „geschlossen“ CF-Einheit, also unter Rückführung des Filtrats in den Fermenter, nach der Einstellung einer Nitratkonzentration von 35 mg/L in einer Suspension mit 7,7 g_{BTM} *P. denitrificans* bestand [5], führt zu einer geringeren

Abbaurrate im Vergleich zum Batchversuch (s.Kap.4.3.3 und [5]). Durch lineare Regression des Konzentrationsverlaufs (wie in Abbildung 4.12 dargestellt) konnte eine Abbaurrate von $0,54 \text{ mg}_{\text{NO}_3^-}/\text{min} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}$ ermittelt werden [5].

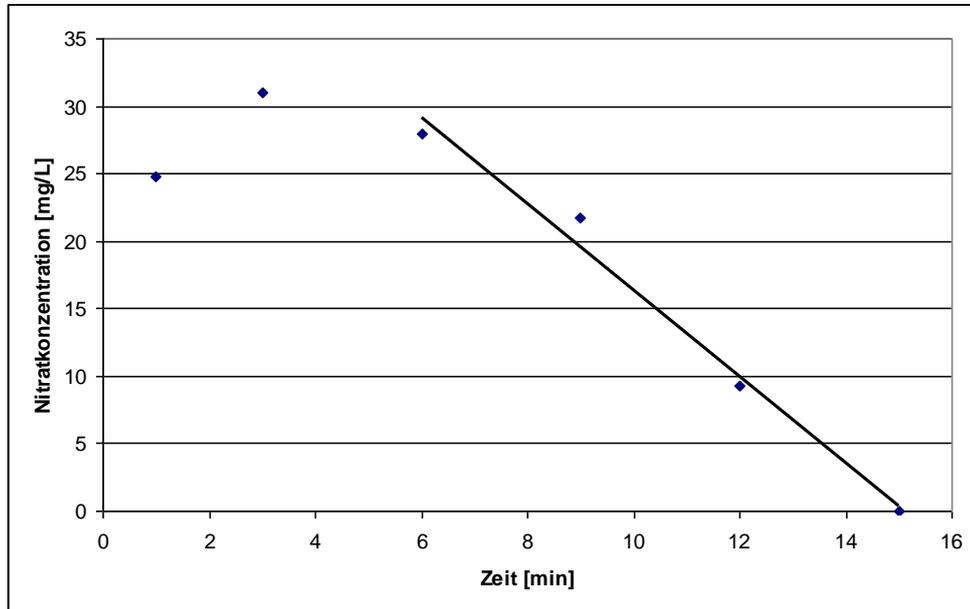


Abbildung 4.12: Nitratabbau in einem geschlossenen CF-System [5]

Aus Abbildung 4.12 geht es um die Entwicklung der Nitratkonzentration im geschlossenen CF-System, in dem Nitrat nach 15 Minuten vollständig abgebaut wurde. Nitrit konnte nicht nachgewiesen werden. Da die Abbaurrate im kontinuierlichen Betrieb im Vergleich zum Batchversuch geringer ausfällt, muss man dies bei der Reaktorauslegung beachten [5].

Für einen längeren kontinuierlichen Betrieb wurde eine Abschätzung der Anlagenauslegung basierend auf den obigen Ergebnissen wie Abbaurrate und Temperatur vorgenommen. Hierfür wurden die beiden Anionenaustauschersäulen auf eine Temperatur von 5°C gekühlt. Ein Volumenstrom aus dem Eluatbehälter in den Reaktor von $9 \text{ mL}/\text{min}$, eine Vorlage von 3.000 mL Eluent und 2.500 mL einer Lösung mit $35 \text{ g}/\text{L}$ NaCl und $60 \text{ mg}/\text{L}$ Nitrat wurden bestimmt, wenn von einer Nitratbeladung der Ionenaustauschersäule von 280 mg ausgegangen wird [5]. Es bleibt zu beachten, dass gekühlte Säulen eine höhere Nitratkapazität als bei RT haben. [5]

Mit diesen Daten wurde eine kontinuierliche Denitrifikation von Molkekonzentrat unter Einsatz der Mikroorganismen vorbereitet. Nach der Zellernte aus 5 L Zellsuspension ($\text{BTM} = 1,54 \text{ g}/\text{L}$) mittels Zentrifugation wurden die Zellen ($7,7 \text{ g}_{\text{BTM}}$) mit 5 L Kochsalzlösung ($35 \text{ g}/\text{L}$) dem Bioreaktor zugesetzt. Des Weiteren wurde die

Acetatkonzentration auf 250 mg/L eingestellt und der Reaktor auf 37°C temperiert. Zur Vermeidung der Störung durch Phosphat bei der chromatographischen Nitrat-abreicherung konnte kein Phosphat-Puffer verwendet werden, um einen pH-Wert von 7,5 einzustellen. Bei dem Versuch erfolgte daher die Kontrolle des pH-Wertes über den Bioreaktor Labfors. Nach Befüllung des Bioreaktors mit der Biomasse (7,7 g_{BTM}) wurde das nitrathaltige Eluat mit einem Volumenstrom von 9 mL/min hineingeleitet. [5]

Eine kontinuierliche Zellabtrennung erfolgte während der Denitrifikation mittels eines Cross-Flow Moduls „keramische einkanalige 0,1 µm-Membran“ der Fa. APPLEXION – ORELIS. Der Filtratvolumenstrom betrug durchschnittlich 12,4 mL/min. Eine Säule wurde mit Molkekonzentrat einer Nitratkonzentration von 56 mg/L mit einem durchschnittlichen Beladungsvolumenstrom von 12,9 mL/min bzw. 4,8 BV/h beladen und es dauerte im Durchschnitt 6,6 h bis zur Aufnahmeerschöpfung [5]. Diese Einstellungen führten zu einem Betrieb der Denitrifikation über einen Zeitraum von 263 h mit insgesamt 38 Beladungs-/Regenerationszyklen [5]. Die Nitrit- und Nitratkonzentration ist in Abbildung 4.13 dargestellt.

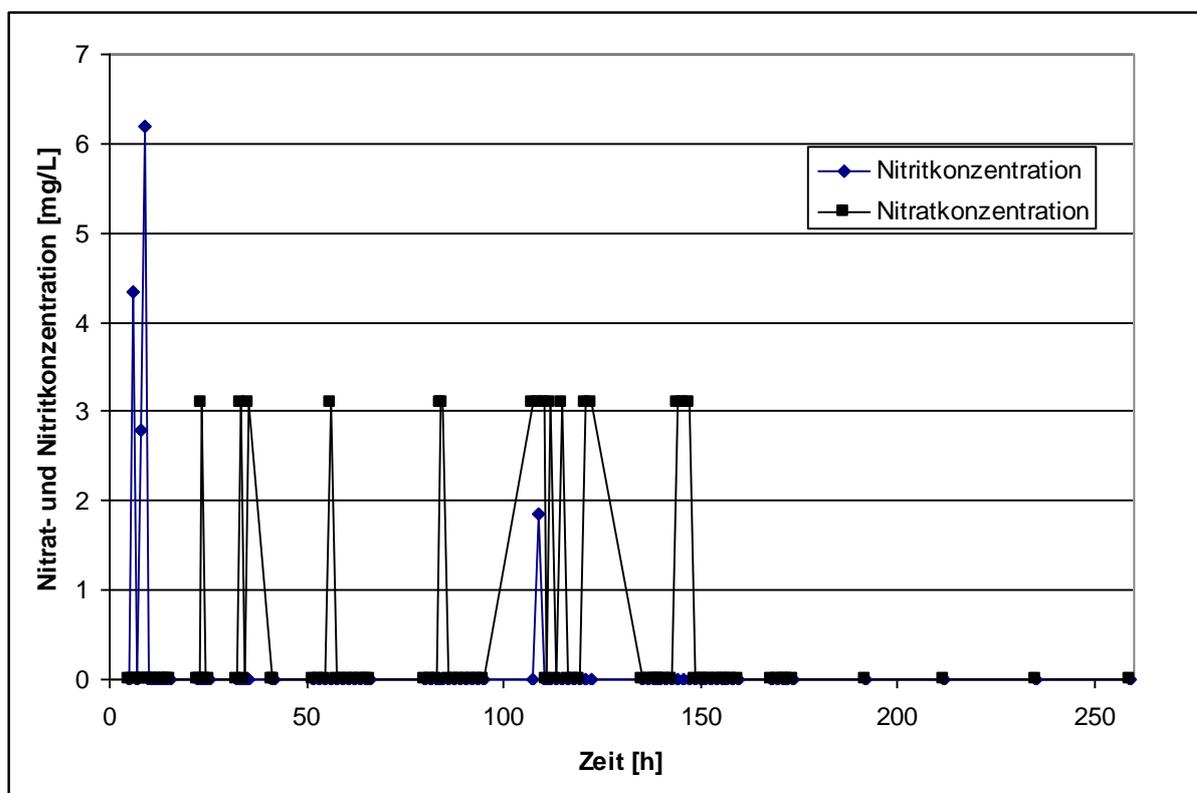


Abbildung 4.13: Verlauf der Nitrit- und Nitratkonzentrationen und des pH-Werts am Reaktorausgang während eines kontinuierlichen Denitrifikationsbetriebs, der über 255 h protokolliert wurde. $T = 36^{\circ}\text{C}$, $V(\text{Reaktor}) = 5 \text{ L}$, $c(\text{BTM}) = 1,5 \text{ g/L}$ [5]

In Abbildung 4.13 ist der Verlauf der Nitrit- und der Nitratkonzentration über den Versuchszeitraum zu erkennen. Wie zu sehen ist, wurden kurz nach dem Beginn des Versuchs keine Konzentrationen von mehr als 3 mg/L nachgewiesen. Hierbei ist zu beachten, dass dieser Wert im unteren Messbereich des Schnelltestverfahrens liegt (zwischen 3-90 mg/L). Dies bedeutet dass Nitrat bzw. Nitrit nicht nachweisbar waren oder fast vollständig durch das Verfahren entfernt wurden. Dadurch konnte man feststellen, dass kontinuierliche Denitrifikation von Molkekonzentrat über fast 11 Tage ohne Austausch der Mikroorganismen mit dem Prozess möglich ist [5]. In diesem Zeitraum ließen sich 190 L nitratfreies Molkekonzentrat gewinnen [5].

4.4.1.2 Kontinuierliche Denitrifikation im Pilotmaßstab

Mit der gesteigerten Kapazität der Anionenaustauscher durch Erhöhung des Harzvolumens auf 2,3 L musste auch die Zellmasse und somit die Cross-Flow Anlage vergrößert werden. Hierzu wurde eine Carbosep Pilotanlage der Fa. Novasep mit einer 19-kanaligen Keramikmembran mit einem Cutt-off von 300 kDa und eine Filtrationsfläche von 800 cm² eingesetzt. Als Bioreaktor wurde ein Technikumsreaktor mit einem Volumen von 190 L verwendet. Zur Denitrifikation wurde der Bioreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 25 L betrieben. Die gesamte Anlage wurde durch die Steuerungssoftware „Nitrikon“, die in LabVIEW entwickelt wurde, überwacht und die Daten protokolliert (bereitgestellt und kontrolliert von Nils Tippkötter, TU Kaiserslautern) [5].

Während des ungekühlten Betriebs mit 25 L Zellsuspension wurde eine Temperatur mit einem Grenzwert von 45°C erreicht, welcher für mikrobiologische Anwendungen zu hoch liegt [5]. Da die Anlage über einen wasserdurchströmten Wärmetauscher gekühlt werden konnte, wird sie daher mit Kühlwasser einer Temperatur von 16-17°C bei einem Volumenstrom von 175 L/h gekühlt, um eine Betriebstemperatur von 31,5-37,5°C im Reaktor zu gewährleisten [5]. In Abbildung 4.14 sind eine Carbosep Pilotanlage (links), 190 L Gefäß als Bioreaktor (Mitte) und Membranstab BW 300 kDa (rechts) dargestellt.



Abbildung 4.14: biologische Denitrifikation Anlage (links) [4], 190 L Gefäß als Bioreaktor (Mitte), Keramik Membran (rechts) [74]

Ohne Reinigung der Membran in der Filtrationsanlage war ein Betrieb der Crossflow Pilotanlage über einen Zeitraum von 229 h bei einem Volumenstrom von durchschnittlich 31,3 L/h unter Verwendung nur einer der zur Verfügung stehenden Pumpen möglich. [5]

Für eine kontinuierliche Regeneration der Austauschersäulen wurde ein Filtratvolumenstrom von ca. 16 L/h durch Einstellung des Transmembrandrucks auf 1,0 bar erreicht, um einen gleich bleibenden Füllstand des Reaktors zu erhalten. Die Drücke am Säulenein- und -ausgang wurden über den betrachteten Zeitraum kaum verändert. Der Eingangsdruck beträgt $4,1 \pm 0,1$ bar und der Ausgangsdruck $0,9 \pm 0,1$ bar. Der Volumenstrom des Filtrats lag im Durchschnitt bei $16,6 \pm 2,4$ L / h. [5]

Für den Pilotversuch zum kontinuierlichen Betrieb der Anlage wurde *P. denitrificans* unter sterilen Bedingungen fermentiert. Allerdings konnte die Zellsuspension nur mit Hilfe des CF-Systems unter unsterilen Bedingungen geerntet werden, da keine Zentrifuge zur Verfügung stand, welche für die Menge der Mikroorganismen von 28 L (BTM = 2,9 g/L) geeignet war. Die 28 L Zellsuspension wurden mit Leitungswasser langsam verdünnt und gleichzeitig mit dem Cross Flow Modul filtriert. Um zu erkennen, wie lange filtriert werden muss, wurde die Leitfähigkeit bestimmt. Die Leitfähigkeit der Zellsuspension liegt typischerweise bei ca. $200 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ und die einer Natriumchloridlösung von 35 g/L bei etwa $55 \text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Nachdem die typische

Leitfähigkeit der Zellsuspension erreicht war, wurde Kochsalzlösung bis zu deren entsprechenden Leitfähigkeit langsam zugegeben. [5]

Als Elektronendonator wurde eine Acetatlösung mit einer Konzentration von 250 mg/L vor Beginn der Denitrifikation zugegeben und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Die kontinuierliche Denitrifikation verlief über einen Zeitraum von 75 h mit 16 Beladungs-/Regenerationszyklen. Dies führte zu einer Umwandlung von ca. 92 g Kaliumnitrat in Stickstoff durch die Mikroorganismen [5]. Der Konzentrationsverlauf von Nitrit und Nitrat am Rektorausgang der CF-Anlage ist in Abbildung 4.15 dargestellt.

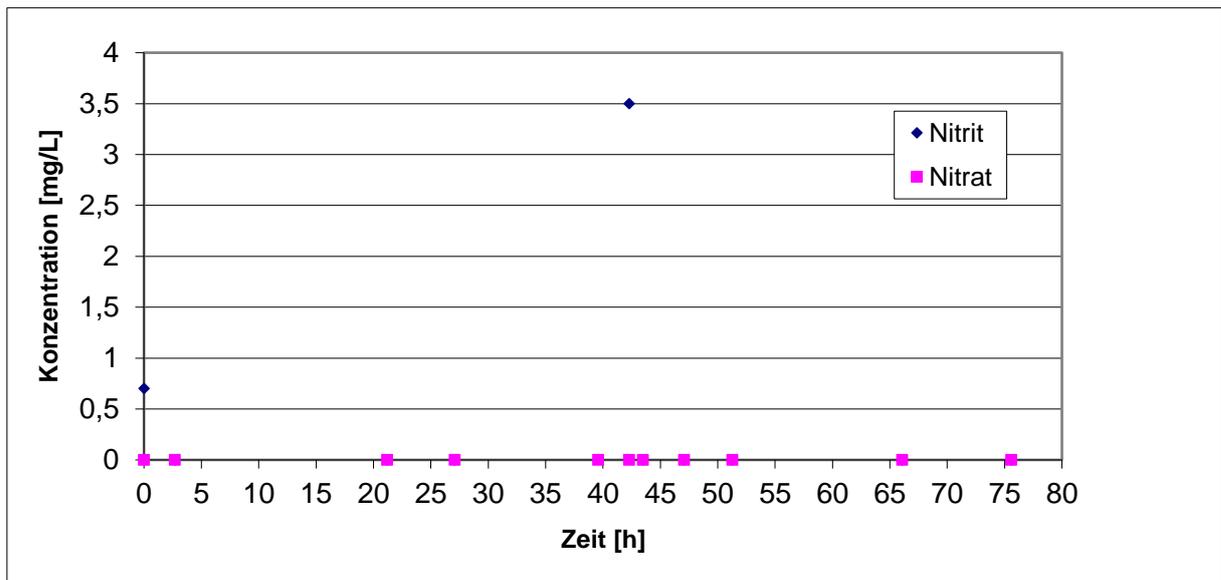


Abbildung 4.15: Verlauf von Nitrit- und Nitratkonzentrationen am Rektorausgang der Pilotanlage.

In Abbildung 4.15 ist zu erkennen, dass die Konzentrationen an Nitrit und Nitrat fast die gesamte Zeit bei 0 mg/L lagen. Ein geringer Anstieg der Nitritkonzentration konnte nur bei 42 h detektiert werden.

Aus Sicherheitsgründen wurde die Chromatographieanlage anfangs über Nacht ausgeschaltet. Ohne Zufuhr von Nitrat aus dem chromatographischen Teil in den Bioreaktor während der Betriebspause können die Zellen trotz lang andauernden Nitratmangels ihre Aktivität erhalten. Die Biotrockenmasse nahm im Laufe des Versuchs von 81,5 g auf 95,7 g (Erhöhung um 17,4%) zu [5].

Schwankungen der Kühlwassertemperatur führten auch zu Schwankungen der Temperatur im Reaktor [5]. Eine Überschreitung der optimalen Temperatur von 37°C kann die Zellkultur schädigen. Daher wurde das System auf eine etwas niedrigere

Temperatur von durchschnittlich 31,3°C eingestellt [5]. Bei dieser Temperatur war der Nitratabbau, wie in der obigen Abbildung zu erkennen ist, in ausreichender Geschwindigkeit möglich.

4.4.1.3 Vitalität der Zellen während der Denitrifikation im Pilotmaßstab

Im Laufe des Versuchs wurde die Nitratabbaurrate der Mikroorganismen, welche bereits 4 Tage unverändert in dem Bioreaktor verwendet wurden, in einem bereits zuvor beschriebenen „geschlossenen“ CF-Kreislauf ohne Verbindung mit der Anlage untersucht. Hierzu wurden 4 g/L Nitrat in den Reaktor gegeben und die Nitratkonzentration alle 10-20 Minuten bestimmt [5]. Der Verlauf des Abbaus ist in Abbildung 4.16 dargestellt.

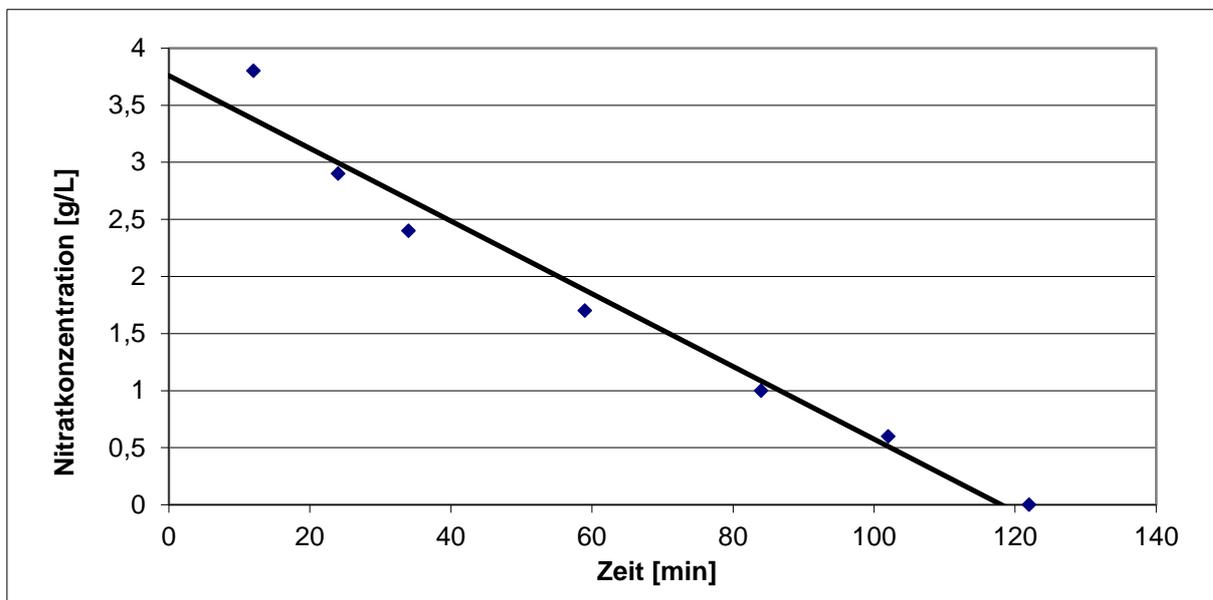


Abbildung 4.16: Verlauf des Nitratabbaus im Reaktor der Pilotanlage. Nitratkonzentration 4 g/L, T = 31°C [5]

Die Abbildung zeigt, dass die im Reaktor enthaltene Nitratmenge nach einer drei minütigen Durchmischungszeit innerhalb von 120 Minuten auf 0 g/L fällt [5]. Der Abbau verläuft näherungsweise linear, so dass eine Regression durchgeführt wurde. Die Steigung der Geraden ergab eine durchschnittliche Abbaurrate von 27,6 mg_{Nitrat}/min für den gesamten Reaktor mit einem Füllvolumen von ca. 24 Litern [5]. Bei einer eingesetzten Zellmasse von 81,5 g_{BTM} würde dies einer Abbaurrate von 0,34 mg/min·g_{BTM} entsprechen [5]. Dieser Wert liegt unter der zuvor bestimmten

Abbaurrate von 0,54 mg/min·g_{BTM} (s. Kap. 4.3.4). Es bleibt zu beachten, dass der Abbau bei der geringeren Temperatur von 31,3°C durchgeführt wurde [5].

Mit der Arrheniusbeziehung (Gl. 4.3) können temperaturabhängige Reaktion beschrieben werden. Durch die Auftragung von ln k gegen 1/T wird die Aktivierungsenergie bestimmt. Sie wird aus der Steigung der resultierenden Geraden des Arrhenius-Diagramms ermittelt. Hier wird für k in der Praxis v_{max} verwendet [36]. Die Änderung der Nitratbaaurate von 0,54 mg/min·g_{BTM} auf 0,34 mg/min·g_{BTM} bei einer Temperaturänderung von 37°C auf 31,5°C ergibt die Aktivierungsenergie (E_a) von 66 kJ mol⁻¹.

Reaktionsgleichung [36]:

$$\ln k = \ln b - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad \text{Gl. 4.3}$$

4.4.2 Einfluss der Mikrobiologie auf die Anlagenkomponenten

Zur Untersuchung von Mikroorganismen aus Molke hinsichtlich des Eintrags in die biologische Stufe wurden Kugeln des Austauscherharzes und die entnommenen Proben während dem laufenden Betrieb der Anlage überprüft. Diese Untersuchung erfolgte über die Bestimmung von koloniebildenden Einheiten (KBE) [2].

Zur Bestimmung der Mikroorganismen wurden 5 Kugeln des Austauscherharzes jeweils vor dem Abreicherungsschritt, nach dem Abreicherungsschritt und nach Reinigung in 1 mL sterilen dest. Wasser suspendiert [2]. Danach wurde die Anzahl der KBE bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 gezeigt.

Tabelle 4.2: Ergebnisse der KBE-Bestimmung der flüssigen Harzkugelsuspensionen zur Untersuchung der Reinigungsmittel 20 % Ethanol, 0,5 M Natronlauge, 0,5 M Salzsäure und 1 M Salzsäure bei verschiedenen Standzeiten der Austauschersäule, KBE: Koloniebildenden Einheiten, K: Kugel des Austauscherharzes [2]

	KBE/K (EtOH 20%)	KBE/K (NaOH 0,5 M)	KBE/K (HCl 0,5 M)	KBE/K (HCl 1 M)
unbehandeltes Harz	1	4	3	1
Harz nach 2 Beladungszyklen	19	44	403	13
Harz nach Reinigung	0	0	3	0
Standzeit [h]	16	59	17	17,5

Die koloniebildenden Einheiten (KBE) der in der Industrie zur Weiterverarbeitung angelieferten Molke betragen zwischen 8.000 und 36.000 KBE/mL Molke [2]. Allerdings wird nur Molke mit einer KBE unter 30.000 weiterverarbeitet [2, 79]. Aus Tabelle 4.2 geht hervor, dass sich in dem unbehandelten Harz zwischen 1 - 4 KBE pro Harzkugel befinden. Die KBE-Bestimmung wurde nach dem 2. Beladungszyklus durchgeführt. Es wurde ein Anstieg der KBE-Anzahl festgestellt. Zur erfolgreichen Entfernung der Mikroorganismen auf den Harz wurden verschiedene Lösungen wie 20 % Ethanol, 0,5 M NaOH und 1 M HCl verwendet. Aus Kostengründen erscheint am günstigsten der Ersatz von 0,5 M NaOH zur Reinigung des Harzes.

4.5 Reaktorauslegung einer biologischen Stufe im Technikumsmaßstab

Gemäß [5] wurde die Bestimmung der minimalen Reaktorauslegung aus dem Nitratmassenstrom wie in Gl. 4.4 verwendet [5].

$$V = \frac{\dot{V} \cdot c_0 \cdot U}{\nu} = \frac{\dot{m} \cdot U}{\nu} \quad (\text{Gl. 4.4})$$

\dot{V} = Volumenstrom durch den Reaktor in L/min

\dot{m} = pro Zeiteinheit eingeleitete Nitratmenge in mg/min

Als Umsatz U wird ein Wert von 0,99 eingesetzt. Somit würde die Reaktorauslegung für den Abbau von $15,6 \text{ mg}_{\text{Nitrat}} \cdot \text{min}^{-1}$ auf $0,2 \text{ mg}_{\text{Nitrat}} \cdot \text{min}^{-1}$ ausreichend sein [5].

Diese lässt sich durch die Gleichung 4.4 bestimmen. Hierbei ist V das erforderliche Reaktorvolumen, c_0 die Ausgangskonzentration von Nitrat, U der gewünschte Umsatz, ν die Abbaurate für Nitrat und \dot{m} der Nitratmassenstrom.

Eine Abschätzung der notwendigen Anlagenauslegung und Verbrauchswerte wurde bereits in der Arbeit von Tippkötter vollständig beschrieben [5]. Dafür wurde ein Modell in der Prozessplanungssoftware Intelligen SuperPro Designer entworfen. Mit dem Programmpaket der Fa. Intelligen kann man sowohl Auslegungs-, als auch Ökobilanzierungsrechnungen durchführen und dies Programm wird im Bereich der Pharmakologie und Biotechnologie auf die Modellierung von Prozessen angewendet [5]. Aus dem Anwenden der Software auf die hier zu Grunde liegende Problemstellung

resultierte ein benötigter Bioreaktor von ca. 4 m³ und zwei Chromatographiesäulen mit je 0,35 m³ um 100 t nitrathaltiges Molkekonzentrat zu denitrifizieren [5].

4.6 Zusammenfassung

In diesem Kapitel werden die optimalen Bedingungen einer heterotrophen Denitrifikation, sowie die Möglichkeit einer kontinuierlichen Denitrifikation mit Hilfe eines Cross Flow Moduls zum Zellrückfluss und die Entwicklung einer Technikumsanlage für die Kombination aus biologischer und chromatographischer Stufe vorgestellt.

Henze, M. et al. haben berichtet [80], dass verschiedene Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Substrat-Zusammensetzung, und Sauerstoff Einfluss auf die Denitrifikation haben. In dieser Arbeit zeigte sich, dass die optimale Temperatur bei 37°C und der optimale pH-Wert bei 7,5 liegen. Als Elektronendonator wird die Zugabe von 250 mg/L Acetat benötigt. Eine Erhöhung der Biomasseausbeute, welche das benötigte Enzymsystem zur Denitrifikation enthält, erfolgte im Komplexmedium (in Tabelle 3.3). Die Bedingungen zur Kultivierung darin sind in Kapitel 3.5 beschrieben.

Die Denitrifikation mittels nativer Zellen von *Paracoccus denitrificans* wurde im Batchversuch bzw. kontinuierlichen Betrieb durchgeführt. Es zeigte sich, dass der Abbau des Nitrats im Batchversuch bei Nitratkonzentrationen bis zu 300 mg/L linear verläuft und die Änderung der Nitratkonzentration mit der Zeit sich wie in Gl. 4.1 beschrieben verhält. Mittels Hanes-Woolf-Darstellung ergibt die maximale Geschwindigkeit der Denitrifikation 2,44 mg_{Nitrat}/min·g_{BTM} und der K_m-Wert 3,6 mg_{Nitrat}/L (58 µM). Im kontinuierlichen Denitrifikationsbetrieb mit einem Crossflow Modul resultiert eine Abbaurate von 0,54 mg_{Nitrat}/min·g_{BTM}. Hier zeigt sich eine geringere Abbaurate im Vergleich zu der Abbaurate im Batchversuch. Dies ist wahrscheinlich dem Aktivitätsverlust der Zellen durch Scher- und Auftriebskräfte an der Membranoberfläche zuzuschreiben.

In Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass die biologische Denitrifikation mittels nativer Zellen von *P. denitrificans* im kontinuierlichen Betrieb mit Hilfe des Crossflow Moduls möglich ist. Zur Entwicklung der Technikumsanlage standen drei Crossflow Module

der Firma Applexion zur Verfügung. Die Konstruktions- und Leistungsdaten für die Entwicklung dieser Technikumsanlage sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

Tabelle 4.3: Konstruktions- und Leistungsdaten zur Entwicklung der Technikumsanlage

	Vorversuch im Biostat Q	Mini Pilot	Pilot
	Experiment	Experiment	Experiment
V (Reaktor)	1,3 L	5 L	25 L
m (Zellen)	3,1 g	7,7 g	81 g
Temperatur [°C]	37 °C	37 °C	31,5 °C
Cross Flow Modul	Ray Flow (Membranfilter)	1 Kanäle (Keramikmembran)	19 Kanäle (Keramikmembran)
Filterfläche [cm ²]	200	80	800
Zufluss = Filtratvolumen	10 mL/min	9 mL/min	16,6±2,4 L /h
entferntes Nitrat [g]	1,440	8,521	56,48
Versuchsdauer [h]	12	263	75

Tabelle 4.3 zeigt, dass beim Vorversuch im Biostat Q mit Ray Flow Modul mit der optimalen Temperatur von 37°C eine Nitratmenge von 1,440 g entfernt wurde. Der Vorversuch wurde nur für 12 h aufgrund des Membranfoulings der Filteranlage (des Ray Flow Moduls) (Abbildung 4.5) durchgeführt. Daher wurde bei Vergrößerung des Arbeitsvolumens der Mini Pilotanlage auf 5 L mit einer keramischen einkanaligen Membran gearbeitet. Der Versuch lief für 263 h bei einer Temperatur von 37°C wobei 8,521 g Nitrat entfernt wurden. In der letzten Stufe der Entwicklung der Anlage wurde eine 19-kanalige Keramikmembran mit einem Cut-off von 300 kDa und einer Filtrationsfläche von 800 cm² eingesetzt. Bei einem Arbeitsvolumen von 25 L mit einem Biotrockenmassegehalt von 81 g und einer Temperatur von 31,5°C wurde 56,48 g Nitrat in 75 h abgebaut. Hierbei ergibt sich, dass durch eine Vergrößerung des Arbeitsvolumens des Bioreaktors um das Fünffache, die sechsfache Menge an Nitrat abgebaut werden kann. Aufgrund der geringeren Temperatur (31,5°C statt den optimalen 37°C) während der biologischen Denitrifikation in hoher Kochsalzkonzentration (35 g/L) lag die Abbaurate von 0,34 mg/min·g_{BTM} in der Pilotanlage niedriger als die Abbaurate von 0,54 mg/min·g_{BTM} im Vorversuch und in der Mini Pilotanlage.

Daher ist es notwendig, die optimale Temperatur von 37°C für die biologische Denitrifikation einzuhalten.

Während der Durchführung in der Pilotanlage mit einem Arbeitsvolumen von 25 L wurden die Vitalität der Zellen, die Menge der Proteine im Eluent, die Änderung der Gesamtkeimzahl im Molkekonzentrat und Einfluss der Mikrobiologie auf die Anlagenkomponenten untersucht. Die Vitalität der Mikroorganismen wurde nach vier Tagen in einem „geschlossenen“ CF-Kreislauf durch die Nitrat-Abbaurrate ermittelt [5]. Eine Abbaurrate von 0,34 mg/min·g_{BTM} bei einer Temperatur von 31,5°C wurde festgestellt. Die Verringerung der Nitrat-Abbaurrate von 0,54 mg/min·g_{BTM} auf 0,34 mg/min·g_{BTM} lässt sich durch die kühlere Temperatur von 31,5°C (statt 37°C) erklären [5]. Nach der Arrheniusgleichung ergibt sich damit eine Aktivierungsenergie (E_a) von 66 kJ/mol. Eine steigende Biomassekonzentration wurde bei diesem Versuch nachgewiesen, dadurch lässt sich eine geringere Nitrat-Abbaurrate durch eine Verringerung der Biomassekonzentration nicht begründen. Eine zunehmende Belastung durch Mikroorganismen in Molke bzw. Eluent während des Versuchs ist möglich. Zur Vermeidung dieser Belastung ist es notwendig, den Versuch unter sterilen Arbeitsbedingungen durchzuführen. Die Reinigung des Harzes durch Lösungsmittel ist auch möglich.

5 Biologische Denitrifikation mit immobilisierten Zellen

Eine Anwendung von immobilisierten Zellen für ein Kombinationsverfahren aus chromatographischer Nitratentfernung und mikrobieller Denitrifikation für nitratbelastetes Eluat ist seit den neunziger Jahren bekannt [81, 82, 83]. Zudem wurde die biologische Denitrifikation im Biofilm bei Temperaturen von 3 – 20 °C beschrieben [84].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Einsatz immobilisierter Zellen von *P. denitrificans* zur Denitrifikation eines nitratreichen Eluats untersucht bzw. das Immobilisat direkt im Molkekonzentrat verwendet. Für eine direkte Anwendung der Immobilisate zur Nitratentfernung im Molkekonzentrat ist es notwendig, eine Änderung der wertschöpfenden Inhaltsstoffe des Molkekonzentrats zu untersuchen, also z.B. Molkeproteine und Lactose. Das Verfahren einer Immobilisierung der Zellen ist im folgenden Kapitel beschrieben.

5.1 Immobilisierung der Zellen in LentiKats®

Mit Hilfe des LentiKat-Systems der Fa. geniaLab GmbH wurde die Immobilisierung der Mikroorganismen realisiert. Mit dem Verfahren wurden die Zellen von *P. denitrificans* in linsenförmige Perlen aus Polyvinylalkohol, sogenannten LentiKats®, eingeschlossen [85]. Hierzu wurde die Suspension der gewaschenen Zellen von *P. denitrificans* mit dem zuvor geschmolzenen Polyvinylalkohol (LentiKats® Liquid) im Verhältnis eins zu vier gemischt. Anschließend wurde diese homogene Zellenmischung mit Hilfe eines LentiKats®-Printers auf Petrischalen aufgetropft [46]. Die Petrischalen wurden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Durch den Verlust von Wasser entstehen die Immobilisate, welche flache Linsen von ca. 3 mm Durchmesser sind. Die LentiKats® Stabilizer-Lösung wurde zur Entfernung von Immobilisaten aus den Petrischalen, nachdem deren Feuchte auf 25% abgesunken war, verwendet. Um die fertigen Immobilisate zu stabilisieren, wurden sie nach Ablösen noch 2 h bei Raumtemperatur in der Stabilizer-Lösung gerührt und in 0,9%iger Kochsalz-Lösung, die mittels Phosphatpuffer (9 g/L Kochsalz, 0,28 g/L Kaliumdihydrogenphosphat und 1,46 g / L Dinatriumhydrogenphosphat) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt wurde, bei 4°C gelagert [2]. Abbildung 5.1 zeigt die vom LentiKats®-Printer auf eine Petrischale

getropften und danach getrockneten LentiKats[®] und fertige LentiKats[®] mit immobilisierten Mikroorganismen.

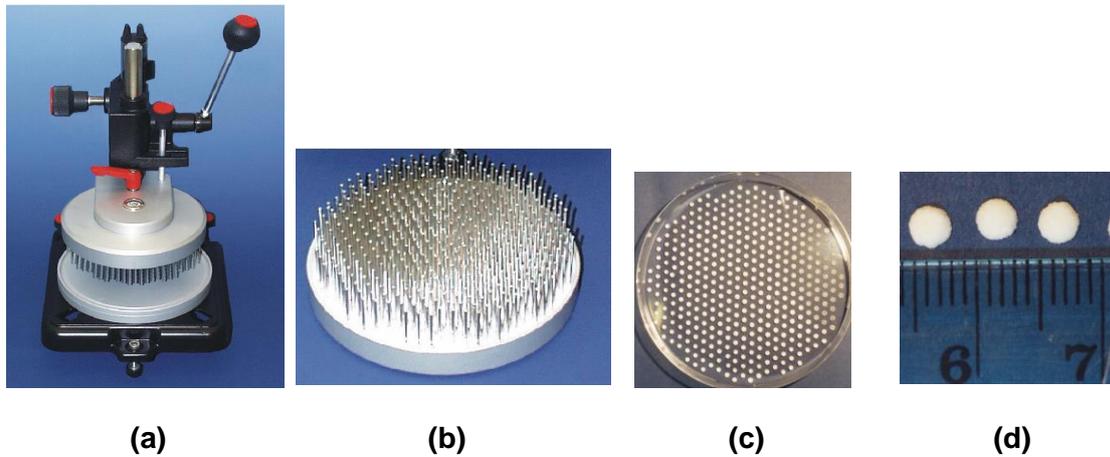


Abbildung 5.1: LentiKats[®]-Printer (a), Auftropfeinheit mit etwa 400 massiven Stahlstiften (b), getrocknete LentiKats[®] auf einer Petrischale (c), LentiKats[®] mit einem Durchmesser von 3 mm [47]

5.2 Einfache Untersuchungen zur Stoffdiffusion für Nitrat

Untersuchungen zur Diffusion niedermolekularer Substanzen in PVA-Hydrogelen wurden beispielweise bei Wittlich und Remmers durchgeführt [42, 63]. 10 g LentiKats[®] ohne Zellen wurden zu 30 mL Nitratlösung, die 35 g/L Kochsalz und Phosphatpuffer pH = 7,5 enthält, gegeben und bei einer Rührgeschwindigkeit von 500 min⁻¹ gerührt. Die Untersuchungen wurden bei Temperaturen von 30°C und 37°C durchgeführt, um den Temperatureinfluss auf den Denitrifikationsprozess zu untersuchen. Die Herstellung von LentiKats[®] ohne Zellen erfolgte analog Kap. 5.1, wobei keine Zellsuspension mit der Polymerlösung gemischt wird. Abbildung 5.2 zeigt den Verlauf der Nitratkonzentration im Überstand bei Temperaturen von 30°C und 37°C.

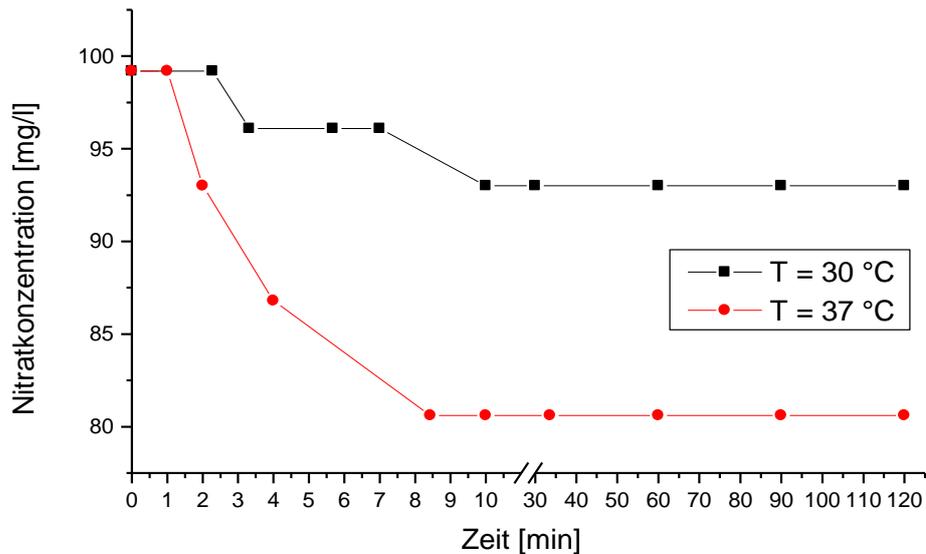


Abbildung 5.2: Zeitlicher Verlauf der Eindiffusion von Nitrat in LentiKats® bei Temperaturen von 30°C und 37°C

Es zeigt sich, dass die Nitratkonzentration im Überstand in den beiden Versuchen sinkt und dass nach 8 bis 10 Minuten die Konzentration stabil bleibt, bis zu 120 min nach der Beginn der Versuche. Allerdings ist die Nitratkonzentration im Überstand bei 30°C höher als bei 37°C, d.h. die Aufnahme von Nitrat in die Immobilisationsmatrix bei Temperatur von 37°C ist größer als bei einer geringeren Temperatur von 30°C. Dieses ist möglicherweise auf eine Vergrößerung der Poren der Immobilisationsmatrix durch erhöhte Temperatur zurückzuführen.

5.3 Einfache Untersuchungen der Durchlässigkeit der zellfreien Immobilisationsmatrix im Bezug auf Molkeproteine

Um die Durchlässigkeit der Immobilisationsmatrix zu untersuchen, wurden Proteine mit unterschiedlicher Größe in LentiKats® immobilisiert. Als Referenz wurden LentiKat-Linsen ohne Protein hergestellt. Diese Proben wurden mittels Coomassie-Färbung mit folgenden Arbeitsschritten, wie in Tabelle 5.1 dargestellt, untersucht. Die Färbung mit dem Coomassie-Reagenz ist eine weit verbreitete Methode, um Proteine sichtbar zu machen. Die Zusammensetzung der Lösung für die Coomassie-Färbung ist in Anhang 8.3 dargestellt. Die Aufnahmen der Immobilisate wurden mittels einem Stereomikroskop SV8 von der Firma Zeiss am Lehrstuhl für Konstruktion im Maschinen- und

Apparatebau an der TU Kaiserslautern angefertigt. Abbildung 5.3 zeigt eine LentiKat®-Linse ohne Protein als Negativ-Kontrolle, es konnte keine Blaufärbung nach der Durchführung des Verfahrens beobachtet werden. Fotos von Linsen mit immobilisiertem Molkekonzentrat und Molkeprotein nach der Coomassie-Färbung sind in der Abbildung 5.4 dargestellt.

Tabelle 5.1: Arbeitsschritte für Coomassie- Färbung [86]

Schritt	Lösung	Zeit [min]	Temperatur [°C]
1	Färbelösung	8	50
2	Waschlösung	8	50
3	Waschlösung	15	50
4	Waschlösung	30	50
5	Fixierlösung	5	50



Abbildung 5.3: LentiKat® ohne Protein (Negativprobe) [86]

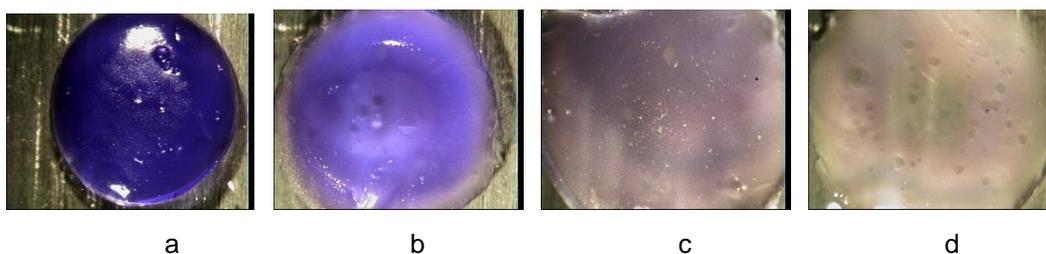


Abbildung 5.4: immobilisierte Molke und Molkeproteine a) Molke b) BSA c) β -Lactoglobulin (LG) d) α -Lactalbumin (LA) [86] nach Färbung mit dem Coomassie-Reagenz [86]

In der Abbildung 5.4 ist zu sehen, dass die LentiKats® mit dem immobilisierten Molkekonzentrat bzw. der Molkeproteine (β -Lactoglobulin (LG), α -Lactalbumin (LA) und BSA) blau gefärbt sind. Allerdings zeigen die immobilisierten Molkeproteine wie LA und LG eine viel geringere Färbung auf als BSA. Dies ist wahrscheinlich auf die hohe Molmasse von BSA (66 kDa) zurückzuführen. Dadurch lässt die

Immobilisationsmatrix Molkeproteine wie BSA nicht durch. Somit wird BSA, im Gegensatz zu α -Lactalbumin (14 kDa) und β -Lactoglobulin (18 kDa), bei der Reinigung nicht aus der Immobilisationsmatrix ausgewaschen. Eine Verringerung des Molkeproteins durch Denitrifikation mittels immobilisierten Zellen direkt in der Molke ist möglich. Um den Verlust von Molkeproteine durch dieses Verfahren zu vermeiden, müssen die verwendeten Immobilisate nach Denitrifikation mehrmals mit Wasser abgewaschen werden.

5.4 Kontinuierliche Denitrifikation des Eluenten im Biostat Q (CSTR)

Um den kontinuierlichen Nitratabbau durch immobilisierte Zellen zu überprüfen, wurden 62,3 g vom Immobilisat (hergestellt nach Kap. 5.1) mit einer Natriumchlorid-lösung ($V = 100 \text{ mL}$, $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/L}$) in Bioreaktoren (siehe Abbildung 5.5) gefüllt und bei 150 rpm gerührt.

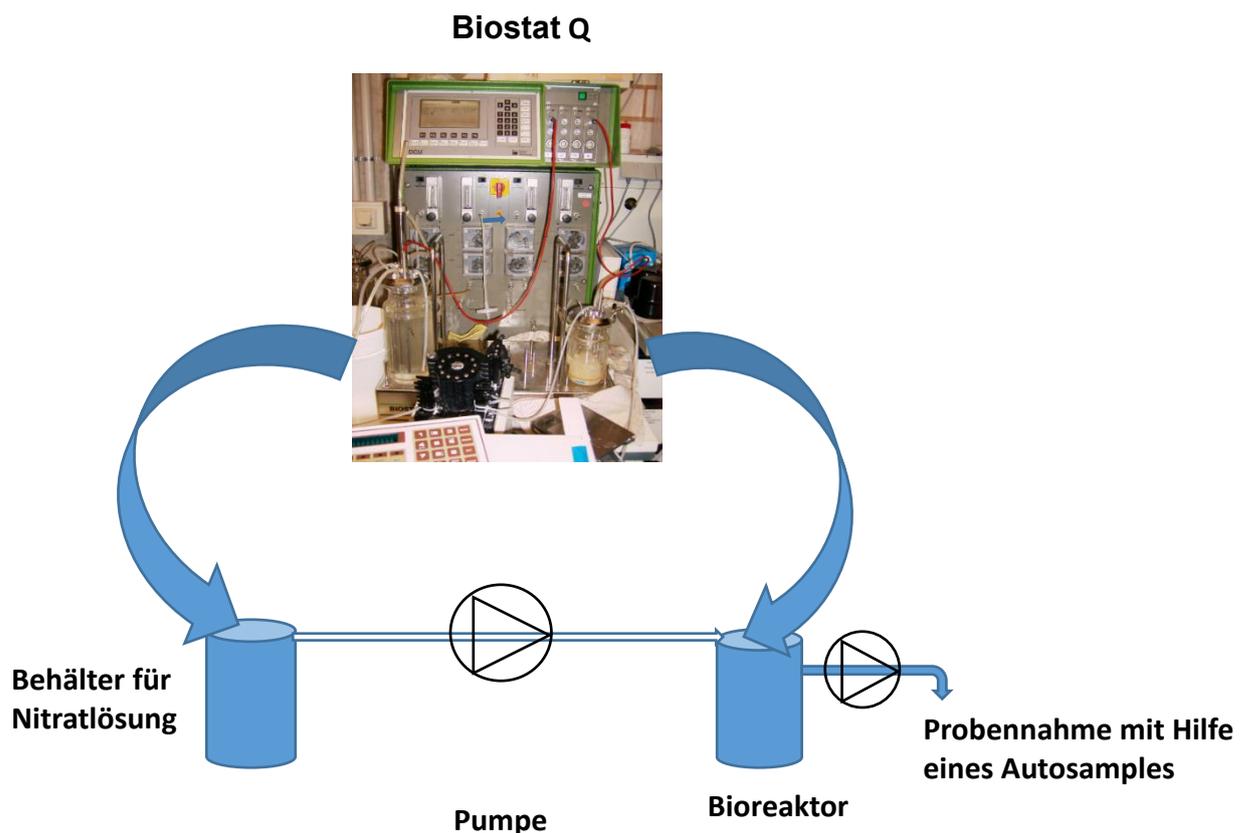


Abbildung 5.5: Versuchsaufbau zur Denitrifizierung mittels Immobilisate mit Hilfe von Biostat Q.

Die Probenahme erfolgte über ein, mit einem Stahlsieb umschlossenes, Probenahmerohr, um die LentiKats zurückzuhalten. Mittels einer Pumpe wurde den

immobilisierten Zellen in den Reaktoren eine Natriumchloridlösung ($c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/L}$) zugeführt, die neben 527 mg/L Nitrat 250 mg/L Acetat als Elektronendonator enthielt. Gleichzeitig wurde der denitrifizierte Eluent abgepumpt. Mit Hilfe eines Autosamplers wurde über einen Zeitraum von 3 Tagen alle 30 min eine Probe für die Nitrit- und Nitratbestimmung genommen. Als Vergleich wurden LentiKats[®] ohne Zellen verwendet. Der Konzentrationsverlauf ist in Abbildung 5.6 dargestellt.

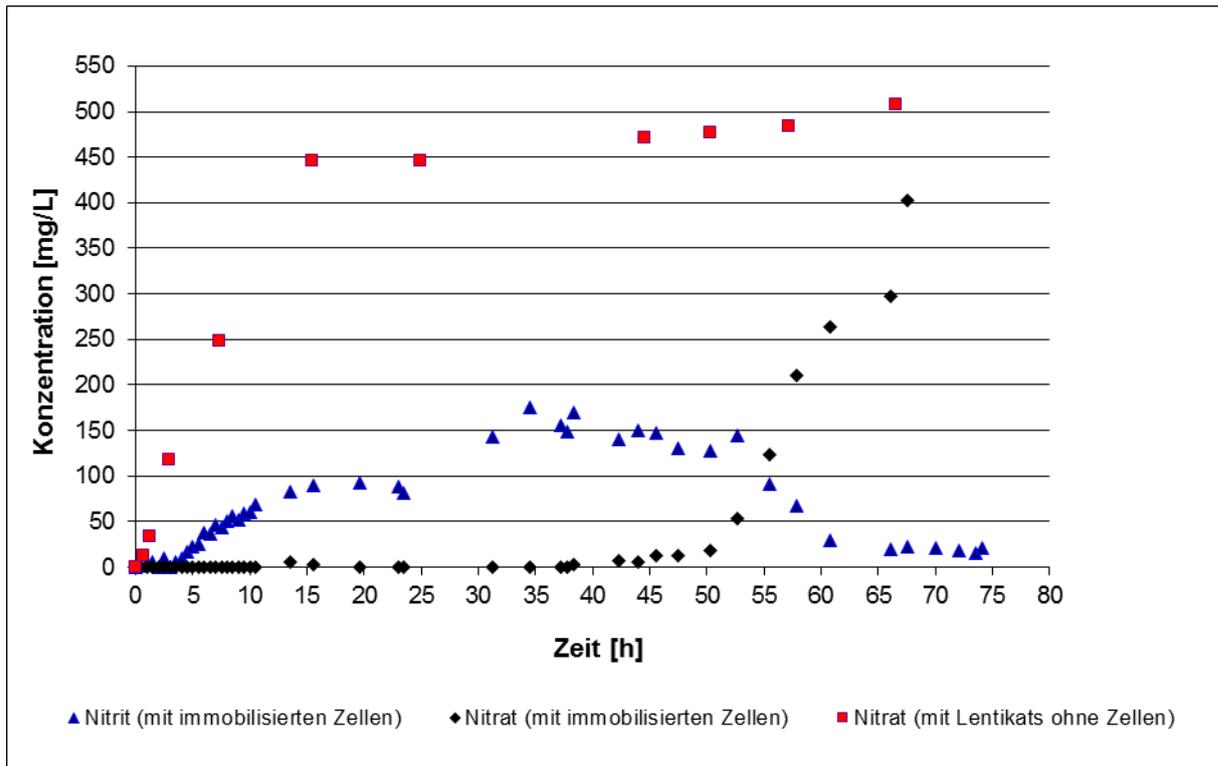


Abbildung 5.6: Konzentrationsverläufe des Nitrats im Eluent mit immobilisierten Zellen bzw. LentiKats[®] ohne Zellen, $T = 38,5^\circ\text{C}$, $c_{\text{Acetat}} = 250 \text{ mg/L}$ als Elektronendonator, $\text{BTM} = 0,65 \text{ g}$, $c_{\text{NO}_3} = 527 \text{ mg/L}$, ohne Puffer, Volumenstrom = $0,7 \text{ mL/min}$

Die Abbildung 5.6 ist zu entnehmen, dass bei einer kontinuierlichen Zugabe von $0,37 \text{ mg/min}$ Nitrat zu den immobilisierten Zellen ($\text{BTM} 0,65 \text{ g}$) ein kontinuierlicher Nitratabbau möglich ist. Bis zu 50 h konnte Nitrat nicht nachgewiesen werden, Nitrit ist nach 4 h sichtbar und nimmt danach auf nicht nachweisbare Gehalte ab. Ähnliche Ergebnisse wurden von Trögl veröffentlicht, wo die Denitrifikation mittels LentiKat[®] mit *P. denitrificans* ebenfalls erfolgreich war. Zwar wurden Zwischenprodukte wie Nitrit detektiert [87], aber es wurde auch berichtet, dass bei einem pH-Wert von mehr als $7,8$ Nitrit vollständig verstoffwechselt wurde [88]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass durch in LentiKats[®] immobilisiertem *P. denitrificans* und nach Zugabe

von 250 mg/L Acetat (als Elektronendonator) eine Nitratabbaurate von 0,34 mg/min zu erreichen ist. Während eines Versuches wurden so in der Summe 1100 mg Nitrat in 50 h abgebaut und Nitrit nach 65 h vollständig eliminiert. In weiteren Experimenten ist es notwendig, zusätzlich den pH-Wert bezüglich der Denitrifikation zu achten.

5.5. Direkte Verwendung immobilisierter Zellen von *P. denitrificans* zur Nitratbereicherung in Molkekonzentrat

In diesem Kapitel wurde die Verwendung der immobilisierten Zellen im direkten Einsatz in der Molke untersucht. Mit dem Verfahren wurden immobilisierte Zellen aus Molke nach Denitrifikation durch einen Sieb problemlos entfernt und gegebenenfalls zur Denitrifikation wiederverwendet. Die direkte Verwendung von immobilisiertem *P. denitrificans* in Molkekonzentrat erfolgte im Batch- bzw. kontinuierlichen Versuch bei unsterilen Bedingungen. Die Herstellung der Immobilisate ist in Kap. 5.1 beschrieben.

5.5.1 Nitratabbau in Molkekonzentrat bei verschiedenen Temperaturen im Batchversuch

Zum Beginn des Batchversuchs wurden Immobilisate mit 15,3 g (BTM = 179,9 mg) in einer 100 mL Schottflasche mit Septum-Schraubverschluss eingesetzt. Zur Denitrifikation wurde 50 mL nitrathaltige Molke in die Schottflasche gegeben und bei verschiedenen Temperaturen (25,5°C und 30°C) mit 120 rpm gerührt. Es wurden Proben mit Hilfe einer Kanüle durch das Septum entnommen, um die Konzentration von Nitrat bzw. Nitrit zu bestimmen.

Abbildung 5.7 zeigt die Verläufe der Nitrit- und Nitratkonzentration während der Denitrifikation bei Temperaturen von 25,5°C und 30°C. Als Referenzprobe wurde Molke ohne Zusatz von *P. denitrificans* verwendet, um den Einfluss der aus der Molke stammenden Mikroorganismen auf die Denitrifikation zu untersuchen.

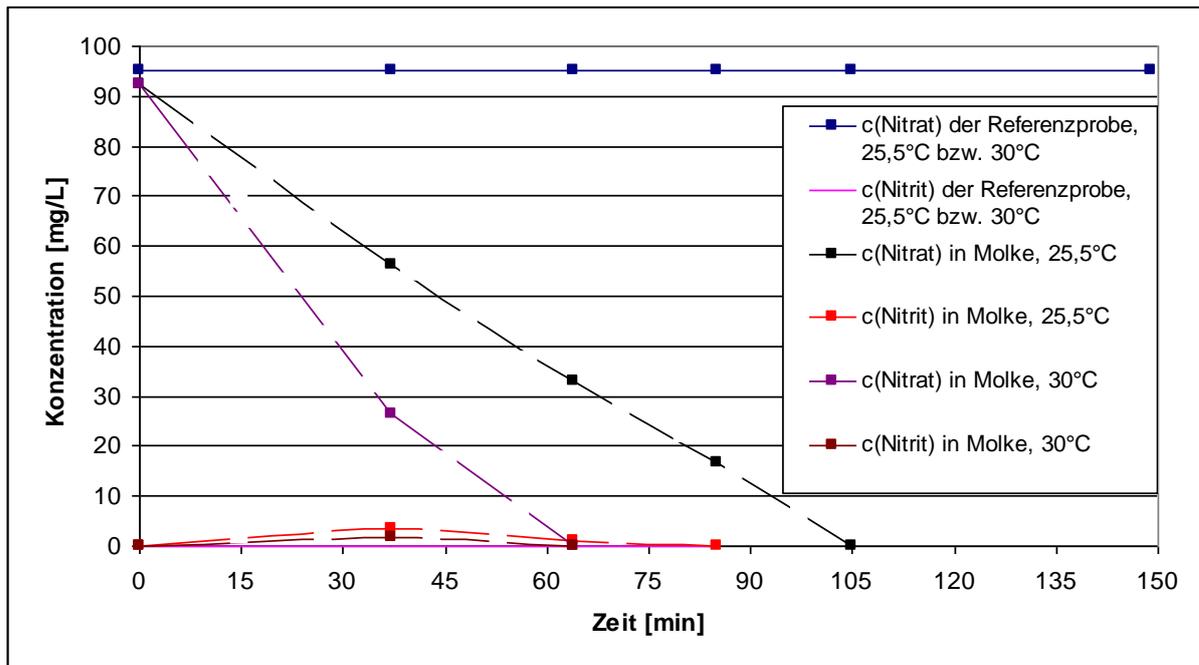


Abbildung 5.7: Verläufe der Konzentrationen von Nitrat bzw. Nitrit in Molkekonzentrat für die Denitrifikation mit immobilisierten Zellen im Batchversuch bei $T = 25,5^\circ\text{C}$ (RT) bzw. 30°C , eingesetzte BTM = 3,6 g/L

Die Referenzproben zeigen keine Änderung der Nitrit- und Nitratkonzentration, d.h. die aus dem Molkekonzentrat stammenden Mikroorganismen haben keinen Einfluss auf den Nitratabbau. Der Nitratabbau bei einer Temperatur von $30,0^\circ\text{C}$ verläuft schneller als bei $25,5^\circ\text{C}$ und die Abbaurate beträgt $0,27 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}\text{L}^{-1}\text{min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ bei $25,5^\circ\text{C}$ und $0,45 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}\text{L}^{-1}\text{min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ bei 30°C .

Um eine Vermehrung der im Molkekonzentrat befindlichen freien Mikroorganismen zu vermeiden, wurden Nitratabbauraten im Molkekonzentrat bei geringeren Temperaturen (20°C , 15°C und 10°C) überprüft. Bei geringeren Temperaturen ist die Aktivität von *P. denitrificans* gering, sodass für diese Untersuchung mehr Biotrockenmasse als zuvor (Abbildung 5.7) verwendet wird. Die Versuchsdurchführung ist analog der im vorherigen Versuch beschriebenen. In Abbildung 5.8 sind die Ergebnisse dargestellt.

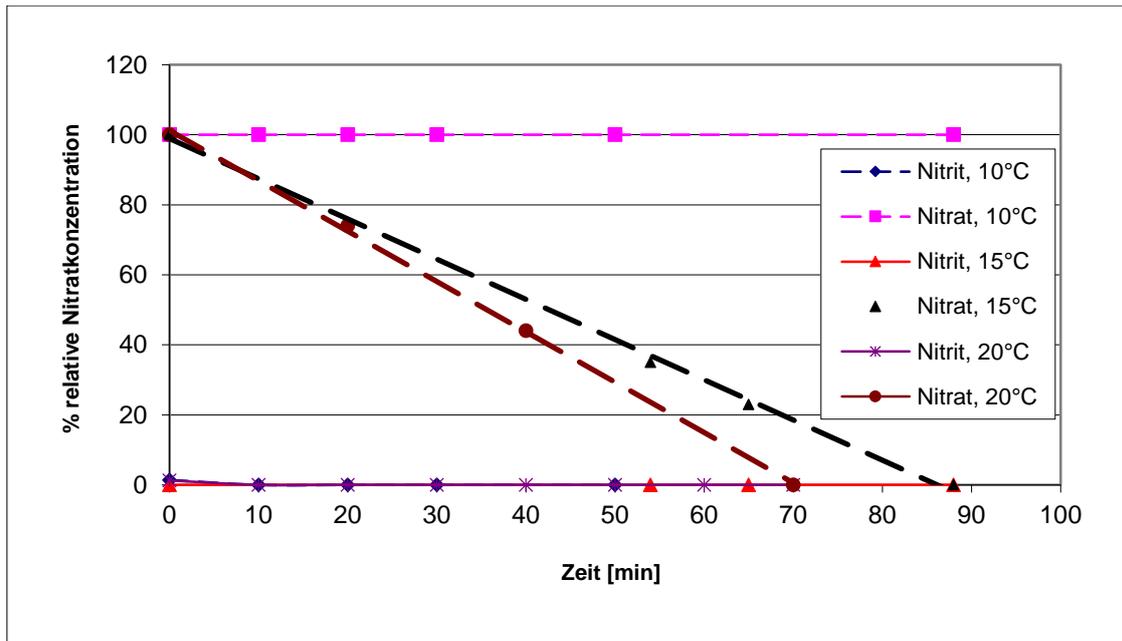


Abbildung 5.8: Verläufe der Konzentrationen von Nitrat bzw. Nitrit in Molkekonzentrat für die Denitrifikation mit immobilisierten Zellen bei Temperaturen von $T = 10^{\circ}\text{C}$, 15°C und 20°C , eingesetzte BTM = 10 g/L , $n=1$

Abbildung 5.8 zeigt, dass ein Nitratabbau in Molkekonzentrat auch bei Temperaturen von 15°C und 20°C möglich ist und die zwischenzeitlich auftretenden Nitritkonzentrationen unterhalb der gesicherten Nachweisgrenze des Analyseverfahrens liegen. Die Entfernung von Nitrat aus Molkekonzentrat ist nicht möglich bei einer Temperatur von 10°C . Die Abbaurrate beträgt $0,11\text{ mg}_{\text{Nitrat}}\text{L}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ bei 15°C und für eine Temperatur von 20°C liegt die Abbaurrate bei $0,14\text{ mg}_{\text{Nitrat}}\text{L}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$.

Wie bereits in Kap. 4.4.1.3 geschrieben wird eine temperaturabhängige Reaktionsgeschwindigkeit durch die Arrhenius-Gleichung (Gl. 4.3) beschrieben. Hier spielt die Ermittlung der Aktivierungsenergie nach Arrhenius eine wichtige Rolle. Mit Auftragung eines Kehrwertes der absoluten Temperatur gegen den Logarithmus der Geschwindigkeit wird die Aktivierungsenergie (E_a) aus der Steigung ermittelt. Durch die obigen Versuche bei vier verschiedenen Temperaturen ($T = 15^{\circ}\text{C}$, 20°C , $25,5^{\circ}\text{C}$ und 30°C) ergibt sich eine Aktivierungsenergie (E_a) von 70 kJ mol^{-1} für Nitratabbau mittels Immobilisate in Molkekonzentrat. Job hat berichtet dass die Werte für die molaren Aktivierungsenergien vieler üblicher Reaktionen zwischen 30 und 100 kJ mol^{-1} liegen [89]. Große Aktivierungsenergien von über 60 kJ mol^{-1} bedeuten eine starke Zunahme der Geschwindigkeit der Reaktion mit steigender Temperatur [89].

5.5.2 Kontinuierlicher Nitratabbau von Molkekonzentrat im Biostat Q (CSTR)

Obwohl bei einer Temperatur von 30°C eine starke Vermehrung von im Molkekonzentrat vorhandenen Mikroorganismen zu erwarten ist, wurden Versuche zur kontinuierlichen Denitrifikation bei dieser Temperatur durchgeführt, da bei der Temperatur von 30°C die beste Abbaurrate erzielt wurde. Zur Untersuchung der Änderung von im Molkekonzentrat vorhandenen Mikroorganismen wurden Proben während der Denitrifikation entnommen und jeweils die KBE bestimmt (siehe Abbildung 5.15). In Abbildung 5.9 ist der Versuchsaufbau zur Denitrifikation im CSTR dargestellt. Zu Beginn des Versuchs wurde 200 mL Molkekonzentrat, welches 73 mg/L Nitrat enthielt, in einem Bioreaktor mit in LentiKats® immobilisiertem *P. denitrificans* 0,17 h lang denitrifiziert; anschließend wurde mittels kontinuierlicher Fließrate von 2 mL/min weiteres Molkekonzentrat in den Bioreaktor mit Hilfe einer Pumpe geleitet. Aus der denitrifizierten Molke wurden nach verschiedenen Zeiten Proben entnommen, um die Nitrat- bzw. Nitritkonzentration zu bestimmen. Gleichzeitig wurde die Molke in einen zweiten Reaktor ohne LentiKats® geleitet - die Versuchsdurchführung war ansonsten identisch (siehe Abbildung 5.9).

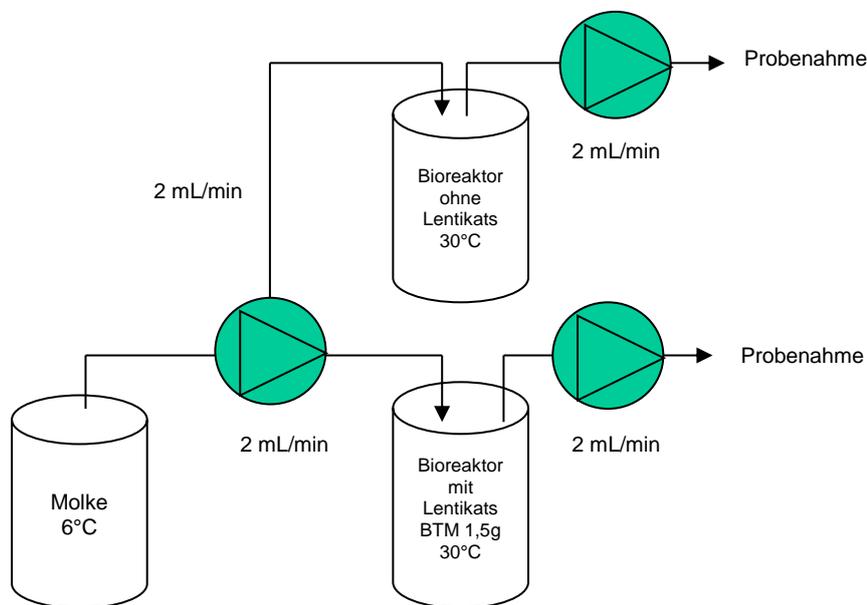


Abbildung 5.9: Versuchsaufbau

Die Änderung der Nitrit- bzw. Nitratkonzentration ist in der Abbildung 5.10 dargestellt.

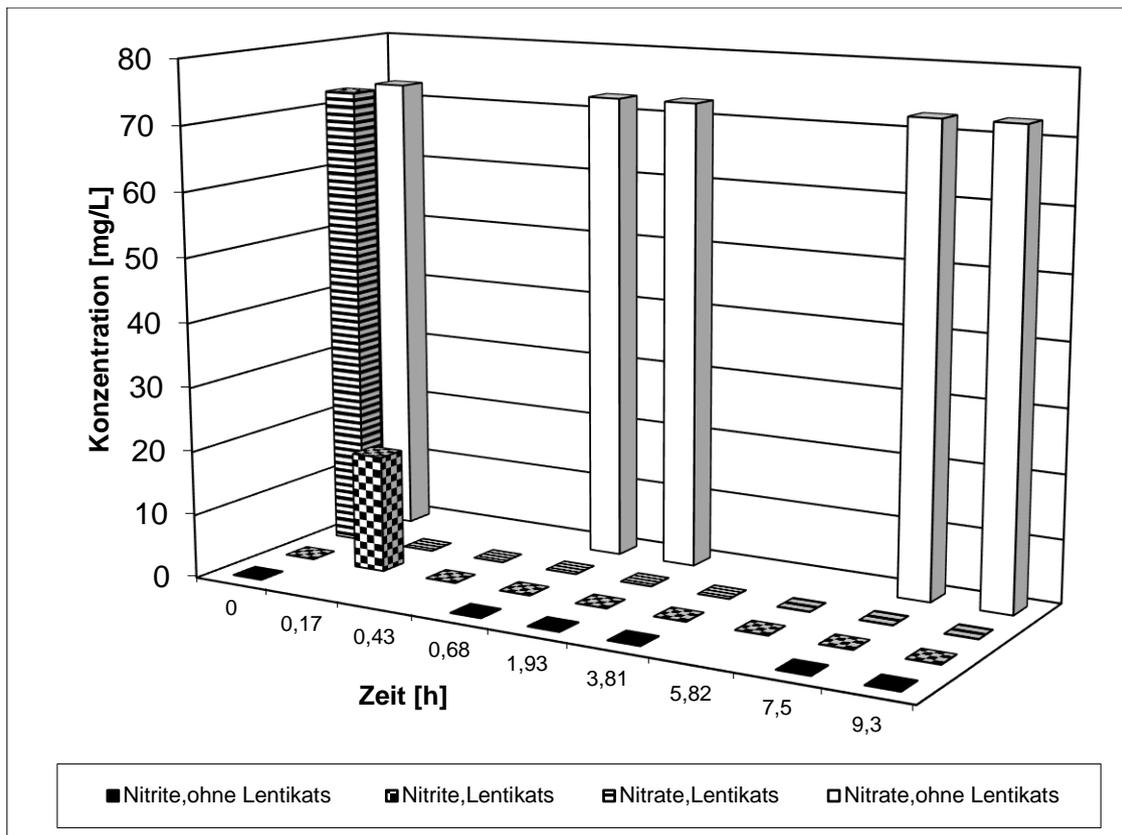


Abbildung 5.10: Nitrit- und Nitratkonzentration bei kontinuierlicher Betriebsweise des Reaktors bei $T = 30^{\circ}\text{C}$ mit $\text{BTM} = 1,55 \text{ g}$, Arbeitsvolumen = 200 mL, Durchflussrate bzw. Flussrate = 2mL/min

Abbildung 5.10 zeigt den Verlauf der Denitrifikation. Es wurde über den gesamten Zeitraum der kontinuierlichen Molkezufuhr kein Nitrit detektiert. Jedoch konnten ca. 10 mg/L Nitrit während der Batchphase nachgewiesen werden. Es ist zu erkennen, dass ein kontinuierlicher Nitratabbau durch Immobilisate von *P. denitrificans* in Molkekonzentrat bei einer Temperatur von 30°C möglich ist. Im Vergleichsexperiment ist die Nitratkonzentration konstant und Nitrit ist nicht nachweisbar. Dies bedeutet, dass die molkeigenen Mikroorganismen keine Rolle bei der Denitrifikation spielen.

5.6 Kinetik des biologischen Nitratabbaus mit immobilisierten Zellen von *P. denitrificans*

Die Versuche zur Denitrifikation mit immobilisiertem *P. denitrificans* wurden im Batchversuch und bei den gleichen optimalen Denitrifikationsbedingungen wie beim Abbau mit nativen Zellen durchgeführt.

Um den Einfluss des pH-Werts auf den Nitratabbau mit den Immobilisaten zu untersuchen, wurden die Immobilisate zunächst, wie in Kap. 5.1 beschrieben, hergestellt und der Nitratabbau im Batchversuch mit konstanter Biomasse beziehungsweise Nitratkonzentration bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Abbildung 5.11 zeigt den zeitlichen Verlauf der Nitratkonzentration.

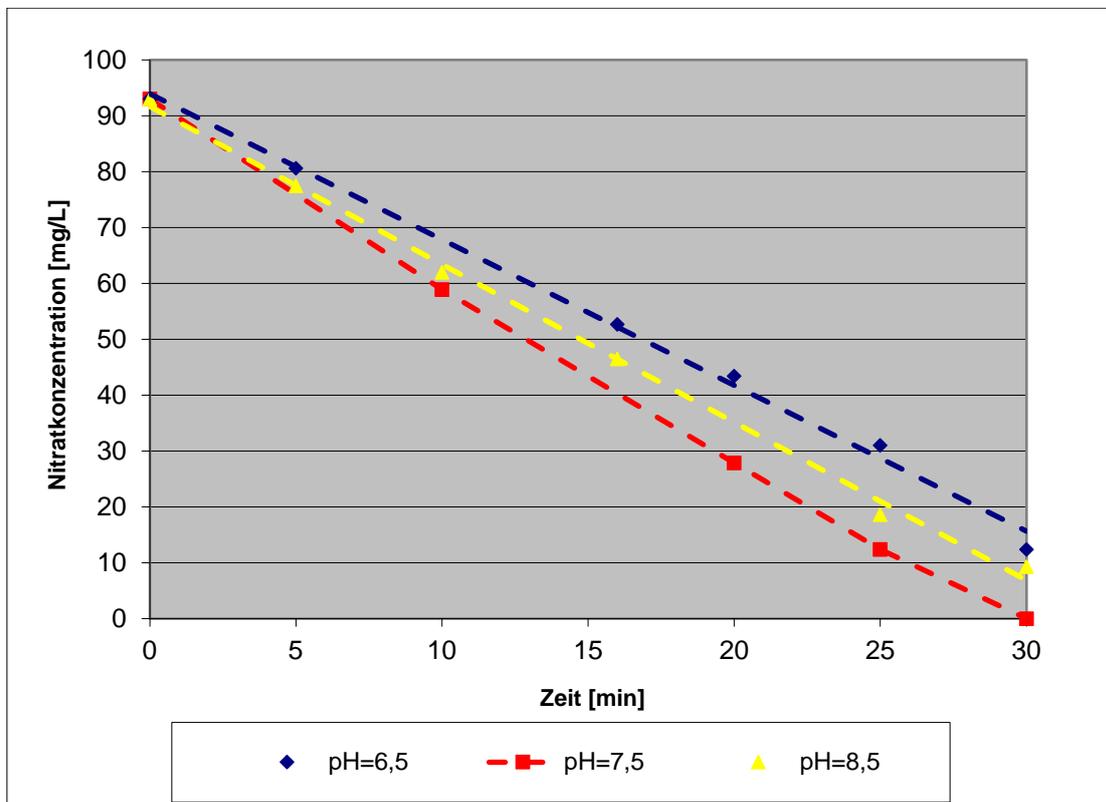


Abbildung 5.11: Zeitlicher Verlauf der Nitratkonzentration bei Einsatz immobilisierter Zellen bei verschiedenen pH-Werten

In Abbildung 5.11 ist es zu erkennen, dass die Abnahme der Nitratkonzentration bei pH 7,5 schneller als bei pH-Werten von 6,5 und 8,5 geschieht. Der Einfluss des pH-Werts auf den Nitratabbau spielt nicht nur bei Anwendung durch native Zellen, sondern auch bei immobilisierten Zellen eine Rolle. Der optimale pH-Wert für den Nitratabbau von nativen Zellen und immobilisierten Zellen liegt bei einem pH-Wert von 7,5.

Um die Michaelis-Konstante K_m und v_{max} der Denitrifikation mittels immobilisierten Zellen zu ermitteln, wurde eine Zelldichte von 4 g Biotrockenmasse an immobilisierten Bakterien pro Liter bei vier verschiedenen Nitratkonzentrationen eingesetzt. Diese Denitrifikation wurde unter optimalen Bedingungen durchgeführt (Temperatur von 37°C und pH-Wert von 7,5). Als Elektronendonator wurde 250 mg/L Acetat zugesetzt.

Die Abbildung 5.12 zeigt die Auftragung nach der Hanes-Woolf-Darstellung zur Ermittlung von K_m und v_{max} .

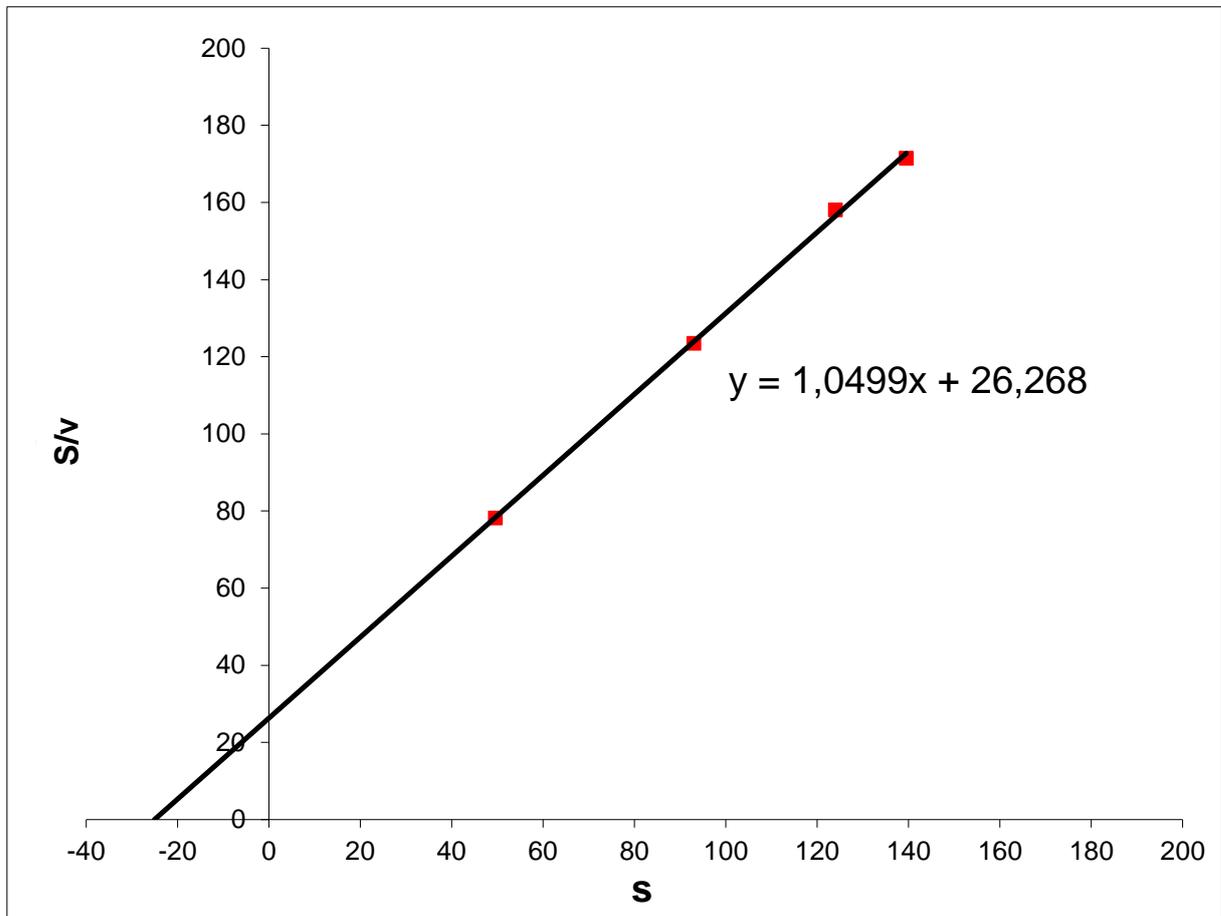


Abbildung 5.12: Bestimmung von v_{max} und K_m durch Auftragung von S/v gegen S (Hanes-Woolf-Darstellung) bei Einsatz immobilisierter Bakterien, $T = 37^\circ\text{C}$, $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/L}$, $\text{pH} = 7,5$ und $c_{\text{Acetat}} = 250 \text{ mg/L}$

Gemäß Abbildung 5.12 resultiert bei der Denitrifikation durch immobilisierte Zellen ein K_m -Wert von $25 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}/\text{L}$ ($400 \mu\text{M}$) und v_{max} von $0,9525 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}\text{L}^{-1}\text{min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$. Der K_m -Wert bei immobilisierten Zellen ist im Vergleich zu nativen Zellen fast siebenfach höher. Dies könnte durch Diffusionslimitierung begründet sein. Ein höherer K_m -Wert bedeutet, dass die Affinität des Enzyms der immobilisierten Zellen gegenüber einem Substrat wie Nitrat geringer ist. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit, dass das aktive Zentrum des Enzyms von Bakterien ein Substrat wie Nitrat bindet, geringer.

Tabelle 5.2 zeigt eine Zusammenfassung der Kinetik der Denitrifikation mittels nativen und immobilisierten Zellen von *P. denitrificans*.

Tabelle 5.2: Zusammenfassung der Kinetik der Denitrifikation mittels nativen Zellen und immobilisierten Zellen von *P.denitrificans*

	Native Zellen	Immobilisierte Zellen	Literatur
V_{\max} [$\text{mg}_{\text{Nitrat}}\text{L}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$]	2,44	0,9525	n.a.
K_m [μM]	58	400	< 5 μM [71] und 0,013-0,283 mM [72]
E_a [kJ/mol]	66	70	n.a.

Aus Tabelle 5.2 geht hervor, dass sich die Aktivierungsenergie der Denitrifikation mit *P. denitrificans* nicht ändert, wenn statt der nativen Zellen immobilisierte Kulturen eingesetzt werden. Der Unterschied von ca. 6 % entspricht der Messungenauigkeit des Systems. Dies bedeutet, dass das Verfahren mittels Immobilisate keinen Einfluss auf die Katalyse (das Enzym) hat. Mit der Aktivierungsenergie um 60 kJ mol^{-1} versteht man, dass die Reaktionsgeschwindigkeit hingegen mit steigender Temperatur stark zunimmt [89], wie auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurde (siehe in Kapitel 5.5.1). Im Vergleich zu nativen Zellen ist die Affinität des Enzyms von immobilisierten Zellen geringer. Hier zeigt sich der K_m -Wert von immobilisierten Zellen höher als der von nativen Zellen.

5.7 Untersuchung von Molkeproteinen in der zellfreien Immobilisationsmatrix

Um zu untersuchen, ob die Immobilisationsmatrix die wichtigen Molkeproteine während der Denitrifikation aufnimmt, wurde sie ohne Zellen in Molkekonzentrat bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Gesamtproteinbestimmung in der Immobilisationsmatrix nach einer definierten Inkubationszeit wurde mit verschiedenen Methoden durchgeführt. Dabei resultierte, dass die Bradford-Methode für die Gesamtproteinbestimmung in der Immobilisationsmatrix am besten geeignet erschien [86]. Bei diesem Versuch wurden die LentiKats[®] ohne Zellen, hergestellt wie Kap. 5.1 beschrieben, bei den Temperaturen $T = 20^\circ\text{C}$, $T = 25^\circ\text{C}$ und $T = 30^\circ\text{C}$ für 45 min in Molke inkubiert. Nach der Auflösung der LentiKats[®] wurden die Molkeproteine über die Bradford-Methode quantifiziert. Hierzu wurden 2 x 1g LentiKats[®] mit je 1,4 mL destilliertem Wasser im Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und im Eppendorf Thermomixer 5436 für 30 Minuten bei 70°C geschüttelt [92]. In

beiden Lösungsansätzen wurde der Proteingehalt je 3-mal mit dem Bradford-Test ermittelt. Die hergestellten LentiKats[®] wurden in einer Phosphat-Pufferlösung im Kühlschrank für die nächsten Versuche in 3 Tagen bzw. 7 Tagen gelagert.

Abbildung 5.13 zeigt eine ähnliche Änderung der Proteinkonzentration in der Immobilisationsmatrix nach Inkubation von LentiKats[®] ohne Zellen in Molke bei verschiedenen Temperaturen.

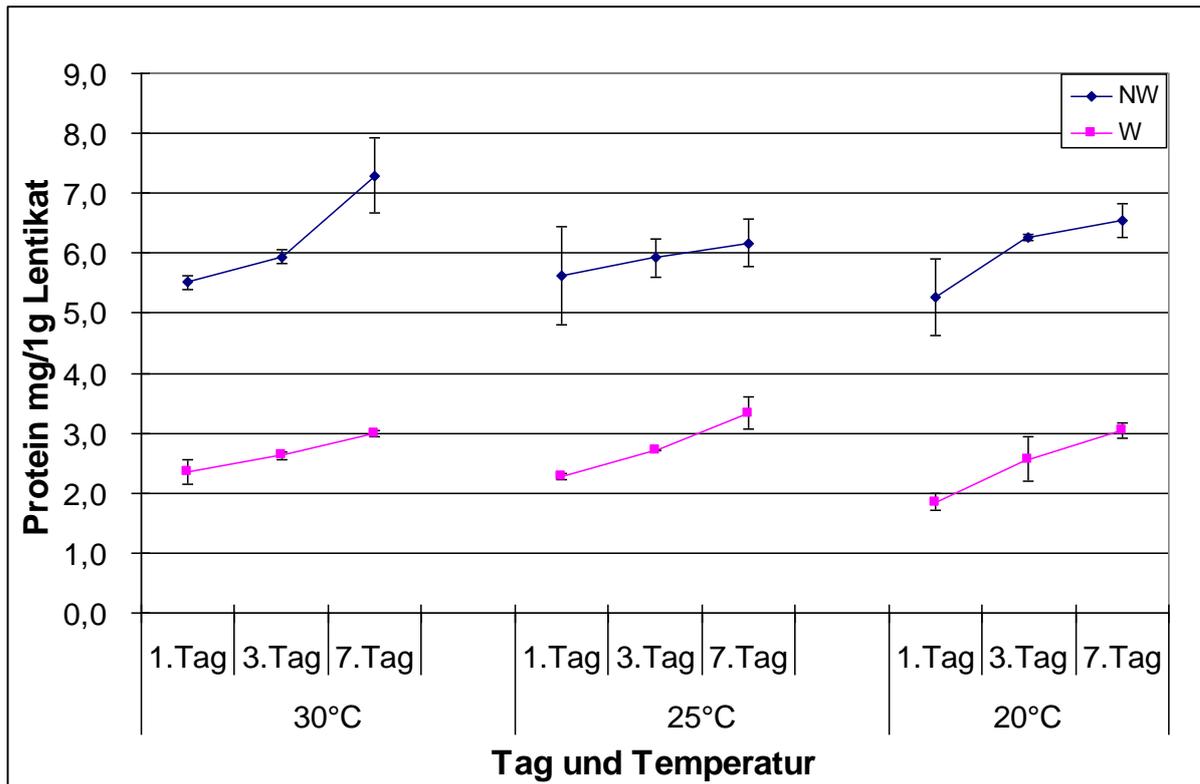


Abbildung 5.13: Gesamtproteinbestimmung mit der Bradford-Methode in LentiKats[®], nach unterschiedlicher Lagerungszeit in Phosphat-Pufferlösung (akkumulierte Proteine bei verschiedenen Lagerungszeit); NW: nicht gewaschen nach Inkubation, W: gewaschen mit dest. Wasser nach Inkubation [86]

Es ist zu erkennen, dass der Proteingehalt in der Immobilisationsmatrix mit zunehmender Lagerungszeit in einer Phosphat-Pufferlösung zunimmt. Nach dem Waschen der LentiKats[®] mit destilliertem Wasser befindet sich eine geringere Menge von Molkeproteinen in/an der Immobilisationsmatrix. Der Proteingehalt nimmt innerhalb von 7 Tagen von ca. 0,2 % auf ca. 0,3% zu. In LentiKats[®], die nicht mit Wasser gewaschen wurden nach der Inkubation in Molke, ist der Proteingehalt fast dreimal so hoch. Der Gesamtproteingehalt in der Immobilisationsmatrix nach der Inkubation in Molke bei Temperaturen von 20°C, 25°C und 30°C zeigt einen in diesem

Bereich temperaturunabhängigen Verlauf. Die Inkubationstemperatur hat somit keinen Einfluss auf die Aufnahme von Molkeproteinen in die Immobilisationsmatrix, sondern die Lagerungszeit. Je länger diese andauert, desto mehr Molkeproteine verbleiben in/an der Immobilisationsmatrix. Um den Verlust an Molkeproteinen zu verringern, sollte man die Immobilisate nach deren Herstellung nicht zu lange lagern, bevor sie zur Denitrifikation in Molke eingesetzt werden.

5.8 Stabilität der immobilisierten Zellen

Da die Zellen in immobilisiertem Material weiterhin wachsen könnten [42, 90], ist es notwendig, die Stabilität der immobilisierten Zellen zu untersuchen. Die Kultivierung von *P. denitrificans* sowie die Untersuchung der Stabilität der immobilisierten Zellen erfolgte in komplexem Medium (Tabelle 8.1 in Anhang). Die Immobilisierung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Vor der Überführung der Immobilisate in ein steriles Komplexmedium (Tabelle 8.1 in Anhang) wurden diese mehrmals mit sterilen physiologischen Kochsalzlösungen gewaschen, um eventuell adsorbierte Zellen von der Oberfläche der LentiKats[®] herunter zu spülen. Die immobilisierten Zellen (3 LentiKats[®]) wurden in 13 mL des Mediums bei verschiedenen Temperaturen mit einer Rührgeschwindigkeit von 120 rpm inkubiert. Dabei wurde die Extinktion bei 660 nm verfolgt.

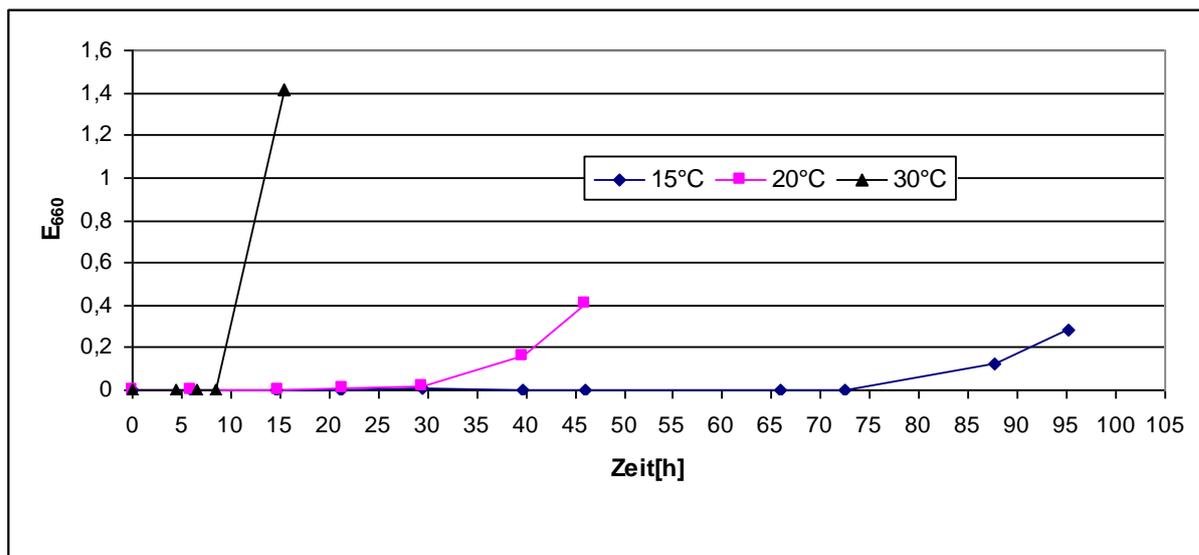


Abbildung 5.14: Extinktion (bei 660 nm) des Kulturmediums, in welchem die LentiKats[®] inkubiert wurden, über einen Zeitraum von 95 h.

Abbildung 5.14 zeigt einen Anstieg der Extinktion nach 8 h bei einer Temperatur von 30°C, nach 29 h bei 20°C und nach 73 h bei 15°C. Somit ist bewiesen, dass vermehrungsfähige Zellen aus den LentiKats® austreten können. Selbst bei Kühlung auf 15°C tritt nach ca. 3 Tagen eine Kontamination des umgebenden Mediums ein.

Es ist möglich Immobilisate direkt im Kontakt mit Medien zu verwenden. Allerdings sollte man darauf achten, dass die Inkubationszeit bei verschiedenen Temperaturen sehr unterschiedlich ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde immobilisierter *P. denitrificans* zur Denitrifikation in Molkekonzentrat verwendet und um eine hohe Nitrat-Abbaurate zu erreichen, wurde dies bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt. Dieser Versuch lief nicht länger als 8 h. Daher sollte keine Kontamination der Molke durch *P. denitrificans* stattfinden. Bei einer Temperatur von 20°C sollte man nicht mehr als 29 h und bei längeren Inkubationszeiten nicht über 73 h bei 15°C die Immobilisate in der Molke belassen.

5.9 Wachstum von Mikroorganismen in Molkekonzentrat während der kontinuierlichen Denitrifikation

Da bei einer Temperatur von 30°C eine starke Vermehrung von im Molkekonzentrat vorhandenen Mikroorganismen zu erwarten ist, wurden die Proben während der kontinuierlichen Denitrifikation (in Kap. 5.7.3) auf weitere Mikroorganismen mittels KBE-Bestimmung in diesen Kapitel überprüft. Abbildung 5.15 zeigt die KBE-Bestimmung der Denitrifikation im Batchversuch bzw. im kontinuierlichen Versuch bei einer Temperatur von 30°C.

Es ist zu erkennen, dass ein Anstieg der Keime bei der kontinuierlichen Denitrifikation auftritt. Dies könnte durch die Vermehrung der molkeneigenen Mikroorganismen und die Instabilität des Immobilisats nach 8 h bei einer Temperatur von 30°C zurückzuführen sein, wie in Abbildung 5.15 gezeigt. Bei dem Batchversuch nach einer Inkubationszeit von 26 min zeigt ein konstanter KBE-Wert, dass das Immobilisat vermutlich während des Versuchszeitraumes stabil war.

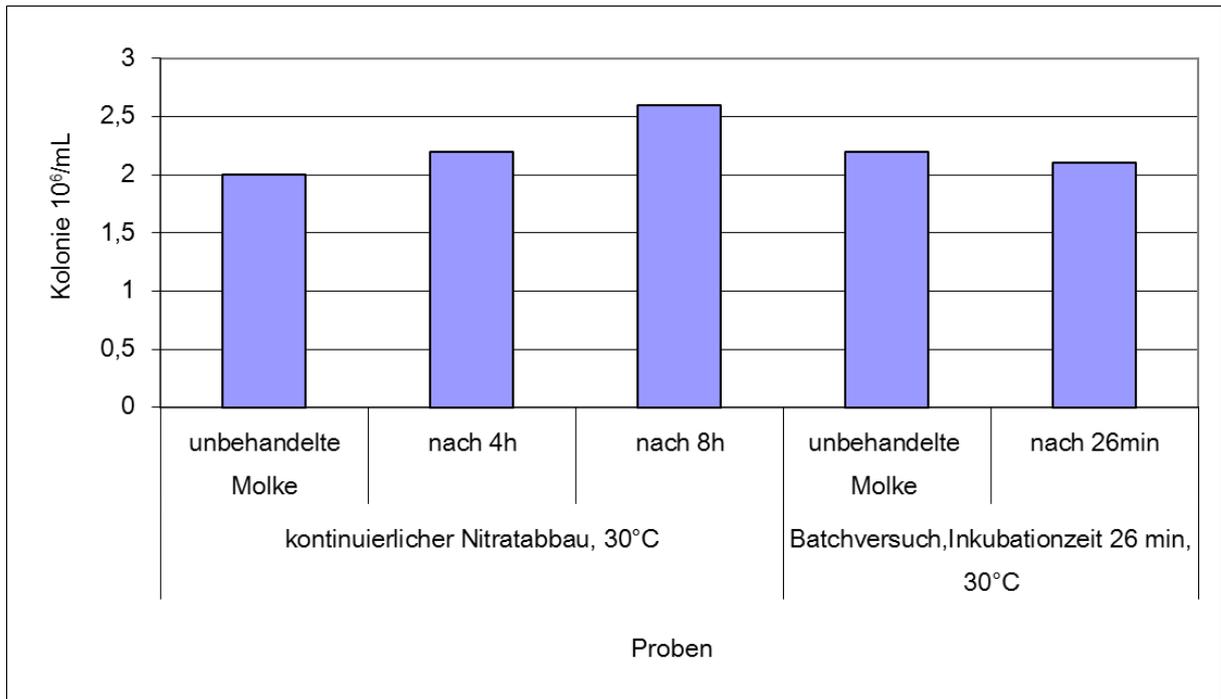


Abbildung 5.15: KBE-Bestimmung zur Untersuchung von Mikroorganismen in Molkekonzentrat nach Denitrifikation in kontinuierlichem Versuch und im Batchversuch, bei T= 30°C

5.10 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Denitrifikation mittels immobilisierter Zellen von *P. denitrificans* im Eluenten bzw. direkt in Molkekonzentrat untersucht. Die Denitrifikation wurde im Batchversuch bzw. kontinuierlichem Betrieb durchgeführt.

Mit sogenannten LentiKats[®] wurden Zellen von *P. denitrificans* als Immobilisate hergestellt. Durch eine einfache Untersuchung zur Stoffdiffusion für Nitrat zeigte sich, dass eine Anreicherung von Nitrat in der Immobilisationsmatrix (PVA- Hydrogel) bei Temperaturen von 30°C und 37°C nach 8 min bis 10 min stattfindet. Die Aufnahme von Nitrat in der Immobilisationsmatrix bei einer Temperatur von 37°C ist höher als bei T = 30°C. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Immobilisationsmatrix bei einer höheren Temperatur eine porösere Struktur aufweist. Die Porengröße der Immobilisationsmatrix liegt zwischen 14 kDa und 66 kDa (0,0028 - 0,0032 µm), abgeschätzt mittels Coomassie-Färbung (vgl. Kap. 5.3).

Im Vergleich zur biologischen Denitrifikation mittels nativen Zellen sank die Fähigkeit der Immobilisate zur Denitrifikation um den Faktor zwei. Der Vorteil der Anwendung der Immobilisate zur Denitrifikation liegt darin, dass die Trennung von Immobilisaten von Molkekonzentrat bzw. der Versuchslösung mit einem Sieb einfacher zu gestalten

ist als die Trennung der nativen Zellen. Aufgrund dieses Vorteils wurde die direkte Verwendung von immobilisierten Zellen von *P. denitrificans* in Molkekonzentrat zum Nitratabbau bei Temperaturen von 10°C, 15°C, 20°C, 25,5°C und 30°C untersucht. Als Referenzprobe wurde Molke ohne Zusatz von *P. denitrificans* verwendet. Dabei zeigte sich keine Änderung der Nitrit- und Nitratkonzentration im Versuchszeitraum, d.h. die aus dem Molkekonzentrat stammenden Mikroorganismen haben keinen Einfluss auf den Nitratabbau. Der Nitratabbau bei einer Temperatur von 30°C verlief schneller als bei geringeren Temperaturen. Bei einer Temperatur von 10°C fand kein Nitratabbau statt.

Bei kontinuierlicher Denitrifikation mittels Immobilisat im Eluent konnte kein Nitrat im Versuchszeitraum von 50 h detektiert werden. Allerdings war ein Anstieg der Nitritkonzentration kurz nach Beginn des Versuchs zu beobachten. Beim kontinuierlichen Nitratabbau im Molkekonzentrat mittels direkter Verwendung der Immobilisate bei einer Temperatur von 30 °C wurde kein Nitrit detektiert. Es konnten jedoch ca. 10 mg/L Nitrit während der Batchphase nachgewiesen werden.

Es war nachzuweisen, dass ein kontinuierlicher Nitratabbau durch immobilisierte Zellen von *P. denitrificans* im Molkekonzentrat bei einer Temperatur von 30°C möglich ist. Die Untersuchung der Stabilität der immobilisierten Zellen zeigte sehr deutlich, dass die Bakterien im Medium wachsen könnten. Allerdings war dies nur der Fall, wenn die Inkubationsdauer zu lang gewählt wurde. So sollten bei einer Temperatur von 30°C die Immobilisate nicht länger als 8 h in der Molke verbleiben.

6 Untersuchung der Inhaltstoffe von Molkekonzentrat während der Denitrifikation

Molke enthält viele wertvolle Inhaltstoffe für die unterschiedlichsten Verwendungszwecke. Deshalb ist es wichtig, Inhaltstoffe wie Molkeproteine, Lactose und Mineralstoffe nach der biologischen Denitrifikation zu untersuchen.

Untersuchungen des Mineralstoffgehalts mittels Aschegehaltbestimmung

Unter Asche bzw. Glührückstand versteht man den Rückstand, der bei der vollständigen Verbrennung (Veraschung) der organischen Bestandteile eines Lebensmittels entsteht. Die Asche entspricht in etwa dem Gehalt an Mineralien. Die Bestimmung des Mineralstoffgehalts wurde nach dem Verfahren der direkten Veraschung durchgeführt [91]. Die Aschegehaltbestimmung wurde in der Fachrichtung Lebensmittelchemie/ Toxikologie durchgeführt. Eine gereinigte Quarzschale wurde im Muffelofen bei 550°C 2 h erhitzt, im Exsiccator abgekühlt und anschließend gewogen. Dann wurde denitrifiziertes Molkekonzentrat von etwa 5 g in die Schale eingewogen und unter dem Oberflächenverdampfer (IR-Lampe) vorgetrocknet. Über dem Bunsenbrenner wurde die Probe nun vorverascht und danach wurde die Schale im Muffelofen geglüht bis die Asche weiß wurde. Der Aschegehalt des Molkekonzentrats wird durch Differenzwägung ermittelt und ist in Tabelle 6.1 dargestellt.

Tabelle 6.1: Aschegehalt von Molkekonzentrat vor bzw. nach Denitrifikation

Probe	Asche [% in Probe]
1. *Molkekonzentrat	2,5 ± 0,15
2. *Molkekonzentrat, 30°C, immobilisierte Zellen	2,4 ± 0,41

* Herkunft: Firma Biolac in Harbansen

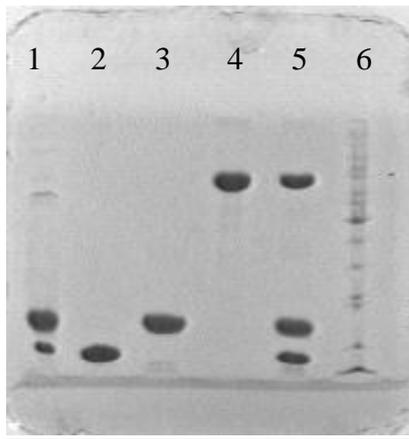
Es ist zu erkennen, dass der Mineralstoffanteil im Molkekonzentrat nach der Denitrifikation geringer ist als im unbehandelten Molkekonzentrat (etwa 4 % geringer). Eine Verringerung des Aschegehaltes ist wahrscheinlich auf Anhaften des Molkekonzentrats auf der Immobilisationsmatrix zurückzuführen. Zur Verhinderung dieses Effektes sollten die LentiKats® nach dem Einsatz mehrmals mit Wasser nachgespült werden um dadurch Mineralstoffe zurückzugewinnen. Der Verlust von

Mineralstoffen spielt eher eine untergeordnete Rolle für den Markt, da die bedeutendsten Inhaltsstoffe die Molkeproteine darstellen, die als Lebensmittelzusatzstoff vielfach verwendet werden. Dadurch ist es notwendig, eine Änderung von Molkeproteinen beziehungsweise Proteingehalt nach der Denitrifikation zu untersuchen.

6.2 Proteinzusammensetzung im Molkekonzentrat

Da die Molkeproteine ein wertgebender Bestandteil der Molke sind, ist es notwendig zu beobachten, ob sie während der biologischen Denitrifikation mittels nativem und immobilisiertem *P. denitrificans* verändert werden, oder ob Fremdprotein in dem Prozess gebildet wird. Mittels SDS-PAGE (**S**odium**d**odecacyl**s**ulfat-**P**olyacrylamid-**G**el-**E**lektrophorese) wurden die denitrifizierten Molken im Vergleich zur unbehandelten Molke als Referenz verglichen. Nach Denaturierung der Proteine in der zu untersuchenden denitrifizierten Molke mit SDS (Natriumdodecylsulfat) wurden die vorhandenen Disulfidbrücken mit α -Mercaptoethanol reduziert. Danach wurden diese Proben mit einem EDTA-haltigen Tris/HCl Puffer verdünnt und bei 95°C für 10 min erhitzt. Nach Abkühlen wurden sie mit Bromphenolblau versetzt und anschließend zur Elektrophorese eingesetzt. Hier wurden 12,5 % Acrylamidgele der Firma Amersham Biosciences als Trenngele verwendet und die Detektion erfolgte mittels Coomassiefärbung [2]. Die vollständige Durchführung der Trennungs- und Färbemethode befindet sich im Anhang (Kap. 8.5).

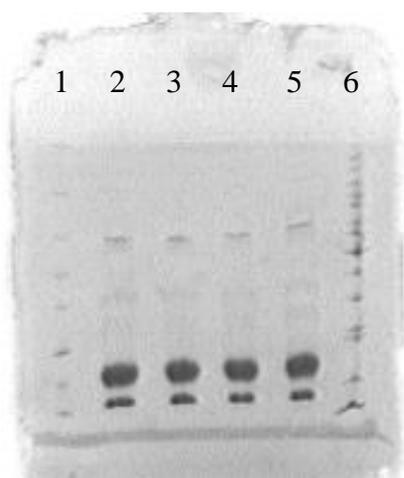
Hierzu wurde ein erster Versuch mit Proteinstandards und mit unbehandelten Molkeproben durchgeführt und die Trennung mit Coomassiefärbung liefert sichtbare Proteinbanden. Die Zuordnung der Proteinbanden erfolgt anhand eingesetzter Standards und anhand kommerzieller Proteinmarker (siehe Abbildung 6.1) [2].



- 1 unbehandelte Molke
- 2 α-Lactalbumin
- 3 β-Lactoglobulin
- 4 Lactoferrin
- 5 Gemisch aus α-Lactalbumin, β-Lactoglobulin und Lactoferrin
- 6 Proteinmarker

Abbildung 6.1: SDS-Gel der Molkeproteine mit Standard- Vergleichen [2]

In der Abbildung 6.1 lassen sich die Proteinbanden identifizieren. Die aufgetrennte Molkeprobe (Bande 1) enthält Proteine wie α-Lactalbumin, β-Lactoglobulin, BSA und Lactoferrin. Allerdings ist die Lactoferrinbande nur schwach zu erkennen. Dies ist vermutlich deshalb so, weil Lactoferrin nur in kleinen Mengen in Molke vorhanden ist. Zur Untersuchung der Veränderung der Molkeproteine nach biologischer Denitrifikation wurde Molkekonzentrat mittels nativem *P. denitrificans* bei einer Temperatur von 30°C für 5,5 h inkubiert. Als Referenz wurde dasselbe Molkekonzentrat ohne Zusatz von *P. denitrificans* genauso lange bei gleicher Temperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben mittels SDS-PAGE untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.2 dargestellt.



- 1 Proteinmarker
- 2 unbehandeltes Molkekonzentrat
- 3 Molke + *Paracoccus*, 1. Versuch
- 4 Molke + *Paracoccus*, 2. Versuch
- 5 Molkevergleich T = 30°C
- 6 Proteinmarker

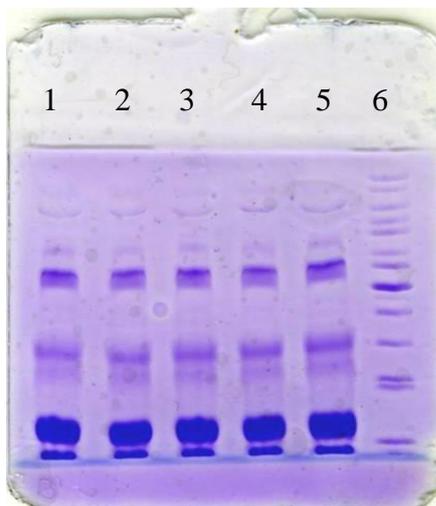
Abbildung 6.2: SDS-Gel Molkeproben (direkte Inkubation mit *Paracoccus*)

Die Abbildung 6.2 zeigt, ob sich eine Änderung der Molkeproteine nach biologischer Denitrifikation erkennen lässt. Die Banden 3 und 4 in Abbildung 6.2 stammen von

Molkeproben, die direkt mit *Paracoccus* für 5,5 h inkubiert wurden. Zum Vergleich ist unbehandelte Molke und ein Molkevergleich, der unter den gleichen Bedingungen behandelt wurde, aufgetragen worden. Es ist keine Veränderung in Hinblick auf die Proteinzusammensetzung zu erkennen.

Im Vergleich zur biologischen Denitrifikation mittels nativer Mikroorganismen von *P. denitrificans* wurde die denitrifizierte Molke mittels immobilisierten Mikroorganismen von *P. denitrificans* untersucht. Hier wurde das Molkekonzentrat mit immobilisierten Mikroorganismen bei einer Temperatur von 30°C für 2,5 h denitrifiziert. Als Referenz wurde Molkekonzentrat ohne Mikroorganismen bei gleichen Bedingungen inkubiert. Dazu wurde ebenfalls unbehandeltes Molkekonzentrat eingesetzt.

Abbildung 6.3 zeigt die Ergebnisse hiervon.



- 1 Molke-Vergleich T = 30°C, t = 2,5 h
- 2 unbehandeltes Molkekonzentrat
- 3 Molke + immob. *Paracoccus*, t = 2,5 h
- 4 Molke + *Paracoccus*, t = 2,5 h
- 5 unbehandeltes Molkekonzentrat
- 6 Proteinmarker

Abbildung 6.3: SDS-Gel zur Trennung von Molkeproben nach Inkubation mit nativem und immobilisiertem *P. denitrificans* nach Coomassie-Färbung

Abbildung 6.3 stellt die Proteinbanden dar, die aus Molke nach der biologischen Denitrifikation mit nativen Mikroorganismen stammen im Vergleich zu Molke mit immobilisierten Mikroorganismen bzw. aus von unbehandelter Molke und inkubierter Molke ohne Mikroorganismen. Hier lassen sich ebenfalls keine Veränderung der Proteinzusammensetzung während der biologischen Denitrifikationsprozesse erkennen.

6.3 Bestimmung der Proteingehalte mittels Kjeldahl

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinmenge im Molkekonzentrat und deren eventuelle Abnahme durch Applikation der LentiKat®-Immobilisate wurde die Kjeldahlmethode [91] angewandt und in der Fachrichtung Lebensmittelchemie/-Toxikologie der TU Kaiserslautern durchgeführt.

Für diese Verfahren wird die Probe mit konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz eines Katalysatorgemisches oxidativ aufgeschlossen. Das Katalysatorgemisch besteht aus zwei Komponenten, zum einen Metallsalze/oxide, die zur Sauerstoffübertragung unter intermediärer Bildung naszierenden Sauerstoffs dienen als auch Kaliumsulfat, das zur Erhöhung der Siedetemperatur dient. Das freigesetzte Ammoniak, das aus dem Ammoniumsulfat durch Alkalizusatz entsteht, wird mit Hilfe einer Wasserdampfdestillation in eine borsäurehaltige Vorlage übergetrieben und durch Titration mit Salzsäure-Maßlösung in ihrer Konzentration bestimmt. Man berechnet den Proteingehalt der Probe unter Berücksichtigung des durchschnittlichen Stickstoffanteils der vorliegenden Proteinart [91].

In der Arbeit wurde der Proteingehalt nach Denitrifikation der Molke durch immobilisierte Mikroorganismen *P. denitrificans* bestimmt. Als Referenz wurde unbehandelte Molke verwendet. Abbildung 6.4 zeigt die Ergebnisse.

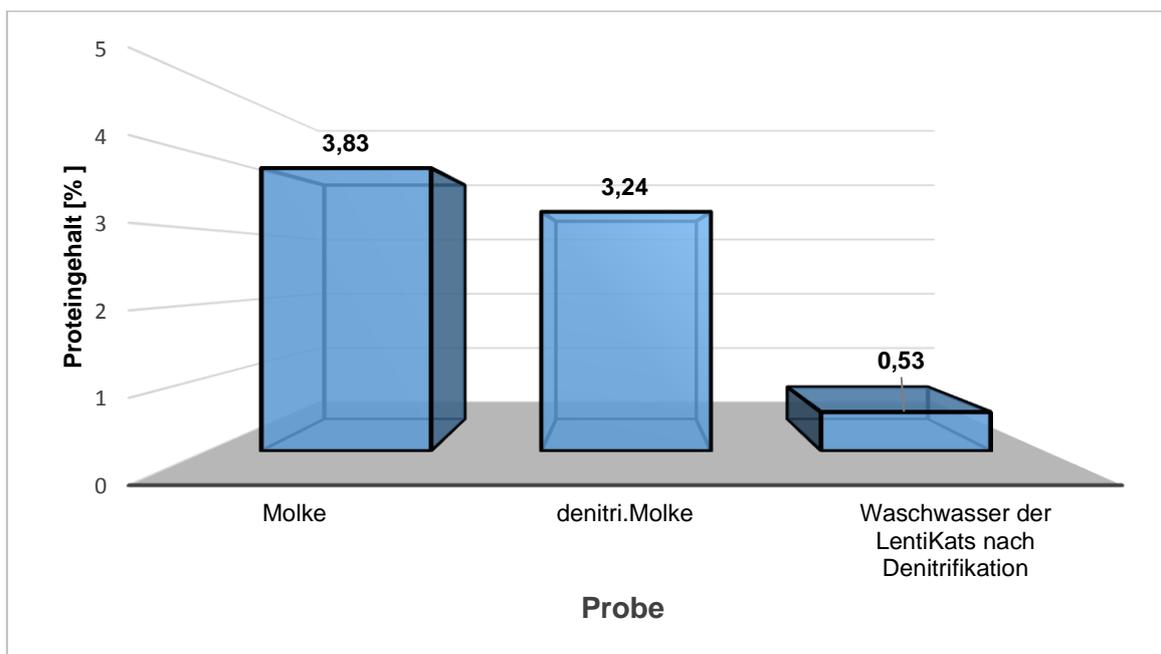


Abbildung 6.4: Proteingehalt nach Denitrifikation durch immobilisierte Mikroorganismen *P. denitrificans* (LentiKats), denitri. Molke = denitrifizierte Molke

Die Abbildung 6.4 zeigt den Proteingehalt in unbehandelter Molke im Vergleich zu denitrifizierter Molke. Das denitrifizierte Molkekonzentrat weist einen geringeren Proteingehalt als das native Konzentrat auf. Ein Teil der fehlenden Proteine können im Waschwasser der LentiKats® nachgewiesen werden. Das heißt: der größte Teil der in Verlust gegangenen Molkeproteine lassen sich im Waschwasser der LentiKats® wiedergewinnen.

Beim Proteingehalt von denitrifizierter Molke wurden nicht nur die Molkeproteine aus biologischen Denitrifikationsverfahren, sondern auch aus chromatographischer Nitratbreicherung untersucht. Zur Herstellung von denitrifizierter Molke mittels chromatographischer Verfahren wurde eine 30 cm Säule mit 15 mL des stark basischen Anionenaustauschers XA 455 der Firma Applexion befüllt. Unter XA 455 versteht man einen makroporösen stark basischen Anionenaustauscher mit quaternären Ammoniumverbindungen, der speziell zur selektiven Nitratentfernung aus Trinkwasser optimiert ist, um Nitrate vor Sulfaten mit einer höheren Kapazität als konventionelle Austauscherharze zu entfernen [2]. Mit einem Volumenstrom von 4 mL/min wurde Molke durch die mit Anionenaustauscher befüllte Säule gepumpt und die nitratfreie Molke wurde gesammelt. Zur Bestimmung des Proteingehalts mittels Kjeldahl wurde etwa 20 mL des denitrifizierten Molkekonzentrat verwendet. Abbildung 6.5 zeigt den Proteingehalt von denitrifizierter Molke im Vergleich zu der unbehandelten Molke [2].

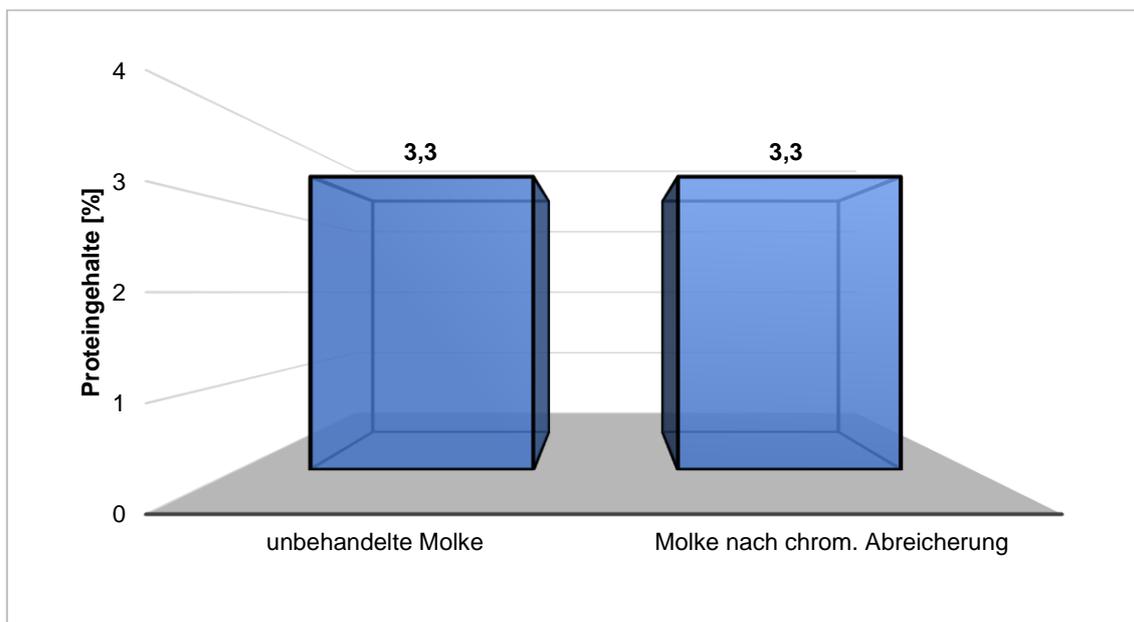


Abbildung 6.5: Gesamtproteingehalte von unbehandelter Molke im Vergleich mit Molke nach chromatographischer Nitratbreicherung (Doppelbestimmung n = 2) [2]

In der Abbildung zeigt sich keine Änderung der Proteinkonzentration der Molke nach chromatographischer Nitratbereicherung. Sie beträgt jeweils vor und nach der Abreicherung 3,3% mit einer Standardabweichung von $\pm 0,1\%$ [2]. Hier bleibt festzustellen, dass man mit diesem Denitrifikationsverfahren keine Molkeproteine verliert.

6.4 Bestimmungen der Lactose-, Glucose-, und Galactosegehalte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Lactose ist ein wertgebender Bestandteil der Molke, deshalb ist es wichtig, bei dem Denitrifikationsprozess keinen Einfluss auf den Lactosegehalt zu nehmen. Lactose gehört zur Gruppe der Disaccharide, die aus den beiden Bestandteilen Glucose und Galactose besteht. Zur Untersuchung der eventuellen Zersetzungsprozesse von Lactose während der Denitrifikation wurden Lactose-, Glucose- und Galactosekonzentrationsmessungen mittels HPLC durchgeführt. Das Ziel dieser Durchführung ist die Veränderung der Lactosekonzentration nach biologischer Denitrifikation mittels *P. denitrificans* zu untersuchen. Um schneller beobachten zu können wie sich die Lactosekonzentration ändert, wurden native *P. denitrificans* verwendet. Jedoch sollte eine Anwendung solcher Mikroorganismen direkt im Kontakt mit zum Verzehr gedachten Lebensmitteln vermieden werden [2].

Unter der Hochdruckflüssigkeitschromatographie, auch Adsorptionschromatographie oder Flüssig-Fest-Chromatographie versteht man eine Trennungsmethode, die auf Basis eines Unterschiedes in der relativen Affinität von in Lösung befindlichen Substanzen zu einer stationären Phase arbeitet. In dieser Arbeit wurde Normalphasenchromatographie verwendet, bei der eine relativ unpolare mobile Phase und ein polares Füllmaterial mit modifizierter Oberfläche als stationäre Phase dient [2]. Zur Lactose-, Glucose- und Galactosebestimmung mittels HPLC wurden biologisch denitrifizierte Proben eingesetzt, bei der alle durchgeführten Proben mit dest. Wasser im Verhältnis 1:150 verdünnt wurden. Danach wurden sie durch eine Membran filtriert und in die HPLC eingesetzt. Die vollständige Beschreibung der Durchführung befindet sich im Anhang (Kap. 8.4). In Tabelle 6.2 zeigen sich angegebenen Konzentrationen von Lactose, Galactose und Glucose als Standardlösung [2].

Tabelle 6.2: Konzentrationen der für die HPLC eingesetzten Standards Lactose, Galactose und Glucose [2]

Standard	Konzentration [g/l]
Lactose	1
Galactose	0,5
Glucose	0,464

Durch die Retentionszeiten der Standardsubstanzen kann man Zucker in der untersuchten Probe identifizieren und ihre Konzentration über eine Integration der Peakflächen berechnen. In der Arbeit wurde eine Einfachbestimmung durchgeführt. Hierzu wurde erst die Veränderung des Zuckers von denitrifizierter Molke nach der biologischen Denitrifikation mittels nativem *P. denitrificans* untersucht. Zur Probenherstellung wurde Molkekonzentrat mit *P. denitrificans* bei einer Temperatur von 30°C inkubiert. Nach 5 h wurde sie entnommen und zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand der Probe verdünnt und anschließend wurde sie mittels HPLC gemessen. Abbildung 6.6 zeigt die Veränderungen der Lactose- und Glucosegehalte für die Denitrifikation mittels nativem *P. denitrificans* im Vergleich zu unbehandelter Molke [2].

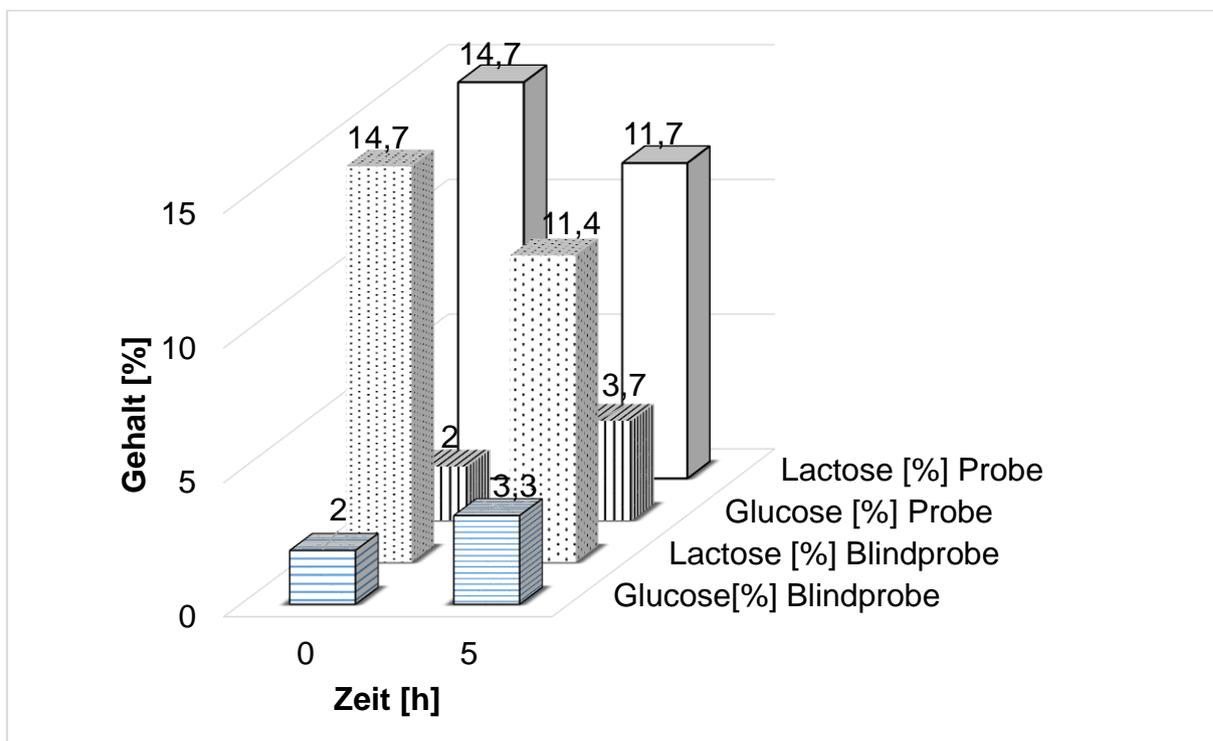


Abbildung 6.6: Ergebnisse der Lactose-, Glucosebestimmung mittels HPLC in mit nativem *P. denitrificans* denitrifizierter Molke bei einer Inkubationstemperatur von 30°C und einer Gesamtinkubationszeit von 5 h (Einfachbestimmung n = 1) [2]

In Abbildung 6.6 sieht man die Ergebnisse der Lactose- und Glucosebestimmung nach Inkubation mit nativem *P. denitrificans* bei einer Inkubationszeit von 5 h. Nach fünfstündiger Inkubation liegt die Lactosekonzentration bei 11,4% in der Blindprobe und bei 11,7% in der denitrifizierten Probe, während die Ausgangskonzentration in der unbehandelten Molke bei 14,7% liegt. Die Verringerung der Lactosekonzentration beträgt in der denitrifizierten Probe sowie in der Blindprobe 20%. Nach 5 h Inkubationszeit steigen die Glukosekonzentration der mitgeführten Blindprobe und der mittels nativem *P. denitrificans* denitrifizierten Probe von 2% auf 3,3% (Blindprobe) und 3,7% (Probe) im Vergleich zu der unbehandelten Molke. Der Differenz von 0,4% konnte auf dem Grund der Abweichung der Messgenauigkeit sein. Hierzu kann man feststellen, dass die Erhöhung von Glucosekonzentrat nicht durch *P. denitrificans* verursachen kann. Allerdings konnte Galactose in keiner untersuchten Probe detektiert werden. Hier ist es vermutlich so, dass die Zersetzungsprodukte wie Glucose und Galactose zum Teil durch Mikroorganismen für den Stoffwechsel verbraucht wurden oder zum Teil zusammen als Glucosepeak eluiert wurden, da die Retentionszeiten von Glucose und Galactose mit 7,0 und 7,3 sehr dicht zusammen liegen [2]. In der Literatur [10] wird beschrieben, dass Lactose entweder durch Lactase im Darm bei Menschen oder auch durch β -Galactosidase von Mikroorganismen gespaltet werden kann. Zu den β -Galactosidase bildenden Mikroorganismen gehören zahlreiche Schimmelpilze, Hefen und Bakterien [10], jedoch nicht der hier verwendete Bakterienstamm *P. denitrificans*, da die Konzentration von Glucose bzw. auch von Lactose bei Anwesenheit von *P. denitrificans* im Vergleich zur Blindprobe gleich blieb. In Molkekonzentrat sind tatsächlich Schimmelpilze und Hefen von 0 bis 20 KBE, durchschnittlich aber von 1 KBE zu finden [92].

6.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die Inhaltstoffe im Molkekonzentrat nach der biologischen Denitrifikation durch direkte Anwendung von immobilisierten Zellen und von nativen Zellen von *P. denitrificans* bestimmt. Im Fall der Untersuchung des Proteingehalts wurde mittels chromatographischem Verfahren denitrifiziertes Molkekonzentrat mit biologisch denitrifiziertem mittels immobilisierten Zellen verglichen.

Der Nitratabbau mittels immobilisierten Zellen von *P. denitrificans* bei einer Temperatur von 30°C verlief schneller als bei geringeren Temperaturen. Zudem war eine Abnahme des Aschegehaltes von denitrifiziertem Molkekonzentrat im Vergleich zu unbehandeltem Molkekonzentrat auf 4% zu beobachten. Ein Fehler aufgrund von Messungenauigkeiten kann bei der Höhe dieses Wertes ausgeschlossen werden.

Mit Hilfe von SDS-Gel wurde eine Bestimmung der Proteinzusammensetzung im Molkekonzentrat durchgeführt. Nach Denitrifizierung der Molke durch native oder immobilisierte Zellen konnte in dieser Arbeit keine Denaturierung der Molkeproteine nachgewiesen werden [2].

Nach Denitrifikation des Molkekonzentrats mittels immobilisierter Zellen wurde eine Proteingehaltsbestimmung durchgeführt, wobei eine Abnahme des Proteingehalts um 14% festgestellt wurde. Um Molkeprotein zurückzugewinnen wurden die LentiKats® nach der Denitrifikation mit dest. Wasser gewaschen. Das proteinhaltige Waschwasser wurde gesammelt und der Molke wieder zugeführt. Im Gegensatz dazu gibt es keinen Verlust von Molkeprotein nach chromatograpischer Denitrifikation [2].

Auch eine Änderung des Zuckergehalts im Molkekonzentrat durch den Denitrifikationsprozess anhand nativer Zellen wurde untersucht. Im Hinblick auf den Erhalt der Lactose als wertgebenden Bestandteil von Molke scheint die Veränderung der Lactose im Molkekonzentrat stattzufinden. Allerdings spielt *P. denitrificans* in diesem Fall keine Rolle, sondern die in Molkekonzentrat vorhandenen Mikroorganismen.

Im Vergleich der natürlich belassenen Molke und der mit *P. denitrificans* versetzten, verringerten sich nach einer Inkubationszeit von 5 h die Lactosegehalte um etwa 20% relativ zur eingesetzten Molke. Dies lässt sich dadurch erklären, dass nach dieser langen Inkubationszeit bereits das Wachstum der von Natur aus in Molke vorhandenen Mikroorganismen eingesetzt hat. Bei der Verminderung des Lactosegehaltes handelt es sich wahrscheinlich um den Verbrauch durch natürliche Mikroorganismen. Die gleichen Konzentrationen in der Probe und in der mitgeführten naturbelassenen Molke nach der Inkubationszeit sprechen hierfür. Außerdem ist es möglich, dass Lactose bei einem Wachstum der Milchsäurebakterien auch säurehydrolytisch gespalten und unter anderem zu Lactat umgesetzt werden kann. Dadurch wird Lactose abgebaut und gleichzeitig Milchsäure gebildet [2]. Um die Verringerung des Lactosegehaltes bzw.

ablaufende Verderbnisprozesse zu vermeiden, sollten Inkubationszeiten so kurz wie möglich sein. Es zeigt sich eine konstante Lactosekonzentration von denitrifiziertem Molkekonzentrat mittels immobilisierten Mikroorganismen nach einer Inkubationszeit von 2 h [2].

7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine biologische Denitrifikation in Molkekonzentrat mittels nativer Zellen und immobilisierter Zellen von *P. denitrificans* untersucht. Ein kombinierter Prozess zur Nitratbreicherung in Molkekonzentrat mittels Anionenaustauscherharzen und mikrobieller Denitrifikation des Eluats aus der Regeneration der chromatographischen Stufe wurde in der Arbeit von Schnitzmeier als einfaches Modell („proof of principle“) verwirklicht [1]. Das Up-Scaling im Labormaßstab war jedoch nicht erfolgreich, da die Abtrennung und Rückführung von Mikroorganismen Schwierigkeiten bereiteten. Dadurch wurde diese Kombination der beiden Verfahrensschritte zur Entfernung von Nitrat im Molkekonzentrat weiterentwickelt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung der mikrobiellen Stufe des Verfahrens bearbeitet. Die Entwicklung der Verfahrensschritte hinsichtlich der chromatographischen Stufe wurde in der Dissertation von Herrn Tippkötter bearbeitet [5]. Beide Verfahren wurden parallel durchgeführt. Wie nachfolgend beschrieben, wurde die Denitrifikation mittels immobilisierter Zellen erforscht. Zudem wurde auch die Änderung der Inhaltstoffe in Molkekonzentrat bzw. die Stabilität der Immobilisate untersucht.

Die für den Nitratabbau notwendigen Enzymsysteme stehen in linearem Zusammenhang mit der gebildeten Biomasse. Aus diesem Grund wurde vor den eigentlichen Versuchen die Zusammensetzung des Kulturmediums optimiert. Eine optimale Biomasseausbeute wurde mit der Zusammensetzung des Kulturmediums nach Tabelle 3.3 bei einem pH-Wert von 7,4, einer Rührgeschwindigkeit von 100 rpm und einer Kultivierungstemperatur von 37°C erzielt.

Dieser Parametersatz lieferte eine Biomasseausbeute von 4,8 g/L und zeigte eine maximale Abbaurate bei der Umsetzung von Nitrat. Diese erhöhte Fähigkeit zur Denitrifikation war auf die Expression des entsprechenden Enzymsystems für den Nitratabbau zurückzuführen [93,94].

Die optimalen mikrobiellen Denitrifikationsbedingungen in einer hohen Salzkonzentration von 35 g/L bzw. im Eluent lagen bei einer Temperatur von 37°C und einem pH-Wert von 7,5. Die Zugabe von Acetat als Elektronendonator war notwendig.

Für die Entwicklung des kontinuierlichen Nitratabbaus standen im Technikum drei Cross Flow Module der Firma Applexion zur Verfügung. Die Abtrennung durch drei Cross Flow Membranen war problemlos. Allerdings ergab sich eine geringere

Abbaurrate von $0,54 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}\text{L}^{-1}\text{min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ bei kontinuierlichem Abbau mittels Cross Flow Modul bei 37°C im Vergleich zur Nitratanreicherung mittels nativer Zellen im Batchversuch von $2,42 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}\text{L}^{-1}\text{min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$. Dies konnte auf einen Aktivitätsverlust von Mikroorganismen durch Scher- und Auftriebskräfte an der Membranoberfläche zurückgeführt werden. In einer größeren Anlage mit einem Arbeitsvolumen von ca. 25 L konnte Nitrat mit einer Rate von $0,34 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}\text{L}^{-1}\text{min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ bei einer Temperatur von $31,5^\circ\text{C}$ abgebaut werden. Aus der Verringerung der Abbaurrate von $0,54 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}\text{L}^{-1}\text{min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ auf $0,34 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}\text{L}^{-1}\text{min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ nach Temperaturänderung von 37°C auf $31,5^\circ\text{C}$ ergibt sich nach der Arrheniusgleichung eine Aktivierungsenergie (E_a) von 66 kJ/mol.

Der biologische Nitratabbau durch immobilisierte Zellen im Batchversuch zeigte bei gleichen optimalen Denitrifikationsbedingungen eine Abbaurrate, die nur etwa halb so hoch liegt wie mit nativen Zellen. Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass sich ein direkter Einsatz der immobilisierten Bakterien im Molkekonzentrat bei dem Batchversuch und auch bei dem kontinuierlichen Versuch als möglich erwies. Allerdings konnten signifikante kleine Mengen an Nitrit nachgewiesen werden und wurden in der kurzen Zeit danach vollständig abgebaut. Bei einer Inkubationstemperatur von 30°C trat die beste Abbaurrate auf. Daher ist es möglich das Verfahren der biologischen Denitrifikation mittels immobilisiertem *P. denitrificans* bei dieser Temperatur zu verwirklichen. Ein Nitratabbau im Molkekonzentrat bei Temperaturen von 15°C und 20°C ist möglich. Allerdings ist hier die Abbaurrate geringer als bei einer Temperatur von 30°C . Die Aktivierungsenergie (E_a) von Immobilisaten zur Denitrifikation in Molkekonzentrat liegt bei 70 kJ/mol. Die Abweichung der Aktivierungsenergie des Nitratabbaus zwischen nativen Zellen und Immobilisaten von 6% entspricht der Messgenauigkeit des Systems. Im Vergleich zu der Verwendung von nativem *P. denitrificans* war die Anwendung von immobilisiertem *P. denitrificans* technisch vorteilhafter aufgrund der einfacheren Abtrennung der Immobilisate aus dem Molkekonzentrat. Die Untersuchung der Stabilität der immobilisierten Zellen zeigte sehr deutlich, dass ihre Stabilität stark von der Temperatur abhängig ist und dadurch war die Inkubationszeit bei verschiedenen Temperaturen sehr unterschiedlich.

Die Inhaltsstoffe der Molkekonzentrate wurden während der beiden angewendeten Denitrifikationsverfahren kaum verändert. Allerdings wurde festgestellt, dass die chromatographische Nitratbreicherung verglichen mit der rein biologischen mit Pellets (LentiKats®) den geringeren Einfluss auf die Zusammensetzung der wertgebenden Bestandteile der Molke hat. Ein weiterer wichtiger Vorteil des Verfahrens ist, dass der direkte Kontakt der Lebensmittel mit Mikroorganismen vermieden werden kann [2].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden umfangreiche Ansätze zum Thema der biologischen Denitrifikation mit Erfolg durchgeführt. Es zeigte sich, dass die biologische Denitrifikation mit immobilisiertem *P. denitrificans* in Molkekonzentrat möglich ist. Eine höhere Temperatur von 30°C lieferte hier auch eine höhere Abbaurrate für Nitrat. Nach längerer Inkubationszeit erschien dabei allerdings ein Nebenprodukt der wärmeanfälligen Molke. Um unerwünschte Produkte durch das Verfahren zu vermeiden, sollte sie während des gesamten Prozesses gekühlt werden. Hierzu sollte ein psychrophiler Denitrifikant verwendet werden. Für die Denitrifikation in Molke ist es sinnvoll bei Temperaturen zwischen 4 und 6°C zu arbeiten [2]. Aus diesen Gründen sollte dieses Immobilisierungsverfahren weiter entwickelt werden, um die Denitrifikation zu optimieren bzw. die wertgebenden Bestandteile von Molke zu erhalten. Heutzutage stehen durch die Möglichkeit der industriellen Herstellung LentiKats® für einen Einsatz im Großmaßstab zur Verfügung.

Die Kombination aus chromatographischer Nitratbreicherung und biologischer Stufe zeigte die besten Resultate im Labormaßstab. Bisher wurde die Nitratbestimmung händisch und ressourcenaufwändig durchgeführt. Für ein Up-Scaling der Nitratbreicherung sollte zukünftig, ein automatisiertes online Verfahren zur Nitratanalytik entwickelt werden, um die Prozessparameter in Echtzeit kontrollieren zu können.

Weiterhin sollten die Inhaltsstoffe von Molke während der biologischen Denitrifikation bzw. des chromatographischen Verfahrens kontrolliert werden, um mögliche Auswirkungen festzustellen. Für die minoren Molkeproteine wie Lactoferrin oder Transferrin war dies mit dem verwendeten Verfahren nicht eindeutig zu erkennen, von daher sollten die minoren Molkeproteine mit einer selektiveren Methode untersucht werden [2]. Des Weiteren sollten andere ernährungsphysiologisch wertvolle Bestandteile wie z.B. die B-Vitamine beobachtet werden.

8 Anhang

8.1 Zusammensetzungen des Mediums

Tabelle 8.1: Komplexes Medium für die Kultivierung von *P. denitrificans* [86]

Bestandteil	Konzentration [g/L]
Pepton	5
Fleischextrakt	3
KH_2PO_4	0,5
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,94
KNO_3	5
Glucose	2

8.2 Cross-Flow Modul

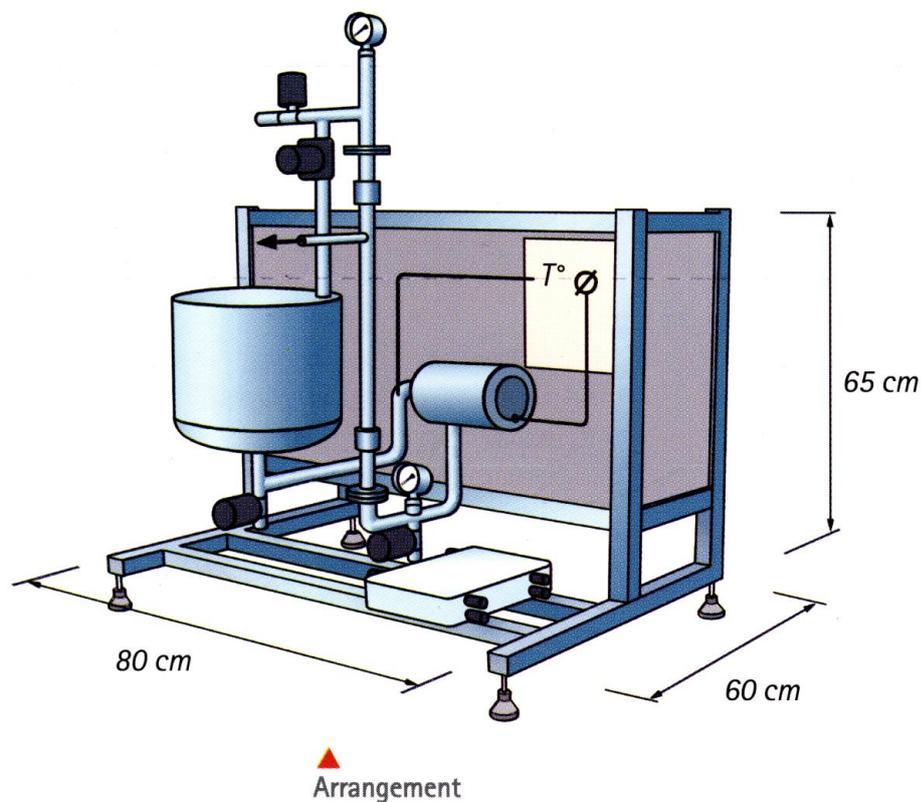
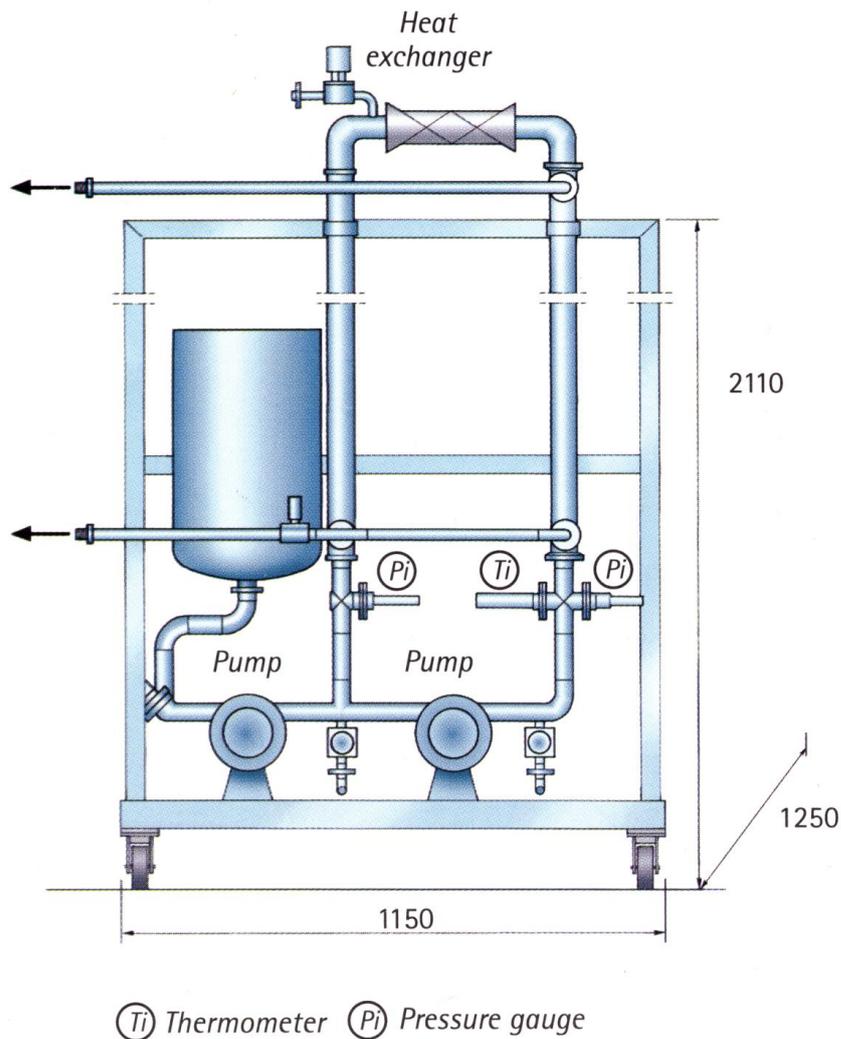


Abbildung 8.1: Mini Pilotanlage mit 5 L Behälter zur biologischen Denitrifikation mittels *P. denitrificans* [74]



▲ Example showing configuration for a «closed loop»

Abbildung 8.2: Filtereinheit der Pilotanlage mit 190 L Behälter zur biologischen Denitrifikation mittels *P. denitrificans* [95]

8.3 Die Lösungzusammensetzung für die Coomassie-Färbungs-Methode [96]

Färbelösung	5 ml Coomassie Stammlösung 4 ml Essigsäure 1 ml dest. Wasser
Waschlösung	9 ml Methanol 3 ml Essigsäure 18 ml dest. Wasser
Fixierlösung	1 ml Glycerin 1 ml Essigsäure 8 ml dest. Wasser

8.4 Bestimmung der Lactose-, Glucose-, und Galactosegehalte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) [2]

Die folgenden Parameter wurden für die Kohlenhydratbestimmung eingestellt:

Flussrate:	1 mL/min
Anfangsdruck:	90 bar
Fließmittel :	Acetonitril : Wasser (80:20)
Injektionsvolumen:	50 µL
Temperatur:	30°C
Säule:	Reprosil-Pur 120 NH ₂ (Porengröße: 120 Å, Korngröße: 5 µm), Nr.: r15aqS25404, Dr. Maisch, 250 x 4mm
Detektion:	Messung des Brechungsindex
Detektor:	RID-6A, Shimadzu
Anlage:	Economy 2/ED Techlab Instruments

8.5 SDS-PAGE

Die verwendete Elektrophoresekammer PhastSystem™ (Pharmacia LKB Biotechnology) besteht aus zwei Einheiten - der horizontalen Laufkammer und der Entwicklungskammer. Mit Hilfe eines Probenkamms werden die Molkeproben auf das Gel aufgebracht. Das Gel besteht aus 6 Bahnen, mit der je 1 µL Probe aufgetragen werden. Als Trenngele verwendet man 12,5%ige Acrylamid-Gele der Firma Amersham Biosciences. Zur Trennung der Proteine wird das Gel nach Auftragen der Probe in die Trennungskammer eingebracht und durch Anlegen von Spannung wird die Trennung der Proteine gestartet [2]. In Tabelle 8.2 sind die Parameter zur Trennung aufgelistet.

Tabelle 8.2: Trennungsmethode mit SDS-Polyacrylamid-Gele (PhastGel Homogen 12,5) [2, 97]

Probenapplikation					0 Vh
Trennungsschritt 1	250 V	10 mA	3 W	15 °C	1 Vh
Trennungsschritt 2	250 V	1 mA	3 W	15 °C	1 Vh
Trennungsschritt 3	250 V	10 mA	3 W	15 °C	95 Vh

Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine wurde das Gel in die Entwicklungskammer überführt. Um Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden die Coomassie-Lösungen verwendet, die über ein programmiertes Pumpsystem in die Entwicklungskammer gepumpt wurden [2].

Die Arbeitsschritte zur Entwicklung der Coomassie-Färbung zur Detektion der aufgetrennten Proteine sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 8.3: Coomassie-Färbung, Methode für SDS-Polyacrylamid-Gele [98]

Schritt	Lösung	Zeit [min]	Temperatur [°C]
1	Färbelösung	8	50
2	Waschlösung	5	50
3	Waschlösung	8	50
4	Waschlösung	10	50
5	Fixierlösung	5	50

Zur Herstellung der Färbelösung benötigt man eine Tablette Phast Gel Blue R. Sie wurde in 80 mL dest. Wasser gelöst und 10 min gerührt. Nach Zugabe von 120 mL Methanol wurde sie für weitere 3 min gerührt. Diese Lösung wird als Coomassie-Stammlösung bezeichnet, die vor dem Einsatz als Färbelösung mit dem gleichen Volumen an 20%iger Essigsäure frisch vor jeder Versuchsdurchführung versetzt wurde. Die Waschlösung besteht aus 30% Methanol und 10% Essigsäure in dest. Wasser und die Fixierlösung aus 10% Glycerin und 10% Essigsäure in dest. Wasser [2].

8.6 Bestimmung der Biomassekonzentration

In dieser Arbeit wurde die Biomassekonzentration indirekt bestimmt. Der Biomasse proportional ist die durch sie hervorgerufene Trübung in einem konstanten Volumen. Diese lässt sich einfach und schnell mittels Photometer bestimmen. Durch eine Suspension von Zellen wird das einfallende Licht gestreut. Dabei nimmt die Intensität des Lichtstrahls beim Gang durch diese Suspension ab. Diese Abnahme lässt sich mit einem Photometer bestimmen.

Durch das Lambert-Beersche-Gesetz (Gl. 8.1) [53] wird der Zusammenhang zwischen der mit dem Photometer messbaren Extinktion (Auslöschung) und der Zellkonzentration beschrieben. Die Extinktion ist direkt proportional zu der Schichtdicke und der Konzentration der Lösung.

$$E = \log \frac{I_0}{I} = s \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. 8.1}$$

E = die Extinktion der Zellen im monochromatischen Licht

I_0 = die Intensität des auf die Messlösung fallenden Lichts

I = die Intensität des aus der Messlösung austretenden Lichts

s = Streukoeffizient (molarer Extinktionskoeffizient)

c = die Konzentration der Zellen

d = Schichtdicke der Lösung.

8.7 Wachstumskurve von *P. denitrificans*

Durch Teilung vermehren sich Bakterien. Die Zellzahl N berechnet man nach n Teilungen zu $N = N_0 \cdot 2^n$ mit N_0 als Anfangszellzahl [51]. Unter Teilungsrate versteht man die Anzahl der Teilungen pro Zeiteinheit und die für einen Teilungszyklus benötigte Zeit ist die Generationszeit.

Die Zellzahl wird nicht häufig in der Praxis betrachtet, stattdessen aber die Zelldichte D , die der Konzentration an Biotrockenmasse entspricht [99]. Die zeitliche Änderung der Zelldichte ist proportional zur Zelldichte D im Fall des ungehemmten Wachstums:

$$\frac{dD}{dt} = \mu \cdot D \quad \text{(Gl. 8.2)}$$

μ = die Wachstumsrate

Das Wachstum in einer statischen Kultur lässt sich entsprechend dem Konzentration-Zeit-Gesetz einer Reaktion erster Ordnung zuordnen:

$$D = D_0 \cdot e^{\mu t} \quad \text{(Gl. 8.3)}$$

D_0 = Zelldichte zur Zeit $t=0$

Dieses Wachstum lässt sich in verschiedene Phasen unterteilen:

- 1) Anlaufphase oder *lag-Phase* ist die Phase, in der sich die Bakterien nach dem Animpfen zunächst an die neuen Bedingungen des Mediums adaptieren müssen.
- 2) exponentielle Phase ist die Phase, die auch ungehemmtes Wachstum (gemäß Gl. 8.3) genannt wird.
- 3) stationäre Phase ist die Phase, in der kein weiteres Wachstum stattfindet.
- 4) Absterbe-Phase ist die Phase, in der die Bakteriendichte abnimmt.

In Abbildung 8.3 handelt es sich um einen prinzipiellen Verlauf der Wachstumskurve bei logarithmischer Auftragung [51]:

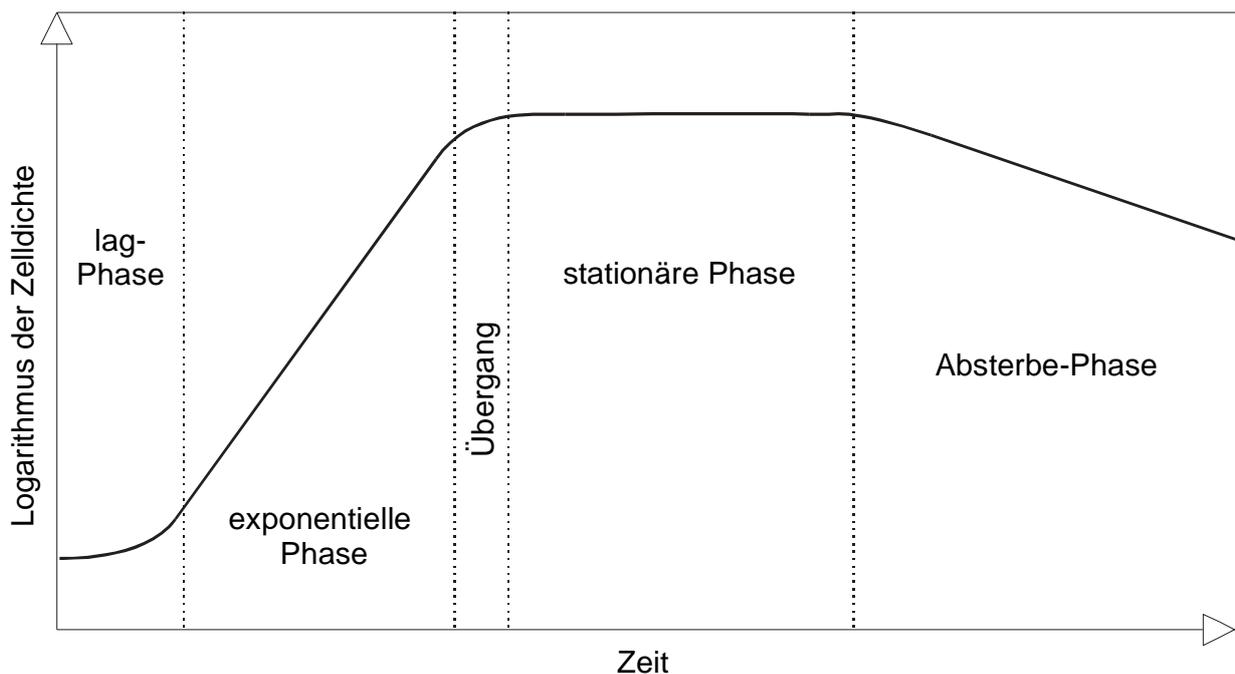


Abbildung 8.3: Schematische Darstellung der Wachstumskurve einer Bakterienkultur [51]

Der Ertrag X , die (exponentielle) Wachstumsrate μ und die Anlaufzeit t_l gehören zu wichtigen Parametern der Wachstumskurve

- Der Ertrag X wird definiert als der Unterschied zwischen der maximalen und der anfänglichen Zelltrockenmasse.

- Die Wachstumsrate lässt sich aus dem exponentiellen Teil der Wachstumskurve ermitteln. Die Steigung der Geraden ergibt sich bei Auftragung des natürlichen Logarithmus der Zelldichte gegen die Zeit. Aus der Wachstumsrate berechnet man die Verdopplungszeit t_d (Gl.8.5):

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t - t_0} \quad \text{(Gl. 8.4)}$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{(Gl. 8.5)}$$

- Unter der Anlaufzeit versteht man die Zeitdifferenz zwischen dem Erreichen einer bestimmten Zelldichte nach optimalem Wachstum und derselben Zelldichte nach Wachstum unter realen Bedingungen. Man kann sie nach Gl. 8.6 berechnen.

$$t_1 = t_r - \frac{\ln D_r - \ln D_0}{\mu} \quad \text{(Gl. 8.6)}$$

Die für diese Arbeit benötigten Biomassen zur Denitrifikation wurden stets in statischer Kultur herangezogen (siehe in Kapitel 3).

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Produktion von Käse in Deutschland	5
Abbildung 2.2:	Produktion von Molkeerzeugnisse in 1000 t	7
Abbildung 2.3:	Schematischer Verlauf der mikrobiellen Nitratreduktion [2]	11
Abbildung 2.4:	Verschiedene Energiequellen bei verschiedenen Wachstumsbedingungen von <i>P. denitrificans</i>	13
Abbildung 2.5:	Elektronentransport im Cytoplasma von <i>P. denitrificans</i> bei aerober und anaerober Atmungskette [1]	14
Abbildung 2.6:	Hanes-Woolf-Darstellung der Michaelis-Menten-Gleichung [36]	16
Abbildung 2.7:	Methoden der Immobilisierung von Biokatalysatoren [40, 41]	17
Abbildung 2.8:	Reaktortypen für den Einschluss von Biokatalysatoren [40]	18
Abbildung 2.9:	Schematische Abbildung von LentiKats [®] Träger [45]	19
Abbildung 3.1:	Kalibrierung für die Bestimmung der Biotrocknensmasse von <i>P. denitrificans</i> aus der Extinktion bei 660 nm	24
Abbildung 3.2:	Zelldichte bei der Anwendung von Anaerocult [®] A für anaerobe Bedingungen nach 20 h Kultivierungszeit, T= 37°C	25
Abbildung 3.3:	Biomasse nach 20 h Kultivierungszeit bei verschiedenen Temperaturen, Rührgeschwindigkeiten und Peptonarten	26
Abbildung 3.4:	Biomasse nach 20 h Kultivierungszeit bei verschiedenen Konzentrationen von Glucose, T=37°C, pH=7,5, c(KNO ₃) = 5 g/L	27
Abbildung 3.5:	Biomasse nach 20 h Kultivierungszeit bei verschiedenen Konzentrationen von KNO ₃ und Glucose, T= 37°C, pH = 7,5, n=3	29
Abbildung 3.6:	Zellwachstumskurve von <i>P. denitrificans</i> bei verschiedenen Konzentration von KNO ₃ und Glucose	30
Abbildung 3.7:	Biomasse nach 20h Kultivierungszeit bei verschiedenen Konzentrationen von NaCl, T = 30°C	31
Abbildung 4.1:	Zeitverlauf der Nitratkonzentrationen während des Nitratabbaus mit verschiedenen Biotrockenmasse, T= 37 °C, bei verschiedenen pH-Werten	38

Abbildung 4.2:	Nitrat- und Nitritkonzentration bei der Denitrifikation mit aerob und anaerob gewachsenen Zellen, 30°C, Acetat als Elektronendonator, physiologische Kochsalzlösung (9 g/L), pH 7,5	39
Abbildung 4.3:	Abbauraten für Nitrat mit anaerob gewachsenen Zellen in einem Medium mit verschiedenen KNO ₃ -Konzentrationen bei 37°C und Acetat als Elektronendonator in Kochsalzlösung 35 g/L.	41
Abbildung 4.4:	Bestimmung der v_{max} und K_m durch Auftragung von $[S]/v$ gegen $[S]$ von Hanes-Woolf-Darstellung der Michaelis-Menten-Gleichung	42
Abbildung 4.5	Aufbau von Ray Flow Modul der Firma Applexion	44
Abbildung 4.6:	Versuchsaufbau des kontinuierlichen biologischen Nitrat-abbaus in Salzkonzentration von 35 g/L, T= 37 °C, pH = 7,5	45
Abbildung 4.7:	native Zellen, kontinuierliche Denitrifikation, in Kochsalzlösung (35 g/L NaCl), Ray Flow Membran PVDF 40 kDa (c(Nitrat) 200 mg/L, Flussrate 10 ml/min), BTM 3,88 g/L, bei Temperatur von 37°C, pH = 7,5, c (Acetat) = 250 mg/L	46
Abbildung 4.8:	Schematische Darstellung der Kombination von Anionenaustauscher und Denitrifikation zur Nitratentfernung aus Molke	48
Abbildung 4.9:	Ein Verfahrensfließbild der Anlage im Technikum	50
Abbildung 4.10:	Anlage für die Kombination der chromatographischen und biologischen Stufe zur Denitrifikation von Molkekonzentrat	51
Abbildung 4.11:	Mini Pilotanlage der Fa. Novasep für die biologische Denitrifikation mittels <i>P. denitrificans</i>	52
Abbildung 4.12:	Nitratabbau in einem geschlossenen CF-System	53
Abbildung 4.13:	Verlauf der Nitrit- und Nitratkonzentrationen und des pH-Werts am Reaktorausgang während eines kontinuierlichen Denitrifikationsbetriebs über 255 h protokolliert wurde.[5]	54
Abbildung 4.14:	biologische Denitrifikation Anlage(links), 190 L Gefäß als Bioreaktor (Mitte), Keramik Membran (rechts)	56

Abbildung 4.15:	Verlauf von Nitrit- und Nitratkonzentrationen am Reaktor- ausgang der Pilotanlage	57
Abbildung 4.16:	Verlauf des Nitratabbaus im Reaktor der Pilotanlage. Nitratkonzentration 4 g/L, T=31°C	58
Abbildung 5.1:	LentiKats®Printer (a), Auftropfeinheit mit etwa 400 massiven Stahlstiften (b), getrocknete LentiKat® auf einer Petrischale (c), LentiKats® mit Durchmesser von 3mm	65
Abbildung 5.2:	Zeitlicher Verlauf der Eindiffusion von Nitrat in LentiKats® bei Temperaturen von 30 °C und 37 °C	66
Abbildung 5.3:	LentiKat® ohne Protein (Negativprobe) [86]	67
Abbildung 5.4:	immobilisierte Molke und Molkeproteine a) Molke b) BSA c) β-Lactoglobulin (LG) d) α-Lactalbumin (LA) nach Färbung mit dem Coomassie-Reagenz [86]	67
Abbildung 5.5:	Versuchsaufbau zur Denitrifizierung mittels Immobilisate mit Hilfe von Biostat Q	68
Abbildung 5.6:	Konzentrationsverläufe des Nitrats im Eluent mit immobi- lisierten Zellen bzw. LentiKats ohne Zellen, T = 38,5 °C, c _{Acetat} = 250 mg/L als Elektronendonator, BTM = 0,65 g ,c _{NO₃} = 527 mg/L, ohne Puffer, Volumenstrom = 0,7 ml/min	69
Abbildung 5.7:	Verläufe der Konzentrationen von Nitrat bzw. Nitrit in Molke- konzentrat für die Denitrifikation mit immobilisierten Zellen in Batchversuch bei T= 25,5°C (RT) bzw. 30°C , eingesetzte BTM = 3,6 g/L	71
Abbildung 5.8:	Verläufe der Konzentrationen von Nitrat bzw. Nitrit in Molkekonzentrat für die Denitrifikation mit immobilisierten Zellen bei Temperaturen von T = 10 °C, 15 °C und 20 °C, eingesetzte BTM = 10 g/L	72
Abbildung 5.9:	Versuchsaufbau	73
Abbildung 5.10:	Nitrit- und Nitratkonzentration bei kontinuierlicher Betriebs- weise des Reaktors bei T = 30°C mit BTM = 1,55 g, Arbeitsvolumen = 200 mL ,Durchflussrate bzw. Flussrate = 2 mL/min	74

Abbildung 5.11	Zeitlicher Verlauf der Nitratkonzentration bei Einsatz immobilisierter Zellen bei verschiedenen pH-Werten	75
Abbildung 5.12:	Bestimmung von v_{\max} und K_m durch Auftragung von S/v gegen S (Hanes-Woolf-Darstellung) bei Einsatz immobilisierter Bakterien, $T=37^\circ\text{C}$, $c(\text{NaCl}) = 35 \text{ g/L}$, $\text{pH}=7,5$ und $c(\text{Acetat}) = 250 \text{ mg/L}$	76
Abbildung 5.13:	Gesamtproteinbestimmung der Bradford-Methode in LentiKats [®] , nach unterschiedlicher Lagerungszeit in Phosphat-Pufferlösung (akkumulierte Proteine bei verschiedenen Lagerungszeit); NW: nicht gewaschen nach Inkubation, W: gewaschen mit dest. Wasser nach Inkubation	78
Abbildung 5.14:	Extinktion (bei 660 nm) des Kulturmediums, in welchem die LentiKats [®] inkubiert wurden, über einen Zeitraum von 95 h.	79
Abbildung 5.15:	KBE- Bestimmung zur Untersuchung von Mikroorganismen in Molkekonzentrat nach Denitrifikation in kontinuierlichem Versuch und in Batchversuch, bei $T= 30^\circ\text{C}$	81
Abbildung 6.1:	SDS-Gel der Molkeproteine mit Standard- Vergleichen	85
Abbildung 6.2:	SDS-Gel Molkeproben (direkte Inkubation mit <i>Paracoccus</i>)	85
Abbildung 6.3:	SDS-Gel zur Trennung von Molkeproben nach Inkubation mit nativem und immobilisiertem <i>P. denitrificans</i> nach Coomassie-Färbung	86
Abbildung 6.4:	Proteingehalt nach Denitrifikation durch immobilisierte Mikroorganismen <i>P. denitrificans</i> (LentiKats), denitri. Molke = denitrifizierte Molke	87
Abbildung 6.5:	Gesamtproteingehalte von unbehandelte Molke im Vergleich mit Molke nach chromatographischer Nitratanreicherung (Doppelbestimmung $n = 2$)	88
Abbildung 6.6:	Ergebnisse der Lactose-, Glucose- und Galactosebestimmung mittels HPLC in mit nativem <i>P. denitrificans</i> denitrifizierter Molke bei einer Inkubationstemperatur von 30°C und einer Gesamtinkubationszeit von 5 h (Einfachbestimmung $n = 1$)	90

Abbildung 8.1:	Mini Pilotanlage mit 5 L Behälter von 5 L zur biologischen Denitrifikation mittels <i>P. denitrificans</i>	97
Abbildung 8.2:	Filtereinheit der Pilotanlage mit 190 L Behälter zur biologischen Denitrifikation mittels <i>P. denitrificans</i>	98
Abbildung 8.3:	Schematische Darstellung der Wachstumskurve einer Bakterienkultur	102

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Nährstoffgehalte pro 100 g Süß- und Sauermolke im Vergleich zu Vollmilch [7]	4
Tabelle 2.2:	Export der Milchprodukte aus der Bundesrepublik Deutschland in t	8
Tabelle 2.3:	Verfahren zur Abreicherung von Nitrat	10
Tabelle 2.4:	Korrekturfaktoren für die Nitrat- und Nitritanalytik mit Merck Reflectoquant® in verschiedenen Medien	20
Tabelle 3.1:	Grundsätzliche bzw. ursprüngliche Zusammensetzung von Medium bzw. Agarplatte zur Kultivierung	22
Tabelle 3.2:	Parameter des anaeroben Wachstums von <i>P. denitrificans</i> (G: Glucose [g/L], N: KNO ₃ [g/L]; z.B. G5N1: Glucose 5 g/L, KNO ₃ 1 g/L)	30
Tabelle 3.3:	optimales komplexes Medium für die Kultivierung von <i>P. denitrificans</i>	32
Tabelle 4.1:	Kontinuierlicher Nitratabbau bei verschiedenen Nitratmasse	45
Tabelle 4.2:	Ergebnisse der KBE-Bestimmung der flüssigen Harzkugelsuspensionen zur Untersuchung der Reinigungsmittel 20% Ethanol, 0,5 M Natronlauge, 0,5 M Salzsäure und 1 M Salzsäure bei verschiedenen Standzeiten der Austauschersäule	59
Tabelle 4.3:	Konstruktion- und Leitungsdaten der Entwicklung einer Technikumanlage	62
Tabelle 5.1:	Arbeitsschritte für Coomassie- Färbung	67
Tabelle 5.2:	Zusammenfassung der Kinetik der Denitrifikation mittels nativen Zellen und immobilisierten Zellen von <i>P. denitrificans</i>	77
Tabelle 6.1	Aschegehalt von Molkekonzentrat vor bzw. nach Denitrifikation	83
Tabelle 6.2:	Konzentrationen der für die HPLC eingesetzten Standards Lactose, Galactose und Glucose	90
Tabelle 8.1:	Komplexes Medium für die Kultivierung von <i>P. denitrificans</i>	97
Tabelle 8.2:	Trennungsmethode mit SDS-Polyacrylamid-Gele (PhastGel Homogen 12,5)	99
Tabelle 8.3:	Coomassie-Färbung, Methode für SDS-Polyacrylamid-Gele	100

11 Literaturverzeichnisse

- 1 Schnitzmeier D. (2003) „Nitratanreicherung in Molke und Molkenkonzentrat zum wertgesteigerten Einsatz der Molkenprodukte“, Dissertation, Univ. of Hannover
- 2 Keller, D. (2006) Denitrifikation von Molke- Untersuchungen in Hinblick auf die wertgebenden Bestandteile und die Mikrobiologie, Diplomarbeit, Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik, Technische Universität Kaiserslautern
- 3 Ulber, R. (2002) Biotechnologische Methoden zur effizienteren Rohstoffnutzung Habilitation, Universität Hannover
- 4 Kinkel, D., Scheper, T., Ulber, R. (2007) Molke zur optimalen Weiterverarbeitung, *LVT Lebensmittel Industrie* , 52. Jahrgang , 4, 54- 55
- 5 Tippkötter, N. (2010) Reaktionssysteme zur Aufarbeitung und Umsetzung nachwachsender Rohstoffe, Dissertation, TU Kaiserslautern
- 6 Roempp Chemie Lexikon (1998), Lebensmittelchemie 9. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
- 7 Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin (2004), Jahrgang 55, Nr.11
- 8 Molke, <http://de.wikipedia.org/wiki/Molke>: Abrufdatum 24.08.2015
- 9 Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2001) Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 5., vollständig überarbeitete Auflage, Springer Verlag, Berlin
- 10 Römpf Lexikon Eisenbrand (2006) Thieme Verlag, Stuttgart
- 11 Produktion von Milcherzeugnis in Deutschland, Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle für Erzeugnisse der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft GmbH, Bonn, <http://www.zmp.de>, Abrufdatum 19.08.2015
- 12 Umsatz Biolac, <http://de.statista.com/unternehmen/111415/biolac-gmbh-co-kg>, Abrufdatum 08.05.2016
- 13 Produkte von Biolac, www.biolac.de, Abrufdatum am 05.05.2016
- 14 Anzahl der Unternehmen Molkepulver, <http://www.wlw.de/trffer/molke.html>, Abrufdatum am 05.05.2016
- 15 Aussenhandel_Export_Import_DE_Mopro_2013_2014_Homepage, Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle für Erzeugnisse der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft GmbH, Bonn, <http://www.zmp.de>, Abrufdatum 20.08.2014

- 16 Aussenhandel_Export_Import_DE_Mopro_2014_2015_Homepage, Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle für Erzeugnisse der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft GmbH, Bonn, Abrufdatum 05.05.2016
- 17 Wolters (1982), Übersicht über die Stickstoffquellen Nitrat-Nitrit-Nitrosamine, Verlag Chemie Weinheim
- 18 Nitrat-Grundwasser- Belastung, Abrufdatum am 16.09.2016
<http://www.zeit.de/wissen/umwelt/2016-09/nitrat-grundwasser-trinkwasser-belastung-massentierhaltung>
- 19 Eisenbrand, G., Metzler, M. (2002), Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner Stoffe, Mechanismen und Prüfverfahren 2., aktualisierte Auflage, Wiley-VCH, Weinheim
- 20 Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung) i.d.F. vom 21. Mai 2001 BGBl. I S. 959, geändert durch Artikel 263 der Verordnung vom 25. November 2003, BGBl. I S. 2304
- 21 Verordnung über diätetische Lebensmittel (Diätverordnung), i. d. F. vom 28. April 2005 BGBl. I Nr. 25 vom 06.05.2005 S. 1161
- 22 Hoek, J.P. van der, Klapwuk, A. (1987) Nitrate Removal From Ground Water, *Wat. Res.*, Vol. 21, No.8
- 23 Schnitzmeier, D., Buchholz, H., Denzler, H.-J., Ulber, R. (2002) Gekoppeltes chromatographisches und biologisches Verfahren zur Nitratanreicherung in flüssigen Lebensmitteln, *Chemie Ingenieur Technik*, 24
- 24 Sorg, T. J., (1979) Nitrate removal from drinking water. Paper presented at EPA seminar on nitrates in ground water, Kansas City, 3-4 October, 1979
- 25 Sontheimer, H., Rohmann, U. (1984) Grundwasserbelastung mit Nitrat-Ursachen, Bedeutung, Lösungswege. *GWF- Wass. Abwass.* 125, 599-608
- 26 Bae, B.-U. , Jung , Y.-H. , Han, W.-W., Shin , H.-S. (2002) Improved brine recycling during nitrate removal using ion exchange, *Wat. Res.*, 36, 3330-3340
- 27 Hoek, J.P. van der, Ven, P. J. M. van der, Klapwuk, A. (1988) Combined ion exchange/ biological denitrification for nitrate removal from ground water under different process condition, *Wat. Res.*, Vol 22, No. 6, 679-684
- 28 Clifford, D., Lui, X. (1993) Biological denitrification of spent regenerant brine using a sequencing batch reactor, *Wat. Res.*, Vol.27, No.9, 1477-1484

- 29 Crack, J. C., -Hutchings, M. I., -Thomson, A. J., - Brun, N. E. Le (2016) Biochemical properties of *Paracoccus denitrificans* FnrP: reactions with molecular oxygen and nitric oxide, *J Biol Inorg Chem*, 20, 71-82
- 30 Qu, Z., Bakken, L. R., Molstad, L., Frostegård, A., Bergaust, L. L. (2016) Transcriptional and metabolic regulation of denitrification in *Paracoccus denitrificans* allows low but significant activity of nitrous oxide reductase under oxic conditions, *Environmental Microbiology*, 18(9), 2951-2963
- 31 Davis, D. H., Doudoroff, M., Stanier, R. Y. and Mandel, M. (1969) Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications, *Int. J. Syst. Bacteriol*, 19
- 32 Nokhal, T. H. A. A. (1981) *Paracoccus denitrificans*: Neuisolation und Untersuchungen zur Taxonomie und Stoffwechselfysiologie, Dissertation, Landwirtschaftlichen Fakultät, Georg- August- Universität, Göttingen
- 33 Van Verseveld, H.W., Stouthamer, A.H. (1991), *The Genus Paracoccus*, *The Prokaryotes – A Handbook of the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications* Springer-Verlag, New York
- 34 Stroh, A. (2004) *Isolierung und Charakterisierung der Atmungskette-Superkomplex von Paracoccus denitrificans*
- 35 Weide, H., Aurich, H. (1979), *Allgemeine Mikrobiologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- 36 Chmiel H., (1991) *Bioprozesstechnik „Einführung in die Bioverfahrenstechnik“*, 2., neu bearbeitete Auflage, Spektrum Akademischer Verlag
- 37 Schwarz, J., (2002) *Optimierung der biologischen Stufe bei der gekoppelten chromatographischen- biologischen Nitratentfernung aus flüssigen Lebensmitteln*, Diplomarbeit, Hannover
- 38 Hartmeier, W.(1986) *Immobilisierte Biokatalysatoren*, Springer Verlag, Heidelberg
- 39 Schmidt, R.(1991) *Herstellung und Charakterisierung formselektiver heterogener Biokatalysatoren mit immobilisierten Mikroorganismen*, Dissertation Univ.Erlangen- Nürnberg
- 40 Woodward, J. (1985) *Immobilised cells and enzymes a practical approach*, IRL Press Limited, England
- 41 Bickerstaff (1997) *Immobilization of Enzymes and Cells*

- 42 Wittlich, P. (2001) Biotechnische Herstellung von 1,3-Propanediol aus Glycerin mit immobilisierten Zellen von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 und thermophilen Mikroorganismen, Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
- 43 Membranreaktor, <http://Wikipedia.org>, Abrufdatum: 31.08.2015
- 44 Fritzsche, M.(2001) Denitrifikation von Molke, Diplomarbeit, Universität Hannover
- 45 Krasňan, V., Radek Stloukal, Michal Rosenberg, Martin Rebro š (2016), Immobilization of cells and enzymes to LentiKats®, Appl Microbiol Biotechnol
- 46 Genialab Biotechnologie Produkte und Dienstleistungen GmbH (2002), LentiKats: Tips & Tricks, Broschüre, Braunschweig
- 47 Genialab Online im Internet <http://www.genialab.de>, Abrufdatum: 13.03.2017
- 48 Anleitung Refletoquan Nitrat-Nitrit-Test
- 49 Nitrat-Nitrit-Test nach DIN38405
- 50 DSMZ – List of Media ,Nährmedium für *Paracoccus denitrificans*
<http://www.dmsz.de/media/med001.htm>, Abrufdatum: 22.03.2006
- 51 Schlegel, H.G. (1992) Allgemeine Mikrobiologie, 7. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart; New York
- 52 Baumann, B., Snozzi, M., Zehnder, A. J. B. (1996) Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes, *Journal of Bacteriology*, Vol. 178, No.15
- 53 Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W. (1987) Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum, 2. völlig überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- 54 Datenblatt Anaerocult®A, Firma Merck KGaA, Darmstadt
- 55 Datenblatt von Bacto Peptone, Abrufdatum am 03.09.2015
https://www.bdbiosciences.com/documents/Bacto_Peptone.pdf
- 56 Datenblatt für Peptone aus Soja , Abrufdatum am 03.09.2015,
<https://www.carlroth.com/Pepton-aus-Soja>
- 57 Su, Y., Zheng, X., Chen, X., Chen, Y., He, G., Chen, H. (2015) Hydroxyl functionalization of single-walled carbon nanotubes causes inhibition to the bacterial denitrification process, *Chemical Engineering Journal* 279, 47–55

- 58 Yang- Hee C., (1994) Entwicklung von Gel- in- Matrix (GIM)- Systemen zur Immobilisierung von *Paracoccus denitrificans* DSM 65, Dissertation, Technische Universität Berlin
- 59 Glass, C., Silverstein, J.A., Oh, J. (1997) Inhibition of denitification in activated sludge by nitrite, *Water Environment Research*, 69
- 60 Van Versefeld, H.; Meijer, E.; and Stouthamer, A. (1977) Energy Conservation During Nitrate Respiration in *Paracoccus denitrificans*. *Arch. Microbiol.*, 112, 17.
- 61 Baccari, M., Passion, R., Ramadori, R., Tandoi, V. (1983) Kinetics of Dissimilatory Nitrate and Nitrite reduction in Suspended Growth Culture, *J. Water Pollut. Control Fed.*, 55, 58
- 62 Chen, S., Juaw, C., Cheng, S. (1991) Nitrification and Denitrification of High-Strength Ammonium and Nitrite Wastewater with Biofilm Reactors, *Water Sci. Technol.*, 23, 1417
- 63 Remmer, P. (1992) Herstellung, Charakterisierung und Einsatz neuer Polymergelperlen als Biokatalysatoren zur kontinuierlichen Denitrifikation von Trinkwasser in einer dazu entwickelten Reaktorkaskade, Dissertation, Technische Universität Carolo- Wilhelmina zu Braunschweig
- 64 Thomson, J.K., Geest, T., Cox, R.P. (1994) Mass Spectrometric of the Effect of pH on the Accumulation of Intermediates in Denitrification by *Paracoccus denitrificans*, *Applied And Environmental Mikrobiology*, Vol. 60
- 65 Chang C.-C., Tseng, S.-K., (1998) The optimum condition for autotrophic denitrification by *Paracoccus denitrificans*, *Journal of the Chinese Institute of Environmental Engineering*, 8, 223-237
- 66 Pauline M. Doran, (1997) *Bioprocess Engineering Principles*, Academic Press
- 67 Reznia, B., Cuicek, N., Oleszkiewicz, J.A. (2005) Kinetics of Hydrogen-Dependent Denitrification Under Varying pH and Temperature Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 92, 7, 901-906
- 68 Peyton B. M., Mormile M. R., and Petersen J.N. (2001) Nitrate reduction with *Halomonas Campisalis*: Kinetics of denitrification at pH 9 and 12,5% NaCl. *Wat. Res.*, Vol. 35, Nr. 17, 4237-4242
- 69 Vasiliadou, I.A., Siozios, S., Papadas, I.T., Bourtzis, K., Pavlou, S., Vayenas, D.V. (2006) Kinetics of Pure Cultures of Hydrogen- Oxidizing Denitrifying

- Bacteria and Modeling of the Interactions Among Them in Mixed Cultures, *Wiley InterScience*
- 70 Marazioti, C., Kornaros, M., Lyberator, G. (2003) Kinetics modeling of a mixed culture of *Pseudomonas Denitrificans* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anoxic operating conditions, *Water Research*, 37
- 71 Craske, A. und Ferguson, S. J. (1986) The respiratory nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans* Molecular characterisation and kinetic properties, *Eur.J.Biochem.* 158, 429-436
- 72 TU Braunschweig Brenda [Online], <http://www.brenda-enzymes.org>.
- 73 Storhas W., (2003) Bioverfahrensentwicklung, Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- 74 Datenblatte Orelis Versatile Orelis mini pilot, Orelis Group Novasep (2005)
- 75 Liu, C., Zhao, C., Wang, A., Guo, Y, Lee, D.-J. (2015) Denitrifying sulfide removal process on high-salinity wastewaters, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 99, 6463-6469
- 76 Datenblatt Austauscherharz XA 455, Firma Applexion
- 77 Emig G., Klemm E. (2005) Technische Chemie „Einführung in die Chemische Reaktionstechnik“, 5.,aktualisierte und ergänzte Auflage, Springer Verlage Berlin
- 78 Tippkötter, N., Roikaew, W., Ulber, R. (2008) Nitrat remove from whey concentrate with biotechnological regeneration of the waste water, EDM European Dairy Magazine Daily & Fluid Foods Technology, Verlag TH. MANN, Gelsenkirchen
- 79 Denzler, H.J., Firma Biolac, Harbansen, Mündliche Mitteilung 03.2006
- 80 Henze,M., Harremes,P., Jansen,C., Arvin,E. (1997) Wastewater Treatment Biological and Chemical Process,2.Edition,Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- 81 Yang, P.Y., Nitorisavut, S., and Wu, J.S. (1995) Nitrate removal using a mixed-culture entrapped microbial cell immobilization process under high salt condition. *Wat. Res.*29, 1525-1532
- 82 Wu, J. S., Nitorisavut, S., Langley, W. G., and Yu, S.F. (1993) Bionitrification of brine waste for ion exchange processing. In *ion exchange Processes: Advances and Applications* (Edited by Dyer A. et al.), pp 191-196. The Royal Society of Chemistry
- 83 Nitorisavut, S., Yang, P. Y.(1992)Denitrification of nitrate- rich water using entrapped mixed–microbial cells immobilization technique. *Wat.Sci.Technol.* 26

- 84 Welander, U., Mattiasson, B. (2003) Denitrification at low temperatures using a suspended carrier biofilm process, *Water Research*, 37
- 85 Jekel, M., Buhr, A., Willke, T., Vorlop, K.-D.(1998), Neuartige Geleinschlussimmobilisate (Lentikats) in der Biotechnologie ,Chemie Ingenieur Technik 70 S.438-441
- 86 Zhang, Z. (2007) Nitratbreicherung in Molke durch immobilisierte Zellen und Untersuchungen der Anreicherung von Molkeproteinen in der Immobilisationsmatrix, Studienarbeit, Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik, Technische Universität Kaiserslautern
- 87 Trögl, J., Bousková, A., Mrákota, J., Pilarová, V., Krudencová, J., Mechurová, J., Krizenecká, S., Stoukal, R. (2011) Removal of nitrates from simulated ion-exchange brines with *Paracoccus denitrificans* encapsulated in Lentikats Biocatalyst, *Desalination*, 275, 82-86
- 88 J. Trögl, J., Krhutkova, O., Pilarová, V., Dánová, P., Holíček, R., Kohlová, M., Hejda, S., Smrcka, J., Bousková, A., Kriklavova, L. (2012) Removal of nitrates from high-salinity wastewaters from desulphurization process with denitrifying bacteria encapsulated in Lentikats Biocatalyst, *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 9, 425–432
- 89 Job, G., Rüffler, R. (2011) *Physikalische Chemie*, Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, 1. Auflage, S.401-402
- 90 Welter, K. (2000) *Biotechnische Produktion von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen mit immobilisierten Zellen*, Dissertation, TU Carolo-Wilhelmina, Braunschweig
- 91 Matissek, R., Schnepel F.-M., Steiner, G. (1992) *Lebensmittelanalytik, Grundzüge Methode Anwendungen*, 2. Auflage, Springer- Verlag Berlin
- 92 Persönliche Mitteilung von Herr Hofman, Biolac GmbH, 2006
- 93 Lam, Y. & Nicholas, D. J. D. (1969) Aerobic and Anaerobic Respiration in *Micrococcus denitrificans* *Biochem. Biophys. Acta*, 172, 450-461
- 94 Meijer, E. M., van der Zwaan, J. W., Wever, R. and Stouthamer, A. H. (1979) Anaerobic Respiration and Energy Conservation in *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* 96, 69-76
- 95 Datenblatte Orelis Multi-functional pilots for scaling up Carbosep® S7 and KARASEP™ K01B, Orelis Groupe Novasep (2005)

- 96 Chrambach, A., Reisfeld, Ra., Wyckoff, M., et al (1967), A Procedure For Rapid And Sensitive Staining of Protein Fractionated By Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Anal. Biochem., 20, 150-154
- 97 SDS-PAGE in homogeneous media, Separation Technique File No. 111, Phast System™, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala Schweden
- 98 Fast Coomassie staining, Development Technique File No. 200, Phast System™ Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala Schweden
- 99 H. Weide / H. Aurich (1979), Allgemeine Mikrobiologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

12 Angabe der Person

12.1 Betreuung der Diplomarbeit & Studienarbeit im Rahmen dieser Arbeit

- D. Keller Denitrifikation von Molke -Untersuchungen in Hinblick auf die wertgebenden Bestandteile und die Mikrobiologie-, Diplomarbeit, TU Kaiserslautern, WS (05/06)
- Z. Zhibin Nitratanreicherung in Molke durch immobilisierte Zellen und Untersuchungen der Anreicherung von Molkeproteinen in der Immobilisationsmatrix, Studienarbeit, TU Kaiserslautern, 2007

12.2 Veröffentlichung

Veröffentlichungen

- 1 Tippkörtter N., **Roikaew W.**, Ulber R. (2010) *P. denitrificans* for continuous denitrification of high-salinity process water, *Biotechnology Progress* 26(3), 756-762
- 2 Tippkörtter N., **Roikaew W.**, Ulber R. (2008) Remove of nitrate from whey concentrate with biotechnological regeneration of the waste water, *European Dairy Magazine*, Feb 1, 30-32
- 3 Tippkörtter N., **Roikaew W.**, Ulber R. (2007) Nitratentfernung aus Molkekonzentrat mit biotechnologischer Regeneration der Abwässer, *Deutsche Milchwirtschaft*, 9

Poster

- 4 **W. Roikaew**, N. Tippkörtter, H.J. Denzler, H. Buchholz, R.Ulber (2007) Denitrification of whey concentrate by immobilized cells of *P.denitrificans* European BioPerspectives in Köln
- 5 N. Tippkörtter, **W. Roikaew.**, R. Ulber (2009) An automated chromatographic and microbiologic denitrification pilot plant for whey concentrate. *Biorefinica*
- 6 N.Tippkörtter, **W.Roikaew**, A. Hoffmann, H.J. Denzler, H. Buchholz, R. Ulber (2008) Construction of a denitrification pilot plant with automated process control implemented in LabVIEW, 7th European Symposium on Biochemical Engineering Science

- 7 N.Tippkörtter, **W.Roikaew**, A. Hoffmann, H.J. Denzler, H. Buchholz, R. Ulber (2006) Nitrate reduction in whey concentrate. BioPerspectives in Focus From μl to m^3
- 8 N.Tippkörtter, **W.Roikaew**, A. Hoffmann, H.J. Denzler, H. Buchholz, R. Ulber (2006) Bioprocess Engineering Approach for the Removal of Nitrate from Whey. European Downstream Technology Forum
- 9 N.Tippkörtter, **W.Roikaew**, A. Hoffmann, H.J. Denzler, H. Buchholz, R. Ulber (2006) Removal of nitrate from whey concentrate: an improvement for liquid foods. IUFoST 13th World Congress of Food Science and Technology FOOD IS LIFE
- 10 N.Tippkörtter, **W.Roikaew**, A. Hoffmann, H.J. Denzler, H. Buchholz, R. Ulber (2006) Kontinuierliche Nitratentfernung aus Molkekonzentrat. 13.Heiligenstädter Kolloquium Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt.

Vortrag

- 11 Tippkörtter N., **Roikaew W.**, Ulber R., An automated pilot plant for the bioengineering processing of concentrated whey, European Bioperspectives 2008

12.3 Lebenslauf

	<p>Wipa Roikaew Diplom- Lebensmittelchemikerin</p> <p>Staatsangehörigkeit: thailändisch</p> <p>Hochschulbildung</p>
04/ 1999 - 09/ 2004	<p>Universität Kaiserslautern</p> <p>Studium der Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie mit Abschluss zum Diplom- Lebensmittelchemikerin Diplomarbeit über Tryptophanmetaboliten aus Bakterienkulturen als Ah-Rezeptorliganden</p>
03/1988 - 04/1992	<p>Universität Chulalongkorn, Bangkok Thailand</p> <p>Studium der Chemie und allgemeine Wissenschaft mit Abschluss zum B. A.</p>

	Schulische Bildung
1982 - 1988	Parkkred Gymnasium Nonthaburi/Thailand
	Arbeitserfahrung
Seit März 08	Lebensmittelchemikerin bei Labor Dr. Haase- Aschoff
01/ 2007- 12/ 2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik, TU Kaiserslautern Forschungsthema: Biotransformation von Lignin
11/ 2004- 12/ 2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Technische Chemie, Universität Hannover Forschungsthema: biologische Denitrifikation von Molke
06/1995 - 06/1998	Projektkoordinatorin SanE Ltd/Bangkok (Thailand) - Beantragen neuer Projekte - Datenerhebung - Erstellung wissenschaftlicher Berichte
05/1992 - 05/1995	Laborleiterin bei Creation Center Ltd/Bangkok im Bereich Wasseranalyse mit den Aufgabenbereichen - Entwicklung und Überwachung von Methoden zur Untersuchung von Wasser im Labor und bei Industriekunden - Auswertung und Dokumentation von Messergebnissen der Laboranalyse beim Anlagendesign - TechniksUPPORT nach dem und während des Aufbaus von Anlagen - Bearbeitung der Kundenanfragen nach Ergebnissen der Laboranalyse - Betreuung und Leitung von drei technischen Mitarbeiter/innen