

Produktion von Milchsäure aus Getreidehydrolysaten

Production of Lactic Acid from Grain Hydrolyzates

Klaus Richter, Winfried Reimann, Christian Berthold und In-Boung Yeo

Institut für Agrartechnik Bornim e.V., Potsdam

Kurzfassung: In Anbetracht der Stilllegung von Ackerflächen in Europa sind alternative Nutzungsmöglichkeiten für landwirtschaftliche Produkte im Nichtnahrungsmittelsektor immer mehr gefragt. Die auf diesem Gebiet laufenden Entwicklungsarbeiten haben einerseits die Durchsetzung von „CO₂-neutralen“ Produktionslinien für alte und neue Produkte als auch die Eröffnung neuer Erwerbsquellen für den Landwirt zum Ziel.

Die Direktverwertung von Getreidekörnern in biotechnologischen Stoffwandlungsprozessen ist eine solche Möglichkeit. Am Beispiel der Milchsäureerzeugung wird gezeigt, daß eine verlustarme Verwertung der im Getreideschrot enthaltenen Stärke ohne deren vorherige Isolierung möglich ist und daß die mit Hilfe von Enzymen erhaltenen glucosehaltigen Hydrolysate sich sehr gut als Substrat für die Milchsäuregärung eignen. Durch den Einsatz verschiedener Membrantrennoperationen (Mikro-/Ultrafiltration, Nanofiltration, Elektrodialyse) kann die Milchsäure aus der Fermentationsbrühe abgetrennt, gereinigt und aufkonzentriert werden.

Deskriptoren: Getreide, Milchsäure, enzymatische Hydrolyse, Fermentation, Ultrafiltration, Elektrodialyse

Abstract: *In Europe, alternative possibilities for the use of agricultural products in the non-food sector are needed to an ever increasing extent because areas are being set aside. Research and development activities in this field are focused on realizing "CO₂-neutral" production lines for current and new products and on creating new sources of income for farmers.*

Direct bioconversion of crops is a possibility here. Considering lactic acid production as an example, it is shown that the starch contained in bruised meal can be utilized without significant losses and without isolating it previously. The hydrolyzates obtained enzymatically are highly suitable substrates in lactic acid fermentation. The lactic acid formed can be separated from the fermentation broth, purified and concentrated by means of a series of membrane separation operations (micro-/ultrafiltration, nanofiltration, electro dialysis).

Keywords: *Grain, Lactic acid, Enzymatic hydrolysis, Fermentation, Ultrafiltration, Electrodialysis*

1 Einleitung

Milchsäure ist eine chemische Verbindung, die über ein großes Anwendungspotential verfügt [1]. Wesentliche Einsatzgebiete sind die Nahrungsmittelindustrie (Geschmacksstoff, Säuerungs- und Konservierungsmittel), die pharmazeutische und kosmetische Industrie (Matrix für Tabletten, Haarpflegemittel), die Landwirtschaft (Konservierungs-, Desinfektions-, Reinigungsmittel) und die chemische Industrie (Ausgangsstoff zur Herstellung von Lösungsmitteln, Spezialchemikalien, Wirkstoffen und Kunststoffen).

Weltweit stellt man Milchsäure vorwiegend auf fermentativem Wege her. Nur ein geringer Teil wird durch chemische Synthese erzeugt. Die in der Literatur auffindbaren Angaben über die Gesamtjahresproduktion

bewegen sich zwischen 40.000 t [2] und 55.000 t [3]. Sie berücksichtigen jedoch nur die Produktion in Holland, Spanien, Brasilien und den USA. Aus Rußland, China und Japan sind diesbezüglich keine Einzelheiten bekannt.

Gegenwärtig nimmt die Bedeutung von Milchsäure als Grundbaustein biologisch abbaubarer Polymere (Polylactide) deutlich zu. Intensive Entwicklungsarbeiten auf diesem Gebiet werden insbesondere in Japan [4], Frankreich [5] und den USA [6] geleistet. Aus diesem Grunde ist in naher Zukunft mit der Ausweitung der Produktionskapazität für Milchsäure und der breiten Markteinführung von Kunststoffen auf Polymilchsäurebasis zu rechnen.

Bei der fermentativen Erzeugung werden einfache Kohlenhydrate mit Hilfe von Mikroorganismen direkt in Milchsäure umgesetzt. Als industrielle Rohstoffe bevorzugte man bisher reine Stoffe, wie Saccharose, Glucose und Stärke, aber auch komplexere Medien wie Melasse und Molke. In biotechnischen Anlagen wurden Getreidekörner bisher nur bei der Alkoholerzeugung als Rohstoff verwendet. Erste Untersuchungen zur Biokonversion von Getreidemehl in Milchsäure wurden in Indien [7] und Deutschland [8, 9] durchgeführt. In jüngster Zeit beschäftigt sich auch eine schwedische Arbeitsgruppe [10] mit dieser Problematik.

In Anbetracht der sich im Zusammenhang mit der alternativen Nutzung von stillgelegten Ackerflächen stellenden Forderung nach neuen Verwertungsstrategien für nachwachsende Rohstoffe ist der Einsatz von Getreide als Industrierohstoff für biotechnologische Stoffwandlungen eine volkswirtschaftlich relevante Aufgabenstellung. Die Untersuchungen am Institut für Agrartechnik Bornim verfolgen das Ziel, Getreide direkt in Milchsäure umzusetzen ohne vorherige Isolierung der für die beteiligten Mikroorganismen als Kohlenstoffquelle dienenden Stärke. Gegenüber dem Einsatz von reiner Stärke führt die Direktverwertung von Getreidekörnern zu einer deutlichen Senkung der Rohstoffkosten bei der Milchsäureproduktion [11].

Das aus der Fermentation kommende Reaktionsgemisch enthält neben der Milchsäure, die als Natriumlactat vorliegt, u. a. noch mikrobielle Biomasse, Reststoffe der eingesetzten Nährstoffe und Salze, Sekundärprodukte des mikrobiellen Stoffwechsels sowie nicht fermentierte Substanzen. Zur Isolierung der Milchsäure sind deshalb sowohl Reinigungs- und Abtrennprozesse als auch Aufkonzentrierungsschritte erforderlich, wofür sich verschiedene Membrantrennverfahren eignen [12]. Konventionelle Verfahren zur Abtrennung der Milchsäure aus Fermentorbrühen sind gekennzeichnet durch den Einsatz von Schwefelsäure und die Abtrennung des entstehenden Gipses durch Filtration, durch weitere aufwendige und energieintensive thermische Verfahren zur Aufkonzentrierung (Vakuumeindampfung) sowie durch zusätzliche Reinigungsoperationen, wie Ionenaustausch und Aktivkohlebehandlung. Membrantrennverfahren [12-17] weisen diese Nachteile nicht auf. Infolge der ständigen Verbesserung der Trenneigenschaften und der Stabilität der im Handel erhältlichen Membranen und Module können Membrantrennprozesse nun

auch zur Produktabtrennung und Produktreinigung im industriellen Maßstab eingesetzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Einsatzmaterial

Als Rohstoff für die Milchsäureerzeugung wurden Körner der Roggensorte Amilo und der Weizensorte Contra aus der Ernte 1996 (Erzeuger Agrargenossenschaft Uetz (Brandenburg)) benutzt.

2.2 Rohstoffvorbehandlung

Die mechanische Zerkleinerung der Körner erfolgte mit einer Schlagasenschrotmühle, in die unterschiedliche Lochsiebe eingesetzt werden konnten, so daß Schrote mit maximalen Partikelgrößen von 1 mm, 2 mm, 3 mm, 4 mm und 6 mm erhältlich waren. Es wurde davon ausgegangen, daß die maximalen Partikelgrößen in den einzelnen Schrotchargen jeweils diesen Werten entsprachen. Bei den Hydrolysetests kamen jeweils die mit den einzelnen Lochfiltern erhaltenen Schrotchargen vollständig ohne weitere Behandlung zum Einsatz.

Der für die Umwandlung der im Schrot enthaltenen Stärke in die vergärbare Glucose erforderliche Hydrolyseprozeß setzte sich aus den Einzelstufen Stärkeverflüssigung und Stärkeverzuckerung zusammen, die unmittelbar vor der Fermentation nacheinander im Fermentor abliefen. Bei den dazu verwendeten Enzymen handelte es sich um die Amylase Termamyl 120 L und die Glucoamylase AMG 300 L von Novo Nordisk.

Die Optimierung der beiden Stufen des Hydrolyseprozesses erfolgte getrennt voneinander, da deren Optima als nicht deckungsgleich zu erwarten waren. Für die Stärkeverflüssigung wurden zunächst nur die Temperatur, der pH-Wert und die Partikelgröße als Haupteinflussfaktoren betrachtet, wobei in diesem Falle die Partikelgröße die jeweils durch die Lochfiltergröße der Mühle mögliche maximale Teilchenabmessung darstellte. Um den Versuchsaufwand zu begrenzen, mußten zwei weitere potentielle Einflußgrößen (Enzymaktivität und Hydrolysedauer) so definiert werden, daß sie außerhalb ihres limitierenden Einflusses lagen und formal als Konstanten betrachtet werden konnten. Beide Größen wurden auf 40 ml Enzymlösung/kg Schrot bzw. auf 4 h festgelegt. Bei der Optimierung der Stärkeverzuckerung stellte die Versuchsdauer jedoch zusammen mit der Temperatur und dem pH-Wert eine unabhängige Variable dar. Die eingesetzte Enzymmenge blieb jedoch auch in diesem Fall konstant bei 40 ml/kg Schrot.

2.3 Fermentation

Für die Konversion der in der Hydrolysestufe gebildeten Glucose in Milchsäure wurde der Milchsäure-Bakterienstamm *Lactobacillus paracasei* ATB 160111 eingesetzt. Als Reaktor für die Hydrolyse und die Fermentation diente ein 50 l-Laborfermentor Biostat UD der Firma Braun Biotech International. Die Apparatur war mit einer automatischen Temperatur- und pH-Wert-Regelung versehen. Die Milchsäurefermentation erfolgte diskontinuierlich bei einer Temperatur von $T = 33^{\circ}\text{C}$ und einem pH-Wert von 6,0, wobei Stärkehydrolysate mit Glucosegehalten von 80 -100 g/l als Substrat verwendet wurden. Zur Verbesserung der Fermentationsleistung waren Zusätze von Hefeextrakt (5-10 g/l) und Pepton (5-10 g/l) erforderlich.

2.4 Produktaufarbeitung

Die Untersuchungen zur Mikro-/Ultrafiltration wurden mit einer Anlage mit auswechselbaren Rohrmodulen durchgeführt (Bild 1), bei der die Kühlung des Mediums im Doppelmantel-Vorlagebehälter möglich war. Die Registrierung der Temperatur des Mediums, der Drücke vor und hinter der Membran sowie des Permeatflusses erfolgte regelmäßig während der Versuche. Die Überströmgeschwindigkeit der Suspension über die Membran ergab sich aus dem eingestellten Druck von 1,5 bar.

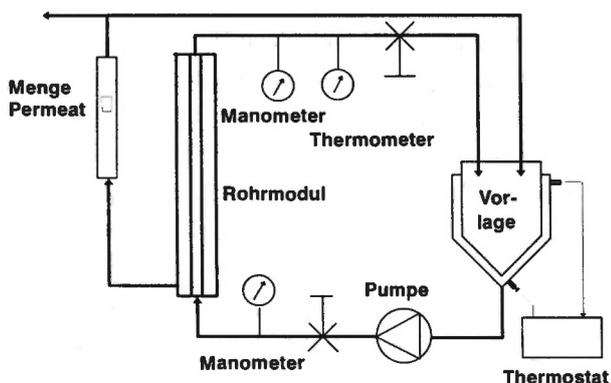


Bild 1: Versuchsaufbau zur Mikro-/Ultrafiltration
Fig. 1: Apparatus for micro-ultrafiltration experiments

Bei den Versuchen zur Elektrodialyse kam eine Technikanlage mit 4 Kreisläufen und auswechselbaren Membranstapeln (Mono- und bipolare Membranen) zum Einsatz (Bild 2). Jeder Kreislauf war mit einer Pumpe sowie mit Meßeinrichtungen für Durchfluß, Druck, Temperatur, pH-Wert und Leitfähigkeit ausgestattet. Die Vorratsbehälter waren thermostatisiert. Die Stromver-

sorgung des Membranstapels erfolgte über eine Gleichstromversorgungseinheit mit einer regelbaren Spannung von 0-65 V und einer regelbaren Stromstärke von 0-5 A, ausgelegt für eine strom- und spannungskonstante Fahrweise. Die effektive Trennfläche der Einzelmembranen betrug 100 cm^2 . Die pro Stapel maximal einsetzbare Membranzahl lag bei 100, was einer effektiven Membrangesamtfläche von etwa 1 m^2 entsprach.

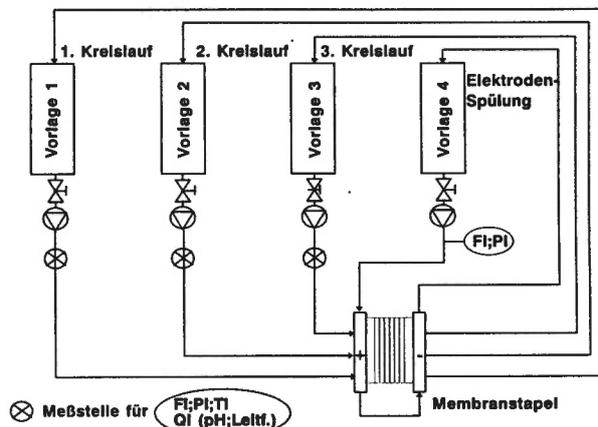


Bild 2: Versuchsaufbau zur Elektrodialyse
Fig. 2: Apparatus for electro-dialysis experiments

2.5 Chemische Analysenmethoden

Zur Beurteilung des Versuchsverlaufes und zur Ermittlung der Versuchsergebnisse mußten die Konzentrationen von Medieninhaltsstoffen mit Hilfe chemischer Analysenmethoden ermittelt werden.

Der Stärkegehalt im Schrot wurde nach einer Methode von Ewers bestimmt, bei der man die Probe mit Salzsäure hydrolysiert. Als Maß für den Stärkeanteil diente die in dem Hydrolysat gemessene optische Drehung von polarisiertem Licht.

Zucker und Milchsäure konnten in einem Arbeitsgang durch HPLC (High Performance Liquid Chromatography) unter den nachfolgend genannten Bedingungen bestimmt werden: Säule: Eurokat H, $300 \times 8\text{ mm i.D.}$; Eluent: $0,003\text{ n H}_2\text{SO}_4$; Flußrate: $0,8\text{ ml/min}$; Druck: 4 MPa ; Temperatur: Raumtemperatur; Probenvolumen: $50\text{ }\mu\text{l}$; Detektor: RI (Brechungsindex).

Der Feuchtegehalt in Feststoffen ergab sich aus Differenzwägungen der Originalproben und dem bis zur Gewichtskonstanz bei 105°C getrocknetem Material.

3 Resultate und Diskussion

3.1 Stärkehydrolyse

Bei diesen Untersuchungen dienten der Reststärkegehalt in den Schrotstückständen nach der Stärkeverflüssigung und die in den Hydrolysaten erreichte Glucosekonzentration nach der Stärkeverzuckerung als Optimierungsgrößen.

3.1.1 Stärkeverflüssigung

Die experimentellen Ergebnisse der Optimierung der Stärkeverflüssigung bei Roggenschrot sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Ergebnisse der Stärkeverflüssigung beim Einsatz von Roggenschrot

Table 1: Results of starch liquefaction using bruised rye meal

Nr.	Temperatur T [°C]	pH-Wert	Partikelgröße PG [mm]	Reststärke RS [% in TS]
1	88	7	6	4,5
2	88	7	2	3,4
3	88	7	3	2,3
4	88	7	1	3,9
5	88	6	2	4,7
6	88	5	1	7,3
7	85	6,5	1	4,5
8	85	5,5	4	3,1
9	85	5,5	1	2,2
10	80	7	2	4,5
11	80	6	6	11,7
12	80	6	4	3,4
13	80	6	3	1,1
14	80	6	1	2,8
15	80	6	2	0,6
16	80	6	2	1,09
17	80	5	2	3,9
18	75	6,5	6	6,3
19	75	6,5	1	5,7
20	75	5,5	1	2,9
21	70	7	3	9,0
22	70	6	2	1,7
23	70	5	4	3,4
24	70	5	3	2,8
25	70	5	1	2,8

Bei der Angleichung der Versuchsergebnisse an einen polynomischen Modellansatz wurde auf die gemischten Glieder verzichtet, da das Aktivitätsverhalten der bei der

Hydrolyse eingesetzten Enzyme [18] mit einem solchen Modellverlauf nicht in Einklang zu bringen war. Die erhaltene Regressionsgleichung lautet deshalb:

$$RS = 0,94 \cdot 10^{-2} \cdot T^2 + 0,81 \cdot (\text{pH})^2 + 0,45 \cdot (\text{PG})^2 \quad (1) \\ - 1,51 \cdot T - 9,60 \cdot \text{pH} - 2,45 \cdot \text{PG} + 95,00.$$

Die optimalen Parameterwerte, die durch partielle Differentiation dieser Gleichung erhalten wurden, sind $T = 80,9^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,9$ und $\text{PG} = 2,9 \text{ mm}$.

Die dreidimensionale Darstellung (Bild 3) der bestehenden Zusammenhänge, in die die maximale Partikelgröße als Konstante ($\text{PG} = 3 \text{ mm}$) eingeht, zeigt, daß in diesem System tatsächlich ein Minimum existiert. Es wird durch die berechneten Optimalwerte der drei berücksichtigten Parameter bestimmt. Nach dem Modell beträgt der minimale Reststärkegehalt im Roggenschrot 1,9%.

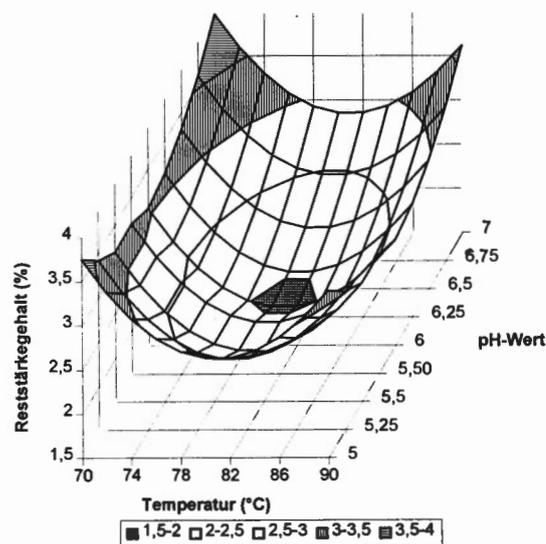


Bild 3: Abhängigkeit des Reststärkegehaltes im Roggenschrot (Partikelgröße 3 mm) von der Temperatur und dem pH-Wert nach der Stärkeverflüssigung

Fig. 3: Dependence of residual starch content in rye meal (particle size 3 mm) on temperature and pH-value after starch liquefaction

Analoge Untersuchungen wurden auch zur Verflüssigung von Weizenschrotstärke vorgenommen. Die Ergebnisse der dazu durchgeführten Experimente enthält die Tabelle 2.

Tabelle 2: Ergebnisse der Stärkeverflüssigung beim Einsatz von Weizenschrot
 Table 2: Results of starch liquefaction using bruised wheat meal

Nr.	Temperatur T [°C]	pH-Wert	Partikelgröße PG [mm]	Reststärke RS [% in TS]
1	88	7	6	3,9
2	88	7	3	1,7
3	88	7	1	2,9
4	88	6	2	4,5
5	88	5	1	3,9
6	85	8	3	2,2
7	85	7,5	6	5,6
8	85	7,5	1	2,3
9	85	6,5	1	2,8
10	85	5,5	4	3,3
11	80	7	2	2,8
12	80	6	6	3,9
13	80	6	4	2,2
14	80	6	3	1,7
15	80	6	1	2,8
16	80	6	2	2,2
17	80	5	2	2,9
18	75	8	3	2,7
19	75	7,5	1	1,7
20	75	6,5	6	6,7
21	75	5,5	3	0,6
22	70	7	3	2,4
23	70	6	2	2,9
24	70	5	4	5,1
25	70	5	3	1,1
26	70	5	1	3,6

Die aus diesen Werten berechnete Regressionsgleichung

$$RS = 0,83 \cdot 10^{-2} \cdot T^2 + 0,14 \cdot (pH)^2 + 0,25 \cdot (PG)^2 - 1,31 \cdot T - 1,95 \cdot pH - 1,32 \cdot PG + 62,00 \quad (2)$$

hat ihre Parameteroptima bei T = 78,9°C, pH = 7,0 und PG = 2,6 mm. Der minimale Reststärkegehalt im Weizenschrot nach der enzymatischen Behandlung liegt bei 1,7%. Die dreidimensionale Darstellung der Gesamtfunktion ist in Bild 4 für eine Partikelgröße von 3 mm zu sehen.

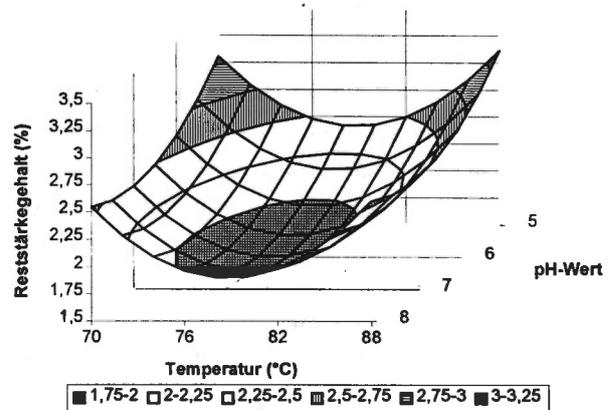


Bild 4: Abhängigkeit des Reststärkegehaltes im Weizenschrot (Partikelgröße 3 mm) von der Temperatur und dem pH-Wert nach der Stärkeverflüssigung
 Fig. 4: Dependence of residual starch content in wheat meal (particle size 3 mm) on temperature and pH-value after starch liquefaction

3.1.2 Stärkeverzuckerung

Alle Experimente zur Stärkeverzuckerung bei Roggen- und Weizenschrot wurden jeweils mit dem gleichen Ausgangsmaterial durchgeführt. Bei jedem Versuch kam eine unter optimalen Bedingungen aus dem Schrot erzeugte Stärkelösung zum Einsatz. Die Versuchsergebnisse der Roggenstärkeverzuckerung enthält die Tabelle 3.

Tabelle 3: Ergebnisse der Stärkeverzuckerung beim Einsatz von Roggenschrot
 Table 3: Results of starch saccharification using rye meal

Nr.	Temperatur T [°C]	pH-Wert	Hydrolysedauer Δt [h]	Glucose-Konzentration S [g/l]
1	40	4	1	100,5
2	40	5	3	126,2
3	50	3,5	1	131,6
4	50	4,5	1	119,9
5	50	4,5	2	139,7
6	50	5	1	122,9
7	50	5	3	138,2
8	60	4	1	114,4
9	60	3,5	2	135,3
10	60	4,5	2	133,3
11	70	4,5	2	119,6
12	70	5	2	127,5
13	80	5	1	52,7
14	80	5	3	57,2
15	80	3	1	43,7
16	80	3	3	49,2

Aus den angeführten Resultaten ergab sich für die Roggenstärkeverzuckerung das folgende Modell:

$$S = -0,105 \cdot T^2 + 5,56 \cdot (\text{pH})^2 - 17,20 \cdot (\Delta t)^2 + 11,14 \cdot T - 41,06 \cdot \text{pH} + 73,34 \cdot \Delta t - 154,50 \quad (3)$$

Aus dieser Gleichung ließen sich nur Optimalwerte für die Temperatur ($T = 53,0^\circ\text{C}$) und die Hydrolysedauer ($\Delta t = 2,1 \text{ h}$) errechnen. Nachträglich durchgeführte Zusatzversuche belegten, daß das pH-Optimum direkt an der Modellgrenze bei $\text{pH} = 5,0$ liegt. Die dabei erreichte maximale Glucosekonzentration betrug $S = 145 \text{ g/l}$.

Für die Optimierung der Verzuckerung der Weizenschrotstärke wurde ein analoger Versuchsplan realisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zu finden.

Tabelle 4: Ergebnisse der Stärkeverzuckerung beim Einsatz von Weizenschrot

Table 4: Results of starch saccharification using wheat meal

Nr.	Temperatur T [°C]	pH-Wert	Hydrolysedauer Δt [h]	Glucose-Konzentration S [g/l]
1	40	5	3	126,9
2	40	3	3	135,8
3	40	3	1	142,6
4	50	3,5	1	136,9
5	50	4,5	1	132,0
6	50	4,5	2	134,1
7	50	5	1	135,3
8	60	4	1	129,7
9	60	3,5	2	125,6
10	60	4,5	2	122,1
11	70	5	2	102,6
13	80	5	1	59,1
14	80	5	3	71,3
15	80	3	1	46,9
16	80	3	3	44,2

Die Regression der experimentell gefundenen Glucosekonzentrationen im Weizenschrothydrolysat führte zu einem ähnlichen Modell wie bei der Roggenverzuckerung:

$$S = -7,3 \cdot 10^{-2} \cdot T^2 + 1,35 \cdot (\text{pH})^2 - 0,57 \cdot (\text{Dt})^2 + 6,74 \cdot T - 8,83 \cdot \text{pH} + 1,43 \cdot \text{Dt} - 6,75 \quad (4)$$

für das folgende Optimalwerte gelten: $T = 46,2^\circ\text{C}$ und $\Delta t = 1,25 \text{ h}$. Das pH-Wert-Optimum mußte auch in die-

sem Fall durch Zusatzversuche ermittelt werden. Es lag wie bei der Roggenschrotverzuckerung bei $\text{pH} = 5,0$.

Die maximal erreichbare Glucosekonzentration betrug $139,3 \text{ g/l}$.

3.2. Fermentation

Die Stärkehydrolysate, die noch die nach der Enzymbehandlung verbliebenen Schrotreste suspendiert enthielten, wurden auf ihre Eignung als Substrat für die Milchsäuregärung untersucht. Es zeigte sich, daß in ihnen offensichtlich keine das Zellwachstum und die Lactatbildung inhibierenden Komponenten enthalten waren. Der natürliche Nährstoffanteil der Hydrolysate reichte indessen für eine schnelle und effiziente Biokonversionsreaktion nicht aus, so daß auch in diesem Fall nicht auf externe Nährstoffzugaben (Hefeextrakt, Pepton) verzichtet werden konnte (Bild 5).

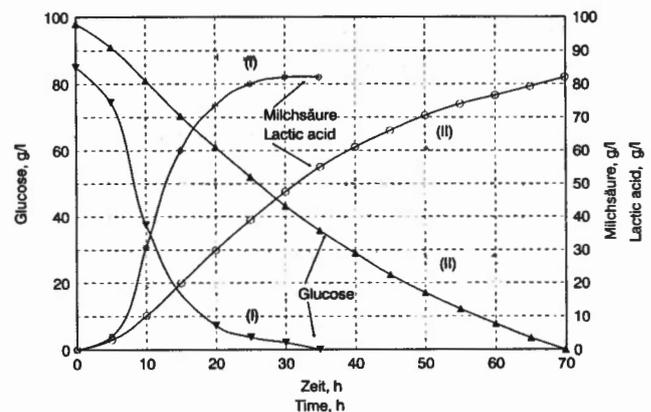


Bild 5: Verlauf der Milchsäuregärung auf Weizenhydrolysat mit (I) und ohne (II) Nährstoffzusatz

Fig. 5: Time course of lactic acid fermentation on wheat hydrolyzate with (I) and without (II) nutrient supply

Wurde die Fermentation nur mit dem Hydrolysat durchgeführt, dauerte der Prozeß 70 h. Bei der Zuführung von je 1% Hefeextrakt und Pepton zu den Nährlösungen ließ sich die Fermentationsdauer auf die Hälfte verkürzen.

3.3 Aufarbeitung

3.3.1 Feststoffabtrennung mittels Ultrafiltration

In einem ersten Aufarbeitungsschritt mußten zunächst alle Feststoffanteile einschließlich der Biomasse aus der Fermentationsbrühe abgetrennt werden, da ihre Anwesenheit in den folgenden Aufarbeitungsstufen sonst zu Ablagerungen und unerwünschten Abbaureaktionen (Fouling) an den Membranen und somit zu deren Zerstörung geführt hätte. Deshalb wurden verschiedene organische und anorganische Membranen auf ihre Eignung für

die Zellmasseabtrennung untersucht. Die wichtigsten Ergebnisse enthält die **Tabelle 5**.

Die beste Selektivität zeigte eine anorganische Membran aus Aluminiumoxid (Porendurchmesser: 0,05 µm). Bei einem transmembranen Druck von 1,5 bar und einem mittleren Permeatfluß von 46 l/m²·h gelang es, die Konzentration der Milchsäurebakterien von 3,2·10⁹ KbE/ml auf 2·10² KbE/ml im Permeat zu reduzieren. Verluste an Milchsäure traten dabei nicht auf, denn der Wiederfindungsgrad im Ultrafiltrat betrug 99,8%. Eine vollständige Abtrennung der Bakterien konnte mit den verwendeten Membranen noch nicht erreicht werden, obwohl die kleinste Trenngrenze der Membran von 0,05 µm unterhalb des minimalen Durchmessers der Milchsäurebakterien von 0,5 µm liegt [19]. Entweder handelte es sich dabei um Störstellen in den Membranen oder um deutlich kleinere Zellen nach der Zellteilung, die die Membran passierten. Nach [20] werden Milchsäurebakterien durch Hohlfasermodule mit einem Porendurchmesser von 0,1 µm vollständig zurückgehalten.

3.3.2 Kulturfiltratreinigung durch Nanofiltration

Da durch MF/UF nur suspendierte Bestandteile aus dem Fermentationsmedium entfernt werden können, enthält das Permeat in gelöster Form noch Nährstoffe, Salze und gefärbte Stoffe. Die Entfärbung der Natriumlactatlösung kann durch Nanofiltration (NF) erreicht werden. Letztere ist wie die Ultrafiltration ein druckgetriebenes Membranverfahren, dessen Trennvermögen zwischen dem der Ultrafiltration und der Umkehrosmose einzuordnen

ist. Im Gegensatz zur Mikro-/Ultrafiltration handelt es sich bei den Membranen der Nanofiltration und auch der Umkehrosmose um dichte "Lösungs-Diffusions-Membranen", die nur den diffusen Transport der übergehenden gelösten Komponente zulassen. Eine Besonderheit der Nanofiltrationsmembranen ist ihre Ionenselektivität. Salze mit einwertigen Anionen können die Membran in hohem Maße passieren, während Salze mit mehrwertigen Anionen, wie Sulfate, Carbonate und Phosphate, zurückgehalten werden. Die Permeabilität eines Salzes wird somit durch die Wertigkeit seines Anions bestimmt [17]. Von den untersuchten Membranen erwies sich eine Membran mit einem NaCl-Rückhalt von 5% als am besten geeignet (**Tabelle 6**).

Tabelle 6: Entfärbung von zellfreien Natriumlactatlösungen aus Fermentationsbrühen

Table 6: Decolorization of cell-free solutions of sodium lactate obtained from fermentation broths

Membranart	Nanofiltration
NaCl-Rückhaltung	15%
Mittl. Permeatfluß	14 l/m ² ·h
Druck	30 bar
Milchsäurewiederfindungsgrad	95%
Farbreduzierung (Extinktion; 420 nm)	95%

Tabelle 5: Ergebnisse der Abtrennung von Milchsäurebakterien aus Fermentorbrühe mit verschiedenen Mikro-/Ultrafiltrationsmembranen (Druck: 1,5 bar)

Table 5: Results of the separation of lactic acid bacteria from fermentation broth by means of a series of micro-/ultrafiltration membranes (pressure: 1.5 bar)

Material	Porengröße/ molekulare Trenngrenze	mittlerer Permeatfluß [l/m ² ·h]	Milchsäure- Wieder- findungsgrad [%]	Anzahl der Bakterien im Zulauf [KbE/ml]	Anzahl der Bakterien im Permeat [KbE/ml]
SiC	0,05 µm	67,6	97,4	1·10 ¹⁰	3,3·10 ⁵
Polysulfon	20.000 g/mol	8,4	100	7,8·10 ⁹	2,4·10 ³
Al-/Ti-/Zr-oxid	15.000 g/mol	27,8	93,8	1·10 ¹⁰	3,6·10 ²
Al ₂ O ₃	0,05 µm	46	99,8	3,2·10 ⁹	2·10 ²

KbE = koloniebildende Einheiten (*colony forming units*)

3.3.3 Milchsäureabtrennung und -konzentrierung mittels Elektrodialyse

Die Elektrodialyse ist ein elektrochemischer Prozeß, bei dem mit meist homogenen Ionenaustauscher-Membranen (Anionen- und Kationenaustauscher-Membranen) und der treibenden Kraft eines elektrischen Feldes ionogene Bestandteile aus einer Lösung entfernt beziehungsweise von ungeladenen Komponenten, wie Zucker oder Proteinen, abgetrennt und gegebenenfalls konzentriert werden. Entsalzung, Trennung und Konzentrierung von Salzen, Säuren und Basen sind die Anwendungsmöglichkeiten des Verfahrens, das bereits in vielen Bereichen der Wasserreinigung und -aufbereitung, der Lebensmittelverfahrenstechnik und der Biotechnologie zum Einsatz kommt. Der Trennmechanismus beruht auf der gerichteten Wanderung von Ionen im elektrischen Feld und der Wirkung ionenselektiver Membranen.

Bei der Elektrodialyse mit bipolaren Membranen wird das im Fermentationsprozeß gebildete Natriumlactat nach der Reinigung durch Mikro-/Ultrafiltration und Nanofiltration in Milchsäure und in Natronlauge getrennt und aufkonzentriert. Letztere kann somit wieder zurückgewonnen und in der Fermentation erneut eingesetzt werden.

Zur Ermittlung der durch Elektrodialyse mit bipolaren Membranen maximal erreichbaren Milchsäurekonzentration war es erforderlich, den Prozeß mit Modell- und Fermentationslösung in mehreren Stufen durchzuführen. Als Modellösung wurde eine Natriumlactatlösung mit einem Milchsäureanteil zwischen 80 g/l und 91 g/l vorgelegt (Bild 6).

Nach der 5. Stufe traten Unregelmäßigkeiten in der Abnahme der Milchsäurekonzentration im Salzkreislauf auf, die aufgrund des hohen Konzentrationsgefälles zwischen der Säure- und Salzfraktion von bis zu 200 g/l durch Elektroosmose und den Wassertransport mit den Ionen (Hydrathülle) hervorgerufen wurden [21, 22]. Für die einzelnen Stufen sind die Werte in der Tabelle 7 zusammengefaßt.

Bei einer erzielten Milchsäurekonzentration von 266 g/l wurden innerhalb von 37,4 h aus dem Salz 527 g Milchsäure gebildet. Das entspricht einer durchschnittlichen spezifischen Milchsäureabtrennrates von etwa 83 g/m²·h. Aus Bild 6 ist ersichtlich, daß von Stufe zu Stufe mehr Zeit zur Umwandlung des Salzes in Säure und Lauge benötigt wurde, da sich der Widerstand für den Stoff-

transport mit zunehmender Konzentrationsdifferenz zwischen der Salz- und der Säurefraktion vergrößert.

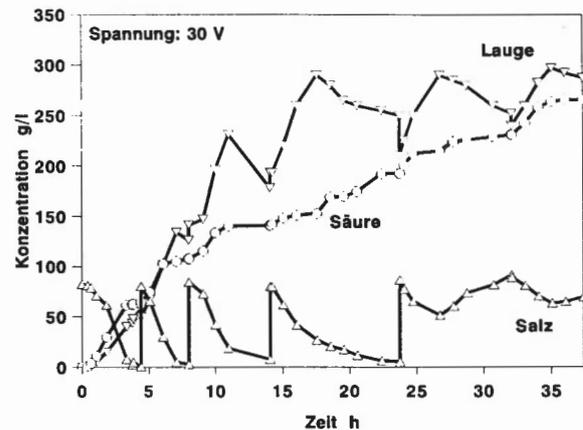


Bild 6: Zeitliche Änderung des Milchsäuregehaltes in der Salz- und Säurefraktion sowie der Laugenkonzentration bei der Spaltung von Natriumlactat (Modellösung) durch 6-stufige Elektrodialyse mit bipolaren Membranen
Fig. 6: Time course of lactic acid content in both the salt and acid fractions and alkali concentration during sodium lactate separation (model solution) by 6-stage electro-dialysis with bipolar membranes

Tabelle 7: Bildung von Milchsäure (MS) aus Natriumlactat (Modellösung) durch Elektrodialyse mit bipolaren Membranen in 6 Stufen

Table 7: Formation of lactic acid from sodium lactate (model solution) by 6-stage electro-dialysis with bipolar membrane

Stufe	Zeit h	MS g/l	MS g	Spezif. MS- Abtrennrates g/m ² ·h
1	4,42	63	125,1	166,5
2	3,57	108	85,1	140
3	6,08	141	66,4	64
4	9,7	193	103,4	63
5	8,3	229	77	55
6	5,3	266	69,6	77
Gesamt	37,4	266	527	83

Im Vergleich zur Modell-Lösung wurde beim 3-stufigen Einsatz von fermentativ erzeugter Natriumlactatlösung mit einer Milchsäurekonzentration von 55,2 g/l bis 61,2 g/l die Milchsäurelösung bis auf 130 g/l innerhalb von 53 h konzentriert (Bild 7). Die spezifische Milchsäureabtrennrates beträgt in diesem Beispiel 135 g Milchsäure je m² und Stunde. Die Ergebnisse für die einzelnen Stufen enthält die Tabelle 8.

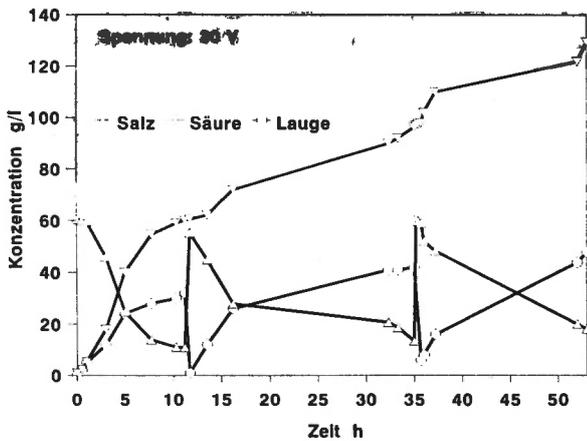


Bild 7: Zeitliche Änderung des Milchsäuregehaltes in der Salz- und Säurefraktion sowie der Laugenkonzentration bei der Spaltung von Natriumlactat (Fermentationslösung) durch 3-stufige Elektrodialyse mit bipolaren Membranen

Fig. 7: Time course of lactic acid content in the both salt and acid fractions and alkali concentration during sodium lactate separation (fermentation broth) by 3-stage electro-dialysis with bipolar membranes

Tabelle 8: Bildung von Milchsäure (MS) aus Natriumlactat (Fermentorablauf) durch Elektrodialyse mit bipolaren Membranen in 3 Stufen

Table 8: Formation of lactic acid (MS) from sodium lactate (fermentation broth) by 3-stage electro-dialysis with bipolar membranes

Stufe	Zeit h	MS g/l	MS g	Spezif. MS- Abtrennrte g/m ² ·h
1	11,2	60,6	422	188
2	23,8	96,3	383	81
3	18	130	622	173
Gesamt	53	130	1427	135

Ein Vergleich der Versuche mit Modellösung und dem Fermentationsmedium zeigt, daß die spezifische Milchsäureabtrennrte im letzteren Fall mit 135 g/m²·h gegenüber der Modellösung mit 83 g/m²·h höher ausfällt. Dieser Unterschied wird auf folgenden Zusammenhang zurückgeführt. Beim Einsatz der Fermentationslösung in Bild 7 wurde nach jeder Stufe die gebildete Natronlauge entfernt und durch destilliertes Wasser ersetzt, so daß die Laugenkonzentration geringer als die Säurekonzentration war. Dadurch konnte der für den Stofftransport erforderliche Strom zur Bildung von Milchsäure aus dem Salz gegenüber der Laugenbildung besser ausgenutzt werden, da die Leitfähigkeit im Laugenkreislauf gegen

Null ging, was zur Folge hatte, daß die Milchsäureabtrennrte zunahm. Beim Einsatz der Modellösung in Bild 6 ist die Konzentration der gebildeten Lauge stets höher als die Konzentration der gebildeten Milchsäure, da in diesem Fall der Strom für den Stofftransport zur Bildung von Natronlauge mit der höheren Leitfähigkeit stärker wirkt. Insgesamt erfolgt bei diesem Elektrodialyseprozeß gleichzeitig eine Reinigung der Säure von nicht ionogenen Bestandteilen, die durch Mikro-/Ultrafiltration und Nanofiltration nicht zurückgehalten wurden.

Bei der Konzentrierung von Milchsäure durch Elektrodialyse mit monopolaren Membranen konnte mit einer Modell-Milchsäurelösung als Diluat, die eine Konzentration zwischen 15,5 g/l und 128,7 g/l aufwies, in 7 Ansätzen nachgewiesen werden, daß das Konzentrat mit einer Ausgangskonzentration von 0,4 g/l bis auf 253 g/l in einer Zeit von 11,25 h konzentriert werden kann (Bild 8). Das entspricht einer spezifischen Milchsäureabtrennrte von 546 g/m²·h (Tabelle 9).

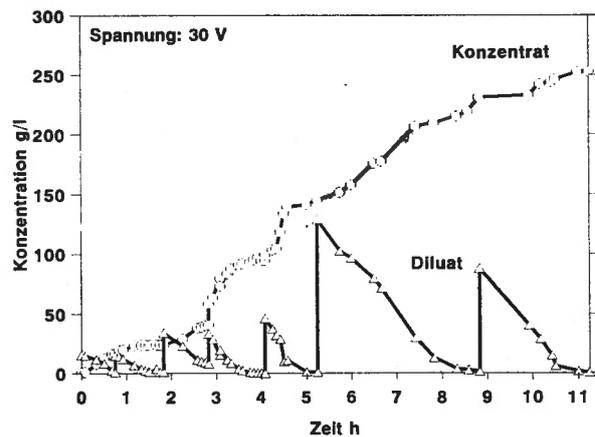


Bild 8: Zeitliche Änderung des Milchsäuregehaltes im Diluat und im Konzentrat bei der 7-stufigen Elektrodialyse von einer Modell-Milchsäurelösung mit monopolaren Membranen

Fig. 8: Time course of lactic acid content in the both diluate and concentrate during 3-stage electro-dialysis of a model lactic acid solution with monopolar membranes

Bei der 2-stufigen Konzentrierung von Milchsäure aus einer Natriumlactat-Lösung (Fermentorablauf) mit einer Ausgangskonzentration von 1,2 g/l wurde eine Konzentration von 255 g/l in einer Versuchszeit von 34,8 h erzielt (Tabelle 10 und Bild 9). Die Ausgangskonzentration im Diluat betrug 78,6 g/l (1. Stufe) und 99,1 g/l (2. Stufe). Im Vergleich zur Modellösung konnte mit diesem Versuch nur eine spezifische Milchsäureabtrennrte von 125 g/m²·h gegenüber 546 g/m²·h (Model-

lösung) erzielt werden. Nach einer Versuchszeit von 15 h ging der Stofftransport bereits gegen Null, d. h. daß in der Lösung keine Ionen mehr vorlagen, obwohl im Diluat noch eine Konzentration von 53,6 g/l voranden war. Die geringere spezifische Milchsäureabtrennrates beim Einsatz des fermentierten Mediums gegenüber der Modellösung wird auf die verringerte Dissoziation der Milchsäure, den hohen Konzentrationsunterschied zwischen Diluat und Konzentrat von etwa 200 g/l und auf Verunreinigung des Fermentationsmediums durch Fremdionen zurückgeführt.

Tabelle 9: Konzentrierung der Milchsäure (MS) aus einer Modellösung durch 7-stufige Elektrodialyse mit monopolaren Membranen

Table 9: Concentration of lactic acid (MS) from a model solution by 7-stage electro dialysis with monopolar membranes

Stufe	Zeit h	MS g/l	MS g	Spezif. MS- Abtrennrates g/m ² ·h
1	0,75	17	34	237
2	1,08	24,2	26,6	129
3	1	58,6	93,8	494
4	1,25	99,1	158,6	667
5	1,17	148	199,8	899
6	3,58	231,4	312,4	459
7	2,42	253	341,3	742
Gesamt	11,25	253	1167	546

Um zu ermitteln, welchen Einfluß die bei der Konzentrierung von Milchsäure durch Elektrodialyse ständig zunehmende Konzentrationsdifferenz zwischen Diluat und Konzentrat und die unterschiedliche Dissoziation der Milchsäure in Abhängigkeit von ihrer Konzentration auf die maximale Konzentrierung ausübt, wurde versucht, im Diluat eine Milchsäure mit der höchsten Dissoziation vorzulegen, die bei einer Konzentration von etwa 160 g/l erreicht wird. In einer Zeit von 41,2 h wurde Milchsäure-Modellösung, die durch Elektrodialyse mit bipolaren Membranen in 6 Stufen bereits auf 266 g/l vorkonzentriert wurde (Bild 6), weiter konzentriert. Dabei kam im Konzentrat eine Milchsäurekonzentration von 438 g/l zustande. Die insgesamt aus dem Diluat in das Konzentrat transportierte Milchsäuremenge betrug 656 g (Bild 10). Das entsprach einer spezifischen Milchsäureabtrennrates von 84 g/m²·h.

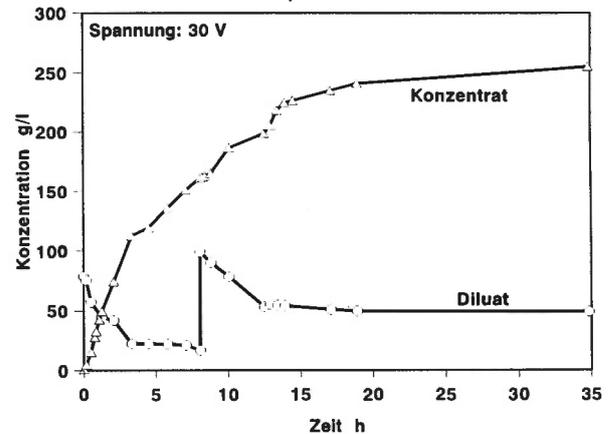


Bild 9: Zeitliche Änderung des Milchsäuregehaltes im Diluat und im Konzentrat bei der 2-stufigen Elektrodialyse einer Rohmilchsäurelösung (Fermentationsablauf) mit monopolaren Membranen

Fig. 9: Time course of lactic acid content in the both diluate and concentrate during 2-stage electro dialysis of crude lactic acid solution (fermentation broth) with monopolar membranes

Tabelle 10: Konzentrierung von Milchsäure (MS) aus einer Fermentationslösung in 2 Stufen durch Elektrodialyse mit monopolaren Membranen

Table 10: Concentration of lactic acid from fermentation broth by 2-stage electro dialysis with monopolar membranes

Stufe	Zeit h	MS g/l	MS g	Spezif. MS- Abtrennrates g/m ² ·h
1	8,08	161	258	158
2	26,7	255	612	54,3
Gesamt	34,8	255	870	125

Damit konnte nachgewiesen werden, daß bei höchster Dissoziation der Milchsäure und gleichzeitiger Verringerung der Konzentrationsdifferenz zwischen Diluat und Konzentrat hohe Milchsäurekonzentrationen erreichbar sind.

4 Gesamtprozeß

Auf der Grundlage der Einzelbefunde konnte ein Prozeß zur Erzeugung von Milchsäure aus Getreide entwickelt und in seinen einzelnen Stufen (Bild 11) im Technikummaßstab erprobt werden. Die Fermentation erfolgte dabei in einem 50 l-Fermentor.

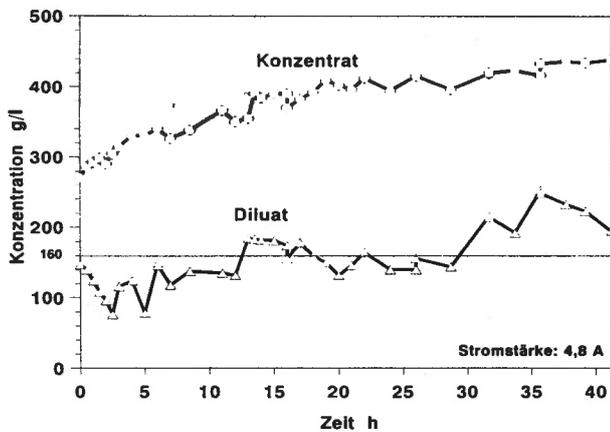


Bild 10: Zeitliche Änderung des Milchsäuregehaltes im Diluat und im Konzentrat bei der Konzentrierung einer Modell-Milchsäurelösung durch Elektrodialyse mit monopolaren Membranen

Fig. 10: Time course of lactic acid content in the both diluate and concentrate during concentrating a model lactic acid solution by electro dialysis) with monopolar membranes

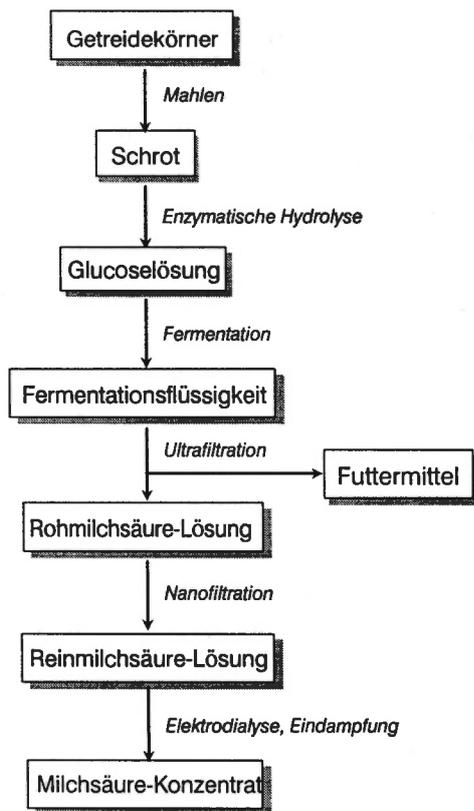


Bild 11: Schema der Biokonversion von Getreide in Milchsäure

Fig. 11: Flow-sheet of bioconversion of grain into lactic acid

Geht man von einem Hydrolysegrad von 95% und einer Milchsäureausbeute von ebenfalls 95% in der Fermentation aus, so kann mit einem Produktausstoß von 590-640 kg Milchsäure (80%ig)/t Getreidekörner gerechnet werden, wenn ein Stärkegehalt von 65% (bezogen auf Trockensubstanz, Feuchtegehalt: 12%) und 10-15% Verluste bei der Aufarbeitung angenommen werden.

5 Schlußfolgerungen

Getreide eignet sich sehr gut als Rohstoff für die Milchsäureproduktion. Die in den Getreidekörnern enthaltene Stärke kann mit einem hohen Wirkungsgrad direkt aus dem verschroteten Material in vergärbare Glucosekonzentrate überführt und so für die Milchsäurebakterien als Substrat verfügbar gemacht werden. Der bisher übliche Umweg über den Einsatz reiner Stärke, die bisher in einem Mehrstufenprozeß erst aus Weizen erzeugt werden mußte, kann somit entfallen. Der neue Prozeß liefert neben dem Hauptprodukt Milchsäure auch noch einen als Futtermittel geeigneten Feststoff, der sich aus dem Restschrot und abgetöteter Milchsäurebakterienmasse zusammensetzt. Die Untersuchungen zur Aufarbeitung des Fermentationsmediums haben gezeigt, daß es möglich ist, mit Hilfe der Membrantrennverfahren Mikro-/Ultrafiltration, Nanofiltration und Elektrodialyse nicht nur die Biomasse vom fermentierten Natriumlactat abzutrennen, sondern auch das Salz in Milchsäure und Natronlauge ohne den Anfall von Nebenprodukten aufzuspalten und zu konzentrieren. Insbesondere bei der Konzentrierung der Milchsäure durch Elektrodialyse ist eine wesentliche Energieeinsparung gegenüber dem bisher eingesetzten thermischen Verfahren durch Vakuumeindampfung möglich.

6 Symbole

T	Temperatur	[°C]
pH	pH -Wert	
PG	Maximale Partikelgröße	[mm]
RS	Reststärkegehalt im Schrot	[% in TS]
TS	Trockensubstanzgehalt	[%]
S	Glucosekonzentration	[g/l]
Δt	Hydrolysedauer	[h]

Literatur

- [1] Van Velthuisen, J.A.: Lactic acid production and utilization. In: Carbohydrate Organic Raw Materials III, Workshop 1994, Hrsg.: Van Bekkum, H., Roepers, H., VCH Weinheim, 1996, S. 129-140.
- [2] Parajo, J.C., Alonso, J.L., Santos, V.: Lactic acid from wood. *Process Biochemistry* 31 (1996) Heft 3, S. 271-280.
- [3] Datta, R., Tsai, S.-P.: Lactic acid production and potential uses: A technology and economics assessment. ACS Symposium Series, 666 (Fuels and chemicals from biomass), 1997, S. 224-236.
- [4] -, -: Plastic plant Japanese. *Nikkei Weekly* 33 (1994) Heft 1672, S. 9.
- [5] -, -: Polymer biodegradable technology in France. *Chemistry News* 65 (1996), Heft 1699, S. 27.
- [6] -, -: Polylactide Polymer Biodegradable Commercial Use Research US. CAS Biotech Updates, Commercial Fermentation, Biotech Industry Notes (1995) Heft 8, S. 29.
- [7] Shamala, T.R., Sreekantiah, K.R.: Degradation of starchy substrates by a crude enzyme preparation and utilization of the hydrolyzates in lactic fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 9 (1987), Heft 12, S. 726-729.
- [8] Richter, K., Rühlemann, I., Becker, U.: Das Leistungspotential der Milchsäurebakterien und die Möglichkeiten seiner praktischen Nutzung in diskontinuierlichen Gärprozessen. *Lebensmittelindustrie* 37 (1987), Heft 2, S. 67-69.
- [9] Richter, K.: Aus Roggenmehl wird Milchsäure. *Landtechnik* 50 (1995), Heft 6, S. 356-357.
- [10] Hofvendahl, K., Hahn-Haegerdal, B.: The effect of nutrients and alpha-amylase inactivation on the fermentative lactic acid production in whole wheat flour hydrolyzate by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435. In: Novel Uses Process. Hrsg.: Campbell, G.M., Plenum, New York, 1997, S. 219-227.
- [11] Baganz, K., Kraut, D., Richter, K.: Möglichkeiten der alternativen Nutzung von Stärkepflanzen bei der Herstellung von Basischemikalien. *Bornimer Agrartechnische Berichte*, (1993), Heft 2, S. 109-127.
- [12] Börgardts, P., Kruschke, W., Trösch, W.: Kombinierte Wertstoffgewinnung und Abwasserreinigung durch den Einsatz von Membranverfahren am Beispiel der Milchsäureproduktion aus Molkepermeat. *Chem.-Ing.-Techn.* 66 (1994), Heft 4, S. 441-448, Heft 6, S. 731-739 und Heft 9, S. 1270-1271.
- [13] Hongo, M., Nomura, Y., Iwahara, M.: A novel method of lactic acid production by electro dialysis fermentation. *Appl. Environm. Microbiol.*, 52 (1986), S. 314-319.
- [14] Boyaval, P., Corre, C., Terre, S.: Continuous lactic acid fermentation with concentrated product recovery by ultrafiltration and electro dialysis. *Biotechnology Letters* 9, (1987), Heft. 3, S. 207-212.
- [15] De Racourt, A., Girard, D., Prigent, Y., Boyaval, L. P.: Lactose continuous fermentation with cells recycled by ultrafiltration and lactate separation by electro dialysis: modelling and simulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30 (1989), S.521-527, 528-534.
- [16] Deuschle, A.: Anwendungen der Elektrodialyse ermöglicht eine abfallfreie und abwasserfreie Produktion. *Maschinenmarkt* (1995), Heft 14, 3. April, Sonderdruck.
- [17] Bauer, B.: Bipolare Membrantechnologie. F & S Filtrieren und Separieren (1995) special Membrantechnik, 28-35
- [18] -, -: Termamyl. Product Sheet, Novo Nordisk, Enzyme process Division, 1994.
- [19] Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, N. E.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Bd. 2, London, Williams und Wilkins, 1986.
- [20] Ye, K., Jin, S., Shimizu, K.: Cell Recycle and Broth Reuse Fermentation with Cross-Flow Filtration and Ion-Exchange. *Resin. J. Chem. Tech. Biotechnol.* 66 (1996), S. 223-226.
- [21] Rehmann, D.: Modifizierter Elektrodialyseprozeß zur Abtrennung und Aufkonzentrierung von Milchsäure. *Fortschr.-Ber. VDI Reihe 3* Nr. 18. Düsseldorf: VDI-Verlag, 1990.
- [22] Kuppinger, F.-F., Neubrand, W., Rapp, H.-J., Eigenberger, G.: Elektromembranverfahren. Teil 1 und 2: Grundlagen und Modellbildung, Anwendungsbeispiele. *Chem.-Ing.-Tech.* 67 (1995) Heft 4, S. 441-448, Heft 6, S. 731-739.