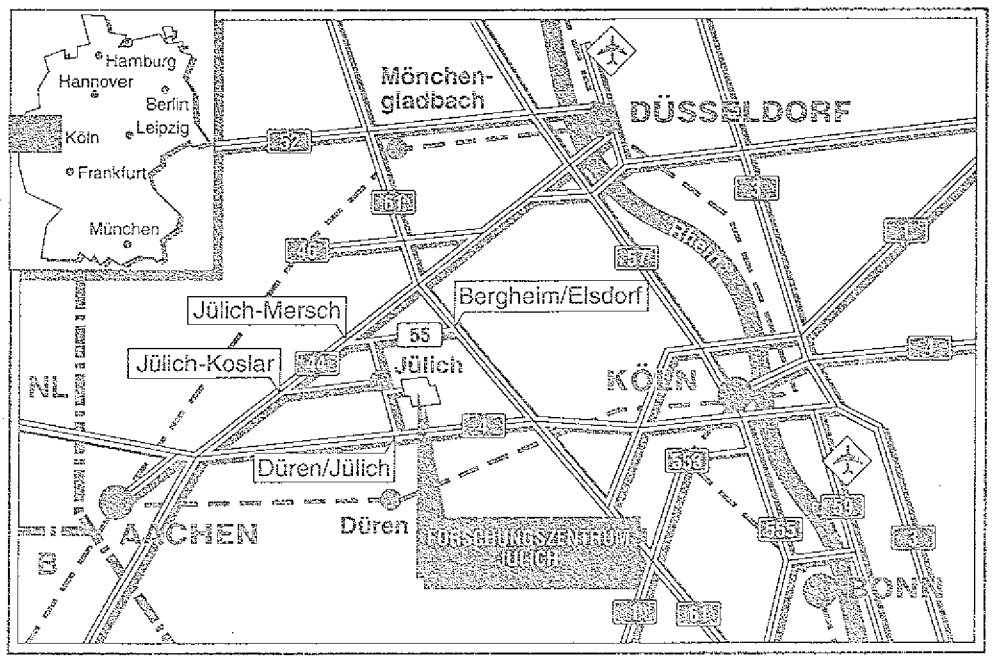
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

Institut für Biotechnologie

Ethanolproduktion mit immobilisierten *Zymomonas mobilis* im Wirbelschichtreaktor

Dirk Weuster-Botz



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2518
ISSN 0366-0885
Institut für Biotechnologie Jül-2518
D 90 (Universität Karlsruhe)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
Postfach 1913 · D-5170 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

Ethanolproduktion mit immobilisierten *Zymomonas mobilis* im Wirbelschichtreaktor

Dirk Weuster-Botz

Dissertation,

genehmigt von der Fakultät für Bauingenieur- und Vermessungswesen der Universität Fredericiana zu Karlsruhe,

1991

Referenten:

Prof. Dr. rer. nat. L. Hartmann
(Ordinarius für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers der Universität Karlsruhe, TH)

Prof. Dr. C. Wandrey
(Ordinarius für Biotechnologie der Universität Bonn)

Ethanolproduktion mit immobilisierten *Zymomonas mobilis* im Wirbelschichtreaktor

1. Einleitung 1

2. Problemstellung und Zielsetzung 3

3. Theoretische Grundlagen 7
   - 3.1 Ökologie von *Zymomonas mobilis* 7
   - 3.2 Stoffwechseleigenschaften von *Zymomonas mobilis* 8
   - 3.3 Mathematische Beschreibung mikrobieller Prozesse 10
     - 3.3.1 Kinetik des Wachstums und der Produktbildung 10
     - 3.3.2 Mikroorganismen in Suspensionskultur 13
   - 3.4 Immobilisierung von Mikroorganismen 15
   - 3.5 Mathematische Beschreibung mikrobieller Prozesse mit immobilisierten Organismen 18

4. Material und Methoden 22
   - 4.1 Organismus und Kulturbedingungen 22
   - 4.2 Analysenmethoden 23
     - 4.2.1 Suspendierte Biomasse 23
     - 4.2.2 Elementarzusammensetzung der Biomasse 24
     - 4.2.3 Immobilisierte Biomasse 24
     - 4.2.4 Glukose 25
     - 4.2.5 Ethanol und Nebenprodukte 26
     - 4.2.6 Laktat 28
     - 4.2.7 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen 28

5. Apparativer Aufbau und Durchführung der Versuche 29
   - 5.1 Kontinuierlicher Rührfermenter 29
   - 5.2 Diskontinuierliche Sorptionsversuche 31
   - 5.3 Labor-Wirbelschichtanlage 31
     - 5.3.1 2,2 l Wirbelschichtreaktor 31
     - 5.3.2 Hydraulische Charakterisierung 32
     - 5.3.3 Fließschema der Labor-Wirbelschichtanlage 33
   - 5.4 Technikums-Wirbelschichtanlage 37
     - 5.4.1 55 l/ 50 l Wirbelschichtreaktoren 37
     - 5.4.2 Hydraulische Charakterisierung 38
     - 5.4.3 Fließschema der Technikums-Wirbelschichtanlage 39
   - 5.5 On-line Datenerfassung und Prozeßregelung 42

6. Versuchsergebnisse und Diskussion 49
6.1 Voruntersuchungen zur Verfahrensentwicklung 49
6.1.1 Kinetik der Ethanolbildung von *Zymomonas mobilis* 49
6.1.2 Einfluß von Laktat auf Wachstum und Produktbildung von *Zymomonas mobilis* 58
6.1.3 Immobilisierung von *Zymomonas mobilis* an offenporigen Sintergläsern 59
6.2 Sterile Ethanolfermentationen im Labor-Wirbelschichtreaktor 64
6.2.1 Sterile Kolonisierung von Sinterglas mit *Zymomonas mobilis* 64
6.2.2 Stationäre Betriebsdaten im Labor-Wirbelschichtreaktor 67
6.2.3 Kaskadierung von Wirbelschichtreaktoren 72
6.2.4 Aktivität von immobilisierten *Zymomonas mobilis* Bakterien 76
6.3 Insterile Ethanolfermentationen in Labor- und Technikums-Wirbelschichtreaktoren 84
6.3.1 Fermentation von hydrolysierter B-Stärke im Labor-Wirbelschichtreaktor 84
6.3.2 Fermentation von hydrolysierter B-Stärke in 2-stufiger Technikums-Wirbelschichtanlage 94
6.3.3 Abschätzung des Gasanteils im Wirbelbett 102
6.4 Diskussion ausgewählter Aspekte 107
6.4.1 Produktinhibierung 107
6.4.2 Trägergeometrie 109

7. Zusammenfassung 111

8. Symbolverzeichnis 114

9. Literatur 117

10. Anhang 122
10.1 Biomassebestimmung in Sinterglas 122
10.2 Umsatzregelung der Wirbelschichtanlage 124
10.3 Berechnung des Gasanteils im Wirbelbett 127
10.4 Liste der verwendeten Geräte 129
10.5 Konstruktionszeichnungen Bauteile Wirbelschichtreaktoren 132
10.5.1 Labor-Wirbelschichtreaktor 132
10.5.2 Technikums-Wirbelschichtreaktor 136
10.6 Konfiguration Meßdaten-Erfassungs- und Auswerte-Software 141
10.7 Verzeichnis Abbildungen 150
10.8 Verzeichnis Tabellen 155

1. Einleitung

Ethanol ist auch heute noch das mengenmäßig bedeutenste biotechnologische Produkt, das weltweit hergestellt wird. Der überwiegende Teil der jährlich aus zucker- oder stärkehaltigen Rohstoffen fermentativ produzierten 8 Millionen Tonnen Ethanol wird in Brasilien und den USA erzeugt, wo die Produktion von Gärungsalkohol als **Energieträger** staatlich subventioniert wird (HACKING 1986).
Daneben stellt Ethanol einen wichtigen industriellen **Rohstoff** dar, der Ausgangsstoff für die Synthese anderer organischer Verbindungen ist, die als Lösungsmittel, Extraktionsmittel, Farbstoff, Klebstoff, Pharmazeutika, Detergenzien, Pestizide, Weichmacher, Kosmetika und Kunststoffharze Verwendung finden.

In der Bundesrepublik Deutschland wurden 1988 145000 Tonnen Ethanol als Industrierohstoff benötigt, wobei lediglich 25000 Tonnen auf fermentativen Weg hergestellt wurden. Dies hat seine Grund in den Herstellungskosten. Der 1988 produzierte **Gärungsalkohol** war mit durchschnittlich 606,7 $/to Ethanol um knapp 12 % **teurer** als der aus Ethylen synthetisierte Ethanol (FROST/SULLIVAN 1989).

Als kohlenhydrathaltige Rohstoffe zur Ethanolgärung werden Zuckerrohr, Zuckerhirse, Zuckerrübe, sowie Mais, Getreide und Kartoffeln nach vorheriger Hydrolyse eingesetzt.

Industrielle Ethanolgärungen werden in Rührkesselreaktoren durchgeführt, die meistens diskontinuierlich oder halbkontinuierlich, seltener kontinuierlich betrieben werden. (KOSARIC et al. 1983; LYONS 1984; HACKING 1986).
Als Gärorganismen werden traditionell Hefen eingesetzt, die zum Wachstum Sauerstoff benötigen, das Zielprodukt Ethanol jedoch unter anaeroben Bedingungen bilden. Bei diskontinuierlicher Fahrweise werden deshalb im allgemeinen 2 Prozeßphasen (aerobe Wachstumsphase und anaerobe Produktionsphase) durchlaufen, bei kontinuierlicher Fahrweise wird meist zusätzlich zum Produktionsfermenter ein aerob betriebener Anzuchtfermenter eingesetzt.
Daher wird bei den in jüngster Zeit neu entwickelten, großtechnischen Verfahren zur kontinuierlichen Ethanolfermentation mit Hefen versucht, beide Prozeßphasen in einem Reaktor zu realisieren. Ein Beispiel ist das "Hoechst/Uhde-Verfahren", bei dem ein Schlaufen-Reaktor eingesetzt wird, in dem gezielt aerobe und anaerobe Zonen erzeugt werden (SCHÄFER 1989).

Da die Herstellung von Ethanol als industrielle Grundchemikalie an große Produktionsmengen gebunden ist, andererseits mikrobiologische Prozesse nur relativ langsam und in verdünnter Lösung ablaufen - die Endproduktkonzentration also entsprechend niedrig ist - sind Fermentervolumina von mehreren 100 m^3 bis über 1000 m^3 die Regel. Deshalb zeichnen sich Prozesse zur mikrobiellen Ethanolerzeugung prinzipiell durch **hohe Kapitalkosten** und durch **hohen Rohmaterialverbrauch** aus. Je nach Verfahren verursachen die Kapitalkosten weit über 20% der Endproduktkosten, während der Kostenanteil für das Rohsubstrat 50-70 % beträgt (MAIORELLA et al. 1984; HACKING 1986).

Zur Verbesserung der ökonomischen Situation bei der fermentativen Ethanolproduktion bietet sich somit in erster Linie der Einsatz von **billigen Abfallsubstraten** an.
Hierbei wird nicht nur ein Wertstoff erzeugt, sondern auch die oftmals extrem hohe organische Belastung des Abfallstroms soweit reduziert, daß eine weitere biologische Abwasserbehandlung möglich wird.

Industriell werden bisher zum Teil die in der Papierindustrie anfallenden Sulfitablaugen, sowie die bei der Käseherstellung anfallende Molke zur fermentativen Ethanolerzeugung genutzt (KOSARIC et al. 1983).

Zur Verringerung des Kapitalkostenanteils bei der Ethanolfermentation sind Verfahren einzusetzen, mit denen sich höhere volumetrische Produktivitäten (Raum-Zeit-Ausbeuten) erzielen lassen. Um die Raum-Zeit-Ausbeute einer Fermentation zu steigern, ist primär der Einsatz eines möglichst aktiven Biokatalysators in einem kontinuierlichen Verfahren sinnvoll.
Ein Mikroorganismus, der Glukose oder Fruktose 5 bis 6 mal schneller zu Ethanol und CO_2 umsetzt, als die herkömlich zur Ethanolfermentation eingesetzten Hefen, ist das anaerobe Bakterium *Zymomonas mobilis* (siehe Abbildung 1.1). Auch die Selektivität der Ethanolbildung liegt bei diesem Bakterium mit maximal 49 % über den mit Hefen erreichbaren Wert von maximal 46 % (siehe Tabelle 1.1). Daneben zeigt *Zymomonas mobilis* dieselbe hohe Ethanoltoleranz, wie sie auch bei Hefen feststellbar ist (ROGERS et al. 1982; BRINGER 1983).

	Zymomonas mobilis	*Saccharomyces carlsbergensis*
Verdopplungszeit, h	2,51	5,64
Ethanol Produktions-geschwindigkeit, g/(g*h)	5,44	0,82
max. Biomasse-Selektivität, g/g	0,028	0,043
max. Ethanol-Selektivität, g/g	0,49	0,46

Tab. 1.1: Vergleich der Gäreigenschaften von *Zymomonas mobilis* und *Saccharomyces carlsbergensis* (BRINGER 1983).

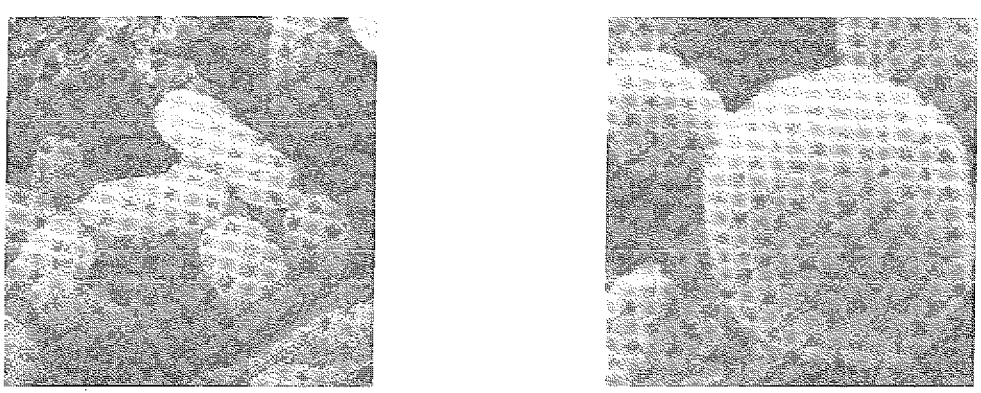


Abb. 1.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Zymomonas mobilis* Bakterien und Hefezellen.

2. Problemstellung und Zielsetzung

Ausgehend von der Forderung nach Verwertung von billigen Abfallsubstraten zur Ethanolgärung wurde am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich ein neues Verfahren zur kontinuierlichen Ethanolfermentation entwickelt. Dieses Verfahren zeichnet sich durch den Einsatz des Bakteriums *Zymomonas mobilis* in einem kontinuierlich betriebenen Rührkessel aus. Als Abfallsubstrat wird eine enzymatisch hydrolysierte Abfallstärkefraktion, sogenannte B-Stärke, vergoren, die bei der Herstellung von Glukose und Gluten aus Weizenmehl anfällt (Fließschema siehe Abbildung 2.1). B-Stärke enthält alle nicht verwerteten Bestandteile des Weizenkorns, also Restprotein, Fett und Fasern und ist zusätzlich mit Prozeßabwässern versetzt.

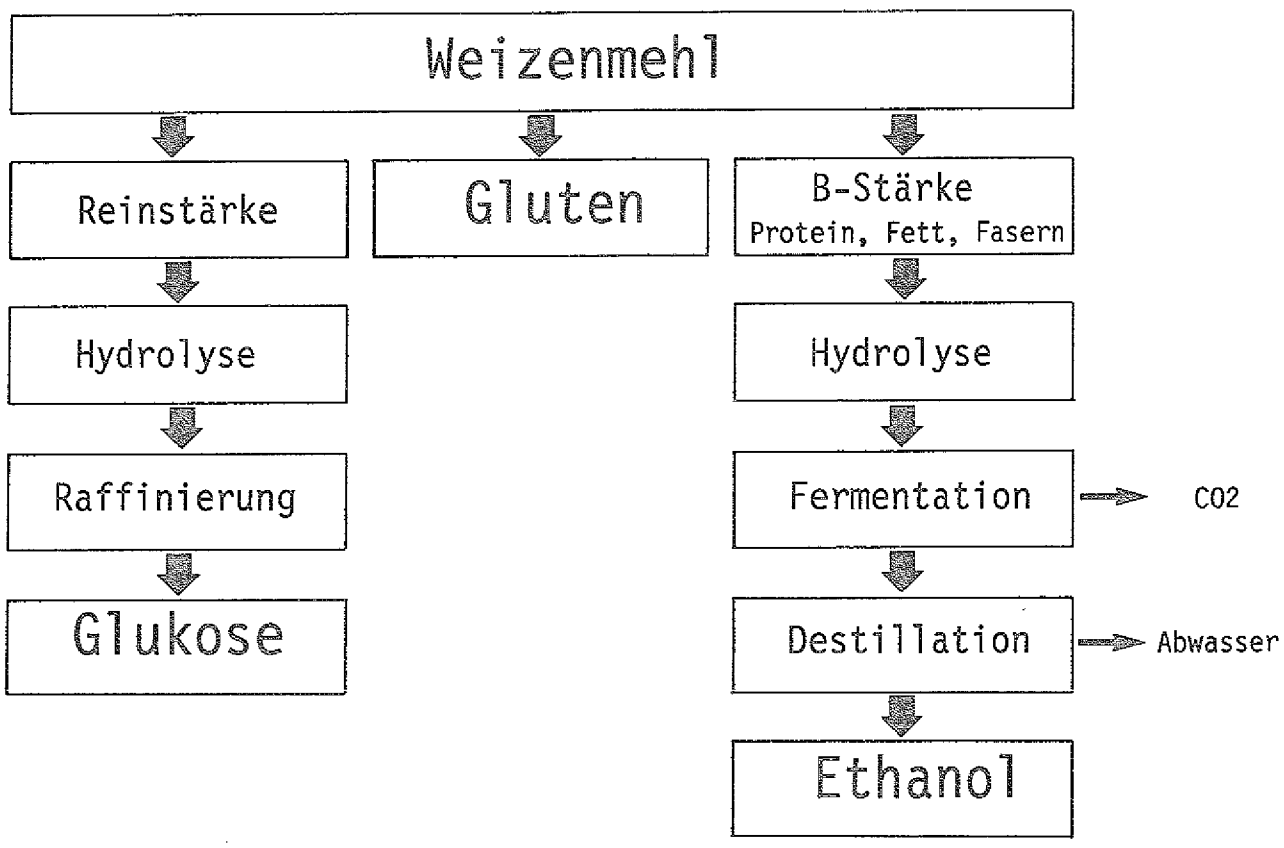


Abb. 2.1: Fließschema der Produktion von Glukose und Gluten aus Weizenmehl

Die kontinuierliche, großtechnische Ethanolproduktion erfolgt in 2 parallel betriebenen 70 m^3 Rührfermentern. Bei einer Verweilzeit von 15 Stunden wird B-Stärkehydrolysat mit einer Glukosekonzentration von 120-130 g/l zu 99 % zu Ethanol umgesetzt. Dabei werden täglich bis zu 10 m^3 96 %igen Ethanols produziert. Die Raum-Zeit-Ausbeute liegt bei 3,5 bis 4,5 kg/(m^3*h). Nach der Abdestillation des Ethanols gelangt die zurückbleibende Schlempe in eine anaerobe Abwasserreinigungsanlage. Das in dieser Anlage gebildete Biogas liefert die Energie für die Destillationsanlage (BRINGER/SAHM 1985).

Unter sterilen Bedingungen läuft die im kontinuierlich betriebenen Rührkessel durchgeführte Ethanolgärung mit *Zymomonas mobilis* über Monate stabil. Wird jedoch aus Kostengründen auf die Sterilisation des Substrats verzichtet, so kommt es zu Prozeßinstabilitäten, insbesondere durch laktatbildende Mikroorganismen. Diese Kontaminanten werden bei insterilem Betrieb ständig mit dem Substratstrom in den Reaktor eingetragen und können sich aufgrund ihrer Fähigkeit, auch die von *Zymomonas mobilis* nicht verwertbaren Pentosen zu metabolisieren, mit zunehmender Fermentationsdauer durchsetzen. (BRINGER/SAHM/SWYZEN 1984).

Daraus ergeben sich als Zielsetzungen dieser Verfahrensentwicklung zur mikrobiellen Ethanolerzeugung:

1. Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute:

Die bei der Vergärung von B-Stärkehydrolysat mit *Zymomonas mobilis* im kontinuierlich betriebenen Rührkessel erzielten Raum-Zeit-Ausbeuten sind nicht höher, als die mit Hefen erzielten Raum-Zeit-Ausbeuten (SWYZEN/BRÜGGEMANN 1990). Der niedrigere Biomasseertrag von *Zymomonas mobilis* im Vergleich zu Hefen (siehe Tabelle 1.1) bewirkt zwar eine höhere Produkt-Selektivität, führt aber im herkömmlichen Rührkesselverfahren zu einer niedrigeren Zelldichte (TRAMM-WERNER 1987). Die hohe spezifische Produktivität von *Zymomonas mobilis* kommt demnach erst dann zum Tragen, wenn durch geeignete Maßnahmen die aktive Biomassekonzentration im Reaktor erhöht wird.
Eine Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute ist bei katalytischen Prozessen primär durch eine Erhöhung der aktiven Biokatalysatorkonzentration im Reaktor zu erzielen.

Die Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute bei der Ethanolfermentation mit *Zymomonas mobilis* soll durch Immobilisierung der Zellen in offenporigem Sinterglas erfolgen. Dieses anorganische Trägermaterial wurde zum Einsatz in der anaeroben Abwasserreinigung entwickelt und optimiert (AIVASIDIS 1989).
Dabei soll das Trägermaterial aufgrund der starken Feststoffbelastung des B-Stärkehydrolysats in einem Wirbelschichtreaktor eingesetzt werden.

2. Vergärung von Abfallsubstrat ohne energie- und damit kostenintensive Vorbehandlung wie Sterilisation oder Pasteurisation:

Da bei der Verwendung von nicht sterilem Substrat in einem kontinuierlichen Fermentationsverfahren ständig Kontaminanten in den Reaktor eingetragen werden, die in Konkurrenz zu dem eingesetzten Organismus treten können, müssen die Reaktionsbedingungen im Reaktor so eingestellt werden, daß der eingesetzte Organismus begünstigt wird.
Bei der Vergärung eines vorgegebenen komplexen Abfallsubstrats mit Glukose als C-Quelle lassen sich durch Optimierung von pH, Temperatur und Medienbestandteilen kaum selektive Bedingungen für den gewünschten Organismus einstellen.
Gelingt es jedoch durch eine genügend hohe Akkumulation von *Zymomonas mobilis* im Reaktor die Verweilzeit der flüssigen Phase so weit zu verkürzen, daß der Reaktor unter Auswaschbedingungen für Kontaminanten betrieben werden kann, und kann gleichzeitig die Akkumulation von Kontaminanten im Reaktor unterbunden werden, so sollte ein stabiler Reaktorbetrieb auch unter insterilen Bedingungen möglich sein.

Dies soll durch ein geeignetes Verfahrenskonzept sichergestellt werden. In einer ersten Prozeßphase, der Kolonisierungsphase, soll das Trägermaterial unter sterilen Bedingungen vollständig mit *Zymomonas mobilis* Zellen gefüllt werden. Danach folgt die eigentliche insterile Produktionsphase, die aufgrund der vorher erfolgten Akkumulation von *Zymomonas mobilis* im Reaktor bei so kurzen Verweilzeiten durchgeführt werden kann, daß Kontaminanten ausgewaschen werden. Dabei muß sichergestellt werden, daß während der insterilen Produktionsphase keine Kontaminanten in den Träger eindringen können, um eine Coimmobilisierung zu vermeiden.

3. Vollständige Umsetzung des eingesetzten Substrats zu Ethanol:

Die bei der Ethanolgärung erreichbaren Endproduktkonzentrationen sind aufgrund der bei Primärmetaboliten üblicherweise auftretenden Produktinhibierung begrenzt. In diskontinuierlich betriebenen Rührreaktoren lassen sich bei mehrtägigen Fermentationen sowohl mit Hefen als auch mit *Zymomonas mobilis* Ethanolkonzentrationen von bis zu 120 g/l erreichen, während in kontinuierlich betriebenen Rührfermentern maximal 72 g/l Ethanol im Ablauf zu finden sind (KOSARIC et al. 1983; BAJPAI/MARGARITIS 1985; JÖBSES/ROELS 1986). Bei diesen hohen Ethanolkonzentrationen lassen sich aufgrund der Endproduktinhibierung nur sehr niedrige Raum-Zeit-Ausbeuten erzielen.
Die Kosten zur destillativen Abtrennung von Ethanol aus wäßrigen Lösungen steigen erst unterhalb einer Konzentration von 50 g/l Ethanol stark an, so daß Ethanolkonzentrationen von mindestens 50 g/l im Ablauf des Fermenters angestrebt werden müssen, um eine wirtschaftliche Abtrennung des Produkts zu gewährleisten (MAIORELLA et al. 1984; ARMSTRONG et al. 1985).
Ausgehend von der maximal mit *Zymomonas mobilis* Bakterien erreichbaren Ethanolselektivität von 0,49 g/g (siehe Tab. 1.1) ergibt sich somit 100 g/l als unteres, wirtschaftlich vertretbares Limit der Glukosekonzentration im Substrat. Andererseits können aufgrund der Produktinhibierung im kontinuierlichen, einstufigen Reaktorsystem mit *Zymomonas mobilis* maximal 147 g/l Glukose vollständig umgesetzt werden, bei dann allerdings sehr niedrigen Raum-Zeit-Ausbeuten.
Zur vollständigen Vergärung höherkonzentrierter Glukose-haltiger Substrate bietet sich die simultane Abtrennung des gebildeten Produkts (CALIBO et al. 1989) oder der Einsatz eines Rohrreaktors an (KLEIN/KRESSDORF 1986).

Zur konkreten Umsetzung der oben formulierten Ziele dieser Verfahrensentwicklung soll im einzelnen folgendermaßen vorgegangen werden:

1. Der prinzipielle Einsatz von offenporigem Sinterglas zur Immobilisierung von *Zymomonas mobilis* Bakterien ist zu untersuchen.

2. Ein sterilisierbarer Labor-Wirbelschichtreaktor für die Ethanolfermentation mit in offenporigem Sinterglas immobilisierten *Zymomonas mobilis* Bakterien ist zu entwickeln.

3. Die für eine Prozeßsteuerung und -regelung des Wirbelschichtreaktors zur Ethanolproduktion erforderliche on-line Analytik inklusive Prozeßrechner ist zu implementieren.

4. Die Ermittlung von Betreibsparametern zur Charakterisierung der kontinuierlichen Ethanolfermentation mit *Zymomonas mobilis* im Wirbelschichtreaktor ist zunächst unter definierten Bedingungen durchzuführen.

5. Durch Modellierung des Stofftransports im mit *Zymomonas mobilis* Bakterien gefüllten Trägermaterial des Wirbelschichtreaktors ist die Effektivität der Immobilisierung zu ermitteln. Zur Überprüfung des verwendeten Ansatzes ist eine Korrelation mit den unter definierten Bedingungen ermittelten Betriebsparametern durchzuführen.

6. Eine weitere reaktionstechnische Optimierung ist mit Hilfe der im Labor-Wirbelschichtreaktor unter definierten Bedingungen ermittelten Betriebsparameter im Hinblick auf die Zielsetzung - hohe Raum-Zeit-Ausbeute bei vollständigem Umsatz - durchzuführen.

7. Zur Umsetzung des Verfahrenskonzepts (Sterile Kolonisierung, insterile Produktion) ist die sterile Kolonisierungsphase mit Hilfe der implementierten on-line Analytik und Prozeßregelung zeitoptimal zu gestalten.

8. Die Stabilität der nachfolgenden insterilen Produktionsphase ist mit der Vergärung von B-Stärkehydrolysat im Wirbelschichtreaktor in einem Dauerversuch zu untersuchen.

9. Mit Hilfe der ermittelten reaktionstechnischen Daten und den Ergebnissen der Stabilitätsuntersuchungen ist zu prüfen, ob Maßnahmen zur Überwindung der Produktinhibierung (simultane Ethanolabtrennung, Rohrreaktor) bei der insterilen Umsetzung von Abfallsubstrat im Wirbelschichtreaktor sinnvoll sind.

10. Die im Labor-Wirbelschichtreaktor ermittelten Betriebsparameter zur vollständigen Vergärung von B-Stärkehydrolysat mit immobilisierten *Zymomonas mobilis* Bakterien sind auf eine maßstabsvergrößerte Technikums-Wirbelschichtanlage zu übertragen.

3. Theoretische Grundlagen

3.1 Ökologie von *Zymomonas mobilis*

Das anaerobe, Gram-negative Bakterium *Zymomonas mobilis* wurde erstmals 1911 von BARKER und HILLIER aus verdorbenem 'Cidre' (vergorener Obstsaft) in England isoliert. Aber erst LINDNER, der dieselbe Bakterienart 1924 in mexikanischer 'Pulque' (vergorener Agavensaft) entdeckte, gab diesem Ethanolgärer den Namen *Zymomonas spec.* (SWING/DE LAY 1977).

Zymomonas mobilis ist in den tropischen Gebieten Amerikas, Afrikas und Asiens verantwortlich für die Ethanolbildung bei der spontanen Vergärung von zuckerhaltigen Säften zu alkoholischen Getränken (Palmweine).
Die Bedingungen, die diese ökologischen Nischen dem Bakterium *Zymomonas mobilis* bieten, lassen sich am Beispiel der Palmweine wie folgt formulieren :
Als C-Quellen liegen lediglich Glukose, Fruktose und Saccharose vor, weiterhin sind Aminosäuren und Vitamine im Saft enthalten. Die Organismen müssen unter hohen Zucker- und Ethanolkonzentrationen, bei niedrigen pH-Werten und tropischen Temperaturen unter anaeroben Bedingungen wachsen können. In wieweit synergistische Wechselwirkungen mit den anderen Organismen der komplexen Mikroflora in Palmweinen eine Rolle spielen, ist nicht bekannt (SWING/DE LAY 1977).

In den 60er Jahren wurden *Zymomonas mobilis* Bakterien als ernst zu nehmende Kontaminanten bei einigen Bierbrauprozessen erkannt (AULT 1965, RAINBOW 1971). Bei Faßbieren werden *Zymomonas*-Infektionen begünstigt, da *Zymomonas mobilis* Bakterien unter anaeroben Bedingungen und erhöhten Drücken wachsen können. Erhöhte Acetaldehyd-Konzentrationen im Bier werden auf *Zymomonas mobilis* zurückgeführt (DADDS et al. 1971). Bei der 'Lager'-Bierherstellung kommt es dagegen nicht zu Infektionen mit *Zymomonas mobilis*, da diese Fermentation bei Temperaturen zwischen 8 und 12 °C durchgeführt wird.

Zymomonas mobilis ist ein stäbchenförmiges, anaerobes Bakterium, daß polar begeißelt ist, eine Länge von 2 bis 6 µm und eine Breite von 1,0 bis 1,4 µm hat. *Zymomonas mobilis* Bakterien treten einzelnen oder paarweise auf. Eine Sporenbildung ist nicht möglich. Die Zellen benötigen für das Wachstum Pantothensäure und Biotin (SWING/DE LAY 1977).

Zymomonas mobilis Bakterien können in einem weiten pH- und Temperaturbereich aktiv sein. Als pH-Optimum für das Wachstum wird ein pH-Wert von 5,0 bis 7,0 (SWING/DE LAY 1977) und für die Produktbildung ein Wert von 4,4 bis 6,0 (BAJPAI/MARGARITIS 1986) angegeben.

Die Angaben für die optimale Temperatur für Wachstum von *Zymomonas mobilis* liegen zwischen 30 °C (SWING/DE LAY 1977) und 33 °C (STEVNSBORG et al. 1988). Als optimaler Temperaturbereich für die Produktbildung sind Werte zwischen 30 bis 36 °C gefunden worden (BAJPAI/MARGARITIS 1986, HUANG/CHEN 1988).

3.2 Stoffwechseleigenschaften von *Zymomonas mobilis*

Das Substratspektrum des chemoorganotrophen Bakteriums *Zymomonas mobilis* ist begrenzt auf Glukose, Fruktose und Saccharose (SWINGS/DE LEY 1977).

Die Vergärung dieser organischen Substrate zur Gewinnung von Stoffwechselenergie in Form von ATP zeichnet sich dadurch aus, daß die Spaltprodukte des Substrats zugleich als Wasserstoff-Donatoren und Wasserstoff-Acceptoren dienen. Ein Teil des Substrats wird also Energie-bringend oxidiert und als CO_2 ausgeschieden, während der andere Teil zum H-Acceptor (Acetaldehyd) umgebaut wird und zu Ethanol reduziert wird. Ethanol als Endprodukt des Energiestoffwechsels zählt demnach zu den Primärmetaboliten. Die Stöchiometrie der reinen Ethanolgärung von Glukose, unabhängig vom Stoffwechselweg, wird wie folgt formuliert (SCHLEGEL 1985):

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\,CO_2 + 2\,C_2H_5OH$$

Stoffwechselphysiologische Untersuchungen haben ergeben, daß *Zymomonas mobilis* zum katabolischen Abbau von Glukose zu Pyruvat über den 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Weg verfügt. Dies ist erstaunlich, da dieser Stoffwechselweg im allgemeinen nur bei strikt aeroben Mikroorganismen vorhanden ist (SWING/DE LAY 1977).
Zum katabolischen Abbau wird zunächst Glukose durch Phosphorylierung zu Glukose-6-phosphat in die stoffwechselaktive Form gebracht. Nach einer Dehydrogenierung zu 6-Phosphoglukonat, wobei der Wasserstoff auf NADP übertragen wird, wird durch eine Phosphoglukonatdehydratase unter Bildung von 2-Keto-3-desoxy-6-phosphoglukonat Wasser abgespalten. Dieses Ketodesoxyphosphoglukonat wird durch eine Aldolase zu Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat gespalten. Letztes wird wie im Fruktose-1,6-biphosphat-Weg zu Pyruvat, daß im Zentrum des Intermediärstoffwechsels steht, oxidiert. Diese Oxidation ist der wichtigste Schritt im Energiehaushalt anaerober Organismen, da hierbei pro Mol umgesetztes Glycerinaldehyd-6-phophat 2 mol ATP gebildet werden.
Die Nettobilanz dieser Substratphosphorylierung über den 2-Keto-3-desoxy-6-phosphoglukonat-Weg ergibt sich zu:

$$1\ \text{Glukose} \longrightarrow 2\ \text{Pyruvat} + 1\ NADPH_2 + 1\ NADH_2 + 1\ ATP$$

Der Netto-Energiegewinn, der dem Bakterium also für die anabolischen Reaktionen zur Verfügung steht, ist mit 1 Mol ATP pro Mol Glukose sehr gering. Dies erklärt die hohe Stoffwechselleistung dieses anaeroben Bakteriums und die hohe Selektivität zugunsten der Gärprodukte, da aufgrund der Energielimitierung nur wenig Zellmasse pro Mol umgesetzte Glukose gebildet werden kann.
Das gebildete Pyruvat wird mit Pyruvatdecarboxylase zu Acetaldehyd decarboxiliert, welches wie oben angegeben zu Ethanol reduziert wird. Diese bei *Zymomonas mobilis* vorliegende direkte Decarboxylierung des Pyruvats zur Ethanolvorstufe Acetaldehyd ist bei Bakterien einzigartig (SCHLEGEL 1985).

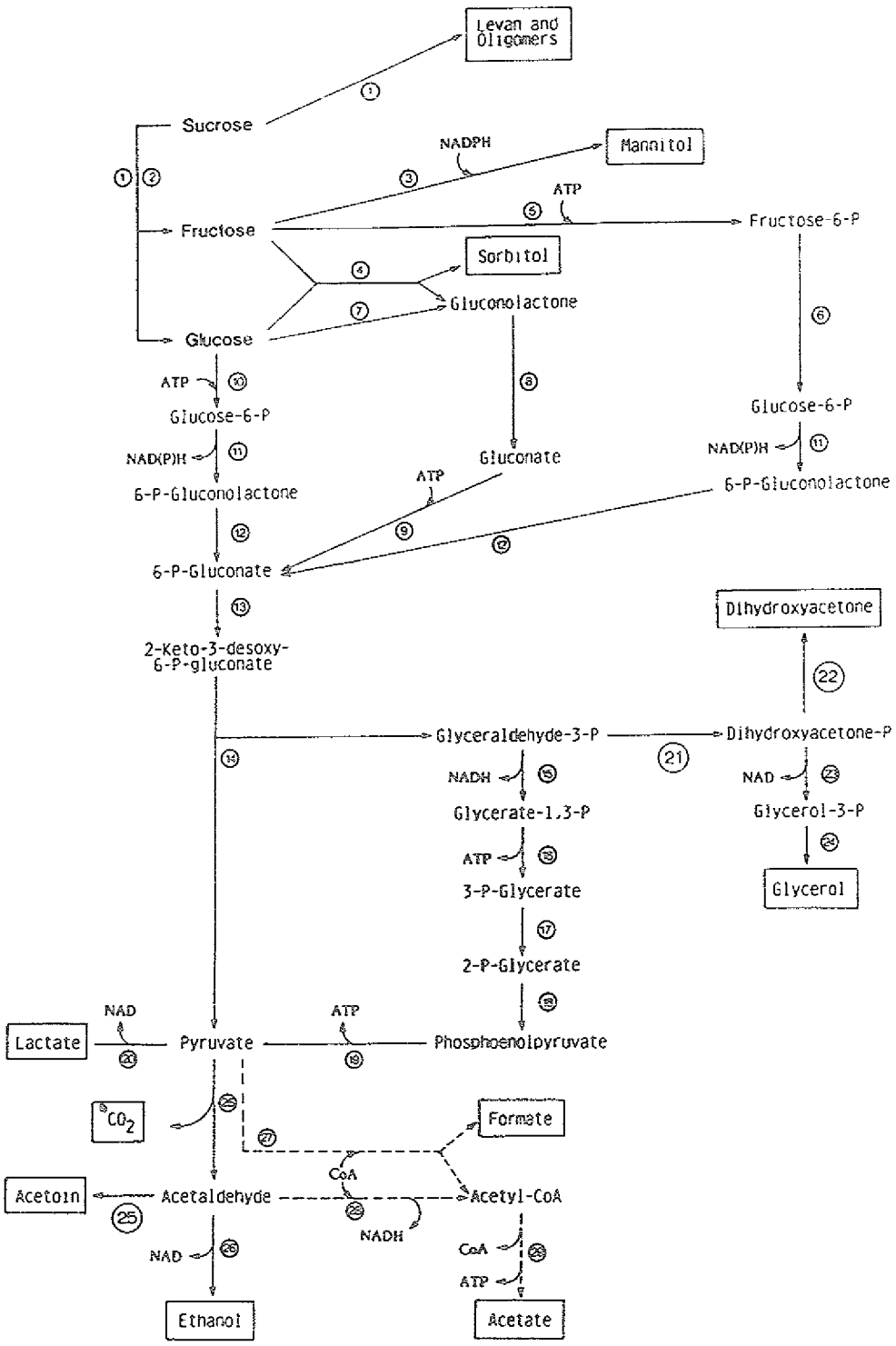


Fig. 1. Products of glucose, fructose and sucrose catabolism in *Zymomonas mobilis*. Broken lines: hypothetical pathways. Enzymes: 1, levansucrase; 2, invertase; 3, mannitol dehydrogenase; 4, glucose-fructose oxidoreductase; 5, fructokinase; 6, glucose-6-P isomerase; 7, glucose dehydrogenase; 8, gluconolactonase; 9, gluconatekinase; 10, glucokinase; 11, glucose-6-P dehydrogenase; 12, 6-P-gluconolactonase; 13, 6-P-gluconate dehydratase; 14, KDPG-aldolase; 15, glyceraldehyde-P dehydrogenase; 16, phosphoglycerate kinase; 17, Phosphoglycerate mutase; 18, enolase; 19, pyruvate kinase; 20, lactate dehydrogenase; 21, triose-P isomerase; 22, phosphatase; 23, glycerol-P dehydrogenase; 24, phosphatase; 25, pyruvate decarboxylase; 26, alcohol dehydrogenase; 27, pyruvate-formate lyase; 28, acetaldehyde dehydrogenase; 29, acetyl-CoA synthetase.

Abb. 3.1: Katabolische Stoffwechselwege bei *Zymomonas mobilis* (BRINGER 1988)

In Abb. 3.1 ist das vollständige Schema des Katabolismus von *Zymomonas mobilis* ausgehend von den 3 verwertbaren Kohlenstoffquellen einschließlich der beteiligten Enzyme aufgezeichnet (BRINGER-MEYER 1988).
Unter anaeroben Bedingungen ist die im Schema eingezeichnete Bildung von Nebenprodukten nicht signifikant (VIIKARI 1986). Ethanol wird mit hoher Selektivität gebildet. Ist jedoch Sauerstoff im Medium vorhanden, so kommt es neben einer Verringerung des Wachstums zur vermehrten Bildung von Acetaldehyd und Acetat. Acetaldehyd bleibt liegen, weil nicht genug des bei der Substratphosphorylierung gebildeten NADH zur Reduktion zum Ethanol zur Verfügung steht. Dieses wird bei der Reduktion des Sauerstoffs zum H_2O mit Hilfe einer Membran-gebundenen Oxidase bevorzugt verbraucht (BRINGER, FINN 1984).
Sind Glukose und Fruktose nebeneinander im Medium vorhanden, so verringert sich die Selektivität der Ethanolbildung besonders bei hohen Zuckerkonzentrationen durch die Bildung von Sorbit, daß von der Zelle nicht mehr weiter verwertet werden kann. Parallel zur Sorbitbildung wird mit Hilfe desselben Enzyms, einer Glukose-Fruktose-Oxidoreduktase, Glukonsäure gebildet (siehe Abb. 3.1). Glukonsäure wird mit Hilfe von Glukonatkinase in Glukonsäure-6-phosphat umgewandelt und über den 2-Keto-3-desoxy-6-phosphoglukonat-Weg abgebaut. Da hierbei weniger Reduktionsäquivalente als bei der direkten Umsetzung von Glukose entstehen, treten auch hier neben Ethanol und CO_2 noch Acetaldehyd, Acetoin und Acetat als Gärprodukte auf (REHR 1990).

3.3 Mathematische Beschreibung mikrobieller Prozesse

3.3.1 Kinetik des Wachstums und der Produktbildung

Unter mikrobiellem Wachstum versteht man die irreversible Zunahme der lebenden Substanz (EINSELE 1985). Die Vermehrung von Bakterien geschieht durch Zellteilung, so daß vereinfachend oft nur die Zellzahl berücksichtigt wird. Bei der Wahl der Biomassekonzentration C_x als Parameter wird jedoch die Zellmasse beobachtet, die sich aufgrund der Zunahme der Zellzahl und der Zellgröße ändert.

Der Zuwachs an Biomasse während des mikrobiellen Wachstums ist proportional der bereits vorhandenen Biomasse (Reaktion erster Ordnung):

$$dC_x/dt = \mu * C_x \qquad 3.1$$

Die Geschwindigkeitskonstante der Biomassezunahme, μ, wird als spezifische Wachstumsgeschwindigkeit bezeichnet. Diese spezifische Wachstumsgeschwindigkeit ist zum einen durch die Eigenschaften des Mikroorganismus und zum anderen durch die Milieubedingungen (pH, Temperatur, Substrate,...) festgelegt.

$$\mu = f(\text{Organismus},T,pH,C_i)$$

Zur Beschreibung des Wachstums von Mikroorganismen werden aufgrund der Komplexität des mikrobiellen Stoffwechsels und somit des Wachstumsvorgangs überwiegend nur unstrukturierte Modelle verwendet (MOSER 1988).

Unter substratlimitierenden Bedingungen, das bedeutet die Wachstumsgeschwindigkeit ist nur vom jeweiligen Organismus und einem 'limitierenden' Substrat abhängig, läßt sich die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit in Form einer Sättigungskinetik beschreiben. Am weitesten verbreitet ist der einfache, empirische Ansatz von MONOD (siehe Abb. 3.2):

$$\mu = \mu_{max} * C_s/(Ks + C_s) \qquad 3.2$$

für $pH, T, Ci = C_s$ = const.

Bei hohen Substratkonzentrationen ($C_s >> Ks$) ist die spezifische Wachstumsrate konstant und auf ihrem zellintern festgelegten maximalen Wert μ_{max}. Der Zuwachs an Biomasse ist unter diesen Bedingungen exponentiell.
Hat die Substratkonzentration den Wert der Sättigungskonstante Ks, so ist die halbe maximale spezifische Wachstumsrate erreicht.
Bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen ($C_s << Ks$) wächst die spezifische Wachstumsrate linear mit zunehmender Substratkonzentration mit Steigung μ_{max}/Ks an.

Bei der Exkretion von Primärmetaboliten wird der Zusammenhang zwischen Substrataufnahme und Produktbildung und dem daraus resultierendem Biomassewachstum, nach dem 'Yield'-konzept beschrieben, da der Energiegewinn durch die katabolischen Reaktionen zum überwiegenden Teil zum Aufbau von neuer Zellsubstanz genutzt wird, die Produktbildung also überwiegend wachstumsgekoppelt ist.
Der Ertragskoeffizient (engl.: yield) für das Biomassewachstum, Y_{xs} gibt an, welcher Anteil des verbrauchten Substrates pro Zeiteinheit in Organismenmasse umgewandelt wird (BERGTER 1983):

$$Y_{xs} = (dC_x/dt)/(dC_s/dt) \qquad 3.3$$

Entsprechend läßt sich der Ertragskoeffizient für das Biomassewachstum bezogen auf die Produktbildung, Y_{xp} definieren:

$$Y_{xp} = (dC_x/dt)/(dC_p/dt) \qquad 3.4$$

Eingesetzt in Gleichung 3.1 ergeben sich die spezifischen Umsetzungsgeschwindigkeiten für Substrat (q_s) und Produkt (q_p) zu:

$$q_s = 1/C_x * dC_s/dt = (\mu/Y_{xs}) \qquad 3.5$$

$$q_p = 1/C_x * dC_p/dt = (\mu/Y_{xp}) \qquad 3.6$$

Mit diesen Ansätzen können nur die streng wachstumsgekoppelten Umsetzungsgeschwindigkeiten beschrieben werden. Neben dem Wachstum benötigen Mikroorganismen noch zusätzliche Energie zur Erhaltung wichtiger Zellfunktionen (Erhaltungsstoffwechsel). Dies läßt sich in den kinetischen Ansätzen zur Substrataufnahme und Produktbildung durch einen zusätzlichen nicht wachstumsgekoppelten 'maintenance'-Faktor (m_s, m_p) berücksichtigen (PIRT 1975):

$$q_s = \mu/Y_{xs,max} + m_s \qquad 3.7$$

$$q_p = \mu/Y_{xp,max} + m_p \qquad 3.8$$

Die maintenance-Faktoren m_s und m_p werden in erster Näherung als unabhängig von der Konzentration am limitierenden Substrat angenommen.
Würde nun für die spezifische Wachstumsrate μ die Monodbeziehung eingesetzt (Gleichung 3.2), so würde auch wenn kein limitierendes Substrat mehr im Medium wäre, die spezifische Substrataufnahmerate q_s einen endlichen Wert haben (m_s). Da dies physikalisch nicht sinnvoll ist, wird die spezifische Wachstumsrate wie folgt formuliert (BERGTER 1983):

$$\mu = \mu_{max} * C_s/(Ks + C_s) - m_s * Y_{xs,max} \qquad 3.9$$

Bei dieser Formulierung ist die phänomenologisch maximale spezifische Wachstumsrate, die unter nicht substratlimitierenden Bedingungen gemessen wird, nicht mehr identisch mit dem kinetischen Parameter μ_{max}. Weiterhin ist bemerkenswert, daß dieser Modellansatz für die Wachstumsrate bei Erschöpfung des limitierenden Substrats ($C_s = 0$) negative Wachstumsraten ergibt (siehe Abb. 3.2).

In vielen Fällen ist es nicht ausreichend, mikrobielle Wachstumsgeschwindigkeiten nur in Abhängigkeit der Konzentration des limitierenden Substrats zu beschreiben. Oft ist die Anhäufung eines gebildeten Primärmetaboliten wachstumsbegrenzend (Produktinhibierung), oder ein Substratüberschuß hemmt das Wachstum, so daß die einfache Sättigungskinetik nach Monod erweitert werden muß.
Zur Beschreibung einer Produktinhibierung hat es sich am sinnvollsten erwiesen, einen empirischen, generell einsetzbaren Exponentialansatz nach LEVENSPIEL (1980) zu verwenden (VON EYSMONDT 1990). Eingesetzt in Gleichung 3.9 ergibt sich somit:

$$\mu = \mu_{max} * C_s/(Ks + C_s) * (1 - C_p/C_{p,max})^n - m_s * Y_{xs,max} \qquad 3.10$$

Dieser Modellansatz zur Beschreibung der Produktinhibierung beruht darauf, daß es eine maximale Produktkonzentration $C_{p,max}$ gibt, bei deren Überschreiten kein Wachstum mehr möglich ist. Der Inhibierungsverlauf wird durch den Exponenten n bestimmt.

Die Modellierung der Substratüberschußinhibierung erfolgt in der Regel in Anlehnung an den Mechanismus der unkompetitiven Hemmung wie er in der Enzymkinetik beschrieben wird (PIRT 1975). Erweitert um diesen Ansatz läßt sich die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit wie folgt formulieren:

$$\mu = \mu_{max} * C_s/(Ks + C_s + C_s^2/Ki) * (1 - C_p/C_{p,max})^n - m_s * Y_{xs,max} \qquad 3.11$$

Die Inhibierungskonstante Ki gibt die Substratkonzentration an, bei der die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit auf $\mu_{max}/2$ gefallen ist (falls $Ki >> Ks$). Bei Vorliegen einer

Substratüberschußinhibierung erhält man durch Differenzieren der Gleichung für die Wachstumskinetik nach der Substratkonzentration eine optimale Substratkonzentration $C_{s,opt}$, bei der die maximale Wachstumsgeschwindigkeit erreicht ist (siehe Abb. 3.2).

$$C_{s,opt} = (Ks*Ki)^{0.5} \qquad 3.12$$

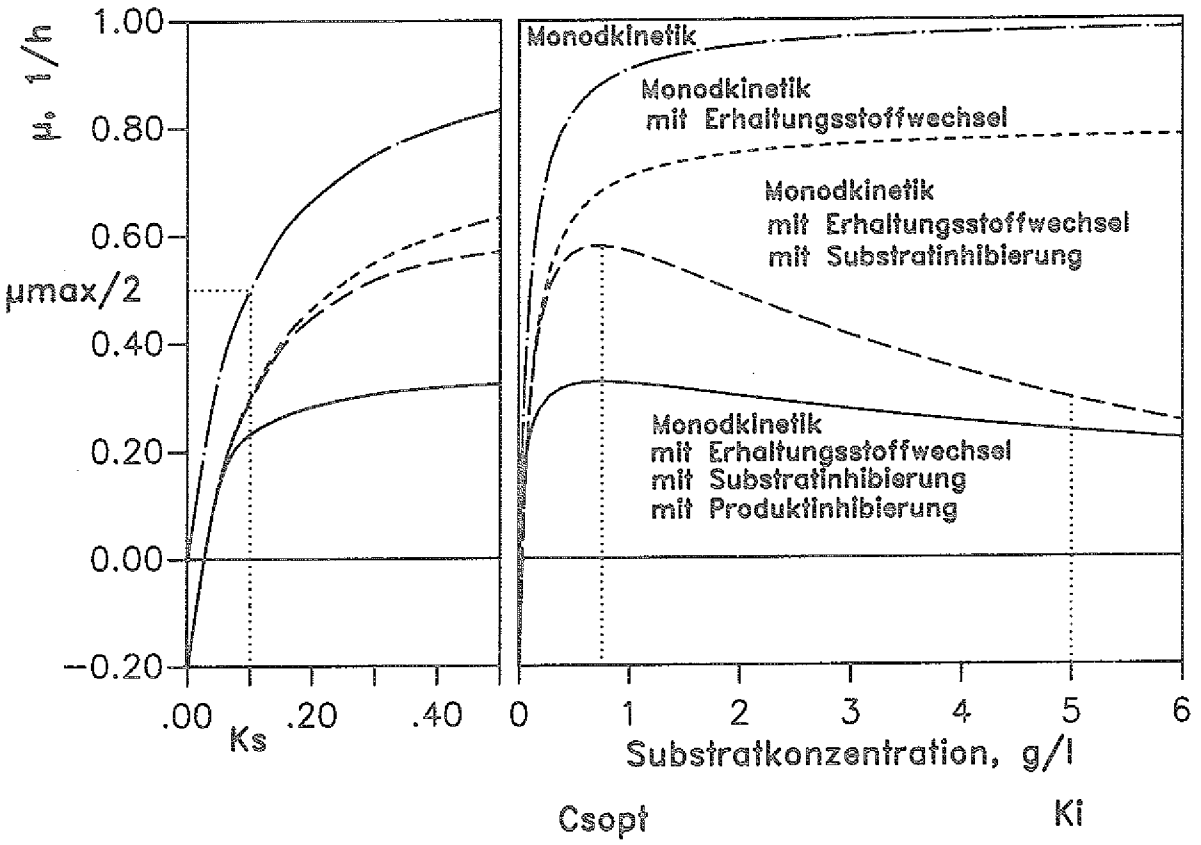


Abb. 3.2: Darstellung verschiedener kinetischer Ansätze zur Modellierung des mikrobiellen Wachstums (μ_{max} = 1,0 1/h; Ks = 0,1 g/l; Ki = 5 g/l; m_s = 0,4 g/(g*h); $Y_{xs,max}$ = 0,5 g/g; n = 1,0; $C_{p,max}$ = 30 g/l; C_p = 0,2 * (100 - C_s)).

3.3.2 Mikroorganismen in Suspensionskultur

Bei der Kultivierung von Mikroorganismen in Suspensionskultur werden diskontinuierliche, halbkontinuierliche und kontinuierliche Verfahren angewendet. Zur mathematischen Beschreibung dieser Verfahren im Labormaßstab wird vom Modell des idealen Rührkessels ausgegangen. Das bedeutet Gradientenfreiheit in alle 3 Raumrichtungen des Reaktionsraums (Fermenters) für alle Komponenten. Als geschwindigkeitslimitierender Schritt der Suspensionskultur sind im allgemeinen die enzymkatalysierten Reaktionsschritte der Organismen anzusehen und nicht der Transport der Reaktionspartner zum Organismus.
Daraus ergibt sich bei isothermer Reaktion, daß zur vollständigen Beschreibung der einzelnen Verfahrensvarianten lediglich die Gesetze der Massenerhaltung mit der Kinetik (siehe Abschnitt 3.3.1) verknüpft werden müssen.

Massenbilanz für jede Komponente (Volumen Bilanzraum, V):

$$V*(dC_i/dt) \quad = Fv * (C_{i,ein}-C_i) + V*(dC_i/dt)_{Metabolismus}$$

Für den Fall der kontinuierlichen Kultur mit einem limitierenden Substrat ('Chemostat') und einem gebildeten Produkt ergibt sich mit den folgenden Randbedingungen und Vereinbarungen ein Satz von 3 Differential-Gleichungen:

$$C_{x,ein} = 0;\ C_{s,ein} = C_{s,0};\ C_{p,ein} = 0;$$

$$V/Fv = \tau;$$

$$dC_x/dt = 1/\tau * (-C_x) \quad + \quad \mu * C_x \qquad 3.13a$$

$$dC_s/dt = 1/\tau * (C_{s,0} - C_s) \quad - \quad q_s * C_x \qquad 3.13b$$

$$dC_p/dt = 1/\tau * (-C_p) \quad + \quad q_p * C_x \qquad 3.13c$$

Befindet sich die Kultur im Fließgleichgewicht (steady-state), so wird die linke Seite der Bilanzgleichung 0. Zusammen mit dem kinetischen Ansätzen für die spezifischen Geschwindigkeiten der Substrataufnahme, Produktbildung und des Wachstums lassen sich die 'steady-state' Konzentrationen bei Kenntnis der kinetischen Parameter in Abhängigkeit der Verweilzeit iterativ bestimmen. Üblich ist die Auftragung dieser Konzentrationen über dem Kehrwert der Verweilzeit, der Verdünnungsrate D, da diese im kontinuierlich betriebenen Rührkesselfermenter gleich der Wachstumsrate ist (siehe Gleichung 3.13a).
Eine mögliche Zielsetzung eines solchen kontinuierlichen Fermentationsprozesses ist der Betrieb bei möglichst hoher volumenspezifischen Produktivität (Raum-Zeit-Ausbeute, RZA). Diese ist im Chemostaten direkt proportional dem Produkt aus spezifischer Substrataufnahmegeschwindigkeit und der Biomassekonzentration, wie sich aus Gleichung 3.13c ergibt:

$$RZA = C_p/\tau = q_p * C_x = (\mu/Y_{xp,max}+m_p) * C_x \qquad 3.14$$

Eine wichtige Größe für den Betrieb eines solchen Chemostaten ist die kritische Verweilzeit, bei deren Unterschreiten die Kultur ausgewaschen wird. Diese wird bestimmt, indem für die Substratkonzentration die Eingangskonzentration $C_{s,0}$ in den Bilanzgleichungssatz 3.13 eingesetzt wird. Bei Vorliegen der Monodkinetik läßt sich für die kritische Verweilzeit angeben (PIRT 1975):

$$\tau_{krit} = (C_{s,0} + Ks) / (\mu_{max} * C_{s,0}) \qquad 3.15$$

Der Betrieb des Fermenters in der Nähe dieses Auswaschpunktes erlaubt zwar ein unlimitiertes Wachstum der Organismen mit der maximalen Wachstumsrate und somit maximaler Raum-Zeit-Ausbeute, allerdings können geringe Schwankungen der Verweilzeit zum Auswaschen der Kultur

führen (siehe Abb. 3.3). Um den Betrieb eines solchen Fermenters zu stabilisieren, ist es sinnvoll, die Verweilzeit über die Biomassekonzentration zu regeln ('turbidostatische Fahrweise').

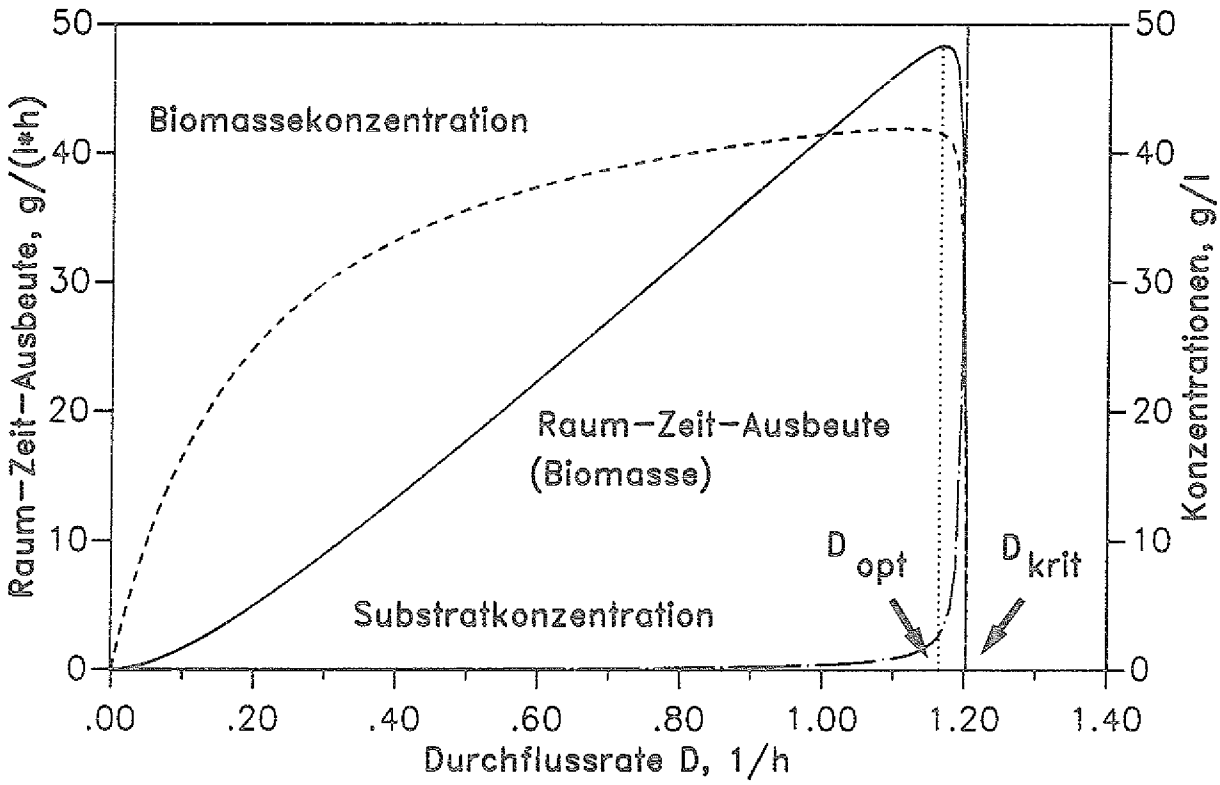


Abb. 3.3: Darstellung der steady-state Prozeßgrößen im Chemostaten, Monodkinetik mit maintenance Anteil (Parameter wie in Abb. 3.2: Ks = 0,1 g/l; m_s = 0,4 g/(g*h); $Y_{xs,max}$ = 0,5 g/g; μ_{max} = 1,0 1/h).

3.4 Immobilisierung von Mikroorganismen

Zur Steigerung der volumenspezifischen Produktivität (Raum-Zeit-Ausbeute) eines kontinuierlichen Fermentationsprozesses bietet sich reaktionstechnisch primär die Verweilzeit-Entkopplung von Biokatalysator und Reaktionsmedium an, da die Raum-Zeit-Ausbeute direkt proportional der Biokatalysatorkonzentration ist (siehe Gleichung 3.4).
Zur Biomasserückhaltung im Fermenter werden neben dem Einsatz von externen Separatoren mit Rückführung des Organismenkonzentrats eine Vielzahl von Methoden zur Immobilisierung der Mikroorganismen direkt im Reaktor eingesetzt. Klassifiziert man diese Methoden nach dem physikalischem Mechanismus der Immobilisierung, so läßt sich eine Einteilung in 4 Kategorien vornehmen (KAREL 1985). Eine Immobilisierung von Mikroorganismen wird erreicht durch

(1) Anbindung an eine Oberfläche,
(2) Einschluß in einer porösen Matrix,
(3) Zurückhaltung hinter einer Grenzfläche (Membran, Phasengrenze) und
(4) Flockung.

Einige konkrete Beispiele für diese Methoden sind in Abbildung 3.4 angeführt.

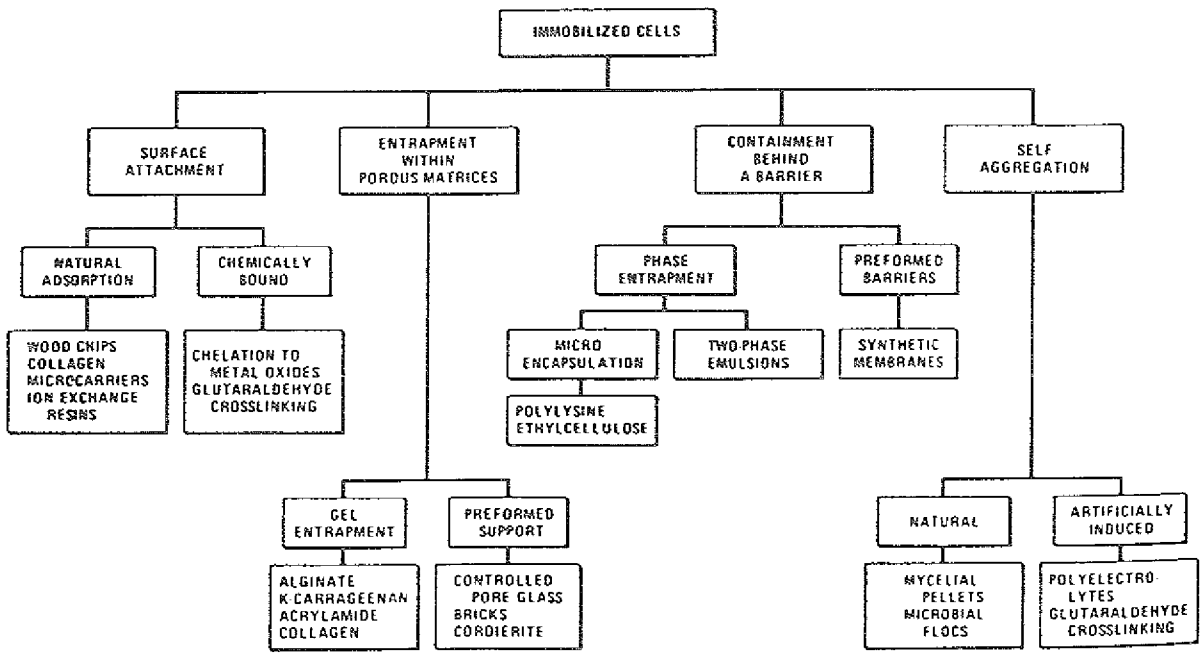


Abb. 3.4: Klassifizierung von Immobilisierungsmethoden (KAREL 1985)

Welche der angeführten Methoden am zweckmäßigsten zur Immobilisierung eingesetzt werden sollte, hängt entscheidend vom jeweiligen, prozeßspezifischen Anforderungsprofil ab.

In der industriellen Praxis ist meistens eine einfache und kostengünstig durchzuführende, reproduzierbare Immobilisierungstechnik gefragt. Deshalb spielt die natürliche Fähigkeit der meisten Mikroorganismen, sich an Oberflächen anzuheften und Kolonien zu bilden, eine große Rolle. Besonders in der Abwassertechnik werden viele Verfahren mit natürlich kolonisierten Oberflächen eingesetzt: Tropfkörperverfahren (HARTMANN 1989), Festbettverfahren (AIVASIDIS 1987) und die Wirbelschichttechnik (HEIJNEN 1985). Dabei stellt die Erhaltung der Regenerationsfähigkeit des Biokatalysators einen weiteren wichtigen Grund für die Durchsetzung dieser Immobilisierungstechnik dar, da diese die Langzeitstabilität solcher Prozesse gewährleistet. Dies ist zum Beispiel bei chemisch an Oberflächen gebundenen Mikroorganismen nicht der Fall.

Die mikrobielle Kolonisierung von Oberflächen erfolgt in 3 Schritten (FLETCHER et al. 1985):

(1) Sorption
(2) Anheftung (attachment)
(3) Kolonisierung

Der erste Schritt der mikrobiellen Kolonisierung von Oberflächen, die Sorption, ist ein reversibler Vorgang bestehend aus Adsorption und Desorption. Unter Adsorption versteht man ganz allgemein die Anreicherung eines Sorptivs an der Grenzfläche zwischen Sorptiv und Sorbens (POERSCH 1963). Dieser Vorgang steht im Gleichgewicht mit der Desorption.

Entscheidend für die Anreicherung eines Sorptivs an einer Phasengrenzfläche sind die Eigenschaften der beteiligten Oberflächen (in diesem Falle Träger und Mikroorganismus) und die Eigenschaften des umgebenden Mediums. Maßgebliche Kräfte sind hierbei zum einen die weit reichenden elektrostatischen Wechselwirkungen (10 - 100 nm) und zum anderen hydrophobe Wechselwirkungen, die durch unabgesättigte Bindungskräfte an der Feststoffoberfläche zustande kommen (< 1nm) (MOZES et al. 1987).
Als Methode zur Bestimmung der Oberflächenladung der Mikroorganismen dient die Messung der elektrophoretischen Beweglichkeit bei verschiedenen pH-Werten, zur Beurteilung der Hydrophobizität wird vielfach der Kontaktwinkel von Flüssigkeit auf getrockneten Zellniederschlägen gemessen (VAN LOOSDRECHT et al. 1987). Der Einfluß dieser beiden Parameter auf die bakterielle Sorption an eine negativ geladene Polystyren-Oberfläche ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

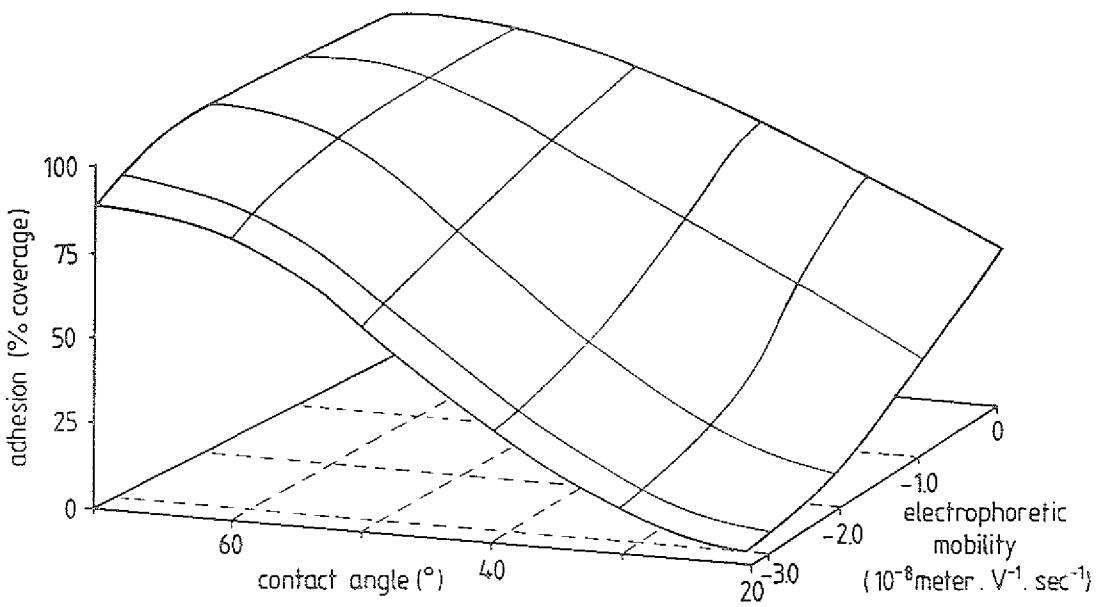


Abb. 3.5: Sorption von Mikroorganismen an Polystyren in Abhängigkeit ihrer Oberflächeneigenschaften (LOOSDRECHT 1987)

Prinzipiell läßt sich diese erste Phase der mikrobiellen Kolonisierung von Oberflächen durch die Veränderung der Oberflächeneigenschaften von Träger und Organismus beeinflussen. Hierzu ist die Wahl des Trägermaterials und dessen Oberflächenmodifikation durch Variation der Oberflächenladung und der Hydrophobizität (BÜCHS 1988), oder die Veränderung der Zellmembran durch Medienbestandteile und Fermentationsbedingungen (LOOSDRECHT et al. 1987) entscheidend.

Der zweite Schritt der mikrobiellen Kolonisierung von Oberflächen, die irreversible Anheftung des Mikroorganismus (attachment), ist eine spezifische physiologische Eigenschaft des jeweiligen Organismus. Diese Anheftung kann durch filamentöse Zellstrukturen (Flagella, Pilli, usw.) erfolgen,

oder durch Antikörper-Antigen Wechselwirkungen (Lectine). Daneben spielt insbesondere die Produktion von Exopolymeren als haftungsvermittelnde Substanzen eine wichtige Rolle (SUTHERLAND 1985). Das Prinzip dieses Mechanismus ist die Erhöhung der Anzahl der Bindungsstellen, so daß sich ein einmal adsorbierter Polymerfaden, auch wenn die Einzelbindungskräfte sehr schwach sind, nicht mehr von der Oberfläche lösen läßt.

Beim dritten Schritt der mikrobiellen Kolonisierung von Oberflächen, der Koloniebildung, treten die Trägeroberfläche-Mikroorganismus Wechselwirkungen zunehmend in den Hintergrund. Für den Aufbau von mehreren Zellagen auf einer Trägeroberfläche ist die Ausbildung von Zelle-Zelle Wechselwirkungen entscheidend, die über dieselben Mechanismen erfolgt, wie bei der irreversiblen Anheftung der Organismen an eine Trägeroberfläche.

3.5 Mathematische Beschreibung mikrobieller Prozesse mit immobilisierten Mikroorganismen

Die Aufkonzentrierung von Mikroorganismen zu hohen lokalen Zelldichten, wie sie bei der Immobilisierung auftritt, kann zu Diffusionslimitierungen führen und so die Reaktionsgeschwindigkeit herabsetzen. Ursachen sind die stark verringerten Oberflächen solcher Zellaggregate im Vergleich zu suspendierten Einzelzellen und das Trägermaterial, welches Stofftransportbarrieren darstellt (KAREL 1985).
Eine Möglichkeit der mathematischen Beschreibung bietet die Übertragung der in der 'heterogenen Katalyse' der Technischen Chemie verwendeten Ansätze auf Systeme mit immobilisierten Mikroorganismen (PHILLIPS/POON 1988). Dabei müssen jedoch eine Reihe von Vereinfachungen formuliert werden, die vor der praktischen Anwendung in jedem Fall überprüft werden müssen (KAREL 1985; VOS et al. 1990):

(1) Es liegen nichtwachsende Zellen vor, bzw. die Aktivität suspendierter Zellen kann vernachlässigt werden.
(2) Das Zellaggregat kann als homogene Phase betrachtet werden.
(3) Die Diffusion im Zellaggregat kann mit dem 1. Fick'schen Gesetz beschrieben werden, d.h. die Diffusion jeder Komponente ist unabhängig von den anderen Komponenten.
(4) Es liegt eine Reaktion vor, die nur von einem limitierenden Substrat abhängig ist.
(5) Der Diffusionskoeffizient $D_{e,s}$ muß unabhängig von C_s sein.
(6) Das System befindet sich im Fließgleichgewicht.

Der Stofftransport zum Reaktionsort läßt sich in 2 Teilschritte aufspalten: zum einen den extrapartikulären Transport und zum anderen die intrapartikuläre Diffusion.
Für den Fall eines kugelförmigen Zellaggregats, dies kann ein Bakterienpellet, ein Biomassefilm auf einem kugelförmigen Träger oder in einer 3-dimensionalen, offenporigen Matrix immobilisierte Biomasse sein, ist das entsprechende Konzentrationsprofil für das limitierende Substrat in Abbildung 3.6 schematisch dargestellt. Da der extrapartikuläre Transport stark von der Reaktorkonfiguration und der Hydrodynamik abhängt, soll zunächst nur die intrapartikuläre Diffusion mit Reaktion betrachtet werden.

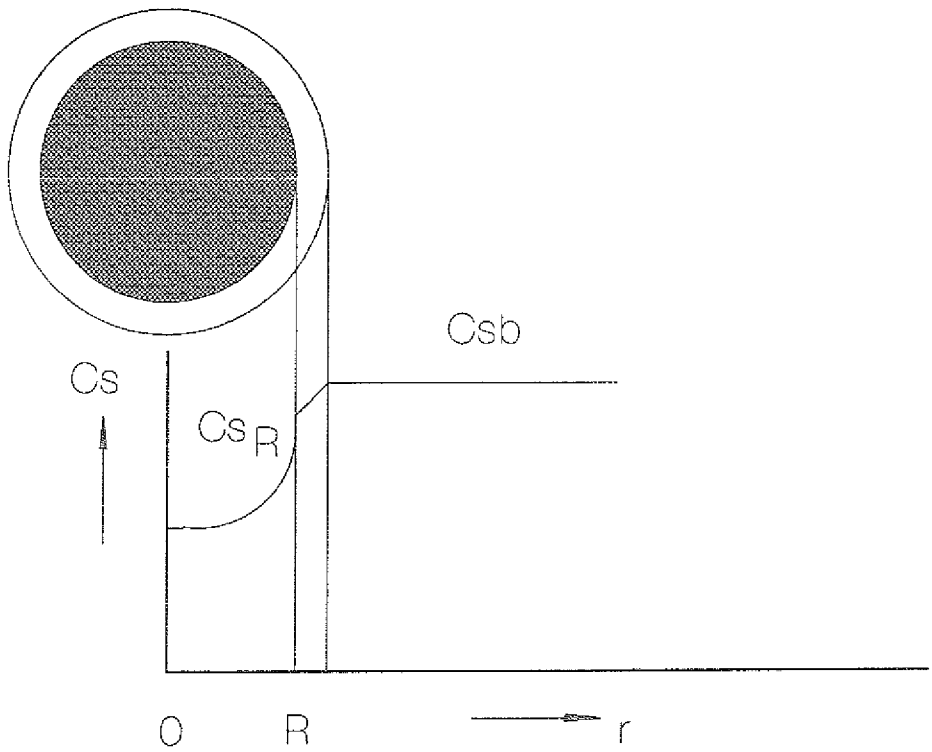


Abb. 3.6: Schematische Darstellung eines Zellaggregats und des entsprechenden Substrat-Konzentrationsprofils

Erstellt man die komplette steady state Massenbilanz (Diffusion und Reaktion) bezüglich des limitierenden Substrats in einer differentiellen Scheibe (r, r + dr) dieses kugelförmigen Immobilisats so erhält man folgende Gleichung für die Reaktionsgeschwindigkeit an der Stelle r (v(r)):

$$v(r)/D_{e,s} = d^2C_s(r)/dr^2 + 2/r * dC_s(r)/dr \qquad 3.16$$

Diese Differentialgleichung läßt sich für Reaktionen 0. und 1. Ordnung analytisch lösen.
Hierzu wird der Wirkungsgrad des Immobilisats $\cap$ definiert, der das Verhältnis zwischen Reaktionsgeschwindigkeit der immobilisierten Biomasse zur Reaktionsgeschwindigkeit darstellt, die sich ergeben würde, wenn im ganzen Zellaggregat $C_s = C_{s,R}$ wäre. Für eine Reaktion 1.Ordnung wird als analytische Lösung gefunden (YAMANE 1981):

$$\cap_1 = 3 * (Ø_1 * \coth Ø_1 - 1) / Ø_1^2$$

Der (generalisierte) Thiele-Modul Ø ist hierbei ein Maß für das Verhältnis von intrapartikulärer Reaktionsgeschwindigkeit zu Diffusionsgeschwindigkeit und wird für eine Reaktion 1.Ordnung (Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_1) wie folgt angegeben:

$$Ø_1 = R * (k_1/D_{e,s})^{0.5}$$

Für eine Reaktion 0. Ordnung (Geschwindigkeitskonstante k_0) wird der Reaktionsterm auf der linken Seite der Gleichung 3.16 eine Konstante. Damit ist die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig von der Ortskoordinate, solange die Substratkonzentration im Zellaggregat nicht auf Null abgefallen ist. Die Lösung der Differentialgleichung 3.16 wird dadurch einfach (Implizite Darstellung YAMANE 1981):

$$1/\varnothing_0^2 = 1/6 * (1-(1-\cap_0)^{1/3})^2 * (2*(1-\cap_0)^{1/3} + 1)$$

mit dem Thiele-Modul:

$$\varnothing_0 = R * (k_0/(D_{e,s} * C_{s,R}))^{0.5}$$

Bei einer Reaktion 0. Ordnung ist der Thiele-Modul und somit auch der Wirkungsgrad abhängig von der Substratkonzentration in der Kernströmung!

Für beide Reaktionsordnungen ist der Wirkungsgrad in Abhängigkeit des Thiele-Moduls in Abbildung 3.7 dargestellt.

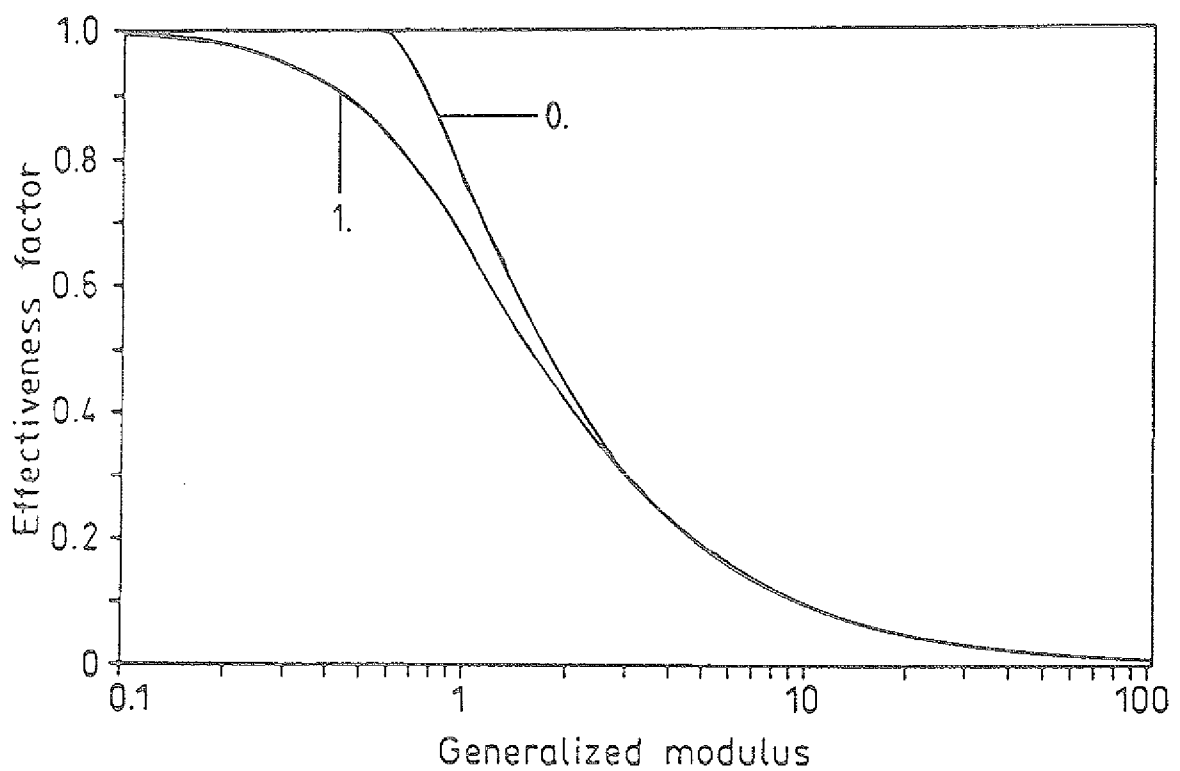


Abb. 3.7: Katalysator-Wirkungsgrad über dem (generalisierten) Thiele-Modul für Reaktionen 0. und 1. Ordnung (VOS et al. 1990)

Unabhängig von der Reaktionsordnung zeigt sich: Ist der Thiele-Modul sehr klein ($\varnothing << 1$), so geht der Wirkungsgrad gegen 1, die Reaktion ist kinetisch kontrolliert. Es liegt also eine im Verhältnis zur Diffusion langsame Reaktion vor, bzw. der Diffusionsweg ist sehr kurz ($R \rightarrow 0$). Umgekehrt - wird der Thiele-Modul sehr groß ($\varnothing >> 1$), so ist der diffusive Transport geschwindigkeitsbestimmend, bzw. der Radius des Zellaggregats ist sehr groß ($R \rightarrow \infty$).

Der Radius des Biokatalysatorteilchens sollte nun so gewählt werden, daß der Thiele-Modul etwa die Größenordnung von 1 hat. Bei höheren Werten von Ø verhindert die Diffusionslimitierung die volle Ausnutzung des immobilisierten Biokatalysators, bei niedrigeren Werten von Ø wird das Reaktorvolumen nicht ausreichend genutzt, die Biomasserückhaltung im Reaktor ist ineffizient.

Die Reaktionsordnung biokatalysierter Prozesse liegt zwischen 0. und 1. Ordnung (siehe Abschnitt 3.3), so daß der Wirkungsgrad nicht analytisch berechnet werden kann. Deshalb werden für einfache Sättigungskinetiken in der Literatur Näherungslösungen angegeben (KOBAYASHI et al. 1976; VOS et al. 1990).

Zur Beschreibung des extrapartikulären Transports wird aufgrund der komplexen Hydrodynamik mehrphasiger Systeme die Dimensionsanalyse herangezogen. Dabei sind die folgenden dimensionslosen Kennzahlen relevant:

Sherwood = Gesamt-Transportstrom/diffusiver Transportstrom:
Sh = $ß_L * d / D_L$

Schmidt = innere Reibung / Diffusionsstrom
Sc = $n / (o_L * D_L)$

Grashof = Gravitationskraft / Innere Trägheitskraft
Gr = $d^3 * o_L * g * (o_s - o_L) / n^2$

Bei spherischen Zellaggregaten ist die charakteristische Länge d gleich dem Durchmesser des Aggregats.
Für fest-flüssig Wirbelschichten ('free suspension') wird mehrere empirische und halbempirische Ansätze zusammenfassend folgende Korrelation für den extrapartikulären Stofftransport angegeben (MOO-YOUNG/BLANCH 1981):

$$Sh = 2 + 0.31*(Sc*Gr)^{1/3} \qquad 3.17$$

Bei diesem Ansatz ist zu beachten, daß die Eigengeschwindigkeit der Katalysatorteilchen keine Rolle spielt und laminare Umströmung der Teilchen vorausgesetzt ist. Das Auftreten von Turbulenzen begünstigt den Stofftransport, so daß dieser Ansatz den 'worst-case' Fall darstellt.

4. Material und Methoden

4.1 Organismus und Kulturbedingungen

Stammhaltung und Stammedium:

Der Stamm *Zymomonas mobilis* ATCC 31 821, auch als ZM 4 bezeichnet, wurde vom Institut für Biotechnologie 1 (Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt.
Die Stammhaltung erfolgt in 25 ml Bellco-röhrchen, die mit 10 ml Stammedium gefüllt werden. Alle 14 Tage wird mit 1 ml Zellsuspension überimpft und bei Umgebungstemperatur inkubiert.
Die Glukosekonzentration des Stammediums wird mit 20 g/l relativ niedrig gehalten, um den Druckaufbau aufgrund der CO_2-Produktion im Stammröhrchen zu begrenzen. Die Zusammensetzung des Stammediums (BRINGER et al. 1985) ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

Synthetisches Glukosemedium:

Die sterilen Ethanolfermentationen mit *Zymomonas mobilis* werden mit einem synthetischem Glukosemedium durchgeführt, daß neben der C-Quelle noch 2 Vitamine (Biotin und Panthothensäure) und einige Nährsalze enthält. Dieses "Minimal-Medium" (FEIN et al. 1983) wird aufgrund seiner definierten Zusammensetzung eingesetzt. Dabei werden die Salz- und Vitaminkonzentrationen an den jeweiligen Glukosegehalt im Medium angepaßt. Zusätzlich wird Antischaummittel zugegeben (siehe Tabelle 4.1).
Die Mediumbestandteile Glukosekonzentrat (700 g/l) und Nährsalze werden getrennt autoklaviert und nach dem Abkühlen steril ineinander überführt. Das Vitaminkonzentrat (jeweils 200 mg/l) wird danach kaltsterilisiert zugegeben.

B-Stärkehydrolysat:

Das zur Ethanolgärung im Wirbelschichtreaktor eingesetzte Abfallsubstrat muß mit Nährsalzen, wie sie auch im synthetischen Glukosemedium verwendet werden, und Panthothensäure supplementiert werden. Die eingesetzten Mengen sind ebenfalls auf den Glukosegehalt des B-Stärkehydrolysats bezogen (siehe Tabelle 4.1). Das Abfallsubstrat wird aus einer auf 4-5 °C gekühlten Vorlage insteril in den Fermenter dosiert.

Fermentationsbedingungen bei allen durchgeführten Fermentationen mit *Zymomonas mobilis* sind:

pH	=	5,0
T	=	30 °C
P	=	P_u + 0,1 bar.

	Stamm-medium	Glukose-medium	B-Stärke-hydrolysat
Glukose, g/l	20	120-240	115-150
KH_2PO_4, mg/(g Glukose)	50	29	16,6
NH_4Cl, mg/(g Glukose)	-	13,3	16,6
$(NH_4)_2SO_4$, mg/(g Glukose)	50	-	-
$MgSO_4*7H_2O$,mg/(g Glukose)	25	8,3	8,3
Zitronensäure, mg/(g Glukose)	-	1,8	-
$FeSO_4*7H_2O$, mg/(g Glukose)	-	0,083	-
Biotin, mg/(g Glukose)	-	0,0083	-
Ca-panthothenate, mg/(g Glukose)	-	0,0083	0,0083
Hefeextrakt, mg/(g Glukose)	250	-	-
Antischaum (DEYHYSAN K969), ml/l	-	0,01	0,1
pH-Einstellung mit	HCl	NaOH	NaOH

Tab. 4.1: Zusammensetzung der verwendeten Medien zur Ethanolfermentation mit *Zymomonas mobilis*

4.2 Analsenmethoden

4.2.1 Suspendierte Biomasse

Die Messung der Biomassekonzentration in der Fermenterlösung erfolgt photometrisch und gravimetrisch. Da zur gravimetrischen Bestimmung eine relativ große Probenmenge erforderlich ist, wird nach der Aufnahme einer Eichkurve überwiegend die photometrische Methode eingesetzt.

Die photometrische Bestimmung der suspendierten Biomasse erfolgt durch Trübungsmessung im Photometer gegen destilliertes Wasser bei einer Wellenlänge von 660 nm (Schichtdicke 10 mm). Der erhaltene Meßwert, die optische Dichte (OD(660)), muß mit dem Korrelationsfaktor der Eichkurve multipliziert werden, um die Konzentration in gBTM/l zu erhalten.

Zur gravimetrischen Bestimmung der Biomassekonzentration werden 50 ml zellhaltige Probe über ein vorher gespültes, bis zur Gewichtskonstanz getrocknetes und gewogenes Membranfilter mit einem Durchmesser von 50 ml abgenutscht. Danach wird der Filterkuchen mit 50 ml 0,5 % NaCl-Lösung gewaschen, bis zur Gewichtskonstanz im Mikrowellenherd getrocknet und erneut gewogen. Aus der Gewichtszunahme bezogen auf die eingesetzte Probenmenge erhält man die Biotrockenmasse in g BTM/l.

Der Zusammenhang zwischen der photometrischen und gravimetrischen Bestimmung der Biomassekonzentration wurde durch lineare Regression ermittelt:

$$C_X, gBTM/l = 0{,}209 * OD(660)$$

4.2.2 Elementarzusammensetzung der Biomasse

1 l zellhaltige Probe wird abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet erneut in 0,5 % NaCl-Lösung resuspendiert, um Mediumbestandteile, die an den Zellwänden der Mikroorganismen haften, abzuwaschen. Nach dem Abzentrifugieren wird der ganze Waschvorgang noch einmal wiederholt. Das gewaschene Pellet wird nach dem letzten Abzentrifugieren im Mikrowellenherd getrocknet.
Die nachfolgende Bestimmung der Elementarzusammensetzung der Biotrockenmassemasse wurde von der Zentralabteilung für Chemische Analysen (ZCH) des Forschungszentrums Jülich durchgeführt.
Zur Bestimmung der einzelnen Komponenten werden dort folgende Methoden eingesetzt:

Kohlenstoff (C):	IR-Spektroskopie nach Verbrennung im Sauerstoffstrom (System LECO)
Stickstoff (N):	Methode nach Kjehldahl
Schwefel (S):	IR-Spektroskopie nach Verbrennung im Sauerstoffstrom (System LECO)
Phosphor (P):	Atom-Emmissions-Spektrometrie mit induktiv gekoppeltem Argonplasma (AES-ICP)
Spurenelemente: (Fe, K, Mg)	Optische Emmissions-Spektrometrie mit induktiv gekoppeltem Argonplasma (OES-ICP)

4.2.3 Immobilisierte Biomasse

Der Biomassegehalt im Trägermaterial wird indirekt durch Bestimmung des Kohlenstoff- und Stickstoffgehalts des bewachsenen Sinterglases ermittelt. Da die Elementarzusammensetzung der Biomasse vorher bestimmt wurde, ist somit ein Rückschluß auf die Biomassekonzentration im Träger möglich.
Zur Analyse werden etwa 5 g bewachsenes Trägermaterial dem Wirbelschichtreaktor entnommen und 4 mal mit 0,5 % NaCl-Lösung gespült, bevor der Träger im Trockenschrank bei 95 °C getrocknet wird. Danach werden die getrockneten Sinterglaskugeln in einer Kugelmühle zu einem feinen Pulver zermahlen.
Die Bestimmung des C-gehalts erfolgt erneut über IR-Spektroskopie nach Verbrennung im Sauerstoffstrom (System LECO), während der N-gehalt mit der Methode nach Kjehldahl gemessen wird.

4.2.4 Glukose

Die Glukosekonzentration im Fermenter wurde zum einen enzymatisch (off-line) und zum anderen polarimetrisch (on-line) bestimmt.

Die enzymatische Bestimmung beruht auf der durch Glukose-Dehydrogenase katalysierten Oxidation von ß-D-Glukose zu D-Gluconolacton. Das dabei als Reduktionsäquivalent gebildete NADH ist der umgesetzten Glukosemenge proportional und wird photometrisch bei 340 nm erfaßt:

$$\text{ß-D-Glukose} + NAD^+ \longrightarrow \text{D-Gluconolacton} + NADH + H^+$$

Durch Zusatz von Mutarotase läßt sich der Reaktionsverlauf beschleunigen.

Die zur enzymatischen Analyse eingesetzte Reaktionslösung hat folgende Zusammensetzung:

0,12 mol/l Phosphatpuffer pH 7,6

0,15 mol/l NaCl

5200 U/l Glukose-Dehydrogenase (ß-D-Glukose NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.47)

110 U/l Mutarotase (Aldose-1-Epimerase, EC 5.1.3.3)

1,1 mmol/l NAD

Diese Lösung ist im Kühlschrank bei 4-8 °C 12 Wochen stabil.

Zur Analyse werden 0,2 ml abzentrifugierte und verdünnte Probe, da der Meßbereich zwischen 0,1 und 2,0 g/l Glukose liegt, sowie 2,0 ml Reaktionslösung direkt in der Küvette gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Reaktion abgeschlossen ist. Die Messung der Extinktion bei 340 nm erfolgt gegen den Reagenzienleerwert.
Die Umrechnung der gemessenen Extinktion auf die Glukosekonzentration wird über eine Eichkurve vorgenommen, die für jeden Reagenzienansatz neu erstellt wird.
Zur Kontrolle läuft bei jeder Messung ein Eichstandard mit. Zusätzlich wird jede Probe 3-fach analysiert.

Die polarimetrische Konzentrationsbestimmung beruht auf der optischen Aktivität von Glukose. Bei Vorliegen einer chiralen Substanz wird die Polarisationsebene von linear polarisiertem Licht um einen bestimmten Winkel gedreht. Der Grad der Drehung ist von der jeweiligen Substanz, der Temperatur und der Meßwellenlänge abhängig und der Konzentration und der Schichtdicke direkt proportional. Die optische Aktivität ist demnach eine substanzcharakteristische Eigenschaft, die jedoch nicht spezifisch ist. Das bedeutet, bei Vorliegen mehrerer chiraler Verbindungen in einer Lösung sind die einzelnen Komponenten nicht mehr zu bestimmen.
Literaturwerte für die Drehwinkel der wichtigsten in der Fermentationslösung der Ethanolgärung mit *Zymomonas mobilis* zu erwartenden optisch aktiven Verbindungen sind in Tabelle 4.2 zusammengestellt.

Substanz	$[\alpha]^{20}_{D}$, Grad/(dm*kg/l)	$[\alpha]^{20}_{D}$, Grad/(dm*mol/l)
D-α Glukose	+ 52,5	+ 9,45
L(+) Laktat	+ 3,82	+ 0,34
D(-) Laktat	- 2,20	- 0,20

Tab. 4.2: Drehwerte optisch aktiver Verbindungen in der Fermentationslösung (D'ANS LAX 1967).

Der Effekt des Kontaminationsprodukt Laktat ist trotz des sich teilweise kompensierenden Drehwinkels der isomeren Formen bei sehr niedrigen Glukosekonzentrationen im Fermenter nicht zu vernachlässigen, so daß in diesem Bereich nur bei sterilen Fermentationen der angegebene Drehwinkel zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden könnte.

Aufgrund der Eigenfärbung der verwendeten Substrate kann die Messung des Drehwinkels nicht bei der angegebenen Wellenlänge der Natriumlinie (589 nm) durchgeführt werden. Um am Detektor des Polarimeters eine ausreichende Intensität zu erreichen, wird eine Wellenlänge von 436 nm eingestellt, was allerdings zu einer Verringerung der Empfindlichkeit der Messung führt.
Da zum einen keine Daten über die Drehwinkel bei 436 nm vorliegen, zum anderen im B-Stärkehydrolysat weitere chirale Verbindungen vorliegen können, muß das Polarimetersignal mit der enzymatisch bestimmten Glukosekonzentration im Fermenter korreliert werden.
Diese Eichung muß besonders bei den insterilen Fermentationen aufgrund der Laktatbildung regelmäßig vorgenommen werden (Meßbereich zwischen 1 und 150 g/l Glukose).

4.2.5 Ethanol und Nebenprodukte

Die Analyse der Ethanolkonzentration und der Nebenprodukte Acetaldehyd, Acetoin und Acetat wird gaschromatographisch durchgeführt. Die Analyse erfolgt nach der "Internen Standard Methode", das heißt, die Auswertung der Peaks bezüglich Peakfläche und Retentionszeit erfolgt in Relation der aktuellen Retentionszeit und Peakfläche eines bei jeder Messung mit eingespritzten internen Standards. Als interner Standard (IS) wird Butanol verwendet. Um eine vollständige Detektion der Essigsäure zu erreichen, wird die Probe mit HCl auf pH 1 - 2 eingestellt. Der Injektor wird zur Abtrennung von Verunreinigungen, die trotz mikrofiltrierter Probe auftreten, mit einem Filter aus Quarzglaswolle versehen. Im einzelnen erfolgt die gaschromatographische Analyse der Fermentationsprodukte unter den in Tabelle 4.3 angegebenen Bedingungen.

Eine Mehrpunkteichung erwies sich aufgrund der Linearität im angegebenen Meßbereich als nicht notwendig, so daß eine 1-Punkt-Eichung in der Mitte des gewählten Meßbereichs durchgeführt wird.

Abbildung 4.1 zeigt ein entsprechendes Chromatogramm. Nach einer Retentionszeit von 2,6 Minuten wird Propanol dedektiert, was zum Spülen der Injektionsnadel nach jeder Injektion verwendet wird.

Säule:	Fused Silica Kapillarsäule FS-CW (für Alkohole) 25m * 0,32 mm ID		
Säulentemperatur:	80 - 140 °C mit 20 °C/min, danach 140 °C		
Injektortemperatur:	260 °C		
Injektionsvolumen:	1 µl		
Trägergas:	N_2		
Split:	1:80		
Detektor:	FID, 260 °C		
Analysenzeit:	7 min		
Retentionszeiten: (Meßbereich)	Acetaldehyd	1,8 min	(1-20 mmol/l)
	Ethanol	2,2 min	(200-2000 mmol/l)
	Isopropanol	2,6 min	(Spüllösung)
	Butanol (IS)	3,2 min	(60 mmol/l)
	Acetoin	4,6 min	(1-20 mmol/l)
	Acetat	6,4 min	(1-20 mmol/l)

Tab. 4.3: Gaschromatographische Analyse der Fermentationslösung

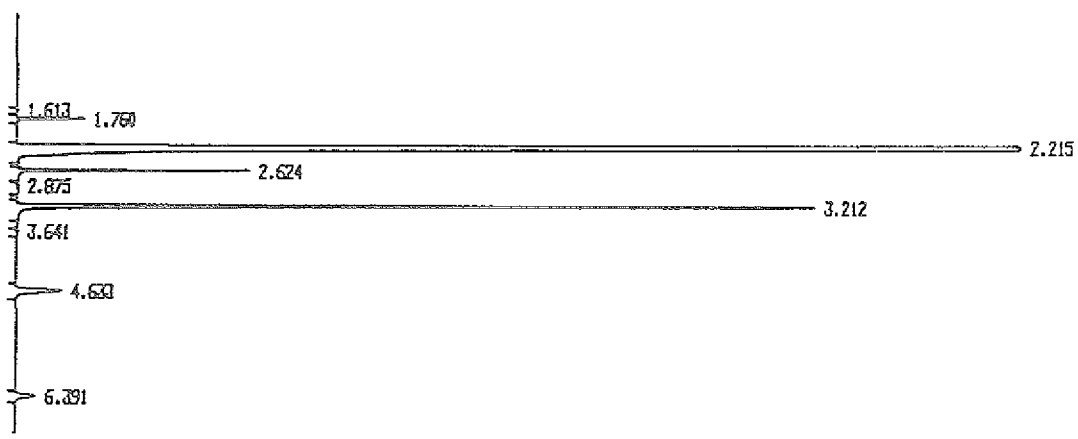


Abb. 4.1: Chromatogramm der gaschromatographischen Analyse bei der Ethanolfermentation mit *Zymomonas mobilis*

4.2.6 Laktat

Laktat wird in einem HPLC-Ionenchromatograph mit automatischer Probenschleife und einem Photometer als Detektor analysiert. Die Auswertung der Peaks bezüglich Fläche und Retentionszeit wird mit einem Integrator nach vorheriger 1-Punkt-Eichung durchgeführt.

Die abzentrifugierte Fermenterprobe wird mikrofiltriert und mit einem automatischen Probenverdünner auf 1/200 verdünnt. Parallel zu jeder Probenserie wird eine Standardlösung verdünnt und ebenfalls über die Säule geschickt (Tabelle 4.4).

Methode:	Einsäulenanalyse		
Säule:	BIORAD Aminex HPX-87H (für org. Säuren)		
Säulentemperatur:	40 °C		
Elutionsmittel:	0,02 n H_2SO_4		
Probevolumen:	100 µl		
Detektion:	photometrisch		
Analysenzeit:	8 min		
Retentionszeiten: (Meßbereich)	Laktat	3,9 min	(0,02-2,0 mmol/l)

Tab. 4.4: Ionenchromatographische Analyse der Fermentationslösung

4.2.7 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Die Präparation der mit Mikroorganismen bewachsenen Träger für die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (REM-Aufnahme) beginnt mit der Fixierung des biologischen Materials durch eine mehrstündige Behandlung mit einer 2,5 % Glutaraldehyd-Medium-Lösung. Nach der Fixierung wird die Probe zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, um die Glutaraldehydlösung zu entfernen. Darauf folgt die Verdrängung des Wassers in der Probe durch steigende Konzentrationen Aceton beginnend bei 40 % bis zu 100 %. Um völlig sicherzustellen, daß kein Wasser mehr in der Probe ist, sollte das wasserfreie Aceton am Ende dieses Präparationsschrittes im Laufe von 24 Stunden mehrmals gewechselt werden. Die nachfolgende 'Kritische Punkt'-Trocknung wird mit flüssigem CO_2 bei 50 bar durchgeführt. Nach 2 Stunden Einlegen in flüssigem CO_2 wird die Probe erwärmt und die Druckkammer entspannt. Direkt anschließend wird das Präparat im Vakuum mit Gold besputtert.

Die REM-Aufnahmen dieser Präparate wurden am Institut für Reaktorwerkstoffe (IRW) des Forschungszentrums Jülich durchgeführt.

5. Apparativer Aufbau und Durchführung der Versuche

5.1 Kontinuierlicher Rührfermenter

Die Durchführung der Untersuchungen zur Kinetik suspendierter *Zymomonas mobilis* Zellen und die Anzucht von Biomasse für die Labor-Wirbelschichtreaktoren wurde in einem autoklavierbaren Laborfermenter mit einem Arbeitsvolumen von 1,5 bis 4,5 l durchgeführt (Fließschema siehe Abb. 5.1).
Temperatur (pT100), pH-Wert (pH-Einstabmeßkette) und Volumen (konduktiometrische Niveausonde) werden mit sterilisierbaren Sonden erfaßt und auf fest vorgegebene Sollwerte eingeregelt (Temperatur 30 °C, pH 5,0). Die Verweilzeit des Substrats im Fermenter wird gravimetrisch über den in einem bestimmten Zeitraum angefallenen Ablauf bestimmt.

Der Abgasstrom wird zunächst über einen Abgaskühler und einem Absorber (Kieselgel) geleitet, bevor das während der Fermentation gebildete CO_2 als Gesamtgas mit einem thermischen Massendurchflußmesser bestimmt wird.

Die Zu- und Ablaufströme sind über Thermofallen mit dem Fermenter verbunden. Die autoklavierten Substratvorlagen, deren Einzelbestandteile nach dem getrennten Autoklavieren steril ineinander überführt werden mußten (siehe Abschnitt 4.1), werden mit Hilfe von Sterilkupplungen unter der Flamme gewechselt.

Die Ethanolfermentationen von synthetischem Glukosemedium mit *Zymomonas mobilis* im Rührkessel wurden mit einem Inocculum von 5-10 % zunächst im Batch-Betrieb gestartet. Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase erfolgte die Umstellung auf den kontinuierlichen Betrieb. Die Konzentrationen an Glukose, Ethanol und Biomasse im Fermenter wurden off-line erfaßt (siehe Abschnitt 4.2).

Die Aufnahme der Fließ-Gleichgewichtsdaten erfolgte beginnend bei kurzen Verweilzeiten in der Nähe des Auswaschpunktes. Hierzu wurde jeweils eine Verweilzeit vorgegeben und nach 4-5 hydraulischen Verweilzeiten wurden für mindestens eine hydraulische Verweilzeit die Konzentrationen an Glukose, Ethanol (und Nebenprodukte) und Biotrockenmasse, sowie der Ablaufstrom und der Gasvolumenstrom mehrmals bestimmt. Erst wenn die Abweichung der Meßwerte innerhalb der Meßfehlerabweichung lag, wurde eine neue Verweilzeit vorgegeben.

Zur Aufkonzentrierung von *Zymomonas mobilis* Zellen im Fermenter wurde ein Querstrom-Mikrofiltrationsmodul mit einer Fläche von 0,1 m^2 im Bypass geschaltet. In dieser Betriebsweise fungierte die Filtratpumpe als Ablaufpumpe. Das System wurde so ohne zusätzlichen zellhaltigen Ablaufstrom maximal 24 Stunden betrieben, bevor die Zellen abgeerntet wurden.

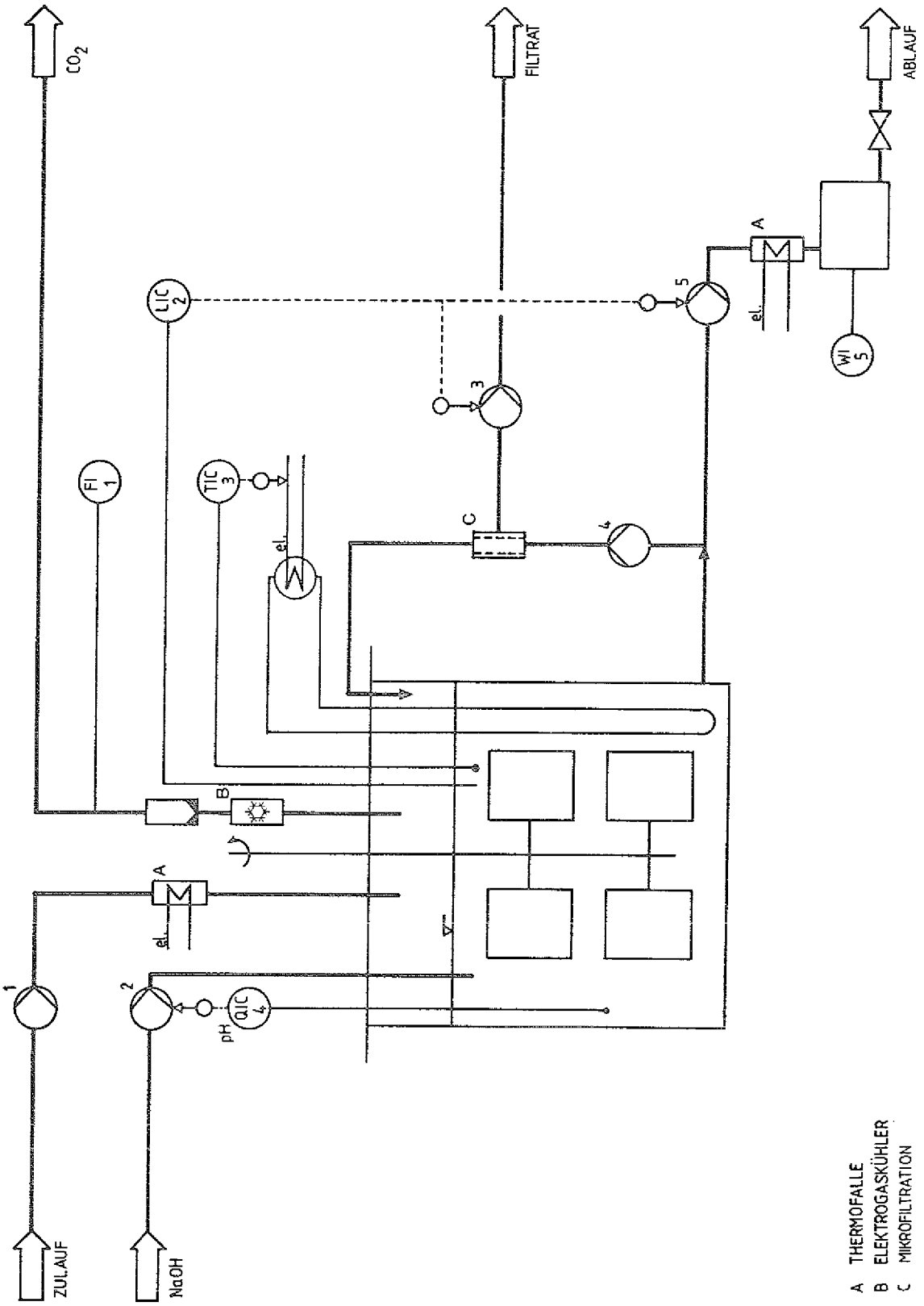


Abb. 5.1: Fließschema des Laborfermenters zur Ethanolfermentation (Ziffern beziehen sich auf Geräteliste, siehe Anhang 10.4).

5.2 Diskontinuierliche Sorptionsversuche

Die Sorptionseigenschaften von ruhenden *Zymomonas mobilis* Zellen an unterschiedliche Sinterglasmaterialien wurden in diskontinuierlichen Sorptionsversuchen ermittelt.

Hierzu wurden jeweils 25 ml einer 2-fach gewaschenen Zellsuspension von *Zymomonas mobilis* Bakterien auf 5 g trockenes Sinterglas in einem 100 ml Schüttelkolben gegeben. Nach dem Messen der optischen Dichte zum Start des Versuchs wurden die Schüttelkolben bei Raumtemperatur auf einen Schüttler mit 80 U/min gerührt. Die Abnahme der optischen Dichte während der Versuchszeit, korrigiert mit dem Blindwert ohne Sinterglas, erfolgt aufgrund der Sorption der Zellen an die Sinterglasoberfläche.

5.3 Labor-Wirbelschichtanlage

5.3.1 2,2 l Wirbelschichtreaktor

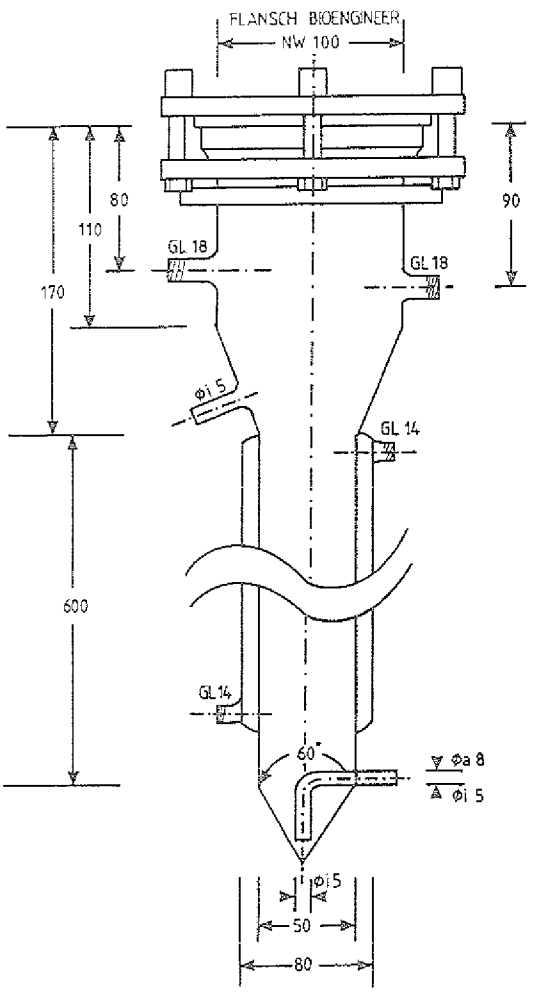


Abb. 5.2: Konstruktionszeichnung Labor-Wirbelschichtreaktor

Der entwickelte, autoklavierbare Labor-Wirbelschichtreaktor (siehe Abbildung 5.2) besteht aus 4 Komponenten: Einem konischen Verteiler am unteren Ende der Reaktionszone, einer zylindrischen Reaktionszone in der das Trägermaterial durch den Umlaufstrom fluidisiert wird, einem Abscheider am oberen Ende der Reaktionszone und der Umlaufpumpe.

Der Verteiler am unteren Ende der Reaktionszone dient der gleichmäßigen radialen Verteilung des Fluidisierungsstroms. Er ist als 60° Konus ausgebildet, in dessen Spitze der Umlaufstrom über ein seitlich angebrachtes, gebogenes Glasrohr zentral eingetragen und durch den Konus umgelenkt wird. Zur gleichmäßigen Verteilung des Flüssigkeitsstroms ist der Konus mit Vollglaskugeln von 8 mm Durchmesser gefüllt. Hierdurch ist auf der einen Seite ein Durchfallen des Trägermaterials in die Konusspitze bei Reaktorstillstand verhindert. Auf der anderen Seite können einzelne in den Umlauf mitgeschleppte Trägerteilchen die Verteilerschüttung problemlos passieren.

Die Reaktionszone (Wirbelschicht) mit einem Durchmesser von 50 mm und einer Höhe von 600 mm ist mit dem fluidisierten Trägermaterial gefüllt. Als Trägermaterial werden offenporige Sinterglaskugeln (Siran^{R}, SCHOTT-Glaswerke Mainz) mit einer Porosität von 55 %, einer Porengröße kleiner 120 µm und einem Durchmesser von 1-2 mm eingesetzt.

Der Abscheider am oberen Ende der Reaktionszone dient der Phasentrennung Fest-Flüssig-Gas. Hierzu wird zum einen der Durchmesser verdoppelt, um die Leerrohrgeschwindigkeit der Flüssigkeit herabzusetzen. Die Aufweitung erfolgt erneut mit einem Öffnungswinkel von 60°, um ein Zurückgleiten von mitgeschlepptem Trägermaterial in die Wirbelschicht zu gewährleisten. Zusätzlich ist im Reaktorkopf ein Hohlzylinder eingelassen, um eine definierte Strömungsführung zu erzwingen. Die Flüssigkeit strömt im Hohlzylinder senkrecht nach oben und kann lediglich durch 2 gegenüberliegende Öffnungen in den Außenraum gelangen. Der Flüssigkeitsablauf ist nun um 90° versetzt, so daß mitgeschlepptes Trägermaterial im Außenraum, der als integrierter Sedimenter wirkt, abgeschieden werden kann. Der abgeschiedene Träger wird durch eine ringförmige Spaltöffnung zwischen Reaktorwand und Hohlzylinder in die Wirbelschicht zurückgeführt.
Als Umlaufpumpen wurden zwangsfördernde Schlauchpumpen eingesetzt, die bei der Wahl geeigneter Schlauchmaterialien (Mapren) die Anforderungen an Sterilisierbarkeit und zerstörungsfreien Feststofftransport gewährleisteten.

Als Fermenterdeckel wurde ein Standardbioreaktordeckel mit 3 25mm Normstutzen und 6 19mm Normstutzen zur Aufnahme von entsprechenden Bioreaktorsonden und Anschlußteilen eingesetzt.

5.3.2 Hydraulische Charakterisierung

Zur Charakterisierung des Verweilzeitverhaltens des Labor-Wirbelschichtreaktors wurde der kontinuierlich betriebenen 2-Phasen Wirbelschicht (fest-flüssig) eine Sprungfunktion aufgeprägt. Gemessen wurde die Änderung der Leitfähigkeit einer NaCl-Lösung im Wirbelschichtreaktor, wenn auf kontinuierlichen Betrieb mit deionisiertem Wasser umgeschaltet wurde.

Aus der Bilanzgleichung für einen ideal durchmischten Reaktor läßt sich die normierte Funktion der Konzentrationsänderung über der Prozeßzeit bei Aufgabe einer Sprungfunktion wie folgt formulieren:

Randbedingungen: $t = 0$: $C_{ein} = 0$; $C = C_{start}$

$t > 0$: $C_{ein} = 0$; $C = C$

$$Ç = EXP(-\theta)$$

wobei $Ç = C/C_{start}$, $\theta = t/\tau$

Volumen Reaktor, l	2,2
Volumen exp. Bett, l	1,2
Höhe exp. Bett, m	0,6
Höhe/Durchmesser, -	12
Trägermenge, kg	0,43
Leerrohrgeschwindigkeit, m/h	62
Zulaufstrom, l/h	4,05
Umlaufzahl, -	30

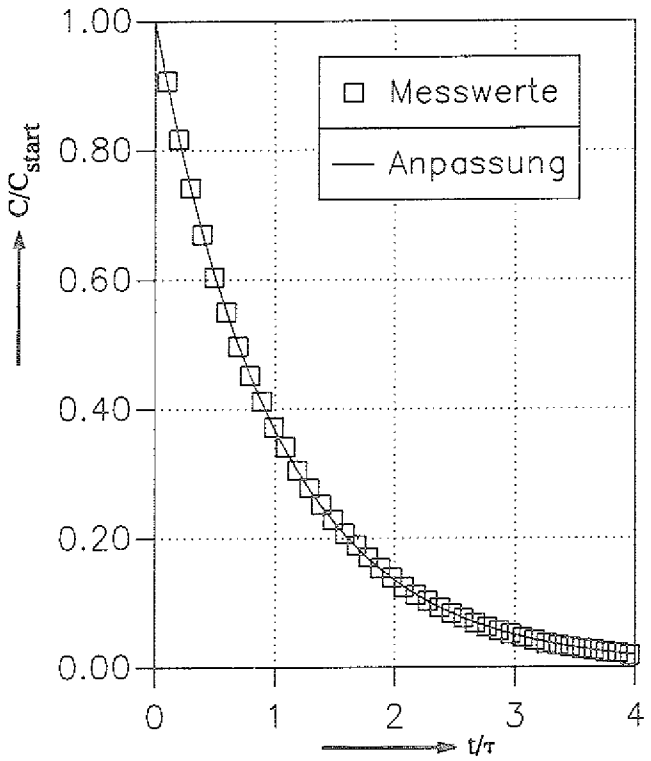


Abb. 5.3: Verweilzeitverteilung im Labor-Wirbelschichtreaktor (Sprungantwort)

Entsprechend dieser Gleichung wurde die normierte Verweilzeit θ mit einem Rosenbrock-Algorithmus an die Meßwerte angepaßt (Opti, GIESECKE 1987). Die normierten Meßwerte und die Modellierung, sowie die zugehörigen Betriebsdaten sind in Abbildung 5.3 wiedergegeben.

Als Ergebnis der Optimierung wurde eine mittlere Verweilzeit von 0,5055 h berechnet (Standardabweichung $1{,}36 \cdot 10^{-4}$ h). Diese weicht beträchtlich von der aus Reaktorvolumen durch Zulaufvolumenstrom berechneten Verweilzeit von 0,54 h ab. Das tatsächlich von der flüssigen Phase durchströmte Reaktorvolumen ist also kleiner. Berücksichtigt man das Trägervolumen, was sich bei einer Materialdichte (Glas) von 2,7 kg/l aus der eingefüllten Sinterglasmenge berechnen läßt, so erhält man eine hydraulische Verweilzeit von 0,50 h, was praktisch mit der berechneten Verweilzeit übereinstimmt.
Der Labor-Wirbelschichtreaktor zeigt also bei dieser relativ hohen Umlaufgeschwindigkeit u_L von 62 m/h als Fest-Flüssig-Wirbelschicht selbst bei einer Verweilzeit von 1/2 Stunde noch nahezu ideales Rührkesselverhalten.

5.3.3 Fließschema der Labor-Wirbelschichtanlage

Der Aufbau der gesamten Labor-Wirbelschichtanlage ist in Abbildung 5.4 schematisch wiedergegeben, ein Photo des Anlagenaufbaus zeigt Abbildung 5.5.

Bei den Versuchen unter definierten Bedingungen mit synthetischem Glukosemedium wurde das Substrat in sterilisierbaren Druckbehältern mit einem Volumen von 120 bis 200 l vorgelegt und mit einer Dosierstrecke präzise in den Wirbelschichtreaktor dosiert.
Als Durchflußmesser wird bei einer solchen Dosierstrecke eine empfindliche Waage eingesetzt, auf der ein sterilisierbarer Zwischenbehälter installiert ist. Zwischen Waage und Dosierpumpe ist ein Interface mit einem Mikroprozessor geschaltet, der die Dosierpumpe entsprechend der gemessenen Gewichtsabnahme auf einen vorgegebenen Sollwert steuert. Ist ein bestimmter, vorgegebener minimaler Füllstand des Zwischenbehälters erreicht, wird der Behälter durch eine schnelle Auffüllpumpe wieder auf einen vorgegebenen maximalen Füllstand aufgefüllt.

Das sterile Substrat gelangt über eine Thermofalle, die mit einer Anstechgarnitur versehen wurde, in den Wirbelschichtreaktor, um bei Dauerversuchen ein Zurückwachsen von *Zymomonas mobilis* Bakterien in die Vorlage zu verhindern. Die Zuführung erfolgt direkt über dem Ansaugstutzen des Umlaufstroms, so daß das frische Substrat sofort in die Reaktionszone transportiert wird.

Im Umlauf befindet sich die Korrekturmitteldosierung (5n NaOH), wobei die Möglichkeit besteht, die sterilisierbare pH-Elektrode durch ein Ventil vom Wirbelschichtreaktor zu trennen (siehe Anhang Abb. 10.4). Dies ist notwendig, um beim sterilen Trocknen des Wirbelschichtreaktors ein Austrocknen der Glasmembran und damit eine Zerstörung der pH-Einstabmeßkette zu verhindern.
Zur pH-Regelung wird standardmäßig ein Impulslängen-Proportionalregler verwendet.

Am Stahldeckel des Wirbelschichtreaktors sind eine konduktiometrische Niveausonde zur kontinuierlichen Messung des Füllstands und ein Widerstandsthermometer zur Messung der Reaktortemperatur angebracht. Das Signal der Niveausonde wird über ein Interface dem auf einem Personal-Computer installierten MeßdatenErfassungs- und Auswerte-System (MEAS) übermittelt und von diesem System wird die Ablaufpumpe kontinuierlich geregelt.
Das Signal des Widerstandsthermometers wird direkt zur Regelung eines Thermostaten benutzt, der den Wärmetauscher der gesamten Reaktionszone thermostatisiert.

Durch den Reaktordeckel werden zusätzlich die Abgasleitung, die Ablaufleitung und das Druckausgleichsystem zur Sterilisation, bestehend aus einem Sterilfilter für Gase und einem Handventil, geführt.

Das während der Fermentation gebildete CO_2 wird zunächst zur Kondensatabscheidung durch einen Elektrogaskühler (4 °C) geleitet. Vor dem Elektrogaskühler befindet sich an der Abgasleitung die Überdrucksicherung, ein zur Bildung einer Sterilgrenze mit 70 % Propanol gefülltes U-Rohr. Nach der Kondensatabscheidung wird das Abgas durch einen mit Kieselgel gefüllten Absorber zur vollständigen Trocknung des Gasstroms geführt, bevor mit einem auf 100 % CO_2 geeichten thermischen Massendurchflußmesser der Gasvolumenstrom bestimmt wird.

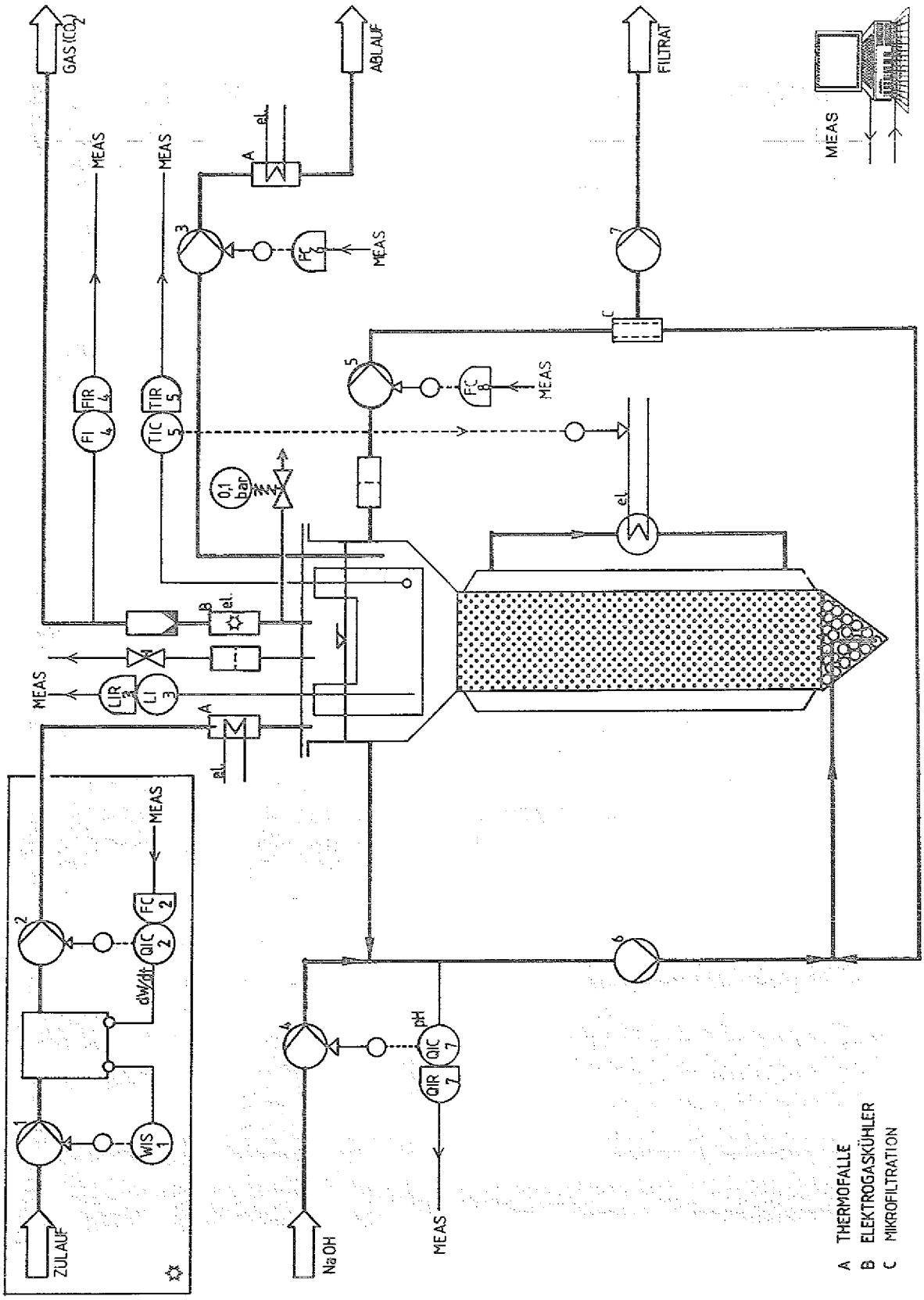


Abb. 5.4: Fließschema der Labor-Wirbelschichtanlage
(Ziffern beziehen sich auf Geräteliste, Anhang 10.4).

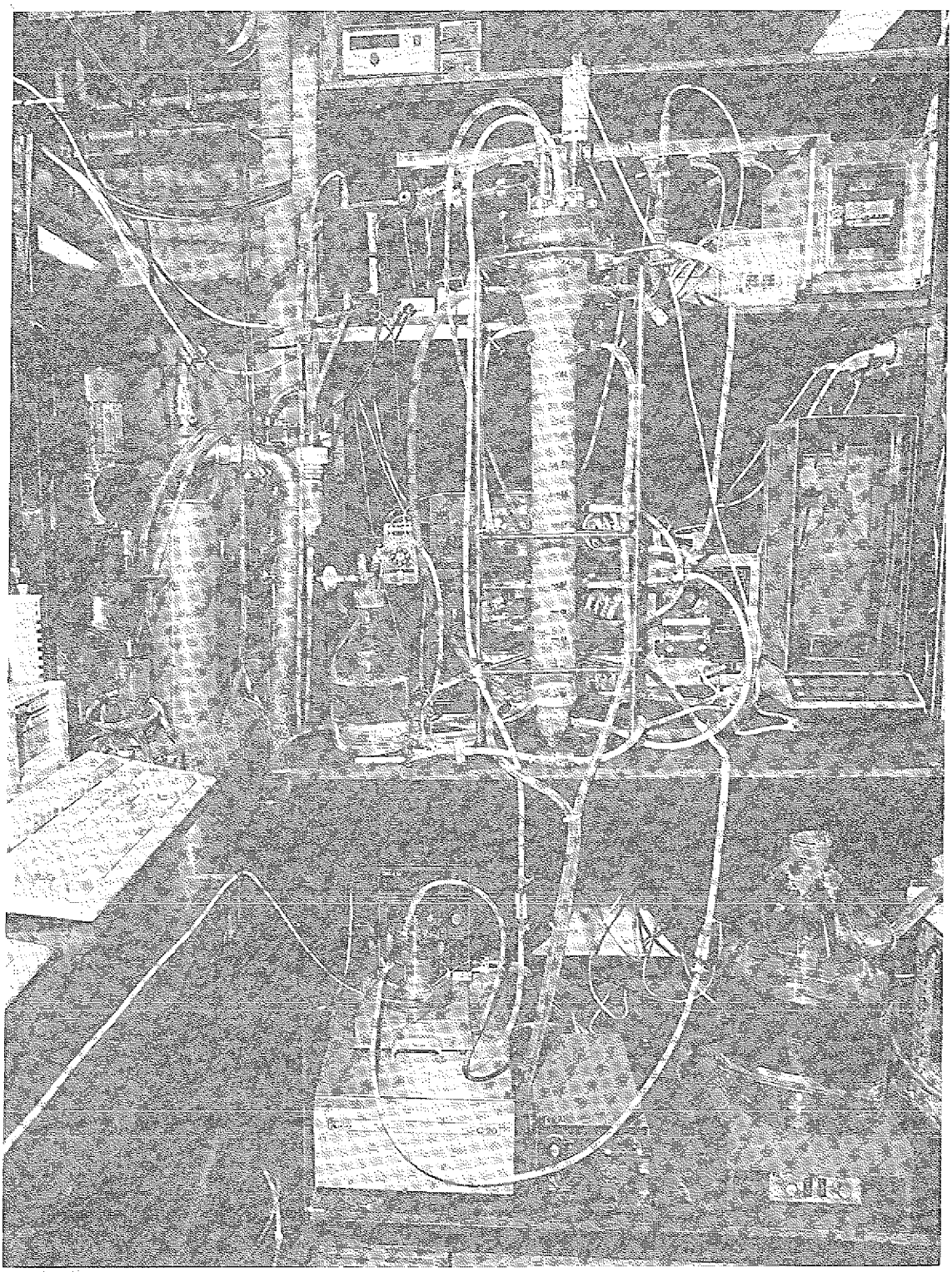


Abb. 5.5: Photo der Labor-Wirbelschichtanlage

Der Ablaufstrom wird dem Reaktor über ein senkrecht angeordnetes Saugrohr aus dem Außenraum des Abscheiders entnommen. Der Durchmesser des Saugrohrs wurde so groß gewählt, daß ein Absaugen von noch nicht sedimentierten Trägermaterial nicht möglich ist, so daß ein Austragen von Sinterglasträgern verhindert wird. Auch im Ablaufstrom ist als Sterilgrenze eine Thermofalle installiert, um bei Dauerversuchen ein Eindringen von Kontaminationskeimen über die Ablaufleitung zu verhindern.

Am Reaktorkopf wird noch ein weiterer Stoffstrom entnommen, der Bypasstrom, der wieder in den Umlaufstrom eingespeist wird. Dieser Bypass dient der Entnahme von feststoffreiem Filtrat zur Analyse des Reaktorinhalts. Hierzu ist an der Entnahmestelle zunächst ein Vorfilter aus Teflon angebracht, daß zur 100 %igen Abscheidung von Trägermaterial dient. Dieses Vorfilter besteht aus einem vorne verschlossenem Teflonrohr, an dessen vorderen Teil Bohrungen mit Durchmesser von 0,8 mm über dem gesamten Umfang verteilt sind. Um ein Verstopfen zu vermeiden, wird dieses Vorfilter durch eine Richtungsumkehr der Bypasspumpe (für 3 Sekunden alle 2 Minuten) rückgespült. Der nun trägerfreie Medienstrom wird durch ein Querstrom-Mikrofiltrationsmodul gepumpt. Das übertretende zellfreie Filtrat wird mit einer Schlauchpumpe abgesaugt und den on-line Analysengeräten zugeführt.

Bei der Kaskadierung von 2 Wirbelschichtreaktoren wird der Ablauf des ersten Reaktors unter Ausschaltung der Thermofallen direkt in den 2. Wirbelschichtreaktor gepumpt. Ansonsten ist die Anordnung der peripheren Einrichtungen identisch.

Zur insterilen Umsetzung von Abfallsubstrat wurde die insterile 60 l Vorlage und das gesamte Dosiersystem in einen Kühlschrank gestellt und auf 5 °C gekühlt, um eine zu starke, unkontrollierte Vormetabolisierung des Abfallsubstrates durch Fremdkeime zu verhindern.

5.4 Technikums-Wirbelschichtanlage

5.4.1 55 l / 50 l Wirbelschichtreaktoren

Der zum Labor-Wirbelschichtreaktor geometrisch ähnliche (h/d = 12) Technikums-Wirbelschichtreaktor ist ebenfalls ein Glasreaktor, der jedoch nicht für den Sterilbetrieb konstruiert wurde. Die Technikums-Wirbelschichtreaktoren sind modular aufgebaut (siehe Abb. 5.6). Prinzipielle Unterschiede im Grundaufbau zum Labor-Wirbelschichtreaktor sind seitliche Stutzen, die in regelmäßigen Abständen an der 1,8 m hohen Reaktionszone angebracht sind, und ein anderer Flüssigkeitsverteiler.

Als Verteiler wurde ein 'Parallelschlitz-Plattenverteilerboden' eingesetzt, der weitgehend eine über dem Querschnitt homogene Verteilung des Fluidisierungsstroms gewährleistet (KEIM 1990).
Die Konstruktionszeichnungen der Einzelteile des Wirbelschichtreaktors sind im Anhang 10.3 wiedergegeben. Zur festen Verrohrung der Technikums-Wirbelschichtreaktoren sind Norm-Glasverrohrungen DN 25 verwendet worden, wie sie im Chemieanlagenbau eingesetzt werden.

Der Hohlzylinder im Kopf des Reaktors verfügt bei den Technikums-Wirbelschichtreaktoren lediglich über eine Öffnung zum Außenraum. Das Absaugrohr des Umlaufstroms ist um einen Winkel von 180 ° versetzt, um die Sedimentationszone zu verlängern.

Der Umlaufstrom wird über eine Absauglanze dem Außenraum des Reaktorkopfs entnommen. Die Zuführung und Entnahme aller Stoffströme des Technikums-Wirbelschichtreaktors mit Ausnahme des Gasstroms erfolgt im Umlauf, so daß der Reaktordeckel aus Glas lediglich zur Aufnahme von Sonden (pT100, Niveausonde) und der Befestigungen des Hohlzylinders dienen muß.

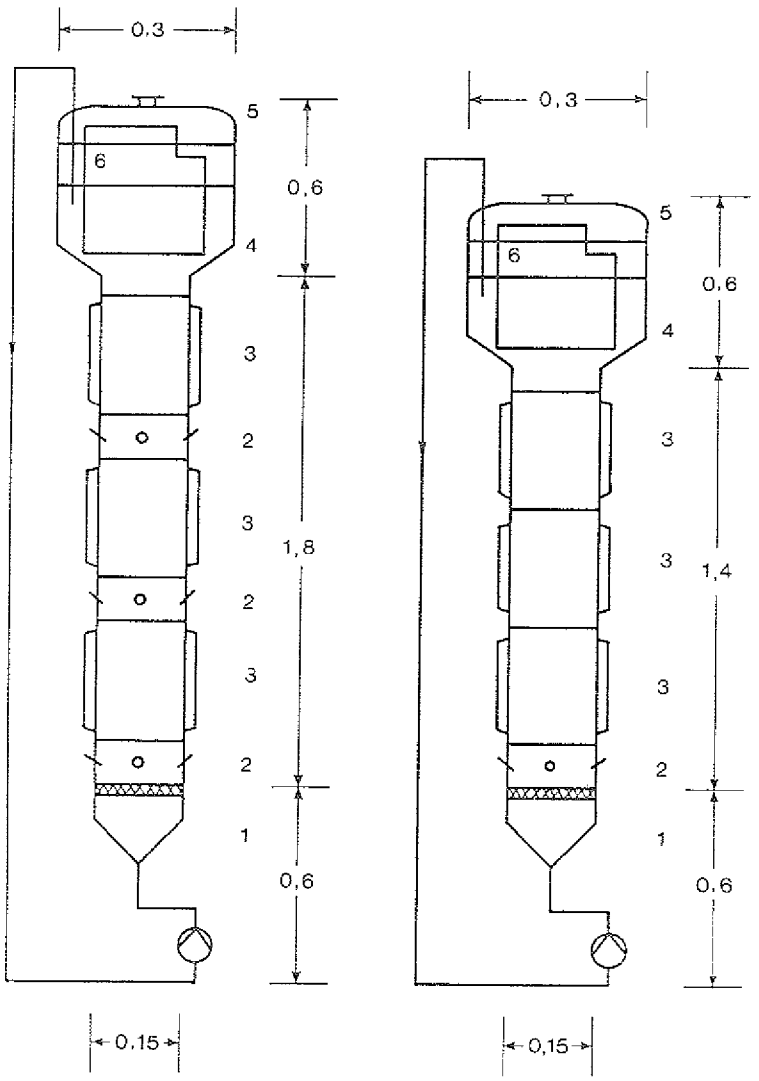


Abb. 5.6: Skizze der Technikums-Wirbelschichtreaktoren (Längenmaße in m, Ziffern beziehen sich auf Konstruktionsskizzen Anhang 10.5).

5.4.2 Hydraulische Charakterisierung

Ebenso wie bei den Labor-Wirbelschichtrektoren wurde das Verweilzeitverhalten der Technikums-Wirbelschichtrektoren durch die Aufprägung einer Sprungfunktion während des kontinuierlichen 2-Phasenbetriebs (Fest-Flüssig) bestimmt (siehe Abb. 5.7).

Die durch Minimierung der Fehlerquadratsumme zwischen Meßwerten und Modellfunktion mit dem Rosenbrock-Verfahren bestimmte mittlere Verweilzeit von 1,112 Stunden hat mit $9{,}01 \cdot 10^{-3}$ h eine um fast 2 Zehnerpotenzen größere Standardabweichung, als im Labor-Wirbelschichtreaktor.

Dies hat seine Ursache in der Halbierung der Umlaufzahl im Technikums-Wirbelschichtreaktor im Vergleich zum Labor-Wirbelschichtreaktor und in der um den Faktor 3 verlängerten Reaktionszone, durch die eine meßbare Signalverzögerung von 3 Minuten zwischen Sprungaufgabe am Reaktoreingang und Antwortsignal am Reaktorausgang entsteht.

Die Korrektur der aus Reaktorvolumen durch Zulaufvolumenstrom berechneten Verweilzeit (1,15 h) mit dem Feststoffanteil liefert mit 1,08 h nicht die erwartete Näherung.

Volumen Reaktor, l	55	(50)
Volumen exp. Bett, l	30	(25)
Höhe exp. Bett, m	1,8	(1,4)
Höhe/Durchmesser, -	12	(9,3)
Trägermenge, kg	8,6	(7,1)
Leerrohrgeschwindigkeit, m/h	40	(40)
Zulaufstrom, l/h	48	
Umlaufzahl, -	15	

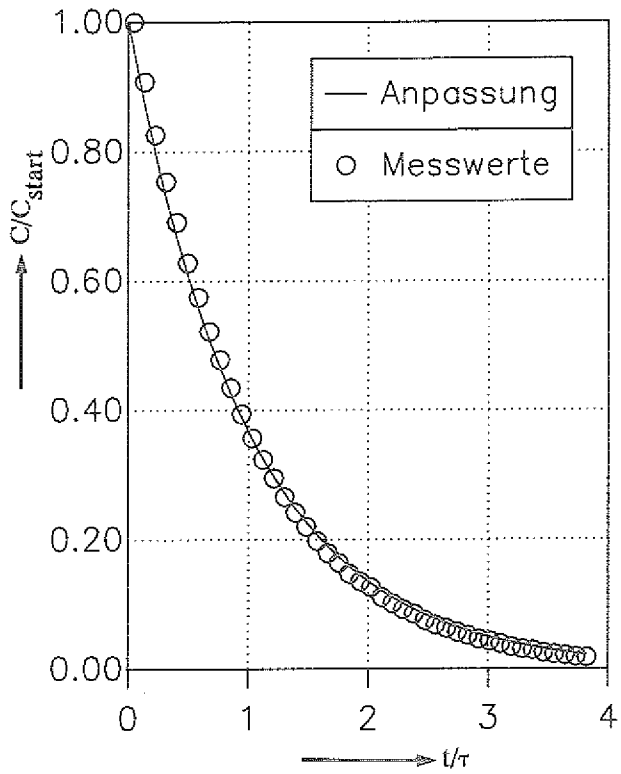


Abb. 5.7: Verweilzeitverteilung im 55 l Technikums-Wirbelschichtreaktor (Sprungantwort), Werte in Klammer beziehen sich auf den 50 l Technikums-Wirbelschichtreaktor

5.4.3 Fließschema der Technikums-Wirbelschichtanlage

Der Aufbau der gesamten einstufigen Technikums-Wirbelschichtanlage ist in Abbildung 5.8 schematisch wiedergegeben, ein Photo des 2-stufigen Anlagenaufbaus zeigt Abbildung 5.9.

Für den Anfahrvorgang ist die Technikums-Wirbelschichtanlage mit 2 Dosiersystemen ausgestattet worden. Über den Zulauf 1, der aus 2 auf 5 °C gekühlten 1 m^3 Tanks und einer gekühlten Dosierstrecke besteht, wird die Nährsalz- und Vitaminlösung (nicht steril) in die Technikums-Wirbelschichtanlage gepumpt. Parallel dazu wird über Zulauf 2 ein in 300 l Behältern angesetztes Glukosekonzentrat (600 g/l) in die Wirbelschichtanlage dosiert. Beide Stoffströme werden kurz vor dem ersten Wirbelschichtreaktor vermischt und der pH wird mit 45 % NaOH auf 5,0 vortitriert.
Bei der insterilen Umsetzung des Abfallsubstrats wird lediglich die gekühlte Dosierstrecke eingesetzt.

Die Zu- oder Abfuhr aller Stoffströme des Technikums-Wirbelschichtreaktors mit Ausnahme des Abgasstroms erfolgt im Umlauf. Um Kurzschlüsse zu vermeiden, ist in Strömungsrichtung folgende Reihenfolge eingehalten worden:

Direkt nach dem Absaugen des Umlaufstroms aus dem Reaktorkopf wird der Bypasstrom über ein Vorfilter aus Stahl (0,8 mm Bohrungen) zur Trägerabscheidung entnommen. Nach dem Durchlaufen eines Querstrom-Mikrofiltrationsmoduls zur Erzeugung eines feststoffreien Filtratstroms für die on-line Analytik von Substrat und Produkten wird der Bypasstrom wieder dem Umlauf zugeführt.

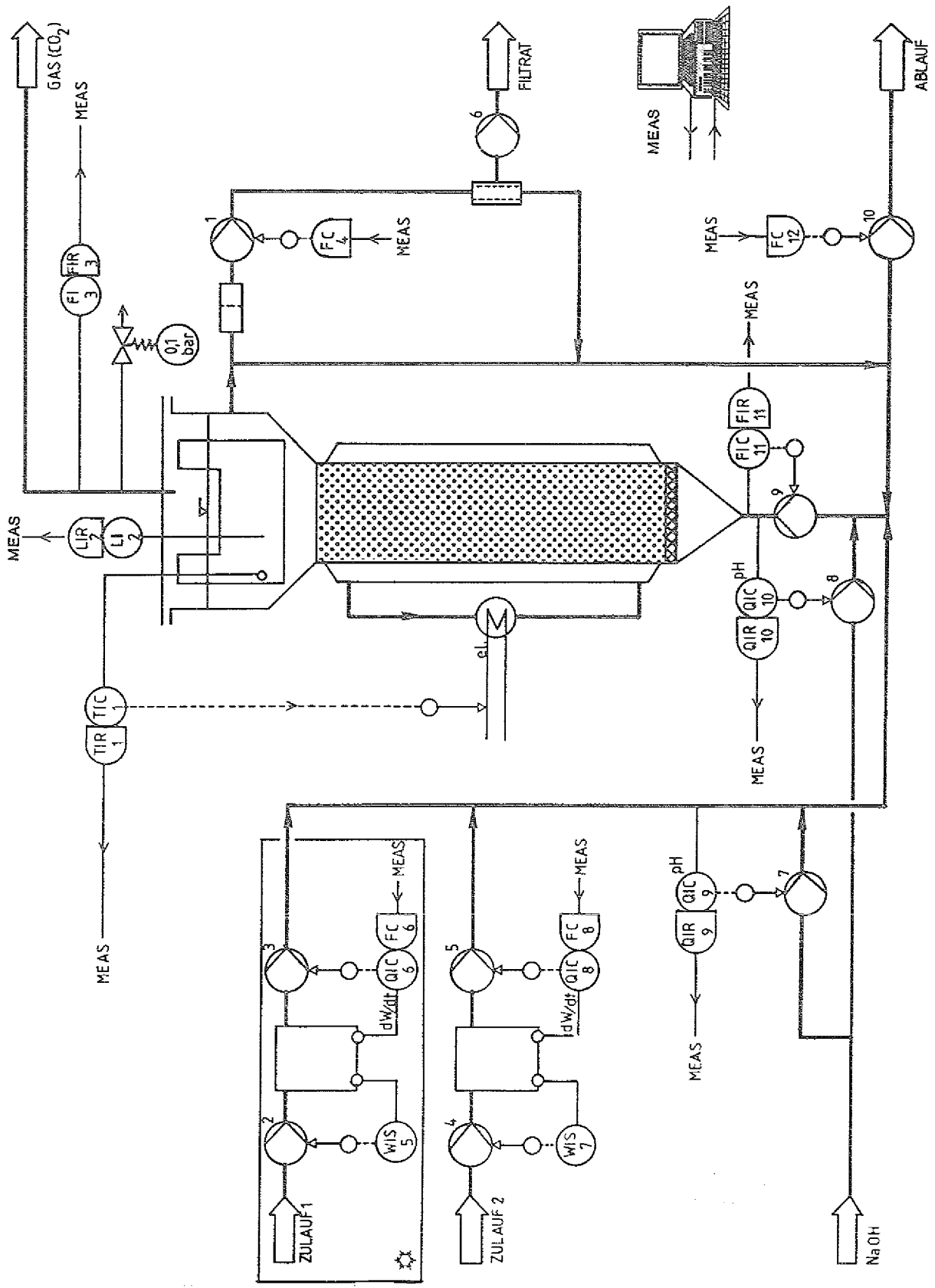


Abb. 5.8: Fließschema der Technikums-Wirbelschichtanlage (Ziffern beziehen sich auf Geräteliste Anhang 10.4).

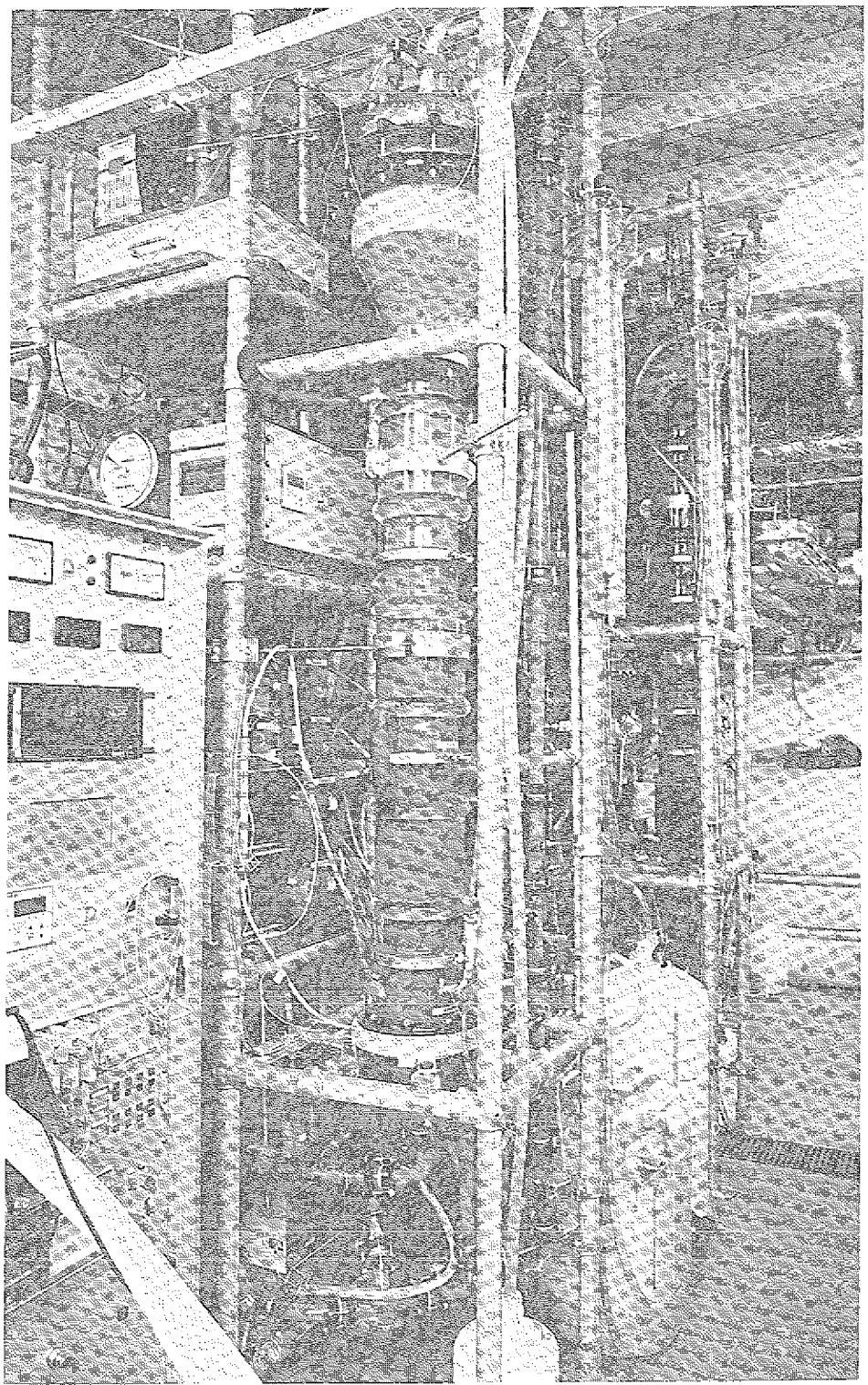


Abb. 5.9: Photo der 2-stufigen Technikums-Wirbelschichtanlage

Danach folgt der Anschluß für das Ablaufrohr, wobei der Ablauf entgegen der Schwerkraft erfolgt, um ein unkontrolliertes Austragen von unter Umständen im Umlauf mitgeschlepptem Trägermaterial zu vermeiden.

Vor der Umlaufpumpe erfolgt zum einen die Zuführung des Korrekturmittels (45 % NaOH) und zum anderen die Zufuhr des Substrats.

Als Umlaufpumpe wird erneut eine zwangsfördernde Schlauchpumpe eingesetzt.

Zwischen Umlaufpumpe und Verteiler werden der pH-Wert mit einer pH-Einstabmeßkette und der Volumenstrom des Umlaufs mit einem induktiven Durchflußmesser gemessen.

Im Reaktorkopf erfolgt die kontinuierliche Messung des Reaktorvolumens durch eine konduktiometrische Niveausonde und die Messung der Temperatur mit einem Widerstandsthermometer. Das Signal der Niveausonde wird vom installierten MeßdatenErfassungs- und -AuswerteSystem (MEAS) zur Regelung der Ablaufpumpe verwendet. Mit dem Signal des Widerstandsthermometers wird der Thermostat geregelt, der die Temperatur des Wärmetauschers direkt um die Reaktionszone einstellt.

Zur Bestimmung des Abgasvolumenstroms werden Experimentier-Prüfgaszähler (nasse Bauart) verwendet. Vor der Volumenstrommessung wird die Überdrucksicherung, erneut ein mit Flüssigkeit gefülltes U-Rohr, an die Abgasleitung angeschlossen.

Bei der Kaskadierung von 2 Wirbelschichtreaktoren wird der Ablauf des ersten Reaktors direkt in den 2. Wirbelschichtreaktor gepumpt. Ansonsten ist die Anordnung der peripheren Einrichtungen identisch.

5.5 On-line Datenerfassung und Prozeßregelung

Der on-line Einsatz eines Polarimeters zur Bestimmung der aktuellen Substratkonzentration (Glukose) und eines Gaschromatographen zur Bestimmung der Konzentrationen an Produkt (Ethanol) und Nebenprodukten (Acetaldehyd, Acetoin, Acetat), erfordert eine Automatisierung der bei off-line Messungen manuell vorzunehmenden Arbeitsschritte.

Dies wurde mit der in Abbildung 5.10 schematisch wiedergegebenen Ventilschaltung erreicht:
Mit dieser Anordnung werden 2 Meßstellen an die on-line Analysengeräte angeschlossen. Es sind bei jeder Funktionseinheit jeweils 2 3/2-Wege-Magnetventile parallel angeordnet, so daß sich die Ventile die meiste Zeit im stromlosen Zustand befinden. Die Schaltung der Ventile erfolgt rechnergesteuert. Der Schlauch-Innendurchmesser beträgt 0,5 mm (Material: Teflon oder Maprene).

Der aktuelle Filtratstrom wird zunächst mit der Filtratpumpe über eine Blasenfalle gepumpt, um Gasblasen, die aufgrund der CO_2-Übersättigung des Filtrats ständig entstehen, abzutrennen. Das blasenfreie Filtrat wird mit einer Mehrkanalschlauchpumpe, deren Gesamt-Förderstrom geringer als bei der Filtratpumpe ist, in 2 den jeweiligen Meßgeräten zugehörige Ströme aufgeteilt.

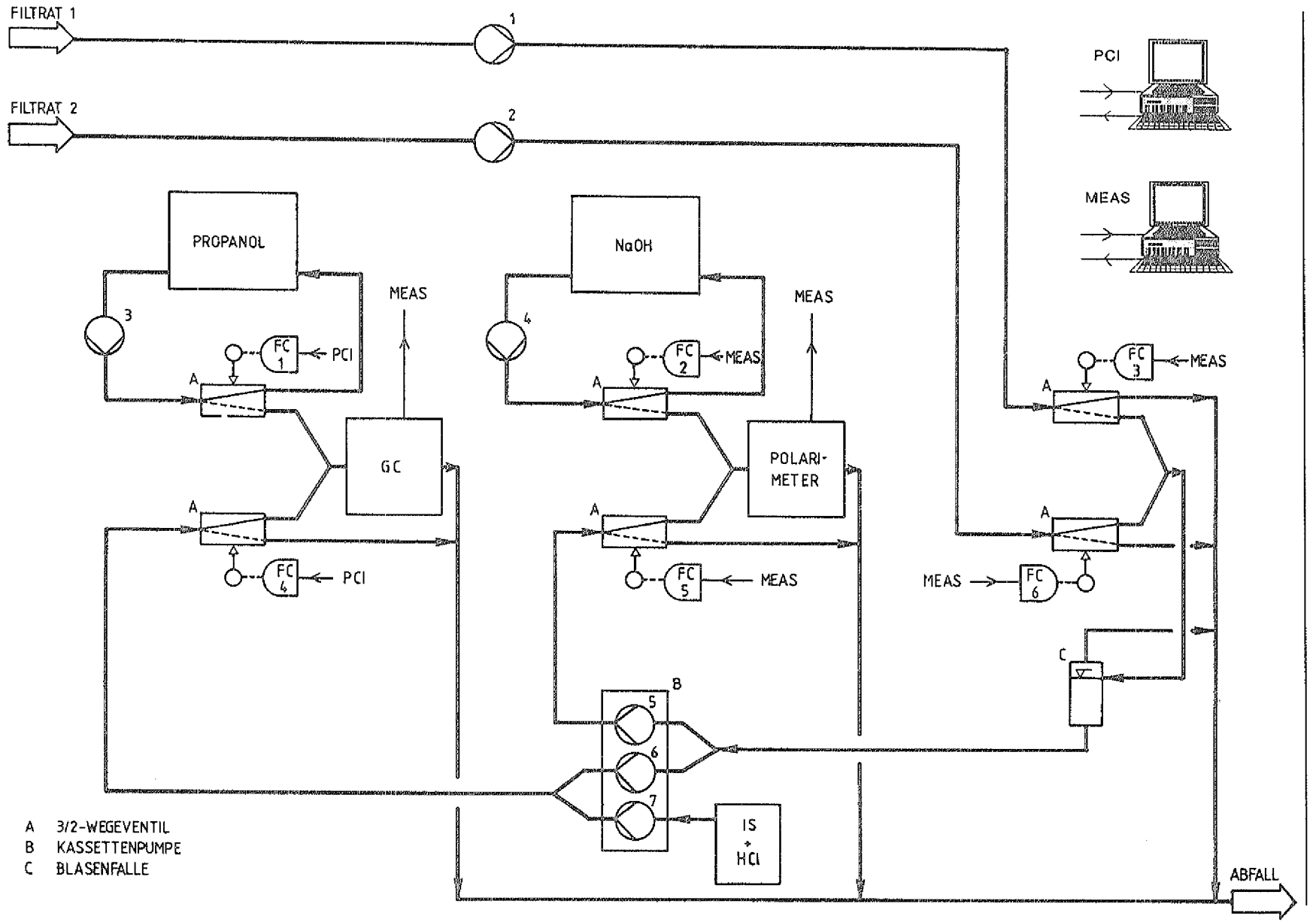


Abb. 5.10: Fließschema der on-line Analytik
(Ziffern beziehen sich auf Geräteliste Anhang 10.4).

Dem Filtratstrom für den Gaschromatographen wird mit derselben Mehrkanalschlauchpumpe ein gleichgroßer Strom mit Internem Standard (Butanol 60 mmol/l) und 0,5 n HCl beigemischt. Dieses Gemisch wird durch die Funktionseinheit GC-Spülung gepumpt, bevor es in eine Durchflußküvette gelangt, aus der die Probe mit einem one-shot sampler gezogen wird. Nach jeder Injektion werden die Magnetventile der Funktionseinheit 'GC-Spülung' von der GC-Software PCI geschaltet und die Durchflußküvette mit einem Propanol/Wasser-Gemisch gefüllt, um die Injektionsnadel zu spülen. Diese Spülung ist notwendig, um die alte Probe vollständig aus der Nadel zu entfernen und um die Korrosion der Injektionsnadel durch Probenreste zu verhindern. Ist die Funktionseinheit 'GC-Spülung' stromlos, so wird die Spüllösung lediglich im Kreis gepumpt.

Der Filtratstrom für das Polarimeter wird ohne weitere Behandlung durch die Funktionseinheit 'Polarimeterspülung und -kalibrierung' gepumpt und der thermostatisierten Durchflußküvette des Polarimeters (Länge 0,1 m, Volumen 1 ml) zugeführt. Zur chemischen Sterilisation und zur Korrektur der Nullpunktsdrift des verwendeten Polarimeters werden in regelmäßigen Abständen die Magnetventile der Funktionseinheit 'Polarimeterspülung und -kalibrierung' geschaltet und 0,5 n NaOH durch die Schläuche und die Durchflußküvette des Polarimeters gepumpt.

Die Meßsignale des Gaschromatographen und des Polarimeters werden über ein Siemens SMP-Interface, daß auch die Daten aller anderen Meßgeräte (siehe Abb. 5.4 und 5.8) wandelt und digital bzw. analog dem Prozeßrechner übermittelt.

Zur Meßdatenerfassung und Prozeßsteuerung werden bei 2 Wirbelschichtreaktoren benötigt:

- 14 **Analogeingänge** (3 * pH-Wert, 2 * Temperatur, 2 * Niveau, 2 * Gasvolumenstrom, 2 * Umlaufvolumenstrom, 2 * Korrekturmittelverbrauch und 1 * Polarimeter),
- 2 **Analogausgänge** zum Regeln von 2 Ablaufpumpen
- 3 **V24 Schnittstellen** zum Datentransfer von GC und 2 Dosiersystemen
- 7 **Relaisausgänge** zum Steuern von 4 Ventilen (on-line Analytik), 2 Pumpen (Reversible Bypasspumpen) und GC (ein/aus) und
- 14 **off-line** Eingabemöglichkeiten.

Als Prozeßrechner wird ein Personalcomputer (IBM-AT) mit 640 kB RAM, 20 MB Festplatte, Arithmetikprozessor und Hercules Graphics Card eingesetzt. Als Betriebssystem wird das Echtzeit-Multitasking-System 'Concurrent DOS' verwendet.

Die zur Datenerfassung und Prozeßregelung eingesetzte, menügesteuerte Software MEAS (MeßdatenErfassungs-und AuswerteSystem, STEINKE 1987) bietet neben der Meßdatenerfassung die Möglichkeit der direkten Auswertung der erfaßten Daten. Somit können die gewonnenen Prozeßinformationen direkt zur Prozeßsteuerung und -regelung verwendet werden. Hierzu dient neben fest programmierten digitalen Reglern im wesentlichen ein Formelinterpreter.

Das in diesem Formelinterpreter formulierte Programm (siehe Anhang 10.6) für Labor- und Technikums-Wirbelschichtanlage erfüllt folgende Funktionen:

- **Steuerung des Analysenzyklus:** Hierbei werden 2 Meßstellen (Reaktor1, Reaktor2) mit 2 on-line Analysengeräten (Polarimeter, GC) über ein Zeitprogramm miteinander verknüpft. Zusätzlich sind in den Zyklus die Spülung der Durchflußküvetten und die Rekalibrierung des Polarimeters ('auto-null') integriert. Da beim GC die Ausgabe der Meßergebnisse zeitverzögert erfolgt (7 Minuten nach der Injektion) müssen die Daten der richtigen Prozeßgröße zugewiesen werden. Auch muß die Übertragungsfunktion der Analysestrecke berücksichtigt werden, was bedeutet, daß der 98 % Wert des neuen Meßsignals erst nach 6,4 Minuten erreicht ist.

- **Berechnen von Prozeßvariablen:** Es werden zur Datenerfassung, Steuerung und Regelung der 2-stufigen Wirbelschichtanlagen 131 Prozeßvariablen benötigt.

- **Rekalibrierung des Polarimeters:** Da eine Nullpunktsdrift des Polarimeters nicht direkt am Meßgerät zu beheben war, wird zu Beginn jeden Meßzyklusses über eine Ventilschaltung 0,5 n NaOH, die keine Änderung des Drehwinkels bewirkt, in die Polarimeterküvette gepumpt und der so erhaltene 'Nullwert' wird im folgenden Meßzyklus vom aktuellen Meßwert subtrahiert (siehe Abb. 5.11).

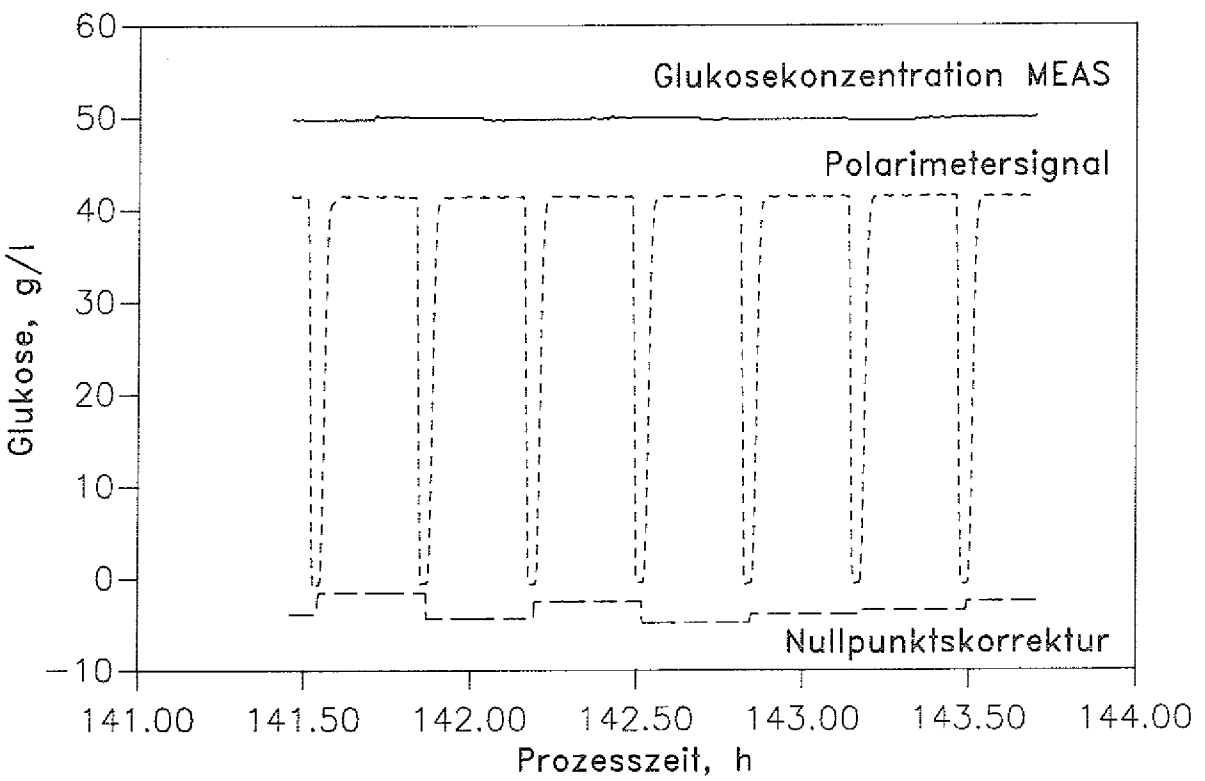


Abb. 5.11: Kompensation der Nullpunktsdrift des Polarimeters

- **Software-Filter für das Polarimetersignal:** Trotz vorgeschalteter Blasenfalle werden immer noch Gasblasen im Filtratstrom des Polarimeters beobachtet, was beim Durchtritt der Gasblase durch die Polarimeterküvette zu einer Verkürzung des Strahlengangs und damit zu einer starken Verringerung des Drehwinkels führt. Daher wird in diesem Programmabschnitt kontinuierlich die erste Ableitung der letzten 6 (gemittelteten) Meßwerte bestimmt und die Meßdatenzuweisung unterbrochen, falls diese ermittelte Steigung einen bestimmten Wert unterschreitet, also eine Gasblase durch die Küvette läuft. Erst nachdem der alte Meßwert (mit einer Abweichung von 10 %) wieder erreicht ist, oder ein Unterbrechungszeitraum von 3 Minuten überschritten wurde, wird die Meßdatenzuweisung fortgesetzt (siehe Abb. 5.12).

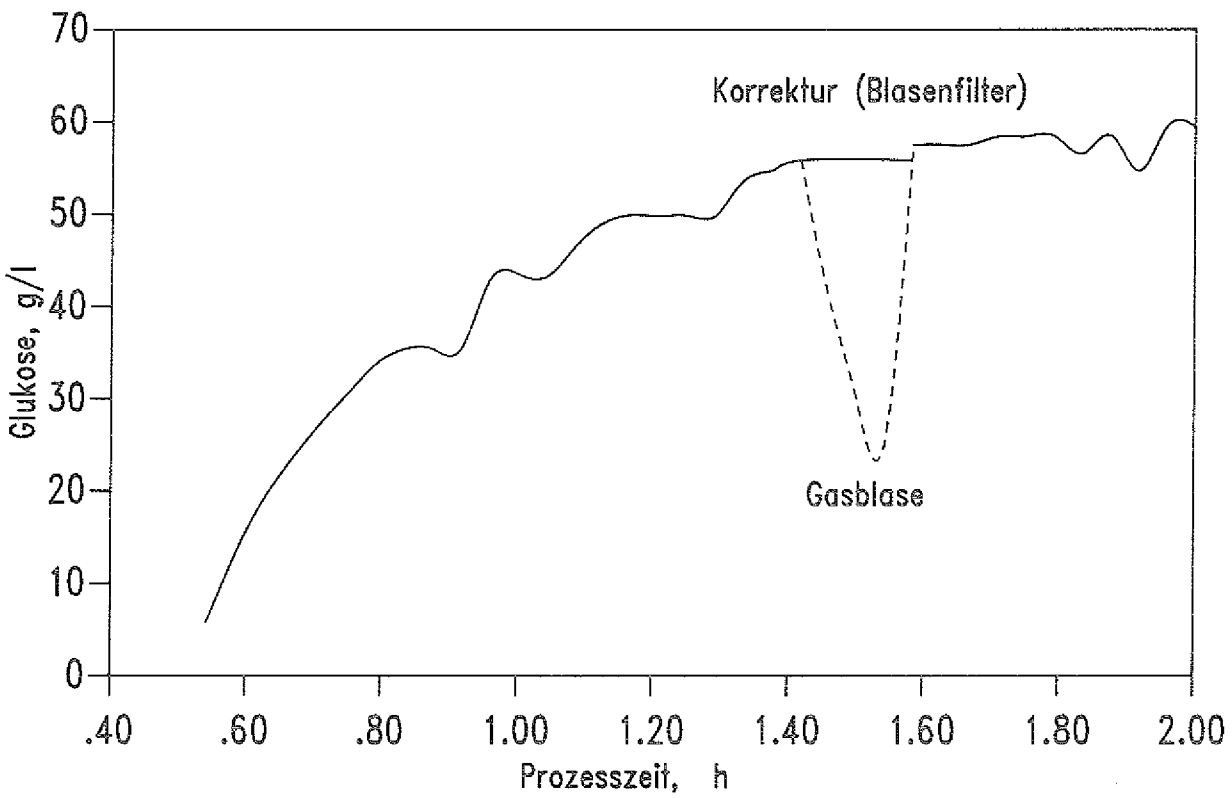


Abb. 5.12: Demonstration Gasblasenkorrektur (Software-Filter)

- **Regler zur Steuerung des Umsatzes über die Verweilzeit:** Da die Regelstrecke (Wirbelschichtreaktor und on-line Analytik) mit relativ großen Totzeiten behaftet ist, wurde zur Regelung des Umsatzes U durch die Veränderung der Verweilzeit τ des Substrats im Reaktor ein PI-Regler in zeitdiskreter Form programmiert (siehe Anhang 10.2).

  Über die während des Prozesses jederzeit mögliche Variation des Verstärkungsfaktors konnte die Empfindlichkeit des Reglers dem Prozesszustand angepaßt werden. Bei Auftreten eines starken Überschwingens der Regelstrecke ist die Empfindlichkeit zu hoch, bei bleibender Regelabweichung ist die Empfindlichkeit zu niedrig.

Abb. 5.13: Photo der Prozeßkontrolle der Wirbelschichtanlagen

Die unten aufgeführten Reglerparameter der Umsatz-Regelung sind bei Labor- sowie Technikums-Wirbelschichtanlage identisch, da die Verweilzeit τ eine volumenunabhängige Größe darstellt.

Abtastzeit	T0	=	60	sec
Verstärkungsfaktor	Kp	=	2 - 5	-
Integrierzeit	Ti	=	1800	sec

- **Steuerung der Reaktorvolumina:** Auch für diese Regelaufgabe hat sich ein PI-Regler bewährt.

- **Rückspülung von Vorfiltern zur Mikrofiltration:** Diese verläuft nach einem über off-line Werte varierbaren Zeitplan.

- **Vorlagekontrolle:** Da die Substratzuführung vom Programm gesteuert wird, kann eine einfache Bilanzierung zur Vorlagenkontrolle eingesetzt werden.

Abbildung 5.13 zeigt ein Photo der gesamten Einrichtung zur Prozeßkontrolle für die 2-stufige Wirbelschichtanlage.

6. Versuchsergebnisse und Diskussion

6.1 Voruntersuchungen zur Verfahrensentwicklung

6.1.1 Kinetik der Ethanolbildung von *Zymomonas mobilis*

Die Modellierung und Quantifizierung der Produktbildungs- und Wachstumskinetik von *Zymomonas mobilis* dient als Grundlage zur konzeptionellen Umsetzung der Ziele dieser Verfahrensentwicklung (siehe Abschnitt 2). Mit diesen Daten sollen das Potential reaktiontechnischer Ansätze abgeschätzt und im Hinblick auf die Zielsetzungen sinnvolle Betriebsbereiche ermittelt werden.

Die Beschreibung der Kinetik von *Zymomonas mobilis* erfolgt mit den in Abschnitt 3.2 dargestellten kinetischen Ansätzen:

$$\mu = \mu_{max} * C_s/(Ks + C_s + C_s^2/Ki) * (1-C_p/C_{p,max})^n - m_s * Y_{xs,max} \qquad 3.11$$

$$q_s = \mu/Y_{xs,max} + m_s \qquad 3.7$$

$$q_p = \mu/Y_{xp,max} + m_p \qquad 3.8$$

Zur Bestimmung der Modellparameter wurden kontinuierliche Fermentationen mit *Zymomonas mobilis* im Rührkessel mit 2 verschiedenen Glukose-Zulaufkonzentrationen durchgeführt und die stationären Konzentrationen ermittelt (siehe Abschnitt 5.1). Die Fermentationen erfolgten mit einem definierten, synthetischem Medium (siehe Abschnitt 4.1).

Die mit dieser Fließgleichgewichtsmethode im kontinuierlich betriebenen Rührkessel zu ermittelnden kinetischen Modellparameter unterscheiden sich prinzipiell von aus Batch-Versuchen ermittelten Parametern. Dies hat seine Ursache darin, daß das oben formulierte, nicht strukturierte kinetische Modell nur bei 'balanciertem' Wachstum zulässig ist (SCHÜGERL 1985). Dabei wird Wachstum über ein Zeitintervall als balanciert angesehen, wenn alle extensiven Eigenschaften des Systems mit der Zeit konstant sind, oder sich in derselben Weise ändern. Dies ist bei Batch-Experimenten, besonders bei schnell metabolisierenden und wachsenden Mikroorganismen nicht der Fall, während diese Forderung im kontinuierlich betriebenen Rührkesselfermenter im Fließgleichgewichtszustand erfüllt ist.

Im Chemostaten ist die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen gleich dem Kehrwert der Verweilzeit, wie sich aus der steady-state Bilanz für die Biomasse C_x (siehe Gleichung 3.13a) ergibt:

$$1/\tau = D = \mu \qquad 6.1$$

Somit sind alle Variablen, die in den kinetischen Ansätzen enthalten sind (C_x, C_s, C_p, μ), erfaßbar.

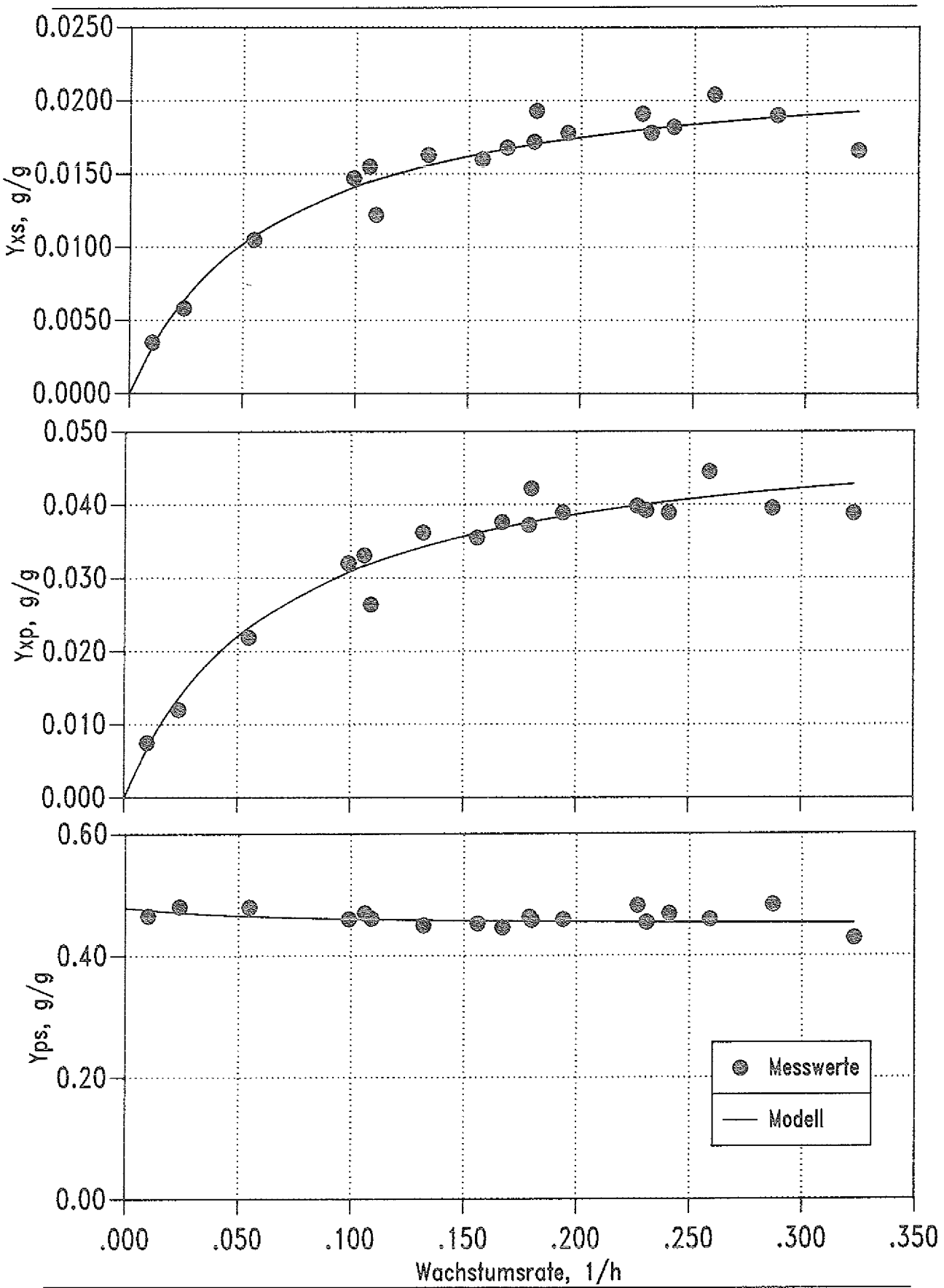


Abb. 6.1: Darstellung der Ertragskoeffizienten Y_{xs}, Y_{xp}, Y_{ps} in Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit

Die Ermittlung der Modellkonstanten des maintenance Ansatzes (m_s, m_p, $Y_{xs,max}$, $Y_{xp,max}$) erfolgt mit der 'PIRT-gleichung', die sich aus der Definition der Ertragskoeffizienten ableiten läßt.

$$Y_{xs} = (dC_x/dt) / (dC_s/dt) = \mu / q_s = D / q_s$$

$$Y_{xs} = (D*Y_{xs,max}) / (D + m_s*Y_{xs,max}) \qquad 6.2$$

und in analoger Weise:

$$Y_{xp} = (D*Y_{xp,max}) / (D + m_p*Y_{xp,max}) \qquad 6.3$$

Die Anpassung der Modellkonstanten zur Minimierung der Fehlerquadratsumme zwischen Meßwerten und Modell erfolgte mit Hilfe eines Optimierprogramms ('OPTI', GIESECKE 1987). Als Optimieralgorithmus wurde die Methode nach Rosenbrock eingesetzt. Damit wurden folgende Werte für die Modellkonstanten ermittelt:

Modellkonstante	Optimum
m_s	2.724 g Glukose/(g BTM * h)
m_p	1.307 g Ethanol/(g BTM * h)
$Y_{xs,max}$	0.023 g BTM/g Glukose
$Y_{xp,max}$	0.0514 g BTM/g Ethanol
(Standardabweichung Y_{xs}: $1.3*10^{-3}$ g/g; Y_{xp}: $2.5*10^{-3}$ g/g)	

Tab. 6.1: Modellkonstanten des Erhaltungsstoffwechsels

In Abbildung 6.1 ist die mit diesen Konstanten berechnete Abhängigkeit der Ertragskoeffizienten von der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit dargestellt. Zusätzlich ist hier noch der Verlauf des Produktertrags Y_{ps}, der sich aus dem Quotienten von Y_{xs} durch Y_{xp} berechnen läßt, wiedergegeben.

Der niedrige Wert für $Y_{xs,max}$ zeigt, daß *Zymomonas mobilis* maximal 2,3 % der umgesetzten Glukose zum Aufbau neuer Zellsubstanz verbraucht, die Selektivität zur Bildung der Produkte - CO_2 und Ethanol - also sehr hoch ist. Dies ist auch der Grund dafür, daß bei wachstumsentkoppelter Produktbildung, wenn der Biomasseertrag gegen Null geht, nur ein minimaler Anstieg der Ethanolselektivität ermittelt wird (siehe Abb. 6.1): Die Produktselektivität steigt von 45 % bei großen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten lediglich auf maximal 48 %, wenn kein Wachstum mehr erfolgt. Dieser Effekt ist meßtechnisch kaum zu erfassen, wie die Streuung der Meßwerte zu erkennen gibt.

Im Vergleich zu den in der Literatur für *Zymomonas mobilis* angegebenen Selektivitäten (siehe Tab. 1.1) fällt insbesondere der hier mit synthischem Glukosemedium bestimmte, maximale Biomassertrag mit 2,3 % gegenüber 2,8 % deutlich niedriger aus. Dies hat seine Ursache in den unterschiedlichen Medien, da bei den in Tab. 1.1 angegebenen Selektivitäten die zusätzlich im Medium vorhandene C-Quelle Hefeextrakt nicht berücksichtigt wurde.

Modellkonstante	Optimum		
μ_{max}	0.532	1/h	
Ks	0.133	g/l	
Ki	913	g/l	
n	0.470	-	
$C_{p,max}$:	72	g/l	(Literatur)
(Standardabweichung μ: $2{,}7*10^{-2}$ 1/h)			

Tab. 6.2: Modellkonstanten der Wachstumsgeschwindigkeit

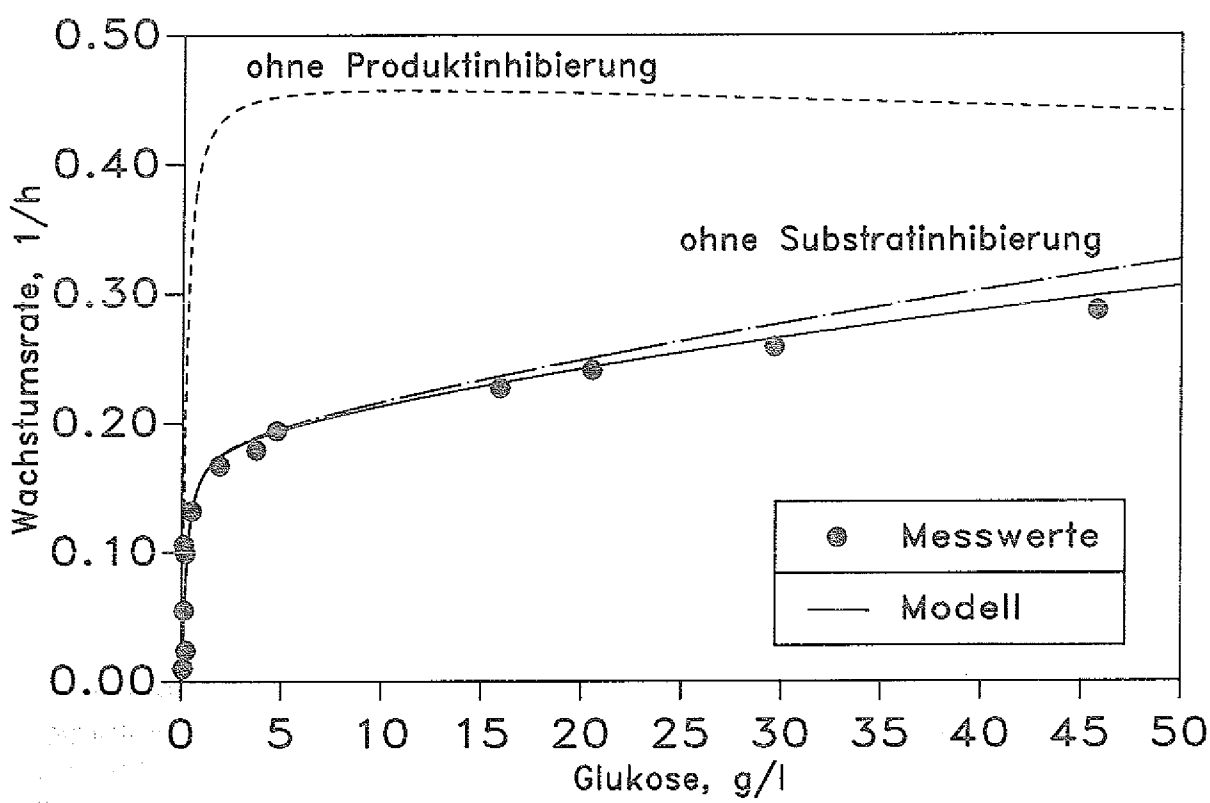


Abb. 6.2: Spezifische Wachstumsgeschwindigkeit mit und ohne Inhibierungsanteile in Abhängigkeit der Substratkonzentration im Chemostaten (C_{s0} = 127 g/l).

Die Optimierung der Modellkonstanten des kinetischen Ansatzes für die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit (Gleichung 3.11) erfolgte ebenfalls nach der Methode von Rosenbrock. Hierbei wurde für die maximale Ethanolkonzentration $C_{p,max}$, ab der kein Wachstum von *Zymomonas mobilis* mehr beobachtet wird, ein Wert von 72 g/l vorgegeben (JÖBSES/ROELS 1985), um die Zahl der Anpassungsparameter zu verringern (siehe Tab. 6.2). Im Chemostaten stellt dies auch die im Fließgleichgewicht maximal erreichbare Ethanolkonzentration dar.

In Abbildung 6.2 ist die mit diesen Modellparametern berechnete spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ als Funktion der limitierenden Substratkonzentration im Fließgleichgewicht mit und ohne den Inhibierungsanteilen aufgetragen. Da die stationäre Ethanolkonzentration im Chemostaten keine von der Glukosekonzentration unabhängige Variable darstellt, aber aufgrund der Produktinhibierung in die Kinetik mit einfließt, müssen die steady-state Massenbilanzen für den Chemostaten miteinbezogen werden (siehe Abschnitt 3.2.2). Die Berechnung der stationären Konzentrationen C_s, C_x, C_p aus den 3 Massenbilanzgleichungen und den kinetischen Ansätzen mit den oben bestimmten Modellkonstanten erfolgte iterativ mit dem Simulationsprogramm STESTA (JOKSCH 1988).

Aufgrund des niedrigen Ks-Wertes von 0.133 g/l ist der Einfluß der Substratlimitierung auf die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit oberhalb Glukosekonzentrationen von 5 g/l nicht mehr signifikant. Auch die Substratüberschußinhibierung beeinflußt nicht signifikant die Kinetik der Ethanolfermentation mit *Zymomonas mobilis*, wie am hohen Wert für die Inhibierungskonstante Ki von 913 g/l feststellbar ist (siehe auch Abb. 6.2).

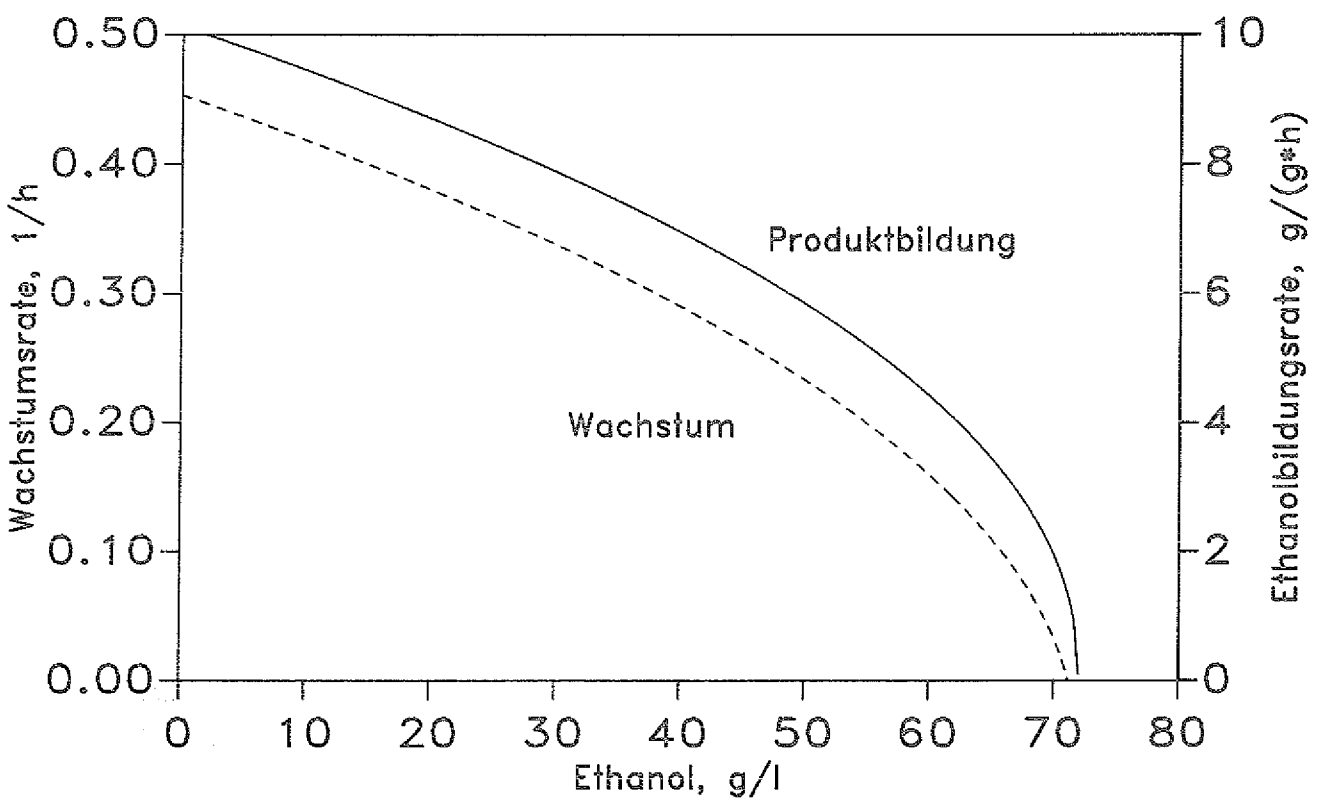


Abb. 6.3: Darstellung der Wachstums- und Produktbildungskinetik von *Zymomonas mobilis* in Abhängigkeit der Produktkonzentration

Von entscheidender Bedeutung für die Kinetik ist jedoch die Produktkonzentration. Dies wird im Chemostaten besonders deutlich bei niedrigen Glukosekonzentrationen, was gleichbedeutend ist mit hohen Ethanolkonzentrationen. Hier ist die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit um mehr als die Hälfte verringert und steigt mit abnehmender Ethanolkonzentration an (siehe Abb. 6.2).

Der Einfluß der Ethanolkonzentration auf die Kinetik von *Zymomonas mobilis* unter nicht substratlimitierenden Bedingungen ist für eine feste Glukosekonzentration C_s = 5 g/l (nicht substratlimitierende Bedingungen) in Abb. 6.3 dargestellt.

Durch den Wert des Exponenten n von 0.47 ergibt sich nahezu eine parabolische Abnahme der spezifischen Geschwindigkeiten mit zunehmender Ethanolkonzentration. Bis zu einer Ethanolkonzentration von 55 g/l verringern sich die Reaktionsgeschwindigkeiten um 50 %. Danach kommt es zu einem rapiden Abfall der spezifischen Geschwindigkeiten.

Da die gebildete Ethanolmenge streng mit dem umgesetzten Substrat gekoppelt ist, ist im Chemostaten die maximal im Fließgleichgewicht vollständig umsetzbare Zulauf-Glukosekonzentration $C_{s0,max}$ berechenbar:

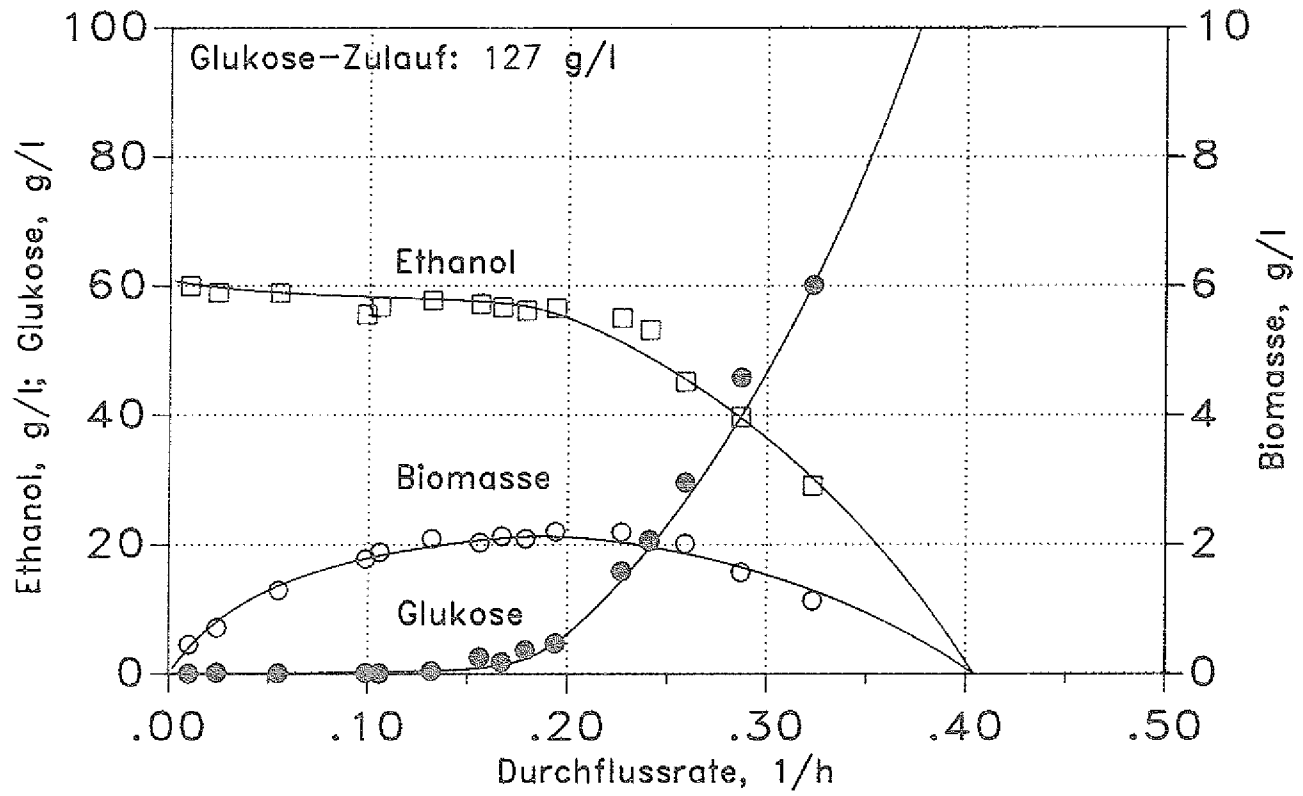
$$\tau \rightarrow \infty : \quad Y_{ps} = m_p/m_s = 0.4798 \text{ g Ethanol / g Glukose;}$$

für $C_{p,max}$ = 72 g/l ergibt sich im Fließgleichgewicht:

$$C_{s0,max} = 150 \text{ g/l Glukose.}$$

Für die eingesetzten Glukose-Zulaufkonzentrationen (127 g/l und 156 g/l) sind die gemessenen stationären Konzentrationen und die modellierten Konzentrationsverläufe über der Durchflußrate in Abb. 6.4 dargestellt.
Die Modellierung der Biomassekonzentration (die anderen Konzentrationen wurden zur Anpassung der Modellkonstanten genutzt) zeigt eine gute Korrelation zwischen Modell und Messung. Im Chemostaten lassen sich Biomassekonzentrationen von maximal 2,2 g/l erzielen. Der Einfluß des maintenance-Anteils ist bei niedrigen Durchflußraten an der abnehmenden Biomassekonzentration deutlich zu erkennen. Der Auswaschpunkt liegt bei beiden Glukose-Zulaufkonzentrationen bei einer Verweilzeit von etwa 2,5 Stunden. Das entspricht einer minimalen Verdopplungszeit von *Zymomonas mobilis* von 1.73 h.

Die Beschreibung nichtstationärer Zustände ist mit diesem nicht strukturierten Modellansatz prinzipiell nicht möglich, da als Information lediglich stationäre Daten eingeflossen sind (MOSER 1988).
Dies zeigt sich zum einen darin, daß in diskontinuierlicher Kultur weitaus höhere Ethanolkonzentrationen erreichbar sind, als im Chemostaten ($C_{p,max}$ = 72 g/l). So konnten im diskontinuierlichen Prozeß Ethanolkonzentrationen von bis zu 120 g/l mit *Zymomonas mobilis* erreicht werden (BAJPAJ/MARGARITIS 1985). Zum anderen kann es im kontinuierlichen Prozeß bei Ethanolkonzentrationen von rund 70 g/l zu Oszillationen der Konzentrationen an Biomasse, Glukose und Ethanol kommen. Augenscheinlich ist zwar das Wachstum ab Ethanolkonzentrationen von 72 g/l inhibiert, die spezifische Produktbildung aber noch konzentrations- und zeitabhängig möglich. Diese kann im Chemostaten unter stationären Bedingungen prinzipiell nicht erfaßt werden, da der Biokatalysator ausgewaschen wird, wenn kein Wachstum mehr erfolgt.



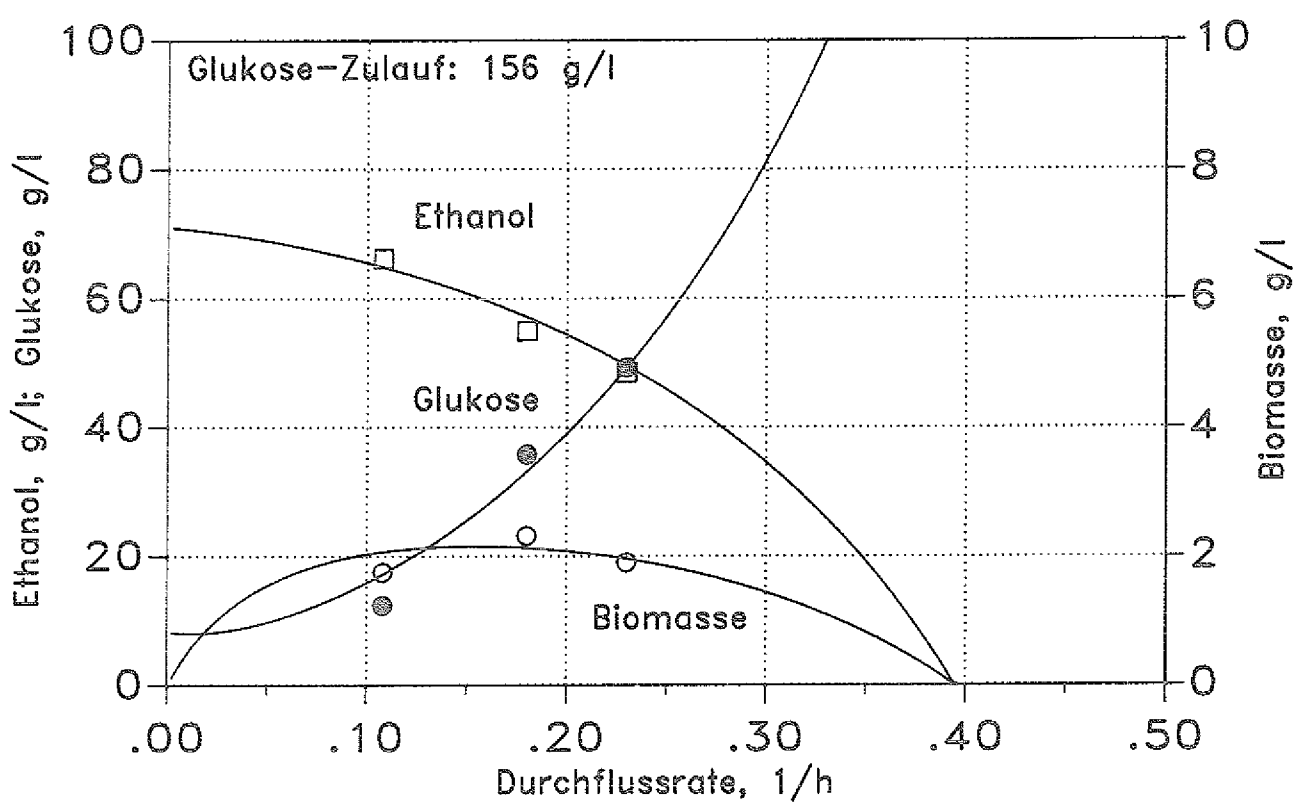


Abb. 6.4: Steady-state Konzentrationen in Abhängigkeit der Durchflußrate im Chemostaten, Vergleich Messung - Modell

Zur Modellierung des instationären Verhaltens müßten also noch weitere Differentialgleichungen formuliert werden (JÖBSES et al. 1986; SCHÜRBÜSCHER 1990). Zur Charakterisierung von Betriebszuständen im kontinuierlichen System reicht der beschriebene Ansatz jedoch vollständig aus.

Das Erstellen von Kohlenstoff-Bilanzen dient der Überprüfung der durchgeführten Messungen und der angesetzten Bilanzgleichungen. Hierzu werden die den Reaktor verlassenden Stoffströme (Glukose, Ethanol, Biomasse, CO_2-gasförmig, CO_2-gelöst) als Kohlenstoff-Ströme formuliert und auf den in den Reaktor gelangenden Kohlenstoff-Strom bezogen. Der als gelöstes CO_2 den Reaktor verlassende Kohlenstoffstrom wird über Henry-Gesetz und Kohlensäuregleichgewicht abgeschätzt, wobei in erster Näherung die Ionenstärke nicht berücksichtigt wird:

$$C_{CO2} = Kh_{CO2/H2O} * p_{CO2} \text{ (Henry-Gesetz)}$$

wobei: p_{CO2} = 1 bar (Umgebungsdruck),
$Kh_{CO2/H2O}(30°C)$ = 29.28 mol/(m^3*bar)

$$C_C = C_{CO2} * (1 + K1/(C_{H^+}) + (K1*K2)/(C_{H^+})^2)$$
(Kohlensäuregleichgewicht)

wobei: K1(30°C) = $4.544*10^{-7}$ mol/l
K2(30°C) = $5.153*10^{-11}$ mol/l

(SONTHEIMER et al. 1980).

Der Kohlenstoffanteil der Biomasse wurde über Elementaranalyse zu 39 % ermittelt.
Das Ergebnis dieser Kohlenstoff-Bilanz für den Chemostaten ist in Abbildung 6.5 dargestellt. Bei vollständigem Umsatz gehen 60 % des eingesetzten Kohlenstoffs in das Zielprodukt Ethanol, während 30 % als CO_2 den Reaktor verlassen. Maximal 2 % des Kohlenstoffs finden sich in der Biomasse wieder. Die Bilanzlücke von höchstens 8 % unter substratlimitierenden Bedingungen hat ihre Ursache in der Vernachlässigung von nicht dedektierten Nebenprodukten und Lyseprodukten.

Die Berechnung der Kohlenstoffselektivität erfolgt, indem nicht auf die zugeführte Kohlenstoffmenge, sondern auf die umgesetzte Kohlenstoffmenge bezogen wird. Hierbei bietet sich die Möglichkeit, die gebildeten Produktmengen aufzuspalten in wachstumsgekoppelte und vom Erhaltungsstoffwechsel verursachte Produktbildung (siehe Abb. 6.5). Dabei wird deutlich, daß selbst am Auswaschpunkt noch 10 % des umgesetzten Kohlenstoffs über den Erhaltungsstoffwechsel in das gebildete Ethanol fließen.

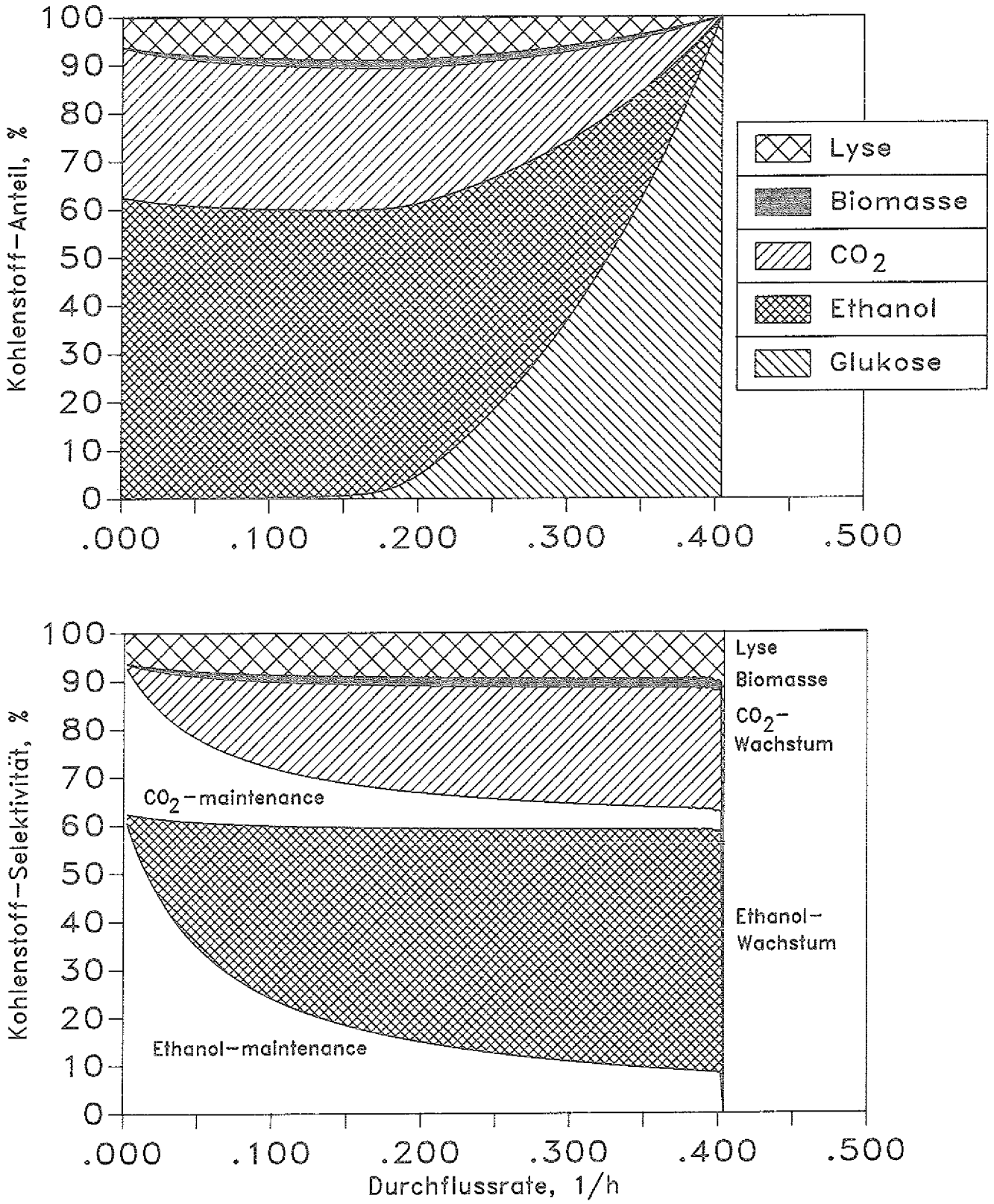


Abb. 6.5: Kohlenstoffbilanz und Kohlenstoffselektivität im Chemostaten (modelliert, C_{s0} = 127 g/l)

6.1.2 Einfluß von Laktat auf Wachstum und Produktbildung von *Zymomonas mobilis*

Laktat als Kontaminationsprodukt nicht steril betriebener Fermentationen mit suspendierten *Zymomonas mobilis* Bakterien führt zu Prozeßinstabilitäten. Hierbei spielt offenbar das Vorhandensein weiterer von *Zymomonas mobilis* nicht verwertbarer Kohlenstoffquellen eine Rolle (BRINGER/SWYZEN 1984). Bei sterilen kontinuierlichen Fermentationen von *Zymomonas mobilis* mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle konnte unter substratlimitierenden Bedingungen gezeigt werden, daß einmalige Kontaminationsstöße lediglich temporäre Störungen hervorrufen (GROTE/ROGERS 1985).

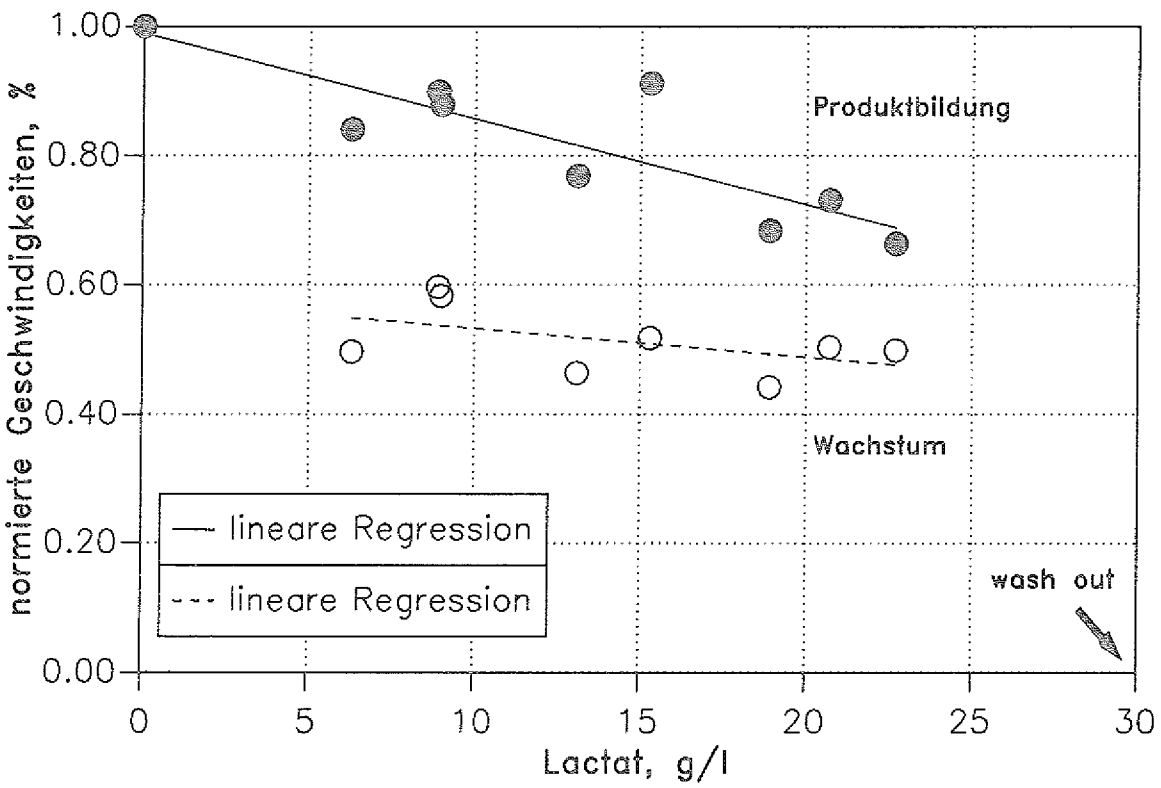


Abb. 6.6: Relative Änderung der spezifischen Geschwindigkeiten von *Zymomonas mobilis* in Abhängigkeit der Laktatkonzentration (τ = 5,93 h; C_{s0} = 100 - 150 g/l)

Um den Einfluß von Laktat auf Wachstum und Produktbildung von *Zymomonas mobilis* zu untersuchen, wurden kontinuierliche Fermentationen im Chemostaten mit steigenden Laktatkonzentrationen im Medium durchgeführt. Die im Fließgleichgewicht gemessenen spezifischen Geschwindigkeiten bei unterschiedlichen Glukose-Zulaufkonzentrationen (100 - 150 g/l) wurden auf die laktatfreien spezifischen Umsetzungsgeschwindigkeiten bezogen und über der Laktatkonzentration im Chemostaten bei fester Verweilzeit aufgetragen (siehe Abb. 6.6).
Prinzipiell läßt sich feststellen, daß die spezifische Produktbildungsgeschwindigkeit nicht in dem Maße durch Laktat gehemmt wird, wie die Wachstumsgeschwindigkeit. Bei 10 g/l Laktat im Fermenter verringert sich die spezifische Produktbildungsgeschwindigkeit um 10 %, während die Wachstumsgeschwindigkeit um 50 % verringert ist. Wird die Verweilzeit verdoppelt, so verringert sich die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit sogar um 60 - 70 % (nicht dargestellt). Diese besondere Hemmung des Wachstums von *Zymomonas mobilis* durch Laktat kann im Chemostaten, wenn eine Konkurrenzsituation zwischen *Zymomonas mobilis* und Kontaminanten vorliegt, leicht zu

Instabilitäten führen. Eine Verlängerung der Verweilzeit, um den vollständigen Umsatz zu gewährleisten, begünstigt Kontaminanten, die nicht in dem Maße wie *Zymomonas mobilis* durch Laktat im Wachstum gehemmt werden. Liegen dazu noch weitere von *Zymomonas mobilis* nicht verwertbare C-quellen im Substrat vor, so ist auch bei vollständigem Glukoseumsatz im Chemostaten eine Selektionierung über unterschiedliche Ks-Werte nicht möglich (BAILEY/OLLIS 1986).

6.1.3 Immobilisierung von *Zymomonas mobilis* an offenporigen Sintergläsern

Den ersten Teilschritt der mikrobiellen Kolonisierung von Oberflächen stellt die reversible Sorption der Zellen an eine Oberfläche dar. Bei diesem Vorgang spielen elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Trägeroberfläche und Organismus eine Rolle (siehe Abschnitt 3.3).
Die Zelloberfläche von *Zymomonas mobilis* wurde von verschiedenen Autoren untersucht. Demnach verfügen *Zymomonas mobilis* Zellen über eine sehr schwache negative Netto-Oberflächenladung von maximal -0.03 ek/($\mu C*cm^2$). Der isoelektrische Punkt von Zymomonmas mobilis Zellen liegt bei pH 3.8 (KOUTINAS et al. 1988). Im Vergleich zu anderen Organismen besitzen *Zymomonas mobilis* Zellen eine ausgesprochen hydrophile Oberfläche (MUSTRANTA et al. 1987). Die Oberfläche von Glas ist ebenfalls hydrophil und negativ geladen, so daß die elektrostatischen Wechselwirkungen einer Sorption der Zellen an die Glasoberfläche entgegen stehen. Da beide Oberflächen hydrophil sind, spielen hydrophobe Wechselwirkungen in diesem Fall keine Rolle.
Prinzipiell bietet sich die Möglichkeit, die Oberflächeneigenschaften des Trägers und/oder die Oberflächeneigenschaften der Zellen gezielt zu verändern, um eine Sorption zu erreichen. Um die Oberflächen des Trägers zu verändern, wurden diese durch adsorptiv gebundene Polymere und kovalent gebundene niedermolekulare funktionelle Gruppen modifiziert. Im einzelnen wurden nach BÜCHS (1988) folgende oberflächenmodifizierten Sintergläser hergestellt (siehe Tab. 6.3):

Funktionelle Gruppe	Oberflächeneigenschaft	
	Ladung	Energie
Silikon	keine	hydrophob
DEAE-Dextran	positiv	n.b.
Polyethylenimin (PEI)	positiv	n.b.
Carboxyl	negativ	hydrophil

Tab. 6.3: Oberflächeneigenschaften von modifizierten Sintergläsern (BÜCHS 1988).

Die Nettoladung von negativ geladenen Zelloberflächen kann durch Behandlung mit 3-wertigen Metallionen (Al^{3+}, Fe^{3+}) so verändert werden, daß eine positive Nettoladung erzeugt wird, die eine Sorption der Zellen an ebenfalls negativ geladene Glasoberflächen bewirkt (ROUXHET et al. 1984). Deshalb wurden zur Durchführung von diskontinuierlichen Sorptionsversuchen *Zymomonas mobilis* Zellen zum einen in $FeSO_4$-freien und zum anderen in $FeSO_4$-haltigem Medium gezüchtet. Die Ergebnisse dieser diskontinuierlichen Sorptionsversuche mit ruhenden *Zymomonas mobilis* Zellen in Schüttelkolben sind in Abbildung 6.7 dargestellt:

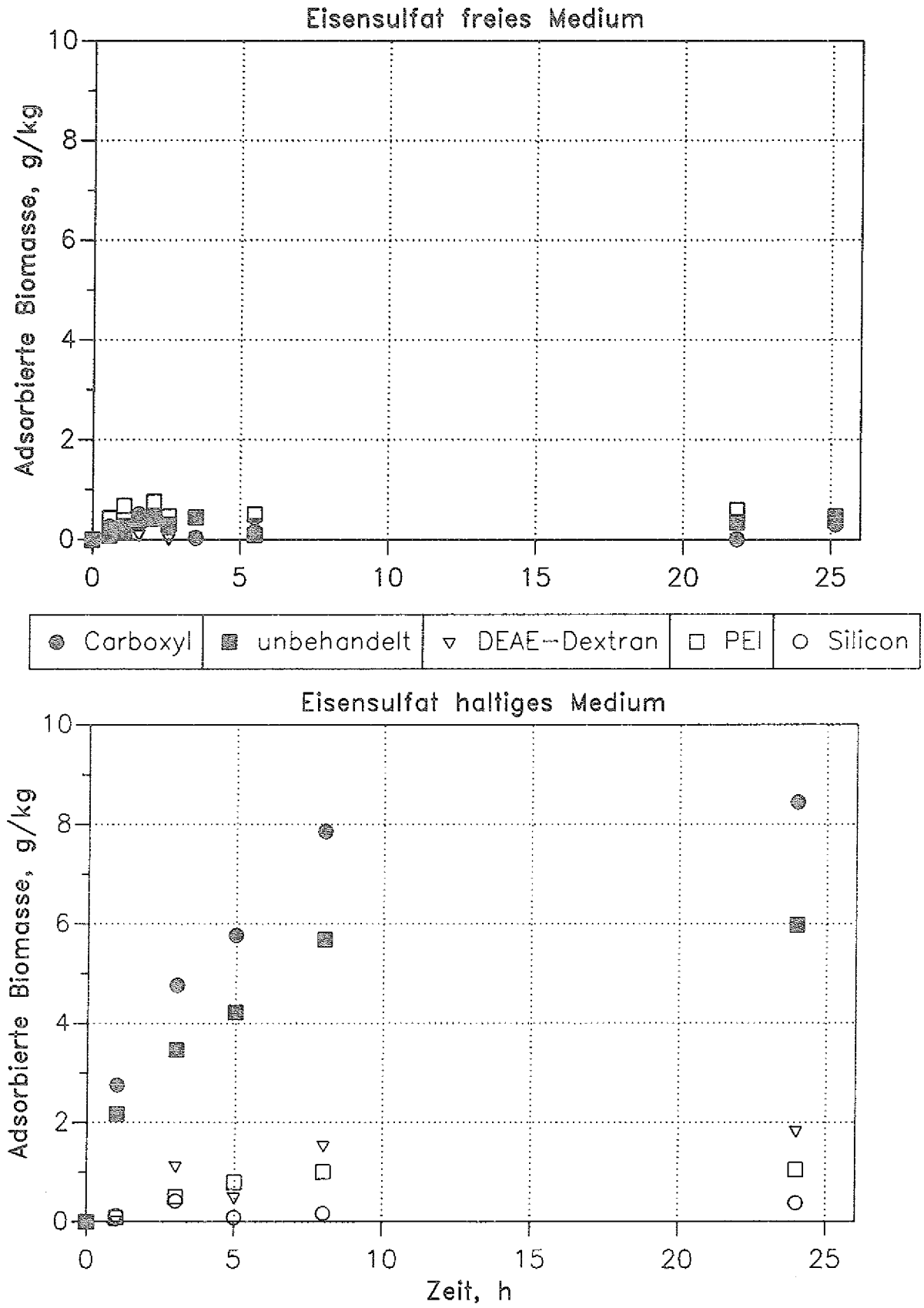


Abb. 6.7: Diskontinuierliche Sorptionsversuche mit ruhenden *Zymomonas mobilis* Zellen aus unterschiedlichen Medien und mit unterschiedlich modifizierten Sintergläsern

Die Zellen aus dem $FeSO_4$-freien Medium zeigten bei allen eingesetzten oberflächenmodifizierten Sintergläsern keine Sorption. Dies deutet darauf hin, daß die nur schwach vorhandene negative Oberflächenladung der hydrophilen *Zymomonas mobilis* Zellen nicht ausreicht, um signifikante Wechselwirkungen mit den angebotenen nativen und modifizierten Glasoberflächen einzugehen.
Mit den Zellen aus dem $FeSO_4$-haltigen Medium zeigte sich bei den negativ geladenen Sintergläsern, dem Carboxyl-glas und dem nativem Glas, eine deutliche Adsorption der Zellen an die jeweilige Oberfläche. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnten beim Carboxyl-glas 60 % und beim nativen Glas 45 % der vorgelegten *Zymomonas mobilis* Zellen innerhalb von 8 Stunden adsorbiert werden.
Dieser geringe Unterschied in der primären reversiblen Beladung des Trägermaterials mit *Zymomonas mobilis* Zellen rechtfertigt nicht den Aufwand der chemischen Modifikation des Sinterglases, so daß alle weiteren Untersuchungen mit unbehandelten Sinterglaskörpern durchgeführt wurden.

Wie rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Sinterglaskörper nach erfolgter Adsorption zeigen, sind die Glasoberflächen der Poren mit einem Monolayer von *Zymomonas mobilis* Zellen bedeckt , der allerdings noch beträchtliche Lücken aufweist (siehe Abbildung 6.8). Die Außenfläche der Sinterglaskugeln ist aufgrund der im Schüttelkolben auftretenden Reibungskräfte nahezu zellfrei.

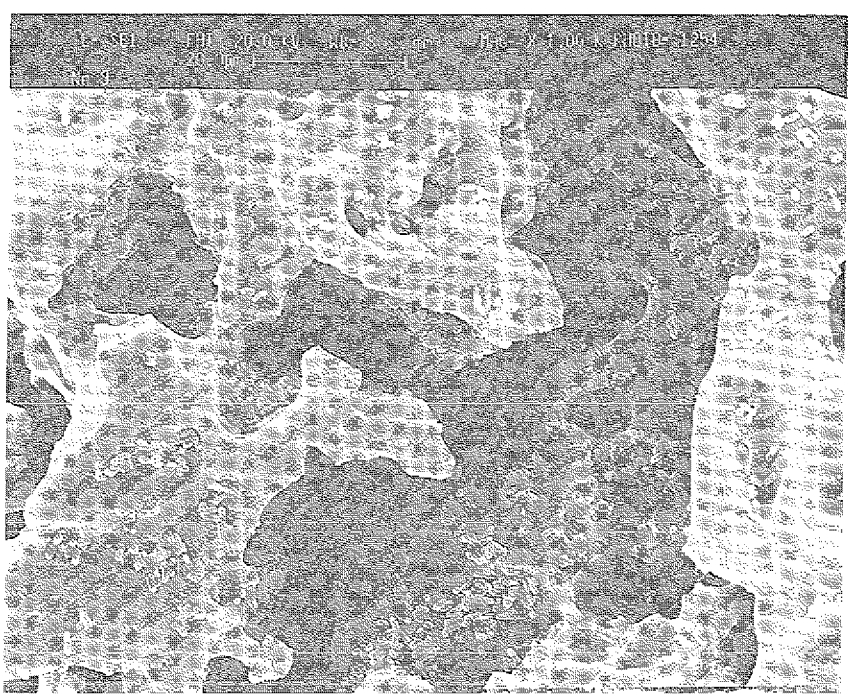


Abb. 6.8: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Sinterglasträgers nach erfolgter Sorption der *Zymomonas mobilis* Zellen.

Der Zusammenhang zwischen sorptiv an Oberflächen gebundenen Partikeln und der Konzentration dieser Partikel in der Flüssigphase wird durch Sorptionsisothermen beschrieben. Wenn die Sorption von Mikroorganismen an Trägeroberflächen bis zum Aufbau eines Monolayers erfolgt, läßt sich die Gleichgewichtbeladung $C_{x,fix}$ in Abhängigkeit der Biomassekonzentration C_x mit der Langmuir-

Isothermen darstellen (FLETCHER 1985):

$$C_{x,fix} = C_{x,fix,max} * C_x / (K + C_x)$$

Zur Aufnahme einer Sorptionsisotherme für *Zymomonas mobilis* Zellen an natives Glas wurden diskontinuierliche Sorptionsversuche mit unterschiedlich konzentrierten Zellsuspensionen von *Zymomonas mobilis* aus $FeSO_4$-haltigem Medium durchgeführt (siehe Abbildung 6.9). Die relativ breite Streuung der Meßwerte ist auf Glasabrieb zurückzuführen, der bei der Messung miterfaßt wird. Die Anpassung der Modellkonstanten ($C_{x,fix,max}$, K) an die Meßwerte erfolgte nach der Methode von Rosenbrock (Tabelle 6.4).

Modellkonstante	Optimum
$C_{x,fix,max}$	28.88 g/kg
K	5.816 g/l
(Standardabweichung $C_{x,fix}$: 3.2 g/kg)	

Tab. 6.4: Modellkonstanten der Langmuir-Isothermen (Sorption von *Zymomonas mobilis* an Glasoberflächen)

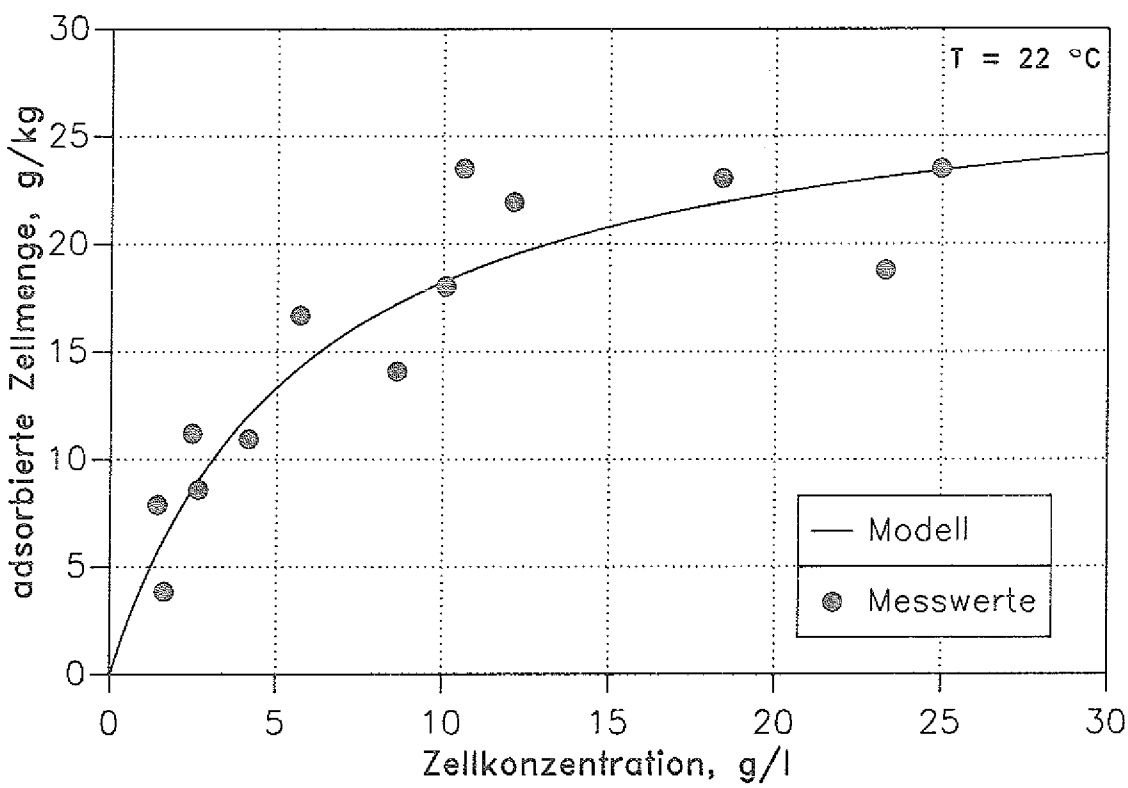


Abb. 6.9: Sorptionsisotherme von *Zymomonas mobilis* Zellen an Sinterglas (Meßwerte KÖPCSENYI 1990).

Der 95 % - Wert der maximal sorptiv erzielbaren Beladung mit *Zymomonas mobilis* Zellen ($C_{x,fix,max}$) ist aufgrund des hohen Wertes der Sättigungskonstante K erst bei einer Zellkonzentration von 110 g/l zu erreichen. Im Rührkessel sind dagegen bei einer diskontinuierlich betriebenen Fermentation von *Zymomonas mobilis* maximal 3,5 g/l Biotrockenmasse zu erzielen. Dies würde einer Beladungsdichte von nur 10 g/kg Sinterglas entsprechen, so daß eine Aufkonzentrierung der Zellen zur Erzielung höherer Beladungsdichten sinnvoll erscheint.

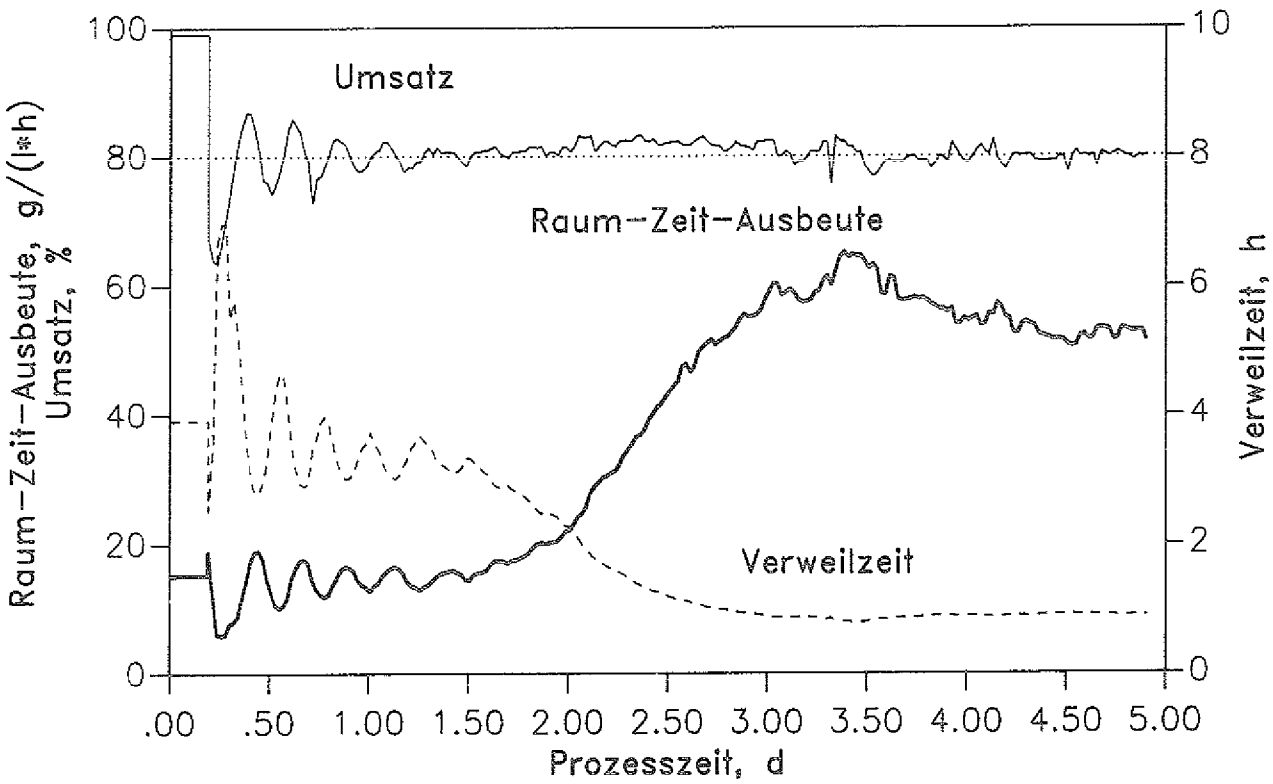
6.2 Sterile Ethanolfermentationen im Labor-Wirbelschichtreaktor

6.2.1 Sterile Kolonisierung von Sinterglaskugeln mit *Zymomonas mobilis*

Ausgehend von den Untersuchungen zur Sorption von *Zymomonas mobilis* Zellen an offenporiges Sinterglas im Schüttelkolben wird die Kolonisierung des Trägers mit *Zymomonas mobilis* im Wirbelschichtreaktor untersucht.
Hierzu wurde zunächst der sterile mit Trägermaterial gefüllte Wirbelschichtreaktor mit einer aufkonzentrierten Zellsuspension (15 - 30 g BTM/l) beaufschlagt und bei Raumtemperatur mindestens 8 Stunden diskontinuierlich betrieben, bis die Sorptionsphase abgeschlossen war und die Biomassekonzentration in der flüssigen Phase entsprechend abgenommen hatte (siehe Abschnitt 6.1.3).
Danach beginnt die eigentliche Kolonisierungsphase mit der kontinuierlichen Betriebsweise unter Reaktionsbedingungen (Temperatur T = 30 °C, pH = 5,0). Bei einer konstanten Zulauf-Glukosekonzentration (120 g/l) wird vom Prozeßrechner durch Veränderung der Verweilzeit ein vorgegebener Umsatz-Sollwert eingeregelt, so daß während der gesamten Kolonisierungsphase die Produkt- und Substratkonzentration in der bulk-Phase konstant gehalten werden. Dies bedeutet, daß die rechnergesteuerte Verkürzung der Verweilzeit bzw. die Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute direkt proportional der Biomasseaktivität im Reaktor ist, so daß die Kolonisierung bei Erreichen einer minimalen Verweilzeit, bzw. einer maximalen Raum-Zeit-Ausbeute abgeschlossen ist.

Abbildung 6.10 zeigt den Verlauf von 2 verschiedenen Versuchen zur Kolonisierung des Wirbelschichtreaktors:
Im oberen Diagramm ist der Kolonisierungsverlauf bei einem Umsatz-Sollwert von 80 %, und im unteren bei einem Umsatz-Sollwert von 50 % dargestellt. In beiden Fällen liegt die Start-Verweilzeit nach dem Einschwingvorgang der Regelstrecke bei etwa 3,5 Stunden, also oberhalb der Verweilzeit am Auswaschpunkt des Chemostaten von 2,5 Stunden (siehe Abschnitt 6.1.1). Wird die Verweilzeit in der Kolonisierungsphase fest mit 2,5 Stunden vorgegeben, so kommt es innerhalb von 20 Stunden zum völligen Auswaschen des Reaktors, der Umsatz liegt dann unter 2 %! Dies liegt daran, daß die primäre, sorptive Bindung der *Zymomonas mobilis* Zellen an den Träger von der aktuellen Biomassekonzentration im Medium abhängt, also reversibel ist. Erst wenn eine irreversible Anheftung der Organismen an die Oberfläche erfolgt, kann die Verweilzeit verkürzt werden, da dann kein funktionaler Zusammenhang mehr zwischen an den Träger gebundenen Zellen und suspendierten Zellen besteht.

Das Unterschreiten der Verweilzeit am Auswaschpunkt des Chemostaten nach 1,5 bis 2 Tagen zeigt an, daß *Zymomonas mobilis* in der Lage ist, irreversible Zelle-Trägeroberfläche- und Zelle-Zelle-Wechselwirkungen einzugehen. Nach einer Hypothese von BARROW et al. (1984) könnte ein von *Zymomonas mobilis* bei Wachstum auf Glukose produziertes Exopolymer für diese adhäsiven Eigenschaften verantwortlich sein. Bei diesen Verweilzeiten unterhalb des Auswaschpunktes des Chemostaten wird dem biologischem System ein Selektionsdruck zugunsten sessiler Mutanten aufgeprägt, da Zellen, die nicht in der Lage sind, Zelle-Zelle-Wechselwirkungen einzugehen, ausgewaschen werden. Daher ist der rechnergesteuerte Kolonisierungsvorgang der Sinterglasträger im Wirbelschichtreaktor nach 3,5 bis 4 Tagen bei Erreichen der maximalen Raum-Zeit-Ausbeute beendet. Im Vergleich dazu werden für manuelles Anfahren des Wirbelschichtreaktors, bei dem die Verweilzeit nach off-line Messungen sukzessive verkürzt wird, 10 bis 14 Tage benötigt (siehe Abb. 6.11). Beim manuellen Anfahren schwanken die Konzentrationen im Reaktor in weiten Bereichen, da



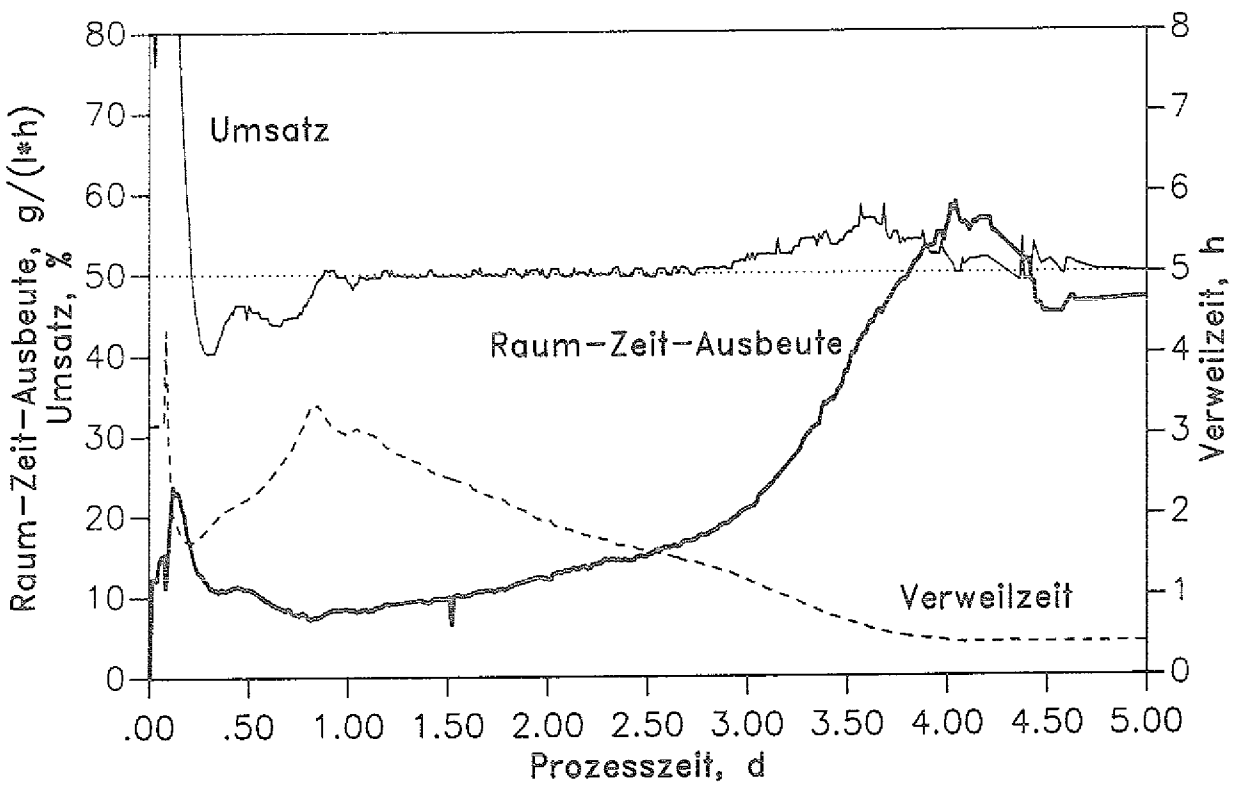


Abb. 6.10: Rechnergesteuerte Kolonisierung von offenporigem Sinterglas im Wirbelschichtreaktor mit *Zymomonas mobilis*, Versuchsverläufe bei unterschiedlichen Umsatzsollwerten.

die Verweilzeit sprunghaft verstellt wird, die Organismen sich also ständig an veränderte Umgebungsbedingungen anpassen müssen. Das Unterschreiten der Verweilzeit am Auswaschpunkt erfolgt erst gegen Ende der manuellen Kolonisierung des Wirbelschichtreaktors, so daß über weite Zeiträume dem biologischem System kein entsprechender Selektionsdruck aufgeprägt werden kann.

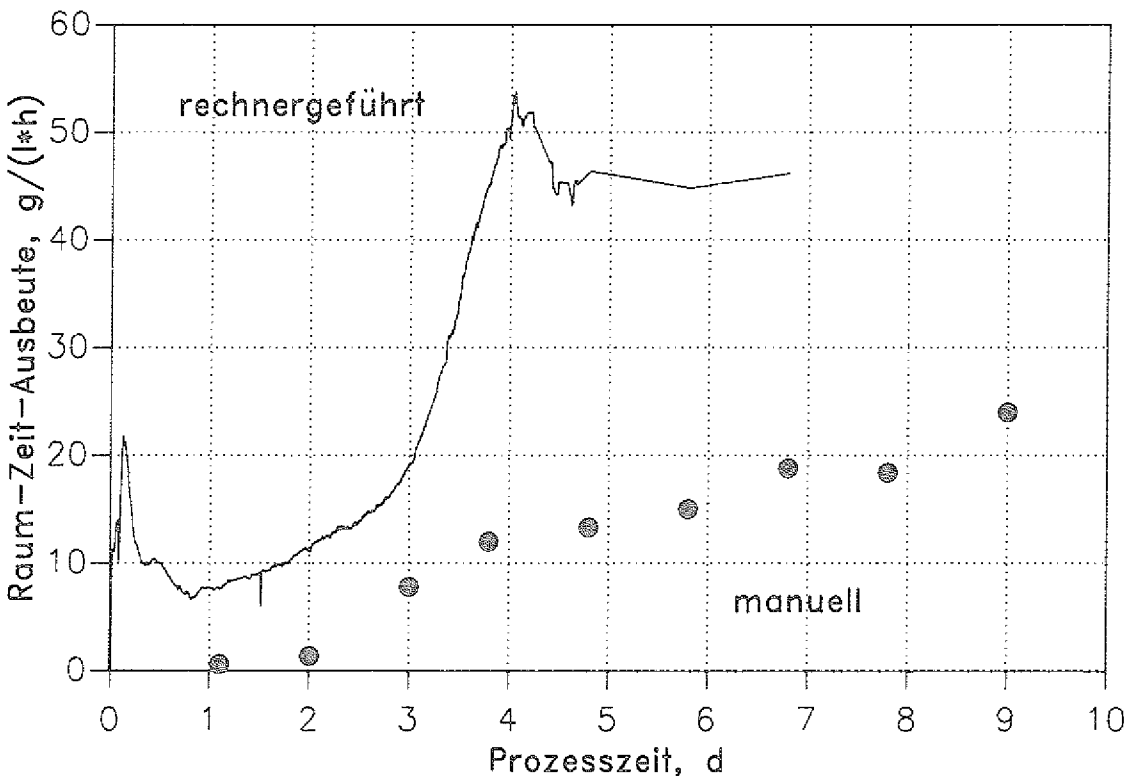


Abb. 6.11: Vergleich rechnergeführte und manuelle Kolonisierung von offenporigem Sinterglas im Wirbelschichtreaktor

Die am Ende der Kolonisierungsphase erzielten Beladungsdichten des Trägers liegen mit 120 -140 g BTM/kg Träger (siehe Anhang 10.1) um den Faktor 10 über den Werten, wie sie in der Sorptionsphase erreicht werden. Wie rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, ist das offenporige Sinterglasmaterial am Ende der Kolonisierungsphase vollständig mit *Zymomonas mobilis* Zellen gefüllt. Abbildung 6.12 zeigt einen Schnitt durch eine Pore im Inneren eines solchen Sinterglaskörpers, die vollständig mit *Zymomonas mobilis* Bakterien gefüllt ist. Bei der Vorgabe von Umsatz-Sollwerten von mehr als 80 % verlängert sich die Kolonisierungsdauer, so daß dann von einer Limitierung oder Inhibierung ausgegangen werden muß.

Bezieht man die erzielten Beladungsdichten auf das Reaktortotalvolumen, so ergeben sich damit Biomassekonzentrationen von 24 - 27 g BTM/l. Das ist eine Aufkonzentrierung der Biomasse im Wirbelschichtreaktor um den Faktor 11 - 13 gegenüber dem maximal im Chemostaten erreichbaren Wert. Hierbei ist noch nicht die suspendierte Biomasse miterfaßt, die Werte von bis zu 2,5 g BTM/l erreicht.

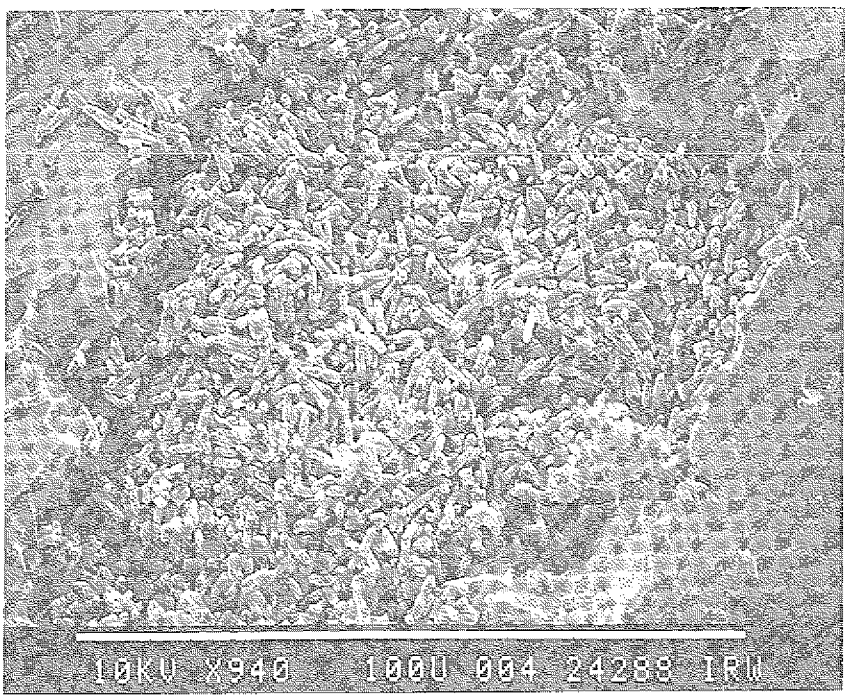


Abb. 6.12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer mit *Zymomonas mobilis* gefüllten Pore im Inneren eines Sinterglaskörpers nach der Kolonisierung

6.2.2 Stationäre Betriebsdaten im Labor-Wirbelschichtreaktor

Um Aussagen über die Aktivität der in offenporigem Sinterglas immobilisierten Biomasse zu erhalten und die stationären Betriebsdaten zu bestimmen, wurden kontinuierliche Fermentationen mit immobilisierten *Zymomonas mobilis* Bakterien bei Zulauf-Glukosekonzentrationen von 120 - 200 g/l mit synthetischem Medium durchgeführt.

Die Ermittlung der Gleichgewichtsdaten erfolgte dabei zum einen durch Vorgabe fester Verweilzeiten und der on-line Registrierung der Konzentrationen an Produkt und Substrat. Zum anderen wurden Umsatzsollwerte vorgegeben und der Prozeßrechner regelte danach die entsprechende Verweilzeit ein. Ein solcher Versuchsverlauf zur Bestimmung der Gleichgewichtsdaten bei einer Zulauf-Glukosekonzentration von 140 g/l ist in Abbildung 6.12 wiedergegeben:
Der Umsatzsollwert wurde in 5 % Sprüngen verändert, wenn ein stationärer Betriebspunkt erreicht war. Kriterium für das Erreichen eines stationären Punktes war eine konstante Raum-Zeit-Ausbeute über mindestens eine Verweilzeit mit einer maximalen Abweichung von 3 % gegenüber dem Mittelwert. Zusätzlich wurde für ausgewählte Punkte die Langzeitstabilität des gewählten Betriebszustandes und die Reproduzierbarkeit überprüft.

Während des Versuchsverlaufs wurde die Selektivität der Ethanolbildung mit aufgezeichnet (siehe Abb. 6.13). Es zeigen sich keine Unterschiede zum Chemostaten. Die ermittelte Produktselektivität liegt mit 45 - 48 % in demselben Bereich, wie bei suspendierten *Zymomonas mobilis* Bakterien (siehe Abschnitt 6.1.1).

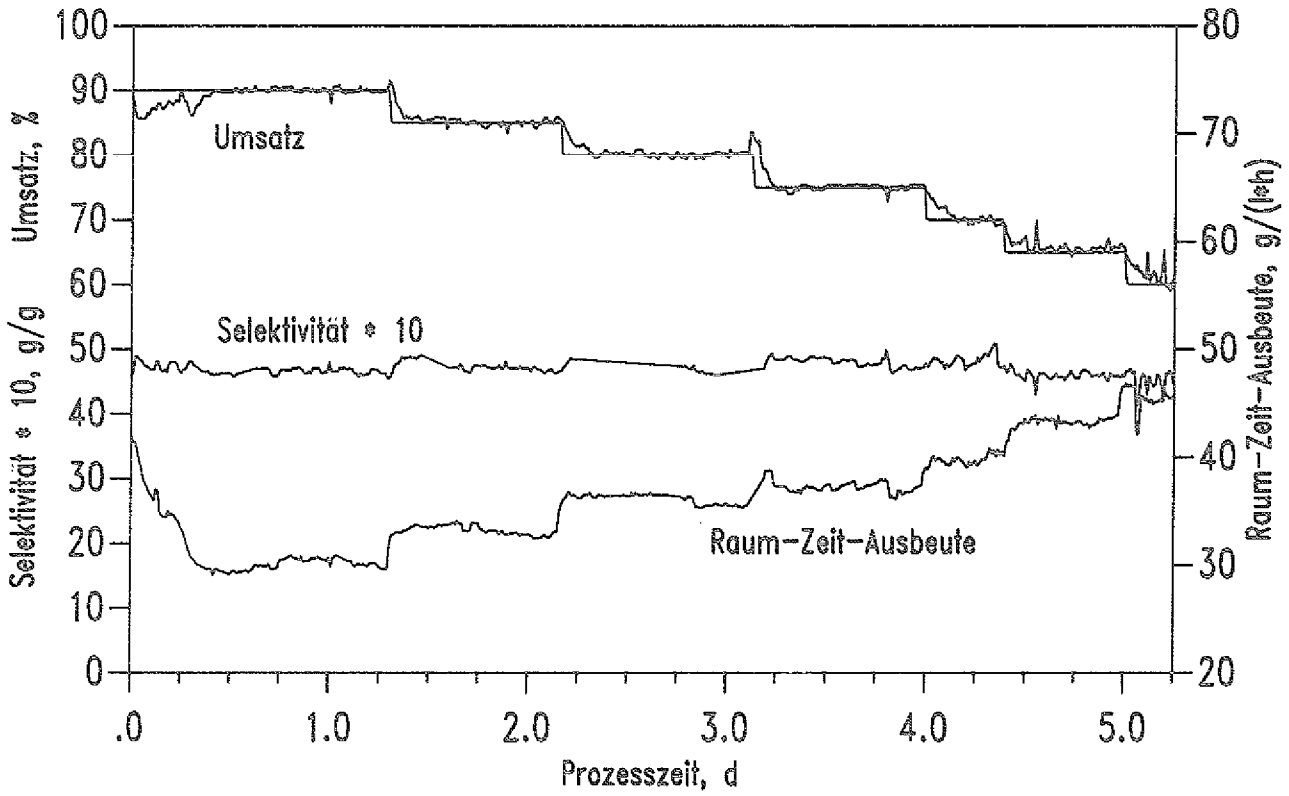


Abb. 6.13: Versuchsverlauf zur Ermittlung stationärer Betriebspunkte im Wirbelschichtreaktor (C_{s0} = 140 g/l)

Die stationären Ergebnisse aller durchgeführten Fermentationen mit *Zymomonas mobilis* im Labor-Wirbelschichtreaktor bei Zulauf-Glukosekonzentrationen von 120 - 200 g/l sind in den Abbildungen 6.14 und 6.15 zusammengefaßt. Über der Verweilzeit, die auf das Reaktor-Totalvolumen bezogen ist, sind die erzielten Umsätze und die erreichten Raum-Zeit-Ausbeuten im Fließgleichgewicht dargestellt. Zusätzlich sind die entsprechenden reaktionstechnischen Daten eines Chemostaten bei den jeweiligen Zulauf-Glukosekonzentrationen eingetragen (durchgezogene Linie, berechnet mit den kinetischen Ansätzen aus Abschnitt 6.1).

Es zeigt sich klar, daß durch die Immobilisierung von *Zymomonas mobilis* an offenporigem Sinterglas im Wirbelschichtreaktor stationären Verweilzeiten im Reaktor weit unterhalb des Auswaschpunkts des Chemostaten möglich sind. Deshalb lassen sich im Wirbelschichtreaktor sehr viel höhere Raum-Zeit-Ausbeuten erzielen.

Die höchsten Raum-Zeit-Ausbeuten werden im Wirbelschichtreaktor bei Zulauf-Glukosekonzentrationen zwischen 120 und 160 g/l bei einer Verweilzeit von 1 Stunde erreicht. Bei der niedrigsten eingesetzten Zulauf-Glukosekonzentration (120 g/l) wird bei einer Stunde Verweilzeit eine Raum-Zeit-Ausbeute von über 50 g/(l*h) bei einem Umsatz von 80 % gemessen. Dies entspricht verglichen mit dem Chemostaten einer Verfünffachung der Raum-Zeit-Ausbeute! Mit zunehmender Zulauf-Glukosekonzentration sinkt die maximale Leistung bei dieser Verweilzeit.

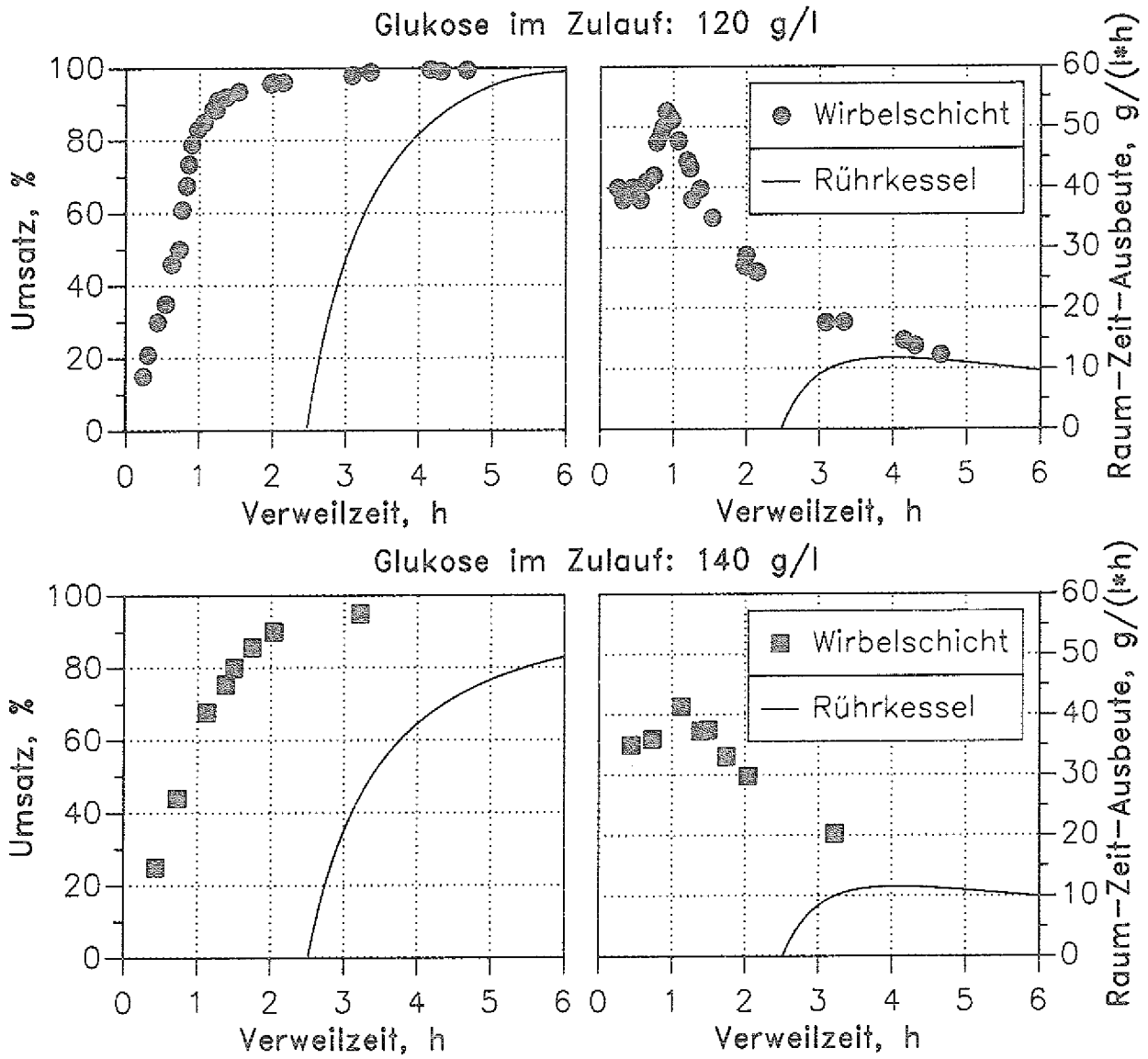


Abb. 6.14: Stationäre Daten Ethanolfermentation im Labor-Wirbelschichtreaktor bei Zulauf-Glukosekonzentrationen von 120 g/l und 140 g/l

Das bedeutet, die erzielten Produktkonzentrationen nehmen ab. Obwohl also die Produktinhibierung abnimmt, sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit! Andererseits sollte der Einfluß einer Substratüberschußinhibierung auf die Kinetik der Produktbildung bei *Zymomonas mobilis* aufgrund der hohen Inhibierungskonstante von 913 g/l als vernachlässigbar anzusehen sein (siehe Abschnitt 6.1.1)!

Wie erwartet fallen zu längeren Verweilzeiten hin die gemessenen Raum-Zeit-Ausbeuten ab, da bei hohen Umsätzen der Einfluß der Substratlimitierung geschwindigkeitsbestimmend wird.

Unerwartet ist der unstetige Abfall des Verlaufs der Raum-Zeit-Ausbeute bei etwa 1 Stunde Verweilzeit, der besonders deutlich bei der niedrigsten eingesetzten Zulauf-Glukosekonzentration zu beobachten ist.

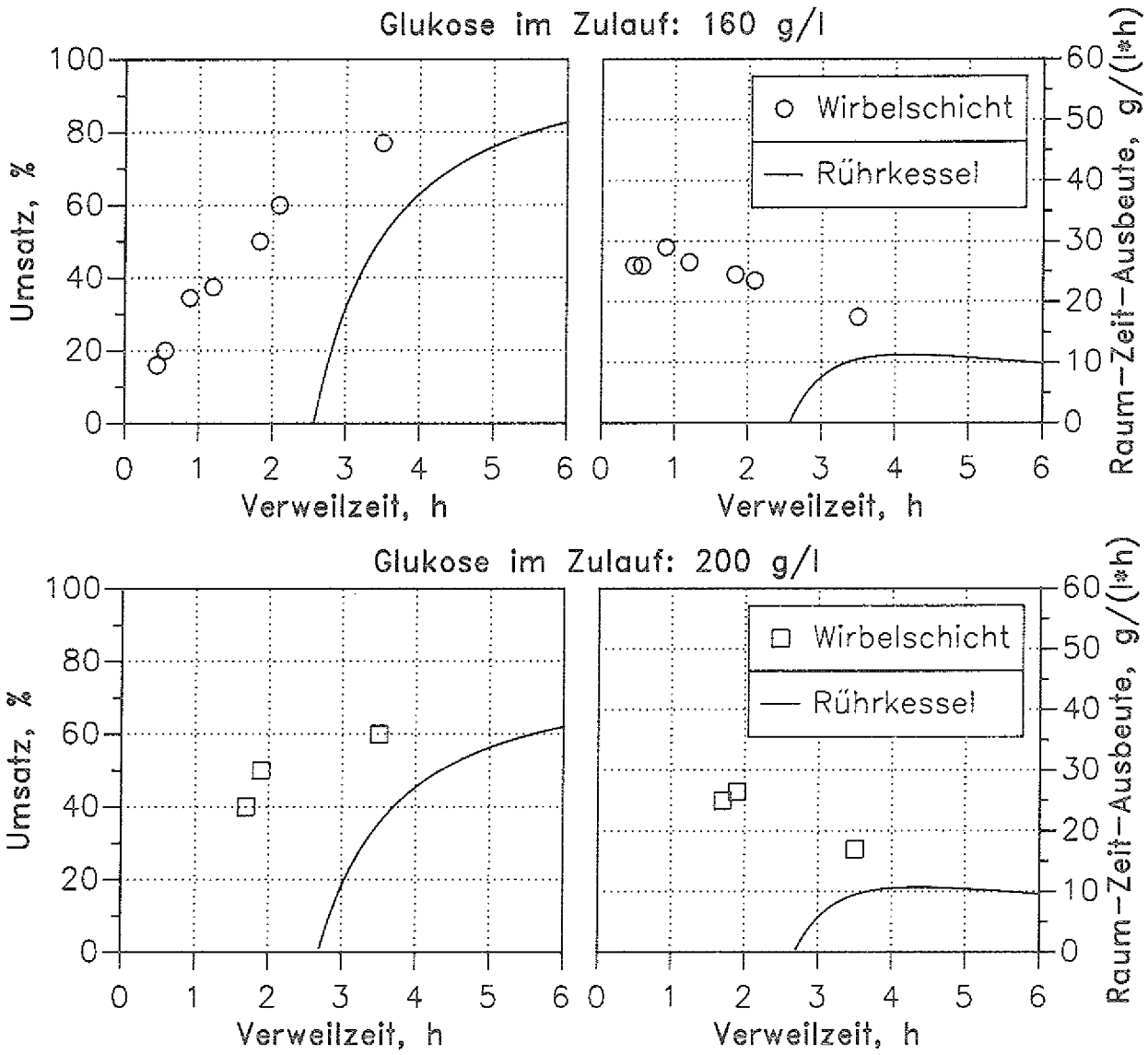


Abb. 6.15: Stationäre Daten Ethanolfermentation im Labor-Wirbelschichtreaktor bei Zulauf-Glukosekonzentrationen von 160 g/l und 200 g/l

Dies könnte auf Inhomogenitäten im Wirbelschichtreaktor hindeuten. Zum einen verändert sich das Verweilzeitverhalten hin zu kürzeren Verweilzeiten, die Umlaufzahl wird geringer, der Reaktor operiert ab einer bestimmten Umlaufzahl nicht mehr unter Auslaufbedingungen. Ein solcher Effekt ist jedoch nicht schon bei einer Verweilzeit von 1 Stunde zu erwarten, wie die Messung der Verweilzeitverteilung ergeben hat (siehe Abschnitt 5.3.2).

Zum anderen sind hohe Raum-Zeit-Ausbeuten mit hohen Gasproduktionen verbunden, so daß sich die Hydrodynamik im Wirbelschichtreaktor verändern kann. Ein weiterer Effekt könnte der Gasanteil in der Wirbelschicht darstellen, der mit zunehmender Raum-Zeit-Ausbeute zunimmt und damit die reale Verweilzeit der flüssigen Phase im Wirbelschichtreaktor verkürzt (Bestimmung des Gasanteils im Wirbelschichtreaktor siehe Abschnitt 6.3.3).

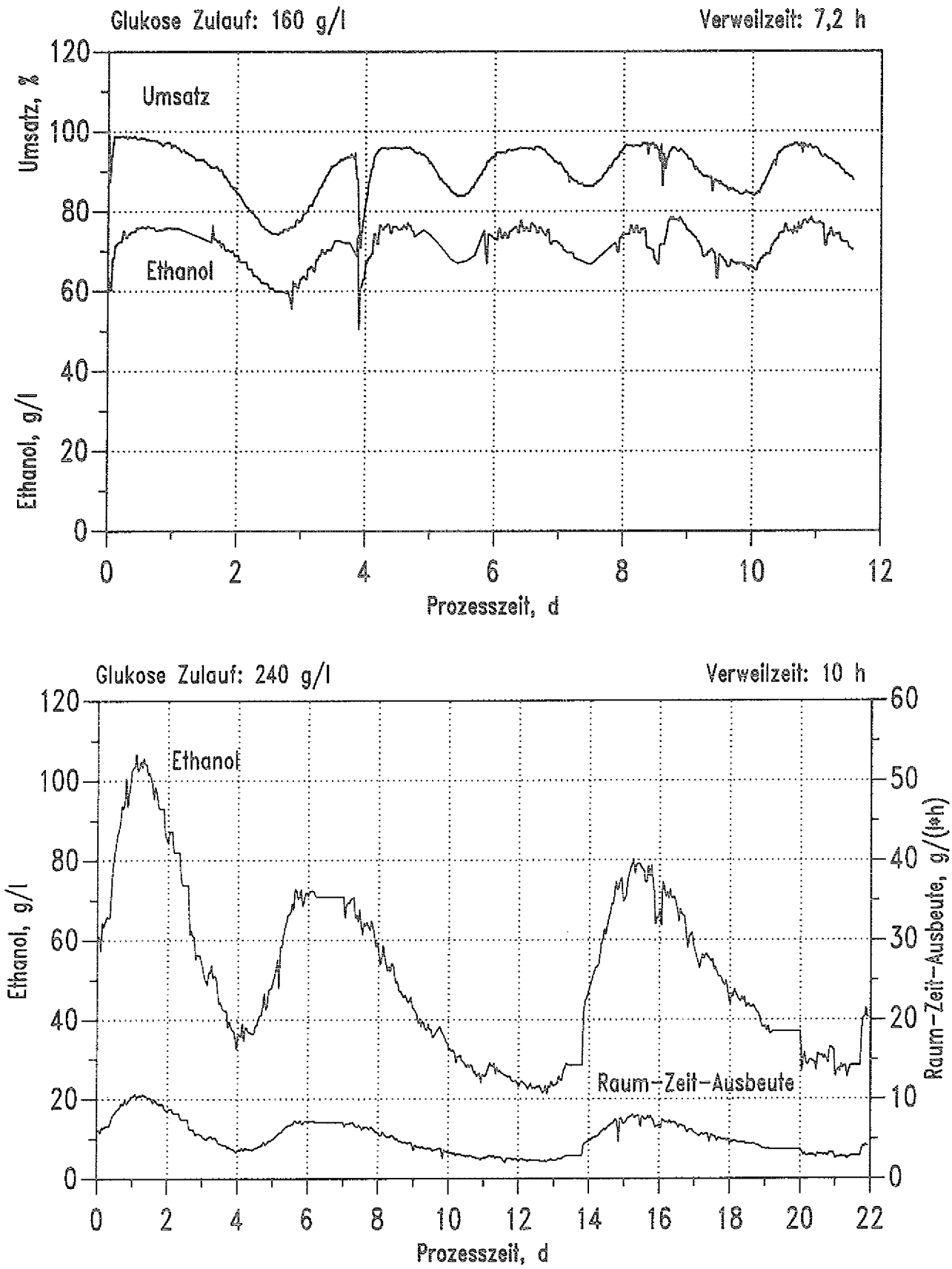


Abb. 6.16: Oszillationen im Wirbelschichtreaktor bei hohen Zulauf-Glukosekonzentrationen

Bei Zulauf-Glukosekonzentrationen von mehr als 140 g/l kommt es bei langen Verweilzeiten zu dauerhaften Oszillationen der Glukose- und Ethanolkonzentrationen im Wirbelschichtreaktor (siehe Abbildung 6.16). Bei diesen Glukosekonzentrationen im Zulauf ist auch im Wirbelschichtreaktor wie im Chemostaten kein stationärer Betriebspunkt bei hohen Umsätzen zu erzielen (siehe Abschnitt 6.1.1). Zum Beispiel oszilliert bei einer Zulauf-Glukosekonzentration von 160 g/l und einer Verweilzeit von 7,2 Stunden die Ethanolkonzentration zwischen 66 und 77 g/l mit einer Frequenz von etwa 2,5 Tagen. Entsprechend schwingt dabei der Umsatz zwischen 85 und 95 %.
Die höchste Ethanolkonzentration wurde beim Wechsel von einer Zulauf-Glukosekonzentration von 160 g/l auf 240 g/l beobachtet. Hier stieg die Ethanolkonzentration kurzzeitig auf über 100 g/l. Bei dieser Zulaufkonzentration und einer Verweilzeit von 10 h oszillieren die Konzentrationen mit einer Frequenz von 8 Tagen (siehe Abb. 6.16).

Das oszillatorische Verhalten von *Zymomonas mobilis* Kulturen bei hohen Ethanolkonzentrationen wurde bereits im Chemostaten beobachtet und beschrieben (JÖBSES et al. 1986, GHOMMIDH et al. 1989). Prinzipiell können Oszillationen auftreten, wenn der inhibierende Einfluß des Produkts zeitverzögert auftritt, die Ethanolproduktion also zunächst weiterläuft, obwohl eigentlich schon toxische Bedingungen vorliegen. Durch die kontinuierliche Betriebsweise werden solche 'überkritischen' Ethanolkonzentrationen wieder aus dem Reaktor ausgewaschen. Damit wird den Mikroorganismen die Möglichkeit verschafft, sich zu regenerieren. Mit der Zunahme der metabolischen Aktivität steigt die Ethanolkonzentration erneut an, die nächste Periode beginnt.

6.2.3 Kaskadierung von 2 Wirbelschichtreaktoren

Reaktionstechnisch besonders wichtig ist der Zusammenhang zwischen erzielter volumetrischer Leistung und dem Umsatz, wenn wie im Fall der Ethanolfermentation die Substratkosten die Wirtschaftlichkeit stark beeinflussen, also hohe Umsätze gefordert sind.

Die im Wirbelschichtreaktor erzielten stationären Ergebnisse zeigen, daß das Maximum der Raum-Zeit-Ausbeute mit zunehmender Zulauf-Glukosekonzentration zu immer niedrigeren Umsätzen verschoben wird (siehe Abbildung 6.17). Es hat also weder unter dem Aspekt der Erzielung hoher Raum-Zeit-Ausbeuten, noch unter dem Aspekt der vollständigen Umsetzung Sinn, höhere Zulauf-Glukosekonzentrationen als 120 g/l einzusetzen.

Bei einem Umsatz von 99 % beträgt die Raum-Zeit-Ausbeute im Wirbelschichtreaktor bei einer Zulauf-Glukosekonzentration von 120 g/l nur noch 15 g/(l*h). Damit ist die Raum-Zeit-Ausbeute im Wirbelschichtreaktor gegenüber dem Chemostaten lediglich knapp verdoppelt. Die im Wirbelschichtreaktor akkumulierte Biomasse, etwa 10-fach aufkonzentriert gegenüber dem Chemostaten, wird also nur zum geringen Teil genutzt.

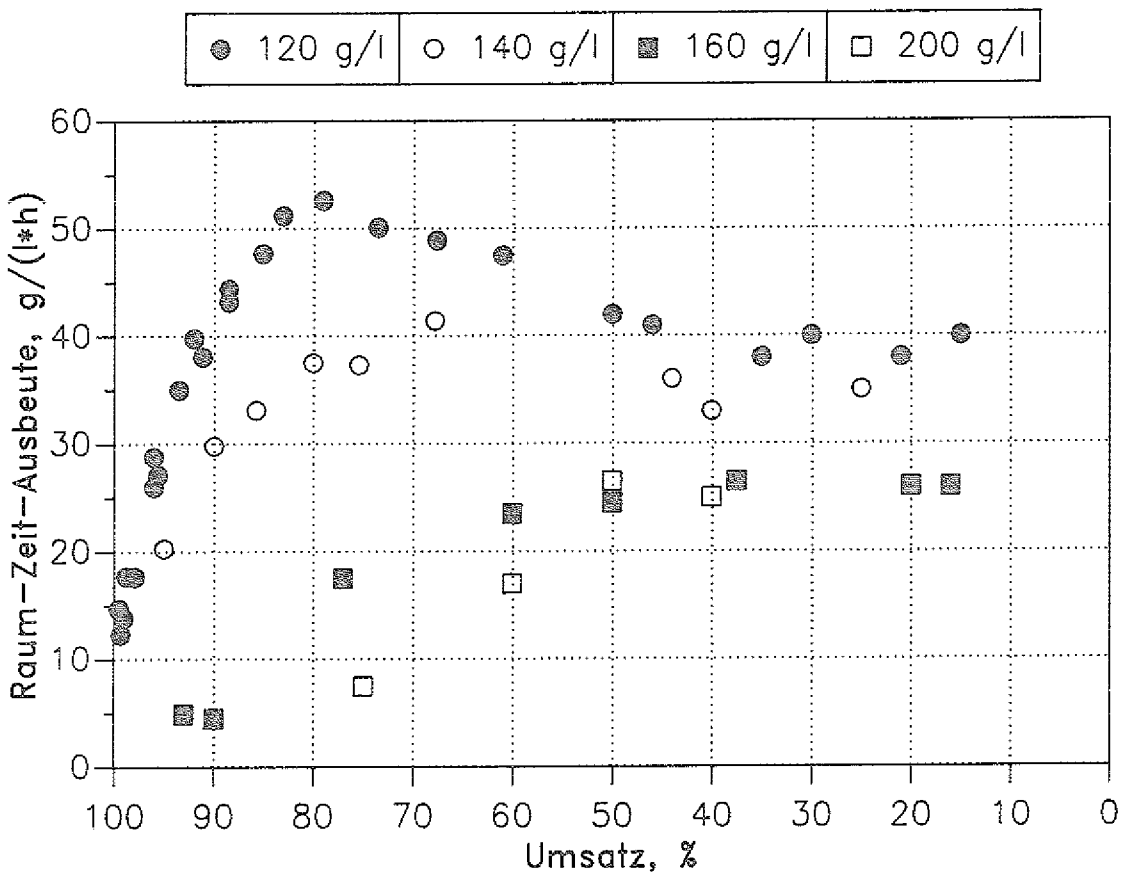


Abb. 6.17: Stationäre Daten Ethanolfermentation im Labor-Wirbelschichtreaktor, Raum-Zeit-Ausbeute über Umsatz bei verschiedenen Zulauf-Glukosekonzentrationen

Im Chemostaten ist aufgrund des niedrigen Ks-Wertes für Glukose keine Abnahme der Raum-Zeit-Ausbeute bis hin zu einem Umsatz von 98 % zu beobachten. Die Reaktionsgeschwindigkeit im Chemostaten ist bis zu diesem Umsatz quasi unabhängig von der Substratkonzentration im Reaktor, es liegt also praktisch eine Reaktion nullter Ordnung vor (siehe Abbildung 6.18).

Dies ist zunächst erstaunlich, da mit zunehmendem Umsatz, also auch zunehmender Ethanolkonzentration im Reaktor die spezifische Produktbildungsgeschwindigkeit aufgrund der festgestellten starken Produktinhibierung abnimmt. Der Abnahme der spezifischen Aktivität mit zunehmendem Umsatz steht jedoch eine Zunahme der stationären Biomassekonzentration im Reaktor entgegen, so daß sich beide Effekte bis hin zu einem Umsatz von 98% kompensieren (siehe Abbildung 6.19).

Liegt wie im Fall des Wirbelschichtreaktors keine Reaktion nullter Ordnung mehr vor - dies ist der Fall, wenn die Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration abhängig ist - so wird zur Erzielung hoher Raum-Zeit-Ausbeute und hohem Umsatz ein Strömungsrohr reaktionstechnisch günstiger (WANDREY 1984). Eine erste Annäherung an ein Strömungsrohr stellt die Kaskadierung zweier Reaktoren dar, die jeweils unter Auslaufbedingungen betrieben werden.

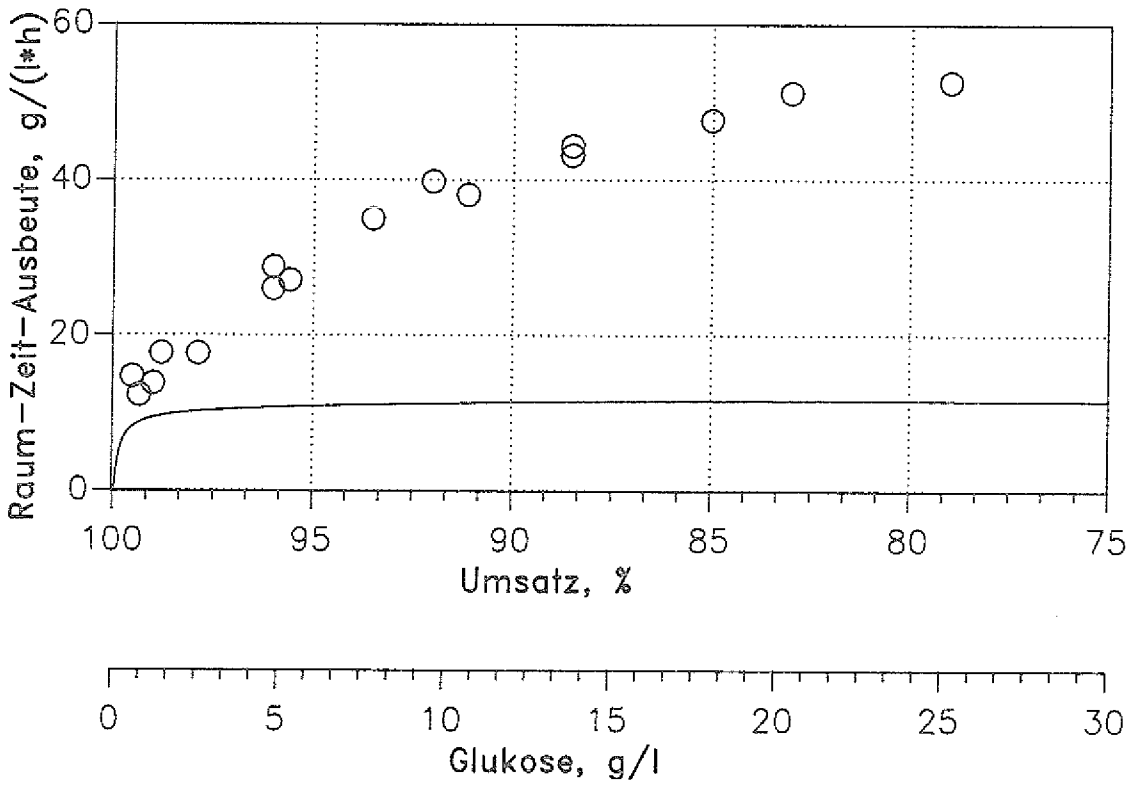


Abb. 6.18: Stationäre Raum-Zeit-Ausbeuten über Umsatz; Vergleich Chemostat, Wirbelschichtreaktor (Cs_0 = 120 g/l)

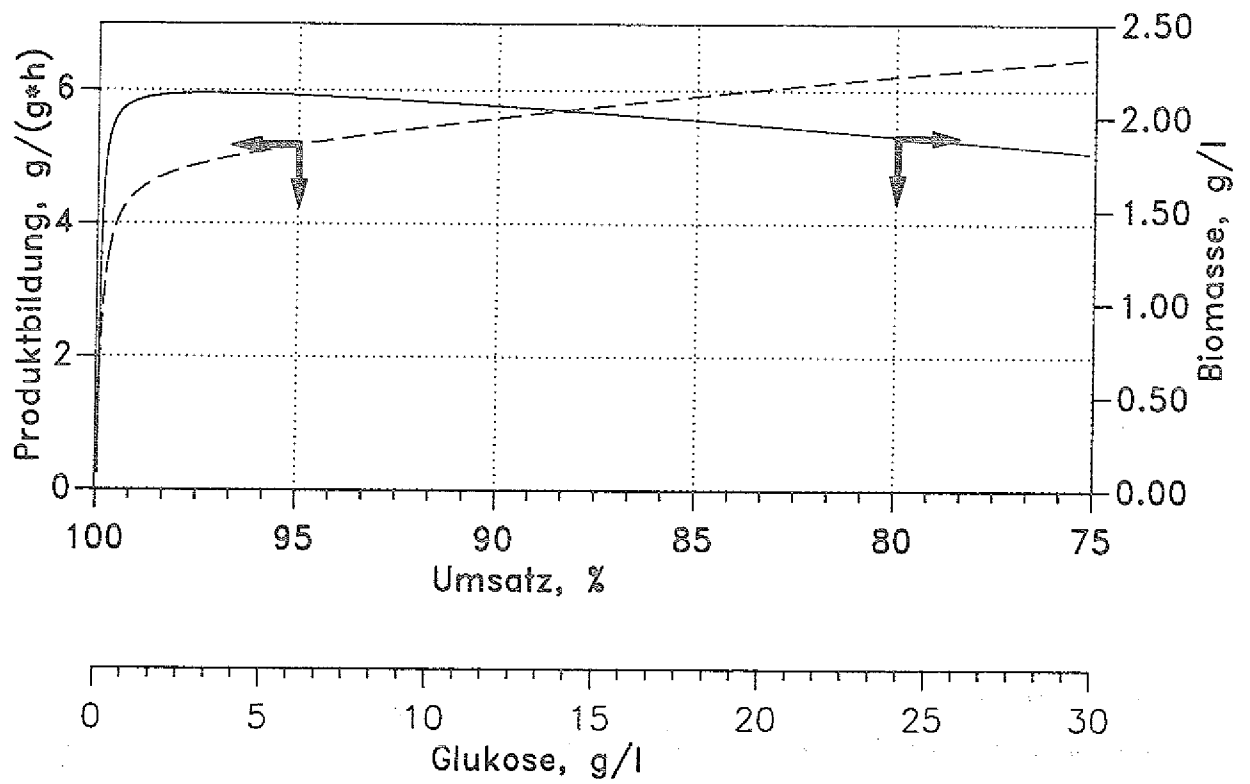


Abb. 6.19: Spezifische Produktbildungsgeschwindigkeit und stationäre Biomassekonzentration im Chemostaten über Umsatz, Modell siehe Abschnitt 6.1.1 (Cs_0 = 120 g/l)

Wie in Abbildung 6.20 gezeigt, läßt sich durch diese Kaskadierung von zwei gleichgroßen Wirbelschichtreaktoren das Profil der Raum-Zeit-Ausbeute in Abhängigkeit des Umsatzes im Vergleich zum einzelnen Wirbelschichtreaktor drastisch verändern: Die Raum-Zeit-Ausbeute ist bei der Kaskadierung bis hin zu einem Umsatz von 99 % (bei einer Zulauf-Glukosekonzentration von 120 g/l) unabhängig von der Glukosekonzentration im Ablauf des 2. Wirbelschichtreaktors. Mit dieser Reaktorkonfiguration sind bei 99 % Umsatz Raum-Zeit-Ausbeuten von über 30 g/(l*h) erreichbar, was einer Steigerung gegenüber dem Chemostaten um den Faktor 3,5 und gegenüber dem einzelnen Wirbelschichtreaktor um den Faktor 2 entspricht.

Der erste Wirbelschichtreaktor, der 'Leistungsreaktor' wird am günstigsten bei maximaler Raum-Zeit-Ausbeute, also im Fall einer Zulauf-Glukosekonzentration von 120 g/l bei einem Umsatz von 80 % betrieben, während die restlichen 20 % im zweiten Wirbelschichtreaktor, dem 'Umsatzreaktor' umgesetzt werden. Dabei werden die suspendierten *Zymomonas mobilis* Zellen aus dem ersten Wirbelschichtreaktor noch zusätzlich in den zweiten Reaktor eingetragen, was die Gesamtaktivität im 2. Wirbelschichtreaktor weiter erhöht. Eine Anpassung an gewünschte Umsätze ist über eine Optimierung des Volumens des 'Umsatzreaktors' möglich.

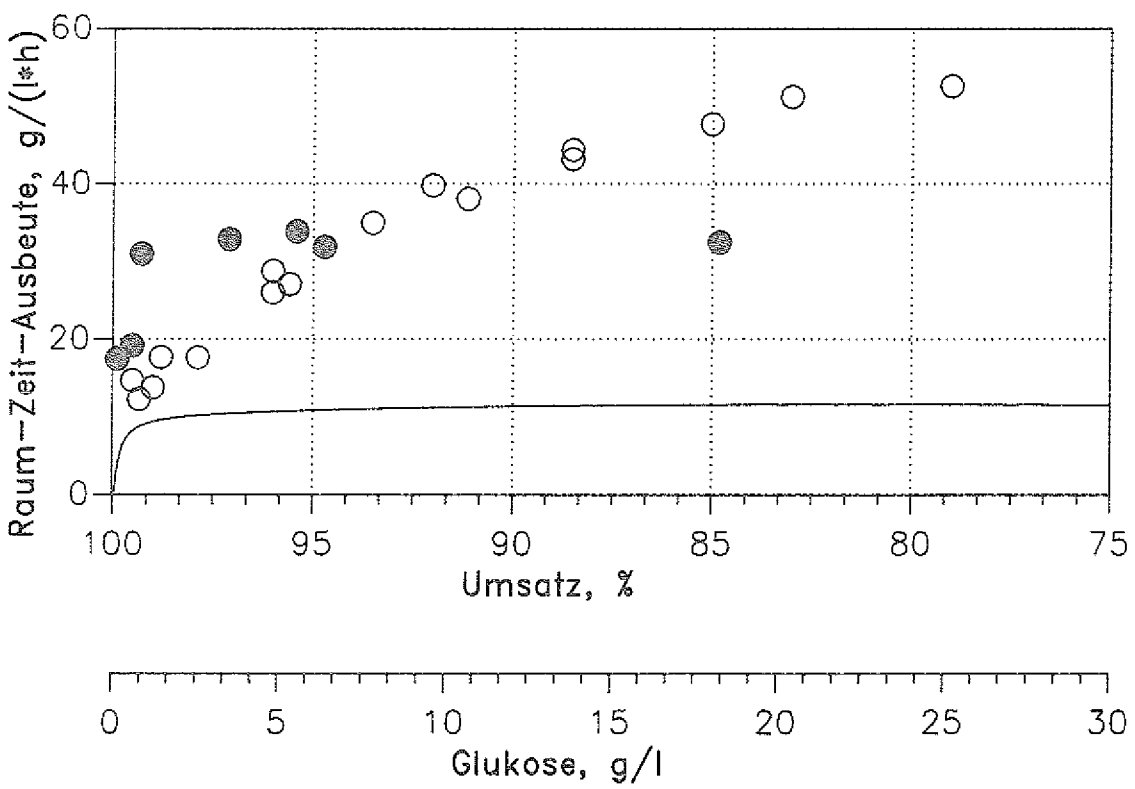


Abb. 6.20: Stationäre Raum-Zeit-Ausbeuten über Umsatz;
Vergleich Chemostat, Wirbelschichtreaktor, Wirbelschichtkaskade (C_{s0} = 120 g/l)
(Meßwerte Wirbelschichtkaskade KÖPCSENYI 1990)

6.2.4 Aktivität von immobilisierten *Zymomonas mobilis* Bakterien

Bei der Aufkonzentrierung von Mikroorganismen zu hohen lokalen Zelldichten, wie sie bei der Immobilisierung in offenporigem Sinterglas auftreten, kann es zu Transportlimitierungen kommen (VOS et al. 1990; PHILLIPS/POON 1988).
Zur Beschreibung der intrapartikulären Diffusion wird der Wirkungsgrad $\cap$ über dem Thiele-Modul Ø aufgetragen (siehe Abschnitt 3.4), wobei die Funktion $\cap(Ø)$ nur für Reaktionen nullter und erster Ordnung explizit zu formulieren ist.
Die Reaktionsgeschwindigkeiten mikrobieller Umsetzungen liegen im allgemeinen zwischen nullter und erster Ordnung, so daß für den Fall einer Sättigungskinetik (Michaelis Menten) empirische Lösungen angegeben werden, die eine Kombination des Wirkungsgrads nullter und erster Ordnung darstellen (KOBAYASHI et al. 1976).

Bei der Ethanolfermentation mit *Zymomonas mobilis* wird die Reaktionsgeschwindigkeit außerhalb des substratlimitierenden Bereiches, der aufgrund des niedrigen Ks-Wertes für Glukose von 0,133 g/l auf sehr niedrige Glukosekonzentrationen begrenzt ist, primär von der Ethanolkonzentration bestimmt (siehe Abschnitt 6.1.1). Für die vorliegende Inhibierungskinetik gibt es weder eine explizite noch empirische Lösung der Funktion $\cap(Ø)$, noch läßt sich der Thiele-Modul angeben.

Zur Veranschaulichung der komplexen Zusammenhänge soll die intrapartikuläre Diffusion ohne Ethanol-Konzentrationsprofil im Katalysatorpartikel und für eine Reaktion Nullter Ordnung abgeschätzt werden. Desweiteren soll vorausgesetzt werden, daß die Poren des Katalysatorpartikels als homogen betrachtet werden können, also keine CO_2-Gasblasen in den Poren gebildet werden.

Unter diesen Voraussetzungen ergibt sich für den Thiele-Modul (YAMANE 1981):

$$Ø_0 = R * (k_0 / (D_{e,s} * C_{s,R}))^{0.5}$$

wobei die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion aus dem Grenzübergang des kinetischen Ansatzes für *Zymomonas mobilis* $C_s >> Ks$ folgt (PHILLIPS/POON 1988):

$$k_0 = v_{max} = \mu_{max}/Y_{xs,max} * (1-C_p/C_{p,max})^n$$

Die spezifische Reaktionsgeschwindigkeit muß noch auf den Träger bezogen werden, weshalb mit der Biomassekonzentration in den Poren des Trägers $C_{x,P}$ und der Porosität des Trägers $\in$ multipliziert werden muß. Damit läßt sich der Thiele Modul wie folgt formulieren:

$$Ø_0 = R * (((\mu_{max} * (1-C_{p,R}/C_{p,max})^n)/(Y_{xs,max} * C_{x,P} * \in * D_{e,s} * C_{s,R}))^{0.5} \qquad 6.4$$

Der hier formulierte Thiele-Modul ist nicht nur von der Glukosekonzentration in der Bulk-Phase abhängig, sondern zusätzlich noch von der Ethanolkonzentration!
Bei Kenntnis des effektiven Diffusionskoeffizienten für Glukose $D_{e,s}$, des Radius des Katalysatorteilchens R und der Biomassekonzentration in den Poren $C_{x,P}$ läßt sich zu jedem stationärem Zustand im Wirbelschichtreaktor ($C_{s,R}$, $C_{p,R}$) der zugehörige Thiele-Modul und der entsprechende Wirkungsgrad berechnen.

Hierbei ist es sinnvoll, mit einem mittleren Partikelradius R zu rechnen. STRIEGEL (1989) ermittelte für das verwendete Sinterglasmaterial einen 'hydrodynamisch äquivalenten Radius' von 0.675 mm, der hier in erster Näherung als mittlerer Radius angenommen wird. Der 'hydrodynamisch äquivalente Radius' ist der Partikelradius, mit dem Sinterglasträger in der Wirbelschicht dasselbe Verhalten zeigen, wie die eingesetzten heterodispersen Sinterglasträger mit einem Radius von 0,5 - 1,0 mm.

Der effektive Diffusionskoeffizient für die Diffusion in Zellaggregaten hängt stark von der Zelldichte ab (MONBOUQUETTE/OLLIS 1986). Daneben hat die Morphologie der immobilisierten Zellen und das Alter des Zellaggregats einen Einfluß auf den effektiven Diffusionskoeffizienten. FAN et al. (1990) geben eine empirische Beziehung für effektive Diffusionskoeffizienten von Substraten in Abhängigkeit der Zelldichte eines Zellaggregats an, die über Literaturwerte und eigene Messungen ermittelt wurde:

$$D_{e,i}/D_{iw} = 1 - 0.43*C_{x,P}^{0.92}/(11.19 + 0.27*C_{x,P}^{0.99})$$

wobei D_{iw} der Diffusionskoeffizient des jeweiligen Substrats in Wasser bei der entsprechenden Bulk-Konzentration und Temperatur darstellt.

Die Konzentration der Biomasse im Zellaggregat $C_{x,p}$ läßt sich über die gemessenen Beladungsdichten und die Porosität des verwendeten Sinterglasmaterials bestimmen. Der Wert, der maximal erreichbar ist, entspricht der Sedimentationsdichte von Bakterien nach der Zentrifugenmethode und beträgt 170 g BTM/l (AIVASIDIS 1989). Aus den gemessenen, maximalen Beladungsdichten der mit *Zymomonas mobilis* Bakterien kolonisierten Sinterglaskörper ergeben sich jedoch nur Konzentrationen von 123 bis 138 g/l, so daß sich der normierte, effektive Diffusionkoeffizient zwischen den folgenden Werten bewegt (homogene Verteilung der Biomasse in den Poren vorausgesetzt):

$$D_{e,i}/D_{iw} = 0{,}12 - 0{,}16$$

Für die Diffusionskoeffizienten von Glukose und Ethanol in Wasser werden angegeben (D'ANS-LAX 1967):

	D_{iw}, m^2/s	T, °C	C_i, g/l
Glukose	$0.67*10^{-9}$	25	75
Ethanol	$1.11*10^{-9}$	25	50

Tab. 6.5: Diffusionskoeffizienten in Wasser (D'ANS-LAX 1967).

In der Tabelle 6.6 sind die Werte der Konstanten der Gleichung 6.4 zusammengestellt, wobei der effektive Diffusionskoeffizient für Glukose bei der höchst möglichen Biomassekonzentration (170 g/l) ermittelt wurde. Dadurch wird eine inhomogene Verteilung der Biomasse im Träger berücksichtigt, da im äußeren Bereich des Trägers die Biomassekonzentration höher sein kann, als im Innenbereich.

Größe	Einheit	Wert	
$D_{e,s}$	m^2/s	$0.77*10^{-10}$	
μ_{max}	1/s	$0.148*10^{-3}$	
n	-	0.470	
$Y_{xs,max}$	g/g	0.023	
$C_{p,max}$	g/l	72	(JÖBSES 1985)
R	m	$0.675*10^{-3}$	(STRIEGEL 1989)
$C_{x,P}$	g/l	170	(AIVASIDIS 1989)
$\in$	-	0.55	(Herstellerangaben)

Tab. 6.6: Konstanten der Bestimmungsgleichung für den Thiele-Modul

Bei Kenntnis des Thiele-Moduls läßt sich der Wirkungsgrad $\cap$ implizit bestimmen (YAMANE 1981):

$$1/Ø^2 = 1/6 * (1-(1-\cap)^{1/3})^2 * (2*(1-\cap)^{1/3}+1) \qquad 6.5$$

Unter der Annahme, daß keine extrapartikulären Transporthemmungen auftreten ($C_{s,R} = C_{s,B}$) und der Wirbelschichtreaktor unter Auslaufbedingungen betrieben wird, läßt sich der Thiele-Modul und der Wirkungsgrad für verschiedene Zulauf-Glukosekonzentrationen über dem Umsatz darstellen (siehe Abbildung 6.21).

Bei diesem Ansatz zur Beschreibung des intrapartikulären Transports ist der Wirkungsgrad der Immobilisierung von *Zymomonas mobilis* in offenporigen Sinterglaskugeln bei hohen Umsätzen stark von der Zulauf-Glukosekonzentration abhängig. Dies spiegelt den Einfluß der Produktinhibierung wieder, da wie oben angemerkt der Thiele-Modul nicht nur wie bei Reaktionen nullter Ordnung üblich von der Substratkonzentration beeinflußt wird, sondern auch von der Produktkonzentration. Deshalb geht der Wirkungsgrad bei hohen Ethanolkonzentrationen gegen 1, da dann die Reaktionsgeschwindigkeit so stark verlangsamt ist, daß keine Diffusionslimitierung mehr vorliegt. Umgekehrt fallen die Wirkungsgrade bei den niedrigeren Glukose-Zulaufkonzentrationen bei hohen Umsätzen noch weiter ab, da mit zunehmend geringerer Bulk-konzentration an Substrat der Anteil an Biomasse im Inneren der Sinterglaskugel anwächst, der nicht mehr mit Substrat versorgt werden

kann. Der Beginn des Abfallens der Wirkungsgradkurve zeigt an, ab welchem Umsatz die Substratkonzentration im Inneren der Sinterglaskugel auf Null gefallen ist.

Der intrapartikuläre Wirkungsgrad der Immobilisierung von *Zymomonas mobilis* in offenporigen Sinterglaskugeln erreicht unter nicht produktinhibierenden Bedingungen lediglich Werte von rund 30 - 50 %. Das bedeutet, die Aktivität der immobilisierten Biomasse wird nur zu einem Drittel bis maximal der Hälfte genutzt. Daher müßte der Radius der Sinterglaskugeln verringert werden, um das Reaktorvolumen effektiver zu nutzen (siehe Gleichung 6.4). Grenzbedingung wäre ein Thiele-Modul kleiner 1 (siehe Abschnitt 3.4), was mit den Reaktionsgeschwindigkeiten von *Zymomonas mobilis* unter nichtproduktinhibierten Bedingungen und dem abgeschätzten, effektiven Diffusionskoeffizienten von Glukose einen Radius der Sinterglaskörper von 0.1-0.2 mm erfordern würde.

Der gesamte Wirkungsgrad der Immobilisierung von *Zymomonas mobilis* im Wirbelschichtreaktor (intrapartikulärer Transport, extrapartikulärer Transport, Inhomogenitäten im Reaktor) läßt sich anhand der ermittelten stationären Daten durch eine einfache Massenbilanz bezüglich des Substrats bestimmen. Hierbei wird der Anteil der suspendierten Biomasse im Wirbelschichtreaktor vernachlässigt. Durch Umstellen der Bilanzgleichung 3.13b nach der Biomassekonzentration und Division durch die mittlere, maximal gemessene Beladungsdichte des Trägers umgerechnet auf das Reaktortotalvolumen (25 g/l) ergibt sich für den 'gemessenen Wirkungsgrad':

$$(C_{s0}-C_s)/\tau = q_s{}^*C_x \qquad 3.13b$$

$$\cap_{gem} = C_x/C_{x,fix,max} = (C_{s0}-C_s)/(\tau^* q_s{}^* C_{x,fix,max})$$

Zur Normierung wird die spezifische Substrataufnahmegeschwindigkeit mit dem vollständigen kinetische Ansatz (Gleichung 3.7 und 3.11) berechnet, um den (gemessenen) Wirkungsgrad in Abhängigkeit des Umsatzes darzustellen. Für eine Zulauf-Glukosekonzentration von 120 g/l ist der 'gemessene summarische Wirkungsgrad' mit dem berechneten intrapartikuläre Wirkungsgrad verglichen (siehe Abb. 6.22).

Bei Umsätzen über 80 % zeigt sich trotz der vielen Vereinfachungen bei der Berechnung des Thiele-Moduls eine gute Übereinstimmung zwischen Modell und Messung. In diesem Bereich ist die Umsetzungsgeschwindigkeit im Wirbelschichtreaktor also durch den intrapartikulären Transport bestimmt. Unterhalb von 80 % Umsatz zeigen sich zunehmende Differenzen zwischen gemessenen und berechneten Wirkungsgrad.

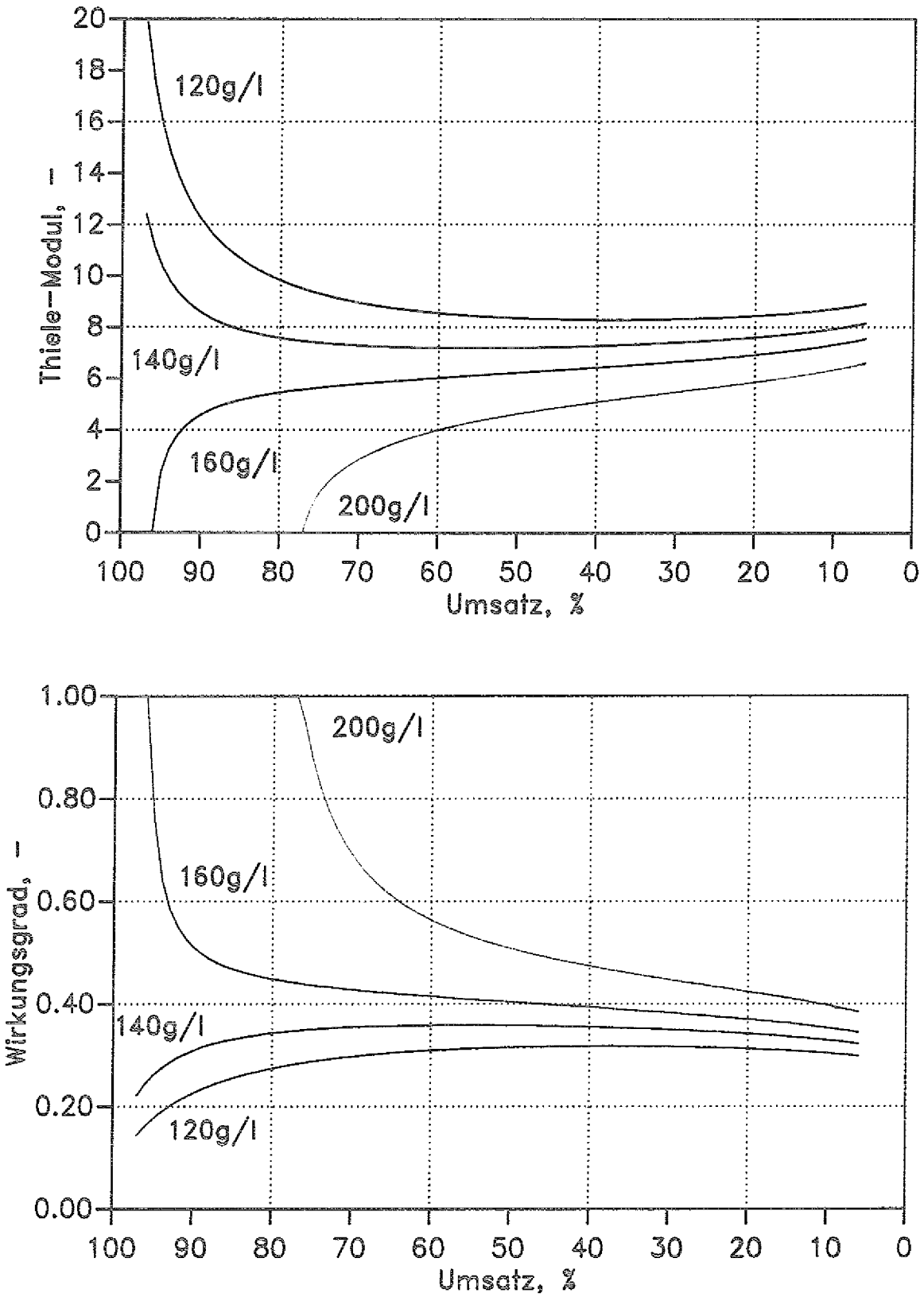


Abb. 6.21: Intrapartikulärer Thiele-Modul und Wirkungsgrad für verschiedene Zulauf-Glukosekonzentrationen, *Zymomonas mobilis* immobilisiert in Sinterglaskugeln (R = 0.675 mm).

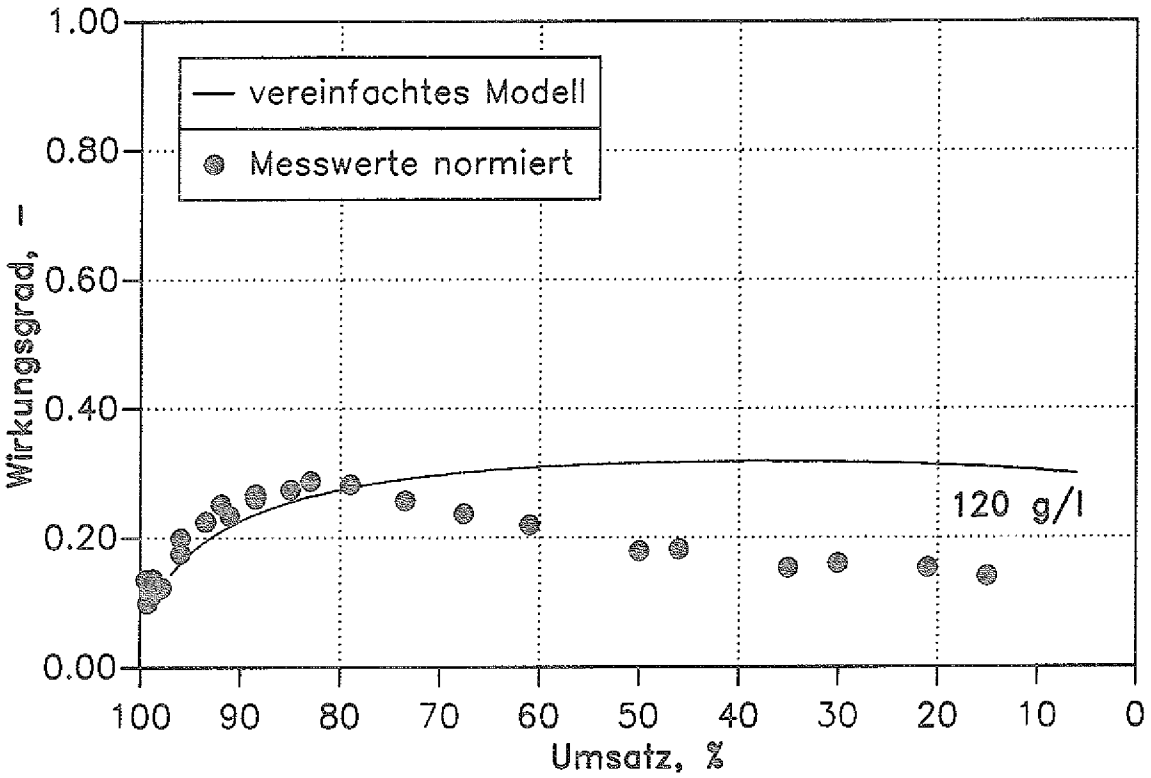


Abb. 6.22: Gemessener summarischer und modellierter intrapartikulärer Wirkungsgrad über dem Umsatz (Cs0 = 120 g/l).

Die 'gemessenen Wirkungsgrade' der anderen untersuchten stationären Zustände zeigen ähnliche Abweichungen (siehe Abb. 6.23). Nur bei hohen Umsätzen ist eine Beschreibung über den intrapartikulären Transport möglich. Das Profil des Verlaufes der jeweiligen Wirkungsgrade über dem Umsatz ist identisch mit dem erwarteten Verlauf. Bei Umsätzen unter 80% sind die summarischen 'gemessenen Wirkungsgrade' zwar in etwa unabhängig von der Zulauf-Glukosekonzentration, aber sie liegen mit rund 15 % bedeutend unter den erwarteten Werten von etwa 40%.

Diese Abweichung tritt bei 120 und 140 g/l Glukose im Zulauf unterhalb einer Stunde Verweilzeit auf, so daß Inhomogenitäten in der Bulk-Phase des Wirbelschichtreaktors dafür verantwortlich sein könnten.

Die Messungen zur Verweilzeitverteilung im Labor-Wirbelschichtreaktor wurden im 2-Phasen Wirbelbett bei 1/2 Stunde Verweilzeit durchgeführt. Dabei wurde ideales Rührkesselverhalten festgestellt (siehe Abschnitt 5.3.2). Dennoch könnte die starke Gasproduktion im realen Betrieb des Wirbelschichtreaktors eine Veränderung der Verweilzeitverteilung der flüssigen Phase bewirken, so daß dies eine mögliche Ursache der Erniedrigung des Gesamt-Wirkungsgrades darstellen könnte.

Dem widerspricht der Befund, daß auch bei den höheren Glukose-Zulaufkonzentrationen (160 g/l und 200 g/l) bei niedrigeren Umsätzen weitaus geringere Wirkungsgrade gemessen wurden, als sie nach dem stark vereinfachten Modellansatz zu erwarten wären.

Die Nichtberücksichtigung eines Ethanolkonzentrationsprofils im Sinterglaskörper ist die wahrscheinliche Ursache für diese Abweichung.

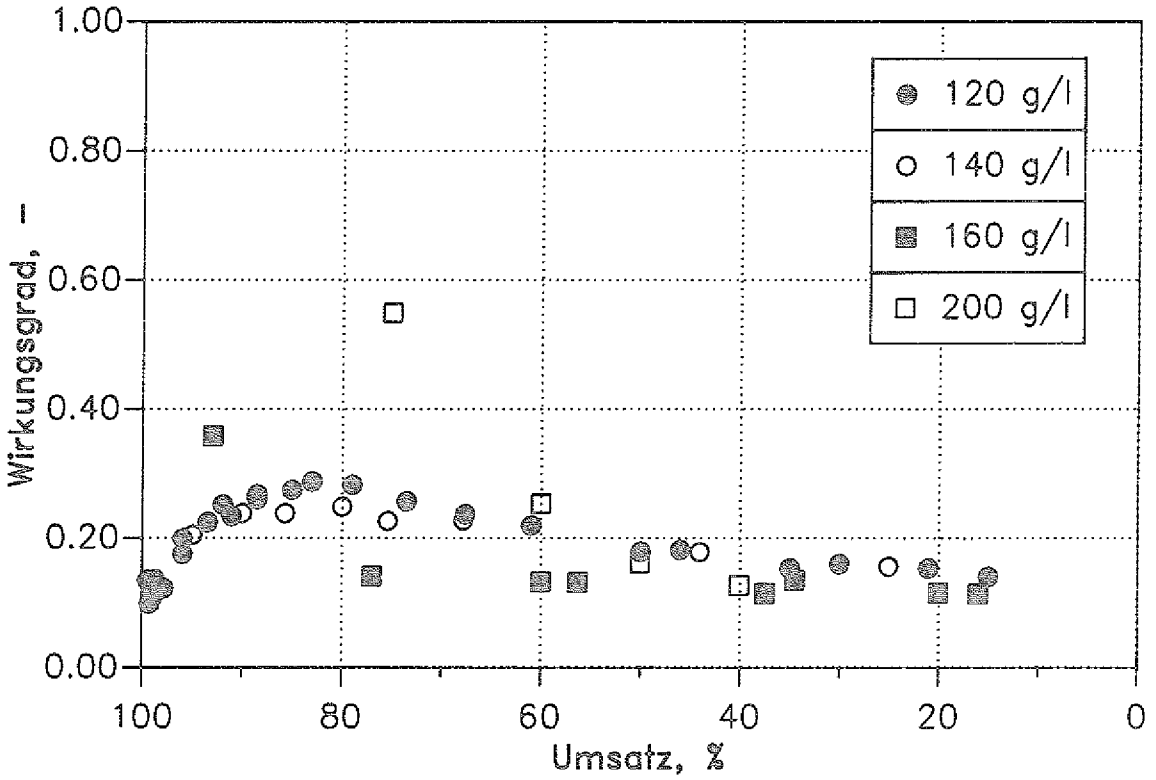


Abb. 6.23: Summarischer 'gemessener Wirkungsgrad' über Umsatz bei der Ethanolfermentation im Wirbelschichtreaktor

Die Abschätzung der Sherwood-zahl zur Beschreibung des extrapartikulären Transports in der Wirbelschicht mit offenporigen Sinterglaskugeln erfolgt nach Gleichung 3.17, die sich umgeformt folgendermaßen formulieren läßt:

$$Sh = 2 + 0.31 * 2*R * (g*(o_S-o_L)/(D_s*n))^{1/3}$$

Hierzu sind als Stoffdaten die dynamische Zähigkeit n und die Dichte o_L der Bulk-phase, sowie die Dichte des Trägers o_S erforderlich. Zähigkeit und Dichte der flüssigen Phase ändern sich je nach Betriebszustand, so daß als untere Grenze die Stoffdaten von Wasser bei 30 °C und als obere Grenze die Stoffdaten einer Glukoselösung von 100 g/l bei 30 °C eingesetzt werden. Die Dichte des Trägers berechnet sich aus der Porosität und der Dichte von Glas, wobei die Poren als vollständig mit der flüssigen Phase gefüllt angenommen werden. Die einzelnen Daten sind in der Tabelle 6.7 zusammengefaßt (D'ANS LAX 1967/ SONTHEIMER 1980):

Größe	Einheit	Wert
R	m	$0.675*10^{-3}$
g	m/s^2	9.81
o_S	kg/m^3	1765
o_L	kg/m^3	1000 - 1038
D_s	m^2/s	$0.67*10^{-9}$
n	kg/(m*s)	$0.7975 - 1.04 *10^{-3}$

Tab. 6.7: Konstanten der Bestimmungsgleichung für die Sherwood-zahl.

Damit liegt die Sherwood-zahl zwischen Sh = 95 für hohe Glukosekonzentrationen und Sh = 103 für Wasser als Medium. Das bedeutet, der Gesamt-Transportstrom liegt um 2 Zehnerpotenzen über dem diffusiven Anteil. Der extrapartikuläre Transport wird im allgemeinen ab Sherwood-zahlen größer als 10 als vernachlässigbar angesehen (KASCHE/BUCHHOLZ 1979).

6.3 Insterile Ethanolfermentationen in Labor- und Technikumswirbelschichtreaktoren

6.3.1 Fermentation von hydrolysierter B-Stärke im Labor-Wirbelschichtreaktor

Nach der sterilen Kolonisierung des Wirbelschichtreaktors mit *Zymomonas mobilis* Bakterien folgt die eigentliche Produktionsphase, die insteril verlaufen soll.
Dabei ist zum einen nach Prozeßbedingungen zu suchen, die einen stabilen, insterilen Dauerbetrieb gewährleisten, zum anderen sollen stationäre Betriebspunkte bei der Vergärung von hydrolysierter Abfallstärke im Wirbelschichtreaktor ermittelt werden, um Auslegungsdaten zu erhalten.

Das eingesetzte Abfallsubstrat ist ein Nebenprodukt der Herstellung von Glukose und Gluten aus Weizenmehl und enthält neben Reststärke alle übrigen Bestandteile des Weizenkorns, sowie die anfallenden Prozeßabwässer. Nach der enzymatischen Hydrolyse mit α-Amylase und Amyloglucosidase liegen 95 % der C-Quelle als Glukose vor (BRINGER/SWYZEN 1984). Der Rest sind Pentosen, die von *Zymomonas mobilis* nicht verwertet werden können. Neben Proteinen und Lipiden, jeweils rund 2-3 g/l, enthält das B-Stärkehydrolysat noch unterschiedliche Anteile an Feststoffen, wobei bis zu 20 g/l TM gemessen wurden. Das B-Stärkehydrolysat wurde zum jeweiligen Zeitpunkt aus dem Produktionsprozeß in der Zuckerfabrik entnommen und bei 4-5 °C im Kühlhaus gelagert. Die Analysenergebnisse (Nährsalze und ausgesuchte Spurenelemente) der einzelnen fermentierten B-Stärkehydrolysat-Chargen sind im Vergleich zum synthetischen Mineral-Medium, daß für die sterilen Versuche eingesetzt wurde, in Tabelle 6.8 dargestellt:

Medium:	Charge 1	Charge 2	Charge 3	Charge 4	**Mineral**
Glukose, g/l	135	120	150	133	120
NH_4^+-N, mg/l	233	93	133	22	420
P, mg/l	600	130	185	370	795
S, mg/l	70	154	220	336	130
Mg, mg/l	65	47	67	160	100
K, mg/l	58	340	485	108	1000
Fe, mg/l	0.2	1.2	1.7	0.5	2.2
Ca-pantothenat, mg/l	-	-	-	-	1
Biotin, mg/l	-	-	-	-	1
Proteine, mg/l	54	n.b.	3330	2160	-
pH	3.1	3.5	3.4	3.5	5.0

Tab. 6.8: Analyse der eingesetzten B-Stärkehydrolysatchargen.

Die Zusammensetzung der einzelnen Chargen ist demnach großen Schwankungen unterworfen, der NH_4^+-Stickstoffgehalt und der Fe^{2+}/Fe^{3+}-gehalt weichen bis zu einer Zehnerpotenz, der Proteingehalt sogar bis fast 2 Zehnerpotenzen voneinander ab. Weiterhin ist aus dem Vergleich mit dem synthetischen Mineralmedium ersichtlich, daß eine vollständige Fermentation von hydrolysierter B-Stärke ohne Supplementierung mit Nährsalzen nicht möglich ist (siehe auch BRINGER/SWYZEN 1984).
Da die einzelnen Messergebnisse jedoch nicht rechtzeitig zur Verfügung standen, wurden alle Chargen in der gekühlten Vorlage grundsätzlich mit einer festen Menge an Nährsalzen und Vitamin supplementiert, so daß keine Limitierungen auftreten konnten:

+1	g/l	$MgSO_4$*7 H_2O
+2	g/l	KH_2PO_4
+2	g/l	NH_4Cl
+1	mg/l	Ca-pantothenat
+0.1	ml/l	Antischaum (DEYHYSAN K969, Henkel)

Der pH-Wert wurde in der gekühlten Vorlage mit NaOH auf pH 5.0 hochtitriert.

Mit diesen 4 Chargen B-Stärkehydrolysat wurde ein Labor-Wirbelschichtreaktor 4 Monate lang insteril betrieben, nachdem die sterile Kolonisierungsphase abgeschlossen war (siehe Abschnitt 6.2.1). Damit gliedert sich dieser Versuchsverlauf entsprechend der Zulauf-Glukosekonzentration in 4 Prozeßabschnitte, wobei Charge 4 zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit von 133 g/l auf 120 g/l Glukose verdünnt wurde.

Bei der kontinuierlichen, insterilen Umsetzung der ersten Charge B-Stärkehydrolysat mit 135 g/l Glukose über einen Zeitraum von 30 Tagen wurden unterschiedliche Verweilzeiten im Wirbelschichtreaktor eingestellt, um Informationen über stationäre Betriebspunkte zu erhalten.
Beginnend bei einer Start-Verweilzeit von 1,5 h wurde diese zunächst sukzessive auf 5 Stunden verlängert und danach wieder sukzessive auf 1,5 Stunden verkürzt, wobei eine eingestellte Verweilzeit mindestens 48 Stunden gehalten wurde. Der Verlauf der Prozeßgrößen in diesem Versuchsabschnitt ist in Abbildung 6.24 wiedergegeben. Oben sind die dem System aufgeprägten Bedingungen (Zulauf-Glukosekonzentration und Verweilzeit) und darunter die Systemantworten (Umsatz, Raum-Zeit-Ausbeute, Konzentrationen an Produkt und Kontamonationsprodukt) dargestellt.

Während der sukzessiven Verlängerung der Verweilzeit nimmt die Laktatkonzentration im Wirbelschichtreaktor stetig zu, wobei die Laktatkonzentration in der Vorlage bereits zu 8-9 g/l bestimmt wurde. Die Laktatkonzentration im Wirbelschichtreaktor stieg in diesem Prozeßabschnitt auf knapp 20 g/l an, konnte danach aber bei wieder kürzeren Verweilzeiten auf etwa 15 g/l stabilisiert werden.

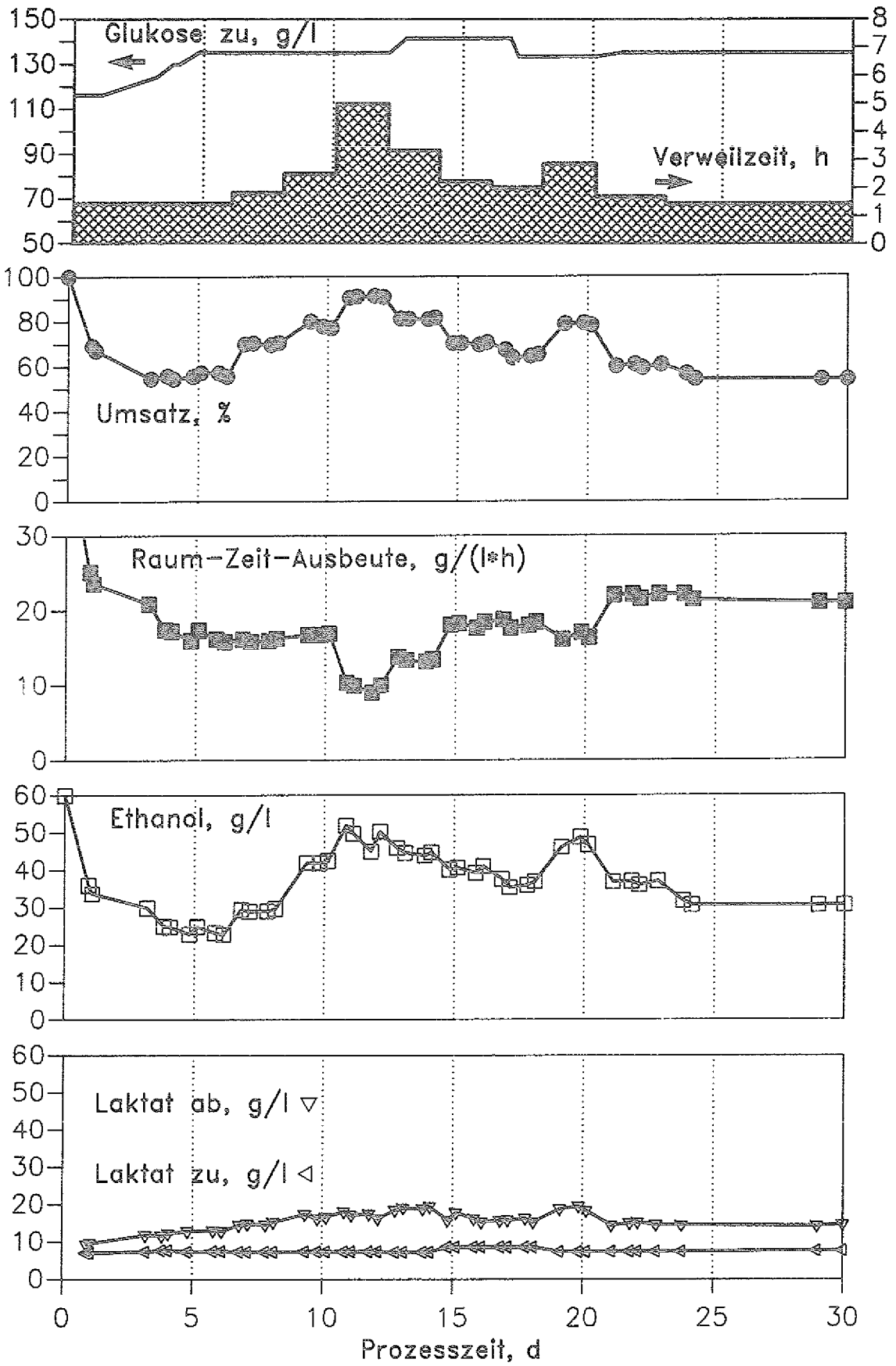


Abb. 6.24: Insterile Dauerfermentation von B-Stärkehydrolysat im Labor-Wirbelschichtreaktor (0-30 Tage)

Als Nebenprodukt der Ethanolgärung mit *Zymomonas mobilis* wird im insteril betriebenen Wirbelschichtreaktor lediglich noch Acetat registriert, wobei diese Nebenproduktbildung gegenüber den sterilen Fermentationen nur unwesentlich zugenommen hat. Acetoin und Acetaldehyd als weitere Nebenprodukte der sterilen Fermentation können bei der insterilen Ethanolgärung nicht mehr gefunden werden.

Vergleicht man die mit dieser Charge hydrolysierter B-Stärke ermittelten stationären Betriebsdaten mit den im definierten sterilen System ermittelten Daten, so ist eine drastische Leistungsverschlechterung festzustellen. Wird die verringerte Selektivität bei der insterilen Ethanolgärung berücksichtigt, die in dieser Prozeßphase 5 % beträgt, so lassen sich die im sterilen Wirbelschichtreaktor mit synthetischem Mineral-Medium ermittelten Leistungsdaten durch eine Halbierung der stationären Raum-Zeit-Ausbeute mit den insterilen Daten korrelieren (siehe Abbildung 6.25). Das bedeutet, die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Ethanolfermentation von hydrolysierter B-Stärke mit *Zymomonas mobilis* ist auf 50 % abgesunken.

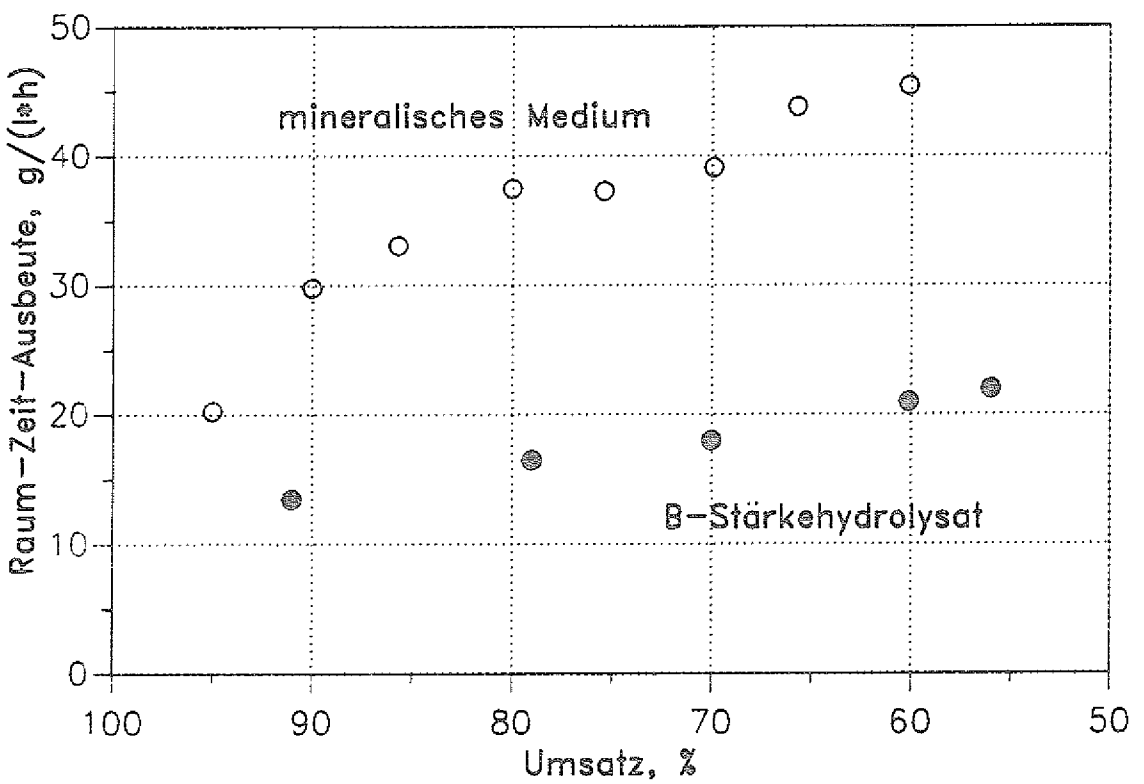


Abb. 6.25: Stationäre Betriebspunkte bei der Umsetzung von B-Stärkehydrolysat im Labor-Wirbelschichtreaktor, Vergleich mit synthetischem Medium

Die insterile Umsetzung der 2. Charge hydrolysierter B-Stärke mit *Zymomonas mobilis* im Wirbelschichtreaktor vom 30. bis zum 70. Prozeßtag und der 4. Charge vom 103. bis zum 116. Prozeßtag ist in Abbildung 6.26 dargestellt. Bei einer Zulauf-Glukosekonzentration von 120 g/l wurde nacheinander eine Verweilzeit von 2.9, 5.0 und 2.0 Stunden eingestellt und jeweils über mindestens 12 Tage konstant gehalten.

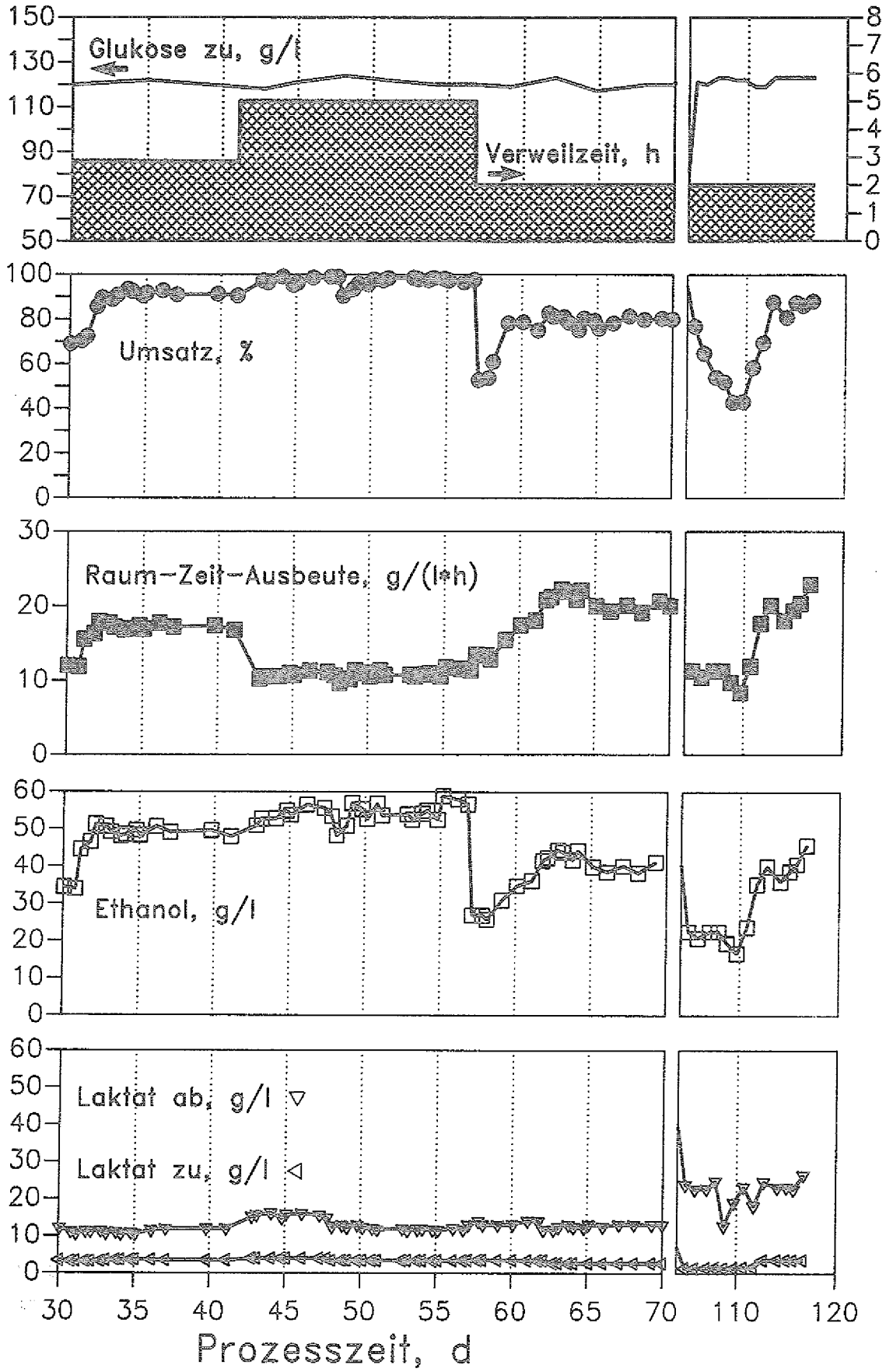


Abb. 6.26: Insterile Dauerfermentation von B-Stärkehydrolysat im Labor-Wirbelschichtreaktor (30-70, 103-116 Tage)

Die im Wirbelschichtreaktor gemessene Laktatkonzentration blieb während dieses Prozeßabschnitts stabil bei Werten zwischen 10 und 15 g/l. Da die Zulauf-Laktatkonzentration dieser Charge B-Stärkehydrolysat jedoch mit 4-5 g/l Laktat niedriger als bei der vorherigen Charge lag, hat sich die Selektivität der Ethanolfermentation weiter geringfügig verschlechtert.

Während bei der Aufprägung eines Verweilzeitsprungs von 2,9 Stunden auf 5,0 Stunden die stationären Konzentrationen im Wirbelschichtreaktor praktisch verzögerungsfrei erreicht werden, wird beim Verweilzeitsprung aus dem stark Glukose-limitierten Zustand von 5,0 Stunden auf 2,0 Stunden der neue stationäre Zustand erst nach 4 Tagen erreicht.

Dies weist daraufhin, daß der Langzeitbetrieb unter stark Substrat-limitierenden Bedingungen bei 97-99 % Umsatz zur irreversiblen Desaktivierung der nicht mehr mit Substrat versorgten Mikroorganismen im Inneren der Sinterglaspartikel führt. Die langsame Reaktion auf den Verweilzeitsprung, immerhin werden über 50 Verweilzeiten benötigt, bis der neue stationäre Zustand erreicht ist, zeigt an, daß die inaktiven Teile des Trägermaterials erst wieder neu besiedelt werden müssen. Während dieser inneren Neubesiedlung des Sinterglaspartikels kommt es nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Laktatkonzentration im Reaktor. Die 'freien Plätze' in der Sinterglaskugel werden also nur durch *Zymomonas mobilis* Bakterien besetzt.

Die Umsatzeinbrüche bei der auf 5 Stunden eingestellten Verweilzeit sind auf technische Probleme bei der Zudosierung des stark Feststoff-belasteten Realsubstrats zurückzuführen, die teilweise zu halbtägigen Unterbrechungen der Substratzufuhr führten.

Die 3. Charge hydrolysierter B-Stärke mit einem Glukosegehalt von zu Beginn 150 g/l, die vom 70. bis zum 103. Versuchstag zur Ethanolfermentation eingesetzt wurde, stellte sich als stark mit Bakterien und Hefen kontaminiert heraus. Da in den vorherigen Versuchsabschnitten bei einer Verweilzeit von 5 Stunden keine Instabilitäten festzustellen waren, bot sich diese Charge mit der höheren Glukosekonzentration an, um Belastungsversuche unter nicht Substrat-limitierenden Bedingungen durchzuführen. Daher wurde die Verweilzeit mit dieser Charge zunächst auf 6,7 Stunden heraufgesetzt. Dies hatte einen rapiden Anstieg der Laktatkonzentration auf über 30 g/l zur Folge (siehe Abbildung 6.27). Bei dieser hohen Konzentration an Laktat ist das Wachstum von *Zymomonas mobilis* so stark gehemmt, daß *Zymomonas mobilis* im Chemostaten ausgewaschen wird (siehe Abschnitt 6.1.2).
Daher wurde versucht, den Wirbelschichtreaktor mit einer Verweilzeit von 4 Stunden wieder zu stabilisieren. Dies gelang zunächst innerhalb von 7 Tagen. Allerdings war die Laktatkonzentration im Reaktor durch diese kurzzeitige Instabilität von 15 g/l im vorherigen Versuchsabschnitt auf 20 g/l gestiegen, was auf eine Coimmobilisierung von Laktat-bildenden Mikroorganismen hindeutet.

Daneben wurde bei der Umsetzung dieser Charge eine verstärkte H_2S-Bildung festgestellt, die auf den hohen Proteingehalt von über 3,3 g/l zurückzuführen ist. Besonders dem eingesetzten Stamm ZM4 wird unter diesen Bedingungen eine verstärkte H_2S-Bildung zugeschrieben (GOODMAN/ROGERS 1985).

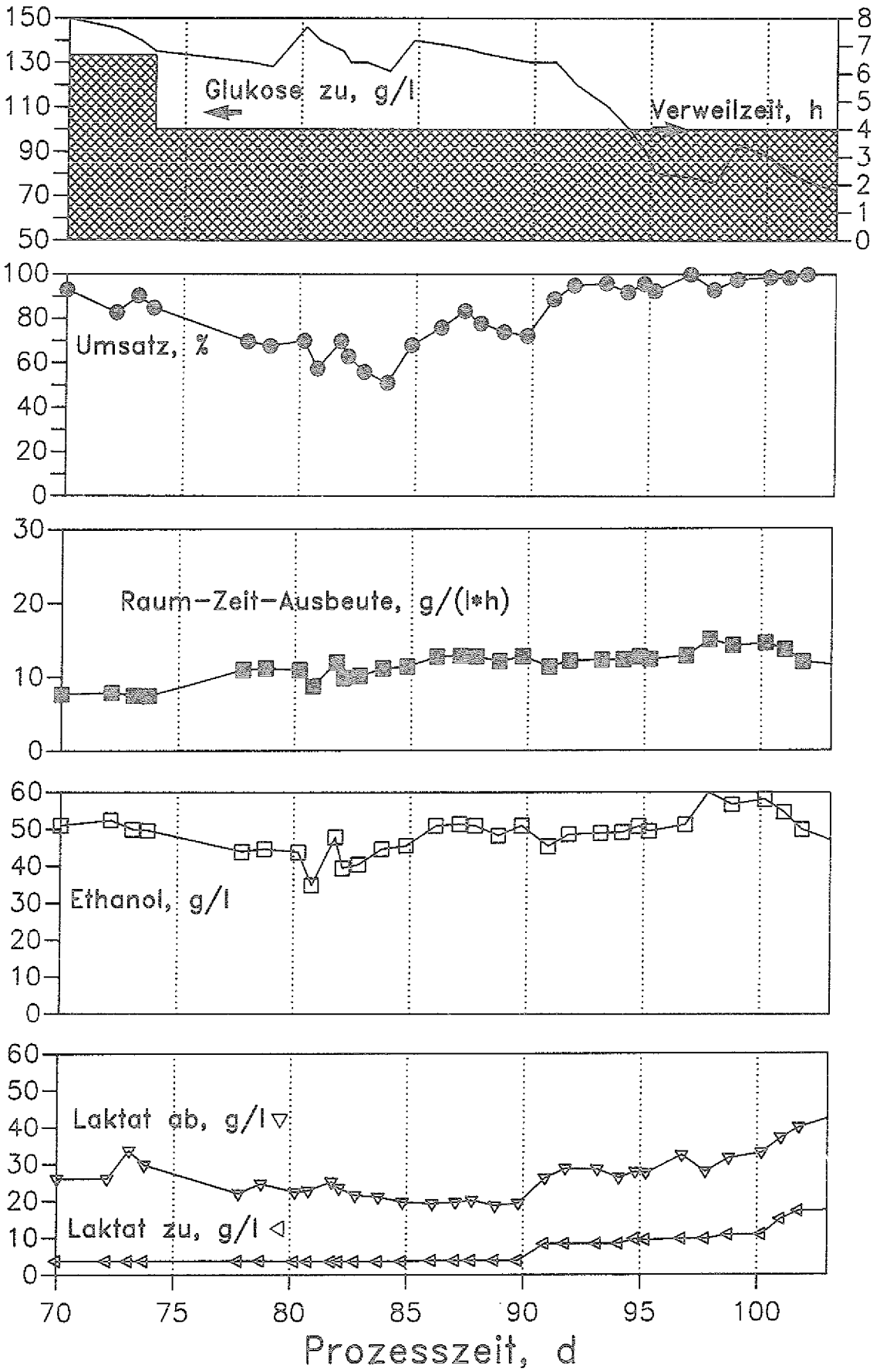
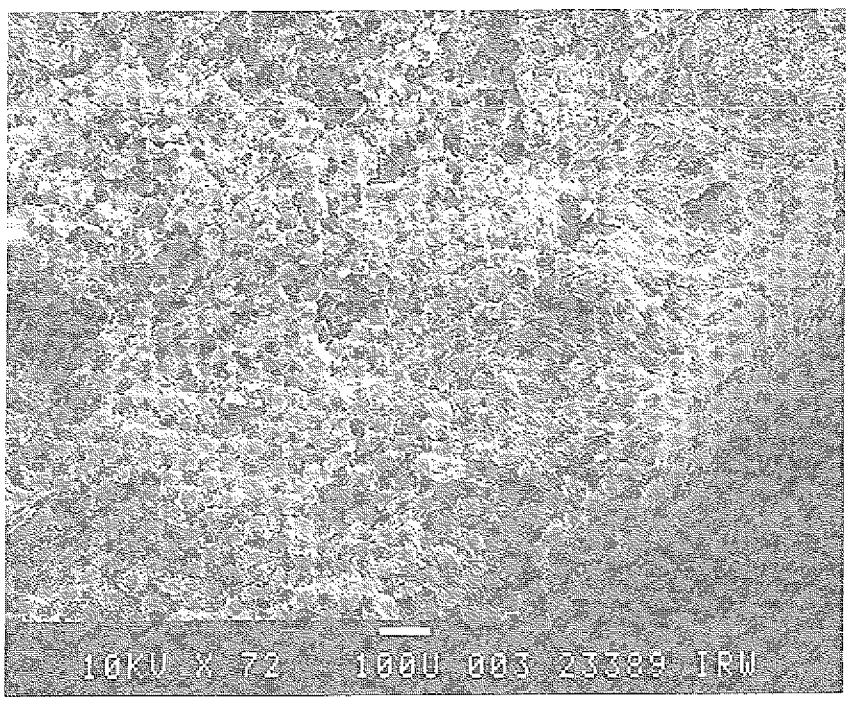


Abb. 6.27: Insterile Dauerfermentation von B-Stärkehydrolysat im Labor-Wirbelschichtreaktor (70-103 Tage)

Die weitere Fermentation dieser stark kontaminierten Charge B-Stärkehydrolysat bei konstanter Verweilzeit, die Zulauf-Glukosekonzentration war durch die metabolische Aktivität der Kontaminanten von 150 g/l zu Beginn bereits auf unter 100 g/l gefallen, führte erneut zu einem starken Anstieg der Laktatkonzentration im Wirbelschichtreaktor auf über 40 g/l Laktat, wobei bis zu 15 g/l aus der Vorlage stammten. Die Ethanolkonzentration, die nur im Wirbelschichtreaktor gemessen wurde, stieg ebenfalls an aufgrund der Ethanolbildung durch Hefen bereits in der Vorlage. Der Wirbelschichtreaktor war instabil geworden.

Während der Fermentation dieser stark kontaminierten Charge wurde eine zunehmende Expansion des Wirbelbetts festgestellt, so daß zunächst die Leerrohrgeschwindigkeit herabgesetzt werden mußte, damit das Trägermaterial nicht aus dem Wirbelschichtreaktor ausgetragen wurde. Das bedeutet, die mittlere Dichte des mit Biomasse besiedelten Trägers wurde geringer, es trat also ein Außenbewuchs auf. Dies konnte durch Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Sinterglasträgers, der dem Wirbelbett entnommen wurde, bestätigt werden (siehe Abbildung 6.25, oberes Bild). Da der Zulauf bereits stark kontaminiert war, wurden dabei auch Kontaminanten in den äußeren Biomassefilm eingelagert, was mit zum starken Anstieg der Laktatkonzentration im Wirbelschichtreaktor führte (siehe Abbildung 6.28, unteres Bild). Um dies zu unterbinden wurde versucht, die Scherkräfte im Wirbelbett durch periodisches Einblasen von Inertgas (Stickstoff) zu erhöhen, um diesen äußeren Biofilm abzuscheren. Dies gelang jedoch nur zum Teil, so daß am 103. Prozeßtag 1/4 des Wirbelbetts dem Wirbelschichtreaktor entnommen werden mußte, um den Prozeß aufrecht zu erhalten.

Durch den Einsatz einer frischen Charge hydrolysierter B-Stärke, wobei die Glukosekonzentration auf 120 g/l eingestellt wurde, konnte der Prozeß nach der Sinterglasentnahme bei einer Verweilzeit von 2 Stunden wieder stabilisiert werden. Nach 7 Tagen wurde nahezu derselbe stationäre Betriebszustand erreicht, wie 40 Tage zuvor. Bei einem etwas erhöhtem Umsatz von 86% gegenüber rund 80% zuvor wurde dieselbe Raum-Zeit-Ausbeute von 20-22 g/(l*h) erzielt (siehe Abbildung 6.23).
Der höhere Umsatz hat seine Ursache in der aufgrund der gegenüber dem vorherigen Zustand höheren Laktatbildung im Wirbelschichtreaktor. Die Laktatkonzentration liegt mit durchschnittlich 24 g/l bedeutend über den vorherigen Werten von 15 g/l, die Ethanolselektivität ist also weiter abgesunken.



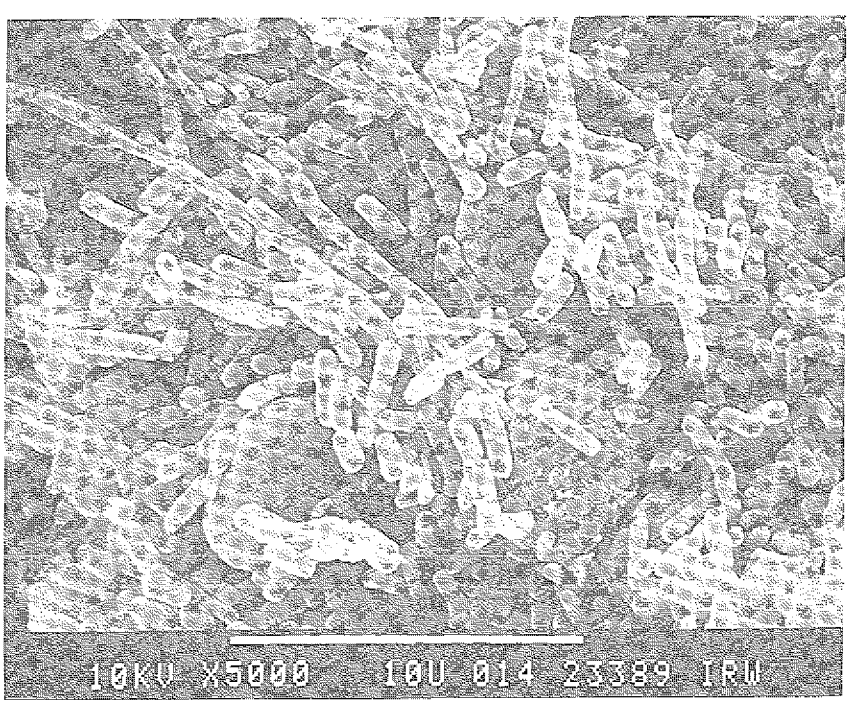


Abb. 6.28: REM-Aufnahme eines Sinterglaskörpers während des insterilen Betriebs: Bruchfläche mit äußerem Biofilm (oben), Oberfläche *Zymomonas mobilis* mit eingelagerten Kontaminanten (unten).

Die Verlauf der Ethanolselektivität ist für die gesamte Versuchsdauer von 116 Tagen in Abbildung 6.29 dargestellt:
Die Ethanolselektivität bewegt sich in den stabilen Prozeßphasen (Charge 1 und 2) in der Regel zwischen 40 und 45 %. Allerdings fällt die Selektivität bei drastischen Änderungen der Fermentationsbedingungen kurzfristig auf Werte weit unter 40 % ab. Dies wurde beim Wechsel vom synthetischen Medium zum B-Stärkehydrolysat (0. bis 8. Prozeßtag), beim Verweilzeitsprung aus dem stark Substrat-limitierten Zustand (58. bis 62. Prozeßtag) und Stabilisieren des Wirbelschichtreaktors mit frischem B-Stärkehydrolysat (103. bis 110. Prozesstag) beobachtet. In diesen Prozeßphasen ergibt sich eine Bilanzlücke in der Kohlenstoffbilanz, da während dieser Phasen verringerter Ethanolselektivität keine Konzentrationserhöhung anderer Produkte gemessen wurde.

Eine Regressionsanalyse der Meßwerte bis zum 70. Prozeßtag (lineare Regression) liefert numerisch einen minimalen Anstieg von 0,009 g/g pro Monat. Das bedeutet, die insterile Vergärung von B-Stärkehydrolysat ist mit immobilisierten *Zymomonas mobilis* im Wirbelschichtreaktor stabil (siehe Abb. 6.29).

Die starke Streuung und die viel zu hohen Werte für die Ethanolselektivität bei der Umsetzung der 3. Charge B-Stärkehydrolysat sind auf den nicht miterfaßten Ethanoleintrag aus der stark kontaminierten Vorlage zurückzuführen.
Es zeigt sich deutlich, daß nach dieser Störung die Ethanolselektivität nicht wieder auf die alten Werte ansteigt, sondern bei Werten von knapp unter 40 % liegen bleibt.

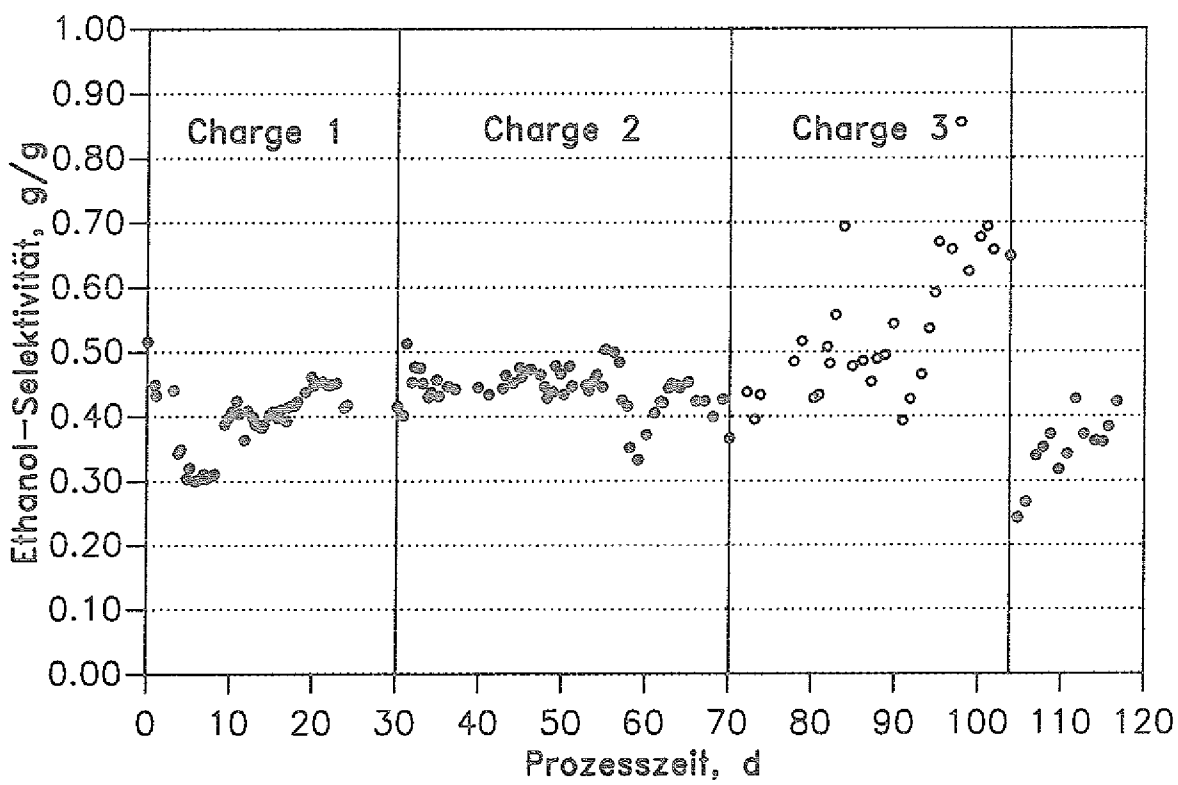


Abb. 6.29: Insterile Dauerfermentation von hydrolysierter B-Stärke im Labor-Wirbelschichtreaktor, Ethanolselektivität (0-116 Tage)

6.3.2 Fermentation von hydrolysierter B-Stärke in 2-stufiger Technikums-Wirbelschichtanlage

Die Ethanolfermentation von hydrolysierter B-Stärke mit immobilisierten *Zymomonas mobilis* Bakterien in der Technikums-Wirbelschichtanlage, die aus zwei in Reihe geschalteten Wirbelschichtreaktoren mit einem Volumen von 55 l im ersten und 50 l im zweiten Wirbelschichtreaktor bestand, wurde mit folgenden Zielsetzungen durchgeführt:

1. Der Anfahrvorgang - die Vorkolonisierung des Trägermaterials mit *Zymomonas mobilis* Bakterien (siehe Abschnitt 6.2.1) - soll unter 'technischen Bedingungen' in der lediglich desinfizierten Wirbelschichtanlage untersucht werden.

2. Die Übertragbarkeit des im Labor-Wirbelschichtreaktor ermittelten Betriebspunktes auf den um den Faktor 25 vergrößerten Technikums-Wirbelschichtreaktor sollte überprüft werden, sowie das Konzept der Kaskadierung von 2 Wirbelschichtreaktoren zur Erzielung hoher Raum-Zeit-Ausbeuten auch bei vollständigem Umsatz sollte auf die Umsetzung von hydrolysierter Abfallstärke übertragen werden (siehe Abschnitt 6.3.1 und 6.2.3).

Entsprechend dieser Zielsetzungen gliedert sich der in der Technikums-Wirbelschichtanlage durchgeführte Versuch zur insterilen Ethanolfermentation mit *Zymomonas mobilis* in 2 Versuchsphasen:

Die 1. Versuchsphase, die Kolonisierung der beiden hintereinandergeschalteten Technikums-Wirbelschichtreaktoren mit , wurde mit synthetischem Medium durchgeführt. Hierzu wurde zum einen ein Glukosekonzentrat (600 g/l) und zum anderen die Nährsalz- und Vitaminlösung nicht sterilisiert vorgelegt und die beiden Stoffströme der Wirbelschichtanlage so zudosiert, daß sich eine Zulauf-Glukosekonzentration von 120 -130 g/l ergab.

Die Anzucht der *Zymomonas mobilis* Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Fermentationsstrecke mit einem 30 l Vorfermenter und einem 300 l Rührkessel-Fermenter im diskontinuierlichen Ansatz. Die Zellen wurden am Ende der exponentiellen Phase abgeerntet und ohne Aufkonzentrierung in die vorher mit 70 % Ethanol desinfizierte Wirbelschichtanlage gepumpt.

Bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension ohne Zugabe von frischem Substrat in den jeweiligen Wirbelschichtreaktoren umgepumpt. Wenige Stunden nach Beginn der Sorptionsphase traten technische Probleme an der Umlaufpumpe eines der beiden Reaktoren auf, die erst nach insgesamt 6,5 Tagen behoben werden konnten. In dieser Zeit mußten beide Reaktoren mehrmals zum Auswechseln von defekten Pumpenteilen insteril geöffnet werden. Während dieses Reaktor-Stillstands wurden die Wärmetauscher der Wirbelschichtreaktoren mit Kühlwasser beaufschlagt, so daß sich eine Temperatur von 15-18 °C in den Wirbelschichtreaktoren aufrecht erhalten ließ.

Da *Zymomonas mobilis* auch über längere Zeiträume ohne Substrat seine metabolische Aktivität nicht verliert (CASTELLAR et al. 1989), wurde nach 6,5 Tagen bei einer relativ langen Verweilzeit

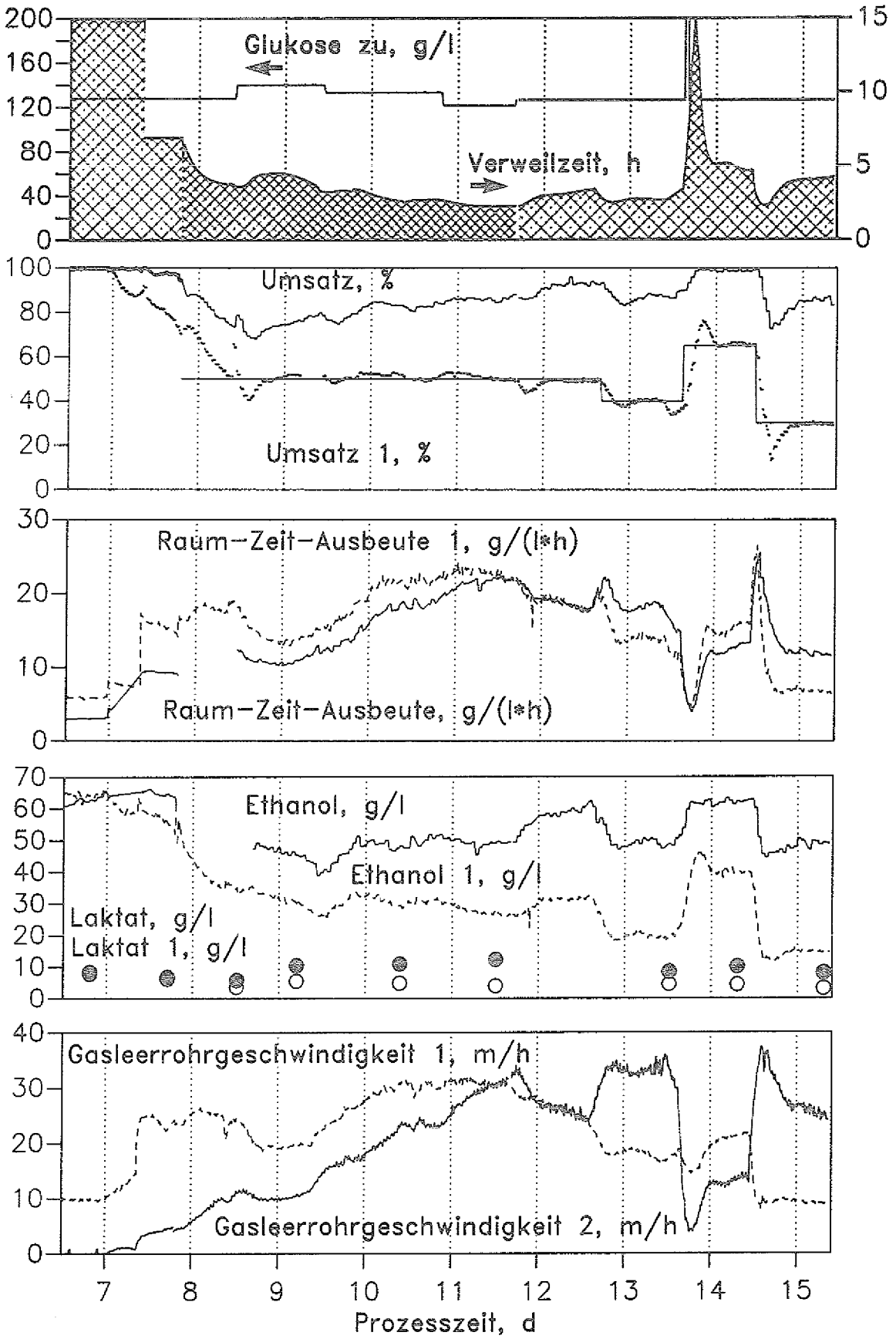


Abb. 6.30: Anfahren 2-stufige Technikums-Wirbelschichtanlage, insteril mit synthetischem Medium (1: Reaktor 1, 2: Reaktor 2, ohne Angabe: Gesamtanlage)

von 20 Stunden die Kolonisierung des Sinterglasmaterials fortgesetzt. Da der Umsatz in beiden Wirbelschichtreaktoren bei dieser Verweilzeit vollständig war, also noch metabolische Aktivität in den Wirbelschichtreaktoren vorhanden war, wurde nach weiterer manueller Verkürzung der Verweilzeit auf 15 Stunden und danach auf 7 Stunden der Umsatzregler eingeschaltet und ein

Umsatzsollwert im ersten Wirbelschichtreaktor von 50 % vorgegeben (siehe Abbildung 6.30). Durch die Vorgabe eines niedrigen Umsatzes im ersten Wirbelschichtreaktor soll sichergestellt werden, daß während der Kolonisierungsphase auch im 2. Wirbelschichtreaktor keine Substrat-limiterenden Bedingungen auftreten können.

Die Kolonisierung des ersten Wirbelschichtreaktors nimmt zunächst denselben Verlauf, wie er auch im sterilen Labor-Wirbelschichtreaktor beobachtet wurde. Durch die zunehmende Biomasseakkumulation im Sinterglas kann vom Prozeßrechner die Verweilzeit in den Wirbelschichtreaktoren verkürzt werden. Entsprechend steigt die aus den on-line gemessenen Ethanolkonzentrationen ermittelte Raum-Zeit-Ausbeute an.

Die Raum-Zeit-Ausbeute im ersten Wirbelschichtreaktor erreicht jedoch im Gegensatz zum steril betriebenen Labor-Wirbelschichtreaktor, in dem bei 50 % Umsatz eine Raum-Zeit-Ausbeute von über 40 g/(l*h) erzielt wurde, nur Werte von maximal 24 g/(l*h) bei einer Verweilzeit von 1,2 Stunden. Ab dem 11. Prozeßtag fällt die Raum-Zeit-Ausbeute im ersten Wirbelschichtreaktor kontinuierlich ab. Die Steigerung der Aktivität im Wirbelschichtreaktor durch zunehmende Biomasseakkumulation in den Sinterglasträgern wird hier also durch eine zunehmende Desaktivierung überlagert. Dies wurde im steril betriebenen Labor-Wirbelschichtreaktor in keinem Fall beobachtet.

Aufgrund des mehrtägigen Anlagenausfalls bereits in der Sorptionsphase wird vom Beginn der insterilen Kolonisierung an eine Laktatkonzentration von 5-10 g/l in den Wirbelschichtreaktoren gemessen. Da diese Kontaminationsproduktbildung über den dargestellten Versuchszeitraum (6,5 - 15,5 Tage) jedoch nicht weiter ansteigt, kann die Laktatbildung nicht ursächlich für die Desaktivierung verantwortlich sein. Im Chemostaten (siehe Abschnitt 6.1.2) und im insterilen Labor-Wirbelschichtreaktor (siehe Abschnitt 6.3.1) sind bei diesen Laktatkonzentrationen keine Instabilitäten beobachtet worden.

Ab dem 12. Prozeßtag wurde im Zuleitungssystem der Nährsalzvorlage, die außer den Vitaminen und dem Komplexbildner keine C-Quelle enthielt, ein starkes Biomassewachstum festgestellt. Dieses Biomassewachstum könnte entweder eine Limitierung durch Nährsalzverbrauch oder eine Inhibierung durch Bildung von für *Zymomonas mobilis* toxischen Kontaminationsprodukten hervorgerufen haben.
Daraufhin wurde das Zuleitungssystem alle 2 Tage mit Natronlauge gereinigt. Die Instabilität konnte durch diese Maßnahme jedoch nicht unterbunden werden, wie aus dem weiteren Versuchsverlauf ersichtlich wird.

Nachdem die Kolonisierung des Sinterglasmaterials beider in Reihe geschalteter Wirbelschichtreaktoren abgeschlossen war, wurden durch Vorgabe weiterer Umsatz-Sollwerte andere Betriebspunkte eingestellt. Es konnte nur bei einem Gesamtumsatz von 98-99 % ein stabiler Betriebspunkt ermittelt werden. Bei niedrigeren Umsätzen stieg die vom Prozeßrechner geregelte Verweilzeit weiter an, die Wirbelschichtanlage blieb instabil.

Nach 13,6 Prozeßtagen kam es durch eine Störung zu einer kurzzeitigen Unterbrechung der Versorgung der Technikums-Wirbelschichtanlage mit Nährsalzen, so daß die Zulauf-Glukosekonzentration in dieser Zeit auf 600 g/l Glukose anstieg. Die Regelstrecke (Wirbelschichtreaktor, on-line Polarimeter und Prozeßrechner) reagierte auf diese starke Störung jedoch sehr stabil, so daß der neu vorgegebene Umsatz-Sollwert nur geringfügig überschritten wurde. Auch das Abfahren der Umsatz-Sprungfunktionen im Technikums-Wirbelschichtreaktor erfolgt mit nur einmaligem Überschwingen der Regelstrecke.

Trotz der in der nicht sterilen Kolonisierungsphase aufgetretenen Instabilität der Wirbelschichtanlage wurde mit der Zuführung von hydrolysierter B-Stärke nach insgesamt 15,5 Prozeßtagen die eigentliche Produktionsphase gestartet.

Aus logistischen Gründen wurden die Fermentation in der Technikums-Wirbelschichtanlage mit einem B-Stärkehydrolysatkonzentrat ('Dormaferm^R') mit einer Glukosekonzentration von 400 - 500 g/l durchgeführt. Dieses längere Zeit lagerfähige Konzentrat hat im Vergleich zum unbehandelten B-Stärkehydrolysat einen stark verringerten Feststoffanteil. Zur Fermentation wurde dieses Konzentrat mit Leitungswasser in einer auf 4-5 °C gekühlten Vorlage verdünnt und wie vorher beschrieben mit Nährsalzen und Vitamin supplementiert (siehe Abschnitt 6.3.1).

Wenige Stunden nach der Umschaltung von synthetischem Medium auf Realsubstrat bei konstanter Verweilzeit und gleich eingestellter Zulauf-Glukosekonzentration - aufgrund von dabei notwendigen Neukalibrierungen der Analysengeräte konnte dieser Prozeßabschnitt nicht aufgezeichnet werden - war der Gesamtumsatz von vorher 80% auf über 95% und damit auch die Raum-Zeit-Ausbeuten angestiegen (siehe Abb. 6.31). Dies legt noch einmal die oben erwähnte Vermutung nahe, daß bei der insterilen Dosierung des synthetischen Mediums eine Mangelsituation für die immobilisierten *Zymomonas mobilis* Bakterien vorgelegen haben muß.

Die insterile Produktionsphase sollte bei festen, aus den Untersuchungen in den Labor-Wirbelschichtanlagen ermittelten Betriebsparametern durchgeführt werden. Ausgehend von den Untersuchungen zur Kaskadierung der Wirbelschichtreaktoren sollte die Gesamtverweilzeit fest vorgegeben werden. Dabei war bei einer Zulauf-Glukosekonzentration von 120 g/l als Optimum ein Umsatz von 80 % im ersten Wirbelschichtreaktor, dem 'Leistungsreaktor', ermittelt worden, um im zweiten Wirbelschichtreaktor, dem 'Umsatzreaktor', 99 % Umsatz zu erzielen (siehe Abschnitt 6.2.3). Diese Daten gelten für die sterile Vergärung von synthetischem Glukosemedium.
Um 80 % Umsatz bei der Vergärung von hydrolysierter B-Stärke zu erreichen, war im Labor-Wirbelschichtreaktor eine Verweilzeit von 2 Stunden erforderlich (siehe Abschnitt 6.3.1). Deswegen wurde in der Technikums-Wirbelschichtanlage zunächst eine Gesamt-Verweilzeit von 4 Stunden vorgegeben, was einer Verweilzeit von 2,1 Stunden im ersten Wirbelschichtreaktor der Technikumsanlage entsprach.

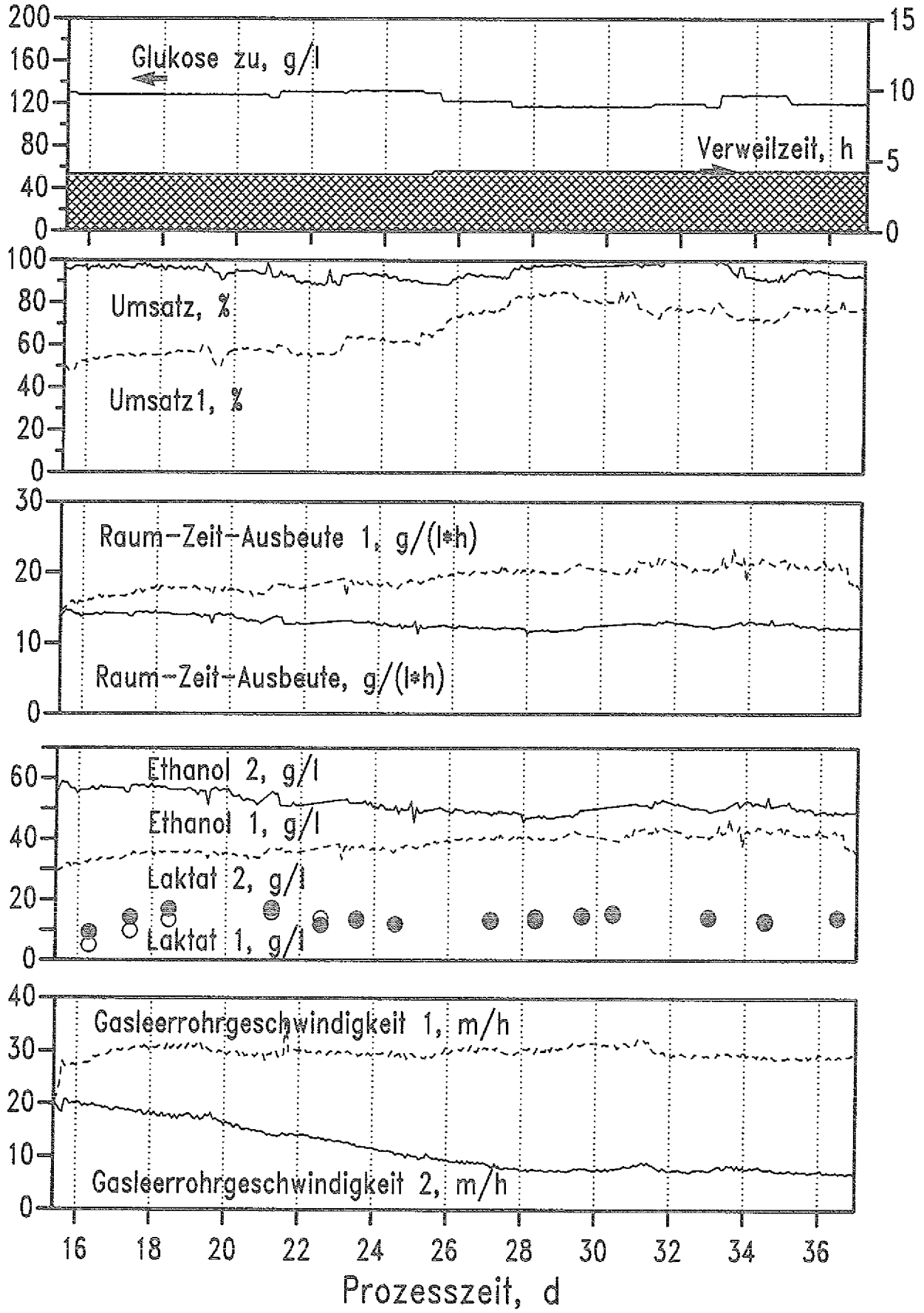


Abb. 6.31: Insterile Dauerfermentation von B-Stärkehydrolysat in 2 stufiger Technikums-Wirbelschichtanlage (15.-37. Prozeßtag) (1: Reaktor 1, 2: Reaktor2, ohne Angabe: Gesamtanlage)

Vom 15. bis zum 25. Prozeßtag wurde die Technikums-Wirbelschichtanlage bei dieser Verweilzeit betrieben. Dabei konnte im Leistungsreaktor jedoch nur ein Umsatz von maximal 60 % erreicht werden, was zu einen Gesamtumsatz von lediglich 90% führte. Erst mit der Verlängerung der Gesamt-Verweilzeit auf 4,25 h und der exakten Einstellung einer Zulauf-Glukosekonzentration von 120 g/l konnte in der Technikums-Wirbelschichtanlage der vorgegebe Betriebspunkt erreicht werden.

Das heißt, gegenüber dem Labor-Wirbelschichtreaktor muß im Technikums-Wirbelschichtreaktor die Verweilzeit um 10 % von 2 auf 2,2 Stunden verlängert werden, um bei gleicher Zulauf-Glukosekonzentration einen Umsatz von 80 % zu erzielen. Entsprechend verringert sich auch die Raum-Zeit-Ausbeute im Technikums-Wirbelschichtreaktor. Die ermittelten Betriebsdaten (arithmetisches Mittel über den angegebenen Prozeßzeitraum) zur insterilen Alkoholgärung von hydrolysierter B-Stärke für beide Wirbelschichtreaktoren sind in Tabelle 6.9 noch einmal zusammengefaßt:

	Einzelreaktor	Einzelreaktor	Kaskade
Reaktorvolumen, l	2,2	55	105
Glukosezulauf, g/l	120	118,2	118,2
Umsatz, %	79,6	79,9	98,5
Verweilzeit, h	**2,0**	**2,2**	4,25
Raum-Zeit-Ausbeute, g/(l*h)	**20,5**	**18,9**	12,4
Ethanol, g/l	40,9	41,3	49,4
Laktat, g/l	12,7	14,5	14,1
Ethanol-Selektivität, g/g	0,43	0,44	0,42
Gas-Leerrohr-geschwindigkeit, m/h	**11,7**	**30,5**	-
(Prozeßzeitraum, d	62-70	27-33	27-33)

Tab. 6.9: Betriebsdaten Labor-, Technikums-Wirbelschichtreaktoren.

Zur Untersuchung der Stabilität der Wirbelschichtanlage bietet sich die Beobachtung der Ethanol-Selektivität mit fortschreitender Prozeßdauer an, da diese praktisch unabhängig vom jeweiligen Umsatz ist (siehe Abschnitt 6.1.1). In Abbildung 6.32 sind die ermittelten Selektivitäten des Leistungsreaktors und der Gesamtanlage über der Prozeßzeit aufgetragen. Zur Tendenzerkennung wurden diese Werte zum einen für den Einzelreaktor und zum anderen für die Gesamtanlage einer (linearen) Regressionsanalyse unterzogen. Es werden jeweils negative Steigungen festgestellt, die Ethanol-Selektivität fällt also mit zunehmender Prozeßdauer. Für die Analyse aller Meßdaten ergibt sich folgende Gleichung:

$$\text{Ethanolselektivität, g/g} = -1{,}2 \cdot 10^{-3} \cdot \text{Prozeßzeit, d} + 0{,}477$$

Das bedeutet, innerhalb des beobachteten Prozeßzeitraums sank die Ethanolselektivität um 0,036 g/g im Monat.

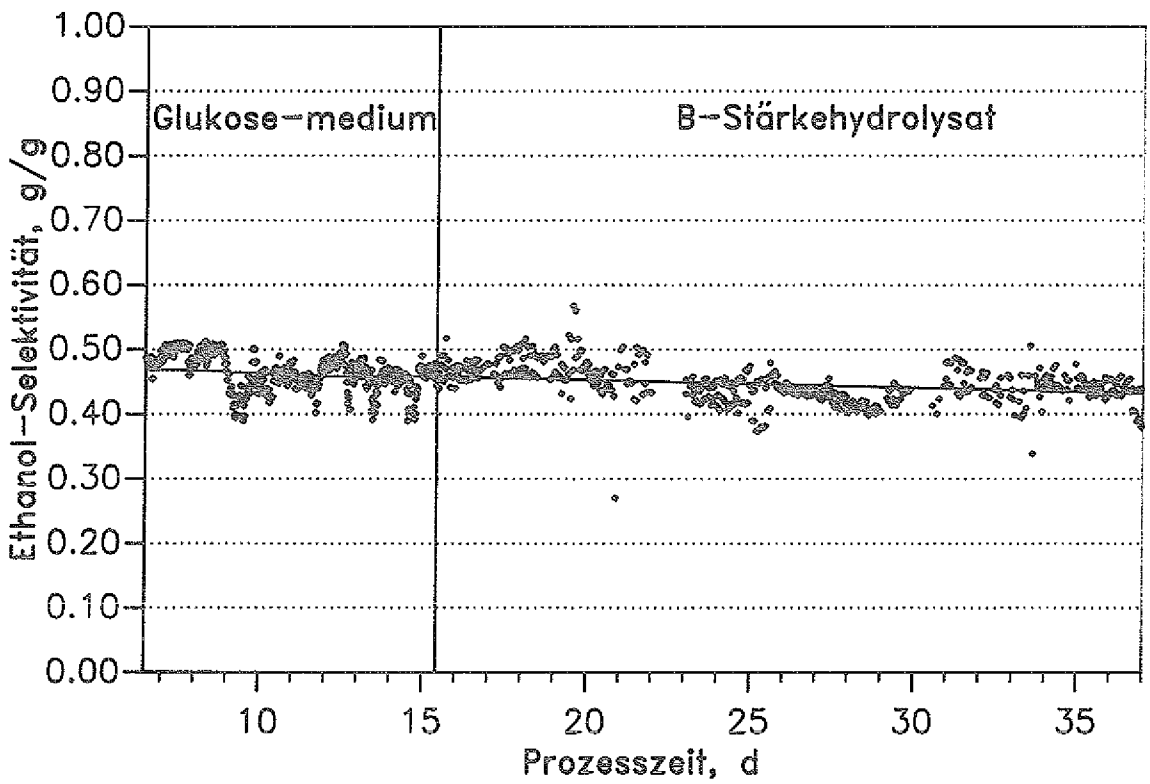
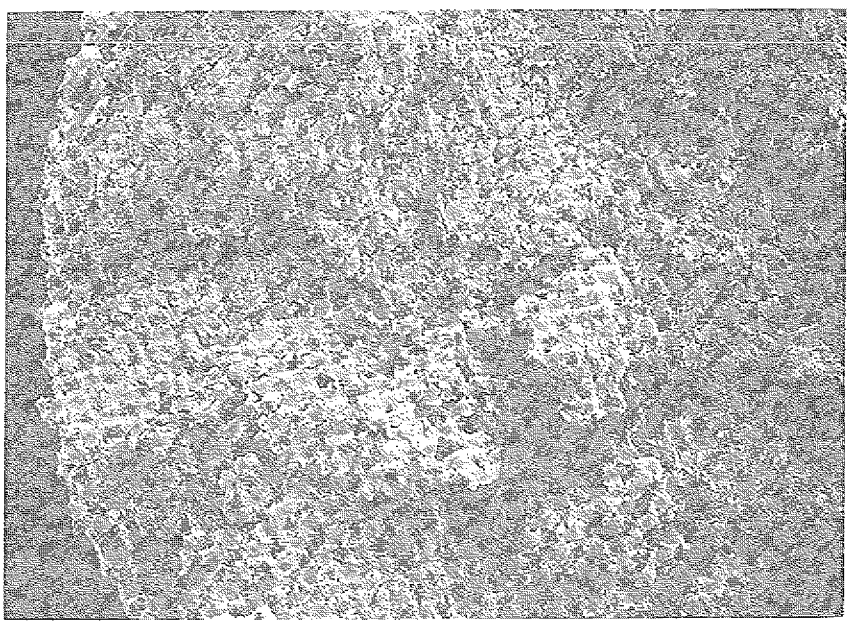


Abb. 6.32: Ethanolselektivitäten der Technikums-Wirbelschichtanlage über Prozeßzeit, Regressionsanalyse.

Die Laktatkonzentration ist über den gesamten Versuchsverlauf der Fermentation von hydrolysierter B-Stärke jedoch stabil. Bei Zulauf-Laktatkonzentration von 2-4 g/l werden im Ablauf der Technikumsanlage Laktatkonzentrationen zwischen 10 und 15 g/l gemessen. Dieses Laktat wurde jedoch fast vollständig im ersten Wirbelschichtreaktor gebildet (siehe Abb. 6.32). Im zweiten Wirbelschichtreaktor wurde als Kontaminationsprodukt Butyrat mit Konzentrationen von bis zu 3 g/l dedektiert.



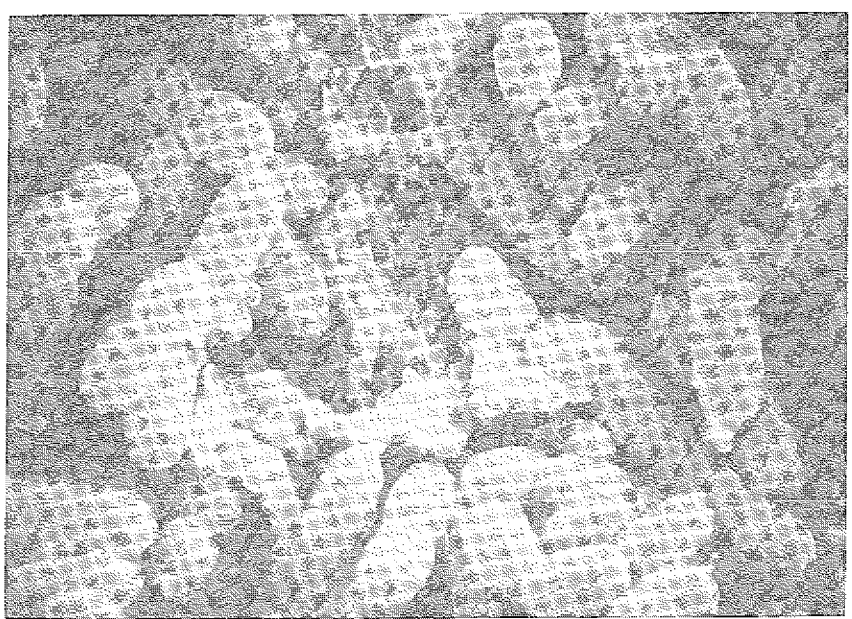


Abb. 6.33: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Sinterglaspartikels am Ende der Kolonisierungsphase; Bruchfläche 100x, Pore im Inneren 2000x.

Demnach korreliert die Verringerung der Ethanolselektivität nicht unbedingt mit einer Zunahme der Laktatkonzentration, sondern mit einer Zunahme der Bildung von Kontaminationsprodukten allgemein.

Diese in der Technikums-Wirbelschichtanlage beobachtbare Tendenz zur Instabilität deckt sich nicht mit den Ergebnissen, die in den Labor-Wirbelschichtanlagen erzielt wurden.
Signifikantester Unterschied zwischen den Versuchen in den unterschiedlich dimensionierten Wirbelschichtreaktoren ist neben der Reaktorgröße die Vorgehensweise bei der Kolonisierung des Sinterglasmaterials, die im Labor-Wirbelschichtreaktor steril durchgeführt wurde. Daher liegt die Vermutung nahe, daß die Coimmobilisierung von Kontaminanten in der Kolonisierungsphase in den Technikums-Wirbelschichtreaktoren Ursache der festgestellten Tendenz zur Instabilität der Technikumsanlage sein könnte. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Sinterglaskörpern, die am Ende der Kolonisierungsphase den Wirbelschichtreaktoren entnommen wurden, zeigen zwar eine vollständige Kolonisierung auch der Poren im Inneren des Trägermaterials. Allerdings sind selbst in Poren, die sich im Zentrum der Sinterglaskörper befinden, bereits Kontaminanten zu identifizieren (siehe Abb. 6.33).

Beim Vergleich der bei der nahezu vollständigen Vergärung von B-Stärkehydrolysat im Labor-Wirbelschichtreaktor erzielten Raum-Zeit-Ausbeute von 10,5 g/(l*h) und der in der 2-stufigen Technikums-Wirbelschichtanlage erreichten Raum-Zeit-Ausbeute von 12,4 g/(l*h), zeigt sich nur eine unbedeutende Leistungssteigerung. Ausgehend von den Ergebnissen bei der sterilen Vergärung von Glukosemedium in den Labor-Wirbelschichtreaktoren (siehe Abb. 6.20), wo festgestellt wurde, daß sich bei diesem Umsatz die im Einzelreaktor erzielte Raum-Zeit-Ausbeute durch Kaskadierung verdoppeln läßt, wäre eine Raum-Zeit-Ausbeute von etwa 20 g/(l*h) in der Technikums-Wirbelschichtanlage zu erwarten gewesen.

6.3.3 Abschätzung des Gasanteils im Wirbelbett

Die Berechnung der Prozeßgrößen Verweilzeit und Raum-Zeit-Ausbeute mit dem Reaktortotalvolumen, wie es hier vorgenommen wurde, also der Summe aus Flüssigkeitsvolumen, Feststoffvolumen und Gasvolumen im Wirbelschichtreaktor, ist unter verfahrenstechnischen Gesichtspunkten sinnvoll, da hier daß 'umbaute Volumen' interessiert.
Die mikrobielle Umsetzung findet jedoch nur in der flüssigen Phase beziehungsweise an der Phasengrenze fest-flüssig statt. Das bedeutet, das Flüssigkeitsvolumen ist das eigentlich relevante 'reaktionstechnische Volumen', mit dem unterschiedlich dimensionierte Wirbelschichtreaktoren unter der Vorausetzung identischen Energie- und Stofftransports (konvektiv und diffusiv), beschrieben werden können.
Die geometrische Ähnlichkeit der eingesetzten Labor- und Technikums-Wirbelschichtreaktoren mit demselben Trägermaterial bedingen bei Nichtberücksichtigung der Gasbildung und nicht zu niedrigen Verweilzeiten identischen Stofftransport (siehe Abschnitt 5.4).
Das in der Wirbelschicht gebildete CO_2 hat bei unterschiedlich dimensionierten Reaktoren zum einen Einfluß auf das reaktionstechnische Volumen und damit auf die tatsächliche Verweilzeit, und kann zum anderen die Hydrodynamik und damit den Stofftransport beeinflussen (siehe Abschnitt 6.2.4).

Das reaktionstechnisch relevante Volumens eines Wirbelschichtreaktors ist neben dem Feststoffvolumen im Reaktor vom Gasvolumen abhängig. Dimensionslos mit Volumenanteilen dargestellt muß gelten:

$$e_L = 1 - (e_S + e_G) \qquad 6.6$$

Der Feststoffanteil läßt sich einfach aus der eingewogenen Menge und der Dichte des Trägermaterials und des Wirbelschichtvolumens berechnen.
Ansätze zur Berechnung des Gasanteils 3-phasiger Wirbelschichten mit einem Gasquellterm über der Höhe der Wirbelschicht sind bisher nicht in der Literatur beschrieben worden (STRIEGEL 1989).

Zur Beschreibung von 3-Phasen Wirbelschichten mit externem Gaseintrag unterhalb des Wirbelbetts werden in der Literatur eine Reihe von empirischen oder halbempirischen Beziehungen für unterschiedliche Feststoffdichten und -durchmesser angegeben (MUROYAMA/FAN 1985). Der Geltungsbereich der verschiedenen Korrelationen wird neben den Stoffeigenschaften durch das Verhältnis von Flüssigkeits- zu Gasleerrohrgeschwindigkeit u_L/u_G charakterisiert.
Im Labor-Wirbelschichtreaktor wurde bei der Ethanolfermentation mit *Zymomonas mobilis* als minimales Geschwindigkeitsverhältnis u_L/u_G ein Wert von 1,8 und im Technikums-Wirbelschichtreaktor von 1,0 erreicht.
Lediglich die von DARTON und HARRISON (1975) vorgeschlagene Beziehung zur Berechnung des Gasanteils für ein Geschwindigkeitsverhältnis u_L/u_G von 0,4 - 20 kann demnach benutzt werden, alle anderen Beziehungen gelten für weitaus höhere Gasvolumenströme im Verhältnis zum Flüssigkeitsstrom (Herleitung siehe Anhang 10.3):

$$u_G*(1-e_G) - u_L*e_G*(1-e_G)/e_L = f(v_{b\infty},e_G) \qquad 6.7$$

wobei $v_{b\infty}$ die Aufstiegsgeschwindigkeit einer Blase in mm/s darstellt.

Diese Beziehung wurde mit dem System Luft/Wasser bei Partikel unterschiedlicher Dichte und Durchmessern von 0,32 bis 6 mm ermittelt und basiert auf dem 'reduced wake model'. Das besagt, daß im 'Flüssigkeitsschwanz', den jede Gasblase hinter sich herzieht, keine Trägerpartikel mittransportiert werden. Dies gilt nur, wenn der Durchmesser der Gasblasen kleiner oder maximal von derselben Größenordnung wie der Durchmesser der Trägerpartikel ist. Bei der Ethanolgärung in den Wirbelschichtreaktoren war diese Voraussetzung erfüllt.

Für den Bereich des 'uniform bubbling regimes', das bedeutet, die aufsteigenden Gasblasen sind alle von ähnlicher Größe und gleichmäßig über den Reaktor-Querschnitt verteilt, wird

$$f(v_{b\infty},e_G) = 180 * e_G \qquad 6.8.$$

Durch Kombination der Gleichungungen 6.6, 6.7 und 6.8 erhält man die quadratische Bestimmungsgleichung für den Gasanteil e_G. Diese Gleichung gilt auch für die Grenzfälle, daß der Feststoffanteil oder der Gasanteil gegen Null gehen.

Zur Abschätzung des Gasanteils in einer Wirbelschicht mit Gasquellterm über der Höhe des Wirbelbetts bietet sich ein Stufenkonzept an.

Das Wirbelbett wird in äquidistanten Abständen in Scheiben geschnitten, die keine Gradienten in radialer Richtung aufweisen. Die in jeder Scheibe gebildete Gasmenge wird dem bisherigen Gasstrom in der folgenden Stufe zuaddiert. Unter der Annahme einer in erster Näherung über der Reaktorhöhe homogenen Verteilung des Trägermaterials in der Wirbelschicht wird in jeder Stufe dieselbe Gasmenge produziert. Diese ergibt sich aus der Gesamtgasmenge dividiert durch die Anzahl der Stufen. Das bedeutet weiterhin, daß die Zunahme des Gasanteils in jeder Stufe mit einer entsprechenden Abnahme des Flüssigkeitsanteils verbunden ist.
Die Aufsummierung der Gasanteile der einzelnen äquidistanten Stufen dividiert durch die Gesamtzahl der Stufen ergibt dann den Gasanteil in der Wirbelschicht. Addiert man den Gasanteil des Reaktorkopfs hinzu, der ebenfalls mit obiger Beziehung durch den Grenzübergang e_S gegen 0 berechnet werden kann, so erhält man den Gasanteil im gesamten Reaktor.

Die Ergebnisse einer solchen Berechnung für den Labor- und den Technikums-Wirbelschichtreaktor bei maximaler Gasbildung sind mit den jeweiligen Parametern in Tabelle 6.10 zusammengefaßt. Hierbei sind die Feststoffanteile als Vollkugeln berechnet worden, da angenommen wird, daß die Poren des Sinterglasmaterials vollständig mit *Zymomonas mobilis* Bakterien gefüllt sind.

	Laborreaktor	Technikumsreaktor
u_L, m/h	40	40
$u_{G,max}$, m/h	24,8	36
Höhe, m	0,6	1,8
e_S (Bett), %	24,1	22,7
e_S (total), %	13,1	12,4
e_G (Bett), %	1,9	2,57
e_G (total), %	1,7	2.62

Tab. 6.10: Berechnung der Gasanteile e_G in den Wirbelschichtreaktoren.

Eine experimentelle Überprüfung der berechneten Gasanteile ist mit einer Differenzdruckmessung in der Wirbelschicht möglich. Hierbei wird der statische Druck des Wirbelsbetts P bei unterschiedlichen Gasleerrohrgeschwindigkeiten, also unterschiedlichen Gasgehalten und konstanter Flüssigkeitsleerrohrgeschwindigkeit gemessen. Durch Differenzbildung mit dem statischen Druck, der ohne Gasbildung gemessen wird, Po, und Normierung auf Po erhält man den Gasgehalt der Wirbelschicht oberhalb der Meßstelle:

$$e_G = V_G/V = V_{\text{verdrängtes Wirbelbett}} / V$$

$$= A*h_G / A*h = [A*(Po-P)/(o*g)]/[A*Po/(o*g)]$$

$$= (Po - P) / Po$$

Die Meßstelle zur Messung des statischen Drucks im Technikums-Wirbelschichtreaktor ist senkrecht zur Strömungsrichtung oberhalb des Verteilerbodens angebracht. Um das Miterfassen von Einlaufstörungen zu vermeiden, wurde die Meßstelle mit einem Abstand von 4 Reaktordurchmessern über dem Verteilerboden installiert (siehe Abbildung 6.31).

Es konnten nur sehr kleine Differenzdrücke am Rande der Empfindlichkeit (1 mbar) des piezoresistiven Druckaufnehmers gemessen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.11 zusammengestellt:

u_L, m/h	u_G, m/h	dP, mbar	e_G, %
36,7	0	150	0
36,7	5,6	150	0
36,7	8,5	149	0,66
36,7	17,5	147	2,00
36,7	30,5	146	2,66

Tab. 6.11: Gemessene Gasanteile im Technikums-Wirbelschichtreaktor.

Die Berechnung des Gasgehalts nach dem oben aufgeführten Ansatz ist im Vergleich zu diesen experimentell ermittelten Werten in Abbildung 6.31 dargestellt. Es zeigt sich eine zufriedenstellende Korrelation, wenn man die meßtechnisch bedingte Streuung der Meßwerte und die ungenügende Anzahl von Meßpunkten außer acht läßt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Unterschiede im Gasgehalt von Labor- und Technikums-Wirbelschichtreaktor je nach zu vergleichendem Betriebszustand bei 1-2 % liegen und demnach der Einfluß des Gasgehalts auf die tatsächliche Verweilzeit vernachlässigt werden kann.

Eine Extrapolation des verwendeten Stufenmodells auf höhere Gasleerrohrgeschwindigkeiten, also größere Wirbelschichthöhen ist nicht zulässig, da der Übergang vom 'uniform bubbling regime' auf das 'churn-turbulent regime', also das Auftreten von radialen Inhomogenitäten mit sehr großen, schnellen Gasblasen in der Nähe der Achse des Wirbelbetts, von Randbedingungen abhängt, die nicht vorhersehbar sind (DARTON/HARRISON 1975).

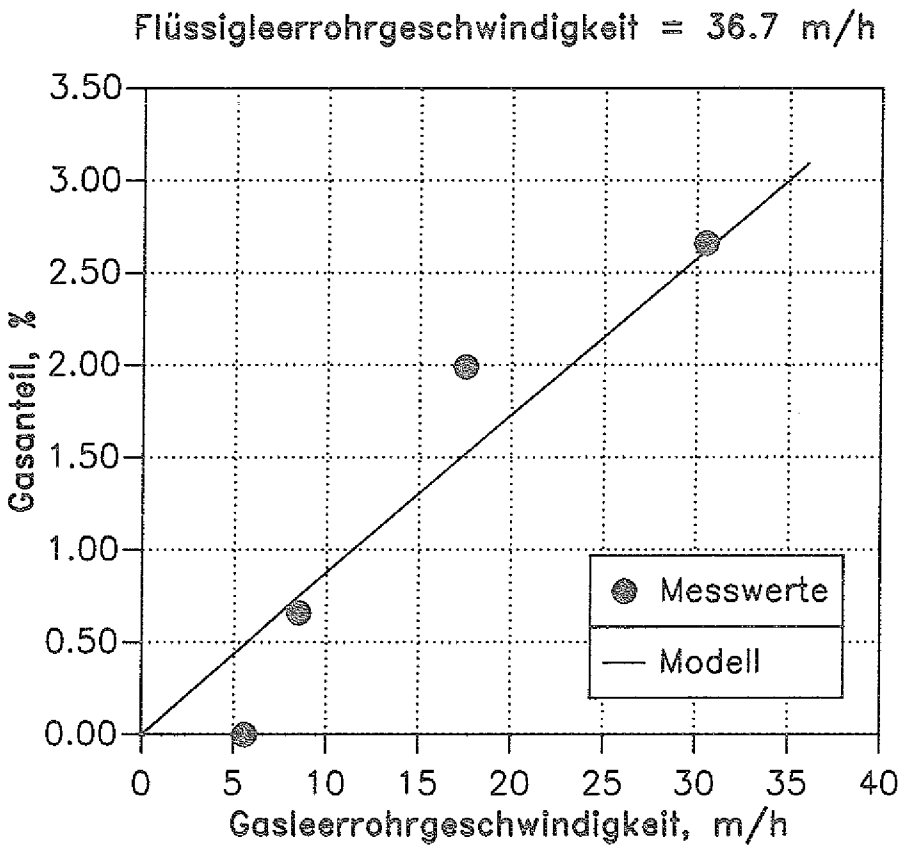


Abb. 6.34: Gemessener und berechneter Gasgehalt in Abhängigkeit der Gasleerrohrgeschwindigkeit im Technikums-Wirbelschichtreaktor

6.4 Diskussion ausgewählter Aspekte

6.4.1 Produktinhibierung

Die Aufnahme der kinetischen Daten von suspendierten *Zymomonas mobilis* Bakterien zeigte den starken Einfluß der Produktinhibierung auf die spezifischen Umsetzungsgeschwindigkeiten von *Zymomonas mobilis*. Insbesondere die Verwertung von höherkonzentrierten Glukosemedien (>150 g/l) zur Ethanolgärung ist im einstufigen kontinuierlichen Prozeß nicht möglich (siehe Abschnitt 6.1).

Zur Überwindung dieser Endprodukthemmung wurden in der Literatur verschiedene Ansätze diskutiert, wobei grundsätzlich zwischen Kaskadierung (POSTEN 1987) und simultaner Produktabtrennung unterschieden werden muß.

Zur simultanen Abtrennung des gebildeten Ethanols werden 'Vakuum-Fermentationen' (CYSEWSKI/WILKE 1977), 'Extraktiv-Fermentationen' (MATSUMURA/MÄRKL 1984) und Adsorptionsmethoden (WALSH et al. 1983), sowie unter Einsatz von Membranen, Perstraktion (MATSUMURA/MÄRKL 1986) und Pervaporation (CHOUDHURY et al. 1985) vorgeschlagen.

Der zusätzliche apparative Aufwand und Energieeinsatz zur simultanen Produktabtrennung muß in erster Linie durch eine starke Reduzierung des Reaktionsvolumens zu rechtfertigen sein. Daneben kann beim Einsatz höher konzentrierter Glukosesubstrate die Reduzierung des Abwasseranfalls (Schlempe) eine nicht unbedeutende Rolle spielen.

Auch der Einsatz der simultanen Ethanolabtrennung bei dem hier entwickelten 2-stufigen Wirbelschichtverfahren könnte die Verwertung höher konzentrierter B-Stärkehydrolysate ermöglichen. Dabei ist es sicherlich sinnvoll, nur den ersten Wirbelschichtreaktor (Leistungsreaktor) mit einer Einheit zur simultanen Abtrennung des Gärprodukts auszustatten, da im zweiten Wirbelschichtreaktor (Umsatzreaktor) die Reaktionsgeschwindigkeit durch das limitierende Substrat bestimmt wird (siehe Abbildung 6.35).

Die eingesetzten Wirbelschichtreaktoren bieten insbesondere für die klassische destillative Ethanolabtrennung Vorteile gegenüber Systemen mit suspendierten Mikroorganismen, da die Gärorganismen immobilisiert vorliegen und somit vor der Destillation keine Abtrennung der Zellen erfolgen muß.

Als wirtschaftliche Randbedingung zum Einsatz der Destillation gilt die Forderung nach einer Mindest-Ethanolkonzentration von 50 g/l im Reaktor (MAIORELLA et al. 1984; ARMSTRONG et al. 1985).

Als weitere Randbedingung zeigten die Untersuchungen zur Stabilität der Ethanolgärung mit *Zymomonas mobilis* im Wirbelschichtreaktor, daß eine hydraulische Verweilzeit in der Gesamtanlage von mehr als 5 Stunden zu Instabilitäten führt.

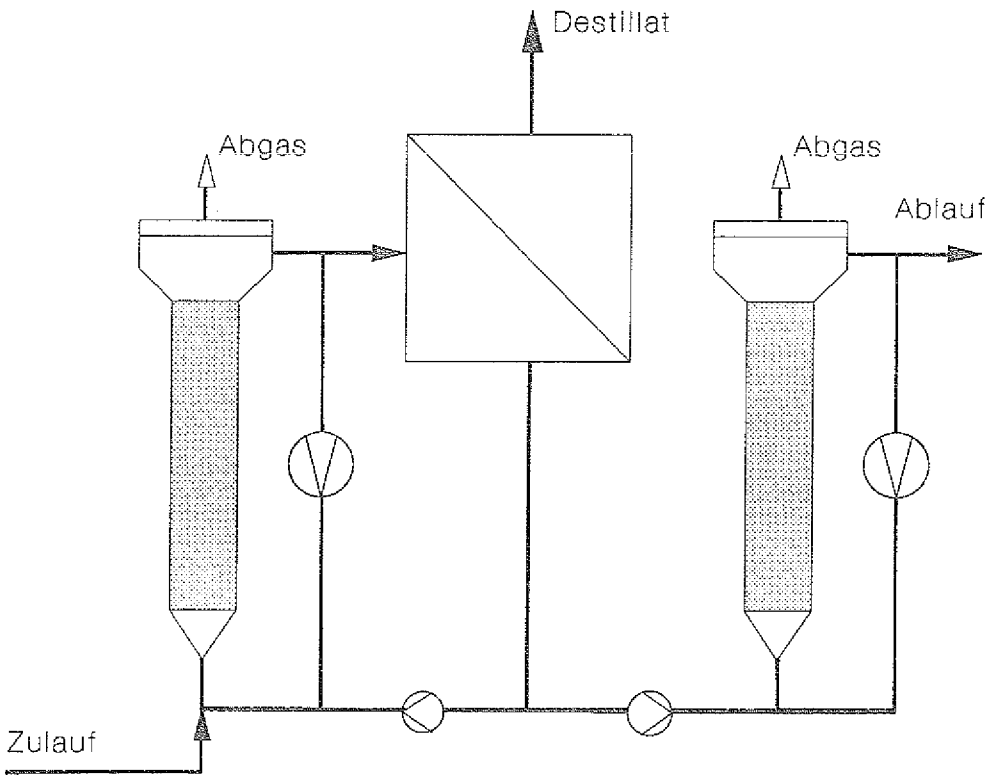


Abb. 6.35: Prinzipskizze 2-stufige Wirbelschichtanlage mit simultaner Ethanolabtrennung

Mit der maximal im Wirbelschichtreaktor bei der Vergärung von B-Stärkehydrolysat erreichten Raum-Zeit-Ausbeute von 20,5 g/(l*h), - die korrespondierende Produktkonzentration lag bei 41 g/l, die Substratkonzentration bei 24 g/l -, läßt sich mit den vorgegebenen Randbedingungen die Zulauf-Glukosekonzentration abschätzen, die gerade noch vollständig in einer solchen Anlage umzusetzen wäre.

Da für die Vergärung des Restzuckeranteils im 2. Wirbelschichtreaktor 2 Stunden Verweilzeit nötig sind (siehe Abschnitt 6.3.2), stehen für den Leistungsreaktor noch 3 Stunden zur Verfügung. Innerhalb von 3 Stunden sind mit oben angenommener maximaler Raum-Zeit-Ausbeute und einer Ethanolselektivität von 43 % 144 g/l Glukose im ersten Wirbelschichtreaktor umsetzbar. Damit könnte maximal eine Zulauf-Glukosekonzentration von lediglich 168 g/l vollständig umgesetzt werden.

Die somit mögliche Steigerung der Zulauf-Glukosekonzentration des B-Stärkehydrolysats um 40-50 g/l Glukose steht in keinem Verhältnis zum Aufwand einer simultanen Ethanolabtrennung, so daß ein solches Konzept bei der insterilen Vergärung von B-Stärkehydrolysat mit immobilisierten *Zymomonas mobilis* Bakterien in 2-stufiger Wirbelschichtanlage nicht sinnvoll erscheint.

6.4.2 Trägergeometrie

Der Wirkungsgrad der Immobilisierung von *Zymomonas mobilis* Bakterien an in der Wirbelschicht eingesetzten offenporigen Sinterglasträgern wurde aufgrund der intrapartikulären Diffusion zu 30 - 50 % bestimmt. Um die immobilisierte Biomasse gut mit Substrat versorgen zu können und somit das Reaktorvolumen besser auszunutzen, wären Partikeldurchmesser von 0,2 bis 0,4 mm notwendig, anstatt der eingesetzten Durchmesser von 1 - 2 mm (siehe Abschnitt 6.2.4).

Die Verringerung des Partikeldurchmessers hätte zunächst den zusätzlichen Vorteil, daß der zur Fluidisierung des Trägermaterials notwendige Energieeintrag vermindert werden könnte.

Allerdings besteht bei der Verringerung der Strömungsgeschwindigkeit in der Wirbelschicht und damit bei einer Verringerung der Scherkräfte, die an der Partikeloberfläche angreifen, die Gefahr eines Biomasseaußenbewuchs. Wie bei der insterilen Fermentation von B-Stärkehydrolysat festgestellt wurde, führt ein solcher Außenbewuchs zur Coimmobilisierung von Kontaminanten, so daß dieser aus Gründen der Stabilität unbedingt vermieden werden muß. Auch der Versuch den Biofilm periodisch mit Inertgas abzuspülen, führt nur zu mäßigem Erfolg (siehe Abschnitt 6.3.1).

Zusätzlich besteht durch die Verringerung der Sedimentationsgeschwindigkeit kleinerer Trägerpartikel die Gefahr des unkontrollierten Trägeraustrags insbesondere bei hoher Gasproduktion.

7. Zusammenfassung

Um den wirtschaftlichen Herausforderungen der technischen Ethanolgärung - hohe Kapitalkosten und hoher Rohmaterialverbrauch - gerecht zu werden, muß die Entwicklung eines neuen Verfahrens zur mikrobiellen Ethanolerzeugung folgenden Anforderungen genügen:

- **Erzielung hoher Raum-Zeit-Ausbeuten,**
- **insterile Vergärung von billigen Abfallsubstraten und**
- **vollständige Umsetzung zu Ethanol.**

Hierzu wurde ein **kontinuierliches Wirbelschichtverfahren** entwickelt, bei dem der Biokatalysator, das anaerobe Bakterium *Zymomonas mobilis*, in offenporigen Sinterglasträgern immobilisiert wird. Diese Immobilisierung, die auf der natürlichen Eigenschaft des eingesetzten Organismus zur Anheftung an Oberflächen beruht, muß unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden.

Nachdem das Trägermaterial in der primären **sterilen Kolonisierungsphase** vollständig mit *Zymomonas mobilis* Bakterien besiedelt wurde, kann die eigentliche **insterile Produktionsphase** mit der Vergärung von Abfallsubstrat folgen.

Die Stabilität des entwickelten Wirbelschichtverfahrens beruht auf der durch die Akkumulation von *Zymomonas mobilis* Bakterien im Wirbelschichtreaktor möglichen kurzen Verweilzeit der Flüssigphase im Reaktor, da ständig mit dem Zulauf eingeschleppte Kontaminanten wieder ausgespült werden.

Da sich durch die Aufkonzentrierung der eingesetzten Mikroorganismen zu hohen lokalen Zelldichten im Trägermaterial die Reaktionsordnung des Prozesses aufgrund von Stofftransportlimitierungen erhöht, ist reaktionstechnisch eine **Kaskadierung von Wirbelschichtreaktoren** notwendig, um hohe Raum-Zeit-Ausbeuten bei nahezu vollständigem Umsatz zu erzielen.

Die reaktionstechnischen Untersuchungen zur Ethanolgärung mit immobilisierten *Zymomonas mobilis* Bakterien wurden in speziell entwickelten, autoklavierbaren 2,2 l Labor-Wirbelschichtreaktoren und 55 bzw. 50 l Technikums-Wirbelschichtreaktoren durchgeführt. Zur Prozeßsteuerung und -regelung der Wirbelschichtanlagen wurde eine on-line Analytik für das Substrat Glukose (on-line Polarimeter) und das Produkt Ethanol (on-line Gaschromatograph) implementiert, sowie ein Personal Computer als Prozeßrechner eingesetzt.

Im einzelnen konnten bei dieser Verfahrensentwicklung zur kontinuierlichen Vergärung von B-Stärkehydrolysat mit *Zymomonas mobilis* Bakterien folgende Ergebnisse erzielt werden:

- Die **rechnergesteuerte Kolonisierung** der Sinterglasträger im Wirbelschichtreaktor mit *Zymomonas mobilis* war innerhalb von **3,5 bis 4 Tagen** möglich. Dies ist eine Verkürzung der Kolonisierungsphase auf 1/3 der manuellen Kolonisierungsdauer.

- Die nach der Kolonisierung erreichten Beladungsdichten des Sinterglasmaterials mit *Zymomonas mobilis* von 120 -140 g Biomasse / kg Träger entsprechen einer Biomassekonzentration im Reaktor von **24 - 27 g BTM/l**, was einer 11 - 13 fachen Steigerung gegenüber der maximal im kontinuierlichen Rührkesselreaktor erzielbaren Biomassekonzentration entspricht.

- Bei der kontinuierlichen Vergärung von synthetischem Glukosemedium mit 120 g/l Glukose konnten im Wirbelschichtreaktor **Raum-Zeit-Ausbeuten von über 50 g/(l*h) bei Verweilzeiten unter einer Stunde** erreicht werden. Dies entspricht einer Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute gegenüber dem kontinuierlich betriebenen Rührkessel um den Faktor 5.

- Die Vergärung von Zulauf-Glukosekonzentrationen größer als 150 g/l führt bei langen Verweilzeiten zu dauerhaften Oszillationen der Substrat- und Produktkonzentrationen. Dabei wurde als maximale, instationäre Produktkonzentration ein Wert von über **100 g/l Ethanol** im Ablauf gemessen.

- Der Wirkungsgrad der Immobilisierung von *Zymomonas mobilis* in Sinterglaskugeln mit einem Durchmesser von 1-2 mm im Wirbelschichtreaktor ist abhängig vom jeweiligen Betriebszustand (Glukose-, Ethanolkonzentration im Reaktor). Bei Umsätzen unter 80 % wurde ein **gesamter Wirkungsgrad von 10 - 20 %** gemessen, wobei der Wirkungsgrad aufgrund der intrapartikulären Diffusion zu 30-50 % berechnet wurde. Der stark vereinfachte Modellansatz zur Beschreibung der intrapartikulären Diffusion beschreibt das tatsächliche Verhalten befriedigend bei Umsätzen über 80%.

- Durch eine **Kaskadierung** von 2 Wirbelschichtreaktoren läßt sich bei **99 % Umsatz** die **Raum-Zeit-Ausbeute** gegenüber dem einzelnen Wirbelschichtreaktor auf über **30 g/(l*h)** verdoppeln, was gegenüber dem kontinuierlichen Rührkessel eine Steigerung um den Faktor 3,5 bedeutet (siehe Abbildung 7.1). Dabei wird der erste Wirbelschichtreaktor, der 'Leistungsreaktor', bei maximaler Raum-Zeit-Ausbeute betrieben, während im 2. Wirbelschichtreaktor, dem 'Umsatzreaktor', die restliche Glukose bei dann entsprechend geringer Umsetzungsgeschwindigkeit vollständig zu Ethanol umgesetzt wird.

- Bei der **insterilen Vergärung von B-Stärkehydrolysat** mit *Zymomonas mobilis* im Labor-Wirbelschichtreaktor (insterile Produktionsphase) wird wie im kontinuierlichen Rührkessel eine **Halbierung der Reaktionsgeschwindigkeit** gegenüber dem synthetischen Glukosemedium beobachtet.

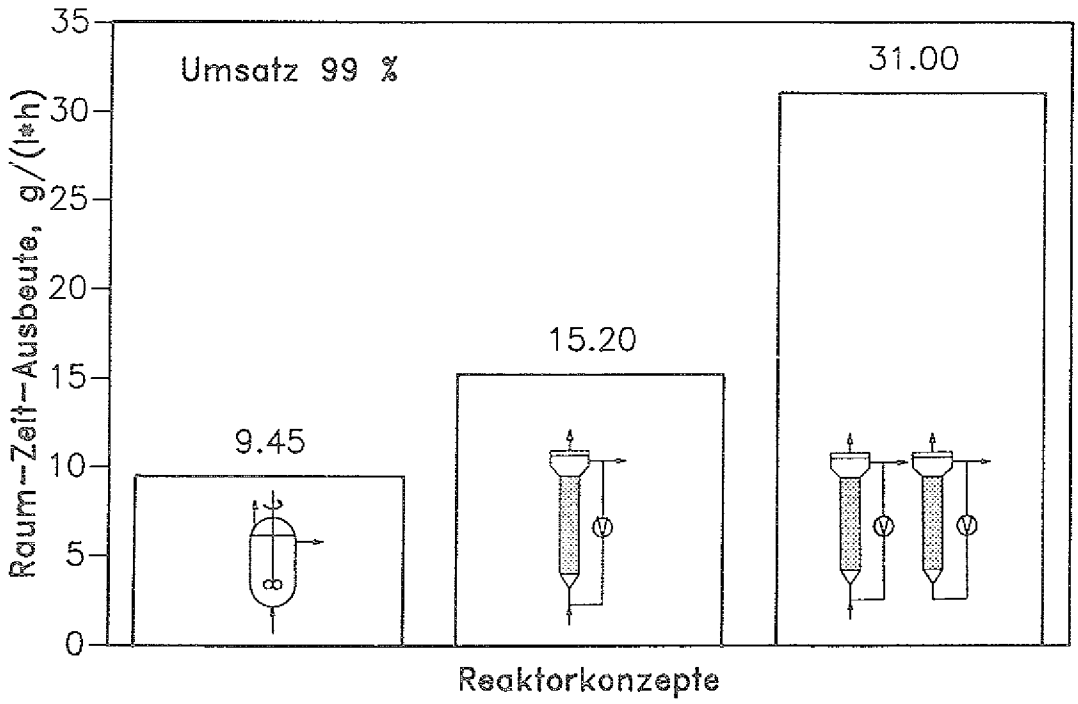


Abb. 7.1: Leistungsvergleich unterschiedlicher Reaktorkonzepte (Zulauf-Glukosekonzentration 120 g/l, Umsatz 98-99 %).

- Die **Selektivität** der Ethanolbildung sinkt bei der insterilen Umsetzung von B-Stärkehydrolysat im Wirbelschichtreaktor aufgrund der Bildung des Kontaminationsprodukts Laktat um 5 % auf Werte zwischen **40 - 45 %** ab. Eine mehrmonatige, insterile Dauerfermentation von B-Stärkehydrolysat ist ohne Instabilitäten möglich.

- Bei Untersuchungen zur Stabilität der insterilen Vergärung von B-Stärkehydrolysat im Wirbelschichtreaktor zeigte sich, daß bei **Verweilzeiten unter 5 h keine Instabilitäten** durch Infektionen, insbesondere durch laktatbildende Mikroorganismen, zu erwarten sind.

- **Instabile Betriebszustände**, charakterisiert durch ein stetiges Ansteigen der Laktatkonzentration auf Werte oberhalb der vollständigen Wachstumsinhibierungsgrenze für *Zymomonas mobilis* von 30 g/l, können **durch kurze Verweilzeiten** und wenig kontaminiertes Substrat wieder **stabilisiert** werden.

- Die **semisterile** Ausführung der **Kolonisierungsphase** in der Technikums-Wirbelschichtanlage führt zur Coimmobilisierung von Kontaminanten im Sinterglas, was eine **langsame Destabilisierung** bewirkt. Die Ethanolselektivität sinkt dabei durchschnittlich um 3,6 % pro Monat.

- Die **Fermentations-Ergebnisse** der Labor-Wirbelschichtanlage konnten bei der Vergärung von hydrolysierter B-Stärke **in der um den Faktor 25 vergrößerten Technikums-Wirbelschichtanlage** mit einer Abweichung von 10 % **reproduziert** werden.

- Durch Abschätzung und Messung des **Gasgehalts in den Wirbelschichtreaktoren (maximal 3 %)** konnte die Verringerung des aktiven Reaktionsvolumens durch den erhöhten Gasgehalt im maßstabsvergrößertem Wirbelschichtreaktor als Ursache der geringeren Leistung praktisch ausgeschlossen werden.

- **In der 2-stufigen Technikums-Wirbelschichtanlage mit einem Totalvolumen von 105 l konnte bei der nahezu vollständigen, insterilen Vergärung von hydrolysierter B-Stärke mit einem Glukosegehalt von 120 g/l die Raum-Zeit-Ausbeute gegenüber dem industriell eingesetzten, steril betriebenen kontinuierlichen Rührkesselverfahren verdreifacht und die Verweilzeit und damit das Reaktorvolumen um den Faktor 3,5 verkürzt werden (siehe Tab. 7.1).**

	kontinuierlicher Rührkessel	2-stufige Technikums-Wirbelschichtanlage
Glukose im Zulauf, g/l	120*	118,2
Umsatz, %	99*	98,5
Verweilzeit, h	**12,5-16,7***	**4,25**
Raum-Zeit-Ausbeute, g/(l*h)	**3,5-4,5***	**12,4**
Ethanol im Ablauf, g/l	56,2-58,5**	49,4
Selektivität, g/g	0,47-0,49**	0,42

Tab. 7.1: Betriebsdatenvergleich bei der Vergärung von B-Stärkehydrolysat, (*) BRINGER/SAHM 1987, (**) aus den Literaturangaben berechnete Werte.

8. Symbolverzeichnis

Lateinische Buchstaben:

Symbol	Dimension	Bedeutung
A	m^2	Fläche
C	g/l	Konzentration
D	1/h	Verdünnungsrate
d	m	Durchmesser
D	m^2/s	Diffusionskoeffizient
e	-	Volumenanteile
Fv	l/h	Volumenstrom
g	m/s^2	Erdbeschleunigung
Gr	-	Grashofzahl
h	m	Höhe
k	g/(g*s)	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
K	g/l	Langmuir-Konstante
K1	mol/l	1. Dissoziationskonstante des Kohlensäure-Gleichgewichts
K2	mol/l	2. Dissoziationskonstante des Kohlensäure-Gleichgewichts
Kh	$mol/(m^3*bar)$	Henry-Konstante
Ki	g/l	Inhibierungskonstante
Kp	-	Verstärkungsfaktor
Ks	g/l	Monod-Konstante
m	g/(g*h)	maintenance-Faktor
M	kg	Masse
n	-	Umlaufzahl
OD(660)	-	Optische Dichte bei 660 nm
P	bar	Druck
p	bar	Partialdruck
pH	-	Wasserstoffionenaktivität
Po	bar	hydrostatischer Druck ohne Gasanteil
q	g/(g*h)	spez. Umsetzungsgeschwindigkeit
r	m	Radius
R	m	Radius des Zellaggregats
RZA	g/(l*h)	Raum-Zeit-Ausbeute
Sc	-	Schmidt-zahl
Sh	-	Sherwoodzahl
t	h	Zeit
T	°C	Temperatur
T0	s	Abtastzeit
Td	s	Differenzierzeit
Ti	s	Integrierzeit
U	%	Umsatz
u	m/h	Leerrohrgeschwindigkeit
v	g/(l*s)	Reaktionsgeschwindigkeit

Symbol	Dimension	Bedeutung
V	l	Volumen
w	-	Führungsgröße
x	-	Meßgröße
y	-	Stellgröße
Y	g/g	Ertragskoeffizient

Griechische Buchstaben:

Symbol	Dimension	Bedeutung
Ç	-	normierte Konzentration
μ	1/h	Wachstumsgeschwindigkeit
n	kg/(m*s)	dynamische Viskosität
o	kg/m^3	Dichte
τ	h	Verweilzeit
ß	m/s	Stoffübergangszahl
θ	-	normierte Zeit
Ø	-	Thiele-Modul
∈	%	Porosität
∩	%	Wirkungsgrad

Indizes, tiefgestellt:

Symbol	Bedeutung
0	0. Ordnung
0	Zulauf
1	1. Ordnung
b	bulk
Bett	expandiertes Wirbelbett
e	effektiv
ein	am Eintritt
fix	immobilisiert
G	Gasphase
gem	gemessen
glas	Sinterglas
i	Komponente i
krit	kritisch
l	Flüssigphase
max	maximal
opt	optimal

Symbol	Bedeutung
P	Poren
p	Produkt
R	Radius Zellaggregat
rel	relativ
S	Feste Phase
s	Substrat
start	zu Beginn
w	Wasser
x	Biomasse

9. Literatur

Aivasidis, A. (1987): Biotechnologische Prozesse. Materialsammlung zur Vorlesung.

Aivasidis, A. (1989): Jahresabschlußbericht 1989, Jülich.

Aivasidis, A. (1989): Process development for anaerobic waste water treatment using porous carriers for microbial colonization. Bioprozess Engineering, 4, 19-25.

Armstrong, D.W.; Martin, S.M.; Yamazaki, H. (1985): Biological production of economically-recoverable products from dilute ethanol streams.

Ault, R.G. (1965): Spoilage bacteria in brewing - a review. J. Inst. Brew. London, 71, 376-391.

Bailey, J.E.; Ollis, D.F. (1986):Competition - survival of the fittest, from: Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw-Hill, New York, 864-871.

Bajpai, P.K.; Margaritis, A. (1985): Kinetics of ethanol production by immobilized cells of *Zymomonas mobilis* at varying D-glucose concentrations. Enzyme Microb. Technology, Vol. 7, 462-464.

Bajpai, P.K.; Margaritis, A. (1986): Effect of temperature and pH on immobilized *Zymomonas mobilis* for continuous production of ethanol. Biotechnology and Bioengineering, 28, 824-828.

Barrow, K.D.; Collins, J.G.; Rogers, P.L. (1984): The structure of a novel polysaccharide isolated from *Zymomonas mobilis* determined by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Eur. Journal Biochem. 145, 173-179.

Bergter, F (1983): Wachstum von Mikroorganismen. VCH Weinheim.

Bringer, S. (1983): Ethanolfermentation mit *Zymomonas mobilis*. Vortrag Dechema Jahrestagung 1983, Frankfurt.

Bringer, S.; Finn, R.K.; Sahm, H. (1984): Effect of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol 139, 376-381.

Bringer, S.; Sahm, H. (1985): Ethanolproduktion mit Bakterien. Jahresbericht 1984/85 der KFA-Jülich GmbH, 31-36.

Bringer, St.; Sahm, H.; Swyzen, W. (1984): Ethanol production by *Zymomonas mobilis* on an industrial scale. Biotechnology and Bioengineering Symposium, No. 14, 311-319.

Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. (1988): Metabolic shifts in *Zymomonas mobilis* in responce to growth conditions. FEMS Microbiology Reviews 54, 131-142.

Bringer-Meyer, S.; Scollar, M.; Sahm, H. (1985): *Zymomonas mobilis* mutants blocked in fructose utilization. Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, 134-139.

Büchs, J. (1988): Immobilisierung von aeroben Mikroorganismen an Glassintermaterial am Beispiel der L-Leucin-Produktion mit Corynebacterium glutamicum. Dissertation TU Hamburg-Harburg.

Calibo, R.L.; Matsumura, M.; Kataoka, H. (1989): Continuous ethanol fermentation of concentrated sugar solutions coupled with membrane distillation using a PTFE module. Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 67, No. 1, 40-45.

Castellar, M.R.; Borrego, F.; Canovas, M.; Manjon, A.; Iborra, J.L. (1989): Stability against stop and flow of an immobilized *Zymomonas mobilis* bioreactor. Biotechnology Letters, Vol. II, No. 9, 665-668.

Choudhury, J.P.; Ghosh, P.; Guha, B.K. (1985): Separation of ethanol from ethanol-water mixture by reverse osmosis. Biotechnol. Bioeng., 27, 1081-1084.

Cysewski, G.R.; Wilke, C.R. (1977): Rapid ethanol fermentations using vacuum and cell recycle. Biotechnol. Bioeng., 19, 1125-1143.

D'Ans Lax (1967): Taschenbuch für Chemiker und Physiker Band 1: Makroskopische physikalisch-chemische Eigenschaften. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.

Dadds, M.J.S. (1972): Detection and survival of *Zymomonas* in breweries, Ph.D.thesis. University of Bath, Bath, U.K..

Darton, R.C.; Harrison, D. (1975): Gas and liquid hold-up in three-phase fluidization. Chemical Engineering Science, Vol. 30, 581-586.

Dellweg, H. (1987): Biotechnologie - Grundlagen und Verfahren. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

Einsele; Finn; Sahmhaber (1985): Mikrobiologische und Biochemische Verfahrenstechnik. VCH, Weinheim.

Eysmondt, J.von (1990): Einsatz der Elektrodialyse bei der anaeroben Essigsäure-Produktion. Dissertation Universität Bonn.

Fan, L.S.; Leyva-Ramos, R.; Wisecarver, K.D.; Zehner, B.J. (1990): Diffusion of phenol through a biofilm grown on activated carbon particles in a draft-tube three-phase fluidized-bed bioreactor. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 35, 279-286.

Fein, J.E.; Charley, R.C.; Hopkins, K.A.; Lavers, B.; Lawford, H.G. (1983): Development of a simple defined medium for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Biotechnology Letters, Vol. 5, No. 1, 1-6.

Fletcher, M.; Latham, M.J.; Lynch, J.M.; Rutter, P.R. (1985): The characteristics of interfaces and their role in microbial attachment. From: Bacterial Adhesion - Mechanisms and physiological significance. Plenum Press, New York London.

Frost & Sullivan Inc. (1989): Biotechnologie und die europäische chemische Industrie. Biotechforum 6, 2, 66.

Ghommidh, C.; Vaija, J.; Bolarinwa, S.; Navarro, J.M. (1989): Oscillatory behaviour of *Zymomonas mobilis* in continuous cultures: A simple stochastic model. Biotechnology Letters, Vol. 2, No. 9, 659-664.

Giesecke, U. (1987): Optimierprogramm OPTI.

Goodman, A.E.; Rogers, P.L. (1985): Hydrogen sulphide production by Zymomonas and its elimination in a mutant strain. Journal of biotechnology, 2, 87-93.

Grote, W.; Rogers, P.L. (1985): The susceptibility to contamination of a *Zymomonas mobilis* process for ethanol production. Journal of Fermentation Technology, Vol.63, No 3, 287-290.

Hacking, A.J. (1986): Economic aspects of biotechnology. Cambridge studies in Biotechnology, 3, Cambridge University Press, Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney.

Hartmann, L. (1989): Biologische Abwasserreinigung. 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo.

Heijnen, J.J. (1985): Anwendung der anaeroben Wirbelschichttechnik in der biologischen Abwasserreinigung. gwf-wasser/abwasser 126, 2, 81-88.

Huang, S.-Y.; Chen, J.-C. (1988): Analysis of the kinetics of ethanol fermentation with *Zymomonas mobilis* considering temperature effect. Enzyme Microb. Technol., 10, 431-439.

Isermann, R. (1987): Digitale Regelsysteme, Band 1. Springer Verlag, Berlin.

Jöbses, I.M.L.; Egberts, G.T.C.; Luyben, K.C.A.M.; Roels, J.A. (1986): Fermentation kinetics of *Zymomonas mobilis* at high ethanol concentrations: oscillations in continuous cultures. Biotechnology and Bioengineering, 28, 868-877.

Jöbses, I.M.L.; Roels, J.A. (1985): The inhibition of the maximum specific growth and fermentation rate of *Zymomonas mobilis* by ethanol. Biotechnol. Bioeng., 28, 554-563.

Joksch, B. (1988): Simulationsprogramm STESTA.

Karel, S.F.; Libicki, S.B.; Robertson, C.R. (1985): The immobilization of whole cells: engineering principles. Chemical Engineering Science, Vol. 40, No. 8, 1321-1354.

Kasche, V.; Buchholz, K. (1979): Mass transfer Influence on effectiveness, in Characterization of immobilized biokatalysts, Dechema Monographs 84, Verlag Chemie Weinheim, New York.

Keim, P. (1990): Wirbelschichtreaktoren für die anaerobe Abwasserreinigung mit porösem Sinterglas als Trägermaterial. Dissertation Universität Bonn.

Klein, J.; Kressdorf, B. (1986): Rapid ethanol fermentation with immobilized *Zymomonas mobilis* in a three stage reactor system. Biotechnology Letters, Vol. 8, No. 10, 739-744.

Kobayashi, T.; Ohmiya, K.; Shimizu, S. (1976): Approximate expression of effectivness factor for immobilized enzymes with Michaelis Menten kinetics. Journal of Fermentation Technol. 54, 260-263.

Köpcsenyi, I. (1990): Reaktionstechnische Untersuchungen zur kontinuierlichen Ethanolfermentation in Wirbelschichtreaktoren. Diplomarbeit Fachhochschule Aachen.

Kosaric, N.; Wieczorek, A.; Cosentino,G.P.; Magee, R.J.; Prenosil, J.E. (1983): Ethanol fermentation. in Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 volumes. ed. by H.-J. Rehm and G. Reed.Verlag Chemie, Weinheim Deerfield Beach, Florida Basel, 257-386.

Koutinas, A.A.; Kanellaki, M.; Lykourghiotis, A.; Typas, M.A.; Drainas, C. (1988): Ethanol production by *Zymomonas mobilis* entrapped in allumina pellets. Appl. Microbiol. Biotechnology, 28, 235-239.

Levenspiel, O. (1980): The Monod equation: A revisit and a generalization to product inhibition. Biotechnol. Bioeng. 22, 1671-1687.

Loosdrecht, M.C.M.van; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa, G.; Zehnder, A.J.B. (1987): Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. Appl. and Envir. Mikrobiology, Vol.53, No.8, 1898-1901.

Lyons, T.P. (1984): Industrial uses of yeast in the production of fuel ethanol. Dev. in Industrial Microbiology, Vol. 25, 231-243.

Maiorella, B.L.; Blanch, H.W.; Wilke, C.R. (1984): Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. Biotechnol. Bioeng. Vol.26, 1003-1025.

Marshall, K.C. (1985): Mechanismens of bacterial adhesion at solid-water interfaces. Bacterial adhesion, edited by Savage, D.C. and Fletcher, M., Plenum Press, Ney York, London.

Matsumura, M.; Märkl, H. (1984): Application of solvent extraction to ethanol fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 20, 371-377.

Matsumura, M.; Märkl, H. (1986): Elimination of ethanol inhibition by perstraction. Biotechnol. Bioeng., 28, 434-451.

Monbouquette, H.G.; Ollis, D.F. (1986): A structured model for immobilized cell kinetics. Annals New York Academy of Science, 230-244.

Moo-Young, M.; Blanch, H.W. (1981): Design of biochemical reactors - mass transfer criteria for simple and complex systems, from Advances in Biochemical Engineering, 19, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1-69.

Moser, A. (1988): Bioprocess Technology. Springer Verlag, New York, Wien.

Mozes, N.; Marchal, F.; Hermesse, M.P.; Van Haecht, J.L.; Reuliaux, L.; Leonard, A.J.; Rouxhet, P.G. (1987): Immobilization of microorganismens by adhesion: Interplay of electrostatic and nonelectrostatic interactions. Biotechnol. Bioeng. 30, 439-450.

Muroyama, K.; Fan, L.S. (1985): Fundamentals of gas-liquid-solid fluidization. AIChE Journal, Vol.31, No.1, 1-34.

Mustranta, A.; Pere, J.; Poutanen, K. (1987): Comparison of different carriers for adsorption of saccharomyces cerevisiae and *Zymomonas mobilis*. Enzyme Microb. Technol., Vol. 9, 272-276.

Peinke, W. (1981): Der Regelkreis. Messen, Steuern und Regeln in der chemischen Technik, Herausgeber: J. Hengstenberg, B. Sturm, O. Winkler, Band 3, 3. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.

Phillips,C.R.; Poon, Y.C. (1988): Immobilization of Cells. Biotechnology Monographs - Springer Verlag Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo.

Pirt, S.J. (1975): Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Poersch, W. (1963): Sorptionsisothermen - Ihre Ermittlung und Auswertung. Stärke 15, Nr.11, 405-412.

Posten, C. (1987): Modellierung und Anlagenoptimierung der Ethanolfermentation mit *Zymomonas mobilis*. VDI Fortschrittsberichte, Reihe 17 Biotechnik, Nr. 38, VDI Verlag Düsseldorf.

Rainbow, C. (1971): Spoilage organisms in breweries. Process Biochem., 6, 15-18.

Rehr,B.; Sahm, H. (1990): Bildung von Sorbit und Gluconsäure mit dem Ethanol-produzierendem Bakterium *Zymomonas mobilis*. forum microbiologie, 3/90, 166-169.

Rogers, P.L.; Lee, K.J.; Skotnicki, M.L.; Tribe, D.E. (1982): Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Advances in Biochemical Engineering 23, Microbial reactions. Springer Verlag, 37-85.

Rouxhet, P.G.; Mozes, N.; van Haecht, J.L.; Reuliaux, L.: Palm Gennen, M.H. (1984): Immobilization of microbial cells by adhesion to a support. Eur. Congr. Biotechnol., 3rd, Vol. 1, 319-325.

Sahm, H.; Bringer-Meyer, St. (1987): Ethanol-Herstellung mit Bakterien. Chem.-Ing.-Tech. 59, Nr.9, 695-700.

Schäfer, H.; Deger, H.M. (1989): Große Schlaufenfermenter - Einsatz bei der kontinuierlichen Ethanolgewinnung. BTF Biotech-Forum 6, 3 , 162-166.

Schlegel, H.G. (1985): Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

Schügerl, K. (1985): Bioreaktionstechnik Band 1 Grundlagen, Formalkinetik, Reaktortypen und Prozeßführung. Otto Salle Verlag, Frankfurt a.M.; Verlag Sauerländer, Aarau.

Schürbüscher, D. (1990): Rechnergestützte Optimierung und Prozeßführung kontinuierlicher biotechnischer Prozesse untersucht am Beispiel der anaeroben Abwasserreinigung. Dissertation, RWTH Aachen.

Sontheimer, H.; Spindler, P.; Rohmann, U. (1980): Wasserchemie für Ingenieure. DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut, Karlsruhe.

Steinke, M. (1987): MEAS-Benutzerhandbuch. Ingenieurbüro für Datentechnik, Dipl.-Ing. W. Horbach.

Stevnsborg, N.; Lawford, H.G.; Martin, N.; Beveridge, T. (1986): Effect of growth temperature on the morphology and performance of *Zymomonas mobilis* ATCC 29 191 in batch and continuous culture. Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 116-123.

Striegel, B. (1989): Modellierung der Hydrodynamik von 3-Phasenwirbelschichten mit über der Höhe variablem Gasstrom für den Einsatz in der anaeroben Abwasserreinigung. Studienarbeit, RWTH Aachen.

Sutherland, I.W. (1985): Polysaccharides in the adhesion of marine and freshwater bacteria. From: Bacterial Adhesion - Mechanisms and physiological significance. Plenum Press, New York London.

Swings,J.; De Ley,J. (1977): The biology of *Zymomonas mobilis*. Bacteriological Reviews, Vol 41, No1, 1-46.

Swyzen; Brüggemann (1990): Persönliche Mitteilung.

Tramm-Werner, S. (1987): Ethanolgewinnung mit einer flockenden Mutante von *Zymomonas mobilis* und immobilisierten Glycosidhydrolasen. Dissertation RWTH Aachen.

Viikari, L. (1986): By-product formation in ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. Dissertation, Technical Research Centre of Finland, Publication 27.

Vos, H.J.; Heederik, J.J.; Potters, J.J.M.; Luyben, K.Ch.A.M. (1990): Effectiveness factor for spherical biofilm catalysts. Bioprocess Engineering 5, 63-72.

Walsh, P.K.; Liu, C.P.; Findley, M.E.; Liapis, A.I.; Siehr, D.J. (1983): Ethanol seperation from water in a two stage adsorption process. Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 13, 629-647.

Wandrey, C. (1984): Reaktionstechnik. Materialsammlung zur Vorlesung.

Yamane, T. (1981): On approximate expressions of effectivness factors for immobilized biocatalysts. J. Ferment. Technol. 59, 375-381.

10. Anhang

10.1 Biomassebestimmung in Sinterglas

Der Biomassegehalt im Trägermaterial wird indirekt durch Bestimmung des Kohlenstoff- und Stickstoffgehalts des kolonisierten Sinterglases ermittelt. Zuvor wird die Elementarzusammensetzung der Biomasse bestimmt, so daß ein Rückschluß auf die Biomassekonzentration im Träger möglich ist.

Zur Analyse werden etwa 5 g bewachsenes Trägermaterial dem Wirbelschichtreaktor entnommen und 4 mal mit 0,5 % NaCl-Lösung gespült, bevor der Träger im Trockenschrank bei 95 °C getrocknet wird. Danach werden die getrockneten Sinterglaskugeln in einer Kugelmühle zu einem feinen Pulver zermahlen.
Die Bestimmung des C-gehalts erfolgt über IR-Spektroskopie nach Verbrennung im Sauerstoffstrom (System LECO), während der N-gehalt mit der Methode nach Kjehldahl gemessen wird.

In Tabelle 10.1 ist das Ergebnis der Elementaranalyse von suspendierten Zymomonas mobilis Bakterien wiedergegeben (Angaben in Gewichtsprozent, falls nichts anderes angegeben):

Element	Konzentration
Kohlenstoff	38,6 % 39,3 %
Stickstoff	10,9 %
Phosphor	1,96 %
Schwefel	0,381 %
Wasserstoff	7,01 %
Kalium	0,31 %
Magnesium	0,33 %
Eisen	205 ppm

Tab. 10.1: Elementaranalyse von Zymomonas mobilis aus synthetischem Glukosemedium

Damit wird das Elementverhältnis:

C : N : P : S = 1 : 0,282 : 0,051 : 0,0099

In Tabelle 10.2 sind die Ergebnisse der C- und N-Bestimmungen der einzelnen Sinterglasproben aus unterschiedlichen Fermentationsläufen mit synthetischem Glukosemedium und die daraus berechneten Biomassekonzentrationen wiedergegeben. Die letzte Probe (B) stammt aus einem mit B-Stärkehydrolysat betriebenen Wirbelschichtreaktor, bei dem Außenbewuchs am Trägermaterial beobachtet wurde.

Probe	C, g/kg	N, g/kg	Biomasse aus C, g/kg	Biomasse aus N, g/kg
1	57,3	13,6	146,9	124,8
2	50,3	11,9	128,9	109,2
3	52,5	12,9	134,6	118,3
4	51,8	12,9	132,8	118,3
5	52,0	13,2	133,3	121,1
6	55,6	14,1	142,6	129,4
7	55,6	14,2	142,6	130,3
8	57,0	15,9	146,2	145,9
Mittelwert			138,0	124,7
(B	92,8	24,0	238,0	220,2)

Tab. 10.2: Biomassebestimmung in Sinterglas

10.2 Umsatzregelung der Wirbelschichtanlage

Zur optimalen Kolonisierung der Sinterglaskörper in der Wirbelschicht war ein Umsatzregler erforderlich, der durch Variation der Verweilzeit im Wirbelschichtreaktor den Umsatz auf einen festen vorgegebenen Wert einregeln sollte.

Unter einer Regelung versteht man die gezielte Beeinflussung eines dynamischen Prozesses während des Prozeßablaufs. In der regelungstechnischen Terminologie wird der Prozeß als Regelstrecke bezeichnet und die zu regelnde Prozeßgröße als Regelgröße. Die von einer Meßeinrichtung erfaßte Regelgröße (Ist-Wert) wird mit der Führungsgröße (Soll-Wert) verglichen und die resultierende Regelabweichung dient dem eigentlichen Regler zur Veränderung der Stellgröße. Ein solcher Regelkreis ist in Abbildung 10.1 dargestellt, wobei neben der regelungstechnischen Terminologie die für die Umsatzregelung der Wirbelschichtanlage entsprechenden Größen angegeben sind.

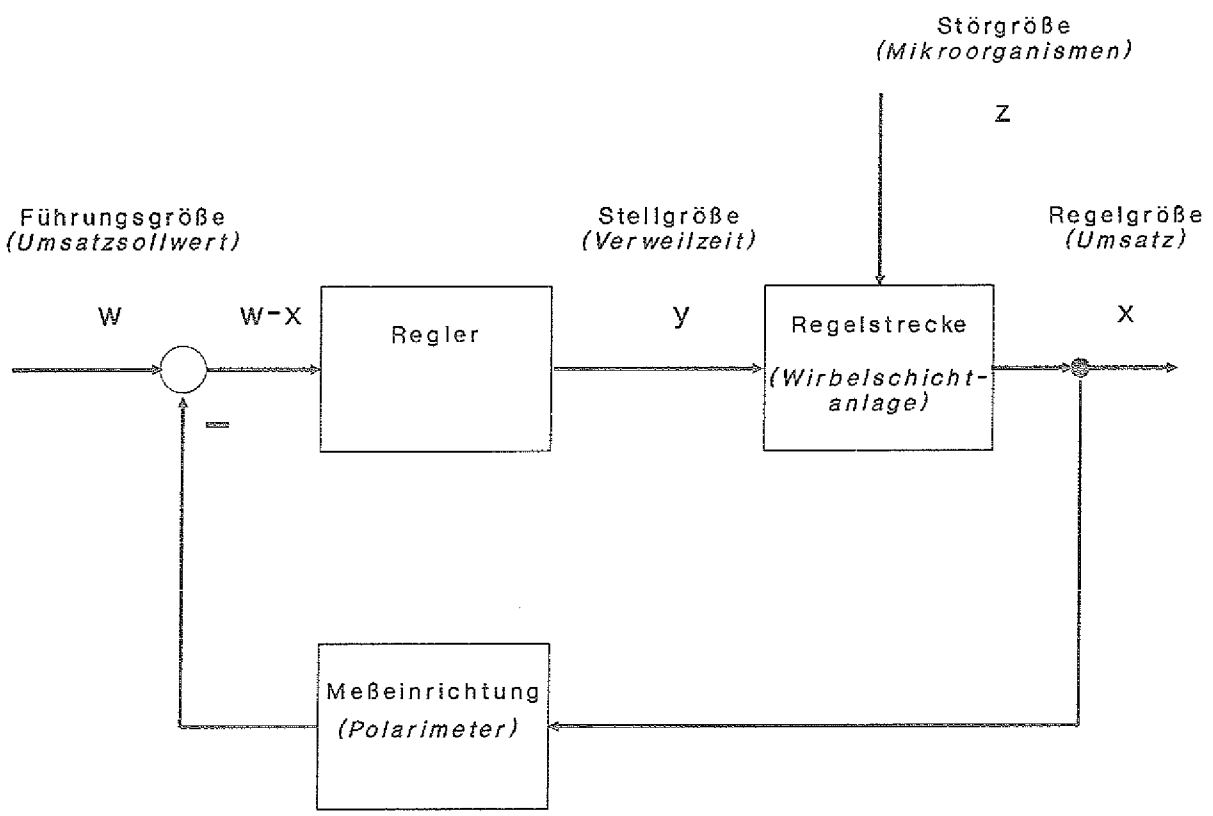


Abb. 10.1: Regelkreis Umsatzregelung der Wirbelschichtanlage

Standardmäßig werden in der Anlagentechnik Regler nach ihrem Übertragungsverhalten bezeichnet, also nach der Art, wie die Stellgröße bei einer Änderung der Regelabweichung verändert wird. Im einfachsten Fall sind dies Linearkombinationen aus proportional wirkenden Reglern (P-Regler), integral wirkenden Reglern (I-Regler) und differential wirkenden Reglern (D-Regler). Die Sprungantworten der einzelnen Reglertypen auf eine Änderung der Regelgröße sind in Abbildung 10.2 wiedergegeben.

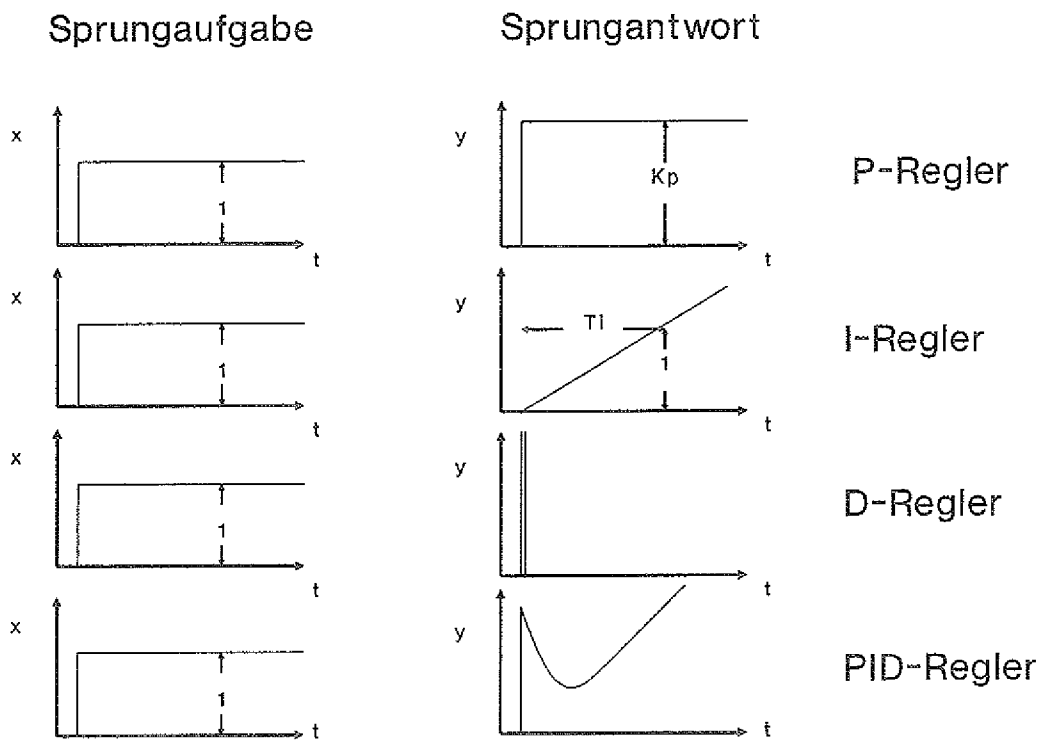


Abb. 10.2: Sprungantworten von P-, I-, D-, PID-Reglern

Die Gleichung eines Reglers mit PID-Verhalten ist im folgenden wiedergegeben:

$$u(t) = Kp * [\, e(t) \quad + 1/Ti * \int e(t)\, dt \quad + Td * d\, e(t) / dt \,]$$

P- I- D- Anteil

wobei	$u(t) = y - y0$	Änderung der Stellgröße
	$e(t) = w - x$	Regelabweichung
	Kp	Verstärkungsfaktor
	Ti	Integrierzeit (Nachstellzeit)
	Td	Differenzierzeit (Vorhaltzeit)

Da diese Gleichung nur für kontinuierliche Signale gilt, muß sie durch Diskretieren in eine Differenzengleichung überführt werden. Für kleine Abtastzeiten T0 kann der Differentialquotient durch eine Differenz erster Ordnung und das Integral durch eine Summe ersetzt werden (Trapezintegration):

$$u(k) = Kp*[e(k) + T0/Ti*((e(0)+e(k))/2 + \Sigma e(i)) + Td/T0*(e(k)-e(k-1)]$$

Diese Form der Darstellung ist zur Programmierung auf Prozeßrechnern nicht geeignet, da alle vergangenen Regelabweichungen e(k) abgespeichert werden müssen. Eine rekursive Darstellung erhält man, wenn vom momentanen Stellwert u(k) der vorherige Stellwert u(k-1) substrahiert wird. Als rekursiven PID-Regelallgorithmus erhält man somit (ISERMANN, 1987):

$$u(k)-u(k-1) = q0*e(k) + q1*e(k-1) + q2*e(k-2)$$

mit:

$$q0 = Kp * (1 + T0/2Ti + Td/T0)$$
$$q1 = -Kp * (1 + 2*Td/T0 - T0/2Ti)$$
$$q2 = Kp * Td/T0)$$

Zur Bestimmung der Reglerparameter Kp, Ti, Td werden eine Reihe von Einstellregeln vorgeschlagen, z.B. nach Ziegler und Nichols (PEINKE, 1981), deren Anwendung aber bei dieser Regelstrecke (Wirbelschichtreaktor mit on-line Analytik) entweder Instabilität verursachten, oder zu unzureichender Regelgüte führten. Als Maß für die Güte der Regelung wurde die quadratische Fehlerfläche der Regelabweichung verwendet. Durch empirisches Probieren wurden die Reglerparameter für den Umsatzregler bei einer Abtastzeit T0 von 60 Sekunden wie folgt bestimmt:

Verstärkungsfaktor	Kp	=	2,0 - 5,0	
Integrierzeit	Ti	=	1800	sec
Differenzierzeit	Td	=	0	sec
(Abtastzeit	T0	=	60	sec)

Es hat sich also für diese Umsatzregelung ein PI-Regler als am sinnvollsten erwiesen (Programmierung siehe Anhang 10.6).

Sehr sensitiv für die Regelgüte ist in diesem Fall der Verstärkungsfaktor, mit dessen Hilfe die Empfindlichkeit des Reglers an die sich mit ändernder Biomassekonzentration ändernde Dynamik der Regelstrecke angepaßt werden konnte. Am Anfang der Kolonisierungsphase wurde der Verstärkungsfaktor mit 2,0 vorgegeben und während der Kolonisierung manuell bis auf den Endwert von 5,0 hochgesetzt.

10.3 Berechnung des Gasanteils im Wirbelbett

Möglichkeiten zur Berechnung des Gasanteils 3-phasiger Wirbelschichten mit einem Gasquellterm über der Höhe der Wirbelschicht sind bisher nicht in der Literatur beschrieben worden (STRIEGEL 1989).

Zur Beschreibung von 3-Phasen Wirbelschichten mit externem Gaseintrag unterhalb des Wirbelbetts werden in der Literatur eine Reihe von empirischen oder halbempirischen Beziehungen für unterschiedliche Feststoffdichten und -durchmesser angegeben (MUROYAMA/FAN 1985). Der Geltungsbereich der verschiedenen Korrelationen wird neben den Stoffeigenschaften durch das Verhältnis von Flüssigkeits- zu Gasleerrohrgeschwindigkeit u_L/u_G charakterisiert.
Im Labor-Wirbelschichtreaktor wurde bei der Ethanolfermentation mit *Zymomonas mobilis* als minimales Geschwindigkeitsverhältnis u_L/u_G ein Wert von 1,8 und im Technikums-Wirbelschichtreaktor von 1,0 erreicht.
Lediglich die von DARTON und HARRISON (1975) vorgeschlagene Beziehung zur Berechnung des Gasanteils für ein Geschwindigkeitsverhältnis u_L/u_G von 0,4 - 20 kann demnach benutzt werden, alle anderen Beziehungen gelten für weitaus höhere Gasvolumenströme im Verhältnis zum Flüssigkeitsstrom.

Zur Berechnung des Gasanteils in 3-Phasen-Wirbelschichten wird zunächst eine Relativgeschwindigkeit zwischen Gas- und Flüssigphase wie folgt definiert (der fluidisierte Feststoff hat global gesehen die Geschwindigkeit Null):

$$u_{rel} = u_G / e_G - u_L / e_L$$

Dies ist im Grunde genommen die Differenz der Durchflußrate des Gases und der Durchflußrate der Flüssigkeit.

Um die relative Bewegung von Gas zu Flüssigkeit zu charakterisieren, ist die oben formulierte Relativgeschwindigkeit nicht ausreichend. Deshalb wird als charakteristische Größe der 'drift flux' des Gases formuliert, das ist der Volumenfluß des Gases relativ zu der gedachten Querschnittsfläche, die sich mit der Durchschnittsgeschwindigkeit beider Teilströme (Flüssigkeit und Gas) nach oben bewegt:

$$u_{driftflux} = u_{rel} * e_G * (1-e_G)$$

Diese Beziehung wurde mit dem System Luft/Wasser bei Partikel unterschiedlicher Dichte und Durchmessern von 0,32 bis 6 mm ermittelt und basiert auf dem 'reduced wake model'. Das besagt, daß im 'Flüssigkeitsschwanz', den jede Gasblase hinter sich herzieht, keine Trägerpartikel mittransportiert werden. Dies gilt nur, wenn der Durchmesser der Gasblasen kleiner oder maximal von derselben Größenordnung wie der Durchmesser der Trägerpartikel ist. Bei der Ethanolgärung in den Wirbelschichtreaktoren war diese Voraussetzung erfüllt.

Für den Bereich des 'uniform bubbling regimes', das bedeutet, die aufsteigenden Gasblasen sind alle von ähnlicher Größe und gleichmäßig über den Reaktor-Querschnitt verteilt, wird

$$u_{driftflux} = v_{b\infty} * e_G,$$

wobei $v_{b\infty}$ die Aufstiegsgeschwindigkeit einer Gasblase darstellt ($v_{b\infty}$ = 180 mm/s (DARTON/HARRISON 1975)).
Das bedeutet im Grunde genommen, daß die Aufstiegsgeschwindigkeit einer Gasblase von der Anzahl der benachbarten Gasblasen positiv beeinflußt wird.

Wird berücksichtigt, daß die Summe aller Volumenanteile (e_G, e_L und e_S) 1,0 ergeben muß, so erhält man bei Kombination obiger Gleichungen eine quadratische Bestimmungsgleichung für den Gasanteil in der 3-Phasen-Wirbelschicht.

$$e_G^2 * (v_{b\infty} + u_G + u_L) - e_G * (v_{b\infty} - v_{b\infty} * e_S + 2 * u_G - u_G * e_S + u_L) - u_G * e_S = 0$$

Als unbekannte Größe tritt jetzt noch der Feststoffanteil des Wirbelbetts e_S auf, der im allgemeinen aber aufgrund der bekannten in den Reaktor gefüllten Katalysatormenge einfach zugänglich ist.

Zur Abschätzung des Gasanteils in einer Wirbelschicht mit Gasquellterm über der Höhe des Wirbelbetts bietet sich ein Stufenkonzept an.

Das Wirbelbett wird in äquidistanten Abständen in Scheiben geschnitten, die keine Gradienten in radialer Richtung aufweisen. Die in jeder Scheibe gebildete Gasmenge wird dem bisherigen Gasstrom in der folgenden Stufe zuaddiert. Unter der Annahme einer in erster Näherung über der Reaktorhöhe homogenen Verteilung des Trägermaterials in der Wirbelschicht wird in jeder Stufe dieselbe Gasmenge produziert. Diese ergibt sich aus der Gesamtgasmenge dividiert durch die Anzahl der Stufen. Das bedeutet weiterhin, daß die Zunahme des Gasanteils in jeder Stufe mit einer entsprechenden Abnahme des Flüssigkeitsanteils verbunden ist.
Die Aufsummierung der Gasanteile der einzelnen äquidistanten Stufen dividiert durch die Gesamtzahl der Stufen ergibt dann den Gasanteil in der Wirbelschicht. Addiert man den Gasanteil des Reaktorkopfs hinzu, der ebenfalls mit obiger Beziehung durch den Grenzübergang e_S gegen 0 berechnet werden kann, so erhält man den Gasanteil im gesamten Reaktor.

10.4 Liste der verwendeten Geräte

Rührfermenter:

(Buchstaben und Ziffern in Klammer beziehen sich auf Fließschema Abschnitt 5.1)

Braun Fermenter Biostat S		Braun Melsungen AG, Melsungen
Thermofalleneinrichtung	(B)	Braun Melsungen AG, Melsungen
pH-Einstabmeßkette, sterilisierbar		Ingold Meßtechnik, Steinbach
pH Meßverstärker und -regler Typ PWRI 2		Endress & Hauser GmbH, Gerlingen
Durchlaufthermostat Typ M3		Lauda KG, Königshofen
Niveautester		Endress & Hauser GmbH, Gerlingen
Elektrogaskühler Typ ECP-1	(A)	M&C Products Analysentechnik GmbH, Ratingen
Elektronische Waage (60 kg)		Sartorius GmbH, Göttingen
Schlauchpumpen Typ 501 U/R, 604 U/R	(1,3,4,5)	Verder GmbH, Düsseldorf
Schlauchpumpe Typ MiniS 820	(2)	Ismatek, Zürich (Schweiz)
Thermischer Massendurchflußmesser Brooks Sensor Modell 5850 Brooks Auswerteelektronik Modell 5875		Brooks Instruments, Elmshorn
Querstrom MF-Modul Typ MD 020 CP 2N	(C)	Enka AG, Wuppertal

Labor-Wirbelschichtanlage:

(Buchstaben und Ziffern in Klammer beziehen sich auf Fließschema Abschnitt 5.3.3)

Wirbelschichtreaktor, Glas, sterilisierbar		Forschungszentrum Jülich, Glaswerkstatt
Fermenterdeckel KLF 2000 mit 3 25mm Stutzen und 6 19mm Stutzen		Bioengineering AG, Wald (Schweiz)
Thermofalleneinrichtung	(B)	Braun Melsungen AG, Melsungen
pH-Einstabmeßkette, sterilisierbar		Ingold Meßtechnik, Steinbach
pH Meßverstärker und -regler Typ PWRI 2		Endress & Hauser GmbH, Gerlingen

Widerstandsthermometer Pt100		Bioengineering AG, Wald (Schweiz)
Durchlaufthermostat Typ MT 3		Lauda KG, Königshofen
Niveausonde Typ MSR 2		Fafnir GmbH, Hamburg
Elektrogaskühler Typ ECP-1	(A)	M&C Products Analysentechnik GmbH, Ratingen
Thermischer Massendurchflußmesser Brooks Sensor Modell 5850 Brooks Auswerteelektronik Modell 5875		Brooks Instruments, Elmshorn
Schlauchpumpen Typ 501 U/R	(1,2,3,5,6,7)	Verder GmbH, Düsseldorf
Schlauchpumpe Typ MiniS 820	(4)	Ismatek, Zürich (Schweiz)
Dosierstrecke Typ YPP01		Sartorius GmbH, Göttingen
Querstrom-Mikrofiltrationsmodul Typ Thomapor LM-2P12	(C)	Reichelt Chemietechnik, Heidelberg

Technikums-Wirbelschichtanlage:

(Buchstaben und Ziffern in Klammer beziehen sich auf Fließschema Abschnitt 5.4.2)

Reaktorrohrmodul aus Glas mit Doppelmantel und Planflansch, Länge 400 mm, DN 150	Forschungszentrum Jülich, Glaswerkstatt
Reaktorrohrmodul aus Glas mit 4 Stutzen GL 25, Länge 200 mm, DN 150	Forschungszentrum Jülich, Glaswerkstatt
Reaktoreinlaufmodul aus Glas, Winkel 60°	Forschungszentrum Jülich Glaswerkstatt
Reaktorkopfmodul aus Glas, Spezialanfertigung, DN 150 / DN 300	Schott Glaswerke, Mainz
Reaktordeckel aus Glas, Spezialanfertigung, DN 300	Schott Glaswerke, Mainz
Reaktor-Verrohrung aus Glas, DN 25	Schott Anlagenbau, Mainz
Reaktorgestell: 2" Rohrgestell	Schott Anlagenbau, Mainz
Parallelschlitz-Plattenverteilerboden aus Hart-PVC	Forschungszentrum Jülich Mechanische Werkstatt
Magnetisch-induktiver Durchflußmesser mag-flux-ndf, Typ MG 711/F und Meßumformer Typ ndf/PC	Turbo Meßtechnik GmbH, Köln

Industrieregler Typ KS 4580		Phillips GmbH, Essen
pH-Einstabmeßkette, sterilisierbar		Ingold Meßtechnik, Steinbach
pH Meßverstärker und -regler Typ PWRI 2		Endress & Hauser GmbH, Gerlingen
Widerstandsthermometer Pt100		Bioengineering AG, Wald (Schweiz)
Durchlaufthermostat Typ MT 3		Lauda KG, Königshofen
Niveausonde Typ MSR 2		Fafnir GmbH, Hamburg
Schlauchpumpen Typ 501 U/R, 604 U/R	(1-6,9,10)	Verder GmbH, Düsseldorf
Schlauchpumpe Typ MiniS 820	(7,8)	Ismatek, Zürich (Schweiz)
Dosierstrecken Typ YPP01		Sartorius GmbH, Göttingen
Querstrom-Mikrofiltrationsmodul Typ Thomapor LM-2P12		Reichelt Chemietechnik, Heidelberg
Experimentier-Prüfgaszähler, nasse Bauart		Ritter KG, Bochum
Prüfgaszähler Auswerteeinheit		Forschungszentrum Jülich, Elektronische Werkstatt

On-line Prozesskontrolle:

(Buchstaben und Ziffern in Klammer beziehen sich auf Fließschema Abschnitt 5.5)

Gaschromatograph Typ 438 AS mit one-shot sampler Typ 940 und Personal Computer XT		Chrompack, Müllheim
Polarimeter Typ 241 mit Durchflußküvette		Perkin Elmer, Düsseldorf
3/2-Magnetventile Typ 0800	(A)	Herion Werke KG, Fellbach
Schlauchpumpen Typ 501 U/R	(1-4, B)	Verder GmbH, Düsseldorf
Daten-Interface: Systemmodul SMP SYS 51 mit entsprechenden Interface-Karten		Siemens AG, Düsseldorf
Personal Computer IBM AT-3		CAE Electronics, Stolberg
Software:		
Betriebssystem Concurrent-Dos		Digital Research, USA
Turbo-Pascal 3.3		Borland
MEAS		Forschungszentrum Jülich
Userprogramme zum Datentransfer über V24 Schnittstelle		Forschungszentrum Jülich, Elektronische Werkstätten
PCI (GC-Software)		Chrompack, Müllheim

10.5 Konstruktionszeichnungen Bauteile Wirbelschichtreaktoren

10.5.1 Labor-Wirbelschichtreaktor

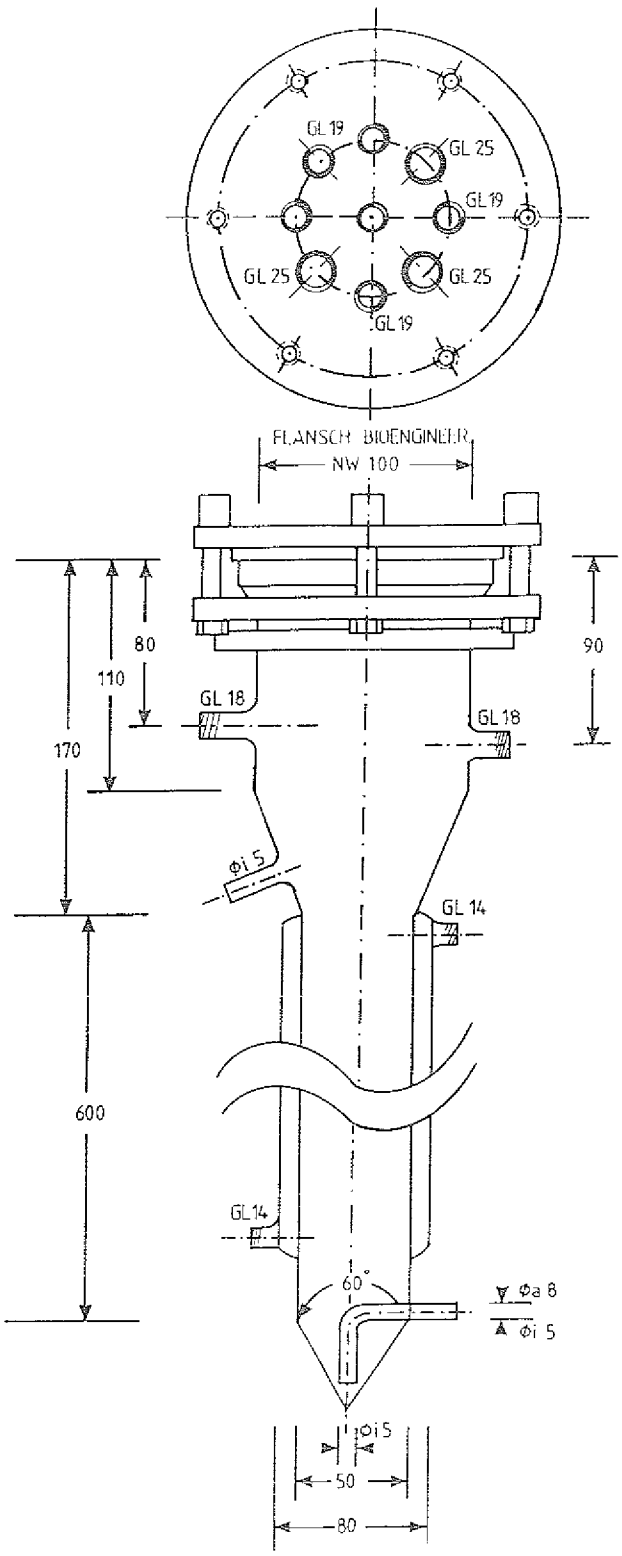


Abb. 10.3: Labor-Wirbelschichtreaktor (Glasreaktor mit Fermenterdeckel KLF 2000 aus V4A, Maße in mm)

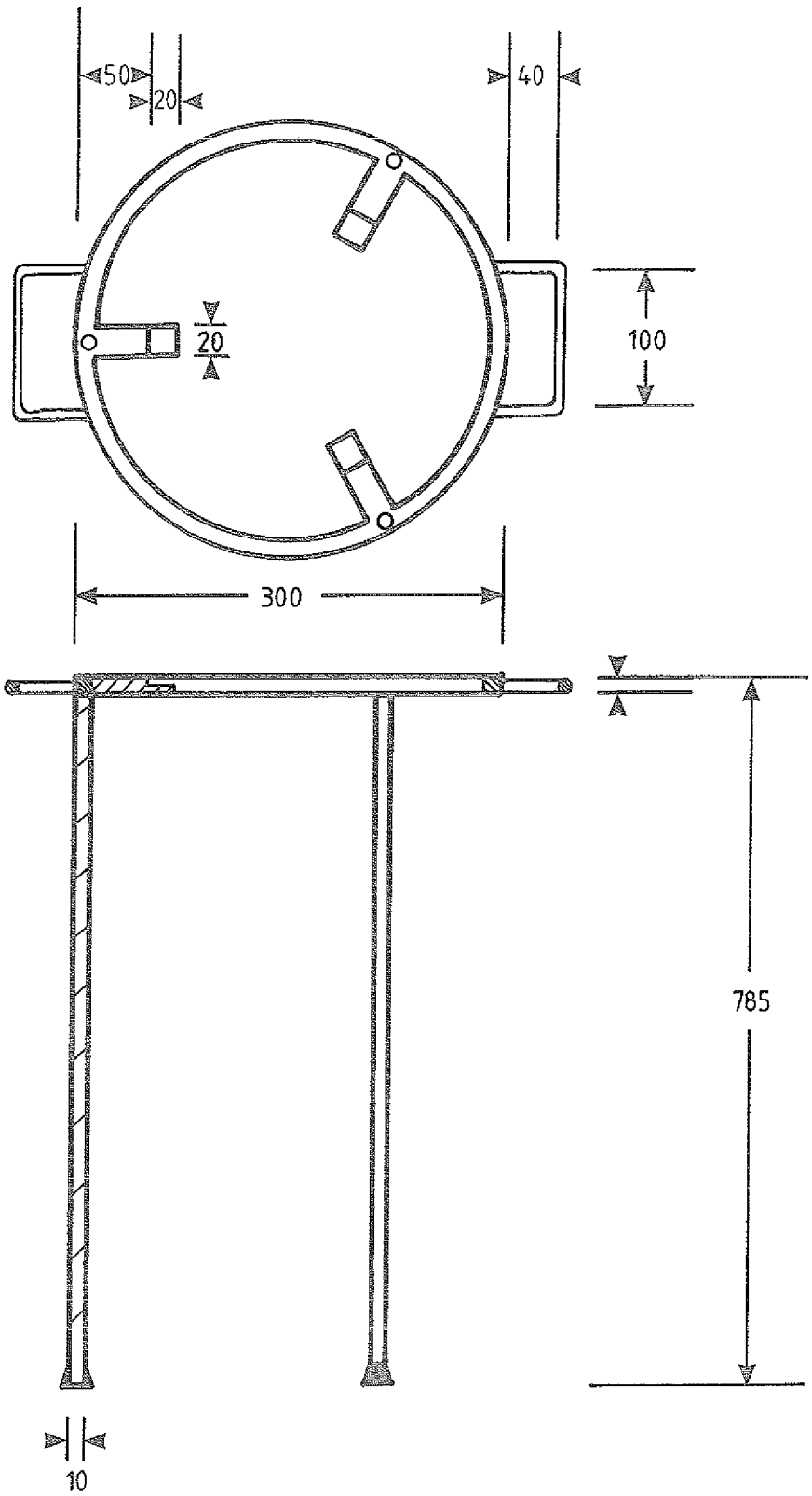


Abb. 10.4: Vollrohrgestell für Labor-Wirbelschichtreaktor (Material V4A, geschweißt, Maße in mm).

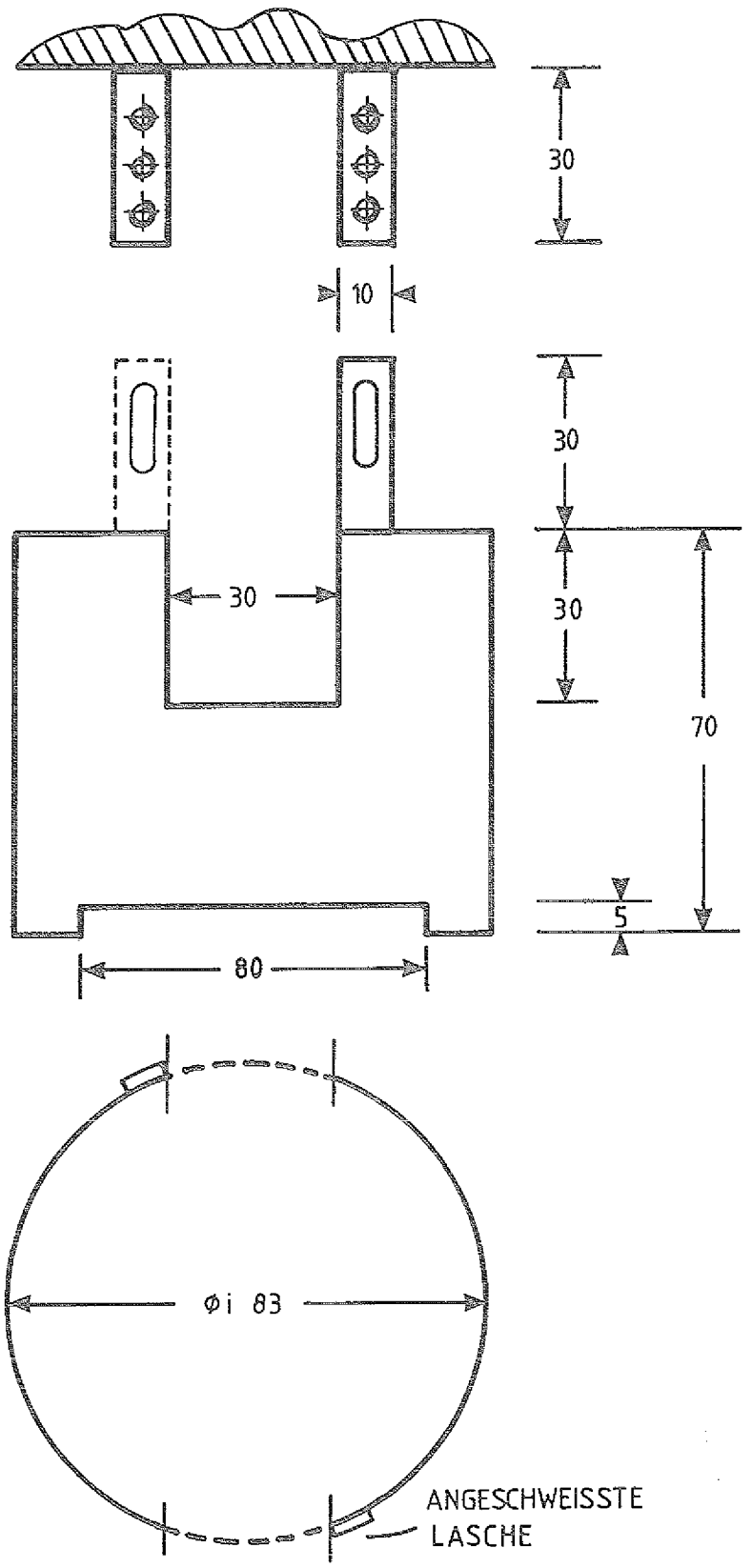


Abb. 10.5: Einbauzylinder Abscheider im Reaktorkopf
(Stahlblech V4A geschweißt, Maße in mm)

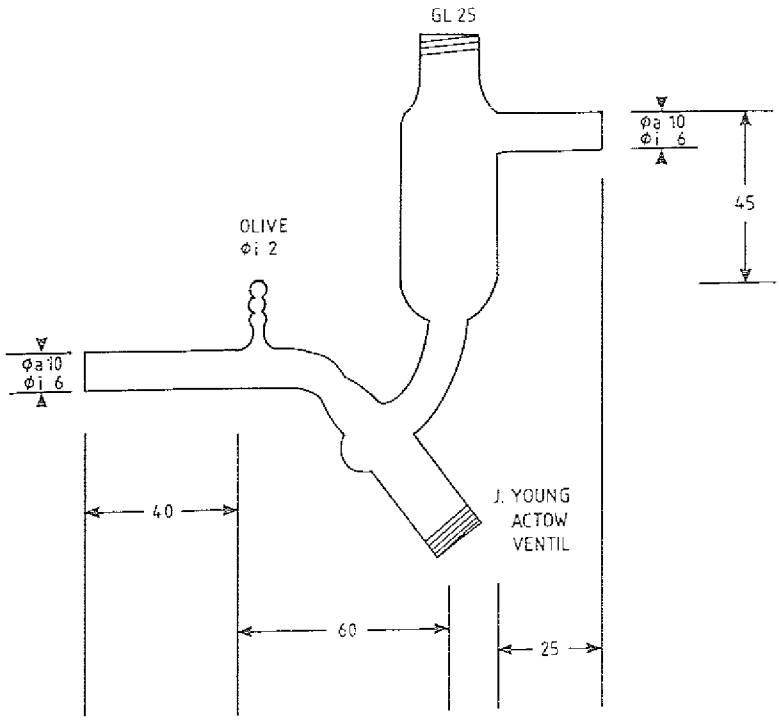


Abb. 10.6: pH Titrationsstrecke zum Einbau in den Umlauf (Material Glas, Maße in mm)

10.5.2: Technikums-Wirbelschichtreaktor

(Die hier angegebenen Nummern der einzelnen Bauteile der modular aufgebauten Technikums-Wirbelschichtreaktoren beziehen sich auf Abbildung 5.6)

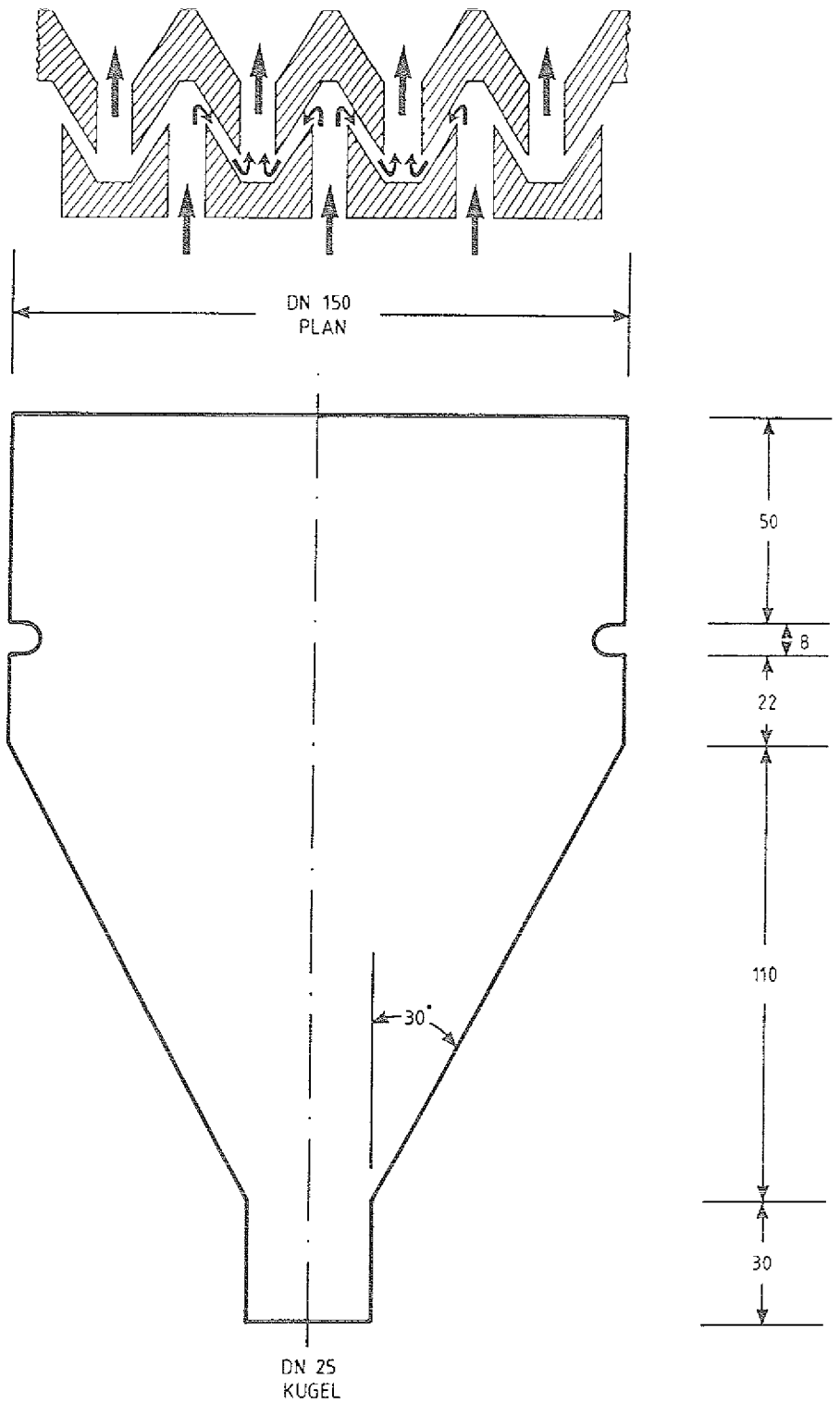


Abb. 10.7: (1) Reaktoreinlaufmodul aus Glas, Parallelschlitz-Plattenverteilerboden (KEIM 1990), Maße in mm

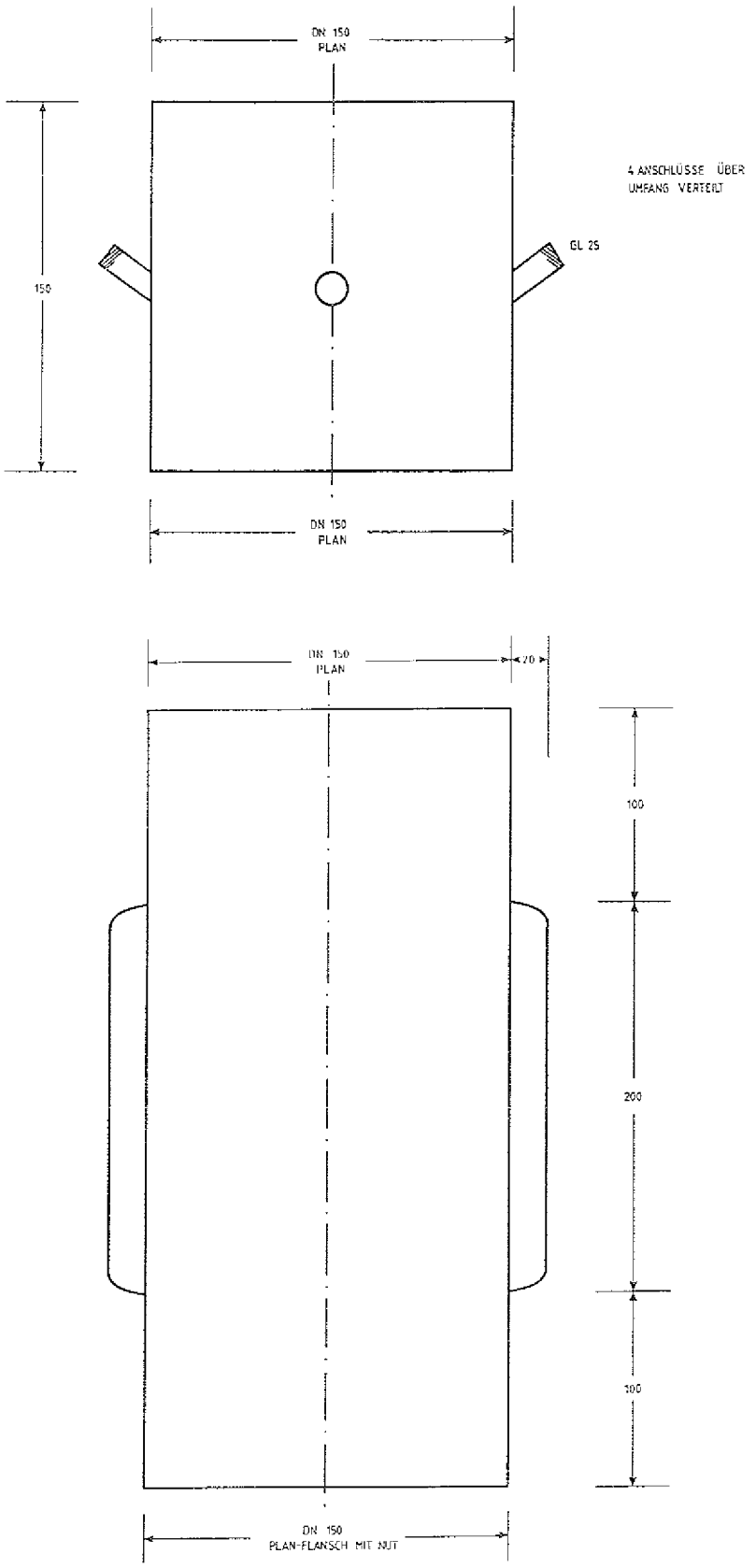


Abb. 10.8: (2) Reaktorrohrmodul aus Glas mit 4 Stutzen GL 25 und (3) Reaktorrohrmodul aus Glas mit Doppelmantel, Maße in mm

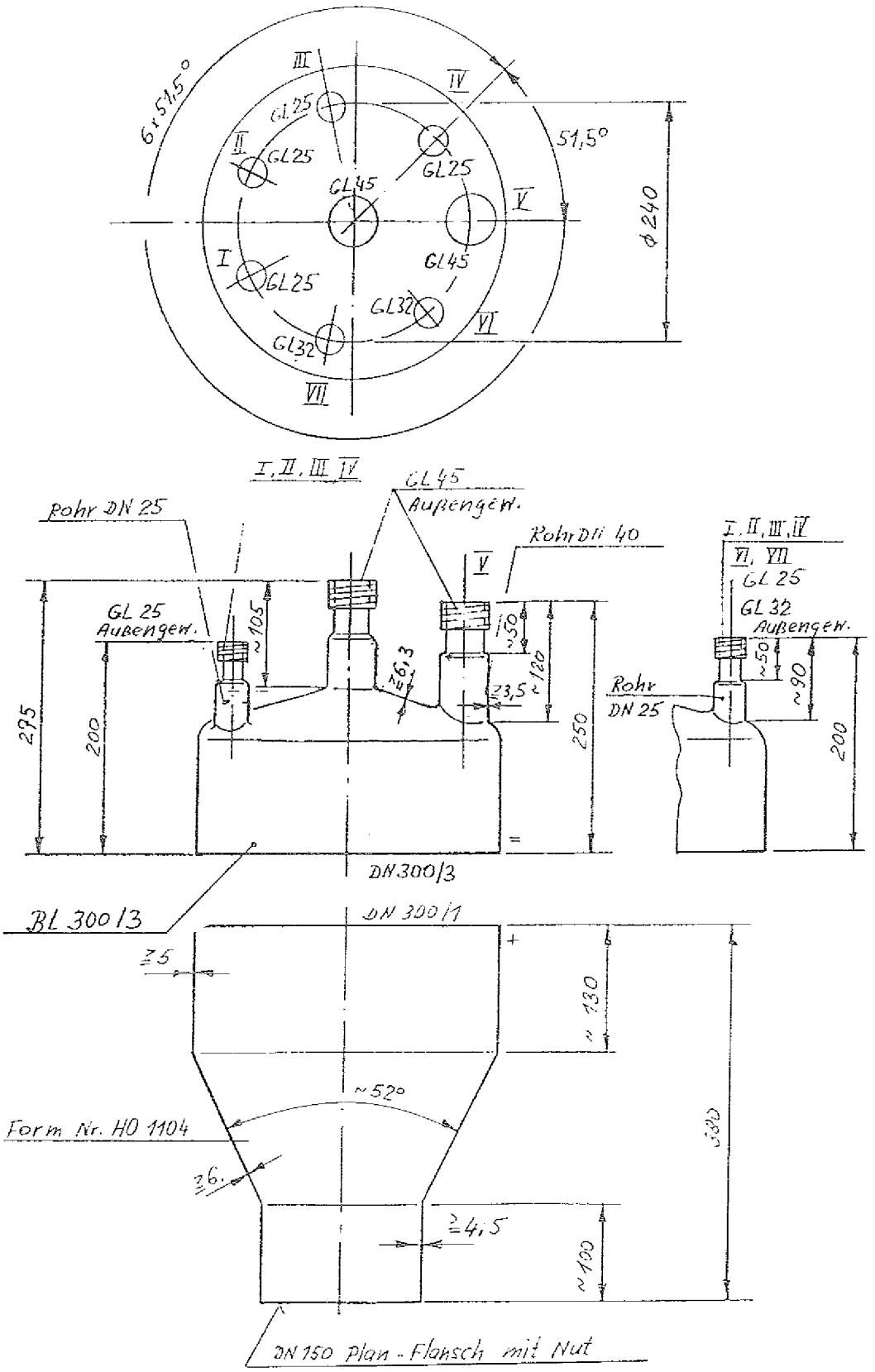


Abb. 10.9: (4) Reaktorkopfmodul aus Glas und (5) Reaktordeckel aus Glas (jeweils Spezialanfertigungen), Maße in mm

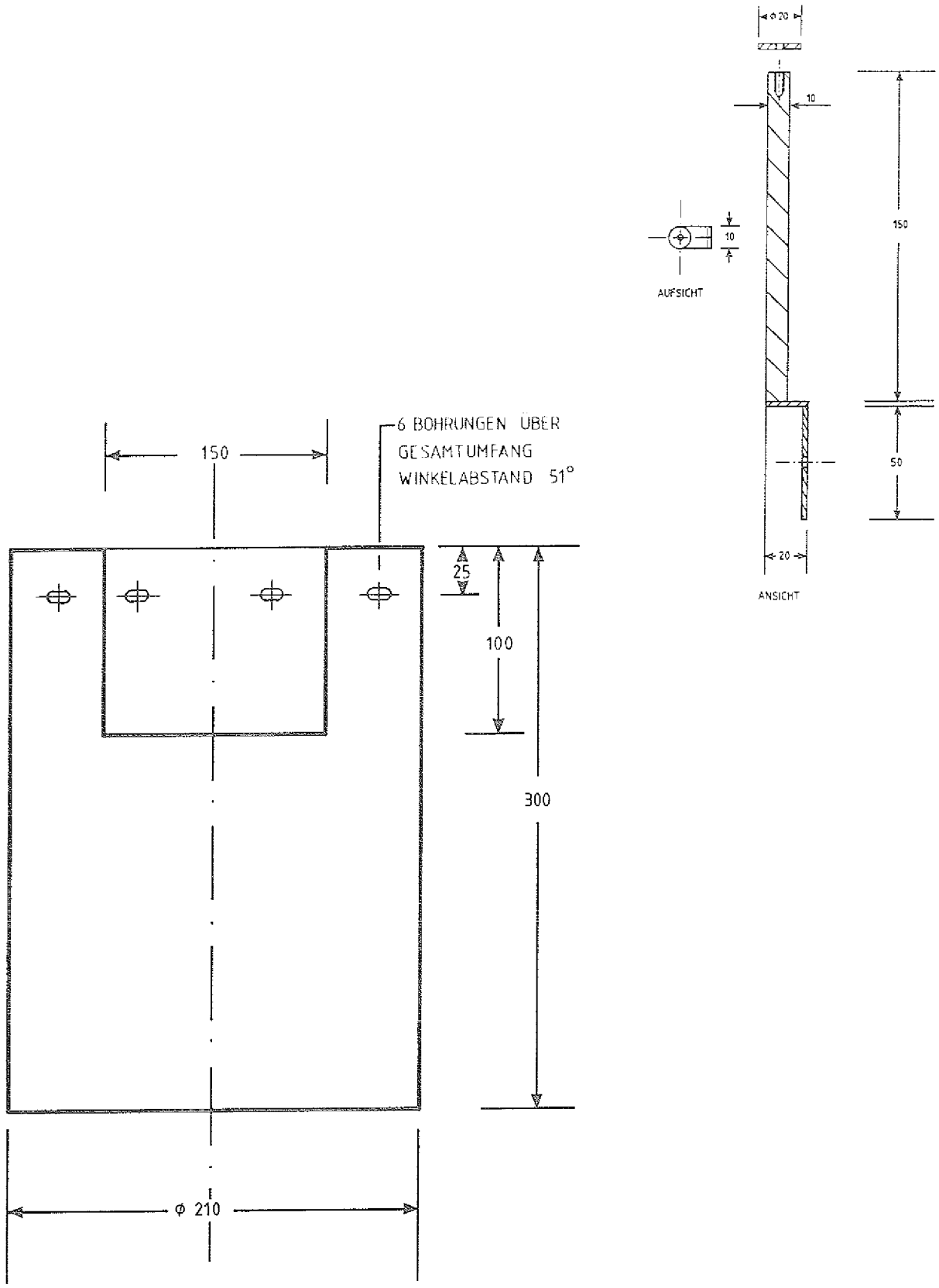


Abb. 10.10: (6) Einbauzylinder Reaktorkopf aus Stahlblech V4A mit Halterungen, Maße in mm

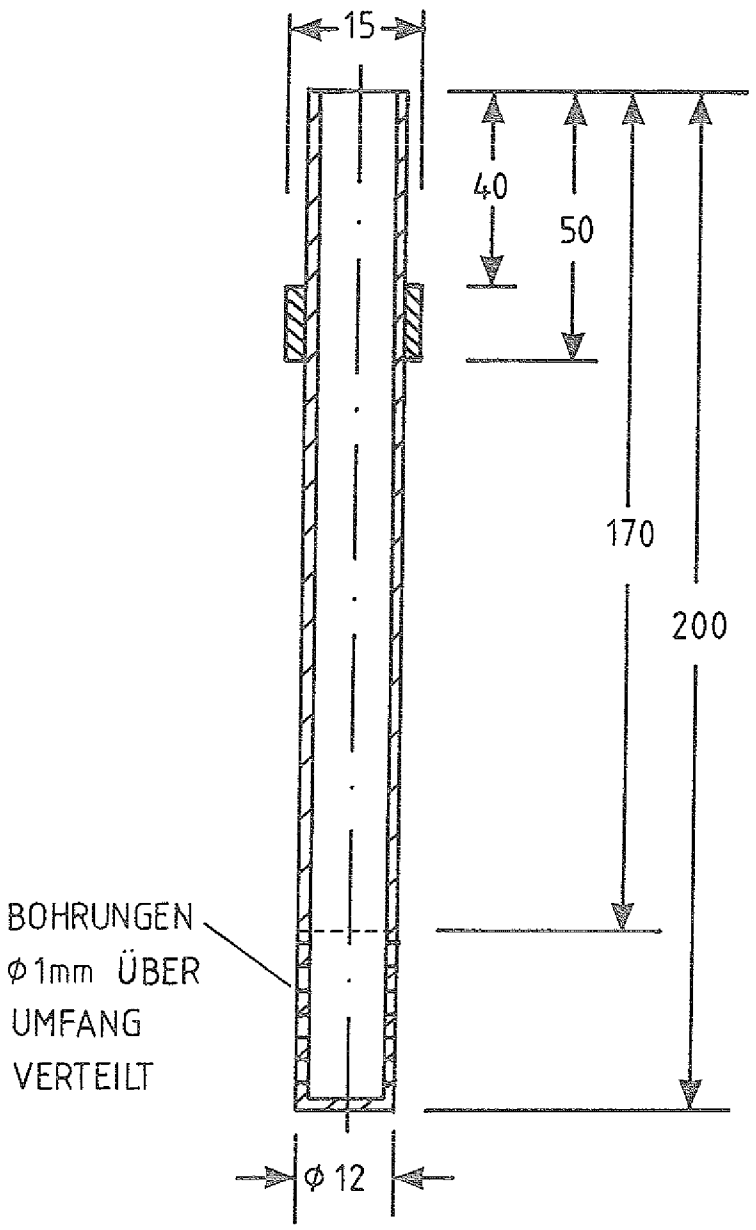


Abb. 10.11: Vorfilter aus Stahl V4A, Maße in mm

10.6 Konfiguration Meßdaten-Erfassungs- und Auswerte-Software (MEAS)

Konfiguration der Analogeingänge:

Zur Meßdatenerfassung wurden bei 2 Wirbelschichtreaktoren 14 Analogeingänge benötigt. Diese wurden wie folgt verteilt (Zahl 1 bedeutet Wirbelschichtreaktor 1, Zahl 2 bedeutet Wirbelschichtreaktor 2):

2 Temperaturmeßstellen (T1, T2),
2 Gasuhren (Gas1, Gas2),
2 Volumenstrommeßstellen (Umlauf1, Umlauf2),
1 Polarimeter (pola),
3 pH-Meßstellen (pH1, pH2, pH3), wobei pH3 zur Titration des Mediums diente,
2 Lauge-Verbrauchsmeßstellen (Lauge1, Lauge2) und
2 Füllstandsmeßstellen (niv1,niv2).

Meßgröße	Einheit	Zykluszeit, sec	Abspeichern (= *)	Mittelwert (Anzahl)
T1	°C	300	*	0
T2	°C	300	*	0
Gas1	l/h	60		0
Gas2	l/h	60		0
Umlauf1	l/h	300	*	0
Umlauf2	l/h	300	*	0
pola	-	10		5
pH1	-	60		0
pH2	-	60		0
pH3	-	60		0
Lauge1	ml/h	300	*	0
Lauge2	ml/h	300	*	0
niv1	%	1		0
niv2	%	1		0

Konfiguration der Analogausgänge:

Zur Regelung der Reaktorvolumina wurden 2 Analogausgänge zur Ansteuerung der jeweiligen Ablaufpumpen benötigt:
Pumpe2 (Ablaufpumpe Wirbelschichtreaktor 1 ist gleichzeitig Zulaufpumpe Wirbelschichtreaktor 2) und Pumpe3 (Ablaufpumpe Wirbelschichtreaktor 2).

Meßgröße	Einheit	Zykluszeit, sec	Abspeichern (= *)
Pumpe2	%	1	
Pumpe3	%	1	

Zum Datentransfer zwischen Gaschromatograph und Prozeßrechner, sowie zum Datentransfer zwischen 2 Dosiersystemen (zum einen Glukosekonzentrat und zum anderen Nährsalze) und Prozeßrechner waren 3 V24 Schnittstellen erforderlich.

Konfiguration der Relaisausgänge:

Zum Umschalten von Ventilen der on-line Analytik (v1, v2, v3, v4), zum Rückspülen der Probenahmemodule (r1, r3) und zum Ein- und Ausschalten des Gaschromatographen wurden 7 Relaisausgänge benötigt.

Meßgröße	Zykluszeit, sec	Kommentar
v1	1	Ventil on-line Analytik
v2	1	Ventil on-line Analytik
v3	1	Ventil on-line Analytik
v4	1	Ventil on-line Analytik
r1	1	Reversible Bypasspumpe
r2	1	GC ein/aus
r3	1	Reversible Bypasspumpe

Konfiguration der Variablen:

Zur Berechnung von abgeleiteten Prozeßgrößen, zur Durchführung von unterschiedlichen Rechenoperationen (siehe Formelinterpreter) und zur Unterscheidung zwischen abzuspeichernden Größen (große Zykluszeiten) und aktuellen Größen für Regelungsaufgaben (kurze Zykluszeiten) wurden 71 Variablen definiert.
Die Bedeutung der unten aufgeführten Variablen ist meist am Namen ersichtlich oder ergibt sich aus der Verwendung im Formelinterpreter. Dabei gilt erneut: die Ziffer 1 hinter einer Variable bedeutet Wirbelschichtreaktor 1, die Ziffer 2 bedeutet Wirbelschichtreaktor 2. Weiterhin gilt, daß abzuspeichernde Variablen mit der Ziffernfolge '_s' versehen sind.

Meßgröße	Einheit	Zykluszeit, sec	Abspeichern (= *)
glucose	g/l	10	
glucose_k	g/l	10	
glucose_1	g/l	10	
glucose_2	g/l	10	
U_diff	%	60	
ethanol1	g/l	60	
ethanol2	g/l	60	
acetald1	g/l	60	
acetald2	g/l	60	
acetoin1	g/l	60	
acetoin2	g/l	60	
acetat1	g/l	60	
acetat2	g/l	60	
z1	sec	1	
z3	sec	1	
z5	sec	1	
rest	l	60	
tau2	h	60	
RZA2_s	g/(l*h)	300	*
ethanol1_s	g/l	300	*
ethanol2_s	g/l	300	*
acetat1_s	g/l	300	*
acetat2_s	g/l	300	*
sartorius3	ml/h	180	
Umsatz1	%	60	
tau1	h	60	
RZA1	g/(l*h)	60	
ethanol	mmol/l	60	
acetald	mmol/l	60	
acetoin	mmol/l	60	
acetat	mmol/l	60	
q0	-	60	
q1	-	60	
sartp	ml/h	60	
sarti	ml/h	60	
sart	ml/h	60	
pola\	-	10	
a	(pola0)	10	
glucose1_s	g/l	300	*
Umsatz1_s	g/l	300	*
tau1_s	h	300	*
RZA1_s	g/(l*h)	300	*
CO2rate1_s	ml/g	300	*

Meßgröße	Einheit	Zykluszeit, sec	Abspeichern (= *)
ethrate1_s	g/g	300	*
a_s	(pola0)	300	*
a_minus	(pola0)	10	
a_plus	(pola0)	10	
a_alt	(pola0)	10	
glucose_n	g/l	10	
Sxy	sec*g/l	10	
Sy	sec*g/l	10	
steig	-	10	
steig_s	-	300	*
Gas1_s	l/h	300	*
Gas2_s	l/h	300	*
pH1s	-	300	*
pH2s	-	300	*
pH3s	-	300	*
glucose2_s	g/l	300	*
Umsatz2_s	%	300	*
tau2_s	h	300	*
Umsatz	%	60	
Umsatz_s	%	300	*
RZAg	g/(l*h)	60	*
RZAg_s	g/(l*h)	300	*
sartorius4	ml/h	180	
P2	%	1	
P3	%	1	
dniv1	%	1	
dniv2	%	1	
dniv3	%	1	

Konfiguration der 'off-line Werte':

Zur Eingabe von off-line gemessenen Prozeßgrößen (Substratkonzentration im Zulauf), zur Eingabe von Korrekturfaktoren aufgrund von off-line Messungen, zum Ein-, Ausschalten von Anlagenkomponenten, sowie zum Verstellen von Reglern war die Konfiguration von 12 'off-line Werten' notwendig. Die Werte können zu jedem beliebigen Prozeßzeitpunkt innerhalb der vereinbarten Grenzen verändert werden.

Meßgröße	Einheit	Meßbereich von	bis	Kommentar
S0	g/l	0,0	500,0	Substrat im Zulauf
U_soll	%	0,0	100,0	U_regler aus/ein, Sollwertvorgabe
sart0	l/h	0,0	100,0	Startwert U_regler
sartmax	l/h	0,0	100,0	max. Stellgröße
Zulauf1	l/h	0,0	100,0	-
Vorlage	l	0	2000	-
Kp		0	100	Empfindlichkeit U_regler
RV1	l	58	63	Volumenregler1, Sollwert
RV2	l	48	57	Volumenregler2, Sollwert
start		0,0000	1,0000	Zuschalten von 2. Dosierstrecke [start = S0 / (SK - S0)]
real1	g/l	-10,00	10,00	Korrekturfaktor für Polarimeter
real2	g/l	-10,00	10,00	Korrekturfaktor für Polarimeter

<u>Konfiguration der Formeln:</u>

Das in diesem Formelinterpreter formulierte Programm für Labor- und Technikums-Wirbelschichtanlage erfüllt folgende Funktionen:

- **Steuerung des Analysenzyklus:** Hierbei werden 2 Meßstellen (Reaktor1, Reaktor2) mit 2 on-line Analysengeräten (Polarimeter, GC) über ein Zeitprogramm miteinander verknüpft. Zusätzlich sind in den Zyklus die Spülung der Durchflußküvetten und die Rekalibrierung des Polarimeters integriert. Da beim GC die Ausgabe der Meßergebnisse zeitverzögert erfolgt (7 Minuten nach der Injektion) müssen die Daten der richtigen Prozeßgröße zugewiesen werden. Auch muß die Übertragungsfunktion der Analysestrecke berücksichtigt werden, was bedeutet, daß der 98 % Wert des neuen Meßsignals erst nach 6,4 Minuten erreicht ist.

{Zähler on-line Analysenzyklus}

$z3:=(z3+1)*(z3<3600)+1*(z3>=3600)$

```
{Ventilschaltungen}

v1:=1*(z3>2700)*(z3<3600)
v2:=1*(z3>2700)*(z3<3600)
v3:=1*(z3>=0)*(z3<300)
v4:=1*(z3>=0)*(z3<300)
```

```
{GC-schaltungen}

r2:=1*(z3>=0)*(z3<3)
r2:=r2+1*(z3>=900)*(z3<903)
r2:=r2+1*(z3>=1800)*(z3<1803)
r2:=r2+1*(z3>=2700)*(z3<2703)
```

- **Rekalibrierung des Polarimeters:** Da eine Nullpunktsdrift des Polarimeters nicht direkt am Meßgerät zu beheben war, wird zu Beginn jeden Meßzyklusses über eine Ventilschaltung 0,5 n NaOH, die keine Änderung des Drehwinkels bewirkt, in die Polarimeterküvette gepumpt und der so erhaltene 'Nullwert' wird im folgenden Meßzyklus vom aktuellen Meßwert subtrahiert.

```
{Rekalibrierung des Polarimeters}

a_alt:=a*(z3>=300)+a_alt*(z3<300)
glucose:=glucose*(z3>=0)*(z3<=900)+(7.92*pola\+a)*(z3>900)
a:=-7.92*pola\*(z3>=180)*(z3<=290)+a*(z3>290)+a*(z3<180)
a_minus:=a_alt-10*a_alt/100
a_plus:=a_alt+10*a_alt/100
a:=a*(a<2*a_minus)+a_alt*(a>=2*a_minus)*(a>=2*a_plus)+a*(a>2*a_plus)
a_s:=a
```

- **Software-Filter für das Polarimetersignal:** Trotz vorgeschalteter Blasenfalle werden immer noch Gasblasen im Filtratstrom des Polarimeters beobachtet, was beim Durchtritt der Gasblase durch die Polarimeterküvette zu einer Verkürzung des Strahlengangs und damit zu einer starken Verringerung des Drehwinkels führt. Daher wird in diesem Programmabschnitt kontinuierlich die erste Ableitung der letzten 6 (gemittelteten) Meßwerte bestimmt und die Meßdatenzuweisung unterbrochen, falls diese ermittelte Steigung einen bestimmten Wert unterschreitet, also eine Gasblase durch die Küvette läuft. Erst nachdem der alte Meßwert (mit einer Abweichung von 10 %) wieder erreicht ist, oder ein Unterbrechungszeitraum von 3 Minuten überschritten wurde, wird die Meßdatenzuweisung fortgesetzt.

(Anmerkung: Ziffern in eckigen Klammern hinter einer Variablen bedeuten, daß entsprechend weit zurückliegende Meßwerte verwendet werden, also 'Variable[1]' heißt, der vorherige Meßwert wird benutzt.)

```
{'Blasenfilter'}

glucose_n: = glucose*(glucose_k = 0)
Sxy: = 10*glucosee_n[5] + 20*glucose_n[4] + 30*glucose_n[3]
Sxy: = Sxy + 40*glucose_n[2] + 50*glucose_n[1] + 60*glucose_n
Sy: = glucose_n[5] + glucose_n[4] + glucose_n[3] + glucose_n[2] + glucose_n[1] + glucose_n
steig: = (Sxy-35*Sy)/(91-91/6)*(z3 > 960)*(z3 < 2700)
steig: = steig + (Sxy-35*Sy)/(91-91/6)*(z3 > 3560)*(z3 < 3600)
steig_s: = steig
glucose_k: = (glucose < = glucose_k-0.1*glucose_k)*glucose_k*(z5 < 300)
z5: = (z5 + 1)*(glucose_k < > 0)
glucose: = glucose*(glucose_k = 0) + glucose_k*(glucose_k < > 0)
glucose: = glucose*(steig > = (-1.0))
glucose_n[5]: = glucose_n[1] + glucose_n[2] + glucose_n[3] + glucose_n[4] + glucose_n[5]
glucose_n[5]: = glucose_n[5]/5
glucose_k: = glucose_n[5]*(glucose = 0) + glucose_k*(glucose < > 0)
glucose: = glucose_k*(glucose_k < > 0) + glucose*(glucose_k = 0)
```

- **Danach erfolgt die Meßwertzuweisung:**

```
{on-line Analysenzyklus: Meßwertzuweisungen}

glucose_1: = (glucose + real1)*(z3 > 1200)*(z3 < = 2700)
glucose_1: = glucose_1 + glucose_1[1]*((z3 < = 1200) + z3 > 2700))
glucose_2: = (glucose + real2)*(z3 < 300) + glucose_2*(z3 > = 300)
glucose1_s: = glucose_1*(glucose_1 > 0)
glucose2_s: = glucose_2*(z3 < 300) + glucose2_s*(z3 > = 300)
ethanol1: = (ethanol/1000)*46.07*(z3 > 1500) + ethanol1*(z3 < = 1500)
ethanol2: = (ethanol/1000)*46.07*(z3 > 600)*(z3 < 900) + ethanol2*((z3 < = 600) + (z3 > = 900))
ethanol1_s: = ethanol1
ethanol2_s: = ethanol2
acetald1: = (acetald/1000)*44.05*(z3 > 1500) + acetald1*(z3 < = 1500)
acetald2: = (acetald/1000)*44.05*(z3 > 600)*(z3 < 900) + acetald2*((z3 < = 600) + (z3 > = 900))
acetoin1: = (acetoin/1000)*88.11*(z3 > 1500) + acetoin1*(z3 < = 1500)
acetoin2: = (acetoin/1000)*88.11*(z3 > 600)*(z3 < 900) + acetoin2*((z3 < = 600) + (z3 > = 900))
acetat1: = (acetat/1000)*60.05*(z3 > 1500) + acetat1*(z3 < = 1500)
acetat2: = (acetat/1000)*60.05*(z3 > 600)*(z3 < 900) + acetat2*((z3 < = 600) + (z3 > = 900))
acetat1_s: = acetat1
acetat2_s: = acetat2
```

- **Die Berechnung von nicht direkt erfaßbaren Prozeßgrößen** kann nach den Meßwertzuweisungen erfolgen:

```
{Berechnen von Prozeßvariablen}

tau1: = (RV1*1000/(sartorius3 + sartorius4))*((sartorius3 + sartorius4) < > 0)
tau1_s: = tau1
tau2: = (RV2*1000/(sartorius3 + sartorius4))*((sartorius3 + sartorius4) < > 0)
tau2_s: = tau2
Umsatz1: = (1-glucose_1/S0)*100
Umsatz1_s: = Umsatz1
Umsatz2_s: = (1-glucose2_s/glucose1_s)*100*(glucose1_s< >0)
RZA1: = ethanol1/tau1
RZA1_s: = RZA1
RZA2_s: = (ethanol2_s-ethanol1_s)/tau2_s*(tau2_s< >0)
Gas1_s: = (Gas1 + Gas1[1] + Gas1[2] + Gas1[3] + Gas1[4])/5
Gas2_s: = (Gas2 + Gas2[1] + Gas2[2] + Gas2[3] + Gas2[4])/5
pH1s: = (pH1 + pH1[1] + pH1[2] + pH1[3] + pH1[4])/5
pH2s: = (pH2 + pH2[1] + pH2[2] + pH2[3] + pH2[4])/5
pH3s: = (pH3 + pH3[1] + pH3[2] + pH3[3] + pH3[4])/5
CO2rate1_s: = Gas1_s*1000*tau1/(RV1*(S0-glucose_1))
ethrate1_s: = ethanol1/(S0-glucose_1)
Umsatz: = (1-glucose2_s/S0)*100*(S0< >0)
Umsatz_s: = Umsatz
RZAg: = ethanol2/(tau1 + tau2)
RZAg_s: = RZAg
```

- **Rückspülung von Vorfiltern zur Mikrofiltration:** Diese verläuft nach einem über off-line Werte varierbaren Zeitplan.

```
{Rückspülung der Vorfilter im Bypass}

z1: = z1 + 1
r1: = 0*((z1< =20) + (z1>20)*(z1< =20+3)
r3: = r1
z1: = z1*(z1<20+3)
```

- **Regler zur Steuerung des Umsatzes über die Verweilzeit:** Da die Regelstrecke (Wirbelschichtreaktor und on-line Analytik) mit relativ großen Totzeiten behaftet ist, wurde zur Regelung des Umsatzes U durch die Veränderung der Verweilzeit τ des Substrats im Reaktor ein PI-Regler in zeitdiskreter Form programmiert.

  Über die während des Prozesses jederzeit mögliche Variation des Verstärkungsfaktors konnte die Empfindlichkeit des Reglers dem Prozesszustand angepaßt werden. Bei

Auftreten eines starken Überschwingens der Regelstrecke ist die Empfindlichkeit zu hoch, bei bleibender Regelabweichung ist die Empfindlichkeit zu niedrig.

```
{Umsatzregler Reaktor 1}

sarti: = sarti*(U_soll < > 0)
U_diff[1]: = U_diff[1]*(U_soll < > 0)
U_diff: = U_soll-Umsatz1
q0: = Kp*(1 + 1/(2*30))
q1: = -Kp*(1-1/(2*30))
sartp: = q0*U_diff
sarti: = sarti + (q0 + q1)*U_diff[1]
sart: = sartp + sarti
sart: = (sart0*1000-sart)*30
sart: = (sart < = 150)*150 + (sart > 150)*sart
sart: = (sart > = sartmax*1000)*sartnax*1000 + (sart < sartmax*1000)*sart
sartorius3: = sart*(U_soll < > 0) + Zulauf1*1000*(U_soll = 0)
sartorius4: = start*Sartorius3*(start < > 0)
```

- **Steuerung der Reaktorvolumina:** Auch für diese Regelaufgabe hat sich ein PI-Regler bewährt.

```
{Volumenregelung}

pumpe2: = P2*(P2 < 100) + 90*(P2 > = 100)
pumpe3: = P3*(P3 < 100) + 90*(P3 > = 100)
dniv1: = niv1-(5*RV1-260)
dniv2: = niv2-(4.375*RV2-197)
```

- **Vorlagekontrolle:** Da die Substratzuführung vom Programm gesteuert wird, kann eine einfache Bilanzierung zur Vorlagenkontrolle eingesetzt werden.

```
{Vorlagekontrolle}

rest: = Vorlage*(Vorlage < > Vorlage[1]) + rest*(Vorlage = Vorlage[1])
rest: = rest-(sartorius3/1000/60)
```

10.5 Verzeichnis Abbildungen

Abb. 1.1:	Rasterelektronische Aufnahmen von *Zymomonas mobilis* Bakterien und Hefezellen	2
Abb. 2.1:	Fließschema der Produktion von Glukose und Gluten aus Weizenmehl	3
Abb. 3.1:	Katbolische Stoffwechselwege bei *Zymomonas mobilis*	9
Abb. 3.2:	Darstellung verschiedener kinetischer Ansätze zur Modellierung des mikrobiellen Wachstums	13
Abb. 3.3:	Darstellung der stady-state Prozeßgrößen im Chemostaten, Monodkinetik mit maintenance Anteil	15
Abb. 3.4:	Klassifizierung von Immobilisierungsmethoden	16
Abb. 3.5:	Sorption von Mikroorganismen an Polystyren in Abhängigkeit ihrer Oberflächeneigenschaften	17
Abb. 3.6:	Schematische Darstellung eines Zellaggregats und des entsprechenden Substrat-Konzentrationsprofils	19
Abb. 3.7:	Katalysator-Wirkungsgrad über dem (generalisierten) Thiele-Modul für Reaktionen 0. und 1. Ordnung	20
Abb. 4.1:	Chromatogramm der gaschromatographischen Analyse bei der Ethanolfermentation mit *Zymomonas mobilis*	27
Abb. 5.1:	Fließschema des Laborfermenters zur Ethanolfermentation	30
Abb. 5.2:	Konstruktionszeichnung Labor-Wirbelschichtreaktor	31
Abb. 5.3:	Verweilzeitverteilung im Labor-Wirbelschichtreaktor (Sprungantwort)	33
Abb. 5.4:	Fließschema der Labor-Wirbelschichtanlage	35
Abb. 5.5:	Photo der Labor-Wirbelschichtanlage	36
Abb. 5.6:	Skizze der Technikums-Wirbelschichtreaktoren	38
Abb. 5.7:	Verweilzeitverteilung im 55 l Technikums-Wirbelschichtreaktor (Sprungantwort)	39
Abb. 5.8:	Fließschema der Technikums-Wirbelschichtanlage	40

Abb. 5.9:	Photo der 2-stufigen Technikums-Wirbelschichtanlage	41
Abb. 5.10:	Fließschema der on-line Analytik	43
Abb. 5.11:	Kompensation der Nullpunktsdrift des Polarimeters	45
Abb. 5.12:	Demonstration Glasblasenkorrektur (Software-Filter)	46
Abb. 5.13:	Photo der Prozesskontrolle der Wirbelschichtanlagen	47
Abb. 6.1:	Darstellung der Ertragskoeffizienten Y_{xs}, Y_{xp}, Y_{ps} in Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit	50
Abb. 6.2:	Spezifische Wachstumsgeschwindigkeit mit und ohne Inhibierungsanteile in Abhängigkeit der Substratkonzentration im Chemostaten	52
Abb. 6.3:	Darstellung der Wachstums- und Produktbildungskinetik von *Zymomonas mobilis* in Abhängigkeit der Produktkonzentration	53
Abb. 6.4:	Steady-state Konzentrationen in Abhängigkeit der Durchflußrate im Chemostaten, Vergleich Messung - Modell	55
Abb. 6.5:	Kohlenstoffbilanz und Kohlenstoffselektivität im Chemostaten	57
Abb. 6.6:	Relative Änderung der spezifischen Geschwindigkeiten von *Zymomonas mobilis* in Abhängigkeit der Laktatkonzentration	58
Abb. 6.7:	Diskontinuierliche Sorptionsversuche mit ruhenden *Zymomonas mobilis* Zellen aus unterschiedlichen Medien und mit unterschiedlich modifizierten Sintergläsern	60
Abb. 6.8:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Sinterglasträgers nach erfolgter Adsorption mit *Zymomonas mobilis* Zellen (Kugelaußenfläche)	61
Abb. 6.9:	Sorptionsisotherme von *Zymomonas mobilis* Zellen an Sinterglas	62
Abb. 6.10:	Rechnergesteuerte Kolonisierung von offenporigem Sinterglas im Wirbelschichtreaktor mit *Zymomonas mobilis*, Versuchsverläufe bei unterschiedlichen Umsatzsollwerten	65
Abb. 6.11:	Vergleich rechnergeführte und manuelle Kolonisierung von offenporigem Sinterglas im Wirbelschichtreaktor	66

Abb. 6.12:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer mit *Zymomonas mobilis* gefüllten Pore im Inneren eines Sinterglaskörpers nach der Kolonisierung	67
Abb. 6.13:	Versuchsverlauf zur Ermittlung stationärer Betriebspunkte im Wirbelschichtreaktor	68
Abb. 6.14:	Stationäre Daten Ethanolfermentation im Labor-Wirbelschicht-reaktor bei Zulauf-Glukosekonzentrationen von 120 g/l und 140 g/l	69
Abb. 6.15:	Stationäre Daten Ethanolfermentation im Labor-Wirbelschicht-reaktor bei Zulauf-Glukosekonzentrationen von 160 g/l und 200 g/l	70
Abb. 6.16:	Oszillationen im Wirbelschichtreaktor bei hohen Zulauf-Glukosekonzentrationen	71
Abb. 6.17:	Stationäre Daten Ethanolfermentation im Labor-Wirbelschichtreaktor, Raum-Zeit-Ausbeute über Umsatz	73
Abb. 6.18:	Stationäre Raum-Zeit-Ausbeuten über Umsatz; Vergleich Chemostat, Wirbelschichtreaktor	74
Abb. 6.19:	Spezifische Produktbildungsgeschwindigkeit und stationäre Biomassekonzentration im Chemostaten über Umsatz	74
Abb. 6.20:	Stationäre Raum-Zeit-Ausbeuten über Umsatz; Vergleich Chemostat, Wirbelschichtreaktor, Wirbelschichtkaskade	75
Abb. 6.21:	Intrapartikulärer Thiele-Modul und Wirkungsgrad für verschiedene Zulauf-Glukosekonzentrationen, *Zymomonas mobilis* immobilisiert in Sinterglaskugeln	80
Abb. 6.22:	Gemessener summarischer und modellierter intrapartikulärer Wirkungsgrad über dem Umsatz	81
Abb. 6.23:	Summarischer 'gemessener Wirkungsgrad' über Umsatz bei der Ethanolfermentation im Wirbelschichtreaktor	82
Abb. 6.24:	Insterile Dauerfermentation von B-Stärkehydrolysat im Labor-Wirbelschichtreaktor (0-30 Tage)	86
Abb. 6.25:	Stationäre Betriebspunkte bei der Umsetzung von B-Stärkehydrolysat im Labor-Wirbelschichtreaktor, Vergleich mit synthetischem Medium	87
Abb. 6.26:	Insterile Dauerfermentation von B-Stärkehydrolysat im Labor-Wirbelschichtreaktor (30 - 70, 103 - 116 Tage)	88

Abb. 6.27:	Insterile Dauerfermentation von B-Stärkehydrolysat im Labor-Wirbelschichtreaktor (70 - 103 Tage)	90
Abb. 6.28:	REM-Aufnahme eines Sinterglaskörpers während des insterilen Betriebs	92
Abb. 6.29:	Insterile Dauerfermentation von hydrolysierter B-Stärke im Labor-Wirbelschichtreaktor, Ethanolselektivität (0-116 Tage)	93
Abb. 6.30:	Anfahren 2-stufige Technikums-Wirbelschichtanlage, insteril mit synthetischem Medium	95
Abb. 6.31:	Insterile Dauerfermentation von B-Stärkehydrolysat in 2-stufiger Technikums-Wirbelschichtanlage (15. - 37. Prozeßtag)	98
Abb. 6.32:	Ethanolselektivitäten der Technikums-Wirbelschichtanlage über Prozeßzeit, Regressionsanalyse	100
Abb. 6.33:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Sinterglaspartikels am Ende der Kolonisierungsphase	101
Abb. 6.34:	Gemessener und berechneter Gasgehalt in Abhängigkeit der Gasleerrohrgeschwindigkeit im Technikums-Wirbelschichtreaktor	106
Abb. 6.35:	Prinzipskizze 2-stufige Wirbelschichtanlage mit simultaner Ethanolabtrennung	108
Abb. 7.1:	Leistungsvergleich unterschiedlicher Reaktorkonzepte (Zulauf-Glukosekonzentration 120 g/l, Umsatz 98-99 %)	112
Abb. 10.1:	Regelkreis Umsatzregelung der Wirbelschichtanlage	124
Abb. 10.2:	Sprungantworten von P-, I-, D-, PID-Reglern	125
Abb. 10.3:	Labor-Wirbelschichtreaktor	132
Abb. 10.4:	Vollrohrgestell für Labor-Wirbelschichtreaktor	133
Abb. 10.5:	Einbauzylinder Abscheider im Reaktorkopf	134
Abb. 10.6:	pH Titrationsstrecke zum Einbau in den Umlauf	135
Abb. 10.7:	Reaktoreinlaufmodul aus Glas, Parallelschlitz-Plattenverteilerboden	136
Abb. 10.8:	Reaktorrohrmodul aus Glas mit 4 Stutzen GL 25 und Reaktorrohrmodul aus Glas mit Doppelmantel	137

Abb. 10.9: Reaktorkopfmodul aus Glas und Reaktordeckel aus Glas 138

Abb. 10.10: Einbauzylinder Reaktorkopf aus Stahlblech V4A mit Halterungen 139

Abb. 10.11: Vorfilter aus Stahl V4A 140

10.6 Verzeichnis Tabellen

Tab. 1.1:	Vergleich der Gäreigenschaften von *Zymomonas mobilis* und *Saccharomyces carlsberbensis*	2
Tab. 4.1:	Zusammensetzung der verwendeten Medien zur Ethanolfermentation mit *Zymomonas mobilis*	23
Tab. 4.2:	Drehwerte optisch aktiver Verbindungen in der Fermentationslösung	26
Tab. 4.3:	Gaschromatographische Analyse der Fermentationslösung	27
Tab. 4.4:	Ionenchromatographische Analyse der Fermentationslösung	28
Tab. 6.1:	Modellkonstanten des Erhaltungsstoffwechsels	51
Tab. 6.2:	Modellkonstanten der Wachstumsgeschwindigkeit	52
Tab. 6.3:	Oberflächeneigenschaften von modifizierten Sintergläsern	59
Tab. 6.4:	Modellkonstanten der Langmuir-Isothermen (Sorption von *Zymomonas mobilis* an Glasoberflächen)	62
Tab. 6.5:	Diffusionskoeffizienten in Wasser	77
Tab. 6.6:	Konstanten der Bestimmungsgleichung für den Thiele-Modul	78
Tab. 6.7:	Konstanten der Bestimmungsgleichung für die Sherwood-zahl	83
Tab. 6.8:	Analyse der eingesetzten B-Stärkehydrolysatchargen	84
Tab. 6.9:	Betriebsdaten Labor-, Technikums-Wirbelschichtreaktoren	99
Tab. 6.10:	Berechnung der Gasanteile e_G in den Wirbelschichtreaktoren	104
Tab. 6.11:	Gemessene Gasanteile im Technikums-Wirbelschichtreaktor	105
Tab. 7.1:	Betriebsdatenvergleich bei der Vergärung von B-Stärkehydrolysat	113
Tab. 10.1:	Elementaranalyse von *Zymomonas mobilis* aus synthetischem Glukosemedium	122
Tab. 10.2:	Biomassebestimmung in Sinterglas	123

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

Jül-2518
September 1991
ISSN 0366-0885