



Jahresbericht: 29. Januar 2010

Effizienzsteigerung von landwirtschaftlichen Trocknungsanlagen II

Nutzung der Prozessabfälle –
Pflanzenpresssäfte als Ressource

Auftraggeber:

Bundesamt für Energie BFE
Forschungsprogramm VTP
CH-3003 Bern
www.bfe.admin.ch

Auftragnehmer:

Fachhochschule Nordwestschweiz (FHNW)
Hochschule für Life Sciences (HLS)
Institut für Ecopreneurship (IEC)
Gründenstrasse 40
CH-4132 Muttenz
<http://www.fhnw.ch/lifesciences/iec>

Autoren:

Hommes, Gregor; FHNW, gregor.hommes@fhnw.ch
Sandoval, Lisseth; FHNW, lisseth.sandoval@fhnw.ch
Krummenacher, Stefan; Enterprice-partners, s.krummenacher@enerprice-partners.ch
Glauser, Walter; ALP, walter.glauser@alp.admin.ch
Ruckstuhl, Meinrad; Trocknungsanlage Zell, radi.ruckstuhl@bluewin.ch
Studer, Martin; Studer-Maschinenbau AG, markus.studer@studer-zell.ch

BFE-Bereichsleiter: Pulfer, Martin
BFE-Programmleiter: Pulfer, Martin
BFE-Vertrags- und Projektnummer: 103335/154397

Für den Inhalt und die Schlussfolgerungen sind ausschliesslich die Autoren dieses Berichts verantwortlich.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Abstract.....	2
1. Ausgangslage	3
2. Ziel der Arbeit	3
3. Methoden	4
4. Ergebnisse	8
5. Diskussion	11
6. Schlussfolgerungen	14
7. Status des laufenden Projektes	15
8. Anhang	16
Referenzen	22

Zusammenfassung

Für die moderne Industriegesellschaft hat Biomasse ein enormes Potenzial als nachhaltige Quelle organischen Kohlenstoffs. In Zeiten stark steigender Erdölpreise, infolge erhöhtem Erdölverbrauchs und steigender Sorge bezüglich nahender Ressourcenknappheit, ist die Nutzung nachwachsender Rohstoffe ein, z.B. für die chemische Industrie, erfolgversprechender Ansatz zur Schonung der Erdölressourcen. Es wurde erfolgreich untersucht, ob der bei der Trockenfuttermittelherstellung anfallende, gebührenpflichtig zu entsorgende, Graspresssaft durch biologische Umformungsprozesse zur Biogasproduktion, Bio-Ethanolgewinnung oder Milchsäureherstellung verwendet werden kann. Hierzu wurden die verschiedenen Fermentationsprozesse untersucht und die Ausbeute der gewünschten Reaktionsprodukte ermittelt. Die Studien haben gezeigt, dass die biotechnologische Nutzung des Graspresssaftes für alle untersuchten Prozesse sinnvoll sein könnte. Die Verwendung des Graspresssaftes zur Biogasproduktion zeigte keine nachteiligen Effekte, sofern die Lasten und die pH-Pufferung sinnvoll gewählt wurden. Ethanol konnte sehr schnell und einfach mittels Bäckerhefe hergestellt werden. Vor allem aber zeigten die Studien zur biotechnologischen Produktion organischer Säuren, dass eine mikrobielle Produktion von z.B. Milchsäure aus dem zurzeit als Abfall zu entsorgenden Graspresssaft nicht nur möglich ist, sondern sogar mit einer deutlichen Wertschöpfung verbunden sein könnte. Dem Betreiber einer modifizierten Trocknungsanlage würden, in Abhängigkeit vom Zuckergehalt des Graspresssaftes, ein finanzieller Mehrwert von bis zu 700.000 SFr. pro Anlage (80 m³ Presssaft) und Jahr entstehen.

Abstract

In the modern industrialised society biomass has an enormous potential as a sustainable source of organic hydrocarbon. The rising oil prices due to the high oil consumption and fear of scarcity of resources, the production of organic acids from renewable raw materials for the chemical industries is one promising approach to protect the oil resources. The present study evaluated the potential of biomassconversion of grass press sap, a wastestream produced via novel fodder manucature technology. In this context different applications were tested, such as production of bio-gas bio-ethanol and organic acids (lactic acid). For this proposes numerous fermentation processes were tested in order to determine the transformation efficiency and the rate of yield concerning the target product. The obtained results demonstrated the high value of grass press sap as renewable resources. Using these resources for production of biogas, no negative effect could be observed, as long as process parameters are controlled. Both, lactic acid and ethanol fermentation processes were successfully performed. The latter accomplished insufficient yields due to the low sugar content, but the former fermentation achieved a overall lactic acid content that tends to result in a strong value enharncement. As for that, a fodder manufactor could, depending on the content of sugar in the grass press sap, have an economic benefit of up to 700.000 SFr per drying plant (80 m³ press sap) and year.

1. Ausgangslage

Die Modifikation des Prozesses zur Pflanzentrockenfuttermittelherstellung erbrachte einerseits Vorteile innerhalb der Energieeinsparung, andererseits wurde durch die Installation einer Vorpresse ein Prozessabfallstrom erzeugt, der zurzeit als Sonderabfall entsorgt werden muss. Für den Fall der Graspressung wurde der Abfallstrom „Graspresssaft (GPS)“ analysiert und als hochwertiger Rohstoff definiert. Die Verwendung dieses Rohstoffes konkurriert nicht mit Nahrungsmitteln und die komplexen Inhaltsstoffe eignen sich als Substrat zur Kultivierung anspruchsvoller Mikroorganismen, die zur Wertstoffherstellung in der Lage sind (Klinke et al., 2002). Generell können, je nach Mikroorganismus und Verfahrenstechnik, aus einem Rohstoffgemisch verschiedene biotechnologische Produkte hergestellt werden (Bengtsson et al., 2008, Hofvendahl and Hahn-Hägerdal 2000, Li et al., 2008, Lü et al., 2008, Sánchez and Cardona 2008). Die Herstellung dieser Produkte aus einem „non-food“-Ressource könnte zu einer Wertschöpfung führen. Darüber hinaus birgt diese Verwertung das Potenzial zur Energieeinsparung, jedoch nicht nur in der direkten Produktion von Energie oder Energieträgern, sondern auch in der Schonung der Biomasseressourcen, die zur Energieproduktion zur Verfügung stehen.

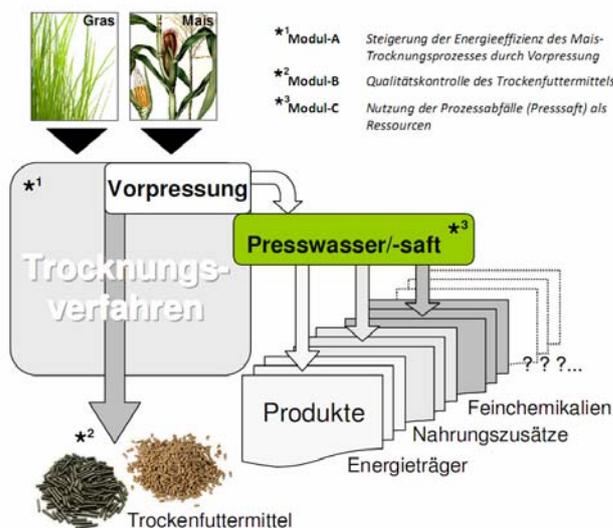
2. Ziel der Arbeit

Der Projektteil (Schema 1; Modul C) „Nutzung der Prozessabfälle – Pflanzenpresssäfte als Ressourcen“ verfolgte das Ziel, in Analogie zur „Grünen Bioraffinerie“¹, ein innovatives Technologiekonzept zur biotechnologischen Verwertung des bisher ungenutzten Rohstoffs zu entwickeln.

Folgende Prinzipien lagen der Presssaftverwertung zugrunde:

- Abfall- und emissionsfreie Wertstoffgewinnung aus Presswasser im Sinne einer Kreislaufwirtschaft
- Weitgehender Verzicht auf Hilfsstoffe in der Produktion
- Niederenergetische Prozesse zur Herstellung der Produkte aus ungenutzten Abfällen der Verwertung nachwachsender Rohstoffe (NawaRo)
- Verwertbarkeit ungenutzter Abfälle aus NawaRo-Produktion unter dem Aspekt des „multi-product-utilisation“ (Wirtschaftlichkeit kann häufig nur erreicht werden, wenn aus einem Rohstoff bzw. Rohstoffgemisch mehrere Produkte generiert werden können)

Die sinnvolle Verwertung des Abfallstroms ist ein notwendiger Schritt in der flächendeckenden Etablierung des modifizierten Trocknungsverfahrens. Die Verwertung des Presssaftes soll somit direkt und indirekt zur Energieeinsparung und darüber hinaus zur finanziellen Entlastung der schweizerischen Landwirtschaft beitragen.



Schema 1 Übersichtsskizze des gesamten Forschungsprojekts „Effizienzsteigerung von Landwirtschaftlichen Trocknungsanlagen –II“; Dokumentation der Kernaspekte der Module 1-3

¹ Grüne Bioraffinerien sind integrierte Systeme zur ganzstofflichen Nutzung des nachwachsenden Rohstoffs Wiesengrünmasse ("Gras") bzw. Silage. Ziel ist es mittels nachhaltiger Technologien ein "Multi-Product" System aufzubauen, dass durch seine betriebswirtschaftliche Tragfähigkeit zum Erhalt der Kulturlandschaft und zur Einkommenssicherung der Landwirte beiträgt.

3. Methoden

3.1. Pflanzenpresssäfte als Substrat

Graspresssaft

Der GPS stammte aus einer landwirtschaftlichen Trocknungsanlage zur Trockenfuttermittelproduktion in Zell² (Luzern) und wurde sowohl vorbehandelt (filtriert), wie auch als Rohpresssaft untersucht.

Die Filtration des GPS wurde mittels einer rotierenden SSDF (Single Shaft Rotating Disc Filter) Filtrationsanlage (Novoflow) bei einer Porengrösse von 0,2 µm durchgeführt. Anschliessend wurde der filtrierte GPS in Plastikcontainern bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert. Charakterisiert wurde der GPS durch die Forschungsanstalt Agroscope (Liebefeld-Posieux). Der Gesamtzuckergehalt lag bei ca. 24 g/L bei einem pH von ca. 5,7.

3.2. Biogasproduktion

3.2.1. Mikroorganismen

Kernstück der biologischen Prozesse eines sog. „Upflow anaerobic sludge blanket reactor“ ist anaerober granulöser Schlamm (Aggregate aus Mikroorganismen). Der Schlamm eines Reaktors der Firma Zweifel Pommy-Chips wurde für die Tests eingesetzt. Er wurde für Aktivitätstest bezüglich der Biogasproduktion aus GPS verwendet.

3.2.2. Aktivitätsmessungen

Ein speziell angefertigtes Multikanaldruckmesssystem (Zandvoort et al., 2002) wurde zur Bestimmung der Aktivität eingesetzt. Das verwendete Medium war ein 40 mM PO₄-Puffer (pH 7) mit Spurenelementlösung nach (Stams et. al., 1992). Die genaue Zusammensetzung kann der Tabelle 1 (siehe Anhang) entnommen werden. Der Aktivitätstest wurde in Serumflaschen (100 mL) durchgeführt. Die Versuchsreihe fand in einem Inkubationsschüttler (IKA KS 4000 i control) bei einer konstanten Temperatur von 37°C ± 0,5°C und 70 upm Schüttelfrequenz statt.

3.2.3. Methanbestimmung

Der Methangehalt wurde mittels Gaschromatographie bestimmt. Ausgewertet wurden die Daten mittels externer Kalibrierung. Für die Analyse wurde ein HP 5890 Series II Gaschromatograph, mit einer Plot 5A Säule (30 m, 0,53 mm, 25 µm) bei einer konstanten Ofentemperatur von 50°C, Injektortemperatur von 275°C, Detektortemperatur von 300° C verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 1 µL pro Probe. Die Auswertung wurde mit der Software GC ChemStation Rev.A 09.03[1417] von Agilent Technologies durchgeführt.

3.3. Ethanolproduktion

3.3.1. Mikroorganismen

Die zur Ethanolproduktion verwendete *Saccharomyces cerevisiae*, wurde in allen Versuchen als Lyophilisat (5 g/L) eingesetzt. Die Inkubation, zwischen 1-14 Tagen, fand bei 30°C im Erlenmeyerkolben statt.

3.3.2. Ethanolgehaltsbestimmung

Gaschromatographie

Die Ethanolkonzentration wurde mittels Gaschromatographie analysiert. Ausgewertet wurden die Daten anhand einer Kalibrierungsreihe von 50 mL/L bis 500 mL/L. Für die Analyse wurde ein HP 5890 Series II Gaschromatograph, mit einer HP-Innowax Säule (19091N- 133; Länge 30 m, I.D. 0,25 mm, Film 0,25 µm) bei einer konstanten Ofentemperatur von 50°C, Injektortemperatur von 275°C, Detektortemperatur von 300°C verwendet. Die Graspresssaftproben wurden mit Ameisensäure stabilisiert

² Trocknungsanlage Zell (LU) CH-6144 Zell

(1% finale Konz.). Das Probeninjektionsvolumen betrug 1 µL. Die Auswertung wurde mit der Software GC ChemStation Rev.A 09.03[1417] von Agilent Technologies durchgeführt.

3.4. Produktion organischer Säuren (Milchsäuren)

3.4.1. Vorbereitung der Starterkulturen

Für die Kinetikstudie in Serumflaschen sowie für die fermentative Milchsäuregärung im Multifors Bio-reaktor (Infors HT) wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten Bakterienstämme verwendet. Es wurden ausschließlich homofermentative, gram-positive und fakultativ anaerobe Milchsäurebakterien als Starterkultur verwendet. Darüber hinaus wurde noch ein kommerziell erhältliches Silierrmittel³ für Gras- und Maissilage (UroSIL NH 708) als Starterkultur innerhalb der Kinetikstudie untersucht [Zusammensetzung: Zuckerrohrmelasse, Kräuterextrakte, Wasser und Milchsäurebakterien (5×10^8 KBE \times g⁻¹).

Tabelle 1 Als Starterkultur verwendete Mikroorganismen; DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; Braunschweig (Germany)

Mikroorganismus	DSMZ
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2648
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	20242
<i>Lactobacillus buchneri</i>	5987
<i>Pediococcus acidilactici</i>	20238
<i>Pediococcus acidilactici</i>	20284
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	46292

Um ausreichend Biomasse der jeweiligen Bakterienreinkulturen zu erhalten, wurden Kulturen unter aeroben Bedingungen, in 400 mL Standart -I-Medium (Merck), bei 30°C inkubiert. Bei einer OD von 2 (ca. 100 mg TS/L) konnten die Zellen abgeerntet werden, um anschliessend direkt als Starterkultur inokuliert zu werden. (1)

- (1) Trockensubstanz (TS) bezeichnet das Trockengewicht; ein Aliquot von 50 mL wurde in einem tarierten Kunststoffgefäß im Vakuumtrockenschrank bei 70°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und im Exsikkator bis zur gravimetrischen Erfassung aufbewahrt.

3.4.2. Spezifische Milchsäureproduktion

Für die Berechnung der spezifischen Wachstums- sowie Produktionsraten wurden die Versuche in Triplikaten angesetzt. Die erhobenen Parameter waren jeweils koloniebildende Einheiten (KBE), Trockensubstanz (TS) und die Milchsäurekonzentration.

Die KBE-Bestimmung, die quantitative Erfassung von lebensfähigen und vermehrungsfähigen Mikroorganismen, wurde mittels Plattentest auf Standard-I-Nähragarplatten (Merck) durchgeführt. Die Agarplatten wurden bei 30 °C für 3-5 Tagen inkubiert. Anschliessend wurde die Anzahl an KBE mittels Scanner (BioRad; GS-800 Calibrated Densitometer) und einer Software (BioRad; Quantity One – 4.6.1) quantifiziert.

Zur Bestimmung der TS wurde ein Aliquot der Probe zentrifugiert (5 min bei 21.000 x g) und der Überstand abgenommen. Dieser wurde für die technische Analytik (Quantifizierung der Milchsäure) sowie für die pH-Wertbestimmung verwendet. Das resultierende Pellet wurde dreifach gewaschen, schliesslich bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (Vakuumtrockenschrank bei 70°C; anschliessend 24 h im Exsikkator) bis zur gravimetrischen Erfassung aufbewahrt.

Die bakterielle Biomassezunahme wurde über die TS berechnet (2).

$$TS = m_{ges} - m_W \quad (1)$$

$$TS_{bakt} = TS - TS_{Substrat} \quad (2)$$

- (1) Die Trockensubstanz (TS) bezeichnet jenen Bestandteil einer Probe, der nach Abzug des evaporierbaren Wassers übrig bleibt; m_{ges} die Gesamtmasse der Probe, m_W die Masse des Wassers.

³ Niederhäuser AG Rothenburg (LU) CH-6023 Rothenburg

- (2) Die bakterielle Biomassezunahme (TS_{bakt}) bezeichnet die Trockensubstanz von Proben abzüglich des TS_{Substrat} zum Zeitpunkt t_0 .

3.4.3. Kinetisches Model

Die Indikatoren Ausbeute- und Umsatzkoeffizienten mit Bezug zur Biomasse und Milchsäurekonzentration wurden zur Bewertung der Fähigkeit des Bakteriums, das Substrat in Milchsäure zu konvertieren, herangezogen. Entsprechend wurden kinetische Parameter wie die spezifische Wachstumsrate (μ), Produktionsrate (Y_P), die spezifische Produktionsrate (Y_{PX}) und die Ausbeute pro eingesetzte Menge Substrat ($Y_{MS/\text{tot}}$) berechnet.

Zur Berechnung von spezifischer Milchsäureproduktion und Wachstumsrate wurden folgende kinetische Modelle verwendet:

Zunahme der Biomassekonzentration als Funktion der Zeit:

$$\frac{dx}{dt} = \mu X \quad (3)$$

- (3) Zunahme der Biomassekonzentration X als Funktion der Zeit t ; μ = spezifische Wachstumsrate. Für die exponentielle Wachstumsphase kann μ als konstant angesehen werden ($\mu = \mu_{\text{max}}$). Infolge des Fehlens von Zu- und Ablauf (Batchverfahren), ist die Verdünnungsrate ($K_d = 0$) in Formel (3) nicht mehr enthalten.

Produktionsrate (Y_P):

$$Y_P = \Delta MS \quad (\text{Ableitung 1. Ordnung}) \quad (4)$$

- (4) Produktionsrate in $\text{g/L} \cdot \text{h}^{-1}$; MS = Milchsäurekonzentration

Spezifische Produktionsrate (Y_{PX}):

$$Y_{PX} = \frac{\Delta MS}{\Delta TS_{\text{bakt}}} \quad (\text{Ableitung 1. Ordnung}) \quad (5)$$

- (5) Produzierte Produktmenge bezogen auf die die produzierte Biomasse in $\text{g/L} \cdot \text{h}^{-1}$

Ausbeute in g Milchsäure pro g verfügbarem Substrat ($Y_{MS/\text{tot}}$):

$$Y_{MS/\text{tot}} = \frac{MS}{24(\text{Zucker})} \quad (\text{Ableitung 1. Ordnung}) \quad (6)$$

- (6) Ausbeute in g/g verfügbarem Substrat; Der Gesamtzuckergehalt lag bei 24 g/L

3.4.4. Reaktordesign

Kinetikstudie

Zur Bestimmung der spezifischen Wachstums- und Produktionsraten von Milchsäure aus GPS wurden für die anaerobe Fermentation modifizierte Serumflaschen mit einem maximalen Füllvolumen von 100 mL verwendet (Abb. 1). Die Versuchsreihe fand in einem Inkubationsschüttler (IKA KS 4000 i control) bei einer konstanten Temperatur von $30^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ statt. Die Durchmischung der Reaktionsansätze (80 mL Füllvolumen, mit $80 \mu\text{L}$ (100 mg/L ; 8 mg / Ansatz) der jeweiligen Starterkultur-Suspension inokuliert) erfolgte mittels Multi-Magnetrührer (Komet Thermo Scientific Variomag Poly 15) bei einer Röhredrehzahl von 400 upm . Um anaerobe Bedingungen zu gewährleisten, wurden die modifizierten Bioreaktoren nach der Inokulation und zweimalig während der Gärungsstudie mittels einer Multi-Begasungs-Einheit (Automatic 12-Channel Gas-Change-System, Wageningen UR) über Injektions-Kanülen mit Stickstoff (N_2) begast (40 Zyklen, Niederdruckgrenze bei 400 mbar und Hochdruckgrenze bei 1200 mbar). Der pH-Wert wurde nachfolgend mittels einer pH-Elektrode (Mettler To-

ledo InLab, Semi-Micro pH) in den restlichen Probenvolumina der jeweiligen Entnahmezeitpunkte gemessen.

Langzeitstudie

Die Langzeitstudie erfolgte im Maßstab 10:1 gegenüber der Kinetikstudie, unter Verwendung eines multiparallelen Kleinbioreaktorsystems (max. Volumen 1 L; Multifors Fermenter, Infors HT), im Batch-Verfahren mit unabhängig geregelten, für den anaeroben Gebrauch modifizierten Fermentationseinheiten (Abb. 2). Stickstoff wurde über einen Sterilfilter konstant den mit 0,8 L GPS gefüllten Fermentern zugeführt (Abb. 3, Punkt 5), um die anaeroben Bedingungen zu gewährleisten. Je 800 mL Presssaft wurden pro Fermenter als Substrat eingesetzt. Nach Inokulation mit 800 µL (100 mg/L bzw. Ansatz) Starterkultur-Suspension wurden die befüllten Reaktoren mit N₂ für eine halbe Stunde begast. Des Weiteren wurden die Reaktoren nach der Inokulation und nach jeglichen Probeentnahmen 1 min lang mit erhöhtem N₂-Fluss begast. Die Rührerdrehzahl der Multifors-Reaktoren betrug 50 min⁻¹ und der pH-Wert wurde Online über eine pH-Elektrode (Mettler Toledo, 405-DPAS-SC-KBS/225) aufgezeichnet. Auch diese Versuchsreihe fand bei einer konstanten Temperatur von 30°C ± 0,5°C statt.

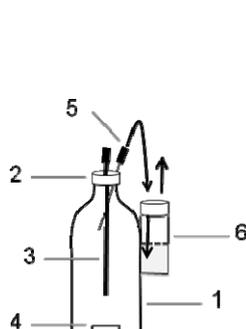


Abb. 2 Technische Skizze des modifizierten Biorektors; 1. Serumflasche (100 mL); 2. Cap mit Gummistopfer; 3. Probenahmeventil, bestehend aus einem Teflonschlauch (i.d. 2 mm) mit Zweiweghahn und Spritze; 4. Magnetrührfisch; 5. Injektions-Kanüle mit Gummischlauch (i.d. 1 mm); 6. Gaswascheinheit gefüllt mit Wasser, GC-Vial (4 mL) mit Septum und Kanülen versehen.

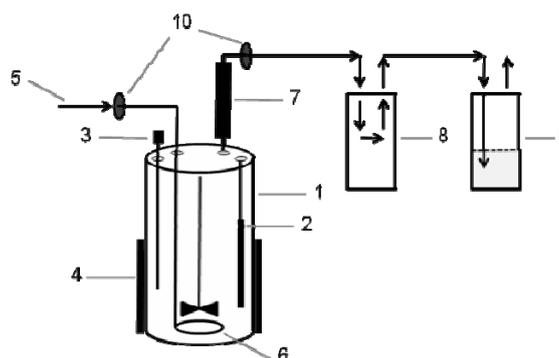


Abb. 3 . Technische Skizze des Multifors Kleinbioreaktorsystem; 1. Multifors Fermenter Einheit; 2. pH-Meter; 3. Probenahmeventil mit Spritze; 4. Heizbacken; 5. N₂-Begasung; 6. Disperser; 7. Kühlaggregat; 8. Schutzflasche gegen Rückstoss; 9. Gaswaschflasche gefüllt mit H₂O; 10. Sterilfilter (0,3/1 µm).

3.5. Technische Analytik

Die Auftrennung der Proben erfolgte mit einem Gaschromatograph (Agilent Technologies 7890A GC System), ausgerüstet mit einem Headspace Autosampler (Agilent Technologies G1888 Network Headspace Sample). Identifizierung, sowie Quantifizierung des Analyten geschah mittels Massenspektrometrie (Agilent Technologies 5975C inert XL MSD with Triple-Axis Detector). Die Proben wurden im Headspace Autosampler auf eine Ofentemperatur von 130°C erhitzt. Dabei betrug die Loop-Tem. 140°C, die Transferline-Temp. 150°C und die Äquilibrierung 10 min. Zur Auftrennung des Analyten über den GC wurde eine HP-5MS Kapillarsäule (30 m x 250 µm x 0,25 µm) mit einer stationären Phase von 5% Phenylmethylsiloxan mit Helium, bei einer Flussrate von 0,93 mL/min, als Trägergas verwendet. Bei einer Gesamtlaufzeit von 18,7 min wurde die Ofentemperatur für 3 min auf 60°C gehalten, dann um 6°C/min auf 120°C und weiter bei 30°C/min auf 200°C erhöht. Die Injektor-temperatur betrug 250°C bei einem Injektorfluss von 5 mL/min und einem Säulenfluss von 1 mL/min.

3.5.1. Probenaufbereitung für die Headspace GC-MS

Die Derivatisierungsmethode (Heitefuss et al., 1990) wurde mit leichten Modifikationen durchgeführt. Dazu wurden die entnommenen Proben zentrifugiert (2 min bei 21.000 x g) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß (Eppendorf-Tube; 2 mL) transferiert. 20 µL des Überstandes wurden in ein GC-Headspace-Vial (HS-Vial) gegeben und mit 10 µL gesättigtem Natriumhydrogensulfat (NaHSO₄) versetzt. Zusätzlich wurde noch 10 µL HPLC-Qualität Methanol (CH₃OH) dazugegeben und die HS-

Vials gasdicht verschlossen. Anschließend wurden die Proben bei 120°C für 20 min durch saure Methylierung derivatisiert und zur Analyse bereitgestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Biogasproduktion

Die Tests zur Biogasproduktion aus GPS (vergoren oder frisch) zeigten unter Verwendung eines granulösen Schlammes, je nach Höhe der CSB-Last im Medium, unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der produzierten Methanmenge, der spezifischen methanogenen Aktivität sowie der maximal erreichbaren (theoretischen) Methanausbeute.

Bei Steigerung der CSB-Last auf 1 g bzw. 2 g CSB/L zeigte sich eine stufenweise Zunahme in der Methanproduktion über die Zeit (siehe Anhang, Abb. 1 und 3). Die Last von 5 g CSB/L wirkte sich im Vergleich zu 2 g CSB/L ungünstig auf die Methanausbeute aus, zeigte jedoch eine deutlich höhere spezifische methanogene Aktivität mit einem Maximum nach 6,3 h (frischer GPS) sowie nach 12,3 h (vergorener GPS) von 5,95 bzw. 2,09 [g CSB_{CH₄} * d⁻¹ * g⁻¹] respektive (siehe Anhang, Abb. 2 und 4). Eine organische Last von 10 g CSB/L wirkte sich hingegen, trotz anfänglicher hoher spezifischer methanogener Aktivität, inhibierend auf die Methanogenese aus (siehe Anhang, Abb. 1 und 2).

Die höchste theoretische Ausbeute konnte mit niedriger CSB-Last erzielt werden. Es zeigte sich, dass die CH₄-Ausbeute des frischen Presssafts bei CSB-Lasten von 1 g und 2 g CSB/L generell höher ausfielen (82,6 %; 79,6 %) als bei vorfermentiertem Presssaft (77,8%; 72,7%).

4.2. Bioethanolproduktion

Nach Etablierung der analytischen Methoden und Optimierung des Versuchsdesigns konnte unter Verwendung der Bäckerhefe *Sachcharomyces cerevisiae* (5 g Lyophilisat / L) Bioethanol hergestellt werden. Die Vergärung (siehe Anhang, Abb. 5) des sowohl filtrierten, als auch unfiltrierten GPS, zeigte innerhalb einer Inkubation von 24 h bei 30°C einen raschen Anstieg des Ethanolgehalts. Bereits nach 6 Stunden Inkubation wurde ein Maximalwert von ca. 24 g Ethanol/L filtriertem GPS und ca. 17,5 g Ethanol/ L unfiltriertem GPS gemessen.

4.3. Produktion organischer Säuren

In Kinetikstudien wurde untersucht, inwieweit es möglich ist den Pflanzenpresssaft zur Produktion von Milchsäure zu verwenden. Diverse Bakterien wurden als Starterkultur getestet. Diese Tests zeigten deutlich, dass alle eingesetzten Bakterien in der Lage waren das angebotene Substrat zu verwerten und Milchsäure zu produzieren. Um den Einsatz spezifischer Reinkulturen bewerten zu können wurde als Referenz eine Inkubation ohne zusätzliche Starterkultur durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Kontrolle zeigten, dass die im GPS noch vorhandenen autochthonen Mikroorganismen eine Vergärung des Presssaftes bewirkten. Um vergleichbare Milchsäurekonzentrationen zu erhalten, musste die Inkubationszeit aufgrund der geringeren initialen Zellzahl entsprechend verlängert werden. Weiterhin wurde ein kommerziell erhältliches Produkt, das als Starterkultur zur Herstellung von Grassilage eingesetzt wird, getestet. Hauptvorteil der Verwendung einer Starterkultur lag vor allem in der Verkürzung der Fermentationszeit.

Im weitem Textverlauf werden relevante Ergebnisse der Kinetikstudie beschrieben:

4.3.1 Vergärung ohne Starterkultur oder unter Verwendung eines Siliermittels

Sowohl die Inkubation des GPS ohne Starterkultur, wie auch die Vergärung unter Zufuhr eines Siliermittels, zeigten eine lange Adaptionsphase (lag-Phase) von ca. 12 h, gemessen Biomassezuwachs und Keimzahl (Abb. 6; b, d). Im Kontrollansatz (ohne Inokulum) stieg die Keimzahl von $< 1 \times 10^5$ [KBE/mL] auf einen Titer von ca. 3×10^9 [KBE/mL] nach der exponentiellen Phase an.

Einen ähnlichen Verlauf nahm die Keimzahl nach Beimpfung mit dem Siliermittel. Das Siliermittel wies einen sehr geringen Gehalt an vitalen Keimen auf, sodass hier die ebenfalls anfänglich sehr geringe Keimzahl von $< 1 \times 10^5$ auf ca. $3,7 \times 10^9$ [KBE/mL] nach der exponentiellen Phase anstieg. Die geringe KBE führte zu einer zeitlichen Verzögerung der Gäraktivität. Der im Versuchsansatz nicht konstant gehalten pH, konnte als Indikator biologischer Aktivität bzw. Säurebildung herangezogen werden. Er senkte sich im Kontrollansatz von anfänglich 5,75 auf $3,80 \pm 0,19$ bzw. auf $3,66 \pm 0,03$ bei Einsatz des Siliermittels als Starterkultur. Gleichzeitig stieg die Konzentration an Milchsäure in beiden Versuchs-

ansätzen an. Sie erreichte ohne Starterkultur einen Maximalwert von $17,2 \pm 2,0$ [g/L] nach 66 h, wohingegen mit dem Silierring eine höhere Endkonzentration (nach 66 h) von maximal $20,0 \pm 0,5$ [g/L] erreicht wurde.

4.3.2 Vergärung mit Starterkulturen der Gattung *Lactobacillus*

In weiteren Fermentationsstudien wurde die Verwendung von Starterkulturen der Gattung *Lactobacillus* untersucht. Hier konnten deutliche Vorteile bei der Milchsäurefermentation erzielt werden.

Reinkulturen der Gattung *Lactobacillus* wiesen eine kurze lag-Phase gemessen am Biomassezuwachs, respektive an der Milchsäureproduktion (siehe Anhang, Abb. 7 a, c) auf. Die Vergärung des GPS mit *L. plantarum* lieferte eine maximale Biomassezunahme von $2,2 \pm 0,3$ [g/L] eine pH-Wertsenkung auf $3,8 \pm 0,1$. Die Milchsäurekonzentration stieg nach 66h auf eine maximale Konzentration von $17,8 \pm 0,5$ [g/L]. Die Biomassezunahme der zwei weiteren getesteten Starterkulturen, *L. acidophilus* und *L. buchneri* zeigte einen direkten Anstieg, ohne lange lag-Phase (siehe Anhang, Abb. 7 c, d; Abb. 7 e, f). Dabei wiesen die Arten *L. acidophilus* und *L. buchneri* mit einer Zunahme von $2,6 \pm 0,1$ [g/L] die höchste maximale bakterielle Biomassezunahme von allen Fermentationsansätzen auf. Auch die Daten zu pH (*L. buchneri* $3,66 \pm 0,01$; *L. acidophilus* $3,67 \pm 0,01$), KBE ($4,2 \times 10^9$ [KBE/mL]; $4,9 \times 10^9$ [KBE/mL]) und Milchsäurekonzentration ($20,1 \pm 0,3$ [g/L]; $20,5 \pm 0,5$ [g/L]) bestätigten (siehe Anhang, Abb. 7 c, e), dass beide Arten in der Lage waren, das angebotene Substrat unter den gewählten Inkubationsbedingungen zu verwerten und Milchsäure zu produzieren.

4.3.3 Vergärung mit Starterkulturen der Gattung *Pediococcus*

Um die Milchsäureproduktion durch Stämme der Gattung *Lactobacillus* bewerten zu können, wurden drei weitere Milchsäurebakterien der Gattung *Pediococcus* in die Studie einbezogen.

Die Ergebnisse werden im weiteren Textverlauf sowie in Abb. 8 (siehe Anhang) beschrieben:

Keine der drei inokulierten Reinkulturen wies, gemessen an der bakteriellen Biomassezunahme, eine lag-Phase auf (siehe Anhang, Abb. 8 a, b). Der Stamm *P. acidilactici* (DSMZ 20238) zeigte im Test eine starke Absenkung des pH auf einen Wert von $3,76 \pm 0,01$. Die bakterielle Biomasse stieg auf $2,5 \pm 0,1$ [g/L] und erreichte einen maximalen Titer von ca. $4,5 \times 10^9$ [KBE/mL] nach 66h. Zu dieser Zeit betrug die max. Milchsäurekonzentration $17,9 \pm 0,2$ [g/L]. Im Vergleich zeigte ein anderer Stamm derselben Art, der *P. acidilactici* (DSMZ 20284), eine Milchsäureausbeute von $20,1 \pm 0,3$ [g/L] ebenfalls nach 66 h (siehe Anhang, Abb. 8 c, d). Die Biomassezunahme dieses Stammes stieg auf $2,6 \pm 0,1$ [g/L], der pH senkte sich tiefer ab ($3,66 \pm 0,01$) und ein Titer von $4,5 \times 10^9$ [KBE/mL] wurde erreicht. Der Vergleich dieser beiden *P. acidilactici* mit einem weiteren Vertreter derselben Gattung (*P. pentosaceus*) zeigte deutliche Unterschiede in der Fermentation. Die bakteriellen Biomassezunahme war mit maximal $2,2 \pm 0,1$ [g/L] und einem Titer von ca. $6,0 \times 10^8$ [KBE/mL] schwächer als die *P. acidilactici* Arten (siehe Anhang, Abb. 8 e, f). Darüber hinaus war der maximale Milchsäureertrag mit $14,6 \pm 0,3$ [g/L] nach 66 h auch der tiefste der gesamten Studie.

4.3.4 Spezifische Wachstums- und Produktionsraten

Die Formulierung von Ausbeute- und Umsatzkoeffizienten war notwendig, um die Ergebnisse mit Werten anderer Forschungsarbeiten vergleichen zu können. So war es möglich mit Bezug zur Biomasse vergleichende Aussagen über das Potential der untersuchten Organismen/-gemeinschaften zu treffen. Die erhaltenen Resultate bezüglich der kinetischen Parametern, wie die spezifische Produktionsrate (Y_{PX}), die Produktionsrate (Y_P), die spezifische Wachstumsrate (μ) und die Ausbeute im Vergleich mit dem Substrat ($Y_{MS/tot}$), sind in der Tabelle 2 dokumentiert.

Ausbeute pro g Substrat ($Y_{MS/tot}$)

Die höchsten Ausbeuten pro g verfügbarem Substrat ($Y_{MS/tot}$) zeigten die Milchsäurebakterien *L. buchneri* ($0,84 \pm 0,01$ [g/g]), *L. acidophilus* ($0,85 \pm 0,02$ [g/g]) und *P. acidilactici* (DSMZ 20284) mit $0,84 \pm 0,01$ [g/g], sowie die Gärung mit zugefügtem Silierring ($0,83 \pm 0,02$ [g/g]). Die Ergebnisse von *L. plantarum* ($0,74 \pm 0,02$ [g/g]), *P. acidilactici* (20238) ($0,75 \pm 0,01$ [g/g]) zeigten eine ähnliche Leistung wie der Kontrollansatz ohne Starterkultur ($0,75 \pm 0,08$ [g/g]). Das schlechteste Ergebnis zeigte *P. pentosaceus* mit einer Ausbeute von $0,61 \pm 0,01$ [g/g].

Spezifische Produktionsrate (Y_{PX})

Die spezifische Produktionsrate (Y_{PX}), betrug bei den Kontrollansätzen ohne Zufuhr einer Starterkultur, $4,14$ [g/L*h⁻¹]. Im Vergleich hierzu wurde bei Verwendung des Silierrings eine Y_{PX} von $0,81$ [g/L*h⁻¹]

erreicht. Im Test der Gattung *Lactobacillus* zeigte *L. plantarum* mit $0,96 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ die höchste Y_{PX} , gefolgt von *L. buchneri* mit $0,52 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ und *L. acidophilus* mit $0,35 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$. Die höchste Y_{PX} im Test der Gattung *Pediococcus* wies *P. acidilactici* (DSMZ 20238) mit $1,73 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ auf, gefolgt von *P. pentosaceus* mit $0,49 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ und schließlich *P. acidilactici* (DSMZ 20284) mit der tiefsten Y_{PX} von $0,25 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$.

Produktionsrate (Y_P)

Der Kontrollansatz zeigte eine Y_P von $0,76 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$. Im Vergleich hierzu wies das Siliermittel ein Zwischenmaximum von $0,85 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ auf. Unter Berücksichtigung der Messschwankungen konnte nach einer konstanten Phase eine Phase deutlicher Steigung in der Produktbildung mit $1,03 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ berechnet werden. Dasselbe Bild zeigte *L. plantarum*, der in einer ersten Phase eine Y_P von $0,67 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$, gefolgt von einer zweiten Phase mit erhöhter Produktionsrate von $0,78 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$, auf wies. *L. acidophilus* und *L. buchneri* zeigten hingegen zunächst eine Phase in der die Y_P $0,92 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ bzw. $0,94 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ betrug, gefolgt von einer schwächeren Phase mit geringerer Produktionsrate ($0,60 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ bzw. $0,77 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$). Auch die Gattung *Pediococcus* zeigte ein Zwischenmaximum, mit einer Y_P von jeweils $1,03 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ und $0,97 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ der Art *P. acidilactici* (DSMZ 20284 respektive 20238) und $0,71 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ der Art *P. pentosaceus*, gefolgt von einer zweiten Phase mit Produktionsraten von $0,68 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$, $0,65 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ und $0,86 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ respektive.

Spezifische Wachstumsrate (μ)

Die höchste spezifische Wachstumsrate der Gattung *Lactobacillus* wies *L. buchneri* mit $0,21 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ auf, gefolgt von *L. acidophilus* mit $0,20 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ und *L. plantarum* mit $0,13 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ auf. Die höchste spezifische Wachstumsrate der gesamten Kinetikstudie zeigte *P. acidilactici* (DSMZ 20284) mit einem μ von $0,38 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$, wobei *P. acidilactici* (DSMZ 20238) die tiefste Rate ($0,11 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$) der gesamten Studie aufweist. Eine ebenfalls tiefe spezifische Wachstumsrate zeigte *P. pentosaceus* mit einem μ von $0,12 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$.

Tabelle 2 Ergebnisübersicht der Kinetikstudie. Abkürzungen: KBE, Koloniebildende Einheiten

Versuchsansatz	KBE [KBE/mL]	TS _{bakt} [g/L]	MS [g/L]	Y _{MS/tot} [g/g]	Y _P [g/L·h ⁻¹]	Y _{PX} [g/L·h ⁻¹]	μ [g/L·h ⁻¹]
Kontrolle	$3,1 \times 10^9$	$2,4 \pm 0,5$	$17,2 \pm 2,0$	$0,72 \pm 0,08$	0,76	4,14	0,18
Siliermittel	$3,7 \times 10^9$	$2,7 \pm 0,1$	$20,0 \pm 0,5$	$0,83 \pm 0,02$	0,85	0,81	0,18
<i>L. plantarum</i>	$6,9 \times 10^9$	$2,3 \pm 0,3$	$17,8 \pm 0,5$	$0,74 \pm 0,02$	0,67	0,96	0,13
<i>L. acidophilus</i>	$4,9 \times 10^9$	$2,6 \pm 0,1$	$20,5 \pm 0,5$	$0,85 \pm 0,02$	0,92	0,35	0,20
<i>L. buchneri</i>	$4,2 \times 10^9$	$2,6 \pm 0,1$	$20,1 \pm 0,3$	$0,84 \pm 0,01$	0,94	0,52	0,21
<i>P. acidilactici</i> (20238)	$4,5 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,1$	$17,9 \pm 0,2$	$0,75 \pm 0,01$	0,97	1,73	0,11
<i>P. acidilactici</i> (20284)	$4,5 \times 10^9$	$2,6 \pm 0,1$	$20,1 \pm 0,3$	$0,84 \pm 0,01$	1,03	0,25	0,38
<i>P. pentosaceus</i>	$6,0 \times 10^8$	$2,2 \pm 0,1$	$14,6 \pm 0,3$	$0,61 \pm 0,01$	0,71	0,49	0,12

MS, Milchsäure; TS_{bakt}, maximale bakterielle Biomassezunahme; Y_{MS/tot}, Ausbeute in g pro g verfügbarem Substrat (Zucker); Y_{PX}, maximale spezifische Produktionsrate in g MS pro L pro h; Y_P, Produktionsrate in g pro L pro h; μ, spezifische Wachstumsrate g pro L pro h; (n=3)

4.4. Langzeitfermentation - Produktion von Milchsäure aus GPS

Zusätzlich zu der Kinetikstudie wurde eine Langzeitfermentation (M = 10/1; verglichen mit Kinetikstudie) über 240 h durchgeführt. Getestet wurde die Milchsäureproduktion mit und ohne den Einsatz von Starterkulturen (siehe Anhang, Abb. 9). Die höchste Milchsäurekonzentration ($27,3 \text{ g/L}$) wurde mittels *L. plantarum* als Starterkultur erzielt, wobei *L. acidophilus* nach einer Fermentationsdauer von 66 h die höchste Milchsäurekonzentration ($25,0 \text{ g/L}$) aufwies (siehe Anhang, Abb. 9 a). Ohne Starterkultur zeigten sich trotz ähnlicher Bedingungen abweichende Gärungsverläufe, so resultierten aus der ersten spontanen Fermentation des GPS eine vergleichsweise tiefe Milchsäurekonzentration von $9,0 \text{ [g/L]}$ nach 66 h und eine Gesamtausbeute von $20,5 \text{ g Milchsäure/L}$ (siehe Anhang, Abb. 9 a). Dagegen wurde bei einer zweiten Spontanvergärung eine Milchsäurekonzentration von $12,6 \text{ [g/L]}$ nach 66 h sowie eine Gesamtausbeute von $13,9 \text{ [g/L]}$ nach 210 h gemessen (siehe Anhang, Abb. 9 c). Die Milchsäuregärungen mit Inokula der Gattung *Pediococcus* ergaben im Vergleich zu den Fermentationen mit der Gattung *Lactobacillus* geringere Milchsäurekonzentrationen (siehe Anhang, Abb. 7 c). Im Gegensatz zur Kinetikstudie war die Ausbeute von *P. acidilactici* (20238) in der Langzeitfermentation mit $17,4 \text{ [g/L]}$ nach 66 h, sowie einer maximaler Ausbeute von $18,6 \text{ [g/L]}$ geringfügig über dem Ertrag von *P. acidilactici* (20284) mit einer Milchsäurekonzentration nach 66 h von $15,7 \text{ [g/L]}$ und einer maximalen Konzentration von $16,8 \text{ [g/L]}$. Wie bereits in der Kinetikstudie führt die Verwendung von *P. pen-*

tosaceus auch in der Langzeitstudie zu einer niedrigen Ausbeute (14,1 g Milchsäure /L, 66 h; 17,1 g Milchsäure /L, 210 h).

Tabelle 3 Ergebnisübersicht der Milchsäurefermentation der Langzeitfermentation; (n=1)

Versuchsansatz	MS konz. [g/L] nach 66 h	max MS konz. [g/L]	pH nach 66 h	min pH
Kontrolle	9,0	20,5	4,06	3,68
<i>L. plantarum</i>	21,4	27,3	3,46	3,45
<i>L. acidophilus</i>	25,0	25,0	3,51	3,49
<i>L. buchneri</i>	21,3	24,2	3,46	3,50
Kontrolle	12,6	13,9	4,14	4,12
<i>P. acidilactici</i> (20238)	17,4	18,6	3,81	3,86
<i>P. acidilactici</i> (20284)	15,7	16,8	3,22	3,22
<i>P. pentosaceus</i>	14,1	17,1	3,55	3,50

5. Diskussion

5.3 Biogasproduktion

Die erhobenen Daten zur produzierten Methanmenge, der spezifischen methanogenen Aktivität sowie der maximal erreichbaren (theoretischen) Methanausbeute lassen darauf schliessen, dass sich die Verwendung des GPS als Substrat zur Biogasproduktion nicht nachteilig auf den Biogasprozess auswirken wird. Die Tests zur Biogasproduktion aus GPS (vergoren oder frisch) zeigten für die Last von 5 g CSB/L (frischer GPS) eine, verglichen mit der Last von 2 g CSB/L, geringere Methanausbeute. Dieser Effekt könnte durch eine starke Säureproduktion verursacht worden sein. Die Pufferkapazität des Mediums hat sehr wahrscheinlich nicht ausgereicht und es kam zu einer Ansäuerung des Mediums bzw. Inhibierung der methanogenen Aktivität der Mikroorganismen. Eine organische Last von 10 g CSB/L wirkte sich, trotz anfänglicher hoher spezifischer methanogener Aktivität, inhibierend auf die Methanogenese aus (siehe Anhang, Abb. 1 und 2). Hier könnte sowohl eine Substratinhibierung, als auch die Erschöpfung der Pufferkapazität der Grund gewesen sein.

Die deutlich höhere spezifische methanogene Aktivität (siehe Anhang, Abb. 2 und 4) von frischem, filtriertem GPS (6,3 h; $5,95 \text{ [g CSB}_{\text{CH}_4} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$) gegenüber vorfermentiertem, unfiltriertem GPS (12,3 h; $2,09 \text{ [g CSB}_{\text{CH}_4} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$) könnte auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein. Einerseits könnte der erhöhte Keimgehalt an nicht methanogenen Organismen im vergorenen GPS zu dieser schwächeren und späteren maximalen methanogenen Aktivität geführt haben, andererseits könnte die Substratverwertbarkeit bzw. der Gehalt, relativ zum CSB, an gelöstem, leichter verfügbarem Substrat generell höher im frischem GPS, gewesen sein, da diese schon während der Vorfermentation bereits teilweise abgebaut wurden.

Niedrige CSB-Lasten (1-2 g CSB/L) erzielten die höchsten theoretischen Ausbeuten. Zudem hatte es den Anschein, dass bei diesen Lasten die Methangesamtausbeute für frischen GPS generell höher ausfiel als bei vorfermentierten Presssaft. Dieser Eindruck ist jedoch aufgrund der Standardabweichungen nicht signifikant.

5.4 Bioethanolproduktion

Durch Verwendung der Bäckerhefe *Sachcharomyces cerevisiae* (5g Lyophilisat / L) konnte durch sechsstündige Fermentation des filtrierten GPS ein Ethanolgehalt von ca. 24g Ethanol /L erzielt werden. In gleicher Zeit wurde bei Verwendung des unfiltrierten, frischen GPS ein Gehalt von ca. 17,5 g Ethanol / L GPS erzielt. Das Ferment enthielt somit < 2% vol. Ethanol. Diese geringe Menge eignet sich nicht für die Ernte via Destillation. Eine energieeffiziente Ethanolernte sollte daher Hauptbestandteil des Prozesses zur Bioethanolgewinnung aus GPS sein.

5.5 Produktion organischer Säuren

5.5.1 Kinetikstudie zur Produktion von Milchsäure aus GPS

Die Zusammensetzung des bei der Trockenfüttermittelproduktion über die Vorpressung anfallenden GPS variiert je nach Gras, Schnitt, Bodenqualität, entsprechender Düngung, Wetterbedingung und Jahreszeit. In sonnigen Tagen wird mehrheitlich Heu gewonnen, wobei Trockenfutter mehrheitlich bei

schlechten Wetterbedingungen hergestellt wird. Aus 1000 kg Gras werden 213 kg Trockenfuttermittel produziert, wobei 200 L GPS anfallen⁴. Der Zuckergehalt des in dieser Studie verwendeten GPS betrug 24 [g/L]. Dabei kann der Gehalt an Zucker variieren und über 120 g Zucker /L betragen. Diesbezüglich scheint der GPS für die biotechnologische Herstellung von Milchsäure sehr gut geeignet zu sein. Die Ergebnisse der Kinetikstudie bestätigten diese Einschätzung. Sie zeigten jedoch auch, dass es ohne den Einsatz von Starterkulturen oder durch die Verwendung einer teils ungeeigneten Starterkultur (Silierrmittel) zu vergleichsweise langen Adaptionsphasen von ca. 12 h kam. Im Fall der Spontanvergärung ist dies mit der niedrigen Keimzahl zu Beginn der Inkubation zu erklären (ca. 10^4 [KBE/mL]). Darüber hinaus ließen die großen Standardabweichungen während des Fermentationsexperiments auf einen stark variablen Fermentationsverlauf schließen. Unter Einbezug der Milchsäurekonzentration sowie der Analyse weiterer organischer Säuren konnte, trotz der vermutlichen hohen Diversität autochthoner Mikroorganismen im Kontrollansatz, keine Fehlgärung festgestellt werden. Allerdings lag die erzielte Milchsäureausbeute der spontanen Vergärungen mit $17,2 \pm 2,0$ [g/L] unterhalb der erreichten Milchsäurekonzentrationen in Ansätzen mit Starterkulturen. Das kommerziell erhältliche Silierrmittel war als Starterkultur nur bedingt geeignet. Denn auch im Falle des Silierrmittels kam es, gemessen an der bakteriellen Biomassezunahme und der Milchsäurekonzentration zu einer vergleichsweise langen lag-Phase von 12 h. Es schien, dass die im Silierrmittel angeblich enthaltenen, vitalen Milchsäurebakterien längere Zeit benötigten, um sich an das Substrat zu adaptieren. Möglicherweise war die Lebendzellzahl sehr gering oder die Zellen befanden sich in einem Ruhestadium und mussten erst noch in die vitale Form übergehen. Dagegen wies die Milchsäurekonzentration von $20,0 \pm 0,5$ [g/L] nach einer Fermentationsdauer von 66 h auf eine erfolgreiche Gärung hin.

Im Falle der inokulierten Starterkultur *L. plantarum* zeigten die Ansätze mit einem maximalen Titer von ca. $6,9 \times 10^9$ [KBE/mL] die höchste Anzahl an lebensfähigen und vermehrungsfähigen Mikroorganismen der gesamten Kinetikstudie. Möglicherweise hatte der Organismus zu Beginn der Inkubation physiologische Probleme mit den vorherrschenden Bedingungen, wie der Temperatur von 30°C, oder mit gewissen Bestandteilen des Substrats, was sich in einer relativ langen lag-Phase widerspiegelte. Des Weiteren könnte die häufige Beprobung (alle 6 h) in Kombination mit dem kleinen Reaktorvolumen limitierend auf den Organismus gewirkt haben. Im Vergleich mit den anderen Reinkultur-Fermentationen zeigten die Ansätze des *L. plantarum* auch grössere Standardabweichungen in allen Parametern, was auf Varianzen im Fermentationsverlauf innerhalb der parallelen Ansätze als Folge suboptimaler Bedingungen hinweist. Die maximale Milchsäurekonzentration, die innerhalb der Kinetikstudie detektiert werden konnte, betrug nach 66 h Gärungsdauer $17,8 \pm 0,5$ [g/L]. Dieser Wert lag im Bereich der nach 66 h im Kontrollansatz gemessenen Milchsäurekonzentration ($17,2 \pm 2,0$ [g/L]). Da *L. plantarum* in der Langzeitfermentation jedoch eine hohe Ausbeute an Milchsäure generierte (bis zu 27,3 g/L) und eine schnelle Adaption an das Substrat aufwies, verhärtet sich die Vermutung, dass die Reinkultur unter den beschriebenen Bedingungen der Kinetikstudie sub-optimal kultiviert wurde.

Obwohl bei allen Versuchsansätzen der Kinetikstudie gleiche Mengen an Biomasse inokuliert wurden, zeigten die übrigen Starterkulturen der Kinetikstudie keine Adaptionsphase, sondern gingen direkt in die exponentielle Wachstumsphase über. Die jeweiligen Starterkulturen begannen umgehend die Inhaltsstoffe des GPS für ihren Metabolismus zu nutzen und Milchsäure zu produzieren. Einzig die Gattung *P. acidilactici* (DSMZ 20238) wies eine Beschleunigungsphase von ca. 6 h auf.

Bei sämtlichen Ansätzen, inklusive des Kontrollansatzes war ein ähnlicher Verlauf in der Änderung der Milchsäurekonzentrationen über die Zeit detektierbar. Die Milchsäurekonzentration stieg zunächst an, erreichte einen zwischenzeitlichen Maximalwert, gefolgt von einer Phase relativ konstanter Konzentrationen, die nach 54 h wieder einen zweiten Anstieg überging. (Abb. 3-5). Ursache für diesen Konzentrationsverlauf könnte die Komplexität des GPS gewesen sein. Je nach Verwertbarkeit könnten zu unterschiedlichen Zeiten verschiedene Nährstoffe (z.B. Mono-, Di-, oder Polysaccharide) für die Milchsäuregärung verwendet worden sein. Es ist wahrscheinlich, dass zu Beginn der Inkubation leicht verfügbare Zucker metabolisiert wurden. Mit fortschreitender Fermentation wurden schwerer verwertbare Nährstoffe vergärt. Deutlich ausgeprägt ist diese Tendenz bei Verwendung des Silierrmittels als Starterkultur. Hier zeigte sich ein Zwischenmaximum mit einer Produktionsrate von $0,85$ [g/L*h⁻¹] gefolgt von einer relativ konstanten Phase, die schließlich in einer deutliche Steigerung von Y_p auf $1,03$ [g/L*h⁻¹] mündete. Im test von *L. plantarum* war eine ähnliche Dynamik detektierbar. Hier zeigte sich nach einer initialen Y_p von $0,67$ [g/L*h⁻¹] eine erhöhte Produktionsrate von $0,78$ [g/L*h⁻¹]. Dagegen wiesen die restlichen Inokula eine höhere erste Steigung, gefolgt von einem tieferen Y_p in der zweiten Steigung.

⁴ Analyseergebnisse, August 2008

Die Berechnung der spezifischen Produktionsraten Y_{PX} ergab für *L. plantarum* einen Wert von $0,96 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$. *L. acidophilus* erreichte trotz höherer Milchsäurekonzentration, eine Y_{PX} von $0,35 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$. Die höchste spezifische Produktionsrate Y_{PX} wies *P. acidilactici* (DSMZ 20238) mit einem Wert von $1,73 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$ auf. *P. acidilactici* (DSMZ 20238) empfiehlt sich somit für den Einsatz in einem kontinuierlich betriebenen Reaktor.

Der Zuckergehalt von 24 [g/L] diente als Basis zur Berechnung der Ausbeute in g pro g verfügbarem Substrat ($Y_{MS/tot}$). Entsprechend $Y_{MS/tot}$ zeigte *L. acidophilus* mit $0,85 \pm 0,02 \text{ [g/g]}$ die beste Performanz und empfiehlt sich ebenfalls für ein biotechnologisches Verfahren.

Infolge der Zunahme organischer Säuren im Ferment, insbesondere der Milchsäure, senkte sich der pH-Wert bei allen Ansätzen ab (von $5,73 \pm 0,01$ bis zu $3,66 \pm 0,01$ *P. acidilactici* (20284)). Obwohl die Parameter, wie die Milchsäurekonzentration und die bakterielle Biomassezunahme, nach Ablauf der Kinetikstudie immer noch anstiegen, wirkte der tiefe pH-Wert sehr wahrscheinlich als limitierender Faktor und senkte die Vitalität der Mikroorganismen. Dementsprechend wirkte sich die pH-Senkung auf die Ausbeute- und Umsatzkoeffizienten aus. Eine pH-Regulierung sollte diesem Effekt entgegenwirken, die Vitalität der Zellen und darüber hinaus die Ausbeute an Milchsäure steigern.

Die Kinetikstudie zeigte deutliche Unterschiede in der Eignung der verschiedenen Starterkulturen. Die schlechtesten Ergebnisse wurden für *P. pentosaceus* ermittelt. Mit einem μ von lediglich $0,12 \text{ [g/L/h]}$ in der exponentiellen Wachstumsphase zeigt nur noch *P. acidilactici* (20238) eine geringfügig kleinere spezifische Wachstumsrate von $0,11 \text{ [g/L/h]}$, wobei die Milchsäurekonzentration von *pentosaceus* mit $14,6 \pm 0,3$ signifikant unter der Konzentration der Kontrollansätze war ($17,2 \pm 2,0$). Auch ($Y_{MS/tot}$) die Ausbeute in g pro g verfügbarem Substrat (Zucker) mit $0,61 \pm 0,01 \text{ [g/g]}$ und die bakterielle Biomassezunahme von lediglich $2,2 \pm 0,1 \text{ [g/L]}$ bestätigt diese Aussage.

Etlche verschiedene Substrate wurden bereits für die fermentative Produktion von Milchsäure durch Milchsäurebakterien untersucht. Das reinste Produkt entsteht bei der Fermentation von reinem Zucker, was mit tieferen Aufreinigungskosten verbunden ist. Dennoch ist dies wirtschaftlich ungünstig, da reiner Zucker als Substrat teuer und Milchsäure hingegen ein billiges Produkt ist (Hofvendahl *et al.*, 2000). Stattdessen werden immer mehr Abfallprodukte aus der Agrar- und Forstwirtschaft für die Milchsäureproduktion verwertet. Das gebräuchlichste Substrat für die fermentative Milchsäureproduktion ist Molke, ein Abfallprodukt aus der Käseproduktion (Silva *et al.*, 1995). Im Vergleich zu dieser Studie zeigt *L. helveticus* (ATCC 15009) bei der fermentativen Milchsäureproduktion aus Molke eine höhere Milchsäurekonzentration von 49 [g/L] als z.B. *P. acidilactici* (20238) mit $17,9 \text{ [g/L]}$, jedoch erreicht *P. acidilactici* (20238) die höhere spezifische Produktionsrate ($1,73 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$) als *L. helveticus* (ATCC 15009) mit einem Y_{PX} von $1,3 \text{ [g/L}\cdot\text{h}^{-1}]$. Studien mit *L. casei* (SU No 22) zeigten eine $Y_{MS/tot}$ von $0,44 \text{ [g/g]}$ und eine Milchsäurekonzentration von 22 [g/L] . Im Vergleich zeigte *L. acidophilus* mit einem $Y_{MS/tot}$ von $0,85 \text{ [g/g]}$ und einer Milchsäurekonzentration von $20,5 \text{ [g/L]}$ höhere Werte. Im Vergleich mit der Fermentation von Biomasse wie z.B. Luzerne mit Hilfe von *Enterokokken*, zeigt die hier untersuchte mikrobielle Produktion von Milchsäure aus GPS ein äußerst zufriedenstellendes Resultat. Bei unkontrolliertem pH, ebenfalls in einem Batch-Verfahren, erreicht *Enterokokken faecium* eine Milchsäurekonzentration von lediglich $8,3 \text{ [g/L]}$ und einem kleinen $Y_{MS/tot}$ von $0,27 \text{ [g/g]}$. Im Vergleich zeigt z.B. *L. buchneri* ein $Y_{MS/tot}$ von $0,84 \text{ [g/g]}$ und eine Milchsäurekonzentration von $20,1 \text{ [g/L]}$. Dementsprechend könnten einige Inhaltstoffe des GPS eventuell auch förderlich für das Wachstum einiger Bakterien sein.

Entsprechend der bakteriellen Biomassezunahme, zeigten alle Ansätze der Kinetikstudie nach Ablauf der Fermentationsdauer von 66 h immer noch eine leicht ansteigende stationäre Phase. Auch die restlichen Parameter wie der KBE und die Milchsäureproduktion wiesen auf eine fortlaufende Dauer der Fermentation hin. Diesbezüglich wurde die Langzeitfermentation zeitlich auf 240 h ausgedehnt.

5.5.2 Langzeitfermentation - Produktion von Milchsäure aus GPS

Die Langzeitfermentation (240 h) wurde im Batch-Verfahren ($M = 10/1$; Multifors Fermenter) mit allen Starterkulturen, analog zur Kinetikstudie, durchgeführt. Das Silierringmittel wurde nicht weiter untersucht, da die Mischkultur des Silierringmittels nicht definiert, bzw. charakterisiert war. Die Untersuchung der Reinkulturen als Starterkultur wurde favorisiert.

Die Gattung *Lactobacillus* und *Pediococcus* wurden je in Kombination eines Kontrollansatz ohne Starterkultur untersucht. Anhand der Kontrollen, konnte belegt werden, dass der Einsatz einer Starterkultur einen deutlichen Einfluss auf die Milchsäureproduktion hat.

Die Milchsäurekonzentrationen der Fermentationsreihe zum Test der Gattung *Pediococcus* fiel generell tiefer aus, als die gemessenen Werte der Testreihe zur Gattung *Lactobacillus* (im Mittelwert ca. 2,4 [g/L] tiefer). Die Ausbeuten waren nach 66 h generell höher als in der Kinetikstudie. Die Multifors Fermentationseinheiten boten sehr wahrscheinlich bessere Kultivierungsbedingungen, sodass für *L. acidophilus* nach 66 h eine Milchsäurekonzentration von 25,0 [g/L] gemessen werden konnte. Wohingegen die Konzentration in den Serumflaschen lediglich $20,5 \pm 0,5$ [g/L] betrug. Wie in der Kinetikstudie, zeigt *P. pentosaceus* auch in der Langzeitfermentation nach einer Fermentationsdauer von 66 h die niedrigste Milchsäurekonzentration (14,1 [g/L]). Entgegen den Ergebnissen der Kinetikstudie war *L. plantarum* das Bakterium mit der höchsten maximalen Milchsäurekonzentration von 27,3 [g/L] nach einer Fermentationsdauer von 209 h. *L. plantarum* empfahl sich somit für den biotechnologischen Produktionsprozess von Milchsäure aus GPS.

6. Schlussfolgerungen

Zu Beginn des Forschungsprojekts wurde der GPS als problematisch eingestuft. Seine Entsorgung verursachte Kosten, welche die Installation der Vorpressung zur Verminderung des Energieverbrauchs weniger attraktiv erscheinen liess. Die im vorliegenden Bericht dargelegten Ergebnisse zeigen nicht nur diverse Möglichkeiten die Problematik zu entschärfen, sondern verdeutlichen, dass der Presssaft eine wertvolle Ressource ist und als solche genutzt werden kann.

Biogasproduktion

Die erhobenen Daten zeigten, dass der GPS zur Biogasproduktion eingesetzt werden kann. Eine mögliche Lösung des Problems, „Entsorgung des GPS“, ist somit grundsätzlich gefunden worden. Transportkosten für die Verfrachtung des GPS zur Biogasanlage wirken der Problemlösung entgegen. Zurzeit sind die meisten Biogasanlagenbetreiber nicht gewillt, die Kosten des Transports zu übernehmen. Bei steigender Konkurrenz um Biomasse könnte sich dieser Sachverhalt jedoch zugunsten des Trocknungsanlagenbetreibers entwickeln.

Bioethanolproduktion

Konnte gezeigt werden, dass der GPS mittels eines simplen Verfahrens zu einem flüssigen Energieträger (Ethanol) fermentiert werden kann. Der niedrige Zuckergehalt (24 [g/L]) war im verwendeten GPS zu gering, als dass eine für die Ernte ausreichende Ethanolkonzentration mittels *Saccharomyces cerevisiae* erreicht werden konnte. Bei erhöhtem Gesamtzuckergehalt des GPS (< 100 g/L) sowie unter Verwendung spezialisierter Mikroorganismen könnte eine Ethanolproduktion sinnvoll sein. Der Trocknungsanlagenbetreiber könnte die ethanolische Gärung leicht, aufgrund des simplen Verfahrens, selber durchführen. Die (Ernte) evt. via Destillation könnte ebenfalls durch den Betreiber selbst durchgeführt werden. In diesem Fall würde eine Restbiomasse entstehend, die wiederum entsorgt werden muss. Somit scheint die Verfrachtung des vergorenen GPS zu einer zentralen Sammel- und Erntestelle als sinnvoller Lösungsansatz. Diese Ernteanlage, ob Destillation oder Pervaporation, könnte mit einer wärmeproduzierenden Biogasanlage gekoppelt werden, sodass die Energieversorgung sowie die Entsorgung der Fermentationsrückstände sinnvoll durchgeführt werden können

Produktion organischer Säuren

Die Produktionskosten organischer Säuren (Milchsäure) sind in hohem Masse von den Rohmaterialkosten abhängig. Dementsprechend liegt der Fokus auf den Einsatz billigerer Alternativen wie z.B. Grünbiomasse aus der Agrarwirtschaft. Der GPS aus Trocknungsanlagen der Trockenfuttermittelherstellung eignet sich für die fermentative Produktion von Milchsäure. Die untersuchten Milchsäurebakterienstämme der Gattung *Lactobacillus* und *Pediococcus*, sowie ein kommerziell erhältliches Siliermittel eignen sich generell für die Fermentierung des GPS. Je nach Organismus zeigten sich deutliche Unterschiede in der erzielbaren Milchsäuremenge.

Den Ergebnissen zufolge ist die Verwendung einer Starterkultur vor allem bei kontinuierlichen Verfahren interessant, da z.B. mittels *L. acidophilus*, die optimale Gärungsdauer auf 18 h gesenkt werden konnte. Für einen einfacheren Batch-Betrieb könnte eine Spontangärung ohne Inokulum ausreichen um wirtschaftliche Mengen zu erhalten, jedoch könnten Fehlgärungen nicht ausgeschlossen werden. Daher wird generell die Verwendung einer Starterkultur empfohlen. Die Fermentation des Graspresssaftes mit *L. acidophilus* erbrachte die höchste Milchsäurekonzentration von $20,5 \pm 0,5$ [g/L], wobei die spezifische Produktionsrate $0,35$ [g/L \cdot h $^{-1}$] vergleichsweise gering ausfiel. Im Vergleich mit anderen

Starterkulturen zeigte *P. acidilactici* (20238) die größte spezifische Produktionsrate von 1,73 [g/L*h⁻¹], jedoch eine tiefere Milchsäurekonzentration (17,9 ± 0,2 [g/L]).

Tendenziell zeigten Starterkulturen der Gattung *Lactobacillus* konstantere Resultate, welche auch durch die Fermentation in der Langzeitstudie bestätigt wurden. Als ungeeignet konnte das Milchsäurebakterium *Pediococcus pentosaceus* angesehen werden. Bezüglich der Wirtschaftlichkeit des GPS-Konversionsverfahrens kann angenommen werden, dass ohne Verwendung einer Starterkultur, für eine GPS-Menge von 80 m³ und einem Preis von 90 CHF/L Milchsäure (geringste Qualität), der Milchsäureertrag zu einer Wertschöpfung (exkl. Kosten für Ernte/Aufreinigung/Transportkosten) von ca. 120'000 SFr. pro Jahr und Anlage führen könnte. Die Verwendung einer Starterkultur würde eine Steigerung von ca. 30'000 SFr pro Jahr (exkl. Beschaffungskosten) bedeuten. In Abhängigkeit vom Zuckergehalt des GPS könnte eine Wertschöpfung von über 700'000 SFr generiert werden.

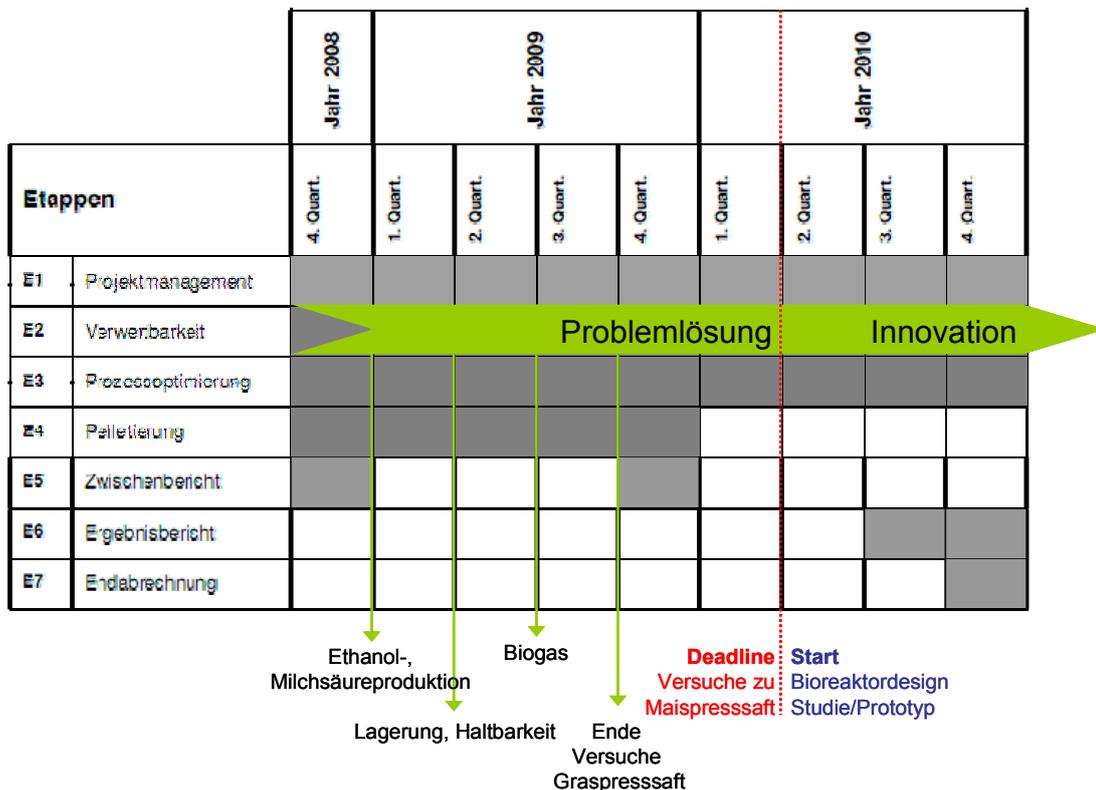
Fazit

Die Implementierung eines Bioraffineriezweiges sowie der energetischen Nutzung des GPS birgt diverse Herausforderungen für die Agrar- und Energiewirtschaft/-forschung und dazu einen enormen Optimierungsbedarf. Grasernteverfahren, Pressung, Fermentation, Ernte des Fermentationsprodukts sowie geeignete Aufreinigungsverfahren sollten hinsichtlich Ihrer Optimierbarkeit überprüft werden.

Darüber hinaus ist ein integrativer Ansatz zur biotechnologischen Biomassenutzung anzustreben, in dem die verschiedensten Stoffströme der schweizerischen Agrar- und Forstwirtschaft zusammengefasst werden und als Ressource nutzbar gemacht werden.

7. Status des laufenden Projektes

Das Projekt befindet sich bezüglich der Laborstudien in einer abschliessenden Phase (Schema 2). Die Versuche zur Ethanol-, Biogas- sowie Milchsäureproduktion aus GPS sind weitestgehend abgeschlossen. Analoge Versuchsreihen mit Maispresssaft werden zurzeit unternommen und sollten voraussichtlich Ende März 2010 abgeschlossen sein.



Schema 2: Projektübersicht mit zeitlichen Verlauf; absolvierte Leistungen und geplante Schritte.

Die folgende Liste gibt eine tabellarische Übersicht über den Status des Projekts, der bis zum Redaktionsschluss erreicht worden war.

<u>Aufgabenfelder</u>	<u>Status</u>
• <i>Charakterisierung der Presssäfte</i>	ABGESCHLOSSEN
• <i>Vorversuche zur Presssaftverwertbarkeit</i>	ABGESCHLOSSEN
• <i>Fokussierung auf marktfähige Produkte</i>	BIOGAS, ETHANOL, MILCHSÄURE → Graspresssaft abgeschlossen → Maispresssaft begonnen
• <i>Biotechnologische Produktion der Produkte</i>	Multiparalleler Fermenter → Langzeitfermentation abgeschlossen Spezieller Reaktor zur Biomassekonversion → Vorversuche (durchgeführt) → Planung (begonnen) → Entwicklung (Folgeprojekt; Innovation)

8. Anhang

Methoden

Tabelle 1 Spurenelementlösung nach (Stams et. al., 1992)

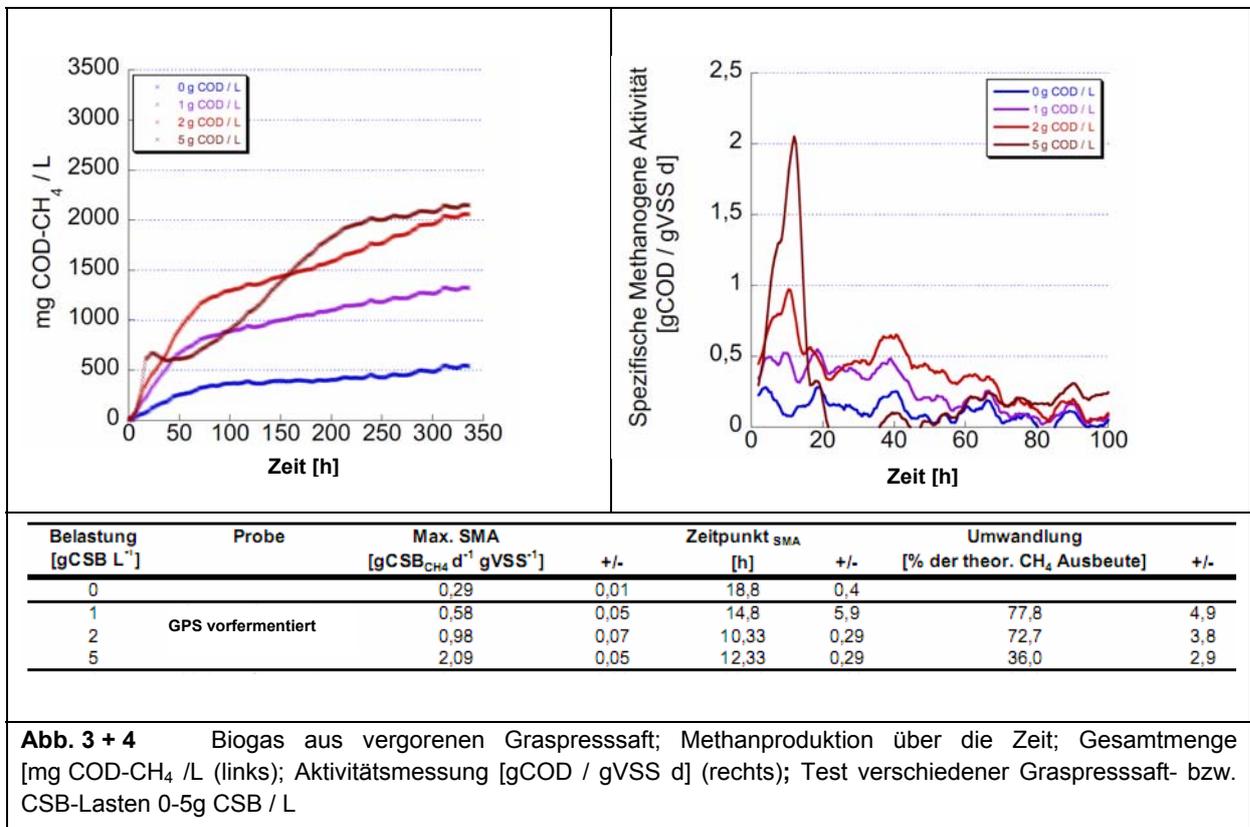
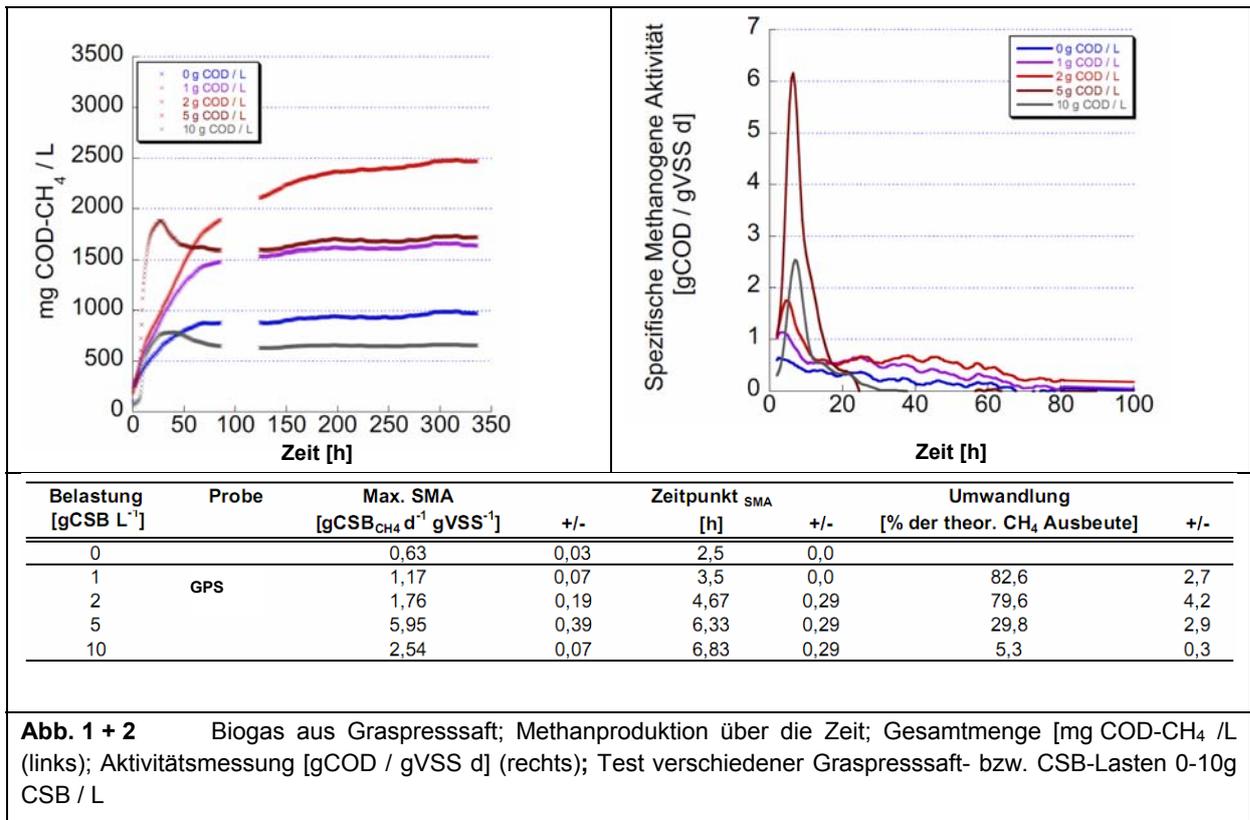
Säure Spurenelemente	1ml/L Medium [mM]
FeCl ₂	7,5
H ₃ BO ₄	1
ZnCl ₂	0,5
CuCl ₂	0,1
MnCl ₂	0,5
CoCl ₂	0,5
NiCl ₂	0,1
HCl	50

Alkalische Spurenelemente	1ml/L Medium [mM]
Na ₂ WO ₄	0,1
Na ₂ MoO ₄	0,1
NaOH	10
Na ₂ SeO ₃	0,1

Salzlösung	g/L
NH ₄ Cl	0,3
NaCl	0,3
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,11
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,1

Ergebnisse

Biogasproduktion



Bioethanolproduktion

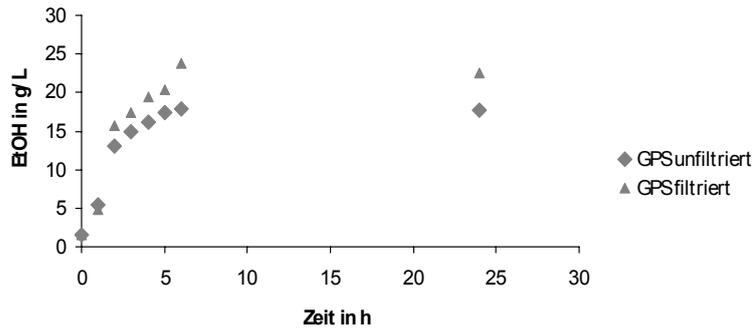


Abb. 5 Produktion von Bioethanol über die Zeit; Fermentation des GPS (filtriert/unfiltriert) mit *Sachcharomyces cerevisiae*

Produktion organischer Säuren (Milchsäure)

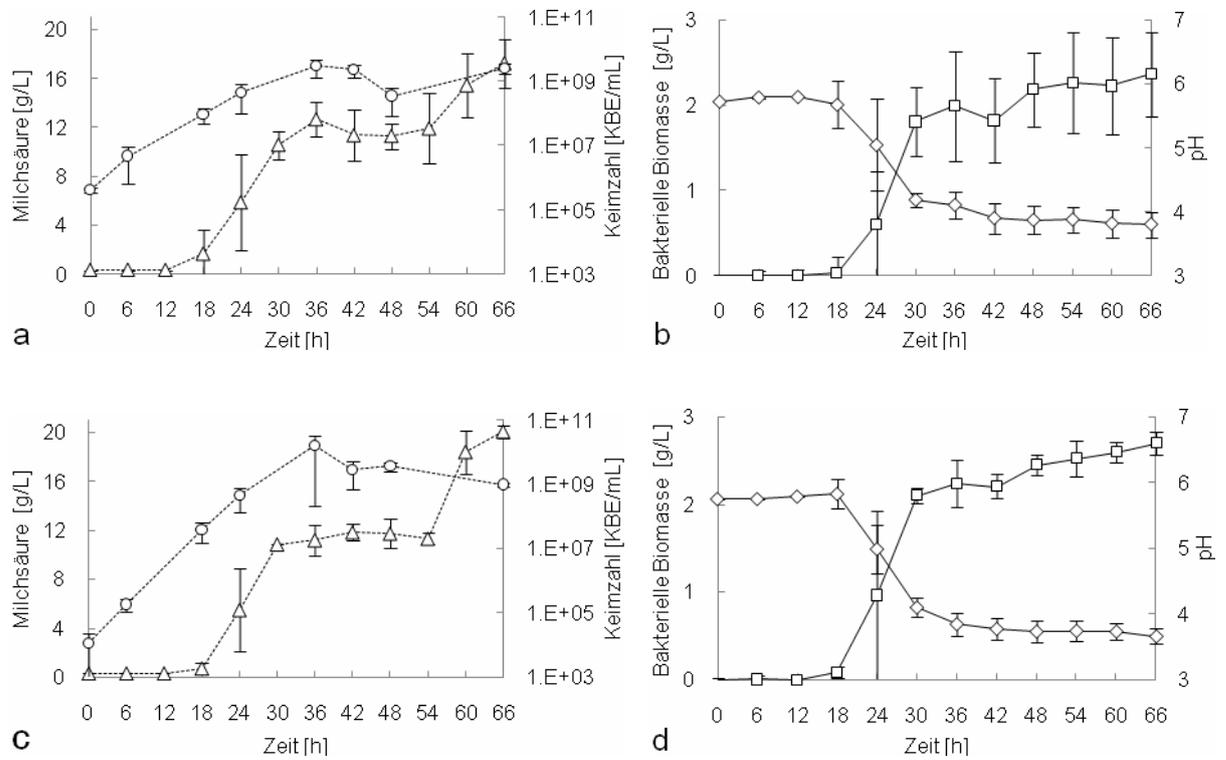


Abb. 6 Milchsäurekonzentration, KBE, bakterielle Biomassezunahme und pH-Wert während der Fermentation des GPS; ohne Inokulum (a, b); Siliermittel als Inokulum (c, d) im Verlauf der Zeit; Milchsäurekonzentration (Δ), KBE (\circ), bakterielle Biomasse (\square), pH-Wert (\diamond); (n=3)

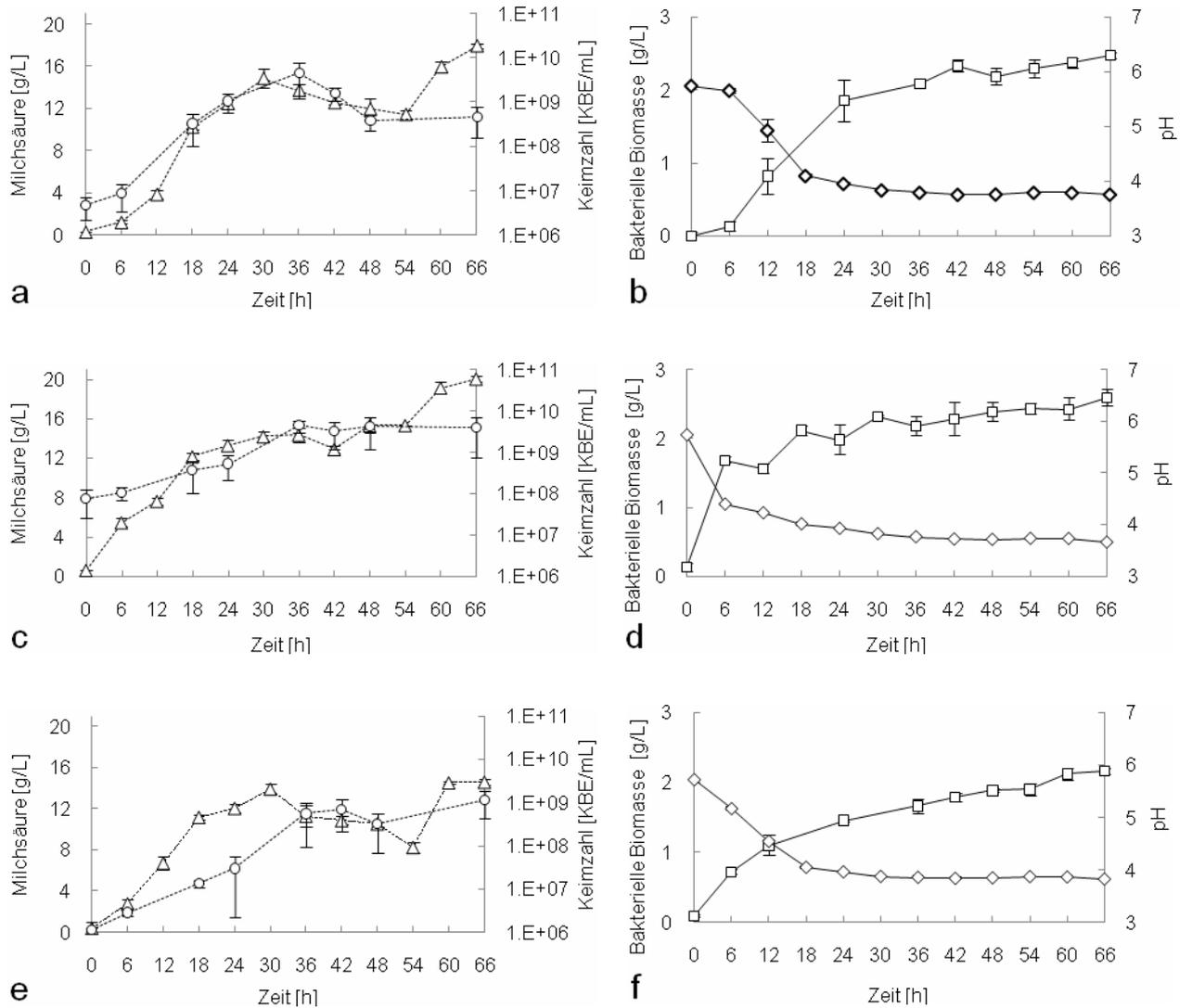


Abb. 7 Milchsäurekonzentration, KBE, bakterielle Biomassezunahme und pH-Wert der Gattung *Pediococcus* im GPS im Verlauf der Zeit; *P. acidilactici* (DSMZ 20238) (a, b), *P. acidilactici* (DSMZ 20284) (c, d) und *P. pentosaceus* (e, f); Milchsäurekonzentration (Δ), KBE (○), bakterielle Biomasse (□), pH-Wert (◇); (n=3)

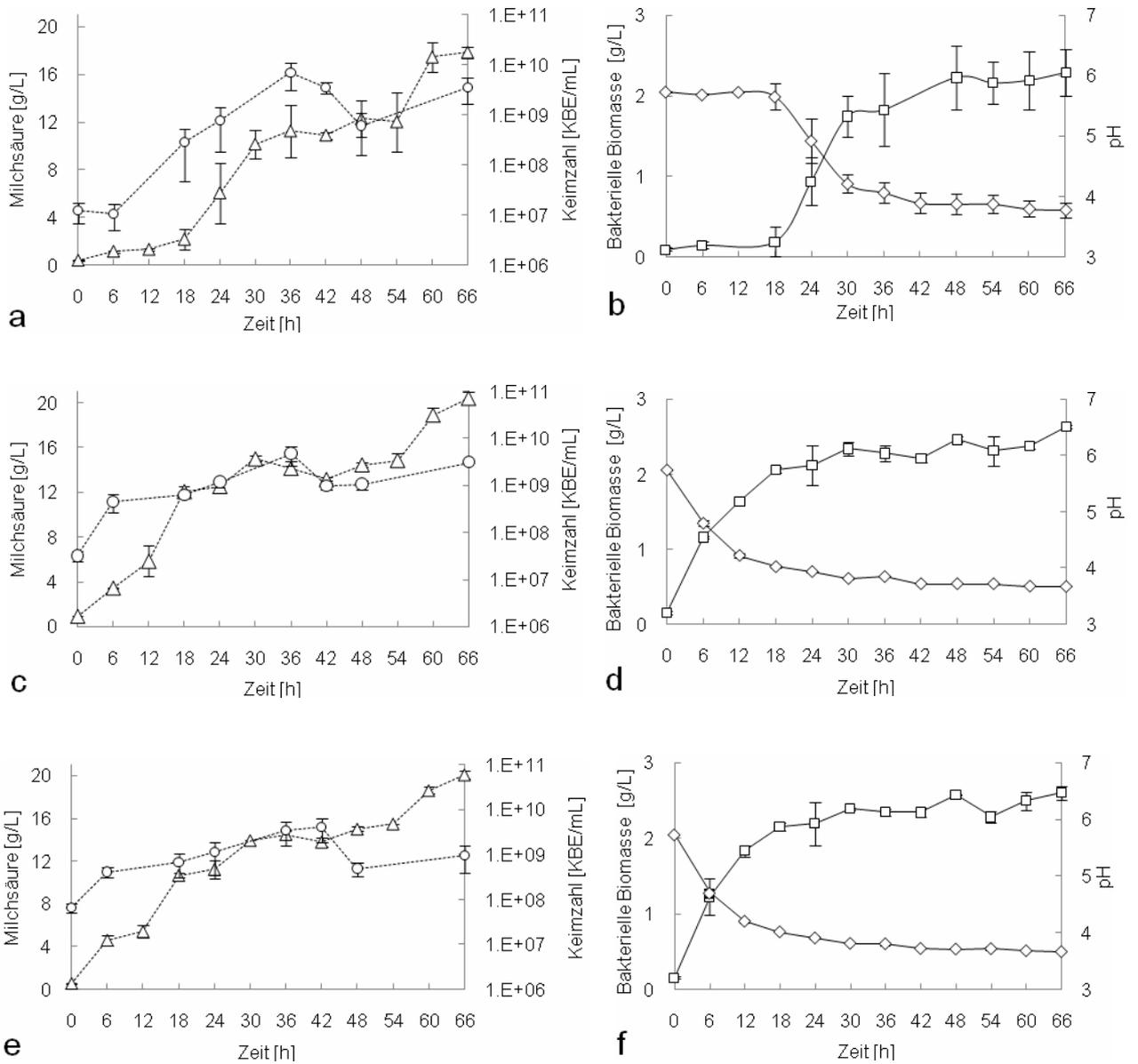


Abb. 8 Milchsäurekonzentration, KBE, bakterielle Biomassezunahme und pH-Wert der Gattung *Lactobacillus* im GPS im Verlauf der Zeit; *L. plantarum* (a, b), *L. acidophilus* (c, d) und *L. buchneri* (e, f); Milchsäurekonzentration (Δ), KBE (○), bakterielle Biomasse (□), pH-Wert (◇); (n=3)

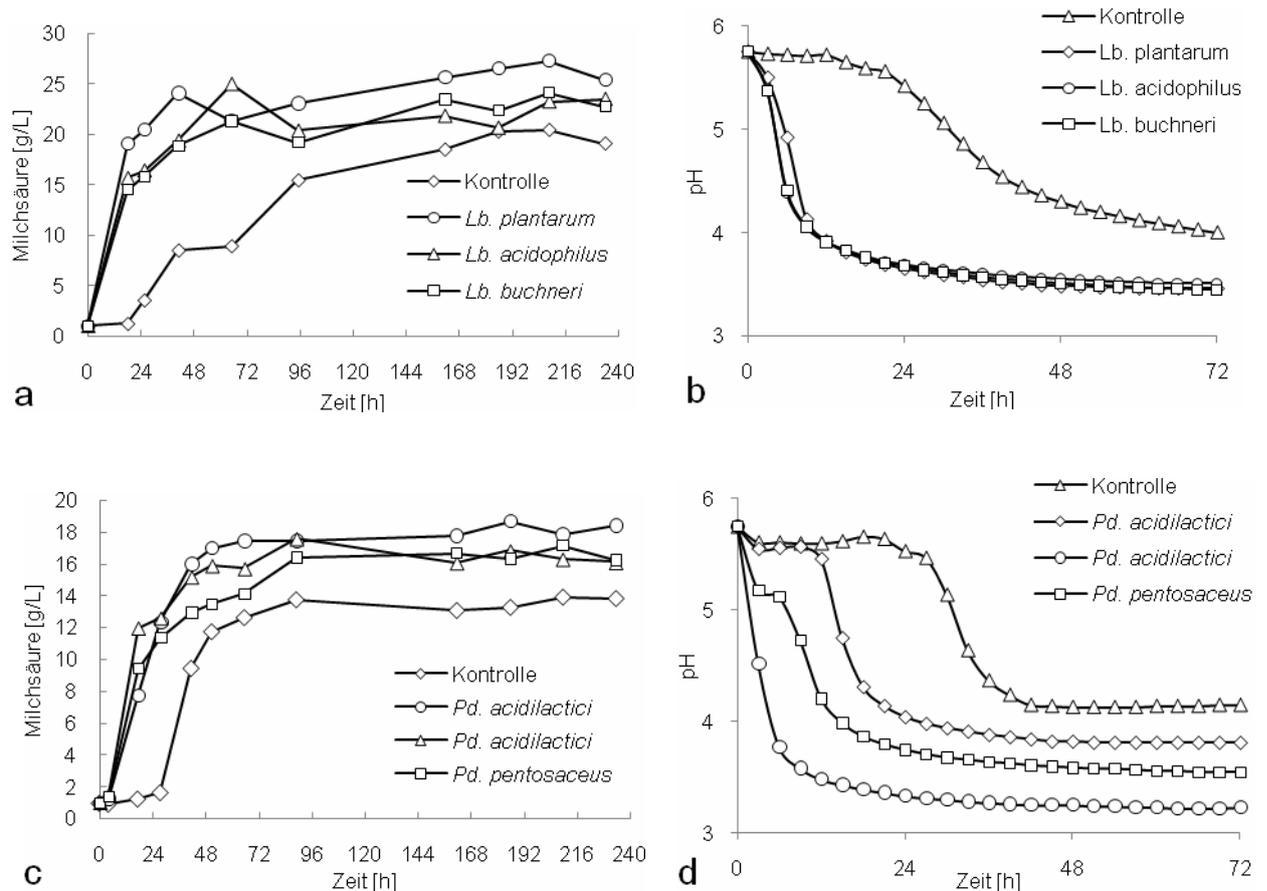


Abb. 9 Milchsäuregärung in den Multifors Fermentern; Milchsäurekonzentration in g/L (a) und pH-Wert (b) im Verlauf der Zeit, Substrat GPS (◇), *Lactobacillus plantarum* (○), *Lactobacillus acidophilus* (Δ), *Lactobacillus buchneri* (□); Milchsäurekonzentration in g/L (c) und pH-Wert (d) im Verlauf der Zeit, Substrat GPS (◇), *Pediococcus acidilactici* (○), *Pediococcus acidilactici* (Δ), *Pediococcus pentosaceus* (□); (n=1)

Tabelle 2 Vergleich von Studien über die Milchsäureproduktion von verschiedenen Substraten und verschiedenen Milchsäurebakterien ausschliesslich im Batch-Verfahren

Substrat	Organismus	pH	Substrat [g/L]	MS [g/L]	$Y_{MS/tot}$ [g/g]	Y_{PX} [g/L·h ⁻¹]	Ref.
Graspresssaft	<i>L. plantarum</i>	5,8	24 (Zucker)	17,8	0,74	0,96	-
Graspresssaft	<i>L. acidophilus</i>	5,8	24 (Zucker)	20,5	0,85	0,35	-
Graspresssaft	<i>L. buchneri</i>	5,8	24 (Zucker)	20,1	0,84	0,52	-
Graspresssaft	<i>P. acidilactici</i> (20238)	5,8	24 (Zucker)	17,9	0,75	1,73	-
Graspresssaft	<i>P. acidilactici</i> (20284)	5,8	24 (Zucker)	20,1	0,84	0,25	-
Graspresssaft	<i>P. pentosaceus</i>	5,8	24 (Zucker)	14,6	0,61	0,49	-
Luzerne	<i>Ent. faecium</i>	6,2	-	8,3	0,27	-	Cavazzoni <i>et al.</i>
Luzerne	<i>Ent. faecium</i>	5,8 (k)	-	27	0,91	-	Cavazzoni <i>et al.</i>
Molke	<i>L. casei</i> (SU No 22)	-	-	22	0,44	-	Roukas <i>et al.</i>
Molke	<i>L. delbrueckii</i> sp. <i>Bulgaricus</i>	-	-	44	0,95	-	Mehaia <i>et al.</i>
Molke	<i>L. helveticus</i> (ATCC 15009)	-	-	49	1,1	1,3	Schmidt <i>et al.</i>
Molasse*	<i>L. delbrueckii</i>	6,2	20 (Zucker)	16	-	-	Aksu <i>et al.</i>
Rübenmolasse	<i>L. lactis</i>	7,5	78 (Zucker)	40	-	-	Ohashi <i>et al.</i>

(k) = konstanter pH-Verlauf (Hofvendahl and Hahn-Hägerdal 2000)

Referenzen

- Bengtsson, S., Hallquist, J., Werker, A., Welander, T., 2008. Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. *Biochemical Engineering Journal*. 40, 492-499.
- Heitefuss, S., Heine, A., Seifert, H.S.H., 1990. Detection of non-volatile organic acids by head-space gas chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 532, 374-378.
- Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. 26, 87-107.
- Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources¹. *Enzyme and Microbial Technology*. 26, 87-107.
- Klinke, H.B., Ahring, B.K., Schmidt, A.S., Thomsen, A.B., 2002. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technology*. 82, 15-26.
- Li, J., Ren, N., Li, B., Qin, Z., He, J., 2008. Anaerobic biohydrogen production from monosaccharides by a mixed microbial community culture. *Bioresource Technology*. 99, 6528-6537.
- Lü, F., He, P.-J., Shao, L.-M., Lee, D.-J., 2008. Stress of pH and acetate on product formation of fermenting polysaccharide-rich organic waste. *Biochemical Engineering Journal*. 39, 97-104.
- Sánchez, Ó.J., Cardona, C.A., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 99, 5270-5295.
- Zandvoort, M.H., Osuna, M.B., Geerts, R., Lettinga, G., Lens, P.N.L., 2002. Effect of nickel deprivation on methanol degradation in a methanogenic granular sludge bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 29, 268-274.