

Separation Exopolysaccharid-produzierender Starterkulturen und Aufreinigung der Exopolysaccharide aus zellfreien Fermentationsmedien

zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)

von der KIT-Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Florian Häffele
aus Bruchsal

Tag der mündlichen Prüfung:	13.05.2022
Erstgutachter:	Prof. Dr.-Ing. Hermann Nirschl
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Harald Horn

Danksagung

Diese Arbeit entstand in den Jahren 2015 bis 2021 während meiner Zeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik (MVM) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT). Nachfolgend möchte ich allen Personen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr.-Ing. Hermann Nirschl. Ich danke Ihnen für das mir entgegengebrachte Vertrauen, sowie die fachliche Betreuung und Richtungsweisung während der Entstehung dieser Arbeit. Zudem danke ich Ihnen für die Gelegenheit, meine Promotion im Rahmen einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre durchgeführt haben zu dürfen. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Harald Horn für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AiF) und dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) möchte ich für die Projektförderung danken. Ebenfalls gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit allen Projektpartnern, sowie dem Team Lebensmitteltechnik des Instituts für Naturstofftechnik der TU Dresden, insbesondere Prof. Dr. Harald Rohm, PD Dr. Doris Jaros, Dr. Susann Mende und Jannis Bulla. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hans Bisgaard-Frantzen und der Firma Chr. Hansen für das Bereitstellen der Proben, sowie Herrn Ulrich Horbach und der Firma GEA-Westfalia für die Bereitstellung eines Tellerseparators im Rahmen des Forschungsprojektes.

Ebenfalls gilt mein Dank den engagierten Studenten Lucas Jakob, Nicolas Bruce, Maximilian Ell, Julia Szabadi, Mo Li, Eva Sophie Mayrose und Christian Javier Avilés Sanchez, die durch ihre Abschlussarbeiten oder Hiwi-Tätigkeiten einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Ein besonderer Dank gilt auch allen Kolleginnen und Kollegen am Institut, die immer ein offenes Ohr und Herz hatten und stets bei allen Problemen bei der Lösungsfindung unterstützt haben. Besonders allen wissenschaftlichen Mitarbeitern möchte ich für die vielen gemeinsamen Stunden danken. Es freut mich besonders, dass neben den fachlichen, auch privaten Gemeinsamkeiten entstanden und sich bis heute anhaltende Freundschaften daraus entwickelt haben. Auch ohne

die Mitarbeiter in der Verwaltung, sowie den Werkstätten, der PMT und den technischen Mitarbeitern wäre das MVM nicht, was es ist. Daher möchte ich mich ausdrücklich bei Amuthavalli Schnepf, Kerstin Schwab, Nadja Hafendörfer, Anna Henzel, Verena Barth für die hervorragende Verwaltungsarbeit hinsichtlich Projektabwicklung, Mitarbeiterverwaltung und die Versorgung mit notwendigen Büromaterialien bedanken. In allen technischen Fragen gilt mein Dank Andreas Lumpp, Thomas Reutter, Hans Guigas und Richard Ullrich. Für alle technischen Probleme wart ihr stets offen und hattet immer ein Lösungsvorschlag parat. Auch den Mitarbeitern der beiden Werkstätten Olaf Jörg, René Fischgräbe, Tobias Adam, Stefan Kollbach und Bernhard Schweigler möchte ich für die geleistete Unterstützung bedanken. Kerstin Bertsch möchte ich für ihre herzliche Art, ihr ansteckendes Lachen und die Fähigkeit andere immer ins rechte Licht zu rücken bedanken. Abschließend möchte ich mich bei den Mitarbeitern der PMT bedanken, für die Unterstützung in Sachen Partikelmesstechnik und allen Fragen und Anforderungen zum Thema Labor und Laborbedarf. Vielen Dank an Regina Mall, Thomas Lebe, sowie ganz besonderen Dank an Klaus Hirsch und Astrid Huber, von euch konnte ich bereits während meiner Ausbildung zum Physikkaboranten sehr viel lernen.

Meinen Eltern möchte ich ebenfalls von Herzen danken. Ihr wart stets für mich da und ich konnte mich immer auf euch verlassen und mit all meinen Sorgen und Nöten zu euch kommen. Ihr habt in allen Lebenslagen zu mir gehalten, selbst wenn unsere Meinungen nicht immer dieselben waren. Auch meinem Bruder, meinen Verwandten und Freunden möchte ich an dieser Stelle danken. Ihr wart immer für mich da, wenn ich Ablenkung von der Arbeit gebraucht habe, oder meinen Hobbys nachging.

Mein größter Dank gilt meiner Verlobten Lisa Löbnitz. Du bist zu jeder Zeit für mich da und du hast es geschafft, meinen Fokus auf die wichtigen Dinge des Lebens zu richten und hast immer an mich geglaubt. Auch wenn ich gezweifelt habe, hast du mich wieder aufgebaut und ermutigt die Arbeit fertig zu stellen. Ohne dein Vertrauen, deine Art mich zu motivieren und deine Unterstützung hätte ich diese Arbeit womöglich niemals beendet. Ich danke dir für die zahlreichen fachlichen Diskussionen, das Korrekturlesen der Arbeit und der Vorträge und vor allem, dass ich meine Zukunft mit dir verbringen darf.

Zuletzt möchte ich meiner kleinen Tochter Anna Christina danken. Deine Anwesenheit hat mein Leben und meine Prioritäten neu geordnet und mir die Kraft gegeben die Dissertation abzuschließen.

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Thematik der biologischen Verfahrenstechnik und betrachtet den Downstreamprozess von Exopolysaccharid (EPS)-produzierenden Bakterien. Die von den Bakterien synthetisierten EPS haben großen Einfluss auf die Separationseigenschaften der Zellen und können somit die Ausbeute bei der industriellen Zellernte stark beeinträchtigen. Dabei ist zwischen kapsulären EPS, welche die Zellen komplett umschließen und frei ins Medium segregierten EPS zu unterscheiden. Zellen, die von kapsulären EPS umschlossen sind, weisen eine geringere Dichtedifferenz zum Fermentationsmedium auf und sedimentieren dadurch langsamer. Freie EPS erhöhen die Viskosität des Fermentationsmediums und sorgen dadurch ebenfalls für eine Reduktion der Sedimentationsgeschwindigkeit. Durch eine Scherbeanspruchung vor der Zellernte können kapsuläre EPS abgelöst und somit die Separation der Zellen erleichtert werden. Zusätzlich zeigen EPS ein scherverdünnendes Verhalten, weshalb auch die daraus resultierende Reduktion der Medienviskosität zu einer besseren Zellernte führt.

Im ersten Teil der Arbeit liegt der Fokus auf der Bewertung der gezielten Scherbeanspruchung der Zellen hinsichtlich der Sedimentationseigenschaften, sowie dem Scale-Up der Laborergebnisse in den Pilot-Maßstab. Im zweiten Teil der Arbeit erfolgt die Aufarbeitung der im Medium verbleibenden EPS mit dem Ziel eines pulverförmigen Endproduktes. Die bei der Zellernte unerwünschten Eigenschaften der EPS sind bei gezieltem Einsatz als Zusatzstoff in der Lebensmittelindustrie eine Alternative zu kommerziellen Hydrokolloiden wie Xanthan.

Um den Einfluss der Scherung auf das Sedimentationsverhalten EPS-produzierender Bakterien aufzuzeigen, standen drei *Streptococcus thermophilus* Stämme zur Verfügung. Diese unterscheiden sich in der Länge ihrer gebildeten Zellketten, sowie der Art ihrer synthetisierten EPS. Gegenstand der Untersuchung waren zusätzlich die Sporen zweier *Bacillus subtilis* und eines *Bacillus licheniformis* Stammes. Die Scherbeanspruchung der Zellen erfolgte mittels Zahnkranzdispersierer und Hochdruckhomogenisator bei variierendem Energieeintrag. Zur Analyse der Separationseigenschaften standen mit dem LUMiSizer und der Scheibenzentrifuge zwei analytische Laborzentrifugen zur Verfügung, ergänzt durch Mikroskopieaufnahmen der Zellen mit und ohne Tuschefärbung. Ein Pathfinder FSC1 Tellerseparator diente zum Scale-Up der Laboraten in den Pilot-Maßstab.

Eine erfolgreiche Ablösung der kapsulären EPS, sowie die daraus resultierende höhere Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Zudem führte die Scherung zu einer Reduktion der Medienviskosität, was wiederum die Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen erhöhte. Auf der Gegenseite verursachte die Scherung auch eine Zerstörung von Zellketten, weshalb sich durch die reduzierte Partikelgröße geringere Sedimentationsgeschwindigkeiten der Zellen ergeben. Zudem war eine deutliche Kompaktierung des Zellsedimentes nach der Scherbeanspruchung nachweisbar. Durch Vergleich der bei der Scherung eingetragenen Energie, resultierte der Zusammenhang, dass eine Scherbelastung mit hoher Intensität und kurzer Dauer die Abscherung kapsulärer EPS begünstigt, während eine Scherung mit geringer Intensität und langer Scherdauer vorwiegend zur Zellkettenzerstörung führt. Mittels eines kapsulären und eines freien EPS produzierenden Stammes gelang die Validierung der im Labor erzielten Ergebnisse im Pilot-Maßstab.

Zur Isolierung von EPS standen Fermentationsüberstände aus der Starterkulturenproduktion eines kapsuläre EPS und eines freie EPS produzierenden Stammes zur Verfügung. Die Abtrennung der restlichen Zellen und Zellbruchstücke erfolgte mittels Mikrofiltration bzw. Ultrazentrifugation und die Konzentrierung der EPS mittels Ultrafiltration. Ein Filtrationsapparat, welcher nach dem Prinzip der dynamischen Cross-Flow-Filtration arbeitet, wurde für die Mikro- und Ultrafiltration eingesetzt. Die Zellabtrennung mittels Ultrazentrifuge fand in einer Z11 Röhrenzentrifuge statt. Die Trocknung der konzentrierten EPS erfolgte über Gefriertrocknung. Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Herstellung eines EPS-Präparates aus dem Fermentationsmedium als Abfallstrom der bakteriellen Starterkulturenproduktion. Durch Untersuchungen verschiedener Verfahrensoperationen war die Beeinflussung von EPS-Reinheit und Ausbeute bestimmbar. Diese Arbeit zeigt in einem Proof-Of-Principle eine Verfahrenskombination zur Herstellung eines EPS-Präparates ohne den Einsatz von Lösungsmitteln, mit weiteren Möglichkeit zur Optimierung und Skalierung.

Abstract

This work deals with issues in the field of biological engineering and highlights the downstream process of exopolysaccharide (EPS)-producing bacteria. The EPS synthesized by bacteria have a considerable impact on the separation properties of the cells and thus, can affect industrial cell harvesting. A distinction must be made between capsular EPS, which completely encloses the cells, and free EPS, that is segregated into the medium. Cells enclosed by capsular EPS show a lower density difference to the fermentation medium and therefore, slower sedimentation velocities. Free EPS, on the other hand, increases the viscosity of the fermentation broth and thus, also reduces sedimentation velocity. Shearing prior to cell harvesting can result in a removal of capsular EPS, thus accelerating cell separation. In addition, EPS exhibit shear-thinning behaviour. Thus, the resulting reduction in media viscosity also leads to better cell harvesting.

The first part of this work focuses on the influence of shear stress on sedimentation properties of the cells, as well as the scale-up of the laboratory results to the pilot scale. In the second part of the work, the processing of the EPS remaining in the medium is carried out aiming a powdered EPS-product. The unfavourable properties of EPS during cell harvesting are a promising alternative for commercially available hydrocolloids such as Xanthan gum for use in food products. To demonstrate the influence of shear stress on the sedimentation behavior of EPS-producing bacteria, three *Streptococcus thermophilus* strains were considered. These differed in the length of their formed cell chains, as well as the type of their synthesized EPS. Additionally, the spores of two *Bacillus subtilis* and one *Bacillus licheniformis* strain were the subject of the study. The shear stress of the cells was executed by means of a toothed ring disperser and a high-pressure homogenizer at varying energy input. Two analytical laboratory centrifuges, the LUMiSizer and a disc centrifuge, were available for analysis of separation properties, supplemented by microscopy images of the cells with and without ink dyeing. A Pathfinder FSC1 disc separator was used for scale-up.

Successful shearing of the capsular EPS, as well as the resulting higher sedimentation rate of the cells, was demonstrated in this work. In addition, shearing of bacteria cells results in a reduction of media viscosity, which leads to an increased sedimentation rate. On contrary, the shear stress also leads to a destruction of cell chains. Thus, the decreased particle size results in a lower

sedimentation settling velocity. In addition, a significant compaction of the cell sediment after shear stress was demonstrated. Comparing the energy applied by shearing led to the conclusion, that a combination of high shear intensity and short duration times favours the removal of capsular EPS, while low intensity and long duration predominantly resulted in cell chain destruction. Using a capsular and a free EPS producing strain, the experimental results were successfully transferred to pilot scale.

For the isolation of EPS, fermentation supernatants from the starter culture production of a capsular EPS and a free EPS producing strain were available. Separation of the remaining cells and cell fragments was performed by microfiltration and ultracentrifugation, respectively, and EPS was concentrated by ultrafiltration. A filtration device, which operates with the principle of dynamic cross-flow filtration, was used for microfiltration and ultrafiltration. Cell separation by ultracentrifuge took place in a Z11 tubular centrifuge. A freeze-drying was performed for a dry and powder-like EPS-product.

This work shows a successful proof-of-principle for the isolation of EPS from a fermentation broth, originated from bacterial starter culture production. By replacing the original microfiltration with ultracentrifugation, the yield of EPS, as well as its purity, was increased. Consequently, this work demonstrates an approach for isolation and purification of EPS without the use of solvents by means of process engineering basic tools, with the possibility of optimization and scaling up.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Stand der Technik	3
1.2. Zielsetzung der Arbeit	8
2. Theoretische Grundlagen	11
2.1. Mikroorganismen	11
2.1.1. Aufbau einer Bakterienzelle	11
2.1.2. Morphologie von Bakterienzellen	15
2.1.3. Zellteilung und Sporenbildung von Bakterienzellen	16
2.1.4. Fermentation von Bakterienzellen im industriellen Umfeld	17
2.1.5. Exopolysaccharide (EPS)	21
2.2. Partikelbeanspruchung und Messtechnik	25
2.2.1. Scherbeanspruchung	25
2.2.2. Partikelmesstechnik	28
2.3. Grundlagen der Sedimentation	32
2.3.1. Sedimentation im Erdschwerefeld	32
2.3.2. Sedimentation von konzentrierten Suspensionen	37
2.3.3. Sedimentation im Zentrifugalfeld	39
2.3.4. Sedimentbildung im Zentrifugalfeld	41
2.3.5. Funktionsprinzip des Tellerseparators	43
2.4. Grundlagen der Filtration	48
2.4.1. Cross-Flow-Filtration	50
2.4.2. Membranen	52
2.4.3. Deckschichtbildung	54
3. Material und Methoden	57
3.1. Mikroorganismen	57
3.1.1. <i>Bacillus subtilis</i>	57
3.1.2. <i>Bacillus licheniformis</i>	58

3.1.3.	<i>Streptococcus thermophilus</i>	58
3.1.4.	EPS-haltiges Fermentationsmedium und Modellsysteme	59
3.2.	Analysemethoden	59
3.2.1.	Scheibenzentrifuge	60
3.2.2.	LUMiSizer	62
3.2.3.	Weitere Analysemethoden	64
3.3.	Scherapparaturen	66
3.3.1.	Zahnkranzdispergierer	66
3.3.2.	Hochdruckhomogenisator	66
3.4.	Pilotanlagen	68
3.4.1.	Dynotest	68
3.4.2.	Tellerseparator	68
3.4.3.	Ultrazentrifuge	69
4.	Ergebnisse	71
4.1.	Einfluss der Scherung auf die Sedimentationseigenschaften von Bakteriosporen	71
4.1.1.	Temperatur- und Konzentrationseinfluss	72
4.1.2.	Einfluss gezielter Scherbeanspruchung	78
4.1.3.	Einfluss gezielter Scherbeanspruchung auf Sedimentkompression	82
4.2.	Einfluss der Scherung auf die Sedimentationseigenschaften von vitalen Zellen	86
4.2.1.	Analytische Bestimmung der konzentrationsabhängigen Sedimentationsgeschwindigkeit	87
4.2.2.	Einfluss gezielter Scherbeanspruchung	89
4.2.2.1.	Unbelastete Probe	89
4.2.2.2.	Scherbeanspruchung mittels Hochdruckhomogenisator	93
4.2.2.3.	Scherbeanspruchung mittels Zahnkranzdispergierer	96
4.2.2.4.	Vergleich verschiedener Leistungseinträge	102
4.2.3.	Einfluss der Scherung auf die Sedimentkompression	107
4.3.	Übertragung der Laborergebnisse in den Pilot-Maßstab	111
4.4.	Aufreinigung von Exopolysacchariden aus zellfreiem Fermentationsmedium	115
4.4.1.	Einfluss der Rührerdrehzahl auf die Retention eines Modellpolysaccharides	116
4.4.2.	Selektivität bei der Filtration mit der Dynotest	118
4.4.3.	Filtration des Fermentationsmediums	120
4.4.3.1.	Bestimmung des optimalen Transmembrandrucks für die Mikro- und Ultrafiltration des Fermentationsmediums	121
4.4.3.2.	Kombinierte Mikro- und Ultrafiltration zur Aufreinigung von EPS des Bakterienstamms <i>ST-C</i>	122

4.4.3.3.	Kombinierte Ultrazentrifugation und -filtration zur Aufreinigung von EPS des Bakterienstamms <i>ST-C</i>	127
4.4.3.4.	Kombinierte Mikro- und Ultrafiltration zur Aufreinigung von EPS des Bakterienstamms <i>ST-E</i>	129
4.4.3.5.	Kombinierte Ultrazentrifugation und -filtration zur Aufreinigung von EPS des Bakterienstamms <i>ST-E</i>	132
5.	Zusammenfassung und Ausblick	135
5.1.	Zusammenfassung	135
5.2.	Ausblick	138
6.	Abkürzungen und Symbole	139

1. Einleitung

Die Branche der Biotechnologie gewinnt in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung, wie Schüler am Beispiel des US-Marktes verdeutlicht [1]. Der Umsatz stieg von etwa 250 *Mrd. US\$* in 2010 auf über 800 *Mrd. US\$* im Jahre 2015 um über 200 % an. Produkte aus biotechnologischer Herstellung sind in vielen Anwendungsbereichen zu finden. In der Lebensmittelindustrie werden Zellen in Form von Milchsäurebakterien zur Ansäuerung in Milchprodukten oder als Hefen für die Alkoholproduktion in Bier oder Wein eingesetzt. Im Pharmabereich sind vor allem die Stoffwechselprodukte bestimmter Bakterienarten zur Gewinnung von Antibiotika oder Impfstoffen von hoher Relevanz. Dieser Auszug verdeutlicht die Vielfältigkeit ihres Einsatzes und begründet den hohen Bedarf an Forschungsaktivitäten hinsichtlich biotechnologischer Aufarbeitungsmethoden. Dabei ist die Herstellung biologischer Produkte komplex und aufwendig. Von der Kultivierung der Mikroorganismen über die weitere Aufarbeitung bis zur finalen Formulierung sind für die Entwicklung eines kosteneffizienten und wirtschaftlichen Prozesses eine Vielzahl an Herausforderungen vorhanden. Während der Upstream von verschiedensten mikrobiologischen Kulturen vielfältig in der Forschung, hinsichtlich Medienoptimierung und Zellmodifikation Beachtung findet, sowie für diverse Bakterien und Stoffwechselprodukte hinsichtlich der Fermentationsbedingungen beschrieben ist [2–5], ist der Downstream bisher nur vereinzelt ein Thema mit Hinblick auf Zellernte, Produktverlust-Minimierung und Produkt-Aufreinigung [6, 7]

In der Regel erfolgt die Fermentation unter optimalen Nährstoff- und Versorgungsbedingungen in gerührten und temperierten Fermentern. Die Zellsuspension durchläuft im Anschluss einen Separationsschritt, wie beispielsweise eine Zentrifugation oder Filtration, zur Abtrennung der Zellen aus dem Medium. Die weiteren Aufarbeitungsschritte definieren sich maßgeblich am Zielprodukt Zellen oder Medium [7].

Bereits die Zentrifugation des Zellmaterials kann sich als problematisch erweisen. Die Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen ist dabei von entscheidender Bedeutung. Optimierungspotential bietet beispielsweise die Erhöhung der separationsrelevanten Partikelgröße durch Zusatz von Flockungsmitteln [8]. Allerdings kann, je nach Zielprodukt und Anwendungsfeld, die Scherung einen negativen Einfluss auf die Zellvitalität haben und ein Einsatz von Flockungsmitteln aufgrund von Spezifikationen des Endproduktes nicht möglich sein. Ist das Zielprodukt im Zellinneren oder im Medium vorhanden, so rückt die Isolierung und Aufarbeitung nach der Zellseparation in den

Fokus. Hierbei kommt es zur gezielten Zerstörung der Zellen, um die gewünschten Inhaltsstoffe ins umgebende Medium freizusetzen. Die Konzentrierung und Aufreinigung des Zielproduktes ist dabei der aufwendigste und teuerste Produktionsschritt. In der Regel kommen hierfür Mikro- und Ultrafiltrationen zum Einsatz, die aber häufig in ihrer Standzeit durch Oberflächenfouling der Membranen begrenzt sind [9]. Weiterhin ist die Konzentration des gewünschten Zielproduktes meist gering, sodass die wirtschaftliche Produktion, gerade im Bereich von Produkten mit einer geringen Gewinnmarge, Probleme mit sich bringt. Lösungsansätze entstanden in den letzten Jahren zunehmend in Form von Kombinationsprozessen. Hierbei sind sowohl die Zellen, als auch im Medium gelöste Substanzen die Wertprodukte, sodass sich der Abfallstrom im Sinne der optimalen Ressourcennutzung und Nachhaltigkeit verringern lässt.

Diese Arbeit befasst sich sowohl mit der Aufarbeitung einer Zellsuspension hinsichtlich der Nutzung der Zellen als Wertprodukt, als auch der Isolierung von erwünschten Stoffwechselprodukten aus deren Fermentationsmedium. Dabei liegt im ersten Teil der Fokus auf der Optimierung der Zellabtrennung verschiedener Zellsuspensionen von Mikroorganismen unterschiedlicher Art und Gattung, die alle Exopolysaccharide als Stoffwechselprodukte produzieren. Die Biomasse findet dabei in der Lebensmittelindustrie als Starterkultur oder als Futtermittel Anwendung. Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit einem Konzept zur Aufarbeitung und Isolierung von Exopolysacchariden aus dem Fermentationsmedium mit Verfahren der mechanischen Verfahrenstechnik. Die von den Zellen produzierten Exopolysaccharide beeinflussen Viskosität und Stabilität von Emulsionen und gewinnen somit als Zusatzstoff in Lebensmitteln zunehmend an Bedeutung.

1.1. Stand der Technik

Industrielle Aufarbeitung biologischer Produkte

Die industrielle Produktion biologischer Produkte erfolgt in der Regel nach einem grundlegenden Prozessschema, wie in Abbildung 1.1 dargestellt [7]. Dieses unterteilt sich in den Upstream- und den Downstream-Prozess. Der Upstream beinhaltet die Vorbehandlung der Nährlösung und Impfkultur, sowie den eigentlichen Fermentationsschritt zur Biomasseerzeugung. Der Downstream beschäftigt sich mit der anschließenden Abtrennung und Aufarbeitung der Wertprodukte [10]. Für eine wirtschaftliche Produktion ist eine möglichst hohe Ausbeute über die gesamten Prozessschritte zu erzielen. Dafür ist eine optimale Anpassung des grundlegenden Verfahrensprozesses auf die zu kultivierende Spezies essenziell. Dies beinhaltet sowohl optimale Nährstoffversorgung und Wachstumsbedingungen hinsichtlich Temperatur, Sauerstoffgehalt und pH-Wert im Upstream, als auch effiziente Downstream-Verfahren mit minimalem Produktverlust [7].

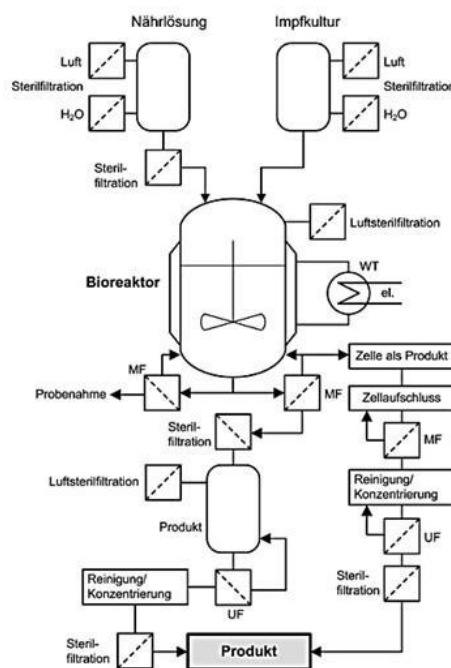


Abbildung 1.1.: Allgemeines Verfahrensschema eines Bioprozesses nach [7]

Die Prozessschritte des Downstreams unterscheiden sich je nach Zielprodukt. Steht die Gewinnung der Biomasse im Fokus der Produktion, ist eine möglichst hohe Trenneffizienz Ziel der Aufarbeitung. Im Vergleich dazu ist die Isolierung eines Stoffwechselproduktes aus der Fermentationsbrühe deutlich komplexer. In Abbildung 1.2 ist für beide Zielprodukte beispielhaft ein Verfahrensweg

dargestellt.

Der erste Schritt des Downstream-Prozesses ist die Separation der Mikroorganismen, die entweder über Filtration oder Zentrifugation erfolgt. Bei der Zentrifugation sind die Partikelgröße der Mikroorganismen und die Dichtedifferenz zwischen Mikroorganismen und dem Fermentationsmedium die entscheidenden Parameter. Hierbei kommen in der Regel Tellerseparatoren oder Dekantierzentrifugen zum Einsatz, welche eine kontinuierliche Separation der Zellen aus dem Fermentationsmedium ermöglichen und durch ihre hohen Beschleunigungskräfte die Sedimentationszeit der Partikel deutlich reduzieren. Auch Röhrenzentrifugen eignen sich zur Zellernte, haben allerdings den Nachteil der diskontinuierlichen Betriebsweise [7].

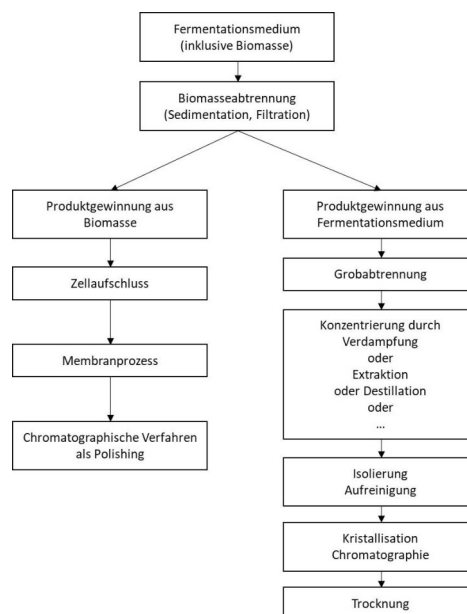


Abbildung 1.2.: Schema des Downstreams eines Bioprozesses nach [7]

Generell bringt die Zentrifugation den Nachteil der hohen Energiekosten mit sich, die zur Beschleunigung des zellhaltigen Mediums notwendig sind. Durch die Beschleunigungskräfte wirken teilweise hohe Scherkräfte auf die Partikel, sodass es zum unerwünschten Zellaufbruch und somit Ausbeuteverlust kommen kann. Zudem erfordern die kompressiblen und klebrigen Eigenschaften des Zellsediments spezifische Konstruktionen hinsichtlich des Feststoffaustrags an Dekantierzentrifugen. Grundsätzlich weisen Mikroorganismen in der Regel sehr geringe Dichtedifferenzen zum Fermentationsmedium auf, sodass im Falle sehr kleiner Mikroorganismen der Aufwand für die Trennung mittels Zentrifugation den Nutzen übersteigt. Durch Einsatz von Flockungsmitteln ist eine Optimierung der Abtrennung möglich, da sich durch die Agglomeration die effektive Partikelgröße der Mikroorganismen erhöht und somit eine Trennung mittels Zentrifugation erleichtert

ist. Flockungsmittel können allerdings nur dann zum Einsatz kommen, wenn sie im Endprodukt erwünscht sind, da sich diese weder von den Zellen noch dem Fermentationsmedium problemlos trennen lassen. Vor allem in der Lebensmittelproduktion ist der Zusatz von Flockungsmitteln nicht erwünscht, bzw. nicht gestattet. In diesem Fall bietet sich die Filtration als alternatives Trennverfahren für kleine Partikel mit geringer Dichtedifferenz an. Bei der Filtration passiert das Fermentationsmedium ein Gewebe oder eine Membran und die Separation der Zellen erfolgt nach dem Prinzip des Größenausschlusses. Dabei kommen dynamische sowie statische Filtrationsverfahren, wie Oberflächen- oder Tiefenfiltrationen zum Einsatz. Typische Filtrationsapparate, die für die Zellabtrennung eingesetzt werden, sind Vakuumtrommelfilter, Bandfilter, Filterpressen, Kerzenfilter, sowie die Membranfiltration. Nachteile bei der Vakuumfiltration ist die maximale Druckdifferenz von 0,8 bar, die oft nicht zur Entfeuchtung kleiner Poren ausreicht. Eine höhere Druckdifferenz kann in Filterpressen oder Kerzenfiltern angewendet werden, allerdings ist hier die Maschenweite der einsetzbaren Gewebe im unteren Größenbereich deutlich eingeschränkt. Eine weitere Methode ist die Cross-Flow-Filtration, welche durch die parallele Überströmung der Membran die abgesetzten Partikel mitreißt und so für eine konstante Deckschichthöhe sorgt [11]. Befindet sich das Zielprodukt im Inneren der Zelle, erfolgt nach der Zellabtrennung der Zellaufschluss über mechanische, physiko-chemische oder biologische Verfahren. Beim mechanischen Zellaufschluss kommen in der Regel Homogenisatoren, aber auch Kugelmöhlen und Ultraschallgeräte zum Einsatz. Die Zellen erfahren dabei eine hohe Scherbelastung, die zur Deformation der Zelle und schließlich zu deren Aufbruch führt. Der physiko-chemische Zellaufschluss kann durch Zugabe von Lösemitteln, Variation des osmotischen Druckes, oder durch Einfrieren und anschließendem Auftauen erfolgen. Der biologische Zellaufschluss ist dabei ein Spezialfall, da er deutlich höhere Kosten im Vergleich zu den physikalischen Verfahren verursacht. Die Zugabe von speziellen Viren, Enzymen oder Antibiotika zur Zellsuspension führt dabei zur Lyse der Zellwand. Bei der Auswahl des Zellaufschlussverfahrens ist auf eventuelle Scherempfindlichkeit, Temperaturempfindlichkeit oder Wechselwirkungen mit den zugegebenen Substanzen zu achten. Im Anschluss an den Zellaufschluss folgt die Isolation des Produktes, sowie dessen Konzentrierung und Reinigung. Dies geschieht in der Regel in einem zeitaufwendigen und kostenintensiven Verfahren mit zahlreichen Prozessschritten wie Fällungen, Filtrationen, Extraktionen, Kristallisationen, Kryo- oder Hitzebehandlungen, Absorptionen oder chromatographischen Methoden. Um eine optimale Ausbeute bei möglichst hoher Reinheit zu erhalten, ist eine Kombination aus mehreren Verfahren notwendig, die speziell auf das Zielprodukt angepasst sind [7].

Bisherige Arbeiten hinsichtlich der Optimierung der Zellabtrennung aus dem Fermentationsmedium beschäftigten sich mit dem Zusatz von Flockungsmittel vor der Separation der Zellen [8], sowie der Vorhersage von Separationsparametern im Pilot-Maßstab durch Laborexperimente am Beispiel von Mikroalgen [12].

Potenzielle Einsatzgebiete und Aufarbeitsverfahren von Exopolysacchariden mikrobiellen Ursprungs

Polysaccharide finden in einem breiten Bereich der industriellen Produktion, wie beispielsweise in der Pharma-, Kosmetik-, oder Lebensmittelindustrie, Anwendung [13]. Xanthan und Alginate werden aufgrund ihrer Eigenschaften in Mehrphasensystemen wie Dressings, Getränken oder nicht fermentierten Milchprodukten eingesetzt. Aufgrund ihres Potenzials zur Verbesserung von Viskosität, Festigkeit und Wasserbindung wirken Polysaccharide somit als Stabilisator der kontinuierlichen Phase und verhindern unerwünschte Aufrahmungs- oder Sedimentationseffekte [14]. Exopolysaccharide mikrobiellen Ursprungs bieten eine Alternative zu den aktuell eingesetzten Stabilisatoren wie pflanzlichen Hydrokolloiden. Zusätzlich zu häufigen Qualitäts- und Versorgungsschwankungen erweisen sich pflanzliche Hydrokolloide auch aus sozialen Gesichtspunkten als problematisch. In der Öffentlichkeit erfolgen vermehrt Diskussionen über deren gesundheitliche Nachteile, wie beispielsweise die Anwesenheit von Pflanzenschutzmittel in modifizierter Stärke oder Carrageen, weshalb sie als Zusatzstoff in der Kritik [15] stehen. Die Herstellung mikrobieller Polysaccharide erfolgt hingegen unabhängig von äußeren Bedingungen mit konventionellen biotechnologischen Verfahren. Zudem bietet sich der Vorteil, dass die Exopolysaccharide bei der Fermentation von mikrobiellen Starterkulturen als Nebenprodukt anfallen. Das Fermentationsmedium ist somit ein Abfallstrom. Dessen weitere Nutzung und Aufarbeitung trägt einen wesentlichen Beitrag zur Effizienzerhöhung des Gesamtverfahrens, der optimalen Ressourcenverwertung und der Nachhaltigkeit bei.

Ein weiterer Vorteil der Exopolysaccharide liegt in ihrer Vielfältigkeit. Aufgrund ihrer Synthese durch eine Vielzahl von Bakterienstämmen, zeichnen sie sich durch eine hohe Varianz im Molekulargewicht, Verzweigungsgrad und ihrer Oberflächeneigenschaften aus. Beispielsweise bilden Milchsäurebakterien der Gattung *Streptococcus thermophilus* verzweigte Heteropolysaccharide, deren spezifische Eigenschaften meist stammabhängig sind. Daraus ergeben sich weitreichende Möglichkeiten zur Produktgestaltung und speziell auf die im Zielprodukt gewünschte Wirkung angepasste Exopolysaccharide.

Die Wirksamkeit mikrobieller Polysaccharide ist mit den pflanzlichen Polysacchariden vergleichbar und zeigt teilweise sogar bessere Effekte bei geringerem Materialeinsatz. Beispielsweise zeigte der Einsatz identischer Mengen von Xanthan und EPS-Präparaten mit geringer Reinheit vergleichbare Wirksamkeit bei der Gelbildung und Gelsteifigkeit von Milchgelatinen [16]. Ähnliche Beobachtungen veröffentlichten Girard und Schaffer-Lequart mit EPS-Präparaten aus marinen Bakterien [17], sowie Yang et al. hinsichtlich der Stichtfestigkeit von Gelen aus Büffelmilchjoghurt [18]. Durch die vielversprechenden Eigenschaften und Wirkungsweisen der Exopolysaccharide zeigt sich sowohl aus industrieller, als auch wissenschaftlicher Sicht, großes Interesse am Mechanismus der EPS-Bildung und deren Nutzung als Lebensmittelzusatzstoff [19–21].

Die Gewinnung von EPS ist bisher allerdings nur im Labormaßstab mit dem Ziel, die Eigenschaften und Wirkweise der EPS zu evaluieren, möglich. Vor allem die hohen Produktionskosten, die vorrangig durch den aufwendigen Isolationsprozess bedingt sind, stellen eine große Herausforderung zur ökonomischen Gewinnung der EPS dar. Für ihre Isolierung sind je nach angestrebter Reinheit verschiedene Schritte zur Abtrennung von Zellen und Bestandteilen des Fermentationsmediums erforderlich. Im Labormaßstab beschreibt Mende et al. bereits ein Verfahren, das die Gewinnung von Exopolysacchariden mit einer hohen Reinheit bei geringem Durchsatz etabliert [16].

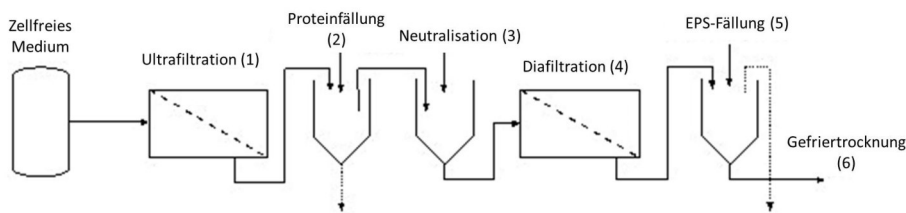


Abbildung 1.3.: Aufreinigungsschema bakterieller EPS nach Mende et al. [16]

Im Allgemeinen erfolgt zur Isolierung mikrobieller Polysaccharide zunächst die Abtrennung der Zellen durch Zentrifugation oder Filtration (1). Nach weiteren Aufreinigungsschritten wie Proteinfällung und Neutralisation (2)-(4) initiiert die Zugabe von Lösungsmittel, wie Ethanol, Isopropanol oder Aceton, sowie geeigneter Salze die Fällung der Polysaccharide aus dem Fermentationsmedium (5). Abschließend erfolgt die Trocknung der EPS (6) durch Gefriertrocknung, Sprühtrocknung, oder ähnliche Verfahren [22]. Sind hohe Ansprüche an die EPS-Reinheit gestellt, sind zusätzliche Verfahrensschritte zur Abtrennung von Proteinen als Nebenprodukte durch Ausfällen, Säurefällung, oder enzymatische Hydrolyse, sowie die Entfernung von niedermolekularen Bestandteilen durch Ultra- oder Diafiltration erforderlich. Auch das mehrstufige Fällung der EPS mit Lösungsmittel führt, bei gleichzeitiger Reduktion der Ausbeute, zu einer Erhöhung der Reinheit. Sheng et al. und Mishra et al. zeigen viele verschiedene Extraktionsverfahren, um die EPS von unterschiedlichen Bakterienarten und Algen zu isolieren [23, 24]. Die Erträge liegen allerdings meist im Bereich von mehreren $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ und sind daher keinesfalls zur kommerziellen Gewinnung von EPS geeignet. Li et al. erzielten durch tangentielle Querstromfiltration im Pilot-Maßstab EPS-Erträge im hohen $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ -Bereich [25] und vereinzelte Arbeiten zeigen Erträge im unteren $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ -Bereich [26]. Bisher existiert somit kein wirtschaftlich nutzbares Verfahren zur Isolierung der EPS aus dem Fermentationsmedium. Dies ist vor allem bedingt durch dessen komplexe Zusammensetzung, sowie die viskositätsbeeinflussenden Eigenschaften der Polysaccharide. Auch die Beeinflussung der Viskosität des zellhaltigen Mediums von verschiedenen *Streptococcus thermophilus*-Stämmen nach Scherbehandlung und die Wirkung auf die Sinkgeschwindigkeit ist in der Literatur bereits betrachtet [27]. Exopolysaccharide als Verkaufsprodukt konkurrieren mit pflanzlichen Hydrokolloiden, die sich auf dem Markt im Niedrig-Preisbereich platzieren. Daher

sind aufwändige Verfahren zur Isolierung der EPS, wie beispielsweise bei der Produktion von Antibiotika, nicht wirtschaftlich anwendbar. Für die Isolierung der EPS aus dem Fermentationsmedium ist daher die Entwicklung von Verfahren mit günstigen Prozessschritten hinsichtlich Investitions- und Betriebskosten, sowie einem hohen Durchsatz notwendig.

1.2. Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit befasst sich mit dem Downstream-Prozess von Zellsuspensionen industriellen Ursprungs aus bakteriellen Starterkulturen. Dabei stellt die Optimierung der Zellseparation mittels Scherbeanspruchung den ersten Teil der Zielsetzung und die Aufarbeitung des zellfreien Fermentationsmediums zur Isolierung von Exopolysacchariden den zweiten Teil der Untersuchungen dar. Der erste Teilabschnitt beschäftigt sich mit dem Einfluss einer Scherbeanspruchung auf die Sedimentationseigenschaften von Bakteriosporen im Labormaßstab. Die Betrachtung erweitert sich im Folgenden um die Beanspruchung von vitalen Zellen durch Scherung mit unterschiedlichen Dispergiergeräten. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse werden durch die Übertragbarkeit der Laborergebnisse in den Pilotmaßstab validiert. Der zweite Abschnitt der Arbeit evaluiert die Machbarkeit der Isolierung von Exopolysacchariden im Pilotmaßstab mittels dynamischer Cross-Flow-Filtration.

Einfluss der Scherbeanspruchung auf die Sedimentationseigenschaften von Bakteriosporen der exopolysaccharid-produzierenden Stämme *Bacillus licheniformis* und *Bacillus subtilis*

Die Sedimentationsgeschwindigkeit der Sporen und die Kompressibilität des Sediments sind die entscheidenden Faktoren bei der Separation von Bakteriosporen. Die Analyse beider Faktoren erfolgt mittels der optischen Analysenzentrifuge LUMiSizer im Labormaßstab. Zunächst wird der Einfluss von Messtemperatur und Probenkonzentration auf die Sedimentationseigenschaften der Sporen, sowie deren Sedimentationseigenschaften im unbelasteten Zustand bestimmt. Im Folgenden werden die Bakteriosporen einer Scherbeanspruchung in einem Hochdruckhomogenisator ausgesetzt und die Änderung des Sedimentationsverhaltens charakterisiert.

Einfluss der Scherbeanspruchung auf die Sedimentationseigenschaften von vitalen Zellen des exopolysaccharid-produzierenden Stamms *Streptococcus thermophilus*

Analog zu den Untersuchungen der Bakteriosporen erfolgt die Charakterisierung der Sedimentationseigenschaften von drei *Streptococcus thermophilus* Stämmen, die sich im Wesentlichen in der Zellkettenlänge und den Eigenschaften der ausgebildeten EPS unterscheiden. Die Sinkgeschwindigkeitsanalyse mittels LUMiSizer ist dabei mit der Scheibenzentrifuge um ein zusätzliches

Analysengerät ergänzt. Dies ermöglicht eine Bewertung der Partikelgröße hinsichtlich des Einflusses der Scherbehandlung auf die Zellkettenlänge. Im Vergleich zu den Baktersporen, ist die Scherbehandlung der Bakterienzellen um die Anwendung eines Zahnkranzdispergierers erweitert, sodass eine weitere Steigerung des Energieeintrages erfolgen kann. Die Ergebnisse geben daher den Einfluss von Beanspruchungsart und Energieeintrag auf Bakterienstämme mit unterschiedlichen EPS-Eigenschaften wieder.

Übertragung der Laborergebnisse zu den Sedimentationseigenschaften zweier Stämme der Gattung *Streptococcus thermophilus* in den Pilot-Maßstab

Der dritte Ergebnisteil befasst sich mit der Übertragung der Laborergebnisse bezüglich der Scherung von vitalen Bakterienzellen in den Pilotmaßstab. Der Unterschied zwischen unbehandelten Zellen und mit Scherung beaufschlagten Zellen zweier Bakterienstämme mit unterschiedlichen EPS-Eigenschaften steht hierbei im Fokus der Untersuchungen. Die Scherung der Zellsuspensionen fand analog zum Laborversuch im Hochdruckhomogenisator statt. Als Pilotapparat zur Zellabtrennung kommt ein Tellerseparator zum Einsatz. Die Übertragung der Ergebnisse zur Sedimentationsgeschwindigkeit der beanspruchten und unbeanspruchten Bakterien erfolgt über die Variation des Feed-Volumenstroms. Die Auswirkung der Scherung auf die Sedimentkompression wird bei konstantem Durchfluss über die Standzeit bis zum Erreichen des maximalen Füllgrads bewertet.

Isolierung von Exopolysacchariden aus dem zellfreien Medienüberstand als Abfallprodukt der industriellen Starterkulturen-Produktion

Die Isolierung der EPS aus dem zellfreien Fermentationsmedium der Starterkulturen-Produktion erfolgt nach einem vereinfachten Isolierungsschema im Labormaßstab nach Mende [16]. Vorversuche beschäftigen sich mit den Eigenschaften der eingesetzten Membranen hinsichtlich Rückhaltung und Selektivität von Modellpolysacchariden. Die Definition der Betriebsparameter für die Experimente mit zellfreiem Fermentationsmedium basieren auf diesen Ergebnissen. Der erste Schritt stellt die Abtrennung der im Medium verbliebenen Zellen und Zellbruchstücken über eine Mikrofiltration, oder alternativ per Ultrazentrifugation, dar. Im Anschluss werden die EPS mittels einer Ultrafiltration konzentriert und durch Waschung mit demineralisiertem Wasser aufgereinigt. Nach einer Gefriertrocknung resultiert ein pulverförmiges EPS-Produkt. Als Bewertungskriterien für die Aufarbeitungseffizienz sind der Trockenmassengehalt, der Kohlenhydratanteil und die EPS-Reinheit von Interesse.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Mikroorganismen

Der Begriff Mikroorganismus definiert Einzeller, für die eine geringe Größe im Mikrometer-Bereich charakteristisch ist. Die Eigenschaft Einzelligkeit beschreibt dabei deren Fähigkeit als einzelne Zelle, unabhängig von der Anwesenheit weiterer Zellen der gleichen Art, zu überleben. Trotz deren prinzipiellen Fähigkeit isoliert zu existieren, ordnen sich viele Arten zeitweise oder sogar dauerhaft in Verbänden wie beispielsweise Zellketten oder Biofilmen an. Durch die Aggregation zu Zellverbänden sind die Mikroorganismen in der Lage ihre Umgebungsbedingungen räumlich begrenzt selbst zu regulieren und gegenseitig von den spezifischen biochemischen Stoffwechselprodukten zu profitieren. Unter Mikroorganismen wird eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Organismen zusammengefasst. Dazu zählen beispielsweise Hefen, Algen, Bakterien und Viren. Je nach Art unterscheiden sich diese in Form und Größe. Hefen ordnen sich in einem Bereich zwischen 4 und 8 μm ein und sind in der Regel rund bis oval, während ein Großteil der Bakterien in einer Größe zwischen 0,2 und 5,0 μm zu finden sind.

Die größten Vertreter der Mikroorganismen sind Amöben, mit einer Partikelgröße zwischen 100 - 800 μm . Deutliche Abweichungen von der Standardgröße sind auch innerhalb mancher Arten zu finden, wie die Gattung *Chaos* bei den Amöben mit einer Größe bis zu 5 mm oder die Gattung *Thiomargarita namibiensis* bei den Bakterien mit einer Größe bis zu 750 μm . Trotz dieses deutlichen Unterschieds zu den weiteren Vertretern ihrer Art zählen auch sie zu den Mikroorganismen, da deutliche Parallelen im Genom nachweisbar sind. Zu den kleinsten Vertretern der Mikroorganismen zählen die Viren. Mit einer Größe von 0,02 - 0,45 μm sind sie teilweise selbst im Lichtmikroskop nicht mehr sichtbar [28].

2.1.1. Aufbau einer Bakterienzelle

Alle bekannten Lebensformen bestehen aus mindestens einer Zelle. Daher kann die Zelle als die kleinste Einheit des Lebens gesehen werden. Ihre geringst mögliche Größe ist dabei durch das

Volumen ihrer lebenswichtigen Bestandteile vorgegeben und beträgt bei Bakterien etwa $0,2 \mu\text{m}$. Damit die Versorgung mit allen überlebensnotwendigen Stoffen möglich ist, ist die maximale Größe einer Bakterienzelle auf einen Wert unter 1 mm beschränkt. Größere Ausdehnungen der Zelle würden gleichzeitig auch ein ungünstigeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis bedeuten. Wichtige Komponenten wie Nährstoffe könnten aufgrund der internen Diffusionsgeschwindigkeit nicht mehr gerichtet und schnell von der *Cytoplasmamembran* an den Zielort in der Zelle und Abfallprodukte nicht mehr aus der Zelle transportiert werden. Damit wäre eine Bakterienzelle nicht mehr optimal versorgt und somit nur bedingt überlebensfähig. Um diesen Mangel in größeren Zellen zu verhindern, weisen diese im Zellinneren abgegrenzte Reaktionsräume auf, die sich durch Einstülpungen der *Cytoplasmamembran* bilden.

Der Aufbau einer Bakterienzelle ist prinzipiell immer gleich, wohingegen die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Umgebung große Unterschiede aufweisen. Abbildung 2.1 zeigt schematisch den Aufbau einer Bakterienzelle.

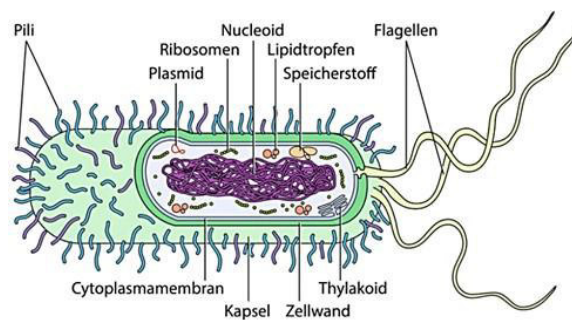


Abbildung 2.1.: Schematischer Aufbau einer Bakterienzelle [28]

Da die Bakterien-Zelle keinen Zellkern beinhaltet, liegt die DNA frei im *Cytoplasma* vor. Allerdings ist sie in einer kernähnlichen Struktur organisiert, dem sogenannten *Nucleoid*. Dieses beansprucht typischerweise ein Drittel des Zellvolumens. Das DNA-Molekül ist meist zirkulär aufgebaut, kann aber in manchen Fällen auch linear vorliegen.

Neben dem *Nucleoid* befinden sich häufig noch mehrere extrachromosomale Elemente, wie z. B. die *Plasmide*, im *Cytoplasma*. Diese meist ringförmigen DNA-Moleküle codieren spezielle Proteine, die beispielsweise für die Toxinbildung oder die Resistenz gegen Antibiotika verantwortlich sind. In den *Ribosomen* wird die RNA, genauer genommen die mRNA, enzymatisch in eine Aminosäuresequenz überführt. Im nachfolgenden Schritt faltet sich diese gemäß ihrer Ladungsstruktur und aktiven chemischen Gruppen in eine dreidimensionale Struktur, das sogenannte Protein.

Zwei grundsätzliche Arten der Zellhülle sind zu unterscheiden. Die Schutzhülle der Zelle gegenüber dem umgebenden Milieu ist die *Zellwand*. Diese ist im Vergleich zur *Cytoplasmamembran*

starr und hält die Zelle in Form. Sie gibt dieser Stabilität, bietet einen begrenzten Schutz gegen mechanische Einwirkungen und erfüllt auch die Funktion eines Druckbehälters, um den hohen Innendruck der Zelle von etwa 1 MPa gegenüber der Umgebung zu kompensieren. Der Hauptbestandteil ist dabei das aus hochmolekularen Polysaccharidketten gebildete Peptidoglykan. Diese Peptidoglykan-Schicht ist ausschlaggebend, ob ein Bakterium als gram-positiv oder gram-negativ gilt. Bei gram-positiven Bakterien ist die Peptidoglykan-Schicht mit etwa 20 nm deutlich dicker als bei gram-negativen Bakterien mit ca. 3 nm Dicke. Beim Anfärben von Bakterienzellen dringt der Farbstoff Gentianaviolett daher tief in die Schicht ein und lässt sich mit Ethanol nur sehr schwer wieder auswaschen. Bei der dünnen Peptidoglykan-Schicht gram-negativer Bakterien kann der Farbstoff hingegen komplett entfernt werden. Somit kann durch die Färbemethode nach dem dänischen Mediziner H. C. J. Gram eine Unterscheidung der Bakterien aufgrund der Dicke ihrer Peptidoglykan-Schicht bzw. Zellwand erfolgen.

Im Vergleich zur *Zellwand*, umschließt die *Cytoplasmamembran* den Reaktionsraum der Zelle und wirkt als regulierende Barriere für aus der Umgebung eintretende und in die Umgebung austretende Stoffe. Außerdem dient sie dem Schutz der Zelle, sowie als Permeabilitätsbarriere, Energiespeicher und Proteinanker. Sie besteht aus Phospholipiden, Proteinen, sowie weiteren Lipiden. Sie ist in der Regel als Lipiddoppelschicht aufgebaut, die sowohl integrierte als auch freie Proteine beinhaltet.

Phospholipide werden anhand ihrer strukturellen Unterschiede in zwei Abschnitte unterteilt. Der Kopfteil weist einen hydrophilen und der Schwanzteil einen hydrophoben Charakter auf. Dies ist durch deren chemische Struktur bedingt. Der hydrophile Kopfteil besteht aus einer Glycerinverbindung, einer Phosphatgruppe und dem jeweiligen hydrophilen Rest, im betrachteten Beispiel das Ehtanolamin. Der hydrophile Teil beinhaltet in der Regel geladene Gruppen, die aufgrund ihrer Polarität zur Bildung von Wasserstoffbrücken führen und somit die Affinität zu Wassermolekülen oder anderen geladenen Komponenten begründen. Der hydrophobe Schwanzteil hingegen besteht aus zwei langkettigen Fettsäuren. Diese sind unpolar und gehen daher präferiert hydrophobe Wechselwirkungen mit weiteren langkettigen und unpolaren Molekülen ein. Das Glycerin verbindet über das Glycerinrückgrat die beiden funktionellen Teile des Phospholipids miteinander und wird teilweise als dritter Teil des Phospholipids gezählt.

Sowohl die Fettsäuren im Schwanzteil, als auch der Rest in der Kopfgruppe sind variabel, so dass sich eine Vielzahl möglicher Kombinationen und daher auch eine Vielzahl verschiedener Phospholipide ergibt. Die Kombination aus Fettsäure und Rest bestimmen die Eigenschaften des Phospholipids und ermöglichen dadurch den Einsatz des genau passenden Phospholipids für eine bestimmte Aufgabe. Sobald die Phospholipid-Konzentration in wässriger Umgebung ein bestimmtes Niveau übersteigt, bilden sie eine Doppelschicht, der sogenannte Bilayer, wobei die hydrophilen Kopfgruppen zur wässrigen Phase ausgerichtet sind und die hydrophoben

Schwanzgruppen ins Innere der Doppelschicht ragen. Die Dicke dieser Doppelschicht beträgt etwa 6 – 8 nm und bildet zusammen mit den im Inneren der Schicht eingelagerten Proteinen und Lipiden eine *Cytoplasmamembran*.

Proteine, welche für ihre Funktion mit der äußeren Umgebung in Kontakt treten müssen, beispielsweise zum Signalaustausch, zur Energieumwandlung, oder zur Fortbewegung der Zelle, sind fest mit der *Cytoplasmamembran* verbunden. Trotz der kovalenten Bindung der Proteine zur Membran, ist diese nicht starr. Das Flüssig-Mosaik-Modell in Abbildung 2.2 zeigt, dass die einzelnen Membranbausteine gegeneinander beweglich sind und die Membran daher das Verhalten einer zweidimensionalen Flüssigkeit aus Lipidmolekülen zeigt. Die Flexibilität und Beweglichkeit der Membran hängt im Wesentlichen von der Kombination der Fettsäureanteile der Lipide ab, wobei eine hohe Fluidität aus kurzen, ungesättigten Fettsäuren und eine geringe Fluidität aus langkettigen, gesättigten Fettsäuren resultiert.

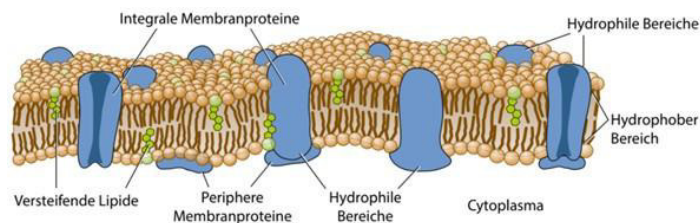


Abbildung 2.2.: *Cytoplasmamembran* nach dem Flüssig-Mosaik-Modell [28]

Wie bereits beschrieben haben gram-negative Bakterien eine dünnere Zellwand als gram-positive Bakterien, weisen aber stattdessen eine zusätzliche äußere Membran auf. Dabei handelt es sich analog zur *Cytoplasmamembran* um eine Lipiddoppelschicht.

Als zusätzlichen Schutz vor der Austrocknung und zur Bindung von Nährstoffen umgeben sich einige Bakterien mit einer Kapsel oder einem Schleim aus Polysacchariden. Diese Schicht, auch als Glykokalyx bezeichnet, kann im Vergleich zur Zellwand sehr dick sein und einen hochviskosen Charakter aufweisen. Die Glykokalyx liegt im Wesentlichen in zwei unterschiedlichen Varianten vor. Entweder als Kapsel, die fest mit der Zelle verbunden ist oder als Schleim, der frei in das umgebende Medium segregiert wird. Chemisch betrachtet handelt es sich bei der Glykokalyx um Polysaccharide, die ins umgebene Medium abgesondert und daher als Exopolysaccharide (EPS) bezeichnet werden [28–31].

2.1.2. Morphologie von Bakterienzellen

Im Wesentlichen werden vier grundlegende Bakterienformen unterschieden. Dazu zählen die kugelförmigen Kokken, die länglichen Stäbchen, die leicht gebogenen Vibrionen und die schraubenförmigen Spirillen, wie in Abbildung 2.3 (oben) dargestellt. Dabei kommt es je nach Bakterienart zu unterschiedlichen Ausprägungen dieser vier Grundformen. So können Kokken, welche in der Regel einen Durchmesser von etwa $1\ \mu\text{m}$ aufweisen, beispielsweise auch leicht oval geformt sein, oder zwischen plumpen (kokkoiden) und schlanken Stäbchen unterschieden werden. Stäbchen haben üblicherweise einen Querschnitt von etwa $0,5\ \mu\text{m}$ bei einer Länge von $2 - 5\ \mu\text{m}$. Bei plumpen Stäbchen entspricht ihr Querschnitt annähernd ihrer Länge, während bei schlanken Stäbchen die Länge um ein Vielfaches größer ist als der Querschnitt. Zusätzliche Variationen können an den Enden, den sogenannten Polen, der Stäbchen auftreten, da diese entweder spitz, rund oder platt, bzw. fast rechteckig, zulaufen. Neben diesen Variationsmöglichkeiten können sich einzelne Zellen auch mit einer oder mehreren Nachbarzellen verbinden. Kokken kommen häufig in Paaren als Diplokokken vor, die sich wiederum zu Vierergruppen als Tetraden, Achtergruppen als Sarcinen, in Haufen bzw. Traubenform als Staphylokokken oder Ketten als Streptokokken anordnen, siehe Abbildung 2.3 (unten). Stäbchenförmige Bakterien liegen entweder als isolierte Einzelzellen vor oder bilden typischerweise lange Ketten, analog zu den Streptokokken. Auch die palisadenförmige Aneinanderreihung stäbchenförmiger Bakterien ist möglich. Aufgrund des Größenbereichs um $1\ \mu\text{m}$ ist es relativ einfach die jeweils vorliegende morphologische Bakterienform, sowie eine eventuelle Aneinanderlagerung mittels Lichtmikroskopie zu identifizieren [28–31].

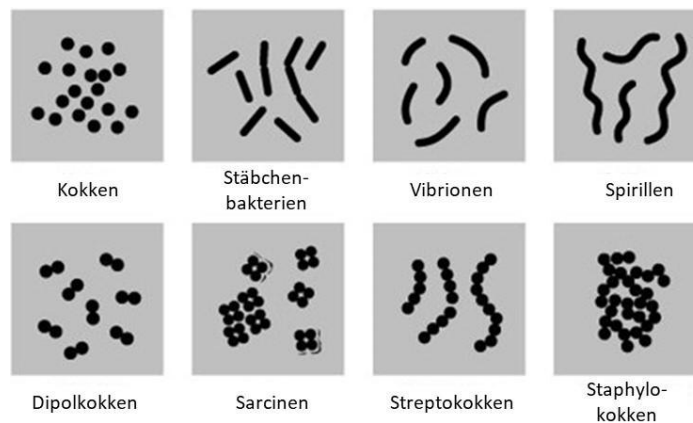


Abbildung 2.3.: Grundformen der Bakterienmorphologie (oben) und gängige Zusammenlagerungen von Bakterienzellen (unten)

2.1.3. Zellteilung und Sporenbildung von Bakterienzellen

Die Vermehrung von Bakterienzellen erfolgt bei ausreichender Versorgung mit Nährstoffen und günstigen Umgebungsbedingungen mittels Zellteilung. Abbildung 2.4 stellt den Prozess schematisch dar. Dabei nimmt zunächst die Biomasse der Zelle in der B-Phase zu. Dieser Prozess wiederholt sich solange bis eine kritische Masse erreicht ist und sich das Bakterienchromosom in der C-Phase repliziert. Die beiden DNA-Moleküle wandern zu den entgegengesetzten Zellpolen und die Zelle beginnt in der D-Phase sich in ihrer Mitte einzuschnüren. Am Ende des Zellteilungsprozesses liegen zwei Zellen, mit identischen Genom, vor [7].

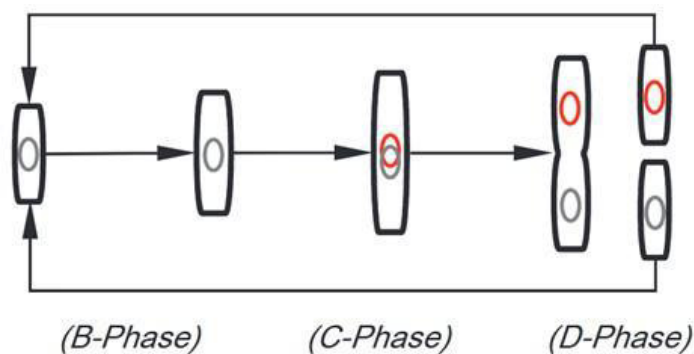


Abbildung 2.4.: Zellteilung von Bakterienzellen [7]

Eine besondere Form der Zellteilung stellt die Bildung von Endosporen dar. Die Bildung von Sporen dient zwei zentralen Zwecken. Liegt eine Situation des Nährstoffmangels vor, bilden Sporen eine Überlebensform, die metabolisch inaktiv ist. Dadurch können sie Extremeinflüssen wie chemischer-, thermischer- und Strahlenbelastung widerstehen. Zudem kann sich die Bakterie in Sporenform deutlich leichter im Medium verteilen. Somit dient die Spore auch zur schnellen Verbreitung des Bakteriengenoms. Der Begriff Endospore bezieht sich dabei auf die Sporenart, die am weitesten unten den Bakterienstämmen verbreitet ist. Es existieren noch weitere Formen spezieller Bakterienstämme wie Myxosporen oder Exosporen. Im Weiteren wird nur die Bildung der Endosporen genauer betrachtet.

In Abbildung 2.5 ist die Sporenbildung vereinfacht dargestellt. Sie besteht aus zwei separaten, aber miteinander verbundenen Zyklen. Der vegetative Zyklus zeigt die Zellteilung wie bereits beschrieben. Liegt ein Unterangebot von Nährstoffen vor, durchläuft die Zelle nicht mehr den vegetativen Zyklus, sondern die Sporenbildung. Dabei erfolgt zunächst eine asymmetrische Aufteilung der Zelle, wobei eine Trennwand, das Septum, die Mutterzelle von der Vorspore trennt. Im nächsten Schritt umhüllt die Mutterzelle die Vorspore, welche durch die Ausbildung von Cortex, Zellwand und Zellmembran im Inneren der Mutterzelle zur Spore heranreift. Nachdem

die Spore inklusive Schutzhülle vollständig ausgebildet ist, kommt es zur Zellyse der Mutterzelle und die Spore wird in die Umgebung freigesetzt. Bei erneuter Nährstoffanreicherung keimt die Spore und eine neue Bakterienzelle kann entstehen [32–34].

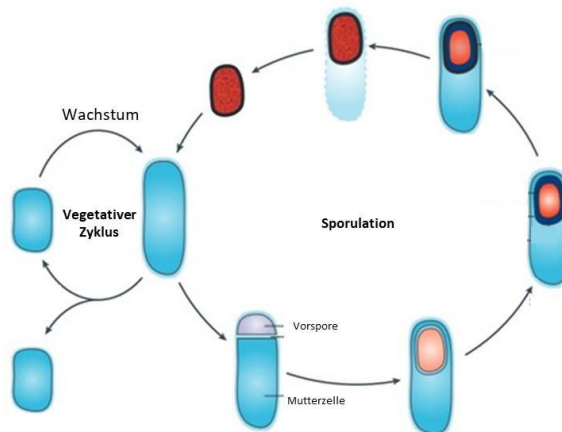


Abbildung 2.5.: Sporulationsprozess am Beispiel von *Bacillus subtilis* nach [35]

2.1.4. Fermentation von Bakterienzellen im industriellen Umfeld

Mikroorganismen werden vielfältig im industriellen Maßstab eingesetzt. Verschiedenste Industriezweige nutzen die Eigenschaften und Stoffwechselprodukte der Bakterien für die Produktion. Dabei können entweder die Mikroorganismen selbst das Produkt sein, wie beispielsweise als Probiotika in der Lebensmittelindustrie, oder deren Produkte wie Antibiotika die Zielkomponente sein. Abbildung 2.6 zeigt einen Ausschnitt aus dem weiten Anwendungsspektrum von Mikroorganismen.

Um die Mikroorganismen zielführend einzusetzen, ist der erste Schritt die industrielle Vermehrung des Ziel-Organismus. Dies wird über die Fermentation ermöglicht. Dabei ist die Nachbildung der optimalen Wachstumsbedingungen des Bakteriums von entscheidender Bedeutung. Dazu zählen unter anderem Parameter wie Temperatur, pH-Wert und Nährstoffangebot.

Um Mikroorganismen im industriellen Maßstab ökonomisch zu fermentieren, ist eine optimale Anpassung des Fermentationsprozesses an den zu fermentierenden Mikroorganismus entscheidend. Dies beginnt bereits bei der Wahl eines geeigneten Reaktors und dessen Dimensionen. In einem Bioreaktor ist in der Regel eine gute Dispergierung der Mikroorganismen notwendig, ohne eine zu hohe Scherbeanspruchung durch das Rührorgan einzutragen und dadurch eine Zellschädigung herbeizuführen. Der Energieeintrag darf gleichzeitig auch nicht zu gering sein, um eine

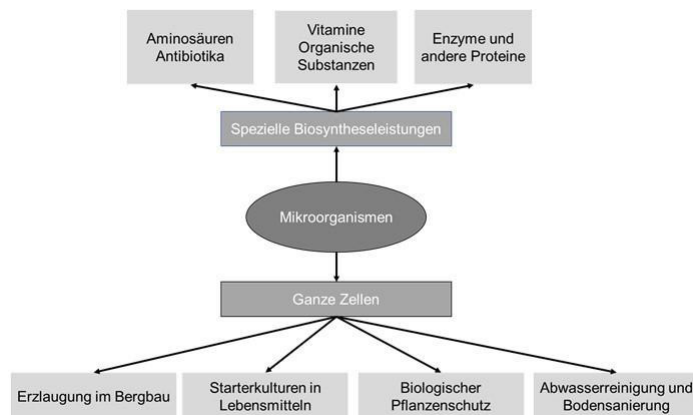


Abbildung 2.6.: Einsatzfelder mikrobieller Produkte und Mikroorganismen im industriellen Umfeld, nach [29]

homogene Verteilung von Gasbläschen, sowie einen guten Energie- und Stoffaustausch im Reaktor zu garantieren. Da im industriellen Maßstab meist Bakterien eingesetzt werden, die Sauerstoff für ihren Stoffwechsel benötigen, sogenannte aerobe Bakterien, kommen in den meisten Fällen begaste Rührkessel bei deren Produktion zum Einsatz. Der begaste Rührkessel gewährleistet eine ausreichend gute Begasung und Durchmischung für das Wachstum der Mikroorganismen. Alternativ können beispielsweise bei scherempfindlichen Mikroorganismen auch Blasensäulen, Festbett- oder Wirbelschichtreaktoren Anwendung finden. Die wesentlichen Vorteile des begasten Rührkessels sind unter anderem die einfache Realisierung der Temperierung mittels Doppelmantel und der hohen Variabilität hinsichtlich Begasungs- und Rührergeometrie. Die Begasung erfolgt im einfachsten Fall durch ein Rohr, welches unterhalb des Rührers endet, siehe Abbildung 2.7. Bei komplexeren Begasungsmethoden wird über einen ringförmigen, perforierten Begaser unterhalb des Rührers begast. Die kleinsten Gasblasen lassen sich beim Durchströmen von hochporösen gesinterten Keramiken oder Metallen realisieren. Grundsätzlich gilt, je geringer die Blasengröße, desto vorteilhafter ist das Oberflächen-Volumen-Verhältnis und somit ist die Begasung effizienter. Die Wahl der Rührergeometrie erfolgt hauptsächlich in Abhängigkeit der Scherempfindlichkeit der Mikroorganismen, sowie den Viskositätseigenschaften des Fluids. Im Regelfall sind aufgrund ihres sehr guten Misch- und Dispergierverhaltens Scheibenrührer im Einsatz. Bei schmalen, hohen Reaktoren sind in der Regel mehrere Scheibenrührer auf einer Welle montiert, um eine gute Durchmischung und Dispergierung über die gesamte Behälterhöhe zu erzielen. Bei scherempfindlichen Mikroorganismen können diese durch Propellerrührer und im Falle hoher Medienviskositäten durch Ankerrührer ersetzt werden. Wie die schematische Abbildung 2.7 zeigt, sind meist in Wandnähe des Behälters zusätzlich Stromstörer angebracht, welche bei hohen Drehzahlen die Bildung von Wirbeln im Reaktor verhindern. Da die Fermentation von Mikroorganismen nicht Teil dieser

Arbeit war, wird auf die detaillierte Auslegung eines Bioreaktors hier nicht weiter eingegangen. Ausführliche Informationen zu diesem Thema sind in der weiterführenden Fachliteratur zu finden [7, 36].

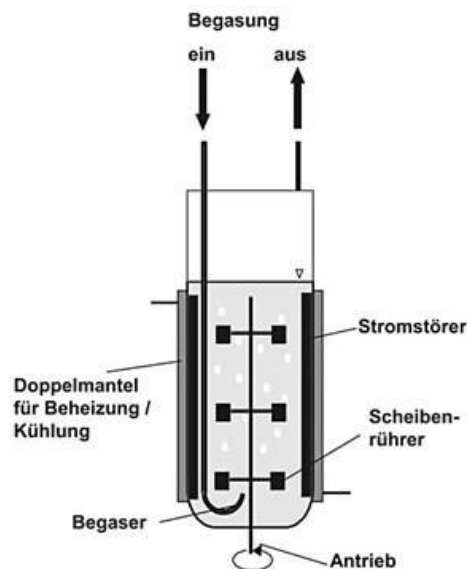


Abbildung 2.7.: Schematischer Aufbau eines Rührkesselreaktors zur Fermentation von aeroben Mikroorganismen [36]

Zusätzlich zur Auswahl und Dimensionierung des Reaktors, sowie der Bestimmung geeigneter Betriebsparameter wie Temperatur, Druck und pH-Wert, ist die Zusammensetzung des Fermentationsmediums von entscheidender Bedeutung für das Bakterienwachstum. Dazu müssen für die Mikroorganismen geeignete Energie-, Kohlenstoff- und Stickstoffquellen in ausreichender Menge vorhanden sein. Auch die Anwesenheit zahlreicher Hauptelemente wie Phosphor, Schwefel, Magnesium, Kalium, Calcium, Natrium und Eisen, sowie Spurenelemente wie Kupfer, Mangan, Kobalt und Zink sind zum Wachstum der Mikroorganismen erforderlich. In vielen Fällen müssen zusätzlich spezifische Vitamine und Aminosäuren bereitgestellt werden, sofern die Mikroorganismen diese nicht selbst synthetisieren können. Allerdings sind Fermentationsmedien sehr komplexe Medien mit teilweise über 50 unterschiedlichen Substraten, sodass es oft schwierig ist, die optimale Medienzusammensetzung im Zusammenspiel mit den Prozessparametern Temperatur, Druck und pH-Wert zu ermitteln. Genauere Erläuterungen zu den aufgezählten Medienbestandteilen, sowie zur Zusammenstellung von Fermentationsmedien sind in der Literatur näher erläutert [7].

Der Upstream-Prozess zur Vermehrung der Zellen ist allerdings nur ein Teil des komplexen Produktionsprozesses mikrobieller Produkte. Durch die spezifischen Eigenschaften der Zellen, wie

ihre geringe Größe und Dichtedifferenz, wird die Zellabtrennung und die weitere Aufarbeitung zur Herausforderung für den industriellen Prozess.

In Abhängigkeit des Zielproduktes und dessen für die Weiterverarbeitung gewünschter Form, kommen nach der Fermentation verschiedene Verfahrensschritte zum Einsatz. In Abbildung 2.8 ist beispielhaft ein Prozess zur Produktion eines Stoffwechselproduktes von Mikroorganismen in einer finalen kristallinen Form dargestellt. Zunächst erfolgt die Abtrennung entweder der ganzen Zellen oder der Zellbruchstücke nach dem Zellaufschluss. Dies geschieht in der Regel entweder über zentrifugierende oder filtrierende Verfahren. Das jeweilige Verfahren ist dabei genau auf die Art des Mikroorganismus, sowie den Zustand der Zellen im Fermentationsmedium angepasst. In Abhängigkeit des Zielproduktes erfolgt eine Weiterverarbeitung der Zellmasse, z.B. in der Lebensmittelindustrie die Zugabe von Milchsäurebakterien zu Milcherzeugnissen für die Ansäuerung von Joghurt, oder die weitere Aufarbeitung der Fermentationsbrühe, beispielsweise bei der Produktion von Antibiotika oder anderen Zielprodukten im Medium.

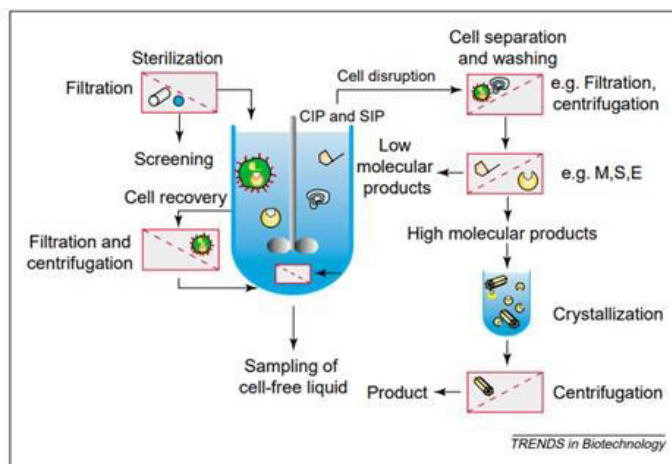


Abbildung 2.8.: Beispiel-Prozess der Produktion mikrobieller Produkte [37]

Wie in Abbildung 2.8 dargestellt, kann es sich bei den weiteren Schritten um Membranfiltrationen zur Entfernung niedermolekularer Nebenprodukte oder auch Kristallisationsschritte zur Erhöhung der Reinheit des Produktes handeln [37]. Dabei sind nicht nur die an sich komplexen Schritte wie Fermentation oder Nachbereitung wie Kristallisation aus verfahrenstechnischer Sicht eine Herausforderung. Vor allem die Zellabtrennung über Zentrifugation und Filtration bedingt die Wirtschaftlichkeit eines solchen Prozesses. Die Anforderungen an die Zellabtrennung sind vielfältig und reichen von vollständiger Abtrennung, über einen hohen Durchsatz bis zu geringen Investitions- und Betriebskosten. Dem gegenüber stehen die besonderen physikochemischen Eigenschaften der Zellen, welche die Abtrennung deutlich erschweren. Die geringe Größe der

Zellen, die geringe Dichtedifferenz zwischen Zellen und Medium, sowie die kompressiblen Eigenschaften der Zellen stellen hohe Ansprüche an den Aufarbeitungsprozess. Zudem liegen im Medium in der Regel nicht ausschließlich ganze Zellen vor, sondern auch Zellbruchstücke und Zellinhalt. Dadurch weisen die abzutrennenden Feststoffe deutlich unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich der Abtrennung auf, während die intrazellulären Stoffwechselprodukte der Zellen zusätzlich die Mediumviskosität erhöhen.

Ein Beispiel ist die Optimierung der Zellabtrennung auf einem Tellerseparator mittels Flockung der Zellen. In Laborversuchen erfolgten Flockungstests mit verschiedenen polymeren Flockungsmitteln, um die Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen zu erhöhen. Die Ergebnisse wurden im Anschluss auf einem Tellerseparator validiert, wobei eine deutliche Verbesserung der Zellabtrennung durch die vorangegangene Flockung gelang [8]. An diesem Beispiel wird deutlich, dass ein hoher Entwicklungsbedarf neuer Prozesse, sowie Optimierungsbedarf bestehender Prozesse vorliegt.

2.1.5. Exopolysaccharide (EPS)

Als zusätzlichen Schutzmechanismus besitzen einige Mikroorganismen die Fähigkeit Polysaccharid-Strukturen zu synthetisieren, die sie auf unterschiedliche Weise vor Umwelteinflüssen schützen. Diese molekularen Strukturen werden durch die Zelle selbst nach Abschluss ihrer Wachstumsphase gebildet. Drei wesentliche Gruppen mit unterschiedlichen Eigenschaften der Polysaccharide sind dabei zu unterscheiden.

Die erste Gruppe bildet Zellpolysaccharide, die nach ihrer Synthese im Cytoplasma verbleiben. Sie dienen dort als Kohlenstoff- und Energiequelle und sind unabhängig des Nährstoffangebots der Umgebung schnell verfügbar. Als Abgrenzung zwischen Zelle und Umgebung dienen die Polysaccharide der zweiten Gruppe, indem sie einen großen Teil der Zellwand ausbilden. Damit dienen sie dem Schutz vor äußeren Einflüssen und tragen erheblich zur Regulierung des Zelltransports bei. Zugehörige Zellen der letzten Gruppe segregieren die Polysaccharide in das extrazelluläre Umfeld. Durch den Wirkort der Polysaccharide außerhalb des Zellinneren werden diese als Exopolysaccharide, kurz EPS, bezeichnet. Die Exopolysaccharide dienen der Zelle unter anderem als Diffusionsbarriere, Substratspeicher und als Schutz vor Änderungen in der Umgebung, z. B. pH-Variation. Während ihre primäre Funktion im Schutz der Zelle vor äußeren Einflüssen liegt, sind sie zudem auch an der Bildung eines Biofilms beteiligt. Dabei sind die Wechselwirkungen zwischen den EPS-Strukturen und den Zellen selbst entscheidend für die Stabilität des Biofilms. Außerdem ermöglichen die EPS ein Anhaften des Biofilms an dafür geeigneten Oberflächen. Diese Funktion der EPS ergibt für die Zelle einen deutlichen Vorteil, während dieser Effekt in vielen Bereichen als Fouling unerwünscht ist [19, 38, 39].

Aufgrund der vielfältigen Funktion der EPS, unterscheiden diese sich auch in ihrer molekularen Struktur voneinander. Die Bakterienzelle synthetisiert diese als Homopolysaccharide oder Heteropolysaccharide. Homopolysaccharide sind aus einer Vielzahl an Molekülen eines einzigen Monomers aufgebaut, während Heteropolysaccharide aus Molekülen von mindestens zwei unterschiedlichen Monomeren bestehen. Die Synthese von Homopolysacchariden katalysieren Enzyme, welche sich an der Außenseite der Zellwand oder im extrazellulären Umfeld befinden. Dies ist ein essentielles Unterscheidungsmerkmal zu den Zellpolysacchariden, da deren Synthese im Gegensatz zu den Exo-Homo-Polysacchariden innerhalb der Zelle erfolgt. Die tatsächliche Synthese der EPS findet im Vergleich dazu außerhalb der Zelle statt.

Die Enzyme katalysieren dabei selektiv die Polymerisation von Zucker-Monomeren zu einem langkettigen Homopolysaccharid. Welche Art von Monomer als Baustein des EPS-Moleküls Verwendung findet ist folglich von der Art des Enzyms, der Bakterienart und von den bei der Fermentation gegebenen äußeren Einflüssen abhängig. Die Synthese des wohl bedeutendsten Homopolysaccharids Dextran katalysiert das Enzym Dextranase aus dem Monomer Glukose und bildet die charakteristischen EPS der Bakteriengattung *Leuconostoc*, welche zur Familie der Milchsäurebakterien gehören. Ein weiteres kommerziell bedeutendes Homopolysaccharid bakteriellen Ursprungs ist Levan, welches *Bacillus subtilis* aus Saccharose synthetisiert.

Im Vergleich zu Homopolysacchariden ist die Synthese von Heteropolysacchariden deutlich komplexer, wie das Beispiel des bedeutendsten Heteropolysaccharids Xanthan zeigt. Im Wesentlichen unterteilt sich die Synthese in drei Schritte. Die Aufnahme von Einfachzuckern als Monomere durch die Zelle stellt den Beginn des Prozesses dar. Im zweiten Schritt verbinden sie sich zu Pentasaccharid-Untereinheiten und koppeln an einen Lipidtransporter. Im dritten und letzten Schritt erfolgt die Polymerisation der Pentasaccharid-Untereinheiten und die Sekretion in die extrazelluläre Umgebung. Um diese Schritte durchzuführen braucht die Zelle der Gattung *Xanthomonas campestris* eine ausreichende Menge an Monomeren, wie Glukose oder Mannose und Enzyme wie Polymerase und Transferase. Die so synthetisierten Heteropolysaccharide unterscheiden sich stark in ihrem chemischen Aufbau zwischen den einzelnen Bakteriengattungen und selbst zwischen den einzelnen Vertretern der gleichen Art. Dies wird besonders bei der Betrachtung der Molekulargewichte verschiedener Homo- und Heteropolysaccharide deutlich. Dextran zeigt einen sehr breiten Bereich von $1,5 \cdot 10^4$ - $2,0 \cdot 10^7$ Da, während Levan in einem sehr engen Bereich von $1,0 \cdot 10^6$ - $3,0 \cdot 10^6$ Da vorliegt. Xanthan besitzt hohe Molekularmassen von $2,0 \cdot 10^6$ - $5,0 \cdot 10^7$ Da [5]. Dabei können auch zwei Größenfraktionen desselben Polysaccharids von ein und demselben Bakterium synthetisiert werden, welche folglich auch unterschiedliche Eigenschaften aufweisen können. Der chemische Aufbau der Heteropolysaccharide ist entscheidend für die physikalischen und chemischen Eigenschaften, die EPS entwickeln [5, 19, 38, 39].

Der Hauptunterschied der EPS bezüglich ihrer Wirkeigenschaften liegt in der Art der Verbindung zur Zelloberfläche begründet. Liegt eine Bindung der EPS zur Zelloberfläche vor, handelt es sich um kapsuläre EPS. Sind die EPS hingegen frei beweglich im umgebenden Medium, so handelt es sich um freie EPS, die einen schleimigen, klebrigen Charakter aufweisen können. Die Bakterien produzieren sowohl ausschließlich kapsuläre bzw. freie EPS oder auch eine Mischung aus beiden Arten. Aufgrund der hohen Wasserbindungskapazität der EPS ist die kapsuläre EPS-Schicht um die Zelle ein vorteilhafter Schutz gegenüber der Austrocknung. Zudem führt die äußere Polysaccharidschicht durch ihre anionische Ladungscharakteristik zur Bindung von Mineralien und Nährstoffen. Die diffusionsregulierende Wirkung der EPS führt zum Schutz gegen das ungewollte Eindringen bestimmter Moleküle wie Tensiden und Antibiotika ins Zellinnere.

Die Wirksamkeit dieser EPS-Schicht als Diffusionsbarriere und Schutzhülle der Zelle kann mittels Tuschefärbung unter dem Lichtmikroskop zur Visualisierung genutzt werden. In Abbildung 2.9 ist dies beispielhaft an Bakterien, die kapsuläre EPS und freie EPS bilden, gezeigt. Während die Bereiche, die sich mit Tusche anfärben lassen, dunkel erscheinen, sind Bereiche ohne Tuschefärbung hell in der Darstellung. In Abbildung 2.9 (a) sind bakterielle Kokken zu erkennen, die von einer hellen EPS-Schicht umgeben sind. Dabei handelt es sich um kapsuläre EPS, die die Zellen von der Umgebung trennen und deutlich als Diffusionsbarriere das Eindringen von Fremdstoffen in die Zelle verhindern. Im Vergleich, ist in Abbildung 2.9 (b) ein Fermentationsmedium mit freien EPS dargestellt. Hier sind ebenfalls Kokken-Ketten zu erkennen, die dunkel gefärbt sind. Sie sind nicht von einer hellen Schicht umgeben, da die EPS in ihrer freien Form im Medium vorhanden sind. Dabei ist deutlich erkennbar, dass auch freie EPS eine hohe Wasserbindungskapazität besitzen und sich in Koagulat-Strukturen zusammenlagern. Zudem zeigt Abbildung 2.9 (b) dass die freien EPS auch als Verbindungsglied für Zellagglomerate fungieren können. Freie EPS wirken sich auch auf die Eigenschaften des Mediums, wie beispielsweise die Viskosität, aus.

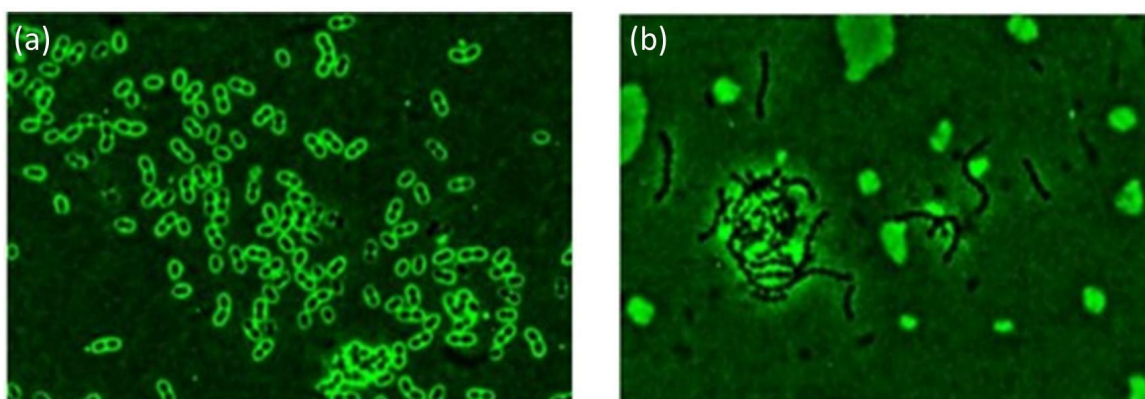


Abbildung 2.9.: Lichtmikroskopische Aufnahmen von *Streptococcus thermophilus* nach Tuschefärbung mit kapsulären EPS (a) und freien EPS (b)

Die Beeinflussung der Viskosität bietet eine potentielle Anwendungsmöglichkeit in Emulsionen der Lebensmittelindustrie, wie Salatdressings oder Saucen. Freie EPS haben je nach Molekulargewicht und Aufbau unterschiedlich starken Einfluss auf die Medienviskosität und können durch ihren schleimigen Charakter zu fadenziehenden Eigenschaften des Mediums führen. Dabei spielt auch der Verzweigungsgrad der EPS-Moleküle eine entscheidende Rolle [5, 19, 38].

Die Menge der produzierten EPS variiert nicht nur innerhalb der Bakterienart, sondern kann sich auch zwischen einzelnen Zellen des gleichen Stammes unterscheiden. Zudem ist sie stark an die gegebenen Fermentationsbedingungen geknüpft. Neben einer ausreichenden Substratversorgung sind auch die Fermentationsbedingungen hinsichtlich Temperatur und pH-Wert entscheidend für die EPS-Produktion. Beispielsweise gibt Donot et al. [19] die produzierte Menge an Xanthan nach 24 h Fermentation von *Xanthomonas campestris* bei pH 7 und 28°C mit $53 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ an. Da Xanthan sehr gut erforscht ist und kommerziell genutzt wird, sind die Produktionsbedingungen für Xanthan optimiert und der Ertrag dementsprechend hoch. Bei weniger gut erforschten und nicht kommerzialisierten Spezies kann die produzierte EPS Menge binnen 24 h auf unter $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ absinken, sodass sehr hohe Anforderungen an die EPS-Extraktion vorliegen, um wirtschaftliche Ergebnisse zu ermöglichen.

Aufgrund der Eigenschaften der Exopolysaccharide auf die Viskosität und die Haptik von Emulsionen und Lösungen ist deren wirtschaftliche Extraktion aus dem Fermentationsmedium zunehmend von Interesse. Sheng, Yu und Li [23] zeigten, dass bereits eine Vielzahl an Methoden zur Extraktion der EPS aus mikrobiellen Kulturen und Schlämmen entwickelt wurden. Es kommen chemische und physikalische Methoden, sowie Kombinationen aus beiden zum Einsatz. Dabei ist nicht nur die prinzipielle Ermöglichung einer Extraktion von Interesse, sondern der Fokus liegt verstärkt auf der Optimierung hinsichtlich Quantität und Qualität der extrahierten EPS. Bei dem Vergleich der Methoden zeigt sich, dass es keine triviale Methode zur Extraktion von EPS gibt und daher eine spezifische Anpassung auf den EPS-Typ erforderlich ist.

Die für die im Rahmen dieser Arbeit zu extrahierenden EPS relevante Methode basiert auf der Labormethode nach Mende et al. [16] und ist in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt. Nach erfolgter Abtrennung der Bakterienzellen in einem Tellerseparator erfolgt eine Ultrafiltration (1) des zellfreien Mediums um eine erste Konzentrierung der EPS zu erreichen. Anschließend findet eine Proteinfällung (2) mit Trichloressigsäure (TCA) statt, um größere Proteine und Zellreste auszufällen. Die Neutralisation (3) mit Natronlauge ist der Diafiltration (4) zur Abtrennung niedermolekularer Substanzen und Salzen vorgeschaltet. Die EPS werden schließlich mit Ethanol gefällt (5) und nach Zentrifugation gefriergetrocknet. Dieses Verfahren legt den Fokus auf die Reinheit der isolierten EPS und erzielt Reinheiten mit $> 90\%$. Allerdings ist dieses Verfahren sehr aufwändig und aus verfahrenstechnischer Sicht nicht wirtschaftlich betreibbar.

Deutliche Vereinfachungen und eine Effizienzsteigerung in den einzelnen Prozessstufen ist essenziell für einen wirtschaftlichen Prozess. Zudem wird in der bisherigen Verfahrensausarbeitung von einem zellfreien Medium ausgegangen. Allerdings stellt gerade die Abtrennung der Zellen aus dem Fermentationsmedium eine Herausforderung dar. Die Eigenschaften der kapsulären EPS-Schicht führen zu Problemen in der Aufarbeitung. Aufgrund der hohen Wasserbindungskapazität reduziert sich die Dichtedifferenz zwischen Zelle und Fermentationsmedium, sodass eine Abtrennung der Zellmasse von der Fermentationsbrühe mit hohen Beschleunigungen im Zentrifugalfeld und hohen Energiekosten verbunden ist. Die Folge ist eine Verminderung der Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen und somit längere Prozesszeiten bei der Abtrennung kommerzieller Bakterien aus dem Fermentationsmedium.

2.2. Partikelbeanspruchung und Messtechnik

Partikel unterliegen bei den verschiedensten Verfahrensschritten zunehmenden Belastungen, wie beispielsweise durch Pumpen oder Rührorganen. Zudem ist die gezielte Einbringung von Scherenergie in ein System in manchen Bereichen erwünscht. In dieser Arbeit wird der Einfluss von Scherung auf die Sedimentationseigenschaften von Bakterienzellen und Sporen betrachtet. Die folgenden Kapitel beschäftigen sich daher mit den Grundlagen der Scherung und deren technischen Anwendung auf Partikelsysteme, sowie mit der Charakterisierung des Effekts der Scherung auf das Partikelsystem hinsichtlich der Partikelgröße.

2.2.1. Scherbeanspruchung

Die Scherbeanspruchung von Partikeln oder Fluidtropfen in einer Suspension, bzw. Emulsion, ist eine gängige verfahrenstechnische Grundoperation und in der Lebensmittelindustrie als Homogenisierung vielfach eingesetzt. Der Begriff stammt aus der Milchindustrie und leitet sich aus dem Wort homogen ab, was in etwa gleichmachend bedeutet. Die Homogenisierung ist somit ein Verfahren, welches eine Vergleichmäßigung der Struktur einer Probe beabsichtigt. Beispielsweise bei der Aufarbeitung von Rohmilch werden Lipid-Tröpfchen durch das Homogenisieren auf eine Tropfengröße $< 1 \mu\text{m}$ zerkleinert [40]. Dies verlangsamt Aufrahmeffekte deutlich, da durch ihre verringerte Größe die Aufrahmgeschwindigkeit eines einzelnen Tropfens reduziert ist. Unerwünschte Effekte wie Koaleszenz treten somit erst zeitlich verzögert auf. Die weiße Farbe der Milch kommt durch Lichtbrechungseffekte an den Grenzflächen zwischen Tropfen und umgebendem Wasser zu Stande. Roach et al. zeigt, dass nach Homogenisierung bei 1000 MPa die Fetttropfen so klein sind, dass die Milch im Bereich des sichtbaren Lichtes als transparent

erscheint [41]. Entscheidend beim Homogenisieren ist das Gleichgewicht zwischen formerhaltender und formverändernder Spannung. Formerhaltende Spannungen resultieren aus Kräften, die an der Grenzfläche zwischen kontinuierlicher und disperser Phase, sowie innerhalb der jeweiligen Phasen, wirken. Die Grenzflächenspannung, sowie die Fließgrenze, beispielsweise zu Beginn der Scherung und die dynamische Viskosität der kontinuierlichen Phase während der Scherung wirken einer Tropfendeformation entgegen. Die Scherbeanspruchung trägt die formverändernde Spannung als Scherenergie in das System ein. Dabei ist die Art der erzeugten Strömung entscheidend für die Zerkleinerung der Tropfen. Ob es zum Aufbruch eines Tropfens kommt, ist abhängig vom Verhältnis zwischen deformierenden und erhaltenden Kräften. Dazu hat sich die Weber-Zahl We als charakteristische Größe etabliert, die nach Walstra und Schubert [42, 43] definiert ist als

$$We = \frac{\sigma \cdot d}{\gamma}, \quad (2.1)$$

wobei σ die am Tropfen angreifenden Scherkräfte darstellt. Die Grenzflächenspannung γ eines Tropfens mit einem Durchmesser d , ist proportional zum Kapillardruck p_K und berechnet sich nach der Young-Laplace-Gleichung zu

$$\gamma = p_K \cdot \frac{d}{4}. \quad (2.2)$$

Je kleiner der Durchmesser eines Tropfens ist, desto mehr Kraft ist zu dessen Verformung nötig. Folglich ist ab einer kritischen Größe d_{krit} die Deformation des Tropfens nur noch durch sehr große äußere Kräfte möglich. Somit kommt es erst ab der Überschreitung von We_{krit} zum Aufbruch des Tropfens. Ein weiterer entscheidender Einflussfaktor ist die Wirkdauer der Belastung auf den Tropfen. Die Wirkdauer, die mindestens benötigt wird, um einen Tropfen aufzubrechen beschreibt Walstra [42] mit

$$t_{krit} = \frac{\eta d}{\sigma - p_K}. \quad (2.3)$$

Somit muss die durch den Homogenisator induzierte Scherspannung hoch genug sein, um We_{krit} zu überschreiten und mindestens so lange auf den Tropfen einwirken, bis t_{krit} erreicht ist. Die Gleichungen 2.1 und 2.2 zeigen, dass bei hohen Scherspannungen eine Überschreitung von We_{krit} wahrscheinlicher ist als bei geringen Scherspannungen und gleichzeitig eine kürzere Wirkdauer zum Aufbruch des Tropfens notwendig ist. Dies legt den Schluss nahe, dass eine

hohe Scherintensität bei kurzer Beanspruchungsdauer denselben Effekt hat, wie eine moderate Scherintensität bei langer Beanspruchungsdauer. Der Energieeintrag zur Scherung der dispersen Phase kann im Wesentlichen durch drei unterschiedliche Scherarten erfolgen. Die verbreitetste Art ist der Energieeintrag durch bewegte Teile, wie es bei Rotor-Stator-Systemen der Fall ist. Diese Geräte weisen hohe Drehzahlen auf, sind kostengünstig in der Investition und Instandhaltung und haben zudem lange Standzeiten, weshalb sie in Labor und Industrie gleichermaßen zu finden sind. Sie sind batchweise als Zahnkranzdispergierer, beispielhaft in Abbildung 2.10 (b) dargestellt, oder quasi-kontinuierlich als Kolloidmühle, in Abbildung 2.10 (a), zu sehen, betreibbar. In einem Rührkessel kann die Homogenisierung auch durch spezielle Rühreranordnung, wie beispielsweise über eine Homogenisierscheibe, erreicht werden. Somit ist auch die Kombination mehrerer Verfahrensschritte, wie Mischen und Emulgieren, in einem Apparat möglich. Die wesentlichen Nachteile dieser Geräte sind die ungleichmäßige Verweilzeit der Partikel im Scherspalt und die daraus resultierenden breiten Partikelgrößenverteilungen. Im Laborbereich bietet sich meist als alternative Methode zum Energieeintrag die Behandlung mit Ultraschall an. Dabei wird die Partikelzerkleinerung über Kavitation erzeugt. Dieses Verfahren ist seit der Entwicklung der Durchströmungszelle, schematisch in Abbildung 2.10 (c) zu sehen, durch Behrend et al. und Bechtel et al. auch kontinuierlich betreibbar [44–46]. Die Grenzen dieser Methoden liegen allerdings bei der begrenzten Reichweite der Schallenergie, sodass diese Methode im industriellen Bereich nicht anwendbar ist [47].

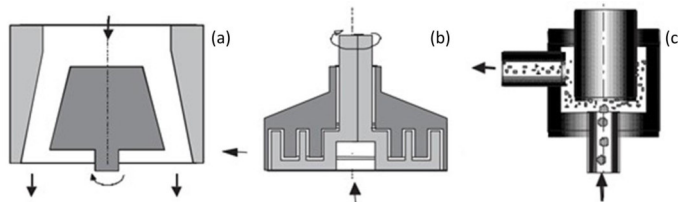


Abbildung 2.10.: Strömungsführung durch eine Kolloidmühle (a), einen Zahnkranzdispergierer (b) und eine Durchströmungszelle (c) nach [47]

Als dritte Möglichkeit Scherenergie in ein System aus disperser und kontinuierlicher Phase einzubringen, ist durch das Verfahren des Hochdruckhomogenisierens zu nennen. Dabei wird über eine Hochdruckpumpe die Energie im System erhöht und über die Homogenisierdüse ans System übertragen. Die Zerkleinerung der Partikel basiert auf der Druckentspannung am Ende der Homogenisierdüse, wobei zwischen den beiden Düsenarten Radialdiffusoren und Gegenstrahl-dispergatoren zu unterscheiden ist. Radialdiffusoren zwingen das Fluid durch einen engen Spalt und können dabei unterschiedliche Geometrien hinsichtlich Ventilsitz und Ventilstempel aufweisen. Beispiele hierfür sind Flachdüsen, Zackendüsen oder Lochblenden. Bei Gegenstrahl-dispergatoren, wie Strahl-dispergator und Microfluidizer, treffen mindestens zwei Fluidströmungen unter

hohem Druck aufeinander. Dies kann auch als Kombination mit zwei Lochblenden erfolgen. Homogenisatoren haben den wesentlichen Vorteil einer kontinuierlichen Betriebsweise, sowie eines gleichmäßigen Energieeintrags ins System. Daraus resultieren enge Partikel- bzw. Tropfengrößenverteilungen und somit ein homogenes Partikelsystem. Ein Überblick über häufig eingesetzte Düsengeometrien ist in Abbildung 2.11 dargestellt.

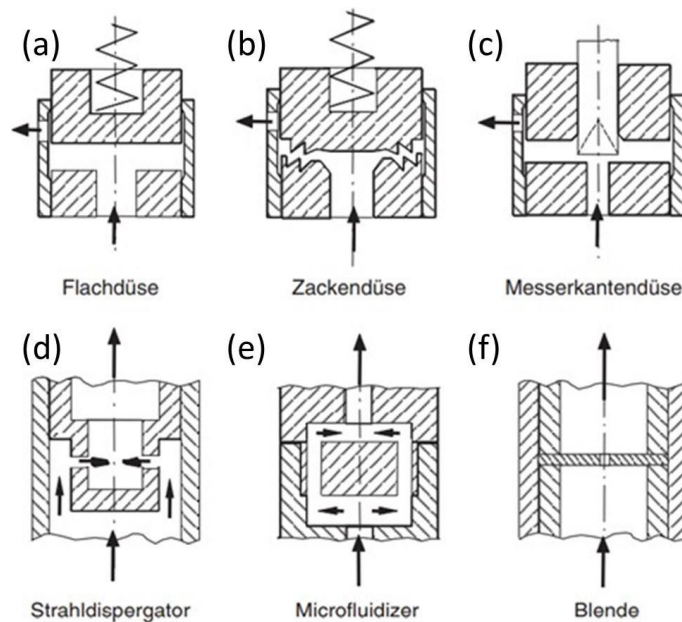


Abbildung 2.11.: Strömungsführung durch eine Flachdüse (a), eine Zackendüse (b), eine Messerkantendüse (c), einen Strahldispersor (d), einen Microfluidizer (e) und eine Lochblende (f) nach [47]

Die Auswirkung der Scherbeanspruchung durch Homogenisierung zeigen Innings et al. am Beispiel der Verformung von Fluidtropfen [48]. Die Zerkleinerung von Reis-Stärke-Agglomeraten konnten Guraya et al. durch Einsatz eines Microfluidizers nachweisen [49].

2.2.2. Partikelmesstechnik

Die Partikelgröße und deren Verteilungsbreite sind in vielen Bereichen der Verfahrenstechnik entscheidend für die Prozesseffizienz, bzw. für die finalen Produkteigenschaften. Dabei hat die Partikelgrößenverteilung eines Produktes sowohl Einfluss auf die spätere Anwendbarkeit, als auch auf die Verarbeitungsweise während der Herstellung des Produktes. Bei Dispersionsfarben ist beispielsweise die Partikelgrößenverteilung entscheidend für die Deckkraft und den Farbton der Farbe, während im Lebensmittelbereich die Partikelgröße einen wesentlichen Einfluss auf

das Aussehen eines Lebensmittels und dessen Haptik hat. Im pharmazeutischen Bereich ist die Partikelgröße des Wirkstoffes beispielsweise bestimmend für dessen Wirkgeschwindigkeit und Löslichkeit. Hierbei spielt besonders die spezifische Oberfläche, die im direkten Zusammenhang mit der Partikelgröße steht, eine entscheidende Rolle bezüglich des Instantisierungsverhaltens bei der Lösung des Produktes in Wasser.

Hinsichtlich der Produktformulierung beeinflusst die Partikelgrößenverteilung maßgeblich die Rieselfähigkeit, das Sedimentationsverhalten und die Haftmechanismen eines Partikelsystems. Der Verarbeitungs- und Aufarbeitungsprozess selbst beeinflusst ebenfalls die Partikelgrößenverteilung. Es kann dabei zu deutlichen Änderungen in der Verteilungsbreite und Verteilungsdichte kommen, sodass auch die Eigenschaften des Partikelsystems sich ändern können. Aus diesen Gründen ist die Partikelmesstechnik ein essenzielles Werkzeug in der Verfahrenstechnik, um Materialeigenschaften und prozessbedingte Einwirkungen zu erfassen und zu beurteilen. Eine Partikelgrößenverteilung umfasst die Gesamtmenge der Partikel und betrachtet diese nach Größe sortiert, wobei den jeweiligen Partikelgrößen die entsprechenden Mengenanteile zugeordnet sind. Zur graphischen Darstellung ist die Partikelgröße x in Abhängigkeit der Mengenanteile Q aufgetragen. Dabei sind grundsätzlich zwei Auftragungsformen zu unterscheiden. Im Fall der Summenverteilung $Q_r(x_i)$ sind die Mengenanteile, welche unter einer bestimmten Partikelgröße x_i liegen als Teil der Gesamtmenge aufgetragen. Es ergibt sich der Zusammenhang

$$Q_r(x_i) = \frac{\text{Teilmenge } x_{min} \text{ bis } x_i}{\text{Gesamtmenge } x_{min} \text{ bis } x_{max}}. \quad (2.4)$$

Diese Art der Verteilung gibt an, wie viele Partikel der Gesamtmenge kleiner als eine Referenzpartikelgröße x_i sind. Ist hingegen die Teilmenge innerhalb eines bestimmten Größenintervalls auf die Intervallbreite bezogen, liegt eine Dichtenverteilung $q_r(x_i)$ vor. Diese bildet die Ableitung der Summenverteilung und zeigt die Häufigkeit einer Partikelfraktion innerhalb der Gesamtmenge. Die Dichteverteilung wird beschrieben als

$$q_r(x_i) = \frac{\text{Teilmenge } x_{i-1} \text{ bis } x_i}{\text{Gesamtmenge} \cdot \text{Intervallbreite}}. \quad (2.5)$$

In Abbildung 2.12 sind eine Summenfunktion und die zugehörige Verteilungsdichtefunktion dargestellt. Per Definition gilt für beide Funktionen Q_r , bzw. q_r von $x < x_{min} = 0$, während für die Summenfunktion $Q_r(x > x_{max}) = 1$ und für die Verteilungsdichtenfunktion $q_r(x > x_{max}) = 0$

gilt. Der Wendepunkt der Summenverteilung Q_r markiert gleichzeitig das Maximum der Verteilungsdichte q_r und zeigt somit die Partikelfraktion, welche am häufigsten in der Gesamtmenge vorkommt. Dieser Wert kann als Modalwert x_M zur Charakterisierung der gesamten Verteilung in Kombination mit der Verteilungsbreite $x_{max} - x_{min}$ dienen. Ein weiterer typischer Wert zur Charakterisierung eines Partikelkollektivs ist der Medianwert x_{50} , welcher angibt, dass 50 % der Partikel kleiner sind als die angegebene Partikelgröße. Zur Charakterisierung der Verteilungsbreite kann der Span-Wert angegeben werden, welcher sich wie folgt berechnet:

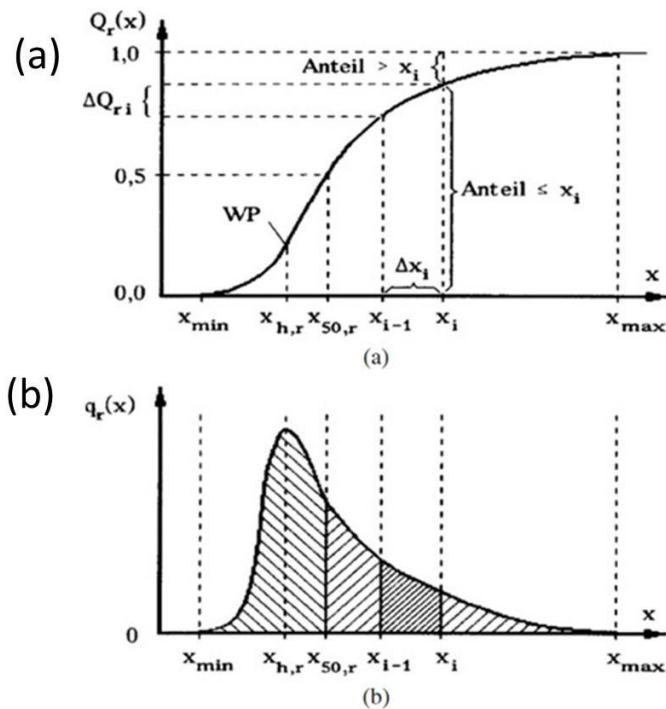


Abbildung 2.12.: Summenverteilung $Q_r(x_i)$ (a) und die zugehörige Verteilungsdichtenfunktion $q_r(x_i)$ (b) mit Kennzeichnung wichtiger Parameter [50]

$$Span = \frac{(x_{90} - x_{10})}{x_{50}}. \quad (2.6)$$

Die mittlere Partikelgröße \bar{x}_r berücksichtigt die zugehörigen Mengenanteile $\frac{\Delta\mu_i}{\mu_{ges}}$ der jeweiligen Partikelgröße in Bezug auf die Gesamtmenge und berechnet sich wie folgt:

$$\bar{x}_r = \sum_{i=1}^n \bar{x}_i \cdot \frac{\Delta\mu_i}{\mu_{ges}} = \sum_{i=1}^n \bar{x}_i \cdot q_{r,i} \cdot \Delta x_i = \sum_{i=1}^n \bar{x}_i \cdot \Delta Q_{r,i}. \quad (2.7)$$

Dieser Wert liegt im Beispiel von Abbildung 2.12 zwischen dem Modalwert und dem Medianwert. Bisher wurde die allgemeine Form der Summenverteilung und der Dichteverteilung beschrieben. Hinsichtlich des angewendeten Messverfahrens unterscheiden sich diese Verteilungen anhand ihrer Indizierung. Der Index r bezeichnet für beide Verteilungsformen die zugrundeliegende Mengenart, charakterisiert durch das Messverfahren. Der Index $r = 0$ bezeichnet die Anzahlverteilung. Diese findet Anwendung bei Zählverfahren, wie beispielsweise im Falle des Coulter-Counter-Verfahrens. Der Index $r = 2$ bezeichnet die Flächenverteilung und bezieht sich auf die Projektionsfläche der Partikel, sodass diese Verteilungsart bei der Analyse mit bildgebenden Verfahren resultiert. In der Partikelmesstechnik spielt die Volumen- oder Massenverteilung mit dem Index $r = 3$ ebenfalls eine sehr wichtige Rolle und wird hauptsächlich bei gravimetrischen Verfahren, wie Siebung oder Sinkgeschwindigkeit, erhalten. Zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung steht eine Vielzahl an Analysenverfahren zur Verfügung, welche sich in der Art der Messmethodik unterscheiden und grob in

- Siebverfahren
- Sedimentationsverfahren
- Optische Verfahren
- Analyseverfahren für Partikelgrößen im Nanometerbereich
- Staubmesstechnik
- Oberflächenverfahren

einteilen lassen [50, 51].

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf den Sedimentationsverfahren und der Bestimmung der Partikelgröße über die Sedimentation im Zentrifugalfeld. Dieses Messverfahren ist gut geeignet für anorganische Partikel, welche bereits in einem Fluid dispergiert sind und eine möglichst hohe Dichtedifferenz zwischen Partikel und Fluid aufweisen. Als Analysegerät kam dabei eine Scheibenzentrifuge zum Einsatz, welche die Partikelgröße indirekt über die Sedimentationsgeschwindigkeit bestimmt. Die Partikel sedimentieren in einem definierten Fluid innerhalb einer rotierenden, vertikal orientierten Scheibe. An deren äußerem Ende befindet sich ein Laser, dessen Intensität auf der gegenüberliegenden Seite detektiert wird. Dieser erkennt, sobald ein Partikel

den Laserstrahl abschwächt und über die Koppelung von Intensitätsverlauf und Messzeit, kann nach Kalibrierung durch einen Partikelstandard, die Berechnung der Partikelgröße nach

$$x = \sqrt{\frac{18 \cdot \eta_F}{(\rho_P - \rho_F) \cdot t_{sed}} \cdot \ln \frac{R_l}{R_0}} \quad (2.8)$$

erfolgen. Die Partikelgröße ist dabei von der Sedimentationszeit des Partikels t_{sed} , der Dichtedifferenz zwischen Partikel ρ_P und Fluid ρ_F , der Viskosität des Fluides η_F , sowie dem Verhältnis aus radialer Position des Detektors R_l und der Probenaufgabe R_0 , abhängig. Der Nachteil dieser Analysenmethode liegt in der sich ändernden Feststoffdichte begründet. Die in dieser Arbeit betrachteten Bakterienzellen bilden Exopolysaccharide aus, die sich als gelartige Schicht um die Zellen legen. Durch eine Scherung der Zellen kann diese Schicht von der Zelloberfläche entfernt werden, weshalb sich die relative Dichte der Zelle erhöht. Dies hat zur Folge, dass die Zellen trotz eher kleinerer Partikelgröße schneller sedimentieren als zuvor, weshalb die Partikelgrößenanalyse die Partikel größer darstellt, als sie tatsächlich sind. Aus diesem Grund wird im Rahmen dieser Arbeit die Partikelgröße als „scheinbare Partikelgröße“ betrachtet.

2.3. Grundlagen der Sedimentation

2.3.1. Sedimentation im Erdschwerefeld

Ein einzelnes Partikel erfährt in einem ruhenden Fluid eine Auftriebskraft F_A , welche der Gewichtskraft des Partikels F_G entgegenwirkt. Im Falle eines Kräftegleichgewichts zwischen F_G und F_A bleibt das Partikel in seiner Position und befindet sich im Schwebezustand. Ist die Gewichtskraft F_G größer als der Auftrieb F_A , bewegt sich das Partikel in Richtung des Erdschwerefeldes g . Das Partikel sedimentiert.

Ist im Vergleich der Auftrieb des Partikels größer als seine Gewichtskraft bewegt sich das Partikel in entgegengesetzter Richtung des Erdschwerefeldes und rahmt auf. In beiden Fällen des Ungleichgewichts von F_G und F_A induziert die Bewegung des Partikels die Widerstandskraft F_W , welche der Bewegungsrichtung des Partikels entgegengerichtet ist. Abbildung 2.13 veranschaulicht die Wechselwirkung der drei ausschlaggebenden Kräfte auf das Partikel am Beispiel einer sedimentierenden Kugel.

Für ein sedimentierendes, kugelförmiges Partikel in einem ruhenden Fluid gilt der Zusammenhang

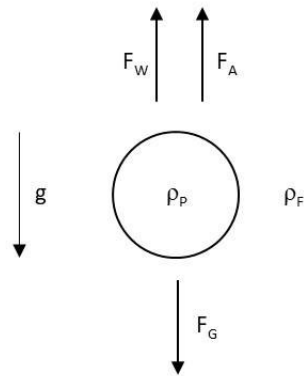


Abbildung 2.13.: Kräftegleichgewicht eines sedimentierenden, kugelförmigen Partikels im Erdschwerefeld

$$F_G = F_A + F_W. \quad (2.9)$$

Das Produkt aus Partikelvolumen V_P , in diesem Fall als Kugelvolumen V_K und Erdbeschleunigung g geht sowohl in die Berechnung der Gewichtskraft

$$F_G = V_K \cdot \rho_K \cdot g, \quad (2.10)$$

als auch in die Berechnung der Auftriebskraft

$$F_A = V_K \cdot \rho_F \cdot g \quad (2.11)$$

ein. Der Unterschied zwischen den beiden Kräften ist die beeinflussende Dichte. Während die Gewichtskraft durch die Partikeldichte ρ_P , bzw. in diesem Fall ρ_K , beeinflusst wird, ist für den Auftrieb die Fluiddichte ρ_F entscheidend. Da für eine Sedimentation die Gewichtskraft größer sein muss als der Auftrieb gilt gemäß Gleichung 2.10 und 2.11

$$\rho_K > \rho_F \quad (2.12)$$

Die aus der Bewegung des Partikels resultierende Widerstandskraft F_W berechnet sich nach

$$F_W = \frac{\rho_F}{2} \cdot c_W \cdot v_{ST}^2 \cdot A. \quad (2.13)$$

Zusätzlich zur Fluidichte ρ_F , der Sinkgeschwindigkeit des Partikels nach Stokes v_{ST} und der angeströmten Querschnittsfläche des Partikels A , wird die Widerstandskraft durch den dimensionslosen Widerstandsbeiwert c_W bestimmt. Dieser ermöglicht die Berücksichtigung des Strömungswiderstand des Partikels, welcher durch die geometrischen Partikeleigenschaften, wie Form, Oberflächenrauigkeit, etc., und die Art der Umströmung des Partikels durch das Fluid bestimmt ist. Abbildung 2.14 zeigt den Einfluss von Partikelform, Rauheit und Umströmungsbedingungen auf den c_W -Wert am Beispiel eines umströmten Zylinders, einer umströmten Kugel und einer umströmten Scheibe.

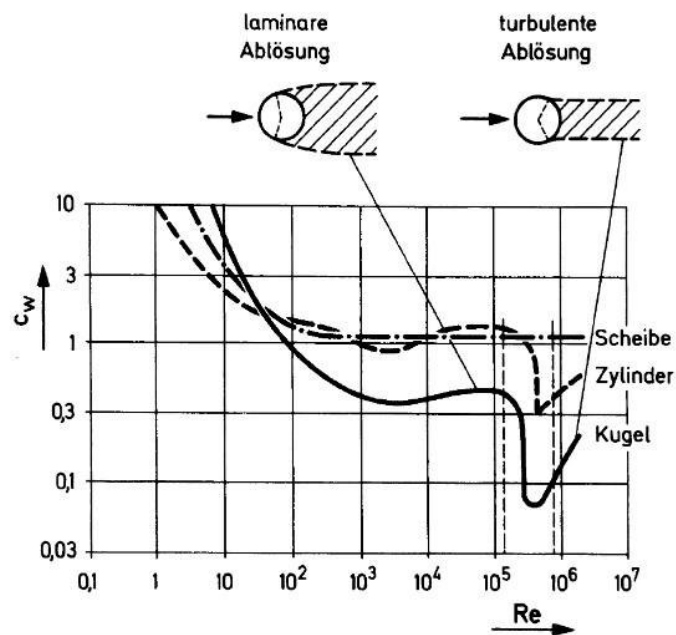


Abbildung 2.14.: Einfluss der Oberflächenrauigkeit und der Reynoldszahl der Partikelumströmung auf den c_W -Wert eines umströmten Zylinders, einer umströmten Kugel und einer umströmten Scheibe [52]

Kürten et. al. stellten für eine Kugel mit glatter Oberfläche mehrere Näherungsgleichungen für die Berechnung des c_W - Wertes in Abhängigkeit der Reynoldszahl im Bereich von $Re \approx 0$ bis $Re = 10^5$ auf [53]. Die Reynoldszahl

$$Re = \frac{v \cdot d}{\nu} \quad (2.14)$$

bezieht das Produkt aus Partikelgeschwindigkeit v und Durchmesser d der angeströmten Fläche auf die kinematische Viskosität ν des Fluids. Sie setzt somit die Trägheitskräfte der Strömung, die sich auf das Partikel auswirken mit den Zähigkeitskräften des Fluids in Relation. Die Reynolds-Zahl gibt zudem Aufschluss über die vorhandenen Strömungsbedingungen. In Abhängigkeit der betrachteten Durchströmungsgeometrie ist zu unterscheiden, ob eine laminare Schichtenströmung oder eine turbulente Wirbelströmung vorliegt.

Da es sich im Rahmen dieser Arbeit um wasserbasierte Fermentationsmedien handelt, wird zur Abschätzung der zu erwartenden Reynoldszahl eine kinematische Viskosität in der Größenordnung von $\nu_F = 1 \cdot 10^{-6} m^2 \cdot s^{-1}$ angenommen. Die Partikeldurchmesser der Bakterien belaufen sich auf wenige μm , siehe 3.1, sodass für den Partikeldurchmesser ein maximaler Wert von $d = 1 \cdot 10^5 m$ erwartbar ist. Als Grundlage dient die Annahme, dass es sich um kugelförmige Partikel handelt. Aufgrund der geringen Dichtedifferenz zwischen Bakterien und Fermentationsmedium sind für die Sinkgeschwindigkeit v_{ST} Werte bis maximal $v = 1 \cdot 10^{-3} ms^{-1}$ zu erwarten. Somit sind Reynoldszahlen bis maximal $Re = 0,01$ zu betrachten, weshalb nach Kürten bei Reynoldszahlen $Re < 0,2$ der Zusammenhang

$$c_W = \frac{24}{Re} \quad (2.15)$$

gilt. In Kombination mit den Gleichungen 2.9, 2.10 und 2.14 ergibt sich die Sinkgeschwindigkeit einer Kugel, mit dem Durchmesser d und glatter Oberfläche, nach Stokes zu

$$v_{ST} = \frac{(\rho_K - \rho_F) \cdot d^2 \cdot g}{18 \cdot \eta_F} \quad (2.16)$$

Im Vergleich zu den bisherigen Gleichungen wird die kinematische Viskosität ν durch die dynamische Viskosität des Fluids η_F und die Dichte ρ_F ersetzt. Gleichung 2.16 zeigt, dass die Sinkgeschwindigkeit proportional zum Quadrat der Größe des sedimentierenden Partikels ist und somit den größten Einfluss auf die Sedimentationsgeschwindigkeit des Partikels hat. Daher ist bei Abweichungen zur Kugelform dem Partikel ein Äquivalentdurchmesser zugeordnet, welcher dem

Durchmesser einer glatten Kugel gleicher Sinkgeschwindigkeit entspricht. Hierzu wird Gleichung 2.16 umgeformt zu

$$d_{ST} = \sqrt{\frac{18 \cdot \eta}{(\rho_P - \rho_F) \cdot g} \cdot v_{ST}}. \quad (2.17)$$

Das Verhältnis zwischen dem tatsächlichen Durchmesser und dem Äquivalentdurchmesser ergibt sich über die Sphärizität Ψ , welche Stieß als Verhältnis der Oberfläche einer volumengleichen Kugel zur tatsächlichen Partikeloberfläche [50]

$$\Psi = \frac{\text{Oberfläche der volumengleichen Kugel}}{\text{tatsächliche Partikeloberfläche}} = \frac{d_V^2 \cdot \pi}{S} = \left(\frac{O_P}{d_S}\right)^2 \quad (2.18)$$

beschreibt. Wie Gleichung 2.18 zeigt, kann die Sphärizität Ψ auch als quadratisches Verhältnis aus dem Durchmesser der volumengleichen Kugel d_V und dem Durchmesser der oberflächengleichen Kugel d_S ausgedrückt werden. Dabei gilt

$$d_V = \sqrt[3]{\frac{6 \cdot V_P}{\pi}} \quad (2.19)$$

und

$$d_S = \sqrt{\frac{O_P}{\pi}}, \quad (2.20)$$

wobei V_P das tatsächliche Partikelvolumen und S_P die tatsächliche Partikeloberfläche repräsentieren.

Als weiterer Einflussfaktor auf die Sinkgeschwindigkeit eines Partikels ist laut Gleichung 2.16 das Verhältnis aus Dichtedifferenz von Partikel und Fluid zur dynamischen Viskosität des Fluids zu betrachten. Bei konstant angenommener Partikeldichte kann für newtonsche Fluide durch eine Erhöhung der Temperatur ein Absinken der Fluidichte und -viskosität erzwungen werden,

sodass die Sinkgeschwindigkeit des Partikels ansteigt. Durch Absenken der Fluidtemperatur resultiert der gegenteilige Effekt. Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Sinkgeschwindigkeit eines Partikels ist laut Gleichung 2.16 die Erhöhung der auf ihn wirkenden Beschleunigung. Dies geschieht bei der Sedimentation im Zentrifugalfeld, da durch die schnell rotierenden Zentrifugen eine deutlich höhere Beschleunigung im Vergleich zur Erdbeschleunigung realisierbar ist.

2.3.2. Sedimentation von konzentrierten Suspensionen

Die in Kapitel 2.3.1 erläuterten Grundlagen der Sedimentation beziehen sich auf ein kugelförmiges Einzelpartikel und können in erster Näherung auch auf kugelförmige Partikel in stark verdünnten Suspensionen angewandt werden. Da die Abstände zwischen den Partikeln in diesem Fall sehr groß sind, hat die durch das sedimentierende Partikel verdrängte Fluidmenge keine Auswirkung auf die Sedimentation eines benachbarten Partikels.

Der Fall eines sedimentierenden Einzelpartikels und geringen Partikelkonzentrationen ist allerdings eine Ausnahme und daher hauptsächlich im wissenschaftlichen Kontext diskutiert. Bei der Betrachtung von realen, industriellen Prozessen liegen meist deutlich höhere Partikelkonzentrationen in Suspensionen vor, sodass es hierbei zur gegenseitigen Beeinflussung der Partikel beim Sedimentieren kommen kann. Zudem weicht die Partikelform häufig von der Kugelgeometrie ab und die Partikelgröße und Form der einzelnen Partikel innerhalb eines Partikelkollektivs sind meist inhomogen. Während der Einfluss der Partikelform durch den Äquivalentdurchmesser, also den angeströmten Durchmesser, berücksichtigt wird, sind die Partikelkonzentration und der Einfluss der Partikelgrößenverteilung ebenfalls zu betrachten.

Im Vergleich zu gering konzentrierten Suspensionen verringern sich die Abstände zwischen den einzelnen Partikeln mit zunehmender Partikelkonzentration deutlich. Durch lokale Konzentrationsunterschiede können sich in Bereichen hoher Partikelkonzentration Cluster bilden, die aufgrund eines geringeren Sedimentationswiderstandes, bzw. einer integral höheren Partikelgröße, schneller sedimentieren als ein Einzelpartikel nach Stokes. Bei einer solchen gegenseitigen Beeinflussung der Partikel, liegt die sogenannte Schwarmsedimentation vor. Nimmt die Partikelkonzentration weiter zu, reduziert sich die Sedimentationsgeschwindigkeit wieder und kann deutlich unter die Sedimentationsgeschwindigkeit eines Einzelkorns nach Stokes absinken. Dieses Verhalten nennt sich Zonensedimentation.

Gleiß zeigt diesen Zusammenhang zwischen Partikelkonzentration und dem Verhältnis der tatsächlichen Sinkgeschwindigkeit zur theoretischen Sinkgeschwindigkeit nach Stokes [54]. In Abbildung 2.15 sind die verschiedenen Zonen als Zusammenstellung der Arbeiten von Kaye, Bhattu und John dargestellt [55–57].

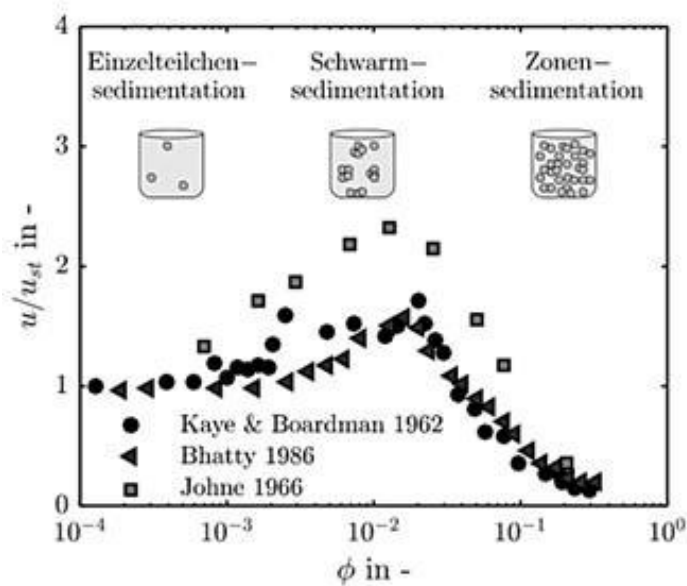


Abbildung 2.15.: Einfluss der Feststoffkonzentration einer Suspension auf die nach Stokes normierte Sinkgeschwindigkeit [54]

Im Bereich der Einzelkornsedimentation sedimentieren die Partikel vorrangig in Abhängigkeit ihrer eigenen Größe. Mit zunehmender Partikelkonzentration geht diese in die Schwarm-sedimentation über. Einzelpartikel agglomerieren zu Partikelclustern und sedimentieren nicht mehr in Abhängigkeit ihrer eigenen Größe, sondern der Cluster-Größe. Damit ergibt sich eine erhöhte Sinkgeschwindigkeit. Gleichzeitig sedimentieren Cluster unterschiedlicher Größe auch unterschiedlich schnell. Ein Cluster verhält sich sinngemäß wie ein Einzelkorn. Erhöht sich die Partikelkonzentration weiter, tritt die Schwarm-sedimentation ein. Hier können Partikel ebenfalls Clustern, sie müssen es allerdings nicht zwangsläufig. Die Abstände zwischen benachbarten Partikeln nimmt deutlich ab und sedimentierende Partikel beeinflussen sich durch die Wechselwirkung mit dem umgebenden Fluid gegenseitig. Daher ist in diesem Fall eine klare Sedimentationsfront zu erkennen. Partikel sedimentieren folglich nicht mehr nach ihrer oder der Cluster-Größe, sondern in Abhängigkeit des gesamten Kollektivs.

Ab welcher Konzentration, welche der beiden Sedimentationsarten vorliegt, ist sowohl von den Wechselwirkungen der Partikel untereinander, als auch von den Massekräften durch die Zentrifugation abhängig [51]. Nach Beiser begünstigt ein schwächeres Zentrifugalfeld bei sehr hohen Partikelkonzentrationen die Zonensedimentation, während hohe Massenkräfte und geringere Konzentrationen die Schwarm-sedimentation begünstigen [58].

Ein sehr geläufiger Ansatz zur Berücksichtigung der Partikelkonzentration bei der Sedimentationsgeschwindigkeit kugelförmiger Partikel ist ein auf experimentellen Studien basierender Ansatz

von Richardson und Zaki [59]. Wie Gleichung 2.21 zeigt, handelt es dabei um einen Potenzansatz, welcher die Sedimentation des Trennsiegels eines monodispersen Partikelkollektivs über

$$v = v_{ST} \cdot (1 - \phi)^{n_{RZ}} \quad (2.21)$$

beschreibt. Die Sinkgeschwindigkeit v ergibt sich dabei aus der Sinkgeschwindigkeit eines Einzelpartikels nach Stokes v_{ST} , der Feststoffkonzentration ϕ und dem empirisch ermittelten Parameter n_{RZ} , welcher bei Reynoldszahlen von $Re < 0,2$ einen Wert $n_{RZ} = 4,65$ einnimmt. Somit reduziert sich die Sinkgeschwindigkeit nach Stokes zunehmend, je höher die Partikelkonzentration der Suspension vorliegt. Da Feststoffpartikel auch einen Einfluss auf die Fließeigenschaften eines Fluids haben, erweiterten Ekdawi und Hunter [60] den Ansatz von Richardson und Zaki unter der Annahme von lokalen Dichte- und Viskositätsänderungen aufgrund der Partikelkonzentration folgendermaßen:

$$v = v_{ST} \cdot (1 - \phi)^2 \cdot \left(1 - \frac{\phi}{\phi_{max}}\right)^{\eta_i \cdot \phi_{max}}. \quad (2.22)$$

ϕ_{max} bezeichnet die maximale Packungsdichte der Partikel bei gegebener Konzentration und der Exponent wird durch die intrinsische Viskosität η_i erweitert, welche bei kugelförmigen Partikeln einen Wert von 2,5 annimmt.

2.3.3. Sedimentation im Zentrifugalfeld

Die auf ein kugelförmiges Partikel im Zentrifugalfeld wirkenden Kräfte sind in Abbildung 2.16 dargestellt.

Analog zur Sedimentation im Erdschwerefeld ergibt sich die Sedimentationsgeschwindigkeit eines Partikels im Zentrifugalfeld aus dem Kräftegleichgewicht zwischen der Auftriebskraft des Partikels F_A , der Widerstandskraft F_W und der Gewichtskraft des Partikels im Zentrifugalfeld F_{ZF} . Die Gewichtskraft des Partikels muss im Vergleich zum Erdschwerefeld um die Schleuderziffer C erweitert werden. Die Schleuderziffer

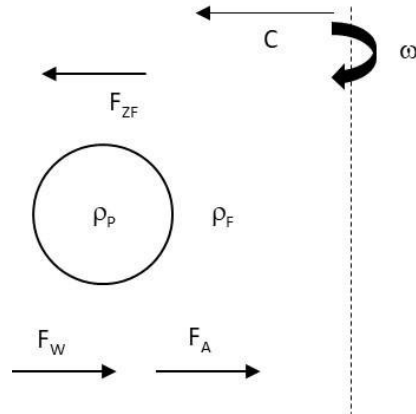


Abbildung 2.16.: Kräftegleichgewicht eines sedimentierenden, kugelförmigen Partikels im Zentrifugalfeld

$$C = \frac{\omega^2 \cdot r}{g} \quad (2.23)$$

beschreibt das Verhältnis zwischen Zentrifugal- und Erdbeschleunigung. Sie hängt im Wesentlichen von der Winkelgeschwindigkeit ω ab, welche über

$$\omega = 2 \cdot \pi \cdot n \quad (2.24)$$

mit der Drehzahl n der Zentrifuge verknüpft ist. Der Radius r gibt den Abstand zur Rotationsachse der Zentrifuge wieder. Dadurch ist die Schleuderziffer ortsabhängig und steigt, je weiter das Partikel sich von der Rotationsachse entfernt. Im Zentrifugalfeld ändert sich Gleichung 2.16 somit zu

$$v_0 = \frac{(\rho_K - \rho_F) \cdot x^2 \cdot C \cdot g}{18 \cdot \eta} \quad (2.25)$$

Zentrifugen lassen sich anhand ihrer Bauart und damit auch Sedimentationsrichtung unterscheiden. Während Partikel in der Vertikalzentrifuge horizontal in Richtung des Zentrifugengehäuses

beschleunigt werden, ist die Sedimentationsrichtung in Horizontalzentrifugen vertikal ausgerichtet. Vertikalzentrifugen kommen in der Regel bei der filtrierenden Zentrifugation zum Einsatz, wohingegen Horizontalzentrifugen im industriellen Umfeld deutlich weiter verbreitet sind. Dies liegt vor allem an der guten Zugänglichkeit des Verfahrensraums, sowie den weiteren Maschinenteilen. Zudem ist eine Entleerung des Feststoffes im Vergleich zur Vertikalzentrifuge, bei welcher sie über Kopf erfolgt, deutlich praktikabler [61]. Die Zentrifugalbeschleunigung ist in der Regel um ein Vielfaches größer als die Erdbeschleunigung mit $C > 100$, sodass bei kleinen Partikeln der Einfluss der Sedimentation in vertikaler Richtung durch die Erdbeschleunigung vernachlässigbar ist.

2.3.4. Sedimentbildung im Zentrifugalfeld

Die Struktur und Packungsdichte eines im Zentrifugalfeld gebildeten Sediments ist hauptsächlich von partikulären Eigenschaften wie Partikelgröße, Partikelform, sowie interpartikulärer Wechselwirkungen abhängig. Die maximale Sedimenthöhe ergibt sich dabei aus der Partikelkonzentration in der Suspension und der Porosität des Sediments bei festen Randbedingungen. Die Sedimenthöhe von inkompressiblen Partikelschichten oder Partikeln ist in der Theorie unabhängig von den Parametern wie Beschleunigung oder äußerer Krafteinwirkung. In der Realität bildet der Großteil aller Partikelsysteme mehr oder minder kompressible Haufwerke aus. Vor allem organische Partikel neigen zur Ausbildung eines kompressiblen Sediments, sodass eine höhere Zentrifugalbeschleunigung oder auch ein erhöhter Pressdruck auf das Partikelsediment maßgeblich zur Sedimenthöhe und -struktur des Haufwerks beitragen. Mögliche Ursachen für die Ausbildung eines kompressiblen Sediments sind in Abbildung 2.17 zusammengefasst.

Abbildung 2.17 (a) demonstriert dabei die Umlagerung von Partikeln, also eine Neuordnung des Partikelhaufwerks, die aufgrund einer Druckerhöhung resultieren. Außerdem können die Wechselwirkungen zwischen den Partikeln verändert, eine Partikelverformung durch deren elastische Eigenschaften, sowie die Materialfestigkeit der Partikel überschritten werden. Die genannten Mechanismen hängen stark von den Partikeleigenschaften, sowie den Eigenschaften des Kollektivs im Zusammenspiel ab. Während Materialeigenschaften wie Elastizität und Materialfestigkeit vor allem die Verformung der Partikel beeinflusst, sind Oberflächenladungen und Wechselwirkungen zu chemischen Komponenten an der Oberfläche benachbarter Partikel ebenfalls ein entscheidender Grund für Änderungen in der Haufwerksstruktur bei erhöhter Krafteinwirkung.

Um das kompressible Verhalten eines Sediments beschreiben zu können, wird der auf das Sediment wirkende Feststoffgerüstdruck betrachtet. In der Literatur existiert bereits eine Vielzahl an Modellen, welche die Anpassung experimenteller Daten für den Feststoffgerüstdruck als Funktion der Feststoffkonzentration thematisieren [63–67].

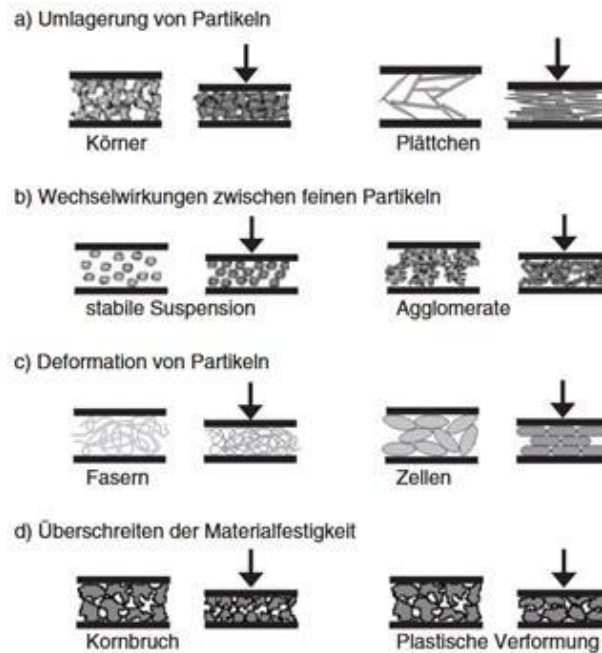


Abbildung 2.17.: Mögliche Ursachen für kompressibles Verhalten eines Sediments [62]

Auf den Boden der Zentrifuge wirken zwei unterschiedliche Drücke. Zum einen der Druck durch die hydrostatische Flüssigkeitssäule, sowie der Feststoffgerüstdruck. Im Allgemeinen berechnet sich der hydrostatische Druck p_h über

$$p_h = p_0 + \rho_F \cdot g \cdot h \quad (2.26)$$

mit dem Umgebungsdruck p_0 , der Flüssigkeitsdichte ρ_F , der Erdbeschleunigung g und der Füllhöhe des Fluids h . Im Zentrifugalfeld wird Gleichung 2.26 mit der Schleuderziffer C erweitert. Durch die Ortsabhängigkeit der Schleuderziffer C ist die Integration

$$p = p_0 + \rho_F \cdot \frac{\omega^2 \cdot g}{g} \cdot \int_R^{r_M} r \cdot dr \quad (2.27)$$

von r innerhalb der Grenzen R und r_M notwendig. Abbildung 2.18 zeigt schematisch die einzelnen Positionen der sedimentierten Suspension im Zentrifugalfeld. R markiert den Abstand

zwischen Rotorachse und Küvettenboden, während r_M den Abstand des Flüssigkeitsmeniskus zur Rotationsachse der Zentrifuge wiedergibt. r_s stellt den Abstand zwischen Rotorachse und Sedimentoberfläche dar, während p_0 den Umgebungsdruck angibt.

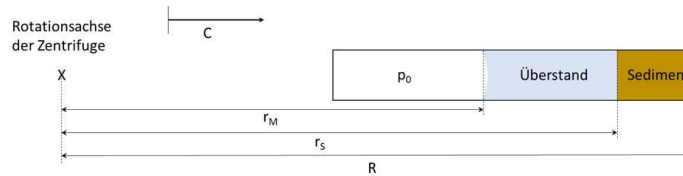


Abbildung 2.18.: Ortsabhängigkeit von r in der horizontalen Analysenzentrifuge LUMiSizer

Nach Integration und Vereinfachung berechnet sich der hydrostatische Druck am Boden p_B nach Stahl [61] zu

$$p_B = p_0 + \rho_F \cdot \frac{\omega^2}{2} \cdot (r_s^2 - r_M^2). \quad (2.28)$$

Während sich die Flüssigkeitssäule am Boden abstützt, wirkt auf das Sediment an unterschiedlichen Höhen durch die darüber liegenden Partikelschichten ein Feststoffgerüstdruck. Dieser ist abhängig vom Abstand zur Rotorachse, der Dichtedifferenz zwischen Fluid und Partikeln, sowie dem Feststoffvolumenanteil ϕ . Er lässt sich in einer definierten Schicht i im Sediment zu

$$p_{s,i} = (\rho_s - \rho_F) \cdot \phi_i \cdot \omega^2 \cdot (R^2 - R_i^2). \quad (2.29)$$

berechnen [54, 68]. Anhand der Gleichung wird deutlich, dass der Feststoffgerüstdruck in einer Schicht im Laufe der Kompression weiter zunimmt, da bei sonst gleichen Parametern der Feststoffvolumenanteil zunimmt. Daraus ergibt sich für die Kompression des Sediments ein exponentielles Verhalten.

2.3.5. Funktionsprinzip des Tellerseparators

Tellerseparatoren gehören zu den Vollmantelzentrifugen und trennen eine, oder mehrere disperse Phasen von der kontinuierlichen Phase. Dabei beruht das Trennprinzip auf der Dichtedifferenz zwischen disperser und kontinuierlicher Phase. Die Separation der dispersen Phase erfolgt im

Inneren der Trommel, welche unter anderem als Vollmanteltrommel oder selbstentleerende Trommel ausgeführt sein kann. Tellerseparatoren erreichen Schleuderziffern von etwa $20.000 \times g$ und damit wesentlich höhere Werte im Vergleich zu Dekantern oder Filterzentrifugen. Durch die hohe Zentrifugalbeschleunigung in Verbindung mit gut prozessierbaren Feststoffkonzentrationen von unter 10 % bildet der Tellerseparator mit selbstentleerer Trommel die idealen Voraussetzungen zur Separation von biologischen Partikelsystemen [69, 70].

In der Trommel des Tellerseparators befindet sich ein Tellerstapel aus mehreren übereinander angeordneten Tellern, wie in Abbildung 2.19 (a) dargestellt. Die Abscheidung der Partikel im Tellerseparator lässt sich somit durch die Betrachtung eines Partikels zwischen zwei Tellern beschreiben. In Abhängigkeit der anliegenden Zentrifugalbeschleunigung und der individuellen Sinkgeschwindigkeit des Partikels, wird das Partikel an der Unterseite des oberen Tellers abgebremst und entlang des Tellers nach außen hin abgeschieden. Partikel mit zu geringer Sinkgeschwindigkeit erreichen die Unterseite des Tellers nicht und folgen der Fluidströmung. Dadurch gelangen diese Partikel in den Überlauf der Zentrifuge. Abgeschiedene Partikel sammeln sich als Sediment im Zentrifugenmantel und verlassen den Separator nach Erreichen des maximalen Füllgrades automatisiert oder manuell.

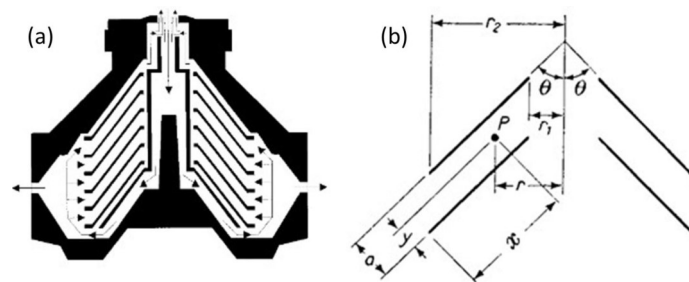


Abbildung 2.19.: Schematische Darstellung eines Tellerseparators (a) [71] und Partikelbewegung zwischen zwei einzelnen Tellern (b) [72]

In Abbildung 2.19 (b) sind die auf ein Partikel zwischen zwei Tellern wirkenden Kräfte dargestellt. Die Tellerabmessungen reichen von r_1 zu r_2 mit einem Tellerabstand von a . Ein Partikel an der Position P ist um die Strecke y vom unteren Teller und um x von äußeren Rand des unteren Tellers entfernt. Durch die Rotation des Separators mit der Kreisfrequenz ω erfährt das Partikel zusätzlich zur gravitationsbedingten Geschwindigkeit v_g eine Bewegung in y -Richtung. Diese ist durch

$$\frac{dy}{dt} = \frac{v_g \cdot \omega^2 \cdot r}{g} \cdot \cos \Theta = \frac{v_g \cdot \omega^2}{g} \cdot (r_2 - x \cdot \sin \Theta) \cdot \cos \Theta \quad (2.30)$$

beschrieben. In x-Richtung erfährt das Partikel eine Bewegung aufgrund der Fluidströmung vom äußeren Tellerrand r_2 zu r_1 . n repräsentiert die Anzahl an Zwischenräumen zwischen zwei Tellern und dementsprechend die Gesamtstelleranzahl -1 . Der Separator wird mit dem Volumenstrom \dot{V} durchströmt. Somit fließt durch jedes Tellerpaar der Volumenstrom $\frac{\dot{V}}{N}$ mit der durchschnittlichen Geschwindigkeit $\frac{\dot{V}}{2 \cdot N \cdot a \cdot r}$. Das sich dabei ausbildende Strömungsprofil ist durch die Funktion $f(y)$ berücksichtigt, wobei an der Telleroberfläche $f(y) = 0$ gilt. Damit kann die Bewegung des Partikels in x-Richtung über

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\dot{V}}{2 \cdot \pi \cdot N \cdot a \cdot r} \cdot f(y) = \frac{\dot{V} \cdot f(y)}{2 \cdot \pi \cdot N \cdot a \cdot (r_2 - x \cdot \sin \Theta)} \quad (2.31)$$

ausgedrückt werden.

Die tatsächliche Bewegung des Partikels ergibt sich somit aus den Gleichungen 2.30 und 2.31 zu

$$\frac{dy}{dx} = \frac{2 \cdot \pi \cdot n \cdot a \cdot v_g \cdot \omega^2}{q \cdot g} \cdot (r_2 - x \cdot \sin \Theta)^2 \cdot \cos \Theta \cdot \frac{1}{f(y)}. \quad (2.32)$$

Nach Trennung der Variablen, Integration nach dx und Berücksichtigung der Abhängigkeit

$$\frac{\sin \Theta}{\cos \Theta} = \tan \Theta \quad (2.33)$$

resultiert der Zusammenhang

$$\int f(y) \cdot dy = \frac{2 \cdot \pi \cdot N \cdot a \cdot v_g \cdot \omega^2}{3 \cdot \dot{V} \cdot g} \cdot \frac{r_2^3 - r_1^3}{\tan \Theta}. \quad (2.34)$$

Mit dem Mittelwert c_y des Strömungsprofils $f(y)$ ergibt sich die äquivalente Klärfläche für den Abschnitt zwischen Telleranfang und Tellerende zu

$$\Sigma = \frac{\dot{V}}{2 \cdot v_g} = \frac{2 \cdot \pi \cdot N \cdot \omega^2 \cdot (r_2^3 - r_1^3)}{3 \cdot v_y \cdot g \cdot \tan \Theta}. \quad (2.35)$$

Durch Einbeziehen der Stoke'schen Sinkgeschwindigkeit resultiert für ein Partikel, das gerade noch abgeschieden werden kann, der Durchmesser d_s mit

$$d_s = \sqrt{\frac{18 \cdot \eta \cdot \dot{V}}{\Sigma \cdot \Delta \rho \cdot g}}. \quad (2.36)$$

Für die Übertragung der Ergebnisse aus Laborexperimenten in den industriellen Maßstab, ist die äquivalente Klärfläche aus dem Laborversuch mit dem Pilotapparat in Relation zu setzen. Ein Modell zur Darstellung der äquivalenten Klärfläche in Laborzentrifugen entwickelte Ambler [72]. Dabei liegt die Partikelgröße zu Grunde, die zu 50 % bei einem Volumenstrom \dot{V} und einer Kreisfrequenz ω unter der Annahme der Stokes'schen Sinkgeschwindigkeit v_{ST} abgeschieden wird. Der funktionale Zusammenhang

$$\dot{V} = 2 \cdot v_{ST} \cdot \Sigma \quad (2.37)$$

beinhaltet dabei mit dem Faktor

$$\Sigma = \frac{V \cdot \omega^2 \cdot r_e}{g \cdot s_e} \quad (2.38)$$

die geometrischen Faktoren des verwendeten Trennapparates. Die apparateabhängigen Größen sind dabei das Rotorvolumen V , der Bezugsradius r_e und die Bezugsstrecke s_e . Abbildung 2.19 (b) zeigt die bedeutenden geometrischen Bezugsgrößen für die Bestimmung des Upscaling-Faktors Σ eines Tellerseparators. Analog ergibt sich über die Abmessungen in Abbildung 2.18 für eine Laborzentrifuge der Zusammenhang

$$\Sigma_{\text{Labor}} = \frac{\omega^2 \cdot V}{2 \cdot g \cdot \ln \frac{2 \cdot r_s}{r_m + r_s}}. \quad (2.39)$$

Beeinflussende Faktoren sind hierbei die geometrischen Größen r_s und r_m , sowie das Flüssigkeitsvolumen V in der Messküvette bzw. im Probengefäß. Die Sigma-Theorie ist auch als Ansatz der äquivalenten Klärfläche bekannt und bezeichnet somit die Fläche, welche ein Klärbecken unter Einfluss der Erdbeschleunigung g für dieselbe Trennleistung benötigen würde. Mit diesem Ansatz kann die Übertragung von Ergebnissen über verschiedene Apparatetypen und Größenmaßstäbe erfolgen. Diese Ergebnisübertragung erfolgt über den Vergleich des Quotienten aus Volumenstrom \dot{V} und äquivalenter Klärfläche Σ . Ähnliche Trennergebnisse der zu vergleichenden Apparate sind zu erwarten, wenn gilt:

$$\frac{\dot{V}_1}{\Sigma_1} = \frac{\dot{V}_2}{\Sigma_2} = \dots = \frac{\dot{V}_n}{\Sigma_n} \quad (2.40)$$

Diesen Vergleichsansatz hat Svarovsky [73] um einen Korrekturfaktor ν_{sv} erweitert, welcher Abweichungen von idealen Separationsverhalten verschiedener Apparate berücksichtigt

$$\frac{\dot{V}_1}{\nu_{sv,1} \cdot \Sigma_1} = \frac{\dot{V}_2}{\nu_{sv,2} \cdot \Sigma_2} = \dots = \frac{\dot{V}_n}{\nu_{sv,n} \cdot \Sigma_n}. \quad (2.41)$$

Laut Mannweiler ist der Faktor ν durch konstruktiv bedingte Inhomogenitäten im Strömungsbild, sowie Resuspendierung bereits abgeschiedener Partikel begründet [74]. Boychyn et al. geben für Laborzentrifugen $\nu = 1$ an und einen Bereich von $\nu = 0,4$ bis $\nu = 0,9$ bei Prozesszentrifugen. Ein vergleichbarer Ansatz zur Sigma-Theorie beschreibt Wakeman [75], indem er das Produkt von Volumen und Schleuderziffer der Zentrifuge in Relation zum Volumenstrom setzt:

$$\frac{V_1 \cdot C_1}{\dot{V}_1} = \frac{V_2 \cdot C_2}{\dot{V}_2} = \dots = \frac{V_n \cdot C_n}{\dot{V}_n}. \quad (2.42)$$

Je höher dabei der Wert des Quotienten, desto leistungsfähiger ist der Trennapparat, was sich bei der Sigma-Theorie genau umgekehrt verhält.

2.4. Grundlagen der Filtration

Neben der Zentrifugation ist die Filtration eine wesentliche Grundoperation der Fest-Flüssig-Trennung. Hierbei erfolgt die eigentliche Trennung nicht aufgrund des Dichteunterschieds von Fluid und Feststoff, sondern mittels eines Filtermediums, welches das Fluid passiert, während die Partikel auf diesem verbleiben. Die treibende Kraft bei der Filtration kann verschiedene Ursprünge haben, wobei eine Druckdifferenz zwischen Suspensionsoberseite und Kuchenunterseite anliegt. Dieser Differenzdruck resultiert durch einen Überdruck oberhalb der Suspension, z.B. durch auflastenden Gasdruck, einen pneumatischen Stempel oder Pumpendruck, einen Unterdruck an der Unterseite des Filtermediums, beispielsweise durch eine Vakuumpumpe, oder durch die Zentrifugalbeschleunigung, z.B. bei der filtrierenden Zentrifugation [76].

Die Filtration als Grundoperation kann in zwei wesentliche Bereiche unterteilt werden, die Tiefenfiltration und die Oberflächenfiltration. Die beiden Filtrationstypen unterscheiden sich durch das Trennprinzip des Filtermediums. Die Tiefenfiltration separiert Partikel im μm - und nm -Bereich aus gering konzentrierten Suspensionen mit einem dreidimensionalen Geflecht aus Poren, welche die Partikelgröße der abzutrennenden Partikel deutlich überschreiten. Die Partikel verbleiben aufgrund von Wechselwirkungen mit dem Filtermedium, wie Oberflächeneigenschaften, Größenausschluss oder Trägheit in den Poren. Die Wirkmechanismen sind dabei sehr unterschiedlich. Die Rückhaltung der Partikel kann beispielsweise über elektrostatische Wechselwirkungen des Partikels mit dem Filtermedium erzeugt, oder durch die mechanische Einlagerung in Ausstülpungen des Gewebes erfolgen. Das Filtermedium selbst kann aus einer dispersen Partikelschicht, wie Sand, Kies, Aktivkohle oder Kieselgur aufgebaut sein oder aus vorgefertigten Filterelementen aus Fasermaterialien, wie Zellulose, Kohlenstoff, Polymeren oder Metall bestehen. Die Auswahl des geeigneten Tiefenfiltergewebes wird dabei ausschlaggebend von der Wechselwirkung zwischen Partikel und Medium, sowie den Anforderungen des Prozesses an Medienstabilität hinsichtlich Temperatur und chemischer Beständigkeit, bestimmt.

Die Oberflächenfiltration umfasst ihrerseits die drei Bereiche Kuchenfiltration, Siebfiltration und Cross-Flow-Filtration. Im Gegensatz zur Tiefenfiltration findet die Abtrennung der Partikel bei allen Oberflächenfiltrationen nicht im Filtermedium, sondern auf dessen Oberfläche statt. Dies ist durch den grundlegend unterschiedlichen Aufbau des Filtermediums begründet. Im Vergleich zu Tiefenfiltern sind Filtermedien für die kuchenbildende Filtration dünner aufgebaut. Auch sie können aus mehreren Schichten aufgebaut sein, wie beispielsweise eine filtrierende und eine stützende Struktur. Die Eigenschaften der Medien und dessen Wechselwirkung mit den Partikeln sind dabei hauptsächlich durch die Webart, die Fadenanzahl und die Maschenweite bestimmt. Bei der Siebfiltration dient das Gewebe als Sieb und Partikel, welche eine bestimmte Partikelgröße überschreiten, werden zurückgehalten, während das Fluid und kleinere Partikel das Gewebe

passieren können. Dementsprechend sind die Maschen kleiner als die abzutrennenden Zielpartikel, sodass diese Partikel die Poren nicht passieren können. Ein Nachteil der Siebfiltration ist die schnelle Verstopfung der Maschen aufgrund des ungünstigen Verhältnisses zwischen Partikelgröße und Maschenweite. Aus diesem Grund ist die Siebfiltration auch nicht zur Abtrennung sehr großer Partikelmengen aus hoch konzentrierten Suspensionen geeignet, sondern findet Anwendung als Vorfilter oder nachgeschalteter Polzeifilter zur Abtrennung einzelner großer Partikel. Die Haupttrennaufgabe übernimmt dabei der Hauptapparat, wie beispielsweise ein Hydrozyklon, oder Tellerseparator, welcher beim Feststoffaustrag empfindlich auf zu große Partikel reagieren kann.

Im Allgemeinen ist der Übergang zwischen der Siebfiltration und der Kuchenfiltration fließend. Die Siebfiltration definiert sich in der Theorie als Einlagenschicht. In der Praxis ist dieser Zustand in der Regel nur während des Anfangsprozesses erreicht. Im Laufe der voranschreitenden Filtration baut sich ein Kuchen auf, bis der Druckabfall über den Filter einen kritischen Wert überschreitet und ein Filterwechsel erforderlich ist.

Die Kuchenfiltration ist die am meisten eingesetzte Art der Filtration. Namensgebend für die Kuchenfiltration ist der Aufbau eines porösen Feststoffkuchens auf dem Gewebe mit zunehmender Filtrationsdauer. Die Höhe des Filterkuchens variiert in Abhängigkeit des Trennapparates und kann in industriellen Drucknutschen Höhen im Bereich von 40 cm erreichen. Der Filterkuchen selbst übernimmt dabei ebenfalls die Aufgabe eines Filtermediums oder auch Tiefenfilters. Die Maschenweite des Filtergewebes wird hierbei in der Regel größer gewählt als die Partikelgröße des abzutrennenden Materials. Die eigentliche filtrierende Schicht bildet sich aus der ersten anfiltrierten Partikelschicht, die sich durch Feststoffbrücken über den Maschen ausbilden. Hierin liegt auch einer der Hauptunterschiede zur Siebfiltration. Die Partikel verstopfen das Filtergewebe nicht, sodass die Standzeit des Filters deutlich erhöht ist. Gleichzeitig ist es bei der Kuchenfiltration in der Regel notwendig zum Beginn der Filtration das Filtrat in den Feed-Behälter zurückzuführen, da zu Beginn ein Partikeldurchschlag in Form eines Trübstoßes auftritt. Sobald sich die notwendige Partikelschicht über dem Gewebe aufgebaut hat, kann die Klärfiltration beginnen.

Daher ist die Kuchenfiltration auch hinsichtlich der Partikelkonzentration in der Suspension beschränkt. Bei zu geringen Konzentrationen baut sich die Partikelschicht nur sehr langsam oder gar nicht auf. Der Partikelgrößenbereich der abgetrennten Partikel reicht bei der Kuchenfiltration von etwa 1 mm bis in den μm -Bereich und kann durch eine Suspensionskonditionierung wie Agglomeration oder Flockung weiter gesenkt werden. Durch eine optimale Flockung sind disperse Systeme im oberen Nanometer-Bereich abtrennbar [51]. In der Regel kommen für die Siebfiltration und Kuchenfiltration Filtergewebe zum Einsatz. In Spezialfällen können auch Membranen mit deutlich kleineren Porenweiten Anwendung finden. Da diese allerdings einen deutlich höheren Durchströmungswiderstand aufgrund der geringen Porengröße aufweisen, ist deren Einsatz auch mit höheren Energiekosten verbunden. Somit ist der wirtschaftliche Einsatz von Membranen im

Zusammenhang mit der Kuchenfiltration in der Regel auf hochreine Produkte oder stark verdünnte Suspensionen beschränkt. Im Unterschied dazu ist der Einsatz von Membranen bei der dritten Art der Oberflächenfiltration, der Querstrom- oder auch Cross-Flow-Filtration, standardmäßig. Diese Arbeit nutzt die Cross-Flow-Filtration, sodass im Folgenden eine genauere Erläuterung dieser Verfahrensoption erfolgt.

2.4.1. Cross-Flow-Filtration

Der wesentliche Unterschied der Cross-Flow-Filtration gegenüber den klassischen Verfahren der Filtration ist die Richtung der Strömungsführung. Während die Strömung bei der Kuchen- und Siebfiltration orthogonal zur Oberfläche des Gewebes erfolgt, verläuft die Strömung bei der Cross-Flow-Filtration parallel zur Oberfläche der Membran. Bei orthogonaler Strömung im Falle der Kuchenfiltration lagern sich die Partikel auf der Gewebeoberfläche ab und es bildet sich der Filterkuchen. Dadurch steigt kontinuierlich der Durchströmungswiderstand und somit der Druckverlust über die Kuchenhöhe an, bis der Filtratfluss einen minimalen Wert erreicht und die Filtration abgebrochen wird. Ein Spezialfall der Cross-Flow-Filtration, die Dead-End-Filtration, zeigt eine ähnliche Vorgehensweise. Die Strömungsrichtung ergibt sich ebenfalls orthogonal zur Membranoberfläche, sodass der Permeatfluss bei konstantem transmembranen Druck über der Zeit abnimmt. Um dem entgegenzuwirken und ein vollständiges Erliegen des Permeatflusses zu verhindern, muss in regelmäßigen Abständen eine Rückspülung des Filtermediums erfolgen. Dieser Spezialfall bietet eine Möglichkeit zur energieeffizienten Abtrennung gering bis mäßig konzentrierter Suspensionen [77, 78]. Bei hohen Feststoffkonzentrationen, oder Stoffsystemen, die einen sehr hohen Durchströmungswiderstand ausbilden, bietet die Querstrom- bzw. Cross-Flow-Filtration deutliche Vorteile. Durch die Überströmung der Filtermedienoberfläche induzierte Scherkräfte lösen die Partikel in Abhängigkeit ihrer Größe von der Oberfläche des Filtermediums und verhindern damit ein Verblocken der Membran. Aus diesem Grund bildet sich nur eine dünne Deckschicht auf der Oberfläche des Filtermediums. In Abbildung 2.20 sind die wirkenden Kräfte auf ein Partikel während der Cross-Flow-Filtration dargestellt.

Je größer das Partikel ist, desto größer ist die Schleppkraft und damit die Wahrscheinlichkeit von der Strömung mitgerissen zu werden. Dabei können größere Partikel auch kleinere Partikel aus der Deckschicht mitreißen. Im optimalen Betriebszustand sorgt dieser Vorgang für ein Gleichgewicht aus Deckschichtbildung und Deckschichtabtragung. In diesem Fall liegt eine reversible Deckschicht vor, deren Höhe durch Anpassung der Überströmgeschwindigkeit regulierbar ist. Sinkt der Permeatfluss jedoch mit zunehmender Filtrationsdauer und trotz hoher Überströmungsgeschwindigkeit, liegt eine irreversible Deckschicht vor, die nur durch eine entsprechende

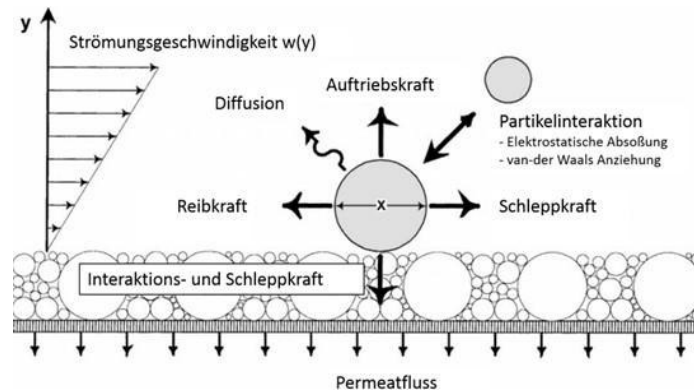


Abbildung 2.20.: Wirkende Kräfte auf ein Partikel während der Cross-Flow-Filtration nach [11]

Rückspülung entfernt ist. Der wesentliche Nachteil der Cross-Flow-Filtration ist der hohe Energieverbrauch, welcher aufgrund des Druckverlustes durch die Überströmung auf der Feedseite der Membran entsteht [77]. In der Regel steht dem im Vergleich zur Dead-End-Filtration höheren Energieverbrauch eine geringere Anzahl notwendiger Rückspülungen, sowie höhere Ausbeute bei gleichzeitig geringerem Zusatzstoffbedarf, wie beispielsweise Flockungsmittel, gegenüber. Bei der dynamischen Cross-Flow-Filtration wie von Bott beschrieben [11], ist die Querströmung nicht über eine Strömungsführung quer zur Membran induziert, sondern über einen Rotor, welcher sich knapp über der Membranoberfläche befindet. Dieses System spart Energiekosten und es ist, im Vergleich zur herkömmlichen Cross-Flow-Filtration, zusätzlich der zwei- bis zehnfache Filtratfluss erzielbar.

Die treibende Kraft bei der Cross-Flow-Filtration ist der transmembrane Druck TMP , welcher sich durch die feedseitige p_{Fe} und permeatseitige p_{pe} Druckdifferenz zu

$$TMP = p_{Fe} - p_{pe} \quad (2.43)$$

ergibt. Der Relativdruck des Permeats p_{pe} ist bei dieser Betrachtungsweise Null, da die Filtration gegen den Umgebungsdruck erfolgt. Sobald das Filtermedium mit einem TMP beaufschlagt ist, stellt sich ein Filtratfluss bzw. Permeatfluss J , der sogenannte Flux, durch die Membran ein. Dieser berechnet sich aus dem Permeatvolumen V_{pe} , welches in der Zeit t durch die aktive Filterfläche A der Membran fließt mit:

$$J = \frac{V_{pe}}{t \cdot A}. \quad (2.44)$$

Um die Permeabilität P der Membran zu erhalten, wird der Permeatfluss J auf den transmembranen Druck TMP bezogen:

$$P = \frac{J}{TMP}. \quad (2.45)$$

Die Permeabilität P ist ein Maß für die Durchlässigkeit der Membran für bestimmte Stoffe. Je höher die Permeabilität, desto besser kann der jeweilige Stoff bzw. das jeweilige Fluid die Membran durchströmen.

2.4.2. Membranen

Die Wahl des Filtermediums ist entscheidend für die Qualität der Filtration hinsichtlich Trennschärfe und Filtrationsdauer. Bei der Oberflächenfiltration sind dafür meist Filtrationsmembranen aus gesinterter Keramik oder Polymeren im Einsatz [51]. Diese bestehen in der Regel aus einer aktiven Schicht, welche die Porengröße definiert und auf der Feedseite lokalisiert ist. Zusätzlich können noch auf der Filtratseite mehrere Stüttschichten aus einem mechanisch stabileren Material unter der aktiven Schicht vorhanden sein, um die mechanische Stabilität und Belastbarkeit der Membran zu erhöhen. Die Membran ist für mindestens eine Komponente des Fluids durchlässig, während mindestens eine andere Komponente zurückgehalten wird. Die Trennung der Komponenten erfolgt dabei physikalisch, sodass keine chemischen, biologischen oder thermischen Veränderungen der Komponenten resultieren. Die Charakterisierung der Membran kann je nach Anwendungsgebiet anhand der Triebkraft, wie Druckdifferenz oder elektrochemische Potentialdifferenz, des Trennmechanismus, wie konvektiv oder diffusiv oder der Größe bzw. Molmasse der abtrennbaren Partikel erfolgen [77]. Bei druckgetriebenen Membranverfahren, wie beispielsweise der Wasseraufbereitung, können Verfahren basierend auf der treibenden Druckdifferenz und der Größe der abzutrennenden Partikel, in Umkehrosmose, Nanofiltration, Ultrafiltration und Mikrofiltration unterteilt werden. Für die Umkehrosmose und Nanofiltration ist die Abtrennung von gelösten organischen Substanzen, Ionen und Partikeln kleiner 1 nm charakteristisch. In diesem Größenbereich gilt die Membran als porenfrei und die Trennung erfolgt diffusiv [51]. Ultrafiltrationsmembranen finden bei der Abtrennung von makromolekularen Substanzen und

Proteinen, sowie feinsten Partikel kleiner $1 \mu\text{m}$ Anwendung, während die Mikrofiltration für Partikelgrößen bis in den zweistelligen μm -Bereich anwendbar ist. Bei beiden Verfahren liegt der Druckbereich üblicherweise zwischen 50 kPa und 1 MPa , weshalb beide Verfahren zu den Niederdruckverfahren zählen [79]. Die verwendeten Membranen sind in der Regel den Porenmembranen zuzuordnen, weshalb hauptsächlich ein konvektiver Transport durch die Membran aufgrund des anliegenden Druckes vorliegt. Unter den Annahmen, dass die Strömung durch poröse Medien, der Strömung durch ein Haufwerk entspricht und die Membran als System parallel geschalteter Kapillaren gilt, ist das Porenmodell zur Beschreibung des konvektiven Transports der kontinuierlichen Phase durch die Membran anwendbar [77]. Dem Porenmodell liegt die Carman-Kozeny-Beziehung nach

$$J = \frac{O_V \cdot \varepsilon^2}{\eta_F \cdot (1 - \varepsilon)^2} \cdot \frac{\Delta p}{2 \cdot \tau \cdot \delta} \quad (2.46)$$

zu Grunde. Die Druckdifferenz Δp beschreibt den Druckunterschied zwischen Feed- und Permeat-Seite und entspricht damit dem TMP aus Gleichung 2.43. Die Viskosität η_F charakterisiert die viskosen Eigenschaften der fluiden Phase, während Größen wie Porosität ε , die volumenbezogene spezifische Oberfläche O_V , Tortuositäts- bzw. Umwegfaktor τ und die Membrandicke δ die Eigenschaften der Membran beschreiben. Diese Membranparameter werden als hydraulischer Widerstand R_M über den Zusammenhang

$$R_M = \frac{s_V^2 \cdot (1 - \varepsilon)^2 \cdot 2 \cdot \tau \cdot \delta}{\varepsilon^2} \quad (2.47)$$

dargestellt. Mit Gleichung 2.46 ergibt sich die Darcy-Gleichung zu

$$J = \frac{\text{TMP}}{\eta \cdot R_M} \quad (2.48)$$

Die Bestimmung des hydraulischen Widerstands erfolgt mittels Permeationsversuchen unter Verwendung von Reinstwasser bei der Ultrafiltration.

2.4.3. Deckschichtbildung

Trotz der Querströmung zur Membranoberfläche entsteht durch den konvektiven Permeatfluss durch die Membran eine Konzentrationserhöhung der zurückgehaltenen Komponenten unmittelbar über der Membranoberfläche. Folglich bildet sich ein Konzentrationsprofil mit erhöhter Konzentration in unmittelbarer Membrannähe aus, welche als Konzentrationspolarisation bezeichnet wird. Es bildet sich eine laminare Grenzschicht über der Membran, sodass der Rücktransport in die Kernströmung nur diffusiv innerhalb der gebildeten Grenzschicht erfolgen kann. Bei Ultra- und Mikrofiltrationen sind die Filtratströme allerdings meist so hoch, dass den abzutrennenden Molekülen nicht genügend Zeit bleibt, um aus der Grenzschicht heraus zu diffundieren. Beim Erreichen einer Sättigungskonzentration, können gelöste Substanzen ausfallen und nachfolgend zur Ausbildung einer Deckschicht auf der Membran beitragen [77]. Diese Deck- oder Gelschicht erhöht den Durchströmungswiderstand der Membran, sodass bei konstantem TMP der Flux mit zunehmender Deckschichtdicke abnimmt [80]. Für einen idealen Filtrationsprozess mit minimaler Konzentrationspolarisation gilt ein linearer Zusammenhang zwischen TMP und Filtratfluss. Dieser TMP-kontrollierte Bereich tritt bei geringen Feedkonzentrationen und hohen Scherkräften an der Membranoberfläche auf. Dabei steigt der Filtratfluss nicht mehr linear mit dem TMP, da durch die Deckschicht der Filtrationswiderstand erhöht ist und somit weniger Filtrat bei konstantem TMP anfällt. Dieser Bereich ist als stofftransferlimitierte Region definiert. Da die durch Konzentrationspolarisation induzierte Deckschichtbildung als dynamisches System angesehen wird, ist durch weiteres Erhöhen der Querstromgeschwindigkeit, oder Reduktion der Feedkonzentration der Prozess wieder in den TMP-kontrollierten Bereich überführbar [81].

Kommt es jedoch zu irreversiblen Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und der Membran und einer dadurch bedingten Leistungsminderung der Membran, tritt der Zustand des Fouling ein. Als Fouling ist eine Vielzahl verschiedenster physikalisch-chemischer Wechselwirkungen zwischen Partikeln und Membran bezeichnet. Zum Überbegriff Fouling zählt somit auch das Abscheiden von Partikeln auf der Membranoberfläche, die eine größere Partikelgröße aufweisen als die Porengröße der Membran. Dadurch kann die Fouling-Schicht eine Tiefenfiltrationswirkung übernehmen. Der Rückhalt an Molekülen oder Partikeln, die im normalen Zustand die Membran passieren können, erfolgt durch die Fouling-Schicht.

Zu Beginn der Filtration kann es zudem zur Porenverblockung kommen, wobei Partikel, welche in etwa dieselbe Größe wie die Poren der Membran aufweisen, sich im Porenmund ablagern und die Pore blockieren. Eine Verengung der Poren kann ebenfalls eintreten, wenn gelöste Komponenten sich im Inneren der Poren ablagern oder anreichern. Bei Filtrationen biologischer Produkte kann es durch die Ablagerung von Mikroorganismen auf der Membranoberfläche zum Biofouling kommen. Hauptsächlich bei der Filtration von Bakterienarten, welche extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) ausbilden, liegt die Neigung zur Ausbildung von Biofilmen auf der Membranoberfläche vor

[82]. Vor allem Polysaccharide, Proteine und Lipide sind als Ursachen für das Membranfouling zu identifizieren und sind aufgrund ihrer hohen Wasserbindungskapazität in der Lage, stark hydratisierte Gele zu bilden. Diese kompakten Strukturen führen zu einer deutlichen Erhöhung des Gesamtwiderstandes und dadurch zu einer Reduktion des Filtratflusses [83–85]. Neben den EPS selbst, können auch Calcium-Ionen zur Bildung von Biofouling führen, da sie aufgrund ihrer Ladung Bindungen vermitteln und somit an der Bildung von Deckschichten beteiligt sein können [86, 87]. Um die filtratflussmindernde Wirkung des Foulings zu berücksichtigen, kann die Darcy Gleichung analog zu Gleichung 2.48 nach Field zu [88]

$$J = \frac{TMP}{\eta \cdot R_T} = \frac{TMP}{\eta \cdot (R_M + R_F)} \quad (2.49)$$

erweitert werden. In Gleichung 2.49 ersetzt der Gesamtdurchströmungswiderstand R_T den hydraulischen Membranwiderstand R_M , welcher in Gleichung 2.48 Anwendung findet. Allerdings berücksichtigt R_T den Membranwiderstand R_M und erweitert diesen um den Einfluss des Foulingwiderstand R_F . Für ideale Filtrationsbedingungen, bei welchen kein Fouling auftritt, entspricht R_T dem hydraulischen Membranwiderstand R_M . Folglich berücksichtigt Gleichung 2.49 den durch Fouling reduzierten Filtratfluss aufgrund der Deckschicht.

Eine weitere Möglichkeit das Fouling auf der Membranoberfläche zu bewerten ist die Filtrationskurve $\frac{t}{V} = f(V)$. Über die Interpretation dieses Diagrammes erfolgt beispielsweise die Auslegung von Apparaten bei der Kuchenfiltration nach Vorversuchen an einer Labordrucknutsche. Dazu dient die Bestimmung des spezifischen Kuchenwiderstands α , welcher ein Maß für die Durchströmbarkeit des gebildeten Filterkuchens bei der Kuchenfiltration darstellt. Schippers und Verdouw (1980) entwickelten angelehnt an das Berechnungsmodell der Kuchenfiltration die MFI (Modified Fouling Index) Gleichung [89], welche die Berechnung des spezifischen Kuchenwiderstandes α bei auftretendem Fouling ermöglicht [90]:

$$\frac{t}{V} = \frac{\eta \cdot \alpha \cdot c_b}{2 \cdot TMP \cdot A^2} \cdot V + \frac{\eta_F \cdot R_m}{TMP \cdot A} \quad (2.50)$$

Analog zur Kuchenfiltration, basiert diese Gleichung auf der Annahme, dass die auf der Membran zurückgehaltenen Substanzen aufgrund von Mechanismen der Oberflächenablagerung zurückgehalten werden [90]. A repräsentiert dabei die aktive Membranfläche und c_b die Bulkkonzentration

der Partikelsuspension. Durch Zusammenfassung mehrerer Größen in die Faktoren a und b , ist Gleichung 2.50 auch in der Form

$$\frac{t}{V} = a \cdot V + b \quad (2.51)$$

darstellbar und zeigt die Charakteristika einer Geradengleichung. Abbildung 2.21 zeigt den Zusammenhang von $\frac{t}{V}$ über V und verdeutlicht die drei zu unterscheidenden Bereiche: a) Porenverblockung, b) inkompressible Kuchenbildung und c) kompressible Kuchenbildung.

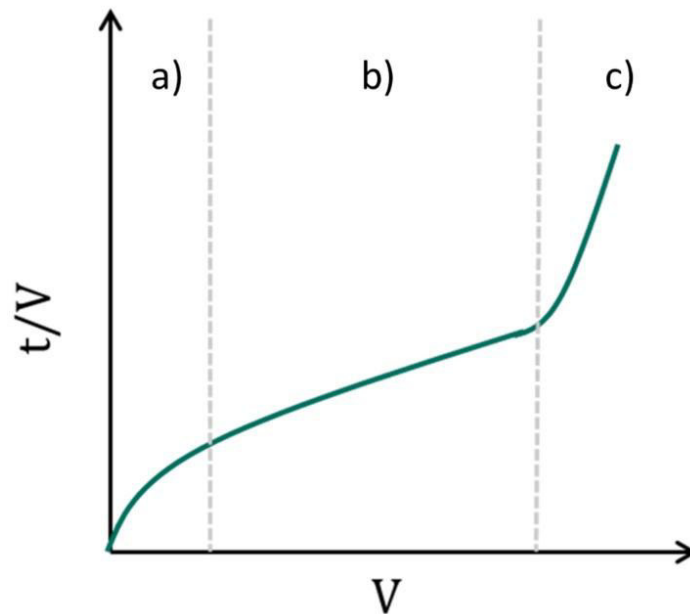


Abbildung 2.21.: Quotient aus Zeit und Filtratvolumen aufgetragen über dem Filtratvolumen, mit Einteilung in die Zonen a) Porenverblockung, b) inkompressible Kuchenbildung und c) kompressible Kuchenbildung [89, 90]

3. Material und Methoden

3.1. Mikroorganismen

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit umfassten insgesamt sechs verschiedene Bakterienstämme, die sich in der Art der Zellen und der Form der produzierten Exopolysaccharide unterscheiden. Die Stämme der Gattung *Bacillus* repräsentieren Bakteriensporen und sind über zwei Stämme des *Bacillus subtilis* und einen Stamm des *Bacillus licheniformis* Teil der Untersuchungen. Ergänzend als Vertreter für vitale Zellen sind drei Stämme der Gattung *Streptococcus thermophilus* experimentell erfasst. Ein weiterer Teil der Untersuchungen findet anhand von zellfreiem Fermentationsmedium für zwei Stämme der Gattung *Streptococcus thermophilus* statt. Die untersuchten Zellsuspensionen und Fermentationsmedien wurden bereitgestellt von der Firma Chr. Hansen GmbH (Nienburg) und Chr. Hansen Holding A/S (Horsholm).

3.1.1. *Bacillus subtilis*

Das gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* ist ein fakultativ aerob wachsendes Fäulnisbakterium der Gattung *Bacillus*. Die stäbchenförmigen Bakterien weisen üblicherweise Längen von 2 bis 3 μm bei einem Durchmesser von 0,7 bis 0,8 μm auf und bilden Zellketten. Glucose dient als Monomer bei der Synthese des Homopolysaccharides Levan, welches die Bakterien je nach Umgebungsbedingungen in Konzentrationen von etwa $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ bis über $80 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ synthetisieren und als Exopolysaccharid in kapsulärer oder freier Form ins umgebende Medium segregieren. Im Falle einer Nährstofflimitierung oder äußeren Stressfaktoren bildet *Bacillus subtilis* Endosporen, welche lange Perioden überdauern und bei Verbesserung der äußeren Bedingungen wieder in ihre vitale Zellform übergehen. Die Sporen weisen eine elliptische Form mit Längen zwischen 1 bis 1,5 μm und Durchmessern von 0,6 bis 0,9 μm auf [91]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden *Bacillus subtilis* Stämme BAC-B und BAC-C untersucht. Zwar bestehen die Zellsuspensionen zum Großteil aus Sporen, sie können allerdings auch noch eine geringe Anzahl an verbleibende Zellen enthalten. Die Lieferung der Proben erfolgte in gekühlter Form und deren weitere Lagerung bis zum Experiment im Kühlschrank bei etwa 5°C . Vor Gebrauch durchliefen

diese eine Akklimationisierung bei 20°C für etwa 1 Stunde. Durch Chr. Hansen GmbH wurden sowohl unbehandelte Fermentationsbrühen, sowie im Anschluss an die Fermentation bei variierendem Homogenisierungsdruck von 15, 30, 45 und 60 MPa in einem Hochdruckhomogenisator beanspruchtes Fermentationsmedium zur Verfügung gestellt.

3.1.2. *Bacillus licheniformis*

Wie schon bei *Bacillus subtilis* handelt es sich auch bei *Bacillus licheniformis* um ein gram-positives, fakultativ aerob wachsendes Fäulnisbakterium der Gattung *Bacillus*. Es ist eng mit *Bacillus subtilis* verwandt und weist daher auch Ähnlichkeiten der Bakterienzellen und Endosporen in Form und Größe auf. Wie *Bacillus subtilis* synthetisiert auch *Bacillus licheniformis* das Homopolysaccharid Levan als Exopolysaccharid, allerdings in deutlich höheren Konzentrationen bis nahezu 100 g · l⁻¹ [92]. Der Probentransport, die Lagerung der Proben und die Probenvorbereitung erfolgte analog zu *Bacillus subtilis*. Die Bereitstellung beinhaltete unbehandelte Fermentationsbrühen, sowie mittels Hochdruckhomogenisator bei Intensitäten von 15, 30, 45 und 60 MPa beanspruchte Zellsuspensionen.

3.1.3. *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus ist ein gram-positives, fakultativ anaerobes Bakterium und gehört zur Familie der Streptokokken. Die Bakterien sind oval bis rund, haben eine Größe von 0,8 µm – 1,0 µm und liegen paarweise, bis hin zu langen Ketten aus mehreren Kokken vor. *Streptococcus thermophilus* bildet im Gegensatz zu den beiden *Bacillus* Stämmen Heteropolysaccharide. Die Zusammensetzung dieser EPS ist stammspezifisch und besteht aus 3 – 8 unterschiedlichen Monosacchariden, wobei meist Glukose, Galaktose und Rhamnose ihre Struktur bilden [93–95]. Die Zusammensetzung der sich wiederholenden Monosaccharide ist maßgeblich für die Eigenschaften der EPS hinsichtlich Oberflächenladung, Verzweigungsgrad und der daraus resultierenden Interaktion mit dem umgebenden Medium verantwortlich.

Chr. Hansen Holding A/S (Horsholm) stellte im Rahmen dieser Arbeit drei ST-Stämme zur Verfügung, welche sich sowohl in der Länge der gebildeten Zellketten, als auch in der Art und Menge der synthetisierten EPS unterscheiden. Der Stamm *ST-C* produziert sowohl kapsuläre als auch freie nicht adhäsive EPS. Die Stämme *ST-D* und *ST-E* produzieren ausschließlich freie, adhäsive EPS. Im Gegensatz zu den Bakteriosporen der Gattung *Bacillus* wurden die Fermentationsmedien inklusive der Bakterienzellen direkt nach der Fermentation schockgefrostet und in Form von Pellets tiefgekühlt bereitgestellt. Bis zu Ihrer Verwendung lagerten die Pellets bei etwa –30°C und über Nacht erfolgte das Auftauen der Proben im Kühlschrank.

Tabelle 3.1.: Molekulargewichte für die eingesetzten Modellsysteme und der Exopolysaccharide, sowie deren Eigenschaften, für die Stämme *ST-C* und *ST-E*

Ursprung	Typ	Eigenschaften	Molekulargewicht / Da
Fermentationsmedium	ST-C Fraktion I	Kapsuläre EPS & nicht adhäsive, freie EPS	$7.6 \cdot 10^5$
	ST-C Fraktion II		$6.7 \cdot 10^4$
	ST-E Fraktion I	Adhäsive, freie EPS	$5.6 \cdot 10^5$
	ST-E Fraktion II		$5.6 \cdot 10^4$
Modell-Polysaccharid-System	Dextran 500	-	$5.0 \cdot 10^5$
	Dextran 40		$4.0 \cdot 10^4$
	Saccharose		$3.4 \cdot 10^2$

3.1.4. EPS-haltiges Fermentationsmedium und Modellsysteme

Für die Aufreinigung von Exopolysacchariden aus einem Fermentationsmedium, wurde durch Chr. Hansen Holding A/S zellfreies Fermentationsmedium der Stämme *ST-C* und *ST-E* bereitgestellt. Die Biomasse ist bereits direkt nach der Fermentation mittels Tellerseparator abgetrennt. Es verbleiben allerdings Zellbruchstücke und kleine Zellen, die in Abhängigkeit der Beschleunigung nicht abtrennbar sind, im Medium zurück. Der Anteil ist verhältnismäßig gering, aber dennoch präsent und für die weitere Aufarbeitung relevant. Vorversuche zur Isolierung von EPS aus dem Fermentationsmedium fanden anhand von Modell-Polysaccharid-Systemen statt. Diese kamen dafür sowohl in wässrigen Einzellösungen, sowie als Mischung der Saccharide Dextran 500, Dextran 40 und Saccharose zum Einsatz. Alle Modellsysteme stammen von Merck KGaA. Das Molekulargewicht für die Exopolysaccharide aus den Fermentationsmedien und der Modell-Polysaccharide, sowie Informationen über die Eigenschaften der durch die Stämme *ST-C* und *ST-E* gebildeten EPS-Moleküle sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

3.2. Analysemethoden

In dieser Arbeit kommen zwei verschiedene Methoden der Sinkgeschwindigkeitsanalyse zum Einsatz. Die Verwendung der Scheibenzentrifuge ist für die Bewertung der Partikelgröße basierend auf der Sinkgeschwindigkeit der Zellen relevant. Die Analysenzentrifuge LUMiSizer dient der Bewertung der Sinkgeschwindigkeitsverteilung und deren Beeinflussung durch die Scherbeanspruchung der Zellen. Weiterhin sind die angewandten Analysemethoden, wie beispielsweise Charakterisierung von Kohlenhydrat- und EPS-Gehalt beschrieben. Die quantitativen Messanalysen, mit

Ausnahme der Gefriertrocknung und der allgemeinen Trockenmassenbestimmung, erfolgte durch die Kollegen der Lebensmitteltechnik am Institut für Naturstofftechnik der Technischen Universität Dresden.

3.2.1. Scheibenzentrifuge

Als Messgerät zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung kam im Rahmen dieser Arbeit die Scheibenzentrifuge DC24000 von CPS Instruments Europe (Oosterhout, Niederlande) zum Einsatz. In Abbildung 3.1 (a) ist die Frontalansicht der Zentrifuge und in Abbildung 3.1 (b) deren Funktionsprinzip schematisch dargestellt. Die Scheibenzentrifuge besteht im Wesentlichen aus einer drehbaren, transparenten Scheibe, einem Laser an deren äußeren, radialen Ende und dem zugehörigen Detektor auf der gegenüberliegenden Seite. Das Messprinzip basiert auf der Einzelkornsedimentation nach Stokes, sodass sie nur für die Analyse von gering konzentrierten Suspensionen geeignet ist. Die Sedimentation der Partikel erfolgt entlang eines Dichtegradienten, welcher von zwei Saccharoselösungen mit Konzentrationen von 3w-% und 7w-% gebildet ist. Dichte und Viskosität nehmen dabei von der Rotorachse bis zur Außenseite zu und führen zu einer gleichmäßigen Partikelsedimentation durch Minimierung von Diffusionseffekten und Konvektionsströmungen. Die Partikelsuspension wird in die Mitte der Scheibe injiziert, sodass die Partikel durch den Gradienten bis zu deren äußeren Rand sedimentieren. In der Nähe des radialen Scheibenendes passieren sie den Laser, welcher das Medium mit monochromatischem Licht der Wellenlänge $\lambda = 470 \text{ nm}$ durchstrahlt. Der gegenüberliegende Detektor registriert kleinste Intensitätsänderungen, welche die sedimentierenden Partikel durch Absorption des Laserlichtes verursachen. Mittels der zeitabhängigen Intensitätsänderung erfolgt anhand eines zuvor analysierten Kalibrierstandards mit definierter Partikelgrößenverteilung die Bestimmung der Größe der untersuchten Partikel. Die Scheibenzentrifuge erreicht Drehzahlen bis 24.000 *rpm*. Dadurch sind, in Abhängigkeit der Dichtedifferenz zwischen Partikel und Dichtegradient, Partikelgrößen zwischen $x_{min} = 10 \text{ nm}$ bis $x_{max} = 30 \text{ }\mu\text{m}$ analysierbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung mittels Scheibenzentrifuge zunächst die jeweilige Probe in einem Becherglas mit isotonischer Kochsalzlösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Durchmischung der Probe erfolgte durch Schütteln des Becherglases und dem mehrmaligen Aufziehen und Entlassen des kompletten Volumens mit einer 1 *ml* Spritze. Durch Aufziehen von etwa 0,2 – 0,3 *ml* und die anschließende Volumenreduktion auf 0,1 *ml* erfolgte das Entfernen von Luftblasen. Das Probenvolumen wurde in den Einlass der Scheibenzentrifuge injiziert und die Online-Messwerterfassung des Versuchs gestartet. Alle Untersuchungen fanden als Dreifachbestimmung mit folgenden Geräteeinstellungen statt

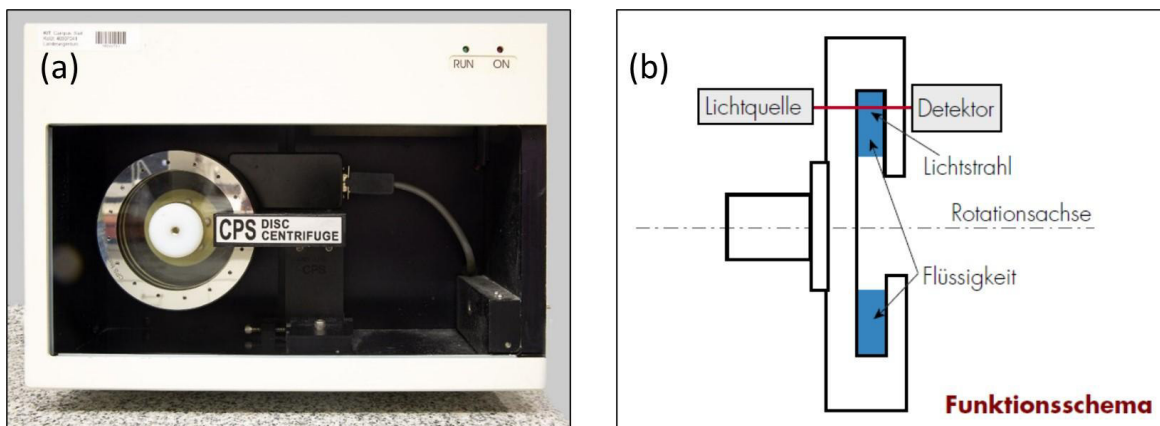


Abbildung 3.1.: Frontalansicht der geöffneten Scheibenzentrifuge (a) und schematische Darstellung des Funktionsprinzips (b) nach [96]

- Drehzahl: $5.850 \text{ rpm} \hat{=} 1.720 \times g$
- Messbereich: 400 nm bis $5 \mu\text{m}$
- Dichtegradient: 1:1 Mischung aus 3 % und 7 % (w/w) Saccharoselösung
- mittlere Dichte Saccharoselösung: $1,016 \text{ kg} \cdot \text{dm}^{-3}$
- mittlere Viskosität Saccharoselösung: $1,2 \text{ mPa} \cdot \text{s}$
- Kalibrierstandard
 - PVC-Partikel dispergiert in deionisiertem Wasser
 - mittlere Partikelgröße: $0,483 \mu\text{m}$
 - Partikeldichte: $1,385 \text{ kg} \cdot \text{dm}^{-3}$
 - Einspritzvolumen: $0,1 \text{ mL}$
 - Evaporationsschutz: $0,5 \text{ mL}$ Dodekan
- Probenparameter
 - Angenommene Partikeldichte: $1,24 \text{ kg} \cdot \text{dm}^{-3}$
 - Einspritzvolumen: $0,1 \text{ mL}$
 - Verdünnung: 1:20 mit NaCl-Lösung
- Messdauer: zwischen 3 und 8 Minuten

3.2.2. LUMiSizer

Der LUMiSizer ist eine optische Analysenzentrifuge, welche in der Industrie in vielen Bereichen der Qualitätssicherung Anwendung findet. Die Bewertung von Sedimentations- und Aufrahmverhalten von Dispersionen oder Emulsionen ist anhand dieser Messmethode möglich. Im optimalen Fall ist bei Kenntnis von weiteren physikalischen Kenndaten, wie beispielsweise Brechungsindex, anhand der gemessenen Profile die Partikelgrößenverteilung basierend auf der Sinkgeschwindigkeitsverteilung berechenbar. Allerdings ergibt sich diese Möglichkeit in der Regel nur für gut charakterisierte bzw. charakterisierbare Stoffsysteme. Häufig ersetzt der Relativvergleich der Proben diese Berechnung.

Im LUMiSizer wird die Bewegung von Partikeln innerhalb eines definierten Probevolumens über Transmissionsänderungen von parallelem NIR-Licht detektiert, wie in Abbildung 3.2 (a)-(c) dargestellt. Die Proben befinden sich während der Analysen in transparenten Kunststoffküvetten, beispielsweise aus Polyamid, welche horizontal in die Zentrifuge eingesetzt und über einen mit Schraubverschluss versehenen Deckel im Rotorraum der Zentrifuge fixiert werden, siehe Abbildung 3.2 (a). Der untere Teil der Küvette, der am weitesten von der Rotorachse entfernt liegt, weist zwei gegenüberliegende, geschliffene Planflächen auf, welche paralleles NIR-Licht während der Analyse durchstrahlt. Aufgrund der Positionierung der Küvette zwischen der NIR-Lichtquelle und einem CCD-Sensor, sind die durch sedimentierende Partikel verursachten Transmissionsänderungen über eine Länge von ca. 25 mm detektierbar, siehe Abbildung 3.2 (b) und (c).

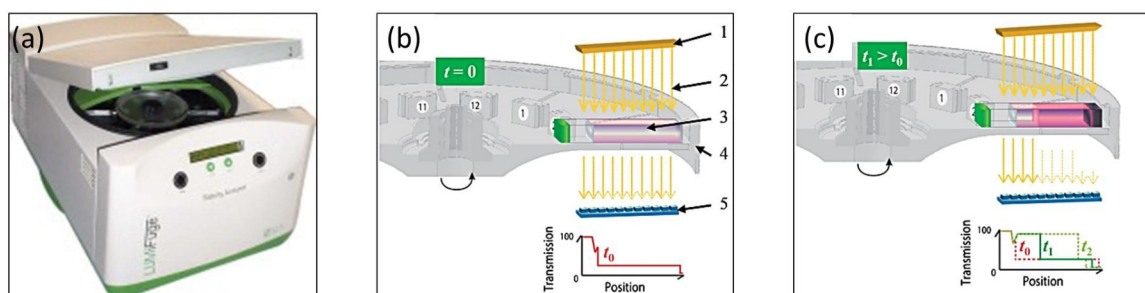


Abbildung 3.2.: Ansicht des geöffneten LUMiSizers (a) und schematische Darstellung der Funktionsweise (b) und (c) nach [97]

Im Laufe der Partikelsedimentation erfasst der Sensor orts- und zeitaufgelöste Transmissionsprofile. Über die zugehörige STEP-Software erfolgt die Berechnung der Sinkgeschwindigkeit aus der zeitlichen und örtlichen Änderung der Transmission. Im LUMiSizer ist eine maximale Beschleunigung von $2.320 \times g$ am Küvettenboden bei einer Drehzahl von 4.000 rpm einstellbar. Die Transmission ist, in Abhängigkeit der Einstellungen, bei zwei verschiedenen Wellenlängen von $\lambda = 470 \text{ nm}$ und $\lambda = 860 \text{ nm}$ detektierbar. Dies ermöglicht die Abdeckung eines breiten

Transmissionsbereiches, da die Partikel in Abhängigkeit ihrer Größe und Eigenschaften unterschiedliches Absorptionsverhalten zeigen. Weiterführende Informationen zum LUMiSizer und der STEP-Technologie sind bei Detloff et. al. und Lerche zu finden [97–100].

Im Vergleich zur Scheibenzentrifuge beschleunigt der LUMiSizer das gesamte Probenvolumen in den Küvetten zusammen mit dem Zentrifugenrotor. Daher tritt die Probe nicht in ein bereits vollständig beschleunigtes Volumen ein und es entsteht durch die sprunghafte Beschleunigung keine zusätzliche Scherbelastung. Ein weiterer Vorteil ist das geringe Probenvolumen und die Möglichkeit zur simultanen Messung von bis zu 12 Proben. Die Küvettengröße stellt allerdings auch einen Nachteil hinsichtlich der Vergleichbarkeit zwischen Laborzentrifuge und Produktionsapparat dar. Vor allem in den kleineren Küvetten mit einer Grundfläche von $2 \times 8 \text{ mm}^2$ und einem maximalen Probenvolumen von 800 μl fallen Randeffekte und gegenseitige Partikelhinderung stärker ins Gewicht und resultieren dadurch zu einem erhöhte Scale-Up-Risiko. In der Vorbereitung werden die Proben mit isotonischer Kochsalzlösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Alle Versuche erfolgten in Doppelbestimmung. Folgende Messparameter fanden für die Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit der Bakterienzellen (*ST*) bzw. Sporen (*BAC*) Anwendung:

- Drehzahl *Streptococcus thermophilus*: $3.600 \text{ rpm} \hat{=} 1720 \times g$
- Drehzahl *Bacillus*: $2.000, 3.000$ und $4.000 \text{ rpm} \hat{=} 582 \times g, 1.307 \times g$ und $2.325 \times g$
- Wellenlänge: 865 nm
- Küvettentyp: $2 \times 8 \text{ mm}^2$ Grundfläche, rechteckig, LUM-Typ 2
- Probenvolumen: $0,3 \text{ ml}$
- Messtemperatur *Streptococcus thermophilus*: 20°C
- Messtemperatur *Bacillus*: $30^\circ\text{C}, 30^\circ\text{C}$ und 40°C
- SOP: 60 Profile, 5 s Messintervall und 10 Profile, 30 s Messintervall und 20 Profile, 120 s Messintervall

Eine Charakterisierung der Sedimentkompression ist mittels LUMiSizer ebenfalls möglich. Durch eine schrittweise Erhöhung der Drehzahl wird das Sediment einer zunehmenden Beschleunigung ausgesetzt und abhängig von den Haufwerkseigenschaften komprimiert. In der Versuchsdurchführung sedimentieren die Partikel zunächst vollständig bei niedriger Beschleunigung. Im Anschluss erfolgt die Erhöhung der Drehzahl in 500 rpm -Schritten bis sich ein Gleichgewicht der Sedimenthöhe einstellt. Dies ist über den Instabilitätsindex erkennbar. Dieser definiert sich aus der

Intensitätsänderung zwischen zwei Extinktionsprofilen. Sobald diese konstant bleibt, ist die Sedimentation, bzw. Sedimentkompression abgeschlossen. Diese drehzahlbestimmte Methode zur Bewertung der Haufwerkseigenschaften in Zentrifugen ist in der Literatur bereits beschrieben [67]. Zur Bestimmung der Sedimentkompression mittels LUMiSizer wurden die Messparameter wie folgt angepasst:

- Drehzahl: 1.500 bis 4.000 *rpm* $\hat{=}$ 327 bis 2325 *x g*
- Wellenlänge: 865 *nm*
- Küvettentyp: 2 x 8 *mm*² Grundfläche, rechteckig, LUM-Typ 2
- Probenvolumen: 2 *ml*
- SOP: 700 Profile, 100 s Messintervall für Sedimentation und 60 Profile, 60 s Messintervall pro Drehzahlstufe

Alle Analysen sind in Doppelbestimmung ausgeführt.

3.2.3. Weitere Analysemethoden

Für die Interpretation der Ergebnisse aus den Laborexperimenten zur Scherbeanspruchung der Bakteriensporen und Bakterienzellen sind weiterführende analytische Methoden erforderlich. Diese sind in den folgenden Abschnitten dargestellt. Die Länge der Bakterienzellketten wurde durch **lichtmikroskopische Aufnahmen** mit automatisierter Bildauswertung, sowie als Anzahl der in einer Zellkette enthaltenen Kokken ermittelt. Die automatisierte Auswertung von ca. 100 - 200 Bakterienzellketten ermöglicht die Angabe einer verlässlichen prozentualen Verteilung der Kokkenanzahl je Bakterienzellkette. Für Vergleichszwecke dient der n_{90} -Wert herangezogen, der besagt, dass 90 % der Zellketten weniger oder dieselbe Anzahl Kokken aufweisen.

Die Visualisierung der kapsulären und freien EPS erfolgte ebenfalls am **Lichtmikroskop mittels Tuschefärbung**. Die Tuscheartikel können nicht in Bereiche aus hochmolekularen Polysacchariden eindringen, sodass kapsuläre EPS um die Bakterien als helle Hülle wahrnehmbar sind, oder im Fall von freien EPS als heller Bereich im sonst dunkel erscheinenden Medium erkennbar sind.

Die **Viskosität** des Medienüberstandes wurde mit einem Kugelfallviskosimeter bestimmt. Zur Bestimmung der Fließ- und Viskositätskurven diente ein Rheometer AR-G2 mit Doppelspaltgeometrie. Die Schergeschwindigkeit variierte von 0,1 bis 100 s^{-1} .

Für die Bewertung der Aufreinigungseffizienz von Mikro- und Ultrafiltration bei der Isolierung von Exopolysacchariden aus dem Zellmedium fanden quantitative Bestimmungsmethoden hinsichtlich Trockenmasse-, Kohlenhydrat- und EPS-Gehalt Anwendung. Diese sind in den nachfolgenden Abschnitten zusammengefasst.

Nach der Mikro- bzw. Ultrafiltration wurden etwa 30 ml des Feeds, des Permeats und des Retentats über Nacht bei -30°C in Rundkolben als Vorbereitung zur Gefriertrocknung eingefroren. Die Gefriertrocknung erfolgte in einem Alpha 2-4 LSCbasic Gefriertrockner (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz) bei 1,0 kPa, einer Eiskondensatortemperatur von -85°C und einer Trocknungsdauer von mindestens 48 Stunden.

Die Messungen des **Kohlenhydratgehalts** mit der Phenol-Schwefelsäure-Methode sind nach Dubois et al. durchgeführt [103]. Dabei erfolgte die Kalibrierung mit Glukose, sodass auch der EPS-Gehalt in Form von Glukoseäquivalenten $\text{mg}_{GE} \cdot \text{kg}^{-1}$ resultiert. Die Analysen erfolgten in Dreifachbestimmung.

Während der Kohlenhydratgehalt anhand der beschriebenen Methode bestimmbar ist, ist für die Zuordnung der EPS eine weitere Aufarbeitung und Analyse notwendig. Dementsprechend beinhaltet die gemessene Kohlenhydratmenge auch die aus Monosaccharid-Molekülen bestehenden EPS. Nach zusätzlichen Aufarbeitungsschritten zur Isolierung der EPS, resultiert die EPS-Masse ebenfalls aus der Phenol-Schwefelsäure-Methode.

Zusätzlich sind die Molekulargewichte der verschiedenen EPS-Fractionen anhand der Molekularmassenverteilung mittels **Größenausschlusschromatographie** (AZURA Assistant ASM 2.1L, Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin, Deutschland), gekoppelt mit einem Smartline 2300 RI-Detektor (Smartline 2300 RI-Detektor, Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin, Deutschland), bestimmbar. Etwa 100 μL der EPS-Proben wurden dafür über eine 0,45 μm Membran vorfiltriert und auf drei verschiedenen Säulen (1x PSS Suprema 100 Å + 2x PSS Suprema 3000 Å), sowie einer Vorsäule (PSS Polymer Standard Service, Mainz, Deutschland) gegeben. Verwendung fand ein Laufpuffer mit $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Natriumnitrat und $7,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Natriumsäure. Pullulan-Standards (PSS Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Deutschland) wurden zur Identifizierung der Peaks verwendet, wie zuvor von Nachtigall et al. beschrieben [104].

3.3. Scherapparaturen

3.3.1. Zahnkranzdispergierer

Das grundlegende Funktionsprinzip eines Rotor-Stator-Systems zur Erzeugung hoher Scherkräfte in einem Medium ist bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Daher wird an dieser Stelle nicht weiter auf die Funktionsweise eingegangen, sondern die Apparatekennzahlen des verwendeten Gerätes zusammengefasst. Für die vorliegende Arbeit wurde ein T25 digital Ultra Turrax Zahnkranzdispergierer von IKA verwendet. Die Drehzahl ist zwischen 3.000 *rpm* bis 25.000 *rpm* einstellbar. Zur Abschätzung der durch den Ultra-Turrax ins System eingetragenen Energie liegt die Annahme zu Grunde, dass der Ultra-Turrax ein ähnliches Strömungsprofil wie ein Scheibenrührer erzeugt. Diese Annahme legten auch schon Zlokarnik und Weiß in ihren Arbeiten zugrunde [105, 106]. Zunächst ergibt sich für die Reynoldszahl Re in der Nähe des Rotors der Zusammenhang

$$Re = \frac{n \cdot d_R^2 \cdot \rho_F}{\eta_F}. \quad (3.1)$$

Re ist dabei abhängig von der Drehzahl n , dem Rotorradius d_R , der Fluidichte ρ_F und der dynamischen Fluidviskosität η_F . Dieser Reynoldszahl ist über die Rührercharakterisierung nach Zlokarnik eine entsprechende Newtonzahl Ne zugeordnet [105]. Mit Hilfe dieser Newtonzahl ergibt sich der Leistungseintrag ins Medium P_L durch den Ultra-Turrax nach

$$P_L = Ne \cdot n^3 \cdot d_R^5 \cdot \rho_F. \quad (3.2)$$

Daraus ergibt sich für den volumenspezifischen Energieeintrag:

$$E_V = \frac{P_L \cdot t}{V}. \quad (3.3)$$

3.3.2. Hochdruckhomogenisator

Analog zum Zahnkranzdispergierer ist das Funktionsprinzip des Hochdruckhomogenisierens ebenfalls in Kapitel 2.2.1 dargestellt. Der folgende Abschnitt geht näher auf den im Rahmen

dieser Arbeit eingesetzten Hochdruckhomogenisator ein.

Der schematische Aufbau des Hochdruckhomogenisators Emulsiflex C5 von AVESTIN Europe GmbH (Mannheim, Deutschland) ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Probe wird von der Vorlage durch die Hochdruckpumpe zur Blende gefördert. Im verwendeten Laborgerät ist diese als Einkolbenpumpe ausgeführt. Durch die Hochdruckpumpe erhöht sich der Fluiddruck auf 2 bis maximal 200 MPa und das Fluid strömt unter hohem Druck durch die Querschnittsverengung der Blende. Mit Hilfe eines Manometers ist der an der Blende anliegende Homogenisierungsdruck regulierbar. Das Fluid unterliegt nach Austritt aus der Blende einer Druckentspannung, weshalb die im Fluid dispergierten Partikel hohen Scherkräften durch turbulente Strömungsverhältnissen und Kavitation ausgesetzt sind. Die in dieser Arbeit verwendete Blende hatte einen minimalen Öffnungsquerschnitt von $0,2 \text{ mm}$ über eine Länge von $0,4 \text{ mm}$, bei einem Austrittswinkel von $\beta = 0^\circ$.

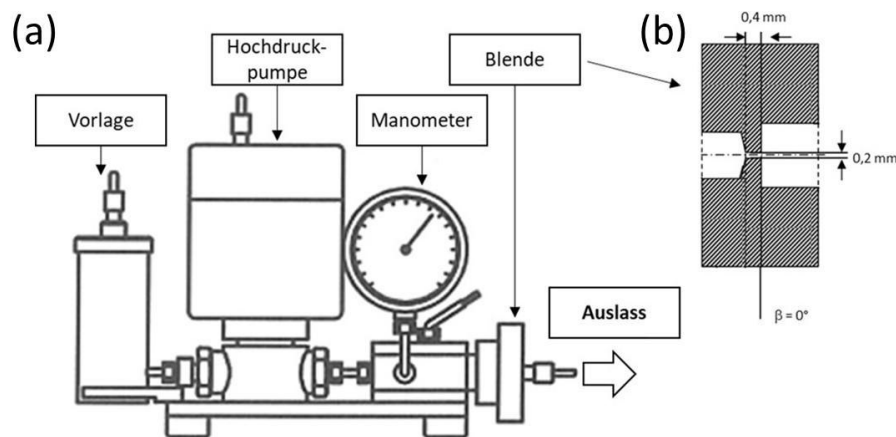


Abbildung 3.3.: Schematische Darstellung des Hochdruckhomogenisators Emulsiflex C5 von Avestin (a) und die Darstellung der charakteristischen Größen der Lochblende (b) nach [107]

Die eingetragene Energie durch die Scherung mit dem Hochdruckhomogenisator ist nach Wengeler et. al. abgeschätzt. Dabei gilt ein linearer Zusammenhang zwischen Homogenisierungsdruck p_H und Energieeintrag, sodass sich der volumenspezifische Energieeintrag E_V direkt aus dem anliegenden Homogenisierungsdruck über den Zusammenhang

$$E_V = p_H \quad (3.4)$$

ergibt [108].

3.4. Pilotanlagen

3.4.1. Dynotest

Die Mikro- und Ultrafiltration der Fermentationsbrühe und der Modell-PS-Lösungen wurde mit dem dynamischen Querstromfiltrationsgerät Dynotest durchgeführt. Aus dem temperierten Vorlagebehälter gelangt die Suspension druckgefördert in die Filtrationskammer mit einem Volumen von 0,36 l [109]. Darin befinden sich eine Membran, in der Regel eine Polymer-Flachmembran, und ein alternierender Diagonalscheibenrührer. Das Fluid und Verbindungen kleiner als die nominale Membranporengröße passieren diese und verlassen den Apparat als Permeat. Für die in der Kammer verbleibende Suspension, das sogenannte Retentat, erhöht sich die Konzentration der Anteile, die durch die Membran zurückgehalten werden. Dieses ist nach Versuchsende manuell zu entfernen.

Der Rührer befindet sich in einem Abstand von etwa 10 mm über der Membranoberfläche. Durch das parallele Strömungsprofil aufgrund der konvektiven Förderung durch den Rührer bleibt die Höhe der Fouling-Layer konstant, bzw. diese kann gar nicht erst entstehen. Aufgrund der spezifischen Rührergeometrie verstärkt sich dieser Effekt durch den Wechsel von Hoch- und Niederdruckbereichen an der Grenzfläche zur Membran.

Nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes stellt sich ein Betrieb mit nahezu konstantem Durchfluss ein. Die Permeatmasse wird während des gesamten Filtrationsprozesses über eine Online-Messwerterfassung gravimetrisch detektiert. Als Parameterstudie wurden der Transmembrandruck (TMP) von 0 bis 400 kPa, die Rührerdrehzahl von 0 bis 1.200 rpm und die Temperatur zwischen 20°C und 40°C variiert. Für den Filtrationsprozess kamen zwei verschiedene Flachmembranen der Firma MICRODYN-NADIR GmbH aus Wiesbaden zum Einsatz. Während die Abtrennung der restlichen Bakterienzellen und größerer Proteine mit einer NADIR MV020 T-Membran aus Polyvinylidenfluorid und einer nominalen Porengröße von 0,2 µm erfolgte, kam für die Ultrafiltration mit anschließender Waschung eine NADIR UP005 P-Membran aus Polyethersulfon mit einer nominalen Porengröße von $5,0 \cdot 10^3$ Da zum Einsatz. In Abbildung 3.4 ist die Frontalansicht der Dynotest (a) mit der alternierenden Anordnung der Rührerblätter, sowie eine schematische Darstellung der Filtrationskammer (b) zu sehen.

3.4.2. Tellerseparator

Um die maßstabsübergreifende Gültigkeit der erzielten Ergebnisse zu verifizieren, fanden Versuche mit dem industriell eingesetzten Tellerseparator Pathfinder 1 der Firma GEA Westfalia statt.

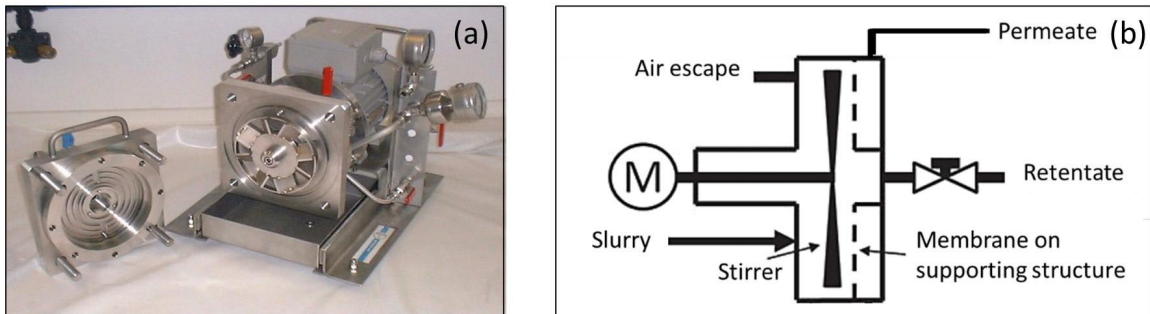


Abbildung 3.4.: Frontalansicht der Dynotest (a) und eine schematische Darstellung der Filtrationskammer (b) nach [109]

Die Funktionsweise eines Tellerseparators ist bereits in Kapitel 2.3.5 beschrieben. Zur Maßstabsübertragung der Sinkgeschwindigkeitsmessungen der ST-Proben wurden folgende Parameter am Tellerseparator gewählt:

- Drehzahl: 13.500 *rpm*
- Volumenstrom: 15 - 100 $L \cdot h^{-1}$
- Druck im Überlauf: 0,5 *MPa*.

Für jeden Volumenstrom wurde die Trübung am Überlauf erfasst. Über den Zusammenhang von Feedvolumenstrom und Trübung ist die Gewinnung von Informationen hinsichtlich der Sinkgeschwindigkeit der Bakterienzellen möglich. Die Parameter zur Maßstabsübertragung der Sedimentkompressionsanalysen der ST-Proben sind

- die Drehzahl 13.500 *rpm*,
- der Volumenstrom 20 $L \cdot h^{-1}$ und
- ein Druck im Überlauf von 0,5 *MPa*.

Die zeitabhängige Trübung dient als Kriterium, um Aussagen über die Eigenschaften des Sedimentes treffen zu können.

3.4.3. Ultrazentrifuge

Als Alternative zur Mikrofiltration bei der Aufreinigung von EPS aus zellfreiem Fermentationsmedium kam die Ultrazentrifuge Z11 der Firma Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH aus Lehr

zum Einsatz. Abbildung 3.5 zeigt eine Frontalansicht der Zentrifuge mit einer Beschreibung der einzelnen Teilkomponenten.

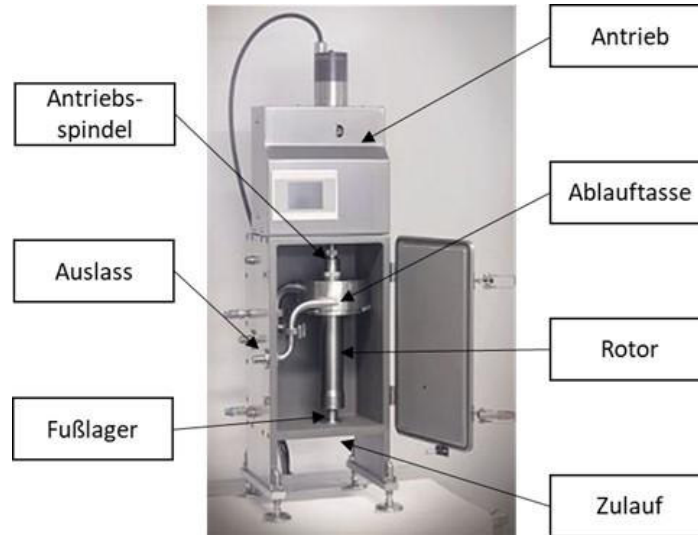


Abbildung 3.5.: Frontalansicht der CePa Z11 Röhrenzentrifuge

Der zylindrische Rotor der Zentrifuge ist vertikal angeordnet und hat ein Nennvolumen von 250 ml. Die Einleitung der Suspension erfolgt über eine Düse am unteren Ende des Rotors. Der Überlauf verlässt die Zentrifuge über eine Auffangwanne am oberen Ende des Rotors. Der Drehzahlbereich der Zentrifuge liegt zwischen 20.000 x g und 54.000 rpm , was einer Beschleunigung von 10.000 x g bis 70.000 x g an der Innenwand des Rotors entspricht. Die Durchflussrate ist mit einer pulsationsarmen Schlauchpumpe auf $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ eingestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Einfluss der Scherung auf die Sedimentationseigenschaften von Bakteriensporen

Die Sedimentationsgeschwindigkeit eines Partikels ist grundsätzlich abhängig von verschiedenen Einflussfaktoren. Sowohl die Partikeleigenschaften, wie Partikeldichte und Form, als auch charakteristische Größen des umgebenden Fluids, wie Fluidichte und -viskosität, sind entscheidend für das Absetzverfahren. Bei der Betrachtung biologischer Partikel, sind weitere beeinflussende Faktoren relevant. Die Fluideigenschaften tragen hier noch deutlicher zum Sedimentationsverhalten bei, da sie durch Stoffwechselprodukte, die in das umgebende Medium segregiert werden, bestimmt sind. Zudem sind Mikroorganismen teilweise in der Lage sich aktiv fortzubewegen und zu Zellverbänden zusammenzuschließen. Äußere Einflüsse, wie eine pH-Verschiebung können zu Zellaufschluss oder einer Änderung der Ladungsverteilung an der Zelloberfläche führen. Dadurch ändern sich die Eigenschaften des Kollektivs maßgeblich.

Aufgrund der komplexen Struktur von biologischen Materialien ist die „wahre“ Bestimmung der Sinkgeschwindigkeit in der Regel sehr aufwändig. Vielmehr sind Relativvergleiche zwischen gleichen Bakterienstämmen, im Speziellen gleicher Chargen, und einer definierten Variation einzelner Parameter, wie beispielsweise der Scherbeanspruchung, von Interesse. Um den Einfluss der Scherung auf die beiden grundsätzlichen Formen eines Bakteriums zu untersuchen, beschäftigt sich dieser Teil der Arbeit mit der Untersuchung von Bakteriensporen der Stämme *Bacillus licheniformis* und *Bacillus subtilis*. Der erste Abschnitt betrachtet den Einfluss äußerer Faktoren wie Temperatur und Konzentration auf die Sedimentationsgeschwindigkeit mit zwei unterschiedlichen Laboranalysemethoden. Mit den daraus für die Analyse optimalen Bedingungen wird die Scherbeanspruchung zweier unterschiedlicher Dispergierprinzipien auf die Sedimentationsgeschwindigkeit und Sedimentkompression evaluiert.

4.1.1. Temperatur- und Konzentrationseinfluss

Der erste Schritt betrachtet die Einflüsse von Temperatur und Konzentration auf die Sedimentationsgeschwindigkeit der Bakteriosporen. Im Fokus der Betrachtungen stehen Proben der unter standardisierten Fermentationsbedingungen hergestellten Stämme

- eines *Bacillus licheniformis* **BAC-A**,
- eines *Bacillus subtilis* **BAC-B**,
- sowie eines *Bacillus subtilis* **BAC-C**.

Die Temperatur wurde zwischen 20 °C, 30 °C und 40 °C variiert und die Partikelkonzentration relativ zur Ausgangsprobe durch die Zugabe von isotonischer Kochsalzlösung zwischen 100 % als unverdünnte Probe und einem Verdünnungsfaktor 1:0 bis zu etwa 5,9 % mit einem Verdünnungsfaktor 1:16 eingestellt. Dadurch ist der gekoppelte Einfluss von Probenkonzentration und Temperaturvariation auf die Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilung der Partikel analysierbar. Die Untersuchungen erfolgten in der optischen Zentrifuge LUMiSizer bei einer Beschleunigung von 3.000 rpm für 25 Minuten.

Abbildung 4.1 zeigt die Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilung von *BAC-A* in Abhängigkeit der Probenkonzentration (a) und den Einfluss der Temperatur auf die mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit (b).

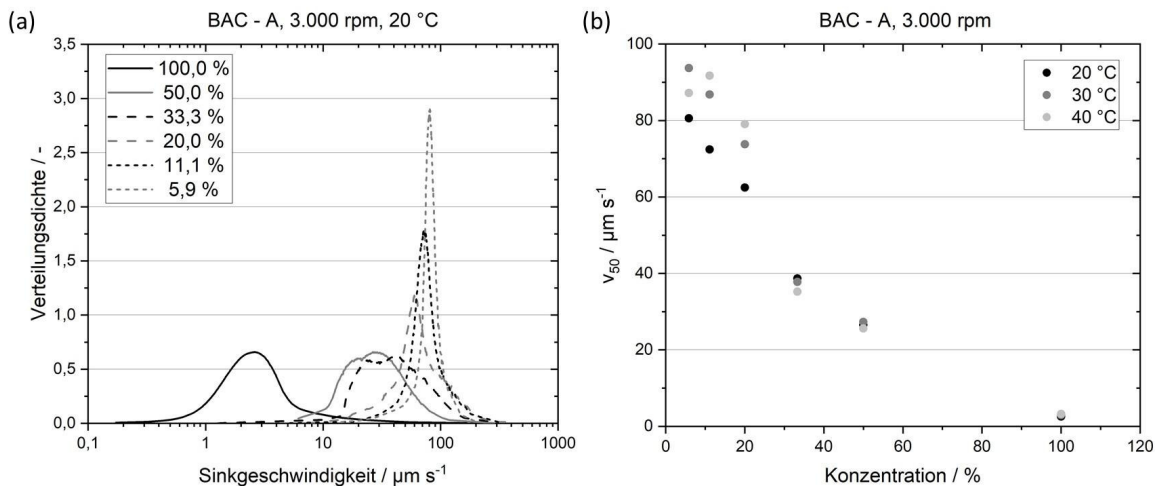


Abbildung 4.1.: Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilung (a) und Temperatureinfluss auf die mittlere Sinkgeschwindigkeit (b) in Abhängigkeit der Probenkonzentration (a) für den Bakterienstamm *BAC-A*

Wie in Abbildung 4.1 (a) ersichtlich, liegt eine deutliche Abhängigkeit der Sinkgeschwindigkeitsverteilung von der Probenkonzentration vor. Mit zunehmender Verdünnung ist eine Verschiebung der Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilung zu höheren Geschwindigkeitswerten erkennbar. Die unverdünnte Probe zeigt Sedimentationsgeschwindigkeiten zwischen $1 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ und $10 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ mit einem Maximum bei $2,6 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. Die Geschwindigkeitsverteilungsdichte hat insgesamt geringe Werte, da sich die Partikel über einen breiten Sinkgeschwindigkeitsbereich verteilen. Die Ausdehnung der Verteilungsbreite lässt sich mit der charakteristischen Kennzahl des Spans quantifizieren. Je größer der Span-Wert, desto breiter ist die Verteilung, wobei Span-Werte unter 1 für enge Verteilungen stehen. Anhand des Span-Werts von 2,5 für die unverdünnte Probe ist die Schlussfolgerung zu ziehen dass sich die Zellen über einen breiten Bereich verteilen.

Bereits eine Verdünnung von 1:1, d.h. die Zugabe von 50 % isotonischer Kochsalzlösung, zeigt eine deutliche Verschiebung der Kurve um etwa eine Dekade zu höheren Sedimentationsgeschwindigkeiten. Die Verteilungsform und der Span ändern sich dadurch nur geringfügig. Dies lässt darauf schließen, dass sich die Beschaffenheit und Anordnung des Zellkollektivs nicht ändert, sondern die Viskosität des Mediums durch die Verdünnung reduziert ist. Daraus ergibt sich die gleiche Form der Sinkgeschwindigkeitsverteilung bei an sich höheren Werten der Sinkgeschwindigkeit. Bei einer Verdünnung von 1:4 liegt der Span bei 1,5 und das Maximum des Peaks bei $59,7 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. Ab einer Verdünnung von 1:4, entsprechend einer Konzentration des Mediums von 20 %, ist auch eine Veränderung der Kurvenform ersichtlich. Die zuvor breite und flache Verteilungskurve entwickelt sich zu einem einzelnen Peak mit höheren Werten der Geschwindigkeitsverteilungsdichte und geringeren Span-Werten. Dieser Effekt verstärkt sich mit zunehmender Verdünnung. So bildet sich bei einer Verdünnung von 1:16 ein deutlicher Peak mit einer maximalen Sinkgeschwindigkeit von $80 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ aus. Die Verteilungsdichte nimmt dabei, verglichen mit der unverdünnten Probe, um das 5-fache zu. Der Span-Wert sinkt von ursprünglich 2,5 auf einen Wert von 0,6. Diese Beobachtung ist auf die zunehmende räumliche Entfernung der Zellen und somit der Abnahme der gegenseitigen Wechselwirkung zurückzuführen. Die enge Verteilung der Sinkgeschwindigkeit lässt zudem die Folgerung zu, dass die Partikel sich über einen engen Größenbereich verteilen und eine homogene Größenstruktur besitzen.

Im Vergleich dazu ist in Abbildung 4.1 (b) die temperatur- und konzentrationsabhängige Änderung der mittleren Sedimentationsgeschwindigkeit dargestellt. Die Erhöhung der Probentemperatur hat im Allgemeinen eine Reduktion der Fluidviskosität und -dichte zur Folge. Dies führt in der Theorie zu einer Erhöhung der Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen. Bei der unverdünnten Probe und geringen Verdünnungsverhältnissen von 1:1 und 1:2 ist allerdings ein Einfluss der Temperatur auf die mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit nicht erkennbar. Da aufgrund der reduzierten Fluidichte und -viskosität eine Steigerung der Sedimentationsgeschwindigkeit nach

Stokes zu erwarten wäre, muss folglich eine starke Abweichung zur Stokes'schen Einzelkornsedimentation vorliegen. Daher ist bei hohen Partikelkonzentrationen die Wechselwirkung zwischen den Partikeln hinsichtlich der Sinkgeschwindigkeit dominant gegenüber dem Temperatureinfluss auf die Viskosität.

Ab einem Verdünnungsfaktor von 1:4 und damit einer Feststoffkonzentration von 20 % bezogen auf die ursprüngliche Konzentration ist ein deutlicher Anstieg der mittleren Sedimentationsgeschwindigkeit mit zunehmender Temperatur zu beobachten. Ab dieser Verdünnung sind die Wechselwirkungen zwischen den Partikeln gering, sodass die Temperatur einen dominanten Einfluss auf die Sinkgeschwindigkeit hat. Damit beeinflussen sowohl die Partikelkonzentration als auch die Temperatur die Sinkgeschwindigkeitsverteilung maßgeblich.

Bei Betrachtung der Sinkgeschwindigkeitsverteilungen des ersten *Bacillus subtilis* Stammes *BAC-B* in Abbildung 4.2 fällt auf, dass lediglich die unverdünnte Probe ein Plateau bei einem Wert der Verteilungsdichte von etwa 1,2 aufweist. Alle verdünnten Proben haben bereits eine engere Peak-Breite im Vergleich zur unverdünnten Probe. Während sich die Peak-Breite und damit auch die Höhe der Verteilungsdichte mit der Verdünnung nur noch geringfügig ändern, nimmt die Sedimentationsgeschwindigkeit weiterhin zu. Die Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilung bei maximaler Verdünnung ist nahezu identisch zu der entsprechenden Kurve von *BAC-A*, sodass ähnliche Zellgrößen zu erwarten sind. Die nur noch geringfügige Änderung der Peak-Breite mit der Verdünnung deutet darauf hin, dass im Falle von *BAC-B* bereits bei einer Verdünnung von 1:1 keine konzentrationsbedingten Effekte mehr auftreten. Im Vergleich zu *BAC-A* ist davon auszugehen, dass die Zellkonzentration in der unverdünnten Probe im Falle von *BAC-B* niedriger ist. Dies wird auch durch Angaben von Chr. Hansen über die beiden Bakterienstämme bestätigt. Die Konzentration von *BAC-A* ist mit $1,2 \cdot 10^{10}$ Sporen pro *ml* im Vergleich zu *BAC-B* mit lediglich $1,09 \cdot 10^{10}$ Sporen pro *ml* um etwa 10 % höher.

Dies bestätigen auch die Ergebnisse der Temperaturvariation, wie in Abbildung 4.2 (b) dargestellt. Nahezu unabhängig von der Verdünnung ist ein klarer Zusammenhang zwischen mittlerer Sedimentationsgeschwindigkeit und Temperatur beobachtbar.

Mit *BAC-C* komplettiert ein zweiter *Bacillus subtilis* Stamm die untersuchten Bakterienstämme. Analog zu *BAC-A* und *BAC-B* ist in Abbildung 4.3 der Einfluss der Probenkonzentration auf die Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilungsdichte (a), sowie der Einfluss der Messtemperatur auf die mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit (b) dargestellt. Die unverdünnte Probe von *BAC-C* zeigte aufgrund sehr hoher Konzentrationen starke Signalschwankungen, die durch den überschrittenen Messbereich des LUMiSizers entstanden. Daher sind diese nicht weiter berücksichtigt. *BAC-C* zeigt eine sehr flache und breite Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilung nach Verdünnung auf 50 % Ausgangskonzentration der Probe. Dies lässt analog zu *BAC-A* auf eine hohe Partikelkonzentration

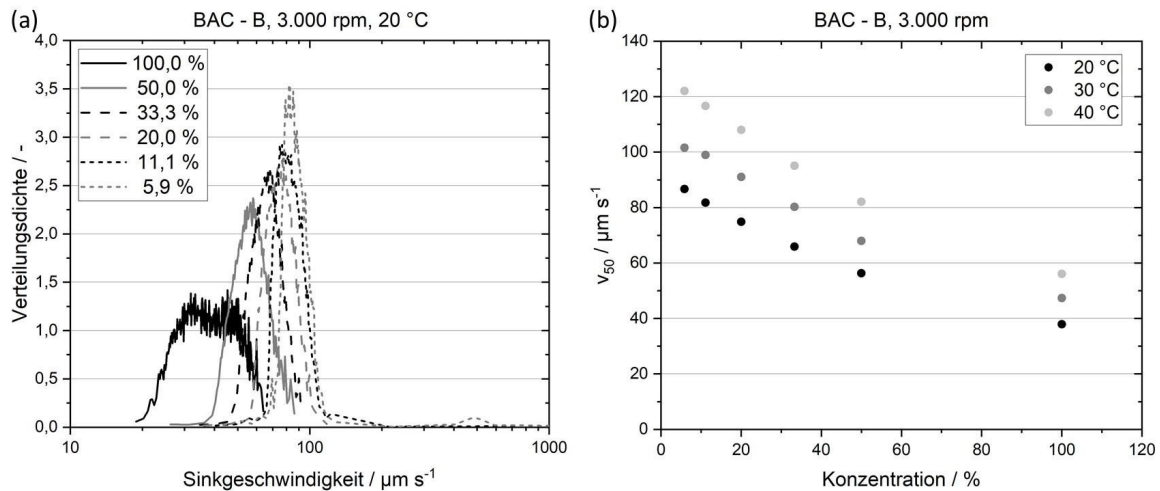


Abbildung 4.2.: Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilung (a) und Temperatureinfluss auf die mittlere Sinkgeschwindigkeit (b) in Abhängigkeit der Probenkonzentration für den Bakterienstamm *BAC-B*

in der Probe schließen, was durch die hohe Sporenzahl von $1,16 \cdot 10^{10}$ Sporen pro *ml* bestätigt wird.

Analog zu *BAC-A* verschiebt sich der in seiner Form nahezu nicht veränderte Peak mit zunehmender Verdünnung zu höheren Sinkgeschwindigkeiten. Ab einer Verdünnung von 1:4 verändert sich zudem die Peak-Form. Dies lässt wiederum darauf schließen, dass bei niedrigen Verdünnungen der Einfluss auf die Wechselwirkungen der Sporen gering ist, während der Viskositätseinfluss erkennbar ist. Auch bei hohen Verdünnungen bildet sich allerdings kein Peak mit einem einzelnen Maximum aus, sondern ein Hauptpeak mit kleineren Maximas bei geringeren und höheren Sinkgeschwindigkeiten. Der Hauptpeak liegt bei einer Sedimentationsgeschwindigkeit von etwa $100 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ und damit im selben Geschwindigkeitsbereich wie die Peaks von *BAC-A* und *BAC-B*. Zusätzlich ist ein Peak bei langsameren Sedimentationsgeschwindigkeiten zwischen $50 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ und $60 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, sowie kleine Peaks bei $105 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ und $110 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ zu erkennen. Der Peak bei langsameren Sedimentationsgeschwindigkeiten ist auf die Unterschiede hinsichtlich der Sporenbildung und des Sporenstadiums zurückzuführen. Sporen, die noch nicht vollständig ausgebildet sind, haften an der Mutterzelle und weisen somit eine geringere Dichtedifferenz und Sinkgeschwindigkeit auf. Die Peaks bei schnelleren Sedimentationsgeschwindigkeiten resultieren aus Zusammenlagerungen von Sporen aufgrund von EPS-Verbindungen an deren Oberfläche [110–112].

Im Hinblick auf die Temperaturabhängigkeit sind die Ergebnisse für *BAC-C* zwischen *BAC-A* und

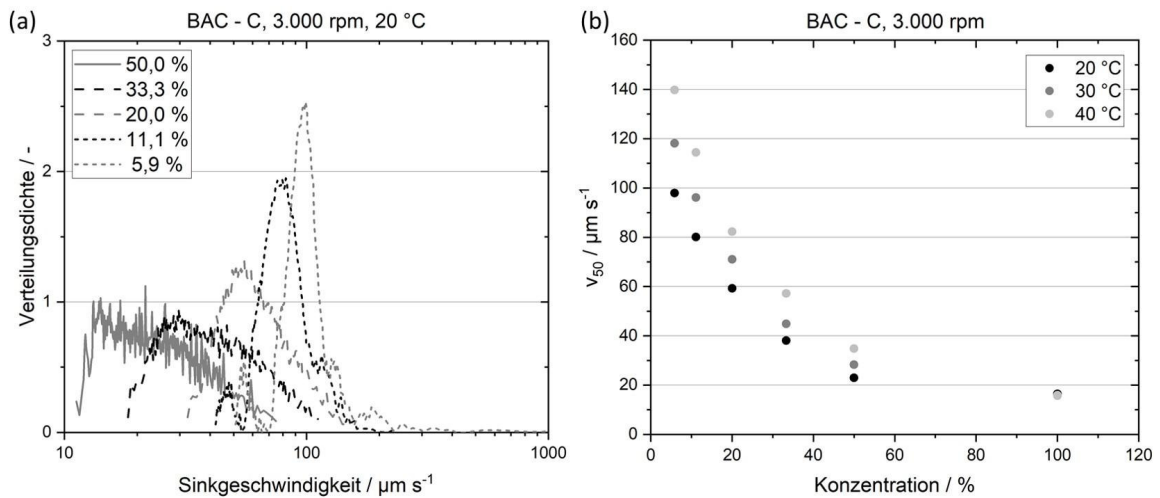


Abbildung 4.3.: Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilung (a) und Temperatureinfluss auf die mittlere Sinkgeschwindigkeit (b) in Abhängigkeit der Probenkonzentration für den Bakterienstamm BAC-C

BAC-B einzuordnen. In unverdünntem Zustand ist kein Unterschied durch die Temperaturerhöhung zu erkennen und mit steigender Verdünnung tritt dieser Unterschied deutlicher hervor.

Mit den bisherigen Versuchen wurde gezeigt, dass die Sinkgeschwindigkeit aller betrachteten Bakterienstämme mit zunehmender Verdünnung steigerbar ist. Aus verfahrenstechnischer Sicht, steigt damit allerdings auch das insgesamt zu prozessierende Suspensionsvolumen und damit die abzuführende Flüssigkeitslast. Von Interesse ist somit die Identifizierung eines Optimums zwischen der Erhöhung der Sinkgeschwindigkeit und der Menge des abzutrennende Flüssigkeitsvolumens. Als Kriterium dient das Effizienzverhältnis q aus mittlerer Sinkgeschwindigkeit v_{50} und Volumen $V_{Suspension}$

$$q = \frac{v_{50}}{V_{Suspension}}. \quad (4.1)$$

Je höher das Effizienzverhältnis ist, desto besser sind somit die Separationsbedingungen. In Abbildung 4.4 sind die Ergebnisse des Verhältnisses für die drei *Bacillus*-Stämme zusammengefasst. Grundlage ist das zu klärenden Suspensionsvolumen im unverdünnten Zustand von 1 Liter. Je größere Werte das Verhältnis q annimmt, desto schneller kann die Separation der Bakteriensporen aus dem zu klärenden Fluidvolumen erfolgen.

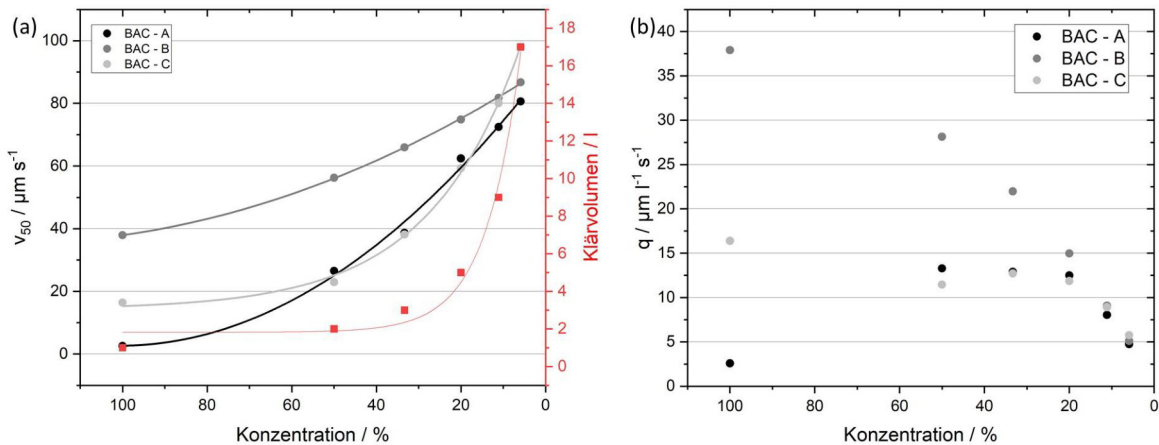


Abbildung 4.4.: Sinkgeschwindigkeit und zu klärendes Volumen (a), sowie Effizienzverhältnis q (b) in Abhängigkeit der Probenkonzentration

In Abbildung 4.4 (a) ist erkennbar, dass die Sinkgeschwindigkeit für die verschiedenen Bakterienstämme mit zunehmender Verdünnung steigt. Gleichzeitig nimmt das zu klärende Volumen in deutlich stärkerem Maße zu. Daraus lässt sich schließen, dass sich zwar die Sinkgeschwindigkeit erhöht, aber auch eine deutlich höhere Flüssigkeitsmenge bei der Separation abzutrennen ist. Anhand dieser gegenteiliger Effekte ergibt sich, wie in Abbildung 4.4 (b) zu sehen, ein Optimum für jeden Bakterienstamm.

Den höchsten Wert zeigt *BAC-B* in unverdünnter Form. Mit zunehmender Verdünnung sinkt das Verhältnis von mittlerer Sedimentationsgeschwindigkeit zu Volumen deutlich, sodass bei einer 16-fachen Verdünnung nur noch etwa 15 % des ursprünglichen Verhältniswertes zu erreichen ist. Das bedeutet, dass die gesteigerte Sedimentationsgeschwindigkeit die größere Menge an abzutrennendem Flüssigkeitsvolumen nicht kompensiert und die Separation dadurch ineffizienter ist. Auch *BAC-C* ist unverdünnt am effizientesten zu separieren, wobei die Separationseffizienz schlechter ist im Vergleich zu *BAC-B*. Folglich benötigt die Separation der gleichen Menge unverdünnter Probe von *BAC-C* mehr als die doppelte Zeit im Vergleich zum unverdünnten Stamm *BAC-B*.

BAC-A zeigt in unverdünnter Form den geringsten Wert aller Proben für das Verhältnis von mittlerer Sedimentationsgeschwindigkeit zu Volumen und lässt sich folglich schlechter separieren. Die Separation von 1 Liter unverdünntem *BAC-A* benötigt dieselbe Zeit wie die Trennung von 15 Liter unverdünntem *BAC-B*. Durch eine 1:1 Verdünnung von *BAC-A* ist die Effizienz zunächst steigerbar, sodass q auf den etwa 5-fachen Wert ansteigt und die Separationszeit damit um etwa 80 % reduziert. Weitere Verdünnungen resultieren allerdings wieder in einer verminderten Abtrenneffizienz.

Anhand dieser Auswertung lässt sich die grundsätzliche Schwierigkeit bei der Abtrennung biologischer Materialien verdeutlichen. Obwohl *BAC-B* und *BAC-C* zur gleichen Gattung gehören, unterscheiden sie sich maßgeblich in ihrer Abtrenneffizienz. Für die Abtrennung von *BAC-C* im Vergleich zu *BAC-B* sind, bei gleicher Verdünnung, deutlich längere Prozesszeiten nötig. Unterscheidet sich, wie am Beispiel von *BAC-A* gezeigt, zudem der Bakterienstamm, sind größere Abweichungen möglich. Anhand der dargestellten Methode ist es damit auch möglich mit geringem experimentellem Aufwand schnell eine Aussage zu den Separationseigenschaften von Fermentationsbrühen hinsichtlich der Verdünnung zu treffen.

4.1.2. Einfluss gezielter Scherbeanspruchung

Um die Auswirkungen der Scherbeanspruchung auf die Sedimentationsgeschwindigkeit von *Bacillus licheniformis* und *Bacillus subtilis* in den folgenden Versuchen treffend zu beurteilen, sind einheitliche Analyseparameter hinsichtlich Probenverdünnung und Messtemperatur erforderlich. Daher ist es essenziell alle Proben im selben Maße zu verdünnen, um die Effekte durch Partikelwechselwirkungen in vergleichbarem Maße zu reduzieren. Um zusätzliche Einflüsse durch Dichte- oder Viskositätsänderungen des Fermentationsmediums zu minimieren, ist weiterhin eine einheitliche Messtemperatur zu gewährleisten. Da die ursprüngliche Partikelkonzentration der drei untersuchten *Bacillus*-Kulturen starke Unterschiede aufweist, sind je Versuch drei Verdünnungsverhältnisse von 1:2, 1:4 und 1:8 Teil der LUMiSizer-Analysen. Somit ist trotz der stark unterschiedlichen Partikelkonzentration gewährleistet, aussagekräftige Messergebnisse zu erhalten und eventuelle Konzentrationseinflüsse bei den nachfolgenden Messungen zu visualisieren. Als Messtemperatur für alle nachfolgenden Analysen wurde 20 °C gewählt. Die Scherbehandlung der Proben führte der Hersteller mittels Hochdruckhomogenisator bei den Drücken 15, 30, 45 und 60 MPa durch. Die resultierenden Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilungen für die mechanisch belasteten Proben des Stammes *BAC-A*, zur besseren Vergleichbarkeit ergänzt um die unbelastete Probe bei 0 MPa, sind in Abbildung 4.5 dargestellt.

Die Sinkgeschwindigkeitsverteilung der unbelasteten Probe bei 0 MPa zeigt eine sehr breite Verteilung, sowie eine Unterteilung in drei Abschnitte. Der Peak bei einer Sinkgeschwindigkeit von etwa $60 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ stellt das Maximum der Verteilung und gleichzeitig den größten Anteil des Kollektivs dar und setzt sich aus Einzelsporen und Sporenpaaren zusammen. Bei den schneller sedimentierenden Partikeln handelt es sich um Zellketten, deren Einzelzellen keine Sporenbildung initiiert haben. Während die Sporenbildung eine Möglichkeit der Zelle ist auf ungünstige Umgebungsbedingungen zu reagieren, kann auch die Zellkettenbildung eine Überlebensstrategie sein. Durch den Zusammenschluss einzelner Zellen in Verbänden ist der Austausch von Stoffwechselprodukten und gegenseitiger Schutz möglich. Für *BAC-A* liegt der Anteil an Zellen, die keine

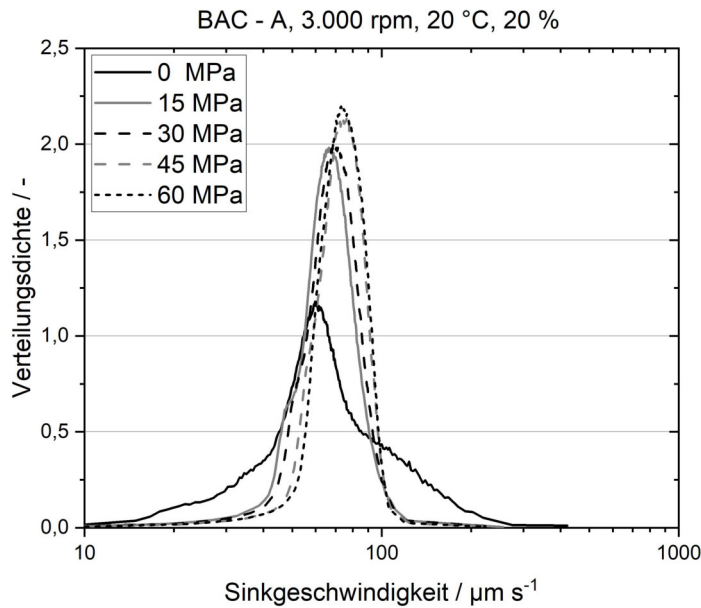


Abbildung 4.5.: Sinkgeschwindigkeitsverteilung von Bakterienzellen des Bakterienstamms BAC-A bei unterschiedlichen Scherbelastungen

Sporulation durchlaufen, bei etwa 15 %.

Gleichzeitig können nicht nur Einzelzellen Cluster-Strukturen bilden, sondern auch Sporen sich zu größeren Verbänden anordnen. Denn als Reaktion auf Stresssituationen erfolgt nicht nur die Sporenbildung, sondern auch eine vermehrte EPS-Synthese durch die Zelle in ihrer Wachstumsphase. Durch den adhäsiven Charakter der EPS-Strukturen haften auch die Sporen teilweise aneinander und können Agglomerate bilden. Somit besteht der schneller sedimentierende Anteil des Partikelkollektivs aus einer Mischung von Zellketten und Sporenagglomeraten [110–112]. Im Vergleich dazu ergibt sich die Fraktion mit geringerer Sinkgeschwindigkeit als der Durchschnitt durch eine Mischung aus Einzelzellen, Zellpaaren und einzelnen Sporen, die größtenteils von kapsulären EPS umschlossen sind. Dabei kann auch die Dicke der EPS-Schicht von Spore zu Spore variieren und deren Sedimentationsgeschwindigkeit beeinflussen.

Im Vergleich zur unbelasteten Probe zeigt die Scherbeanspruchung einen deutlichen Effekt auf die Sinkgeschwindigkeitsverteilung. Bereits bei der geringsten Scherbelastung von 15 MPa ist die Verteilungsbreite deutlich enger und die Verteilungsdichte höher. Die Fraktion schneller sedimentierender Partikel ist nach der Scherung nicht mehr vorhanden, während auch der Anteil an Partikel mit geringer Sedimentationsgeschwindigkeit abnimmt. Dies deutet auf eine Zerstörung von Zellketten und Partikelagglomeraten hin. Die dabei entstehenden kürzeren Ketten und kleineren Agglomerate sedimentieren daher langsamer und die Sinkgeschwindigkeitsverteilung vereinheitlicht sich über das Partikelkollektiv. Die Zunahme der Sinkgeschwindigkeit langsam

sedimentierender Partikel durch das Einbringen einer Scherbeanspruchung ist auf das Abscheren der EPS-Schicht zurückzuführen. Der Einsatz eines Hochdruckhomogenisators führt somit zur Vereinheitlichung des Zellkollektivs hinsichtlich der Sinkgeschwindigkeit.

Bei sehr hohen Scherbelastungen von 45 und 60 MPa zeigt sich eine leichte Tendenz zu höheren Sinkgeschwindigkeiten bei geringfügig reduzierter Peak-Breite. Diese Verschiebung deutet auf sich überlagernde Effekte wie die Abscherung weiterer kapsulärer EPS, sowie die Absenkung der Medienviskosität durch die Scherbeanspruchung hin [113]. Abbildung 4.6 zeigt den Einfluss der Scherbeanspruchung auf die Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilungen der Bakterienstämme *BAC-B* (a) und *BAC-C* (b).

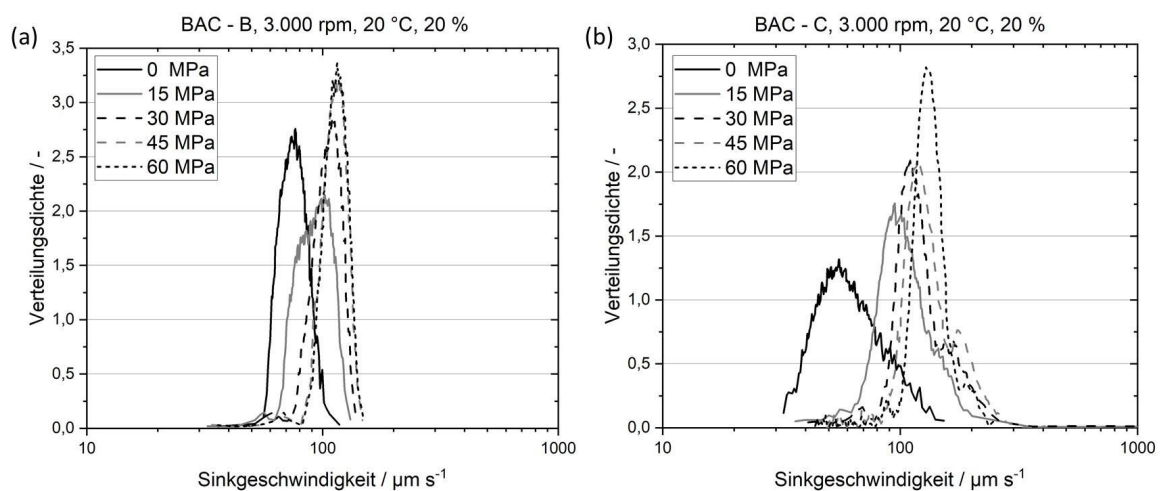


Abbildung 4.6.: Sinkgeschwindigkeitsverteilung von Bakterienzellen des Bakterienstamms *BAC-B* (a) und *BAC-C* (b) bei unterschiedlichen Scherbelastungen

Im Gegensatz zu *BAC-A* zeigt die Verteilung der unbelasteten Probe von *BAC-B* bereits eine geringere Verteilungsbreite, sowie höhere Verteilungsdichten. Durch die Scherung bei 15 MPa verbreitert sich die Kurve zunächst etwas und verschiebt sich hin zu höheren Sedimentationsgeschwindigkeiten. Mit zunehmender Scherintensität erhöht sich die Sedimentationsgeschwindigkeit bei gleichzeitig geringerer Verteilungsbreite und höherer Verteilungsdichte. Der maximale Wert für die Verteilungsdichte reduziert sich nach der Scherung mit 15 MPa zunächst von 2,7 auf 2,1 und steigt mit zunehmender Scherintensität wieder auf einen Wert über 2,7 an. Dieser geringere Wert von 2,1 und die Lokalisierung zwischen der unbelasteten und den restlichen einer Scherbelastung ausgesetzten Proben hinsichtlich der Sedimentationsgeschwindigkeit legt die Vermutung nahe, dass bei der 15 MPa Probe zwei Fraktionen vorliegen, die sich in ihrer Geschwindigkeit überlagern.

Von einem Teil der Sporen sind die kapsulären EPS durch die Scherbeanspruchung abgelöst, während ein in etwa gleich großer Teil noch mit kapsulärem EPS umhüllt ist. In der Sinkgeschwindigkeitsverteilungskurve bei 15 MPa sind annähernd zwei Peaks zu erkennen, die sich überlappen und auf die beiden Fraktionen hindeuten. Somit findet bei einer Scherbeanspruchung von 15 MPa keine vollständige Entfernung der EPS-Schicht von der Sporenoberfläche statt, da der Scherdruck nicht ausreicht, um die haftenden Kräfte zwischen EPS und Spore zu überwiegen. Die Tatsache, dass die Sporen mit kapsulären EPS dennoch schneller sedimentieren als bei der unbelasteten Probe ist in einer Veränderung der Medienviskosität aufgrund der Scherbeanspruchung begründet. Dieser Effekt ist auch bei der Betrachtung der weiteren Belastungsstufen erkennbar. Mit höheren Scherbeanspruchungen nimmt die Verteilungsbreite ab. Ab einem Homogenisierungsdruck von 30 MPa ist kein zweiter Peak mehr vorhanden. Folglich ist die Abscherung der EPS-Schicht von den Zellen nahezu vollständig. Die Sinkgeschwindigkeit ist dennoch geringfügig höher, je größer die Scherbelastung ist. Dies bekräftigt die Vermutung von einer reduzierten Medienviskosität durch die Scherung.

Der Einfluss der Scherung auf die Viskosität des Mediums kann mit der Zusammensetzung des komplexen Fermentationsmediums begründet werden. Während der Wachstums- und Sporenbildungsphase segregieren die Zellen Stoffwechselprodukte in das umgebende Medium. Dabei handelt es sich in der Regel um komplexe Makromoleküle und Proteine, die einen deutlichen Einfluss auf die Mediumviskosität haben. Aufgrund ihrer Oberflächenwechselwirkungen und dreidimensionalen Struktur können sie erheblich zur Viskosität des Mediums beitragen. Bei einer Scherbeanspruchung kommt es teilweise zur Ausrichtung der Moleküle in der Strömung und einer Vereinzelnung von Strukturen. Dadurch ist die Reduktion der Medienviskosität erklärbar [113].

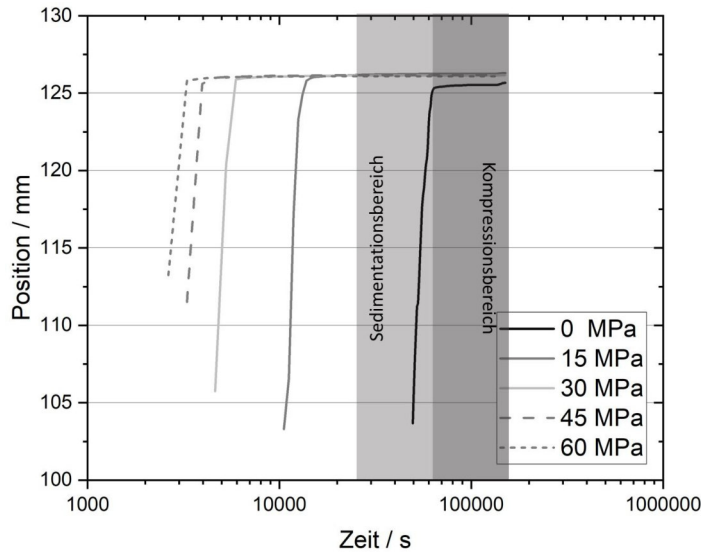
Die deutlichste Änderung im Sinkgeschwindigkeitsverhalten aufgrund der Scherbeanspruchung ist bei dem Bakterienstamm *BAC-C* erkennbar. Die sehr breite und flache Verteilung der unbelasteten Probe wird mit zunehmender Scherbeanspruchung schmaler und höher. Die Verteilungen verschieben sich mit gesteigerter Scherintensität zu höheren Sedimentationsgeschwindigkeiten. Dies ist analog zu den beiden anderen Stämmen auf eine Reduktion der Medienviskosität und der Abscherung von EPS zurückzuführen. Bei 30 und 45 MPa ist ein zweiter kleiner Peak bei höheren Sedimentationsgeschwindigkeiten zu erkennen. Dabei handelt es sich vermutlich um Zellketten oder Sporenagglomerate, die bereits vorher vorhanden waren, aber durch die Breite des Peaks nicht eindeutig erkennbar sind. Die Scherbeanspruchung von 30 und 45 MPa führt zur Zerstörung der ersten Zellketten oder Sporenagglomerate, sodass sich ein zweiter Peak ergibt. Bei noch höheren Belastungen von 60 MPa ist der Anteil schneller sedimentierender Zellen und Sporen nicht mehr zu erkennen, sodass von einer vollständigen Zerstörung der Ketten oder Sporenagglomeraten auszugehen ist.

4.1.3. Einfluss gezielter Scherbeanspruchung auf Sedimentkompression

Die Sedimentkompression hat eine große Bedeutung hinsichtlich der verfahrenstechnischen Umsetzung. Die Fließ- und Kompaktierungseigenschaften von Sedimenten, beispielsweise in Zentrifugen, sind entscheidend für deren Austrag. Hierbei trägt ein stark verdichtetes Sediment zu einer Reduktion der Austragszyklen bei, kann aber gleichzeitig zu einem erschwerten Widerstand beim Austrag führen. Zudem ist die Sedimentkompression vorteilhaft hinsichtlich einer reduzierten Restfeuchte des Endproduktes. Im Falle des Feststoffes als Wertprodukt ist ein höherer Reinigungseffekt und im Falle des Fluids als Wertprodukt eine höhere Ausbeute erreichbar. Aus diesem Grund ist für die Bewertung des Einflusses der Scherbeanspruchung auf die Abtrennung von biologischen Materialien sowohl die Betrachtung der Sinkgeschwindigkeitsverteilung als auch die Sedimentkompression notwendig. Dieses Kapitel thematisiert den Einfluss der Scherung auf die Sedimentkompression der Sporen der Bakterienstämme *BAC-A*, *BAC-B* und *BAC-C*.

Die Sedimentkompression ist als Abnahme der Sedimenthöhe mit zunehmender Sedimentbelastung definiert und anhand des LUMiSizers optisch detektierbar. Bei unterschiedlichen Beschleunigungen ist die Sedimenthöhe anhand der Position in der Küvette bestimmbar. Dazu erfolgt eine schrittweise Erhöhung der Drehzahl und somit die Bestimmung der Kompressibilität des Sedimentes in Abhängigkeit der wirkenden Zentrifugalbeschleunigung. Dabei dient der zeitliche Verlauf der Position der Phasengrenze zwischen Sediment und Klarphase bei einem definierten Transmissionswert als Bewertungskriterium für die Sedimentationskinetik. Die Ergebnisse sind beispielhaft für den Bakterienstamm *BAC-C* in Abbildung 4.7 dargestellt.

Die Sedimentationskinetik unterteilt sich im Wesentlichen in zwei Abschnitte. Der erste Abschnitt zeigt die Sedimentation der Partikel aus der Suspension, in welcher der Abstand der Phasengrenze zum Rotationsmittelpunkt in den LUMiSizer-Küvetten mit der Messdauer steil zunimmt. Während der Sedimentationsphase haben die Partikel noch keinen direkten Kontakt zueinander, sondern werden nur durch die Beeinflussung der Strömungsverhältnisse direkt um das Partikel beeinflusst. Im zweiten Abschnitt hat sich dagegen ein Partikelnetzwerk mit physischem Kontakt der Partikel zueinander gebildet. Es erfolgt nur noch eine geringe Änderung des Abstandes zum Rotationsmittelpunkt mit zunehmender Messdauer, da sich das Sediment in Abhängigkeit der wirkenden Kräfte kompaktiert. Den Übergang zwischen den beiden Bereichen bildet eine sprunghafte Steigungsänderung, welche damit den Zeitpunkt des Übertritts von Sedimentbildung zu Sedimentkompression definiert. Die Messdauer bis zum Erreichen des Übergangs gibt Informationen über das jeweilige Sedimentationsverhalten der Probe. Je länger die Messdauer bis zu diesem Punkt andauert, desto geringer ist die Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel. Gleichzeitig gibt die Position in der Küvette, an welcher der Übergang stattfindet, indirekt die Sedimenthöhe wieder. Eine Aussage

Abbildung 4.7.: Sedimentationskinetik am Beispiel von *BAC-C*

über die Kompressibilität kann mit Hilfe der Geradensteigung im Kompressionsbereich erfolgen. Das Sediment ist umso kompressibler, je höher die Steigung der Kompressionsgeraden ist, sodass im Umkehrschluss bei einer horizontal verlaufenden Kompressionsgeraden keine Sedimentkompression auftritt. Folglich ist anhand der Sedimentationskinetik eine qualitative Aussage über den Einfluss der Scherbeanspruchung hinsichtlich Sedimentationsgeschwindigkeit, Sedimenthöhe und Sedimentkompressibilität möglich [114, 115].

Für den Bakterienstamm *BAC-C* führt eine Scherbeanspruchung, wie bereits in Kapitel 4.1.2 gezeigt, zu einer Erhöhung der Sedimentationsgeschwindigkeit. Gleichzeitig ergeben sich durch die Scherung kompaktere Sedimente. Dabei ist eine Scherbeanspruchung von 15 MPa ausreichend, um ein unter Scherung maximal kompaktiertes Sediment zu erhalten. Ein weiterer Schereintrag führt zwar zu einer weiteren Erhöhung der Sinkgeschwindigkeit, die Höhe des Sediments bleibt davon allerdings unbeeinflusst. Für eine bessere Sichtbarkeit ist die Entwicklung der Sedimenthöhe in Abhängigkeit der relativen Zentrifugalbeschleunigung, sowie die daraus resultierende Sedimentkompression im Folgenden dargestellt.

Abbildung 4.8 (a) illustriert den Verlauf der Sedimenthöhe abhängig von der relativen Zentrifugalbeschleunigung des Bakterienstamms *BAC-C*. Hier ist eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Scherbeanspruchungen erkennbar. Im Falle der unbelasteten Probe nimmt die Sedimenthöhe mit zunehmender Beschleunigung ab. Die Krafteinwirkung führt somit zu einer Kompression des Haufwerkes. Beanspruchte Proben zeigen eine niedrigere Sedimenthöhe, die

sich durch eine Erhöhung der Beschleunigung nur unwesentlich ändert.

Analog ist die Sedimentkompression in Abbildung 4.8 (b) in Abhängigkeit der relativen Zentrifugalbeschleunigung dargestellt. Während mit Scherung beaufschlagte Proben nur eine minimale Steigung in Abhängigkeit der Beschleunigung zeigen, ist diese im Falle der unbelasteten Probe deutlich erkennbar. Dieser Umstand ist durch die Entfernung der EPS-Schicht durch die Scherbelastung erklärbar. Die EPS-Schicht führt zu einem höheren Abstand der Sporen im Haufwerk. Durch die zunehmende Beschleunigung verdichtet sich die EPS-Schicht und der Abstand zwischen den Sporen verringert sich. Daraus resultiert eine Sedimentkompression. Ist die EPS-Schicht durch die Scherung entfernt, lagern sich die Sporen schon im Sedimentationschritt näher aneinander und bilden ein kompakteres Haufwerk. Eine zusätzliche Belastung durch die Beschleunigung führt zu keiner weiteren Sedimentkompression, da die Sporen bereits sehr dicht gepackt sind. Gleichzeitig zeigen die Sporen bei den durch die Beschleunigung aufgeprägten Kräften keine elastischen Eigenschaften, wie beispielsweise eine Verformung der Zellstruktur.

Die Ergebnisse der Sinkgeschwindigkeitsanalyse stützen diese These. Die Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilung nimmt in ihrer Breite bereits bei geringen Scherungen deutlich ab und ändert sich in ihrer Form durch eine weitere Erhöhung der Scherbelastung nicht mehr. Die weitere Verschiebung zu höheren Sinkgeschwindigkeiten liegt in der Änderung der Mediumviskosität begründet. Damit erfolgt die Entfernung der EPS-Schicht bereits bei geringen mechanischen Scherbelastungen.

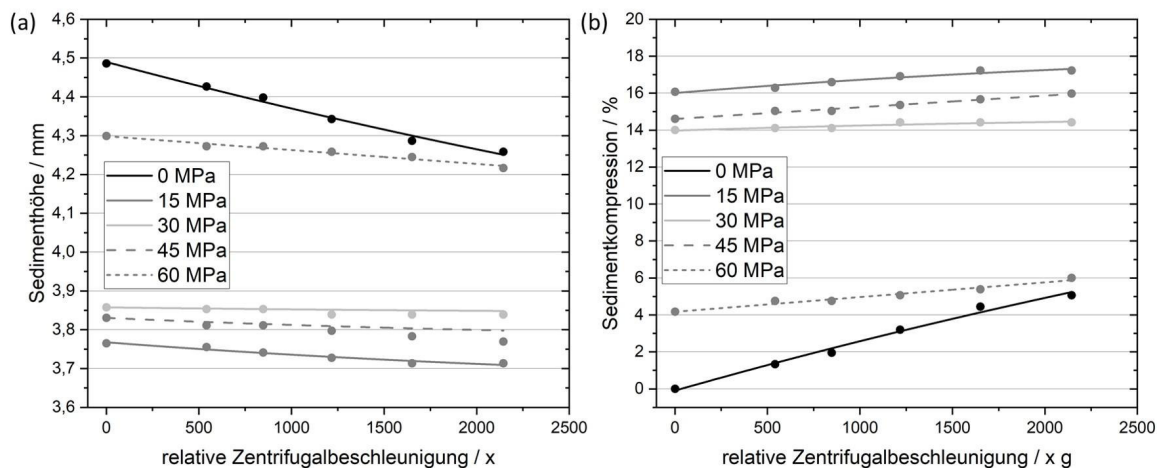


Abbildung 4.8.: Sedimenthöhe (a) und Sedimentkompression (b) in Abhängigkeit der relativen Zentrifugalbeschleunigung für den Bakterienstamm BAC-C

In Abbildung 4.9 (a) ist die Abhängigkeit der Sedimenthöhe von der relativen Zentrifugalbeschleunigung für den Bakterienstamm BAC-B dargestellt. Im Gegensatz zu BAC-C wird auch nach der Scherbelastung eine weitere Kompaktierung des Sediments durch die Erhöhung der

Beschleunigung erzielt. Analog zu *BAC-C* ist die absolute Höhe des Sediments bereits durch eine moderate Scherbelastung reduziert. Gleichzeitig nimmt die Sedimenthöhe auch bei den belasteten Proben mit zunehmender Beschleunigung geringfügig ab. In Abbildung 4.9 (b) ist dieser Effekt in der Darstellung der anteiligen Sedimentkompression in Abhängigkeit der relativen Zentrifugalbeschleunigung noch stärker verdeutlicht. Die Sedimentkompression ist für die unbelastete Probe steiler im Vergleich zu den Proben nach der Scherbelastung. Allerdings weisen auch diese eine deutliche Steigung auf. Wie bereits bei der Analyse der Sinkgeschwindigkeitsverteilung in Kapitel 4.1.2 identifiziert, beeinflusst die Scherung die Sporen des Bakterienstammes *BAC-B* weniger stark als die beiden anderen betrachteten Stämme. Das kompressible Verhalten aufgrund der zunehmenden Beschleunigung ist in diesem Fall auf elastische Eigenschaften oder instabilere Zellstrukturen der Sporen von *BAC-B* zurückzuführen.

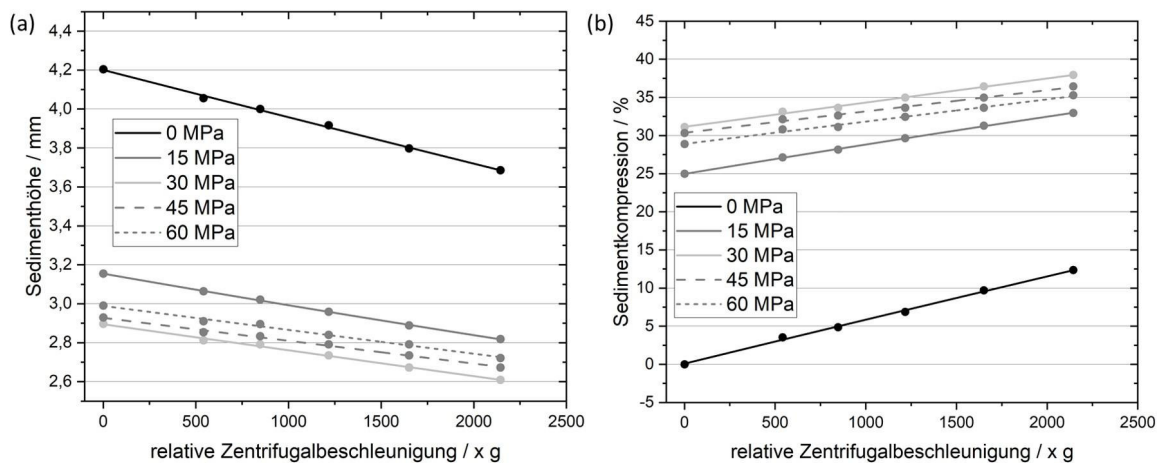


Abbildung 4.9.: Sedimenthöhe (a) und Sedimentkompression (b) in Abhängigkeit der relativen Zentrifugalbeschleunigung für den Bakterienstamm *BAC-B*

Ein analoges Verhalten zu *BAC-C* zeigt sich für den Bakterienstamm *BAC-A*. Die Ergebnisse für die Sedimenthöhe sind in Abbildung 4.10 (a) und für die Sedimentkompression in Abbildung 4.10 (b) dargestellt. Hier wird deutlich, dass die Scherbeanspruchung zunächst einen Einfluss auf die absolute Sedimenthöhe hat. Auch die Sedimentkompression zeigt nach einer Scherung mit 15 MPa noch eine deutliche Steigung. Bei höherer Scherbelastung ist nur noch, im Rahmen der Messungenauigkeit, eine geringe Abnahme der Sedimenthöhe mit der Beschleunigung zu erkennen. Dieser Effekt ist, unter Berücksichtigung der Änderung der Sinkgeschwindigkeitsverteilung unter Scherbeanspruchung, auf das Entfernen der EPS-Schicht durch die Homogenisierung begründet. Bereits bei geringen Scherbelastungen werden die EPS-Schichten von der Spore entfernt, sodass sich diese kaum noch auf die Sedimentkompression auswirkt.

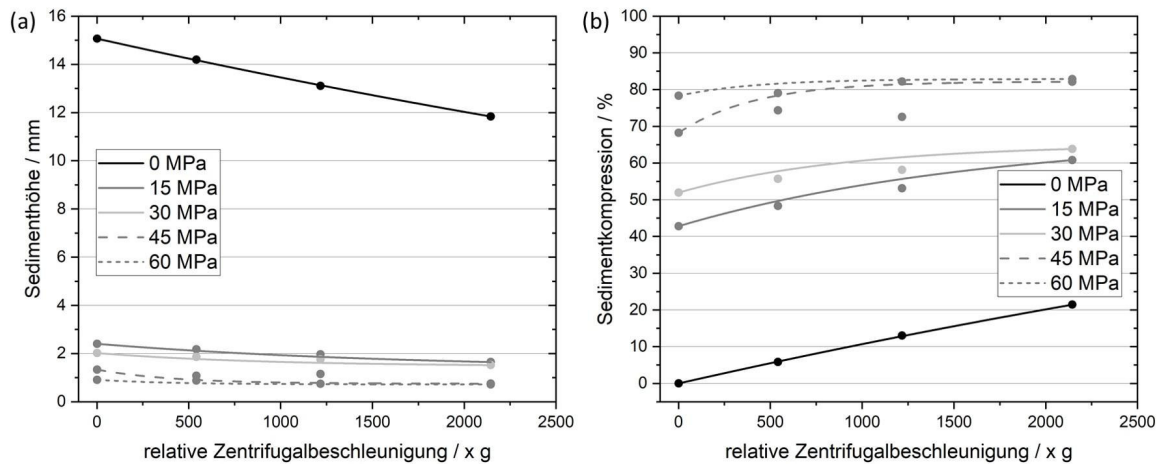


Abbildung 4.10.: Sedimenthöhe (a) und Sedimentkompression (b) in Abhängigkeit der relativen Zentrifugalbeschleunigung für den Bakterienstamm BAC-A

4.2. Einfluss der Scherung auf die Sedimentationseigenschaften von vitalen Zellen

Kapitel 4.1 thematisierte die Eigenschaften von Sporen hinsichtlich der Sinkgeschwindigkeit und Sedimentkompression, sowie den Einfluss einer Scherbeanspruchung auf deren Sedimentationsverhalten. Im Vergleich zu Sporen zeigen lebende Zellen, die sich nicht in einem stark reduzierten Stoffwechselstadium befinden, abweichende Eigenschaften. Die Zellen stehen in deutlich stärkerem Austausch mit dem umgebenden Medium, sodass Produkte aus diesem aufgenommen oder in dieses segregiert werden. Gleichzeitig sind vitale Zellen weniger robust gegenüber mechanischen Einflüssen, da sie in ihrer Zellstruktur eine geringere Stabilität als ihre verkapselten Sporen besitzen. Daher stehen im folgenden Kapitel die Eigenschaften vitaler Zellen der Gattung *Streptococcus thermophilus* und deren Beeinflussung durch Scherbeanspruchung im Fokus der Arbeit. Die drei verschiedenen Bakterienstämme *ST-C*, *ST-D* und *ST-E* unterscheiden sich dabei nicht nur in zellspezifischen Eigenschaften, sondern auch in der Art und Struktur der gebildeten EPS, sodass sich hieran eine weitere Unterscheidung in deren Sinkgeschwindigkeits- und Kompressionsverhalten vermuten lässt. Teile dieses Kapitels sind bereits veröffentlicht und für die vorliegende Arbeit angepasst [116].

4.2.1. Analytische Bestimmung der konzentrationsabhängigen Sedimentationsgeschwindigkeit

Da sich bereits in Kapitel 4.1.1 ergab, dass die Temperatur nur einen unerheblichen Einfluss auf die Mediumviskosität hat, während die Änderung der Konzentration deutlich stärker auf die Sinkgeschwindigkeitseffekte wirkt, erfolgt die Durchführung der weiteren Versuche bei einer konstanten Raumtemperatur von 20 °C.

Die drei untersuchten Stämme der Gattung *Streptococcus thermophilus* *ST-C*, *ST-D* und *ST-E* unterscheiden sich im Wesentlichen durch die Länge ihrer gebildeten Zellketten, sowie die Art und Menge der produzierten EPS. Für die analytische Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit, sowie die Bewertung des konzentrationsabhängigen Einflusses, erfolgt die Einstellung der Probenkonzentrationen analog zu Kapitel 4.1.1 mittels isotonischer Kochsalzlösung. Die optische Zentrifuge LUMiSizer dient der Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilung und der Sedimentkompression.

Da sich die tatsächliche Zellgröße bei lebenden Zellen im Vergleich zu Sporen deutlich stärker unterscheiden kann, beispielsweise durch die Bildung von Zellketten, ist die Bestimmung der Zellgröße mittels Scheibenzentrifuge ein zusätzlicher Bestandteil der Analysen. Grundsätzlich ergibt sich die Partikelgrößenverteilung auch aus den Sinkgeschwindigkeitsverteilungen des LUMiSizers. Allerdings ist hierfür die Kenntnis von Materialdaten wie Brechungsindex des Mediums und der Partikel notwendig. Biologische Systeme lassen sich hinsichtlich dieser Eigenschaften nur sehr schwer charakterisieren, sodass die Berechnung der Partikelgrößenverteilung auf Basis der LUMiSizer-Messdaten zu nicht signifikanten Werten führen würde. Wie für die verschiedenen Partikelgrößenmessverfahren typisch, ist mit der Scheibenzentrifuge nicht die „wahre“ Partikelgröße bestimmbar. Daher sind die Ergebnisse der Scheibenzentrifuge immer in Relation zueinander zu interpretieren.

Der Einfluss der Probenkonzentration auf die Zellen der Gattung *ST-D* ist in Abbildung 4.11 in Form der Sedimentationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Probenkonzentration dargestellt. Diese Untersuchung wurde für den Bakterienstamm *ST-D* durchgeführt, da hier die meisten Effekte durch eine Verdünnung erwartbar sind. *ST-D* bildet zum einen lange Zellketten bzw. Kokkenverbände aus und segregiert gleichzeitig freie EPS in das umgebende Medium. Daher spielen Verdünnungseffekte bei diesem Bakterienstamm eine besondere Rolle.

Durch zunehmende Verdünnung ist eine Verschiebung der Sedimentationsgeschwindigkeit zu geringeren Werten erkennbar. Dies ist auf die konzentrationsbedingte Verringerung der Kettenlänge bzw. die Auflösung von Kokkenverbänden zurückzuführen. Während die Verteilungsbreite für die unverdünnte Probe verhältnismäßig breit ist, verringert sich diese mit zunehmender Verdünnung. Durch die Verdünnung wird die Kettenlänge der Zellverbände immer weiter reduziert bis sie

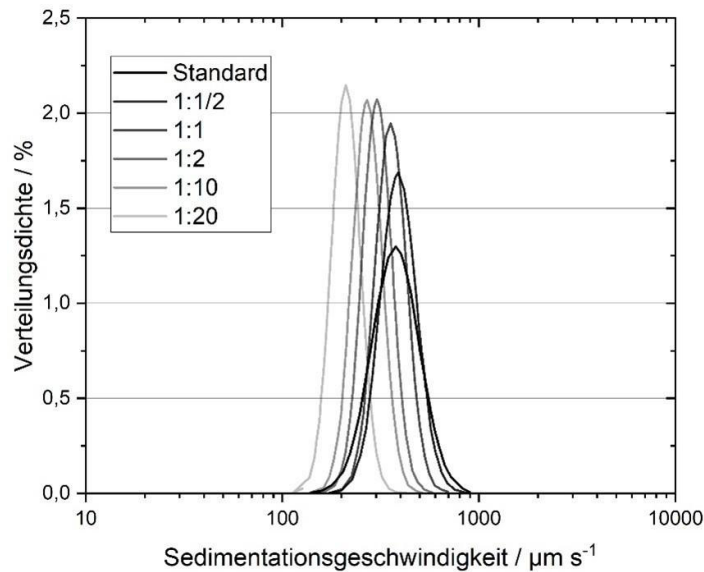


Abbildung 4.11.: Dichteverteilung der Sedimentationsgeschwindigkeit für Proben unterschiedlicher Verdünnung des Bakterienstamms *ST-D*

nahezu als Einzelzellen vorliegen. Während die Zellverbände in der unverdünnten Probe als Agglomerat mit einer höheren Sedimentationsgeschwindigkeit sinken, reduziert sich diese für Einzelzellen auf niedrigere Werte. Im Vergleich zu den Sporen lässt sich für die vitalen Zellen keine deutliche Abhängigkeit der Viskosität von der Verdünnung erkennen. Der entscheidende Einfluss auf die Sinkgeschwindigkeit geht in diesem Fall von der Partikelgröße aus.

Da die beiden Stämme *ST-E* und *ST-C* nur kurze Kokkenverbände ausbilden, ist eine detaillierte Betrachtung der Partikelgröße bei diesen Stämmen von Interesse. Die Analyse erfolgt mittels Scheibenzentrifuge. Analog zur Sedimentationsgeschwindigkeitsbestimmung mit dem LUMiSizer hat die Probenkonzentration einen entscheidenden Einfluss auf die mittels Scheibenzentrifuge bestimmte Partikelgröße. Da die Partikelgröße aus der Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel resultiert, verfälschen Wechselwirkungen zwischen den Partikeln die Ergebnisse. Abbildung 4.12 zeigt den Zusammenhang der Probenkonzentration und der mittleren Partikelgröße ausgehend von der unverdünnten Probe für zwei unterschiedliche *ST*-Stämme. Beide Stämme zeigen eine deutliche Abnahme der mittleren Partikelgröße mit abnehmender Probenkonzentration. Im Falle von *ST-E* und *ST-C* ist diese Abnahme der Partikelgröße, welche direkt mit der Sinkgeschwindigkeit korreliert, nicht auf eine Zerteilung von Zellketten zurückzuführen, da diese deutlich geringere Kokkenlängen ausbilden. Bei Konzentrationen kleiner 10 % sind keine signifikanten Änderungen der mittleren Partikelgröße mehr zu erkennen, sodass ab diesem Punkt von einer ausreichenden Verdünnung auszugehen ist.

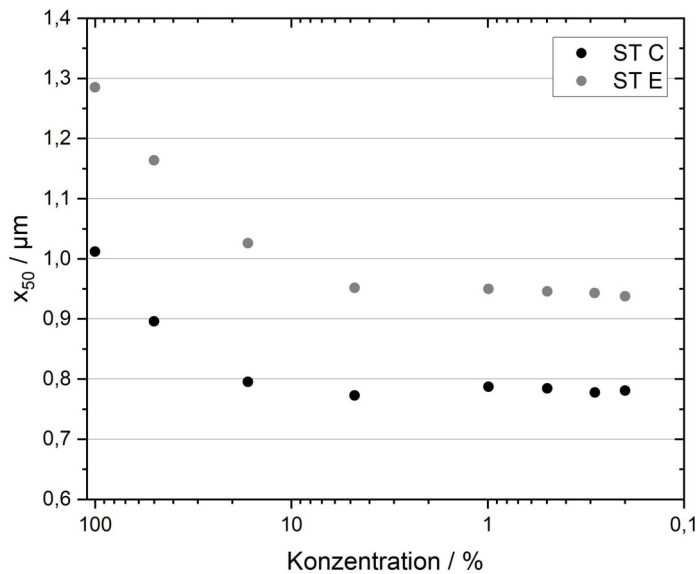


Abbildung 4.12.: Einfluss der Probenkonzentration am Beispiel von *ST-C* und *ST-E* auf die mittlere Partikelgröße nach Messung mit der Scheibenzentrifuge

Um den Einfluss der Probenkonzentration bei der Bewertung nachfolgender Scherversuche zu minimieren, dient als geeignete Messkonzentration für die Scheibenzentrifuge eine Verdünnung von 1:20, was etwa einer Konzentration der ursprünglichen Probe von 5 % entspricht.

4.2.2. Einfluss gezielter Scherbeanspruchung

4.2.2.1. Unbelastete Probe

Um den Einfluss der Scherbeanspruchung auf die Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilungen der drei *ST*-Stämme beurteilen zu können, ist zunächst das grundlegende Verständnis der unbelasteten Probe essenziell. Abbildung 4.13 (b) zeigt die mit der Scheibenzentrifuge bestimmten Partikelgrößenverteilungen für die Stämme *ST-C*, *ST-D* und *ST-E*. Alle drei Stämme zeigen eine monomodale Verteilung mit Partikelgrößen zwischen $0,8 \mu\text{m}$ und $1,6 \mu\text{m}$. Die geringste mittlere Partikelgröße ergibt sich für den kapsuläre EPS produzierenden Stamm *ST-C* mit etwa $0,8 \mu\text{m}$. Die größte mittlere Partikelgröße mit ungefähr $1,3 \mu\text{m}$ charakterisiert den Stamm *ST-D*, während sich *ST-E* mit einer mittleren Partikelgröße von etwa $1,0 \mu\text{m}$ dazwischen einordnet.

Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die gemessene Partikelgröße keine geometrischen Charakterisierungsgröße wiedergibt, sondern durch das Sedimentationsverhalten definiert wird. Daher

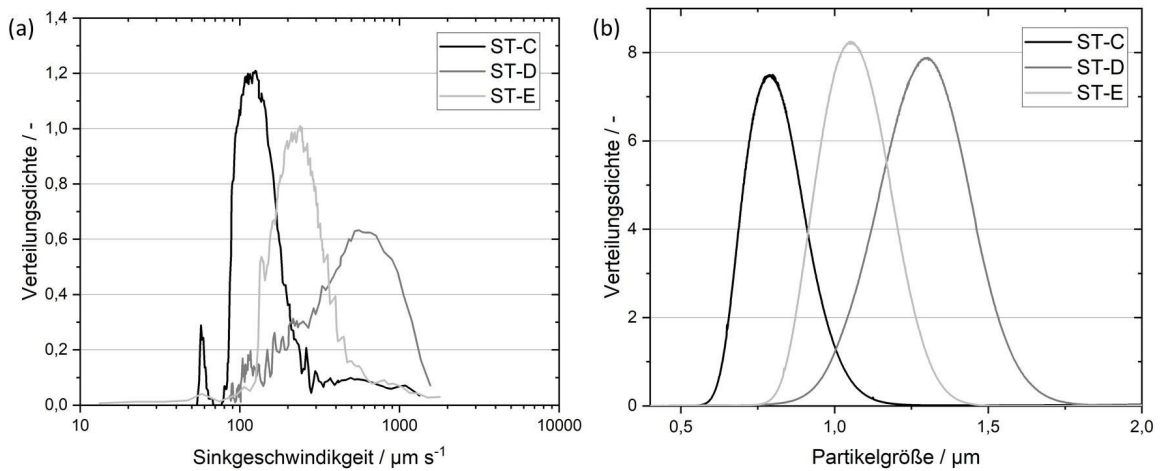


Abbildung 4.13.: Sinkgeschwindigkeitsverteilung (a) und Partikelgrößenverteilung (b) der bakteriellen Kulturen *ST-C*, *ST-D* und *ST-E*

können kleine Partikel mit einer größeren Dichtedifferenz zum umgebenden Medium, beispielsweise aufgrund einer anderen Zellzusammensetzung, gleich schnell sedimentieren wie größere Zellen mit einer geringeren Dichtedifferenz. Die anhand dieser Messtechnik erhaltenen Werte sind somit als scheinbare Partikelgröße zu betrachten. Da es sich bei allen drei Proben um ST-Bakterien handelt, ist zunächst von einer in etwa identischen Partikelgröße der unterschiedlichen Stämme auszugehen. Die deutlichen Unterschiede bei der Partikelgrößenbestimmung sind folglich auf die angewandte Messtechnik zurückzuführen. Diese Aussage bestärken die Sedimentationsgeschwindigkeitsanalysen, welche mit dem LUMiSizer erfolgten und in Abbildung 4.13 (a) dargestellt sind. Passend zu den Partikelgrößenverteilungen, zeigt *ST-C* die geringsten Sedimentationsgeschwindigkeiten, gefolgt von *ST-E* und *ST-D*. Für einen Vergleich der unterschiedlichen Stämme und der Bewertung hinsichtlich der Sinkgeschwindigkeitsverteilung sind in Tabelle 4.1 charakterisierende Parameter der Stämme *ST-C*, *ST-E* und *ST-D* zusammengefasst.

ST-C und *ST-E* unterscheiden sich in ihrer Kokkenzahl pro Zellkette nur marginal, sodass aufgrund der Partikelgröße von einer nahezu identischen Sedimentationsgeschwindigkeit auszugehen ist. Diese unterscheidet sich allerdings deutlich, sodass der Grund in der unterschiedlichen Art synthetisierter EPS liegt. *ST-C* synthetisiert kapsuläre EPS, welche die Zellen umgeben und aufgrund ihrer wasserbindenden Eigenschaften die Dichtedifferenz zwischen Zelle und Medium reduzieren und daher als bremsende Schicht im Hinblick auf die Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen wirken. Das primäre Maximum der Sinkgeschwindigkeitsverteilung des Stammes *ST-C* ist bei $131 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ zu sehen und repräsentiert den dominierenden Teil an Zellen. Zusätzlich sind zwei weitere Maxima bei etwa $250 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ und $65 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ auffällig. Der schneller sedimentierende Anteil ist den Kokkenverbänden zuzuordnen. Der Anteil an langsam sedimentierenden

Tabelle 4.1.: Charakteristische Parameter der gebildeten EPS-Typen, sowie Sedimentationseigenschaften für *ST-C*, *ST-D* und *ST-E*

	Einheit	ST-C	ST-D	ST-E
Kapsuläre EPS	-	ja	nein	nein
Kokkenanzahl	-	1-5	2-19	1-4
n_{90} der Kokkenzahl pro Zellkette	-	2,99	12,96	3,16
Viskosität Überstand	$mPa \cdot s$	1,75	2,25	2,16
c_{EPS}	$mg_{GE} \cdot kg_{Medium}^{-1}$	1062	788	940
x_{50}	μm	0,82	1,29	1,06
v_{50}	$\mu m \cdot s^{-1}$	131	523	264

Partikeln bei etwa $65 \mu m \cdot s^{-1}$ wird durch Zellbruchstücke und Zellreste gebildet. Auffällig ist, dass die schnell sedimentierenden Zellketten bei der Messung der Partikelgrößenverteilung in der Scheibenzentrifuge nicht erkennbar sind. Da die Probenzufuhr in die rotierende Scheibe der Zentrifuge mit bereits vorgelegtem Dichtegradienten erfolgt, könnte dies durch den Eintritt der Partikel in den als Starrkörper rotierenden Dichtegradienten begründet sein. An diesem Punkt in der Zentrifuge wirken auf die Zellketten große beschleunigende Kräfte, sodass sich die Zellverbände separieren und daher nicht für die Messung der Partikelgröße erfassbar sind. Ein ähnlicher Verlauf wie bei *ST-C* zu beobachten ist, zeigt die Verteilung der Sinkgeschwindigkeit des Stammes *ST-E*. Beide Stämme zeigen drei unterschiedliche Fraktionen in der Sinkgeschwindigkeitsverteilung. Da sie sich auch in ihrer Zellkettenlänge und -größe ähneln, bestätigt der Stamm *ST-E* die Annahmen von schneller sedimentierenden Zellketten im höheren und Zellbruchstücke im niedrigeren Sinkgeschwindigkeitsbereich. Ein Unterschied lässt sich anhand der absoluten Sinkgeschwindigkeit erkennen. Zellen des Stammes *ST-E* sedimentieren schneller bei gleicher Verteilungsform. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass sie keine kapsulären EPS ausbilden, die einen verlangsamen Effekt auf die Zellen haben, bei sonst ähnlicher Zellstruktur.

Die Ergebnisse der Sinkgeschwindigkeit und Partikelgröße für den Stamm *ST-D* unterscheidet sich dagegen deutlich von *ST-E* und *ST-C*. Die Verteilung des Hauptpeaks ist breiter und liegt bei wesentlich höheren Geschwindigkeiten. Der große Anteil an schnell sedimentierenden Partikeln über einen breiteren Sinkgeschwindigkeitsbereich deutet auf eine hohe Anzahl von Zellketten hin. Die optische Analyse mittels Mikroskopie, wie in Abbildung 4.14 dargestellt, bestätigt diese Aussage und gibt Aufschluss über die minimale und maximale Anzahl an Kokken innerhalb einer Zellkette. Daraus ergibt sich eine statistische Verteilung, anhand derer der charakteristische Wert

n_{90} ermittelbar ist. Dieser Wert gibt an, dass 90 % der Zellketten kleiner oder genauso lang sind. Tabelle 4.1 fasst Informationen über die Zellkettenlänge, sowie über die Mediumviskosität des zellfreien Überstandes und die Konzentration an gebildeten EPS im Medium zusammen.

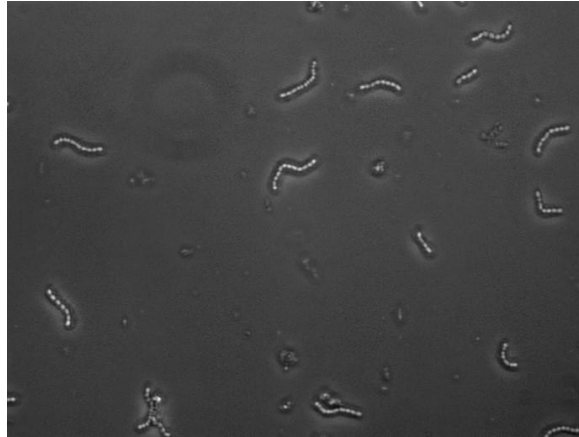


Abbildung 4.14.: Mikroskopieaufnahme des Bakterienstamms *ST-D*

ST-D bildet mit einer Anzahl an Kokken pro Zellkette von $n_{90} = 13$ und Zellkettenlängen von 2 - 19 Kokken deutlich längere Ketten als *ST-C* mit einer Anzahl an Kokken pro Zellkette von 3 und einer Kettenlänge von 1 - 5 Kokken, sowie *ST-E* mit einer Anzahl an Kokken pro Zellkette von 3, 2 und einer Kettenlängen von 1 - 4 Kokken. Die große Varianz der Zellkettenlänge von *ST-D* zeigt sich auch deutlich in der breiten Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilung, sowie der Partikelgrößenverteilung. Da die Größe des Zellverbundes für *ST-D* durch die größere Anzahl beteiligter Kokken mindestens doppelt so groß ist im Vergleich zu *ST-C* und *ST-E* sedimentieren diese mit vergleichsweise höheren Geschwindigkeiten. Die mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit von *ST-D* ist etwa doppelt so groß im Vergleich zu *ST-E* und skaliert mit dem Vierfachen von *ST-C*. Während die Unterschiede in der Sinkgeschwindigkeitsverteilung deutlich erkennbar sind, zeigen die Partikelgrößenverteilungen aus der Analyse mittels Scheibenzentrifuge ähnliche Verläufe. Da die Überstände von *ST-D* und *ST-E* ähnliche Viskositätswerte aufweisen, müsste somit bei gleicher Feststoffdichte die Partikelgröße von *ST-D* um $\sqrt{2}$ größer sein als bei *ST-E* was etwa $1,5 \mu\text{m}$ entspricht. Die gemessene mittlere Partikelgröße liegt mit $1,29 \mu\text{m}$ allerdings um etwa 15 % unterhalb dieses Wertes.

Wie in Kapitel 3.1 bereits beschrieben, liegt die mittlere Partikelgröße von *Streptococcus thermophilus* zwischen $0,8$ und $1,0 \mu\text{m}$ pro Kokke. In diesem Größenbereich sortieren sich die Zellen des Stammes *ST-E* mit einer mittleren Partikelgröße von $1,06 \mu\text{m}$ stimmig ein, unter Berücksichtigung von Zellpaaren, sowie den natürlichen Schwankungen in der Zellgröße durch Zellteilung. Dasselbe Verteilungsbild ist bei *ST-C* zu vermuten, lediglich mit dem Unterschied der kapsulär um die Zellen liegenden EPS-Schicht. Diese bremst die sedimentierenden Partikel, sodass scheinbar

kleinere Partikelgrößen resultieren und sich die gesamte Verteilung zu geringeren Partikelgrößen verschiebt. Die kapsuläre Bindung der EPS an die Zellen bei *ST-C* erklärt auch den geringeren Viskositätswert des Überstandes trotz der höchsten EPS-Konzentration im Medium. Dabei ist die Messmethodik entscheidend für die Interpretation der Ergebnisse.

Für die Bestimmung der Viskosität erfolgt die Zellabtrennung über einen Zentrifugationsschritt mit anschließender Viskositätsmessung des zellfreien Überstandes. Zur Konzentrationsmessung der EPS wird das gesamte Fermentationsmedium inklusive Zelle aufgeheizt, sodass sich die kapsulären EPS von den Zellen lösen und in einem weiteren Analyseschritt in Form von Glukoseeinheiten bestimmbar sind. Während der Viskositätsmessung haften die kapsulären EPS folglich weiterhin an der Zelle, sodass sie keinen Einfluss auf die Viskosität des Mediums nehmen, während für die Konzentrationsbestimmung eine Ablösung der EPS von den Zellen erfolgt, sodass diese bei der Konzentrationsanalyse erfasst werden. Für den Fall von *ST-D* und *ST-E* wirkt sich dieser Effekt nur geringfügig aus, da diese Stämme freie EPS ins Medium segregieren und somit Einfluss auf die Mediumviskosität ausüben.

Die deutlich höhere mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit von *ST-D* gegenüber *ST-E* ist daher aufgrund der nahezu identischen Viskosität auf die Unterschiede in der Partikelgrößenverteilung zurückzuführen. Der Unterschied bezüglich der gemessenen Partikelgröße fällt allerdings geringer aus, als die doppelt so hohe Sedimentationsgeschwindigkeit vermuten lässt.

Da die Partikelgröße für alle drei Stämme pro Kokke identisch anzunehmen ist, sind tatsächliche Unterschiede der Partikelgröße auf unterschiedliche Zellkettenlängen zu beschränken. *ST-D* zeigt, wie in Tabelle 4.1 dargestellt, deutlich längere Ketten im Vergleich zu den beiden anderen Kulturen, was sich in der höheren gemessenen Partikelgröße äußert. Allerdings schmälert das verwendete Messverfahren diesen Unterschied, da sich die Zellketten beim Eintritt in den rotierenden Dichtegradienten trennen und somit die Partikelgrößenverteilung verfälschen. Daraus folgt, dass die Einzelkokken, die über die Partikelgrößenverteilung deutlich erkennbar sind, für alle Stämme eine ähnliche Verteilung aufweisen. Durch das Vorhandensein von kapsulären EPS, sowie die ursprünglich längeren Ketten verschiebt sich die Verteilung zu niedrigeren oder höheren Werten.

4.2.2.2. Scherbeanspruchung mittels Hochdruckhomogenisator

Im industriellen Umfeld erfahren Bakterien in der Regel eine Scherbeanspruchung durch einen Homogenisator, beispielsweise um einen Zellaufschluss gezielt zu induzieren. Daher ist der Einfluss dieses Verarbeitungsschrittes auf die weiteren Abtrennschritte von großem Interesse. Die

Bakterienstämme *ST-C*, *ST-D* und *ST-E* wurden dafür einer Scherbelastung in einem Hochdruck-Labor-Homogenisator bei Drücken von 2, 4 und 6 MPa ausgesetzt und der Einfluss auf die Partikelgröße, Sinkgeschwindigkeit und Sinkgeschwindigkeitsverteilung charakterisiert.

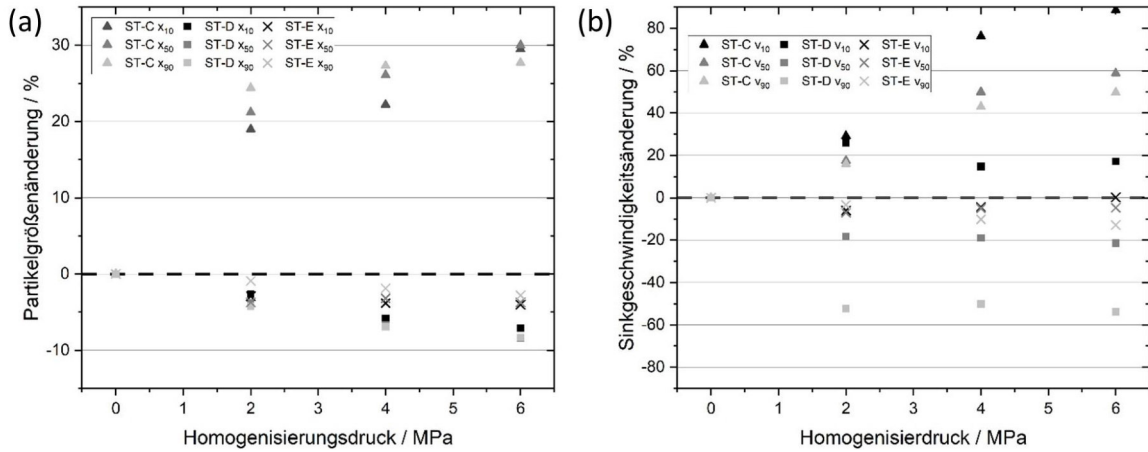


Abbildung 4.15.: Relative Partikelgrößenänderung (a) und relative Sinkgeschwindigkeitsänderung (b) für die Bakterienstämme *ST-C*, *ST-D* und *ST-E* nach Scherung mittels Hochdruckhomogenisator

Zur Bewertung ist in Abbildung 4.15 (a) die Änderung der Partikelgröße im Verhältnis zur unbelasteten Probe über den Zusammenhang

$$\text{Partikelgrößenänderung} = \frac{x_{\text{belastet}} - x_{\text{unbelastet}}}{x_{\text{unbelastet}}} \cdot 100 \quad (4.2)$$

für die charakteristischen Größenbereiche x_{10} , x_{50} und x_{90} dargestellt. Werte im positiven Bereich bedeuten die Zunahme der Partikelgröße im jeweiligen Bereich, während negative Werte eine Abnahme zeigen. Die Messung erfolgte mittels Scheibenzentrifuge. Analog ist in Abbildung 4.15 (b) die relative Sinkgeschwindigkeitsänderung

$$\text{Sinkgeschwindigkeitsänderung} = \frac{v_{\text{belastet}} - v_{\text{unbelastet}}}{v_{\text{unbelastet}}} \cdot 100 \quad (4.3)$$

abgebildet. Die Analyse wurde mittels LUMiSizer durchgeführt.

ST-C zeigt eine deutliche Zunahme der scheinbaren Partikelgröße durch die Scherbeanspruchung. Dies ist auch in der Zunahme der Sinkgeschwindigkeit mit zunehmendem Homogenisierungsdruck erkennbar. Für *ST-C* nehmen die Werte für Partikelgröße und Sinkgeschwindigkeit sowohl für die kleinen als auch die großen Fraktionen, repräsentiert durch die x_{10} bzw. v_{10} und x_{90} bzw. v_{90} -Werte, zu. Dies deutet darauf hin, dass eine Änderung in den Eigenschaften des gesamten Zellkollektivs ursächlich ist. Mit den Erkenntnissen aus den vorangegangenen Kapiteln kann dies auf das Ablösen der kapsulären EPS von der Zelloberfläche zurückgeführt werden.

Die Zellen des Bakterienstamms *ST-D* reagieren mit einem gegensätzlichen Effekt auf die Scherbeanspruchung. Die Partikelgröße nimmt mit zunehmendem Homogenisierungsdruck und über alle Größenfraktionen ab. Dies ist als Zellkettenzerstörung zu interpretieren. Die Sinkgeschwindigkeit zeigt ein uneinheitliches Verhalten. Während die Sinkgeschwindigkeit der kleinen Partikelgrößenfraktion v_{10} geringfügig zunimmt, nimmt sie für die große Partikelfraktion für v_{90} deutlich ab. Die Geschwindigkeitsabnahme der großen Partikelfraktion ist analog zur Partikelgröße der Zellkettenzerstörung zuzuordnen. Die Zunahme der Sinkgeschwindigkeit der kleinen Fraktion ist in der Reduktion der Medienviskosität durch die Scherbeanspruchung begründet. Die nicht ansteigende Partikelgröße der kleinen Fraktion bestätigt den Einfluss der Viskosität auf deren Sinkgeschwindigkeit, da die Analyse mittels Scheibenzentrifuge unabhängig von der Medienviskosität ist. Dabei ist eine geringe Scherbelastung bei einem Homogenisierungsdruck von 2 MPa ausreichend, um den Effekt zu erzielen. Weitere Druckerhöhung führt zu keinen weiteren Änderungen in der Sinkgeschwindigkeit.

Für den Bakterienstamm *ST-E* lässt sich nahezu kein Effekt auf die Partikelgröße und Sinkgeschwindigkeit unabhängig vom Homogenisierungsdruck feststellen. Dies liegt in den Zelleigenschaften des spezifischen Stammes begründet. Im Vergleich zu *ST-C* bildet *ST-E* keine kapsulären EPS-Schichten, sodass der Effekt des Ablöses durch die Scherbeanspruchung nicht vorliegt. Gleichzeitig tendiert *ST-E* nicht zur Bildung langer Zellketten, wie dies beispielsweise für *ST-D* der Fall ist, sodass auch kein Effekt durch eine Zellkettenzerstörung durch die Scherbeanspruchung erwartbar ist. Für einen weiteren Vergleich sind in Abbildung 4.16 die Sinkgeschwindigkeitsverteilungen der unbelasteten Probe, sowie nach Homogenisierung bei 2, 4 und 6 MPa für *ST-C* und *ST-D* dargestellt. Wie bereits anhand der diskutierten Ergebnisse nach Abbildung 4.15 verdeutlicht, ergeben sich für den Bakterienstamm *ST-E* keine wesentlichen Unterschiede im Sinkgeschwindigkeitsverlauf. Daher wird auf eine Darstellung der Sinkgeschwindigkeitsverteilung in Abhängigkeit der Scherbelastung für *ST-E* an dieser Stelle verzichtet.

Die Verteilungen verdeutlichen die wesentlichen Unterschiede der Bakterienstämme sowie deren Reaktion auf eine Scherbelastung. Während sich die Kurven für den Stamm *ST-C* bei gleicher Verteilungsbreite zu höheren Sinkgeschwindigkeiten verschieben, ändert sich für den Stamm *ST-D* hauptsächlich die Form der Verteilung. *ST-C*-Zellen bilden keine Kokkenverbände, sondern

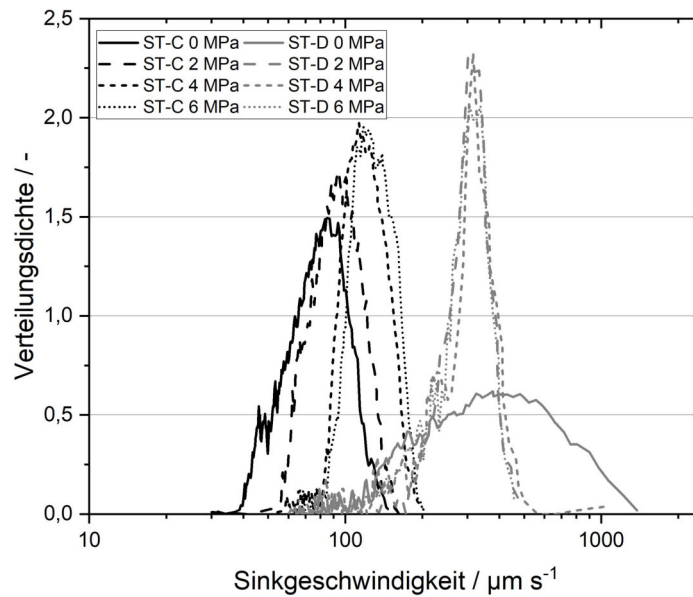


Abbildung 4.16.: Sinkgeschwindigkeitsverteilung nach Analyse im LUMiSizer der bakteriellen Kulturen *ST-C* und *ST-D* nach Scherung mit dem Hochdruckhomogenisator Emulsiflex C5 bei einem Scherdruck von 0 MPa, 2 MPa, 4 MPa und 6 MPa

liegen bereits im unbelasteten Zustand als Einzelzellen oder Zellpaare vor. Durch die Scherbelastung erfolgt die Ablösung kapsulärer EPS und die Zellen sedimentieren aufgrund der erhöhten Dichtedifferenz schneller. Im Vergleich dazu liegen die Zellen des *ST-D* Stamms als Zellketten vor. Daher zeigt sich im unbelasteten Zustand eine sehr breite Verteilung mit einer geringen Verteilungsdichte. Durch die Scherung verschmälert sich der Peak deutlich. Hauptsächlich nimmt dabei der Anteil der großen Partikel zugunsten der mittelgroßen Partikelfraktion ab. Der Einfluss der Scherwirkung auf kleine Partikel ist vernachlässigbar. Diese Ergebnisse verdeutlichen erneut die Zerstörung von Zellketten für den Stamm *ST-D* durch die Scherung, sodass deren Einzelzellen die Verteilungsdichte im mittleren Partikelgrößenbereich erhöhen.

4.2.2.3. Scherbeanspruchung mittels Zahnkranzdispergierer

In Kapitel 4.2.2.2 ist die Scherbelastung der verschiedenen Bakterienstämme mit einem Labor-Hochdruck-Homogenisator beschrieben. Um die Reaktion der Zellen auf eine gesteigerte Scherbelastung zu bewerten, ist im folgenden Kapitel der Einfluss der Scherbeanspruchung in einem Zahnkranzdispergierer auf die Partikelgröße, Sinkgeschwindigkeit und Sinkgeschwindigkeitsverteilung thematisiert.

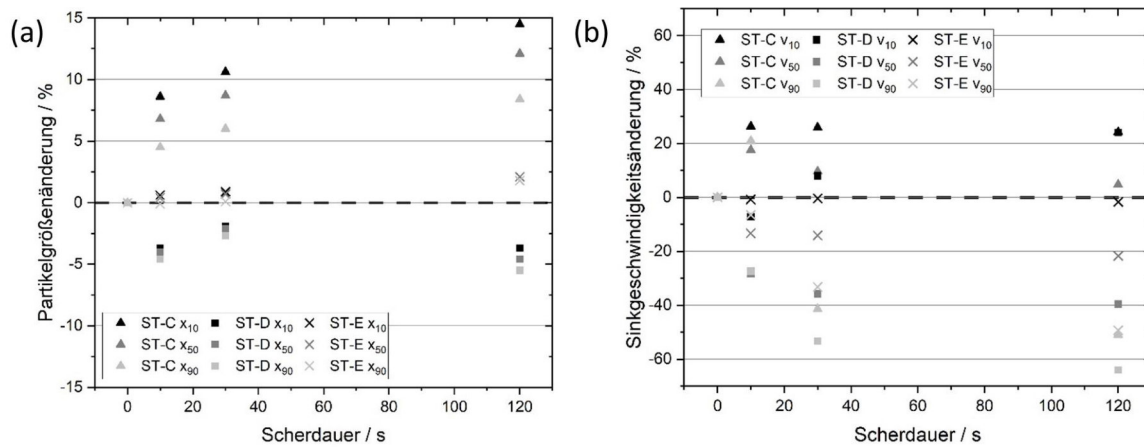


Abbildung 4.17.: Relative Partikelgrößenänderung (a) und relative Sinkgeschwindigkeitsänderung (b) für die Bakterienstämme *ST-C*, *ST-D* und *ST-E* nach Scherung mittels Zahnkranzdispergierer

Abbildung 4.17 (a) zeigt die relative Partikelgrößenänderung der verschiedenen Bakterienstämme nach der Scherbeanspruchung mittels Zahnkranzdispergierer für 10, 30 und 120 s bei einer Drehzahl von 19.000 *rpm*. Analog ist in Abbildung 4.17 (b) die relative Sinkgeschwindigkeitsänderung dargestellt.

Wie bereits in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben, nimmt die scheinbare Partikelgröße für den Bakterienstamm *ST-C* mit zunehmender Scherdauer zu. Dabei nimmt die Partikelgröße über alle Größenfraktionen gleichmäßig zu. Im Homogenisator lässt sich zwar der grundsätzlich gleiche Effekt erkennen, allerdings ist er mit einer Zunahme bei höchstem Homogenisierdruck von 6 *MPa* um 30 % deutlich stärker ausgeprägt als im Zahnkranzdispergierer bei einer maximalen Scherdauer von 120 s mit einer Zunahme um ca. 10 %. Gemeinsam mit den Ergebnissen der relativen Sinkgeschwindigkeitsänderung, dargestellt in Abbildung 4.17 (b), lässt sich dies durch eine andere Charge des Bakterienstammes *ST-C* erklären. Obwohl es sich um den gleichen Stamm, hergestellt unter den gleichen Fermentationsbedingungen, handelt, bilden sich für den im Zahnkranzdispergierer eingesetzten Stamm längere Zellketten aus. Bei der Analyse mittels Scheibenzentrifuge sind diese nicht zu erkennen, da die hohe Beschleunigung bei der Probenaufgabe, wie bereits in Kapitel 4.1.1 gezeigt, die Zellketten zerstört. Daher ist der Effekt in der Scheibenzentrifuge auf das Ablösen von EPS zurückzuführen. Bei den Messungen der Sinkgeschwindigkeit ist die Zerstörung von Zellketten aufgrund der Scherbeanspruchung jedoch erkennbar. Während die Sinkgeschwindigkeit für Partikelfractionen des Bereichs v_{10} mit ansteigender Scherdauer nahezu konstant bleiben, reduziert sich diese für den Bereich v_{90} mit zunehmender Scherdauer wesentlich.

Die These der Zellkettenzerstörung ist anhand einer Analyse mehrerer Proben mittels Lichtmikroskop nachweisbar. Die Ergebnisse der Auszählung der Kokkenverbände aus lichtmikroskopischen Aufnahmen ist in Abbildung 4.18 dargestellt. Während in der unbelasteten Probe noch ein Anteil an Zellketten aus 5 - 10 und 3 - 4 Kokken enthalten war, sind nach einer Scherbelastung bei 19.000 *rpm* im Zahnkranzdispergierer nahezu ausschließlich Einzelzellen oder Zellpaare vorhanden.

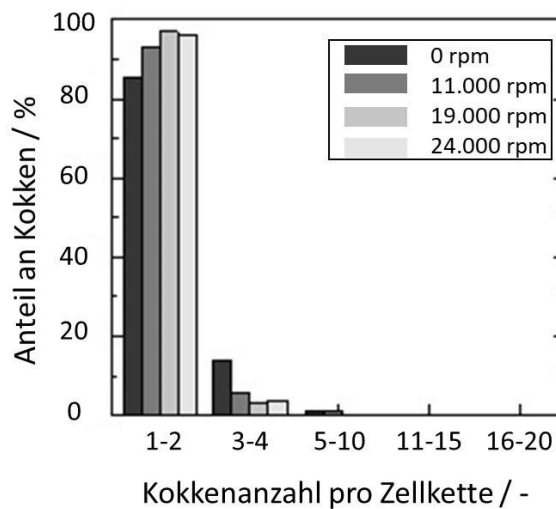


Abbildung 4.18.: Verteilung der Kokken je Zellkette für *ST-C* nach unterschiedlicher Scherbeanspruchung im Zahnkranzdispergierer

Die Ergebnisse für den Bakterienstamm *ST-D* sind analog zu den Resultaten des Homogenisators interpretierbar. Zellketten werden zerstört, sodass sowohl die Partikelgröße als auch die Sinkgeschwindigkeit abnimmt. Im Vergleich zu den Zellketten des *ST-C* Stammes bildet *ST-D* längere Verbände, sodass auch der Effekt auf die Sinkgeschwindigkeit für diesen Stamm stärker ausfällt. So nimmt die Sinkgeschwindigkeit der großen Fraktion mit -60% im höheren Maße ab als für den Stamm *ST-C* mit -40% beobachtbar ist. Analog zu Abbildung 4.18 wurde auch für die Zellen des Stammes *ST-D* eine Analyse der Kokkenlänge nach unterschiedlichen Scherbelastungen mittels Lichtmikroskop durchgeführt. Die Ergebnisse sind Abbildung 4.19 zu entnehmen. Nach einer Scherbeanspruchung mit 24.000 *rpm* sind keine Zellketten mit Kettenlängen von 16 – 20, sowie 11 – 15 Kokken mehr vorhanden. Die Anzahl der Ketten mit Kettenlängen von 5-10 Kokken ist um mehr als die Hälfte reduziert, während Ketten mit 3 – 4 Kokken etwa doppelt so häufig vorhanden sind. Einzelzellen und Zellpaare sind in etwa dreimal so häufig vorzufinden im Vergleich zum unbelasteten Zustand.

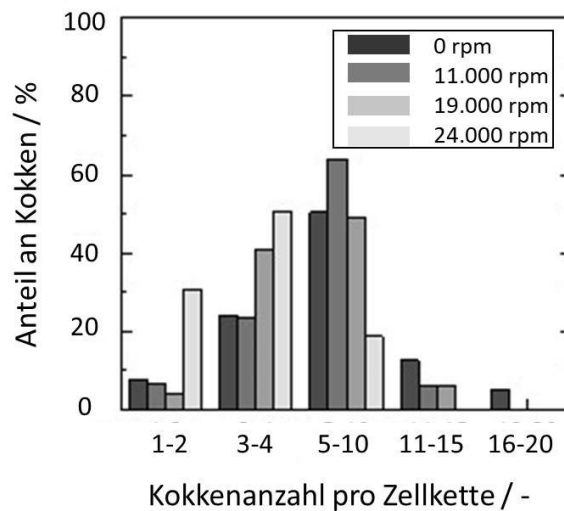


Abbildung 4.19.: Verteilung der Kokken je Zellkette für *ST-D* nach unterschiedlicher Scherbeanspruchung im Zahnkranzdispergierer

Wie die deutlich breitere Verteilung der Zellketten von *ST-D* im Vergleich zu *ST-C* zeigt, sind bei *ST-D* wesentlich mehr Ketten mit 3 - 4 Kokken oder mehr vorhanden, während *ST-C* hauptsächlich Einzelzellen und Zellpaare aufweist. Der Einfluss der Scherung auf die Zellen des Bakterienstamms *ST-E* ist analog zum Hochdruckhomogenisator unwesentlich. Durch die Scherbelastung ergibt sich keine deutliche Änderung in der Partikelgröße oder der Sinkgeschwindigkeit. Analog zu Abbildung 4.16 in Kapitel 4.2.2.2 für den Hochdruckhomogenisator, ist in Abbildung 4.20 die Sinkgeschwindigkeitsverteilung in Abhängigkeit der Scherdauer von 30, 60 und 120 s bei einer Drehzahl von 19.000 *rpm* für die Bakterienstämme *ST-C* und *ST-D* dargestellt. Anhand des Verlaufes sind die Vorgänge während der Scherung deutlicher identifizierbar.

Anhand der Sinkgeschwindigkeitsverteilung im unbelasteten Zustand für *ST-C* ist der Einfluss der unterschiedlichen Chargen deutlich erkennbar. Während sich bei Scherbelastung im Hochdruckhomogenisator, dargestellt in Abbildung 4.16, die gesamte Kurve ohne wesentliche Änderung der Verteilungsform zu höheren Sinkgeschwindigkeiten verschiebt, ändert sich für die Scherbelastung im Zahnkranzdispergierer auch die Form der Verteilung. Für die unbelastete Probe sind drei Peaks erkennbar, wobei der Hauptpeak eine geringe Verteilungsdichte aufweist im Vergleich zum belasteten Zustand im Zahnkranzdispergierer oder Hochdruckhomogenisator. Der Peak bei geringeren Sinkgeschwindigkeiten ist Zellbruchstücken zuzuordnen. Diese reduziert sich mit zunehmender Scherbeanspruchung und ist bei einer maximalen Scherung nicht mehr erkennbar.

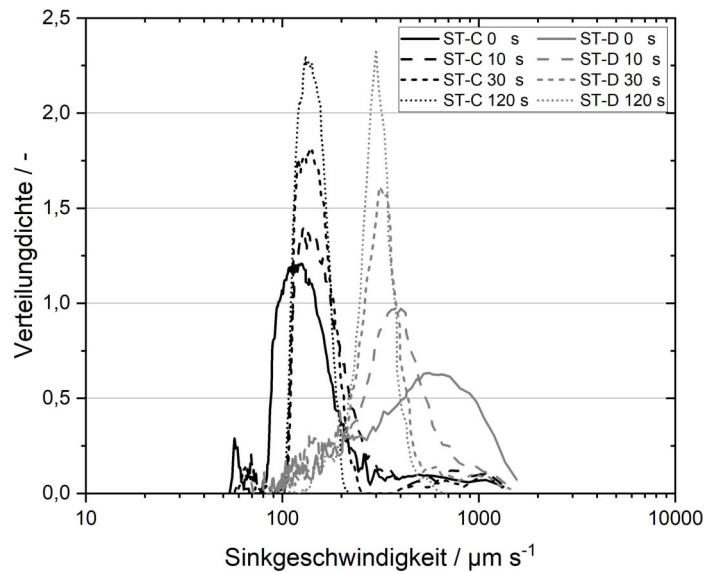


Abbildung 4.20.: Sinkgeschwindigkeitsverteilung nach Analyse im LUMiSizer der bakteriellen Kulturen *ST-C* und *ST-D* nach Scherung mit dem Zahnkranzdispergierer bei einer Scherdauer von 0, 10, 30 und 120 s

Dies liegt in zwei Effekten begründet. Zum einen geht der ohnehin geringe Anteil an sehr langsam sedimentierenden Partikeln durch die Zunahme der Signalstärke im mittleren Sinkgeschwindigkeitsbereich im Messrauschen verloren. Gleichzeitig verändert sich durch die Zerstörung der Zellketten die Anzahl an Einzelpartikeln im Medium. Die Einzelzellen verteilen sich im gleichen Volumen über einen größeren Bereich als die Zellketten, die miteinander verbunden sind. Das Oberflächen-Volumen-Verhältnis für Einzelzellen ist somit höher als für Zellketten. Gleichzeitig bedeutet dies auch eine stärkere Wechselwirkung mit dem umgebenden Medium und geänderte Sinkgeschwindigkeitsbedingungen resultieren. Als Konsequenz sedimentiert die geringe Anzahl an Zellbruchstücken durch die stärkere Wechselwirkung der räumlich nahen Einzelzellen mit einer ähnlichen Geschwindigkeit, weshalb sie nicht mehr als Einzelpartikel identifizierbar sind. Der Peak bei höheren Sinkgeschwindigkeiten verteilt sich über einen breiten Sinkgeschwindigkeitsbereich und repräsentiert die Zellketten. Durch die Scherung werden diese zerstört und die Verteilung wird enger. Dabei sind zwei Phasen in der Verschiebung erkennbar. In der ersten Phase verschiebt sich analog zu den Untersuchungen im Hochdruckhomogenisator die gesamte Verteilung bei gleicher Form zu höheren Sinkgeschwindigkeiten. Analog liegt dies im Ablösen der kapsulären EPS begründet. In der zweiten Phase bei höheren Scherbelastungen von 30 s tritt der Effekt der Zellkettenzerstörung mit einer Änderung der Verteilungsform auf. Die Sinkgeschwindigkeitsverteilung von *ST-C* unterliegt aufgrund der Scherbeanspruchung somit mehreren Effekten. Der bedeutendste Effekt hinsichtlich der Höhe der Sinkgeschwindigkeit ist das Ablösen

der EPS-Schicht und der daraus resultierenden Verschiebung zu höheren Absinkraten. Durch das Fehlen der EPS entfällt deren bremsende Wirkung auf die Sinkgeschwindigkeit der Zellen, sodass das gesamte Kollektiv beschleunigt sedimentiert. Dies erklärt auch den mittels Scheibenzentrifuge bestimmten Anstieg der Partikelgröße, da hierbei die Sinkgeschwindigkeit Grundlage für die Berechnung der Partikelgröße ist. Das Ablösen der EPS-Schicht von den Zellen durch die Scherbeanspruchung bestätigt Abbildung 4.21, welche die mit Tusche angefärbten Bakterienzellen von *ST-C* vor und nach der Scherbeanspruchung unter dem Lichtmikroskop zeigt. Im linken Bild sind die kapsulären EPS vor der Scherbeanspruchung als helle Bereiche um die Zellen zu erkennen, da die Tuschepartikel nicht in die EPS-Schicht eindringen können. Nach der Scherbeanspruchung ist keine EPS-Schicht mehr zu erkennen, dargestellt in Abbildung 4.21 (b).

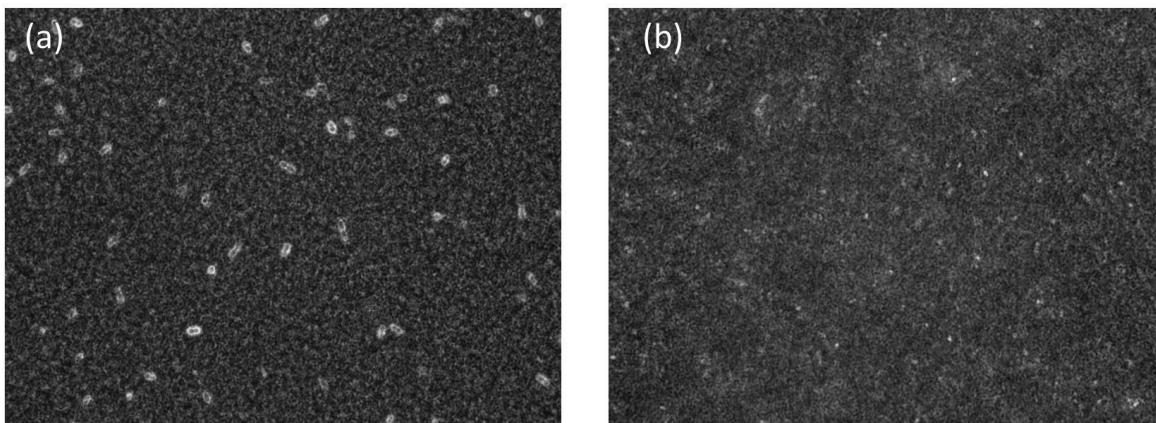


Abbildung 4.21.: Mikroskopieaufnahmen der mit Tusche gefärbten Zellen von *ST-C* mit kapsulärer EPS-Schicht in ungeschertem Zustand (a) und ohne kapsuläre EPS-Schicht nach Scherung im Ultra-Turrax bei 24.000 *rpm* für 120 *s* (b)

Zusätzlich reduziert sich im Falle von *ST-C* im Zahnkranzdispergierer die Sinkgeschwindigkeit durch die Zerstörung von Zellketten. Die dadurch induzierten Scherkräfte beanspruchen die vorhandenen Zellketten so stark, dass diese sich trennen. Je länger dabei die Zellketten sind, desto empfindlicher sind sie gegenüber einer Scherbeanspruchung. Die längsten Zellketten bilden die größten Partikel und repräsentieren daher hauptsächlich die höchsten Sedimentationsgeschwindigkeiten mit v_{90} . Die kürzesten Zellketten, bzw. Zellpaare und Einzelzellen weisen die geringsten Sedimentationsgeschwindigkeiten auf und sind daher vermehrt im Bereich langsam sedimentierender Partikel um v_{10} zu finden. Diese beiden durch die Scherbeanspruchung hervorgerufenen Effekte führen zu einer Verschiebung der Sinkgeschwindigkeitsverteilung zu höheren Werten bei gleichzeitig engerer Verteilungsbreite.

Ein weiterer Effekt ist die Änderung der Anzahl an Einzelpartikel im gleichen Volumen. Dadurch

ändern sich die Sinkgeschwindigkeitsbedingungen und eine gleichmäßigere Sedimentation resultiert. Dieser Effekt konnte in den Kapiteln 4.1.1 und 4.1.2 bereits beschrieben werden. Zwar liegen hier unterschiedliche Mechanismen vor, die allerdings zum gleichen Effekt führen. Während die Vereinzelung von Zellen im gleichen Volumen zu einer stärkeren gegenseitigen Beeinflussung führt, ist dieser Effekt gegenteilig für die Verdünnung einer Probe. Der vierte Einflussfaktor ist die Viskosität der Proben, die durch die Scherbeanspruchung ebenfalls beeinflussbar ist. Die langen Polymerketten bilden Schlaufenstrukturen, welche die Sedimentation der Bakterienzellen erschweren. Durch die konvektive Förderung im Hochdruckhomogenisator und Zahnkranzdispergierer entsteht eine gerichtete Strömung, deren Scherkräfte die intermolekularen Wechselwirkungen der Polymere unterbrechen und damit die Viskosität senken. Experimente hinsichtlich der Beeinflussung der Viskosität durch die Scherbeanspruchung zellhaltiger Medien verschiedener ST-Stämme zeigen ähnliche Tendenzen und sind in Jaros et. al. beschrieben [27].

Für Zellen des Stammes *ST-D* ergibt sich für die Scherung im Zahnkranzdispergierer dasselbe Resultat wie für den Hochdruckhomogenisator. Die Zellketten werden zerstört, sodass sich die Form der Verteilung deutlich ändert. Gleichzeitig ist keine wesentliche Verschiebung zu höheren Sinkgeschwindigkeiten erkennbar, da durch das Fehlen von kapsulären EPS für diesen Stamm, kein positiver Effekt auf die Sinkgeschwindigkeit durch die Scherung erwartbar ist.

4.2.2.4. Vergleich verschiedener Leistungseinträge

Anhand der bisherigen Versuche und Diskussionen wird die Bedeutung der ausführlichen Charakterisierung der individuellen Bakterienstammeigenschaften, sowie deren Separationseigenschaften mit und ohne Scherbelastung deutlich. Darüber hinaus ist die Bewertung dieser Eigenschaften hinsichtlich einer industriellen Anwendung eine weitere zentrale Fragestellung. Dabei liegt der Fokus auf der Wahl der geeigneten Scherparameter zur Erzielung eines optimalen Abtrennergebnisses. Beispielsweise zeigt Abbildung 4.17, dass der Effekt der EPS-Abscherung bereits nach einer kurzen und intensiven Scherdauer von 10 s erreichbar ist. Damit eine Zellkettenzerstörung stattfindet, sind dagegen längere Scherdauern notwendig. Um weiterführende Aussagen hinsichtlich Scherbeanspruchung und Sinkgeschwindigkeit zu erzielen, ist im folgenden Kapitel der Energieeintrag der beiden Scherbeanspruchungsarten mit dem Ziel eine optimale Scherbeanspruchung der Bakterien zu definieren näher betrachtet. Der Energieeintrag in die jeweiligen Proben hängt von mehreren Faktoren ab. Zunächst muss zwischen den beiden Scherapparaturen unterschieden werden, da diese zwei unterschiedliche Funktionsprinzipien einsetzen.

Der Hochdruckhomogenisator fördert die Partikel mit definiertem Druck durch eine Querschnittsverengung und erreicht so eine Scherung der Partikel, ohne dem Medium in signifikanter Form Wärmeenergie zuzuführen. Die Intensität der Scherbeanspruchung ist mittels unterschiedlicher

Lochblenden über den Scherdruck regulierbar. Der Zahnkranzdispergierer nutzt dagegen eine axiale Strömung durch die Ansaugung des Mediums im unteren Teil des Dispergierstabes und dessen Beschleunigung beim Auslassen in radialer Richtung. Dadurch entstehen hohe Scherkräfte, die zu Kavitationseffekten und einer signifikanten Wärmeentwicklung im Medium führen. Im Vergleich zum Homogenisator setzt sich die ins System eingetragene Energie aus der Scherintensität, die über die Drehzahl einstellbar ist, und der Scherdauer zusammen. Am Beispiel von *ST-C* ist der Drehzahleinfluss des Zahnkranzdispergierers auf die Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilung durch Analyse im LUMiSizer verdeutlicht. Die Versuche wurden mit der gleichen Charge des *ST-C* Stammes durchgeführt wie in Kapitel 4.2.1.

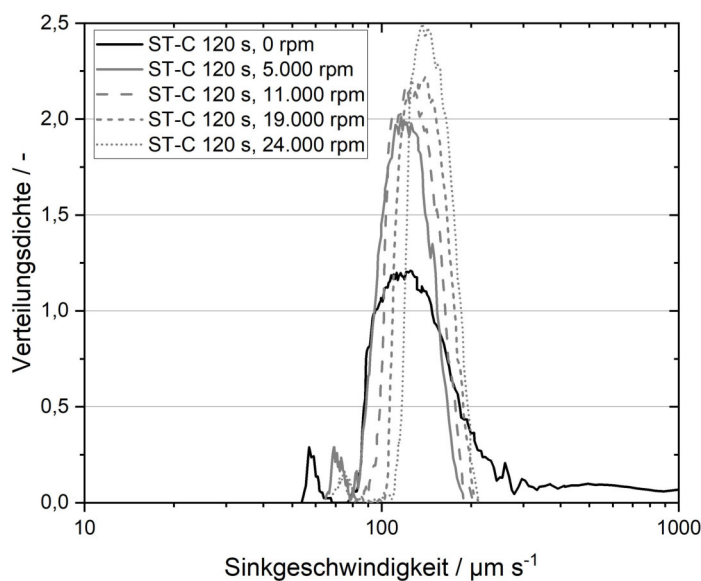


Abbildung 4.22.: Sinkgeschwindigkeitsverteilung des Bakterienstammes *ST-C* nach unterschiedlichen Scherbeanspruchungen

Abbildung 4.22 zeigt die Sinkgeschwindigkeitsverteilung in Abhängigkeit der Scherintensität bei einer Scherdauer von 120 s für den Bakterienstamm *ST-C*. Bereits eine Scherintensität von 5.000 rpm führt zu einer vollständigen Zerteilung der Zellketten in Einzelzellen. Während für die unbelastete Probe Zellketten im Bereich größerer Sedimentationsgeschwindigkeiten erkennbar waren, ist dies bereits nach dem geringsten Schereintrag nicht mehr der Fall. Bei höheren Scherintensitäten ändert sich die Form der Verteilungskurve nur noch unwesentlich. Sie verschiebt sich dagegen zu höheren Sinkgeschwindigkeitswerten aufgrund des Ablösens der kapsulären EPS. Somit ist ersichtlich, dass die Zellkettenzerstörung für den Zahnkranzdispergierer bei einer Scherdauer von 120 s unabhängig von der Scherintensität ist. Das Ablösen der EPS-Schicht erfordert dagegen höhere Scherintensitäten und erreicht erst bei maximaler Scherbelastung das Optimum hinsichtlich der Sinkgeschwindigkeit. Ein zusätzlicher Effekt durch die hohe Scherintensität liegt

in der Reduktion der Mediumviskosität und der zusätzlichen Beschleunigung der Sinkgeschwindigkeit begründet.

Basierend auf der Scherdauer und -intensität für den Zahnkrandispergierer, sowie auf dem Scherdruck für den Hochdruckhomogenisator, lässt sich ein vom Funktionsprinzip des Dispergiergerätes unabhängiger Energieeintrag bestimmen. Abbildung 4.23 zeigt die mittlere Sinkgeschwindigkeit mit zunehmendem Energieeintrag für die untersuchten Bakterienstämme für beide Dispergiergeräte.

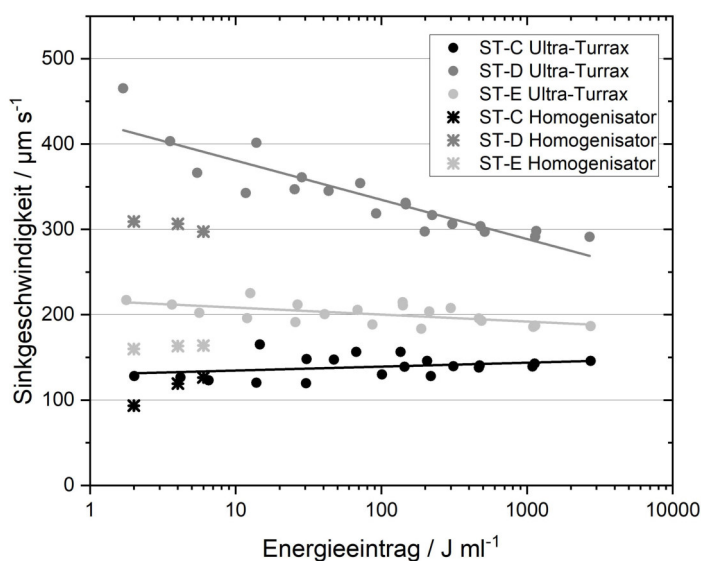


Abbildung 4.23.: Mittlere Sinkgeschwindigkeit in Abhängigkeit des Energieeintrags von *ST-C*, *ST-D* und *ST-E*

Die Berechnungsgrundlage des Energieeintrags in Abhängigkeit der Schermethode, sowie Scherparameter ist in Kapitel 3.3.1 und 3.3.2 erläutert. Die mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit und der volumenspezifische Energieeintrag zeigen einen logarithmischen Zusammenhang. Dabei weist *ST-D* eine deutliche Reduktion der mittleren Sedimentationsgeschwindigkeit mit zunehmendem Energieeintrag auf. Daraus lässt sich schließen, dass zur vollständigen Zellkettenerstörung sehr hohe Energieeinträge notwendig sind. Ist diese für den Prozess nicht notwendig, sondern lediglich eine Homogenisierung der Suspension das Ziel, ist ein niedrigerer Energieeintrag ausreichend. Damit sind Kosten einsparbar. Eine Tendenz für die Stämme *ST-E* und *ST-C* ist dagegen weniger deutlich, aber dennoch ersichtlich. Die Sinkgeschwindigkeit für den Bakterienstamm *ST-C* nimmt mit zunehmendem Energieeintrag durch das Ablösen der EPS-Schicht zu. Als Konsequenz kann für eine optimale Abtrenngeschwindigkeit der Zellen das Einbringen von möglichst viel Scherenergie von Vorteil für den Prozess sein.

Im Falle von *ST-E* lässt sich ebenfalls eine geringfügig fallende Abhängigkeit vom Energieeintrag

hinsichtlich der Sinkgeschwindigkeit erkennen. Da auch der Stamm *ST-E* in geringem Maße Zellketten ausbildet, kann dieser Effekt auf eine Zerteilung dieser Verbände hindeuten. Allerdings ist der Effekt weniger stark ausgeprägt.

Hinsichtlich der mittels Hochdruckhomogenisator gescherten Proben ergeben sich für alle drei Stämme geringere mittlere Sedimentationsgeschwindigkeiten im Vergleich zum Ultra-Turrax, bei identischem Energieeintrag. Die Erklärung hierfür ist bereits in Kapitel 4.2.2.2 diskutiert. Im Fall von *ST-D* findet schon bei dem geringsten Scherdruck von 2 MPa eine vollständige Zerstörung von Zellverbänden und Zellketten statt, sodass die Sedimentationsgeschwindigkeit entsprechend reduziert ist. Bei *ST-C* kam eine andere Charge zum Einsatz, sodass die Daten nur bedingt vergleichbar sind. Bei gleicher Charge ist bei mittels Homogenisator gescherten Proben ebenfalls von einer etwas geringeren mittleren Sinkgeschwindigkeiten wie bei der Scherung mit dem Ultra-Turrax auszugehen, da hierbei ebenfalls die Zellketten bereits bei geringen Scherdrücken zerstört und die kapsulären EPS nur zum Teil von der Zelloberfläche abgelöst sind. Die geringeren mittleren Sedimentationsgeschwindigkeiten bei *ST-E* sind ebenfalls auf die Zerstörung der kurzen Zellketten zurückzuführen.

Da somit für alle drei Stämme geringere mittlere Sedimentationsgeschwindigkeiten nach der Scherung mittels Hochdruckhomogenisator bestimmt wurden, könnte auch zusätzlich ein Unterschied aufgrund der Scherbeanspruchungsart für die unterschiedlichen Werte sorgen. Da der Ultra-Turrax im Vergleich zum Hochdruckhomogenisator wesentlich ungleichmäßiger schert und auch deutlich mehr Wärme ins System einbringt, könnten lokale Temperaturspitzen auch Veränderungen der EPS-Eigenschaften verursacht haben. Beispielsweise könnte die höhere Temperatur EPS-Verklebungen auflockern oder lösen, sodass die Zellen schneller sedimentieren können. Auch Veränderungen der EPS-Struktur sind aufgrund der Scherbeanspruchung möglich.

Die Ursachen für die Veränderung der mittleren Sedimentationsgeschwindigkeit der Kulturen ist bereits im vorigen Kapitel ausgiebig diskutiert. Da die mittlere Sinkgeschwindigkeit nur bedingt Informationen über die Abläufe während der Scherung ermöglicht, zeigt Abbildung 4.24 den Einfluss eines niedrigen Energieeintrages von $12,5 \text{ J} \cdot \text{ml}^{-1}$ (a) und eines hohen Energieeintrages von $1050 \text{ J} \cdot \text{ml}^{-1}$ (b) auf die Sinkgeschwindigkeitsverteilung der Stämme *ST-C* und *ST-D*. Da zusätzlich von Interesse ist, ob der Zusammenhang zwischen Scherdauer und Scherintensität einen entscheidenden Einfluss auf die Sinkgeschwindigkeitsverteilung hat, ist dies ebenfalls in Abbildung 4.24 dargestellt.

Abbildung 4.24 (a) verdeutlicht, dass die Kombination der Scherparameter Scherdauer und Scherintensität bei gleichem Energieeintrag die Sinkgeschwindigkeit maßgeblich beeinflusst. Der geringe volumenspezifische Energieeintrag von $12,5 \text{ J} \cdot \text{ml}^{-1}$ ergibt sich aus einer Scherdauer von 10 s bei 11.000 rpm , bzw. 60 s Scherdauer bei 5.000 rpm . *ST-C* zeigt bei einer Drehzahl von 5.000 rpm nach 60 s keine Verschiebung zu höheren Sedimentationsgeschwindigkeiten

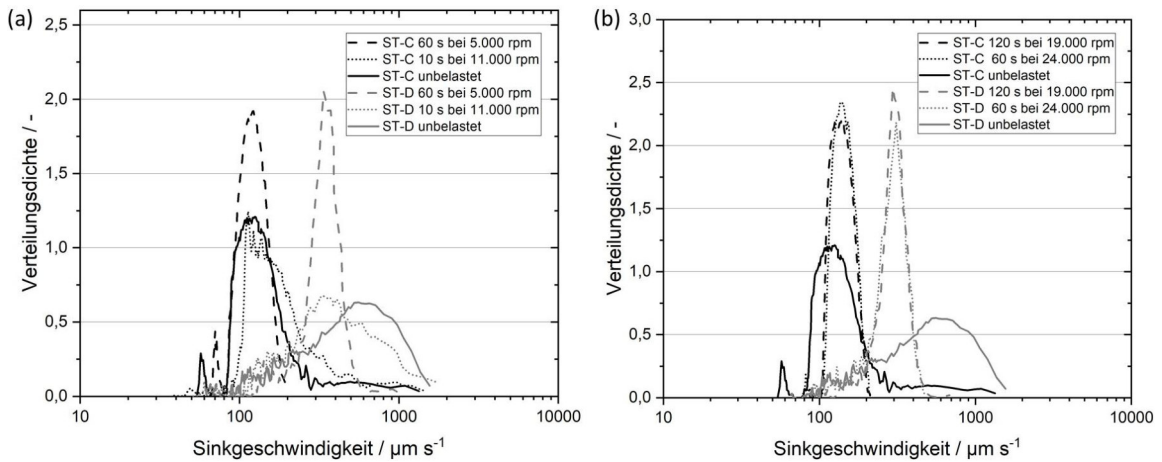


Abbildung 4.24.: Sinkgeschwindigkeitsverteilung bei einem volumenspezifischen Energieeintrag von $12,5 \text{ J} \cdot \text{ml}^{-1}$ (a) und $1050 \text{ J} \cdot \text{ml}^{-1}$ (b) von *ST-C* und *ST-D*

und damit auch keine Ablösung der kapsulären EPS. Da sich die Form der Verteilung durch die lange Scherdauer von 60 s allerdings verschmälert und der Anteil an Zellen bei höheren Geschwindigkeiten nicht mehr vorhanden ist, ist eine Zellkettenzerstörung anzunehmen. Bei einer Scherintensität von 11.000 rpm ist bereits nach 10 s eine klare Verschiebung der kompletten Verteilung zu höheren Sedimentationsgeschwindigkeiten ersichtlich, wobei weiterhin Zellketten im Medium vorhanden sind.

Ein ähnliches Verhalten zeigt *ST-D*, mit Ausnahme der nicht vorhandenen kapsulären EPS und der daraus resultierenden Verschiebung der Verteilung zu höheren Geschwindigkeitswerten. Auch hier sind die Zellketten bei der längeren Scherbeanspruchungsdauer und geringerer Scherintensität zerstört, während bei hoher Intensität und kurzer Beanspruchungsdauer noch eine sehr breite Verteilung zu sehen ist.

In Abbildung 4.24 (b) ist zum Vergleich ein hoher Energieeintrag von $1050 \text{ J} \cdot \text{ml}^{-1}$ dargestellt, welcher einerseits mit einer Drehzahl von 24.000 rpm bei 60 s Scherdauer und andererseits mit einer Drehzahl von 19.000 rpm bei 120 s Scherdauer erzielt wird. Es ist klar zu sehen, dass in diesem Fall die Kurven bei beiden Stämmen sehr gut übereinstimmen. Daraus lässt sich schließen, dass bei hohen Energieeinträgen die Zusammensetzung zwischen Scherdauer und -intensität keinen Einfluss auf den Wirkungsgrad von EPS-Ablösung und Zellkettenzerstörung hat. Zusammenfassend führen höhere Scherintensitäten bei gleichem Energieeintrag zu einer besseren Abscherung kapsulärer EPS und sind gleichzeitig schonender hinsichtlich der Zellkettenzerstörung. Je höher dabei die eingetragene volumenspezifische Energie, desto mehr gleichen sich die Ergebnisse der unterschiedlichen Scherintensitäten an.

Aus industrieller Sicht ist daher bei Stämmen, welche kapsuläre EPS ausbilden, eine hohe Scherintensität bei geringer Beanspruchungsdauer vorteilhaft. Ist die Erhöhung der Zellzahl durch Zerstören von Zellketten das Ziel, so ist eine geringe Scherintensität bei langer Scherdauer von Vorteil. Sind kapsuläre EPS und lange Zellketten vorhanden, so ist eine Kombination aus hoher Scherintensität und langer Scherdauer zielführend. Bezogen auf den im industriellen Umfeld meist zum Einsatz kommenden Hochdruckhomogenisator sollten Kulturen mit kapsulären EPS daher bei hohen Scherdrücken prozessiert werden. Im Falle von Kulturen mit langen Zellketten und dem Wunsch der Zellkettenzerstörung bieten sich eher geringe Scherdrücke an. Sollte eine Kombination aus kapsulären EPS und langen Zellketten vorliegen sind hohe Scherdrücke zu empfehlen. Bilden die Kulturen hingegen keine kapsulären EPS und auch keine langen Zellketten aus, oder ist die Zerstörung langer Zellketten nicht erwünscht, so ist der Einsatz von Scherbeanspruchungen im Prozess zu vermeiden. Hierbei sind nicht nur beabsichtigte Scherbeanspruchungen, wie beispielsweise durch einen Hochdruckhomogenisator zu berücksichtigen, sondern auch scherarme Pumpen und Rührergeometrien zu bevorzugen.

4.2.3. Einfluss der Scherung auf die Sedimentkompression

Der Einfluss der Scherbeanspruchung auf die Sedimentkompression für die Bakterienstämme *BAC* ist bereits in Kapitel 4.1.3 thematisiert. Analog dazu erfolgt diese Untersuchung auch für die Bakterienstämme *ST-C*, *ST-D* und *ST-E* anhand der Belastung in einem Zahnkranzdispersierer. Auf die zusätzliche Darstellung des Einflusses der Scherbeanspruchung im Hochdruckhomogenisator auf die Sedimentkompression wird aufgrund der Ähnlichkeit an dieser Stelle verzichtet. Analog zu Abbildung 4.7 ist in Abbildung 4.25 die Sedimentationskinetik vor und nach der Scherbeanspruchung am Beispiel von *ST-C* dargestellt.

Wie für die Bakteriensporen ist auch hier deutlich der Unterschied zwischen den Phasen der Sedimentation und der Sedimentkompression ersichtlich. Analog zu den *BAC*-Stämmen gibt die Position des Überganges von Sedimentations- zu Kompressionskurve qualitative Einblicke in die Sedimentationskinetik der Probe. Die Scherbeanspruchung führt zu einer Verschiebung des Übergangspunktes zu kürzeren Sedimentationszeiten und einer geringeren Sedimenthöhe. Dies bedeutet einerseits, dass die Scherung eine Erhöhung der Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel und andererseits eine Kompression des gebildeten Sediments zur Folge hat. Wie zuvor bei *BAC-C* bereits erwähnt sind beide Effekte im Hinblick auf die industrielle Separation von Starterkulturen erstrebenswert. Wie Sobisch und Lerche bereits zeigten [114, 115], deutet der in Abbildung 4.25 dargestellte Verlauf der Sedimentationskinetik auf starke Wechselwirkungen zwischen den Partikeln innerhalb der unbeanspruchten Probe hin.

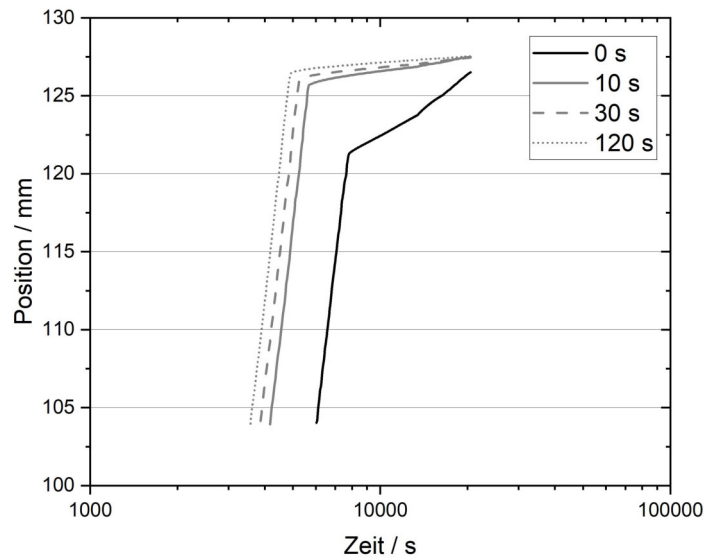


Abbildung 4.25.: Sedimentationskinetik am Beispiel von *ST-C* aus der LUMiSizer-Analyse nach Scherbeanspruchung mit dem Zahnkranzdispergierer bei 19.000 *rpm*

Im Fall von *ST-C* treten diese Wechselwirkungen vermutlich zwischen den Zellen und den kapsulären EPS, sowie zwischen den mit kapsulären EPS umgebenen Zellen untereinander auf. Durch die Scherbeanspruchung erfolgt das Ablösen der kapsulären EPS, sodass die Wechselwirkungen zwischen den Zellen aufgrund der fehlenden EPS-Schicht deutlich reduziert sind.

Für eine detailliertere Interpretation sind der Verlauf der Sedimenthöhe und der Sedimentkompression in Abhängigkeit der relativen Zentrifugalbeschleunigung für die Stämme *ST-C*, *ST-D* und *ST-E* in den Abbildung 4.26, 4.27 und 4.28 gezeigt. Für alle Stämme ist dabei zu beachten, dass sich der erste aufgetragene Wert bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von $1 \times g$ theoretisch berechnet, da dieser mit der verwendeten Analysemerhode nicht messbar ist.

Für alle Stämme ist dabei auffällig, dass der erste Messwert bei einer niedrigen relativen Zentrifugalbeschleunigung über dem exponentiellen Fit liegt. Diese Abweichung ist durch eine zu geringe Analysendauer zu erklären. Da bei der ersten Stufe vor der Sedimentkompression die eigentliche Sedimentation erfolgt, ist es möglich, dass die verbleibende Zeit nicht ausreicht, um das Sediment der Zentrifugalbeschleunigung entsprechend zu komprimieren. Daraus folgt eine zu hoch ermittelte Sedimenthöhe, was wiederum zu geringeren Sedimentkompressioswerten führt.

Die Auswirkungen der Scherbeanspruchung auf die Sedimenthöhe und Sedimentkompression von *ST-C* sind in Abbildung 4.26 dargestellt. Analog zu den *BAC*-Proben zeigt die Sedimenthöhe der unbelasteten Probe, siehe Abbildung 4.26 (a), eine exponentielle Abnahme bei steigender

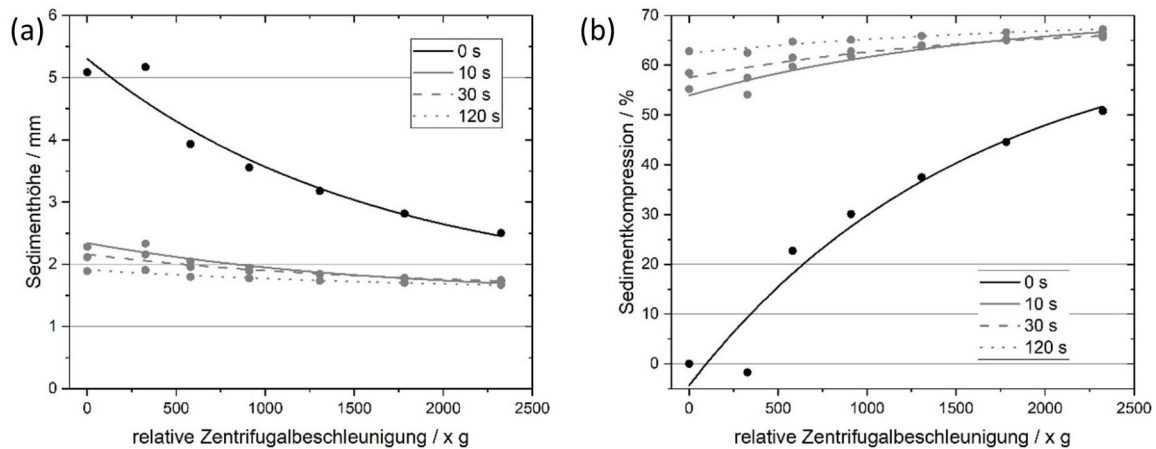


Abbildung 4.26.: Sedimenthöhe (a) und Sedimentkompression (b) in Abhängigkeit der relativen Zentrifugalbeschleunigung für den Bakterienstamm *ST-C* nach Scherbeanspruchung mittels Zahnkranzdisperspierer bei 19.000 rpm

Zentrifugalbeschleunigung. Dies resultiert in einer deutlichen Sedimentkompression, wie in Abbildung 4.26 (b) dargestellt. Die starke Kompressionsneigung ist auf die kapsuläre EPS-Schicht um die Zellen zurückzuführen. Aufgrund der elastischen Eigenschaften der EPS-Moleküle werden die EPS-Schichten mit zunehmender relativer Beschleunigung komprimiert, sodass das gesamte Haufwerk eine Kompression erfährt. Bereits nach einer Scherdauer von 10 s ändert sich diese Eigenschaft für den Stamm *ST-C*. Durch das Ablösen der EPS-Schicht aufgrund der Scherwirkung reduzieren sich die elastischen Eigenschaften des Sediments und die Sedimentkompression verläuft deutlich flacher. Eine Erhöhung der Scherdauer führt zwar zu einer Verstärkung dieses Effekts, allerdings im deutlich geringeren Maße. Dies ist darin begründet, dass sich weiterhin EPS durch die Steigerung der Scherbelastung ablösen, wobei der Hauptanteil bereits nach einer Scherdauer von 10 s von der Zelloberfläche entfernt ist. Die bereits zu Beginn geringere Höhe des Sediments bei einer Scherung von 10 s stützt diese Hypothese, welche auf eine engere Packung des Haufwerks bereits bei niedrigeren Zentrifugalbeschleunigungen hindeutet.

Für die Zellen des *ST-D* Stamms sind die Auswirkung der Scherbelastung auf die Sedimenthöhe in Abbildung 4.27 (a) und auf die Sedimentkompression in Abbildung 4.27 (b) dargestellt. Dabei lässt sich ebenfalls eine exponentielle Abnahme der Sedimenthöhe und damit eine exponentielle Zunahme der Sedimentkompression mit steigender relativer Zentrifugalbeschleunigung erkennen. Im Vergleich zu den *ST-C* Proben wird deutlich, dass sich der Grad des exponentiellen Verlaufs bei zunehmender Scherbelastung nicht ändert, während die absolute Sedimenthöhe reduziert ist. Dieser Effekt lässt sich durch die Zellkettenzerstörung erklären. Im unbelasteten Zustand ordnen sich die Zellketten durch Sedimentation lose geordnet im Haufwerk an. Durch die Zunahme der

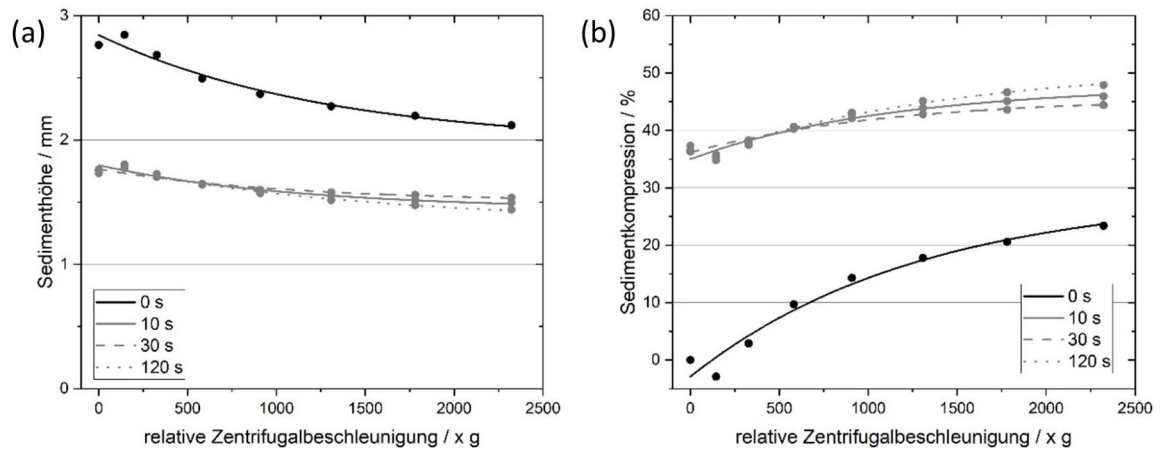


Abbildung 4.27.: Sedimenthöhe (a) und Sedimentkompression (b) in Abhängigkeit der relativen Zentrifugalbeschleunigung für den Bakterienstamms *ST-D* nach Scherbeanspruchung mittels Zahnkranzdispergierer bei 19.000 rpm

relativen Zentrifugalbeschleunigung erfolgen Umordnungsvorgänge im Haufwerk, sodass sich dieses kompaktiert. Durch den Eintrag von Scherung in die Probe erfolgt die Zellkettenzerkleinerung. Daher ist die Sedimenthöhe bereits bei niedrigen Beschleunigungen geringer im Vergleich zur unbelasteten Probe. Durch die Erhöhung der Zentrifugalbeschleunigung ergeben sich ähnliche Umordnungsvorgänge im Haufwerk wie bei der unbelasteten Probe, die zu einer Kompaktierung führen.

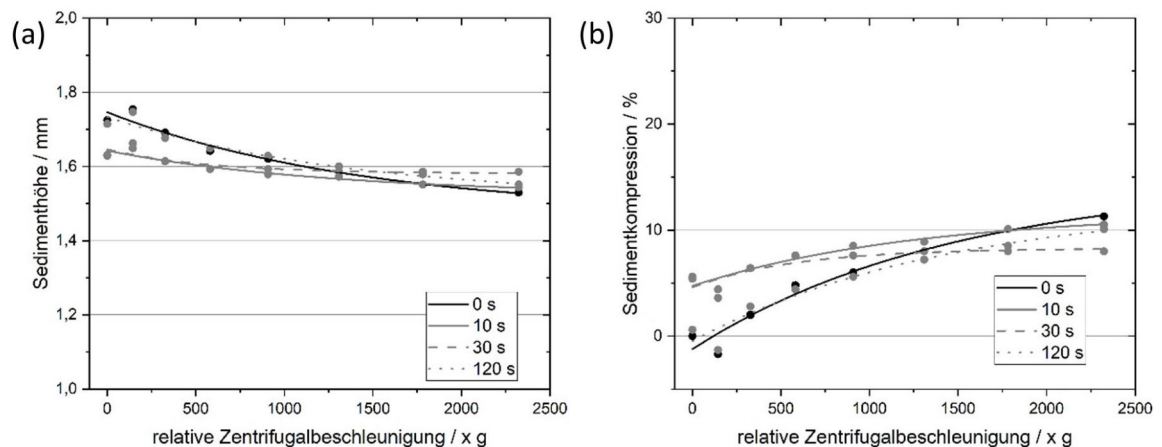


Abbildung 4.28.: Sedimenthöhe (a) und Sedimentkompression (b) in Abhängigkeit der relativen Zentrifugalbeschleunigung für den Bakterienstamms *ST-E* nach Scherbeanspruchung mittels Zahnkranzdispergierer bei 19.000 rpm

Der Einfluss der Scherbelastung auf die Sedimentationskinetik für den Stamm *ST-E* ist in Abbildung 4.28 (a) als Sedimenthöhe und in Abbildung 4.28 (b) als Sedimentkompression in Abhängigkeit der Scherdauer und relativen Beschleunigung aufgetragen. Auch für diesen Stamm ist eine geringe Reduktion der Sedimenthöhe und Erhöhung der Sedimentkompression aufgrund der relativen Zentrifugalbeschleunigung erkennbar, allerdings ist dieser Effekt nur sehr gering im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen ausgeprägt. Die Sedimentkompression liegt für den Stamm *ST-E* bei maximal 10 %, unabhängig von der Scherdauer, im Vergleich zu Maximalwerten von 50 % im Falle von *ST-D* und 70 % für *ST-C*. Die Zellen von *ST-E* liegen bereits im Fermentationsmedium meist als Einzelzellen ohne kapsuläres EPS vor. Daher sind die beobachteten kompressiblen Eigenschaften auf die spezifische Zellstruktur dieses Bakterienstammes zurückzuführen.

4.3. Übertragung der Laborergebnisse in den Pilot-Maßstab

Dieses Kapitel widmet sich der Übertragung der in den Laborexperimenten bestimmten Ergebnisse in den Pilot-Maßstab zur Evaluierung der Anwendbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse auf industrielle Prozesse. Teile dieses Kapitels sind bereits veröffentlicht und für die vorliegende Arbeit angepasst [116].

Dazu erfolgen Separationsversuche zur Bewertung der Sedimentationsgeschwindigkeit und Sedimentkompression von belasteten und unbelasteten *ST*-Stämmen in einem Tellerseparator (Pathfinder 1, GEA Westfalia Separator Group GmbH, Oelde, Deutschland). Als Stoffsystem sind die Stämme *ST-C* und *ST-E* eingesetzt, jeweils in unbelasteter Form und nach Scherbeanspruchung im Hochdruckhomogenisator bei 8 MPa. Um den Einfluss der Scherung auf die Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel am Tellerseparator zu zeigen, erfolgt eine schrittweise Erhöhung des Feed-Volumenstromes bei sonst konstanten Betriebsparametern. Durch den Volumenstrom wird die Verweilzeit der Partikel im Tellerseparator definiert. In Abhängigkeit der Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen kann die Verweilzeit ausreichend für eine Abtrennung sein oder es zu einem Partikeldurchschlag kommen. Dementsprechend lässt sich die Trenneffizienz durch die Trübung des Überlaufes charakterisieren und somit Rückschlüsse auf die Sinkgeschwindigkeit ziehen. Durch die Steigerung des Volumenstromes sinkt auch gleichzeitig die Verweilzeit der Partikel, bis die Sedimentationsgeschwindigkeit nicht mehr zum Abscheiden der Partikel ausreicht und ein deutlicher Anstieg der Trübung am Überlauf messbar ist. Die Trübung des Überlaufes wird über einen internen Trübungssensor bestimmt. In Abbildung 4.29 ist der Verlauf der Trübung im Überlauf in Abhängigkeit des Feedvolumenstroms für die Stämme *ST-C* und *ST-E* für die belastete und unbelastete Probe gezeigt.

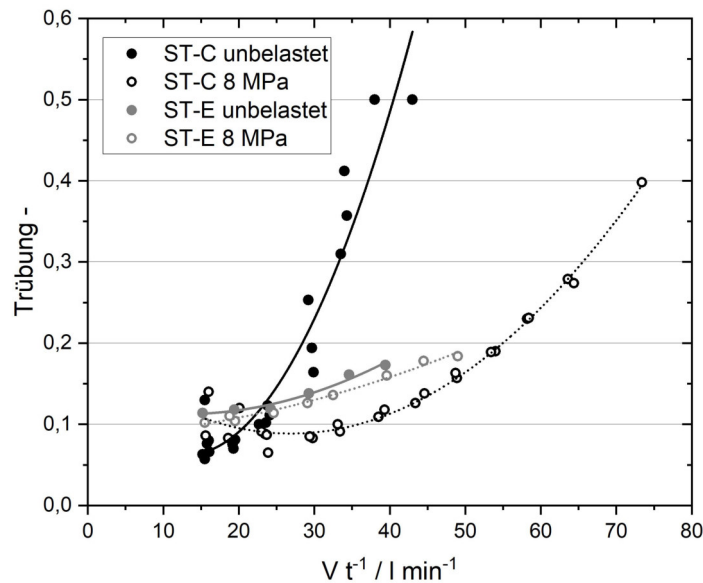


Abbildung 4.29.: Abhängigkeit der Überlauftrübung vom eingestellten Volumenstrom am Tellerseparator für den kapsuläre EPS produzierenden Stamm *ST-C* und den freie EPS produzierenden Stamm *ST-E*. Einfluss der Scherbeanspruchung mittels Hochdruckhomogenisator bei 8 MPa Homogenisierungsdruck

Beide Stämme zeigen grundsätzlich einen exponentiellen Anstieg der Trübung mit zunehmendem Volumenstrom. Gleichzeitig ergeben sich auch deutliche Unterschiede zwischen den beiden Bakterienarten. Die unbelastete Probe von *ST-E* beginnt bei einem Trübungswert von 0,1 bei einem Volumenstrom von $5 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ und bleibt selbst bei einem maximalen Volumenstrom von $50 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ unter einem Trübungswert von 0,2. Nach Scherbelastung sind die Trübungswerte von *ST-E* leicht reduziert, aber die Abhängigkeit zum Volumenstrom bleibt unverändert. Diese leicht reduzierten Trübungswerte deuten auf eine Erhöhung der Sedimentationsgeschwindigkeit hin, welche durch die Reduktion der Medienviskosität erklärbar ist.

ST-C zeigt hingegen sowohl einen deutlichen Unterschied zwischen belasteter und unbelasteter Probe, als auch im unbelasteten Zustand im Vergleich zu *ST-E*. Die Trübungswerte für die unbelastete *ST-C* Probe liegen zu Beginn niedriger im Vergleich zu *ST-E*. Allerdings übersteigt der Trübungswert bereits bei etwa $40 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ den Grenzwert des Trübungssensors von 0,5. Folglich ist die Sedimentationsgeschwindigkeit der unbelasteten *ST-C* Bakterien geringer im Vergleich zu den Zellen von *ST-E*. Dieser Umstand ist die Folge der kapsulären EPS-Schicht. Nach der Scherung mit 8 MPa zeigt *ST-C* einen sehr ähnlichen Verlauf wie *ST-E* und bleibt mit den Trübungswerten stets unterhalb von *ST-E*. Wie in Kapitel 4.2.2 diskutiert, führt die Scherbeanspruchung von *ST-C*

zum Ablösen der kapsulären EPS von der Zellwand und dadurch zu einer deutlichen Steigerung der Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel. So ist bei einer Trübung von etwa 0,3 im unbelasteten Zustand ein Volumenstrom von etwa $35 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ prozessierbar, während nach der Scherbeanspruchung bei gleicher Trübung ein Volumenstrom von etwa $70 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ als Betriebsparameter möglich ist. Somit ist durch die Scherbeanspruchung von *ST-C* der Durchsatz des doppelten Volumenstroms bei gleicher Trenneffizienz erzielbar, was einer Steigerung der Separationsproduktivität von 50 % entspricht. Dies korreliert mit den relativen Verhältnissen zwischen den beanspruchten und nicht beanspruchten Zellsuspensionen der Stämme *ST-E* und *ST-C* aus den Laborexperimenten, beschrieben in Kapitel 4.2.2.2 und 4.2.2.3. Damit ergibt sich eine gute Übereinstimmung zwischen Laborversuchen und Prozesswerten.

Zusätzlich zu einem möglichst hohen Durchsatz ist als zweiter wichtiger Parameter für den Betrieb eines Tellerseparators die Standzeit bis zum Erreichen des maximalen Füllgrads und somit des notwendigen Ausschleusens des Feststoffes von enormer Bedeutung. Kürzere Standzeiten bedeuten längere Totzeiten und somit eine Reduktion der Produktionskapazität. Im Falle der Bakterienstämme resultieren kompaktere Sedimente in einem verbesserten Verhältnis von Sedimentvolumen zu Suspensionsvolumen und somit einer höheren Feststoffmenge bei dem gleichen maximalen Füllvolumen. Daher ist die Übertragbarkeit der Laborergebnisse zur Sedimentkompression von *ST-C* und *ST-E* in den Pilot-Maßstab von Interesse. In Abbildung 4.30 ist die Trübung im Überlauf des Tellerseparators in Abhängigkeit der Versuchsdauer aufgetragen. Der Volumenstrom bleibt konstant, sodass ein Anstieg der Trübung auf das Erreichen des maximalen Füllgrades hindeutet. Der Sedimentbereich des Separators füllt sich mit zunehmender Versuchsdauer bis das maximale Volumen erreicht ist, sodass keine weiteren Partikel mehr abgeschieden werden können und dadurch in den Überlauf gelangen. Für den verwendeten Tellerseparator liegt der Grenzwert des Trübungssensors, der den Zeitpunkt für die Entleerung des Gerätes signalisiert, bei 0,5.

Analog zu den Versuchen bezüglich der Sedimentationsgeschwindigkeit sind sowohl die unbelasteten, als auch die mit 8 MPa im Hochdruckhomogenisator beaufschlagten Proben von *ST-C* und *ST-E* Gegenstand der Untersuchung.

ST-E zeigt im unbelasteten Zustand eine durchschnittliche Trübung von 0,1 bis 0,15 und erreicht einen Trübungswert von 0,5 nach etwa 260 min. Nach der Scherbeanspruchung ist der Trübungswert von 0,5 nach etwa 250 min erreicht. Dies entspricht in etwa den Erwartungen, da die Scherbeanspruchung keinen nennenswerten Effekt auf die Sedimentkompression von *ST-E* hat. *ST-C* zeigt dagegen im unbelasteten Zustand eine deutlich kürzere Versuchsdauer von 75 min, bis ein Trübungswert von 0,5 erreicht ist. Folglich bildet *ST-E* ein wesentlich dichteres Sediment als *ST-C*. Im Gegensatz zu *ST-E* zeigt für *ST-C* die Scherbeanspruchung einen deutlichen Effekt auf die Zeit, bis zum Erreichen einer Trübung von 0,5 im Überlauf. Während die unbelastete Probe

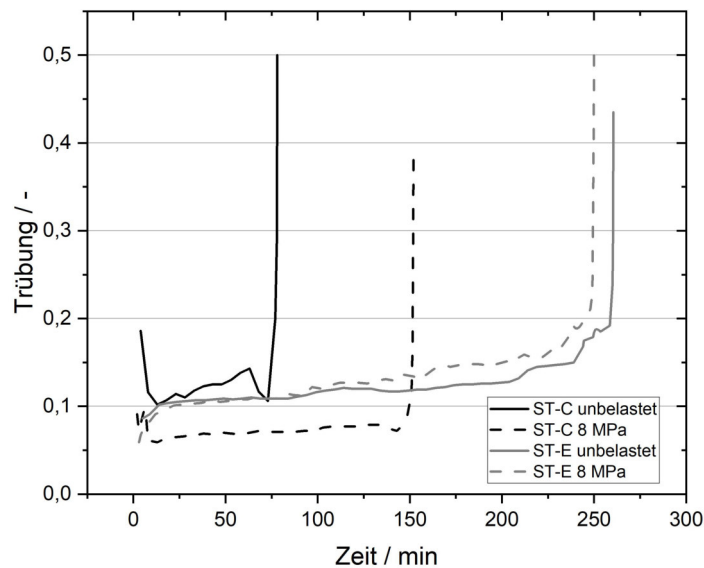


Abbildung 4.30.: Abhängigkeit der Überlauftrübung von der Versuchsdauer bei konstantem Volumenstrom am Tellerseparator für den kapsuläre EPS produzierenden Stamm *ST-C* und den freie EPS produzierenden Stamm *ST-E*. Einfluss der Scherbeanspruchung mittels Hochdruckhomogenisator bei 8 MPa Homogenisierungsdruck

nach etwa 75 min den Grenzwert von 0,5 erreicht, kann die belastete Probe etwa doppelt so lange prozessiert werden, bis der maximal zulässige Trübungswert erreicht ist. Folglich ist das Sediment von *ST-C* durch die Scherbeanspruchung auf etwa 50 % des ursprünglichen Sedimentvolumens komprimierbar. Dieser korreliert mit den Werten aus Abbildung 4.26 wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben. Auch die etwa dreifach längere Laufzeit der unbelasteten Probe von *ST-E* im Vergleich zu *ST-C* stimmt überein mit den Ergebnissen aus den Laborversuchen. Hier ergab sich für die Bakterienzellen des Stammes *ST-C* eine dreimal höhere Sedimenthöhe im Vergleich zu *ST-E*.

Zusammenfassend zeigt sich, dass sowohl die spezifischen Eigenschaften des Bakterienstamms als auch die Scherbeanspruchung einen deutlichen Einfluss auf die Separationsparameter bakterieller Zellen und Sporen haben können. So resultiert aus den Laborversuche mittels optischer Zentrifugation ein kombinierter Einfluss aus Probenkonzentration, Ablösung kapsulärer EPS, Zellkettenzerstörung und Änderungen der Medienviskosität auf die Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel. Ebenfalls zeigt die Scherbeanspruchung einen deutlichen Effekt auf die Kompressibilität des Sediments. Die Erkenntnisse aus dem Labormaßstab konnten im Anschluss erfolgreich auf den Pilotmaßstab übertragen werden.

4.4. Aufreinigung von Exopolysacchariden aus zellfreiem Fermentationsmedium

Bisher lag der Schwerpunkt der Betrachtungen auf der Abtrennung der Zellen als Wertprodukt aus einem Fermentationsmedium. Ein weiterer Fokus der industriellen und wissenschaftlichen Forschung liegt auf der Aufarbeitung und Wertproduktgewinnung aus dem Fermentationsmedium. Eine Vielzahl von Exopolysaccharid- (EPS) produzierenden bakteriellen Starterkulturen, wie beispielsweise *Streptococcus thermophilus*, werden zum Einsatz in der Lebensmittelproduktion im industriellen Maßstab fermentiert. Nach der Zellseparation bleibt das Fermentationsmedium als Überstand zurück, das eine Vielzahl von bakteriellen Stoffwechselprodukten enthält. Bisher wurde die Fermentationsbrühe im industriellen Maßstab teilweise als Abfallstrom weiter verwertet. Aufgrund des gesteigerten Bedarfs an natürlichen Zusatzstoffen in Lebensmitteln, liegt das Interesse verstärkt auf der Nutzung von Exopolysacchariden als Wertprodukt. Die hohe Wasserbindungsfähigkeit der EPS und die damit verbundene stabilisierende und viskositätssteigernde Wirkung in Emulsionen, sowie der Herstellungsprozess nach Qualified Presumption of Safety-Status, kurz QPS, ergeben ein hohes Interesse der Lebensmittelindustrie daran pflanzliche Lebensmittelzusatzstoffe, wie Xanthan oder Johannisbrotkernmehl, durch ein EPS-Präparat zu ersetzen. Den Status Qualified Presumption of Safety vergibt die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit und kennzeichnet damit die Unbedenklichkeit eines Stoffes als Lebensmittelzusatz. Folglich müssen die Zellen bei der Herstellung des EPS-Präparates nicht vollständig entfernt sein, wie es beispielsweise für den Mikroorganismus bei der Xanthan-Produktion vorgeschrieben ist. Dadurch reduziert sich der Aufwand der Zellseparation erheblich. Durch die Vielfalt an EPS-Molekülen in Abhängigkeit des produzierenden Bakterienstamms und die damit einhergehenden unterschiedlichen chemischen Eigenschaften und Wirkungsweisen, bietet der Einsatz von spezifischen EPS die Möglichkeit Produkteigenschaften gezielt zu beeinflussen. Daher ist der Bedarf an Aufarbeitungsmethoden zur Abtrennung der EPS aus der Fermentationsbrühe vorhanden. Das Fermentationsmedium beinhaltet allerdings nicht nur das Zielprodukt, sondern enthält selbst nach der Zellabtrennung eine große Anzahl an unerwünschten Nebenprodukten oder Zellresten. Erschwerend kommt hinzu, dass die Konzentration an EPS in der Regel mit $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ gering ist. Die Konzentration und Abtrennung der EPS aus dem komplexen Fermentationsmedium ist dadurch kostenintensiv und zeitaufwändig. Diese Arbeit betrachtet ein im Vergleich zum etablierten Laborverfahren vereinfachtes EPS-Isolierungsverfahren im Pilotmaßstab. Die Methode beinhaltet eine Mikrofiltration zur Entfernung der verbleibenden Zellreste und einer Ultrafiltration mit einem abschließenden Waschschriff zur Konzentrierung der EPS. Beide Filtrationsschritte, sowie die Waschung sind mit der Filtrationsanlage Dynotest realisiert. Im Anschluss

an die Abtrennung erfolgt die Gefriertrocknung des Permeats und es wird als Endprodukt ein pulverförmiges EPS-Präparat gewonnen.

4.4.1. Einfluss der Rührerdrehzahl auf die Retention eines Modellpolysaccharides

Um die Eignung der Dynotest für die Konzentrierung und Isolierung der EPS zu untersuchen, ist zunächst der Einfluss der Rührerdrehzahl im Inneren der Filtrationskammer auf die Retentionsfähigkeit der Membran zu bewerten. Da das Fermentationsmedium mit vielen verschiedenen hoch- und niedermolekularen Substanzen sich nicht als Testmedium eignet, wird ein Modellsystem für die Versuche eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine wässrige Polysaccharidlösung aus Dextran 500 in einer Konzentration von $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ mit einem Molekulargewicht von 500 kDa . Für die Filtration kam eine NADIR-Ultrafiltrationsmembran UP005 P eingesetzt und ein konstanter Transmembrandruck von $0,3 \text{ MPa}$ zum Einsatz. Die Rührerdrehzahl variiert in Schritten von 300 rpm von 0 rpm bis 1.200 rpm . Abbildung 4.31 zeigt den Einfluss der Rührerdrehzahl auf die zurückgehaltene Menge an Dextran 500 im Retentat in Relation zur eingesetzten Menge im Feed. Eine Zunahme der Rührerdrehzahl in der Filtrationskammer führt zu einer Steigerung der Rückhaltefähigkeit der Membran. Ohne Rühreintrag ergibt sich die geringste Retention von etwa 15 %. Bereits bei einer Rührerdrehzahl von 300 rpm ist die Retention auf etwa 70 % deutlich angestiegen. Der maximale Rückhalt von etwa 90 % ist bei einer Drehzahl von 1.200 rpm erreichbar. Dieser Zusammenhang zwischen Rührerdrehzahl und Retention ist durch den sehr geringen Verzweigungsgrad des Dextrans zu erklären. Aufgrund der Druckdifferenz zwischen der Feed- und der Filtratseite kommt es zu einer Strömung, die orthogonal zur Membranoberfläche gerichtet ist. Die Makromoleküle des Dextrans richten sich in Strömungsrichtung aus und können aufgrund ihrer nahezu linearen Struktur die Membranporen passieren. Wie von Baker beschrieben [117], ermöglicht die Ausrichtung linear strukturierter Makromoleküle in orthogonaler Richtung zur Membranoberfläche, dass Moleküle mit einem höheren Molekulargewicht als die nominale Porengröße der Membran diese dennoch durchdringen können. Die rotierende Strömung, die durch den Rührer verursacht wird, führt zu einer parallelen Strömung über die Membranoberfläche. Auch hier richten sich die Moleküle in Strömungsrichtung aus, jedoch in diesem Fall parallel zur Membranoberfläche. Aus diesem Grund können sie die Poren nicht passieren. Obwohl dieser Effekt mit steigender Rührerdrehzahl zunimmt, führen geringe Rührerdrehzahlen zu einer signifikanten Rückhaltung. Somit resultiert bereits ein geringer Energieverbrauch zu einer erhöhten Ausbeute an zurückgehaltenem Polysaccharid.

Da die Analyse der Retention, wie in Abbildung 4.31 dargestellt, lediglich auf der gravimetrischen Bestimmung der Trockenmasse beruht, ist eine weitere Analyse von Feed, Permeat und Retentat notwendig. Durch die Identifizierung der in den Strömen vorhandenen Makromoleküle mittels

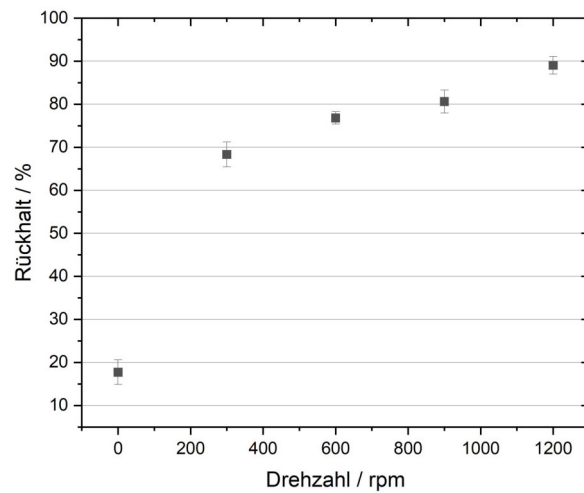


Abbildung 4.31.: Rückhalt von gelöstem Dextran 500 nach Filtration mit der DynoTest

Größenausschlusschromatographie (SEC) ist der Weg der Polysaccharide während der Filtration eindeutig nachvollziehbar.

In Abbildung 4.32 sind die Ergebnisse der SEC-Analysen von Feed, Retentat und Permeat einer ohne Rührereinsatz durchgeführten Filtration (a) und einer bei 1.200 rpm Rührerdrehzahl durchgeführten Filtration (b), dargestellt. Zur Verdeutlichung der einzelnen Kurvenverläufe sind die Kurven nicht bei gleicher Basislinie dargestellt, sondern zu höheren Intensitätswerten verschoben.

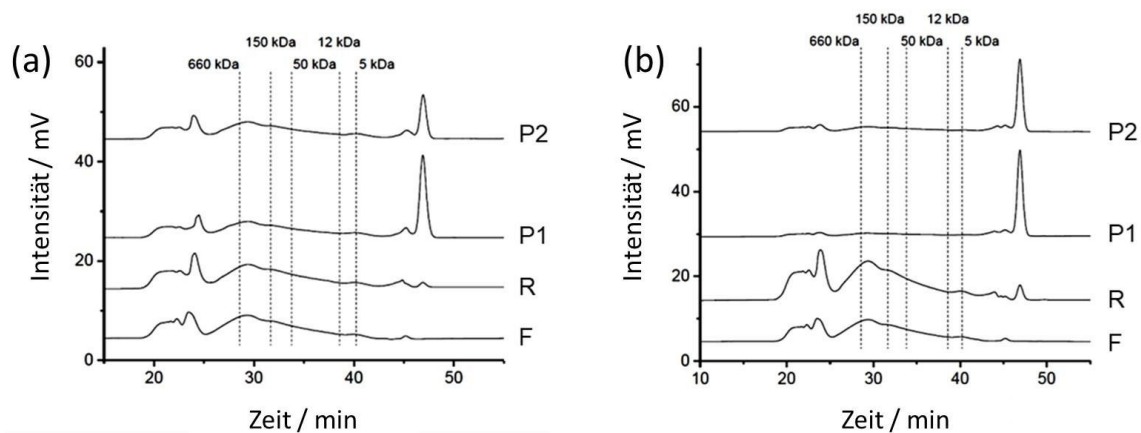


Abbildung 4.32.: SEC-Analysen von Feed (F), Retentat (R) und Permeat (P) einer ungerührten Filtration (a) und einer bei 1.200 rpm gerührten Filtration (b) mit der Dynotest

In beiden Diagrammen sind keine Unterschiede in der jeweiligen Feed-Kurve erkennbar, sodass die Vergleichbarkeit der beiden Versuche gegeben ist. In Abbildung 4.32 (a) unterscheidet sich die Retentat-Kurve kaum merklich von der Feed-Kurve, während sie in Abbildung 4.32 (b) deutliche Unterschiede aufweist. Der Peak bei einer Retentionszeit von ca. 25 min zeigt nach der Filtration eine höhere Intensität. Dies deutet auf die Konzentrierung von Dextran 500 im Retentat hin. Gleichzeitig ist an dieser Stelle der Retentionszeit nahezu kein Peak im Permeat erkennbar. Dadurch ist ein Durchtritt des Dextrans 500 durch die Membran größtenteils ausgeschlossen. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 4.32 (a) bei einer Filtration ohne Rühren ein deutlicher Peak im Permeat und keine Steigerung in der Peakintensität im Retentat für eine Retentionszeit von 25 min, zu welcher das Dextran 500 erwartet wird, erkennbar. Das bestätigt, dass die linearen Polysaccharide durch die Membran ins Permeat gelangen, obwohl sie von der Membran aufgrund ihrer Porengröße theoretisch rückhaltbar sind. In beiden Diagrammen fallen im Permeat deutlich sichtbare Peaks kleiner 5 kDa auf. Diese Peaks sind auf Stoffe zurückzuführen, welche sich aus der Membran herauslösen und haben für die Versuche in dieser Arbeit keinerlei Relevanz. Die in diesem Teilkapitel durchgeführten Versuche konnten somit den Einfluss der Rührerdrehzahl der Dynotest auf das Retentionsverhalten der Membran zeigen.

4.4.2. Selektivität bei der Filtration mit der Dynotest

Bisher stand die grundsätzliche Fähigkeit der eingesetzten Membran hinsichtlich der Rückhaltung der Polysaccharide im Fokus der Untersuchungen. Da es sich bei Fermentationsmedium um eine Mischung vieler Einfach- und Mehrfachzucker, sowie weiterer Komponenten handelt, ist die Selektivität der Membran hinsichtlich des Verzweigungsgrades von Makromolekülen und deren Molekulargewicht von Bedeutung. Zunächst erfolgt analog zu Kapitel 4.4.1 die Bewertung der Rückhaltung der NADIR-Ultrafiltrationsmembran UP005 P für das deutlich kleinere Polysaccharid Dextran 40 mit einem Molekulargewicht von 40 kDa. Dieses Molekulargewicht liegt nahe an der Größenordnung der nominalen Porengröße der Ultrafiltrationsmembran, um die Selektivität von Polysacchariden im Größenbereich der EPS zu simulieren. Im Anschluss wird ein Polysaccharid-Gemisch aus Dextran 500, Dextran 40 und dem Einfachzucker Saccharose zur Nachstellung der wesentlichen Bestandteile des Fermentationsmediums, wie Proteine, EPS und niedermolekulare Substanzen, in einem Mehrkomponententest hinsichtlich der Filtration in der Dynotest untersucht. Für die Versuche kamen Lösungen mit einer Konzentration von $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ pro Saccharid zum Einsatz. Die Filtration fand bei einer Rührerdrehzahl von 1.200 rpm, sowie einem Transmembrandruck von 200 kPa statt.

Das Ergebnis der Einkomponentenfiltration zeigt das SEC-Chromatogramm für Feed, Permeat und Retentat in Abbildung 4.33 (a). Im Feed ist bei einer Retentionszeit von 30 min deutlich der Peak des Dextrans 40 zu erkennen. Bei der gleichen Retentionszeit zeigt sich der Peak im Retentat mit einem 3-fach höheren Messsignal. Vor dem Hintergrund, dass das Integral der Kurve die Menge des detektierten Materials darstellt, kann von einer Dextran-Anreicherung im Retentat ausgegangen werden. Im Gegensatz dazu sind im Permeat keine weiteren Substanzen nachweisbar. Dies lässt die Vermutung zu, dass sich im Permeat kein Dextran 40 befindet und somit auch die Rückhaltung kleiner Moleküle durch die Membran möglich ist.

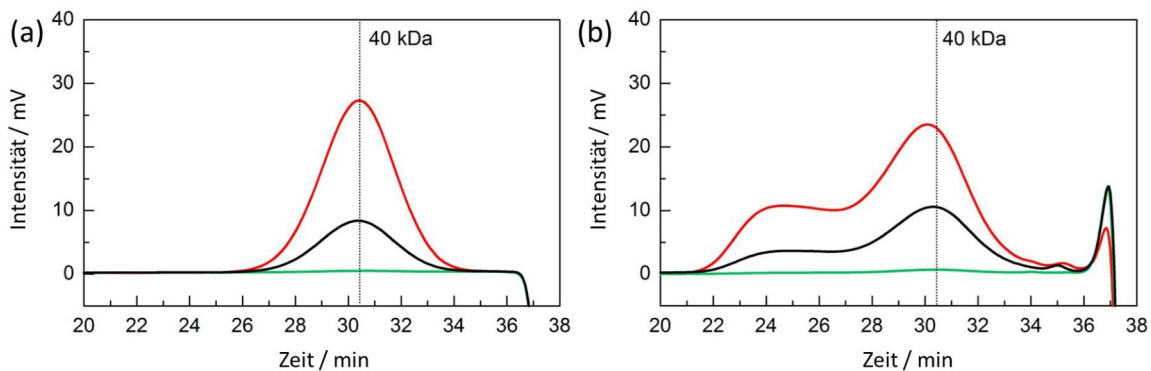


Abbildung 4.33.: SEC-Analyse von Feed (schwarz), sowie Permeat (grün) und Retentat (rot) nach Ultrafiltration

Zur Bewertung der Selektivität der Membran wurde ein Mehrkomponententest anhand einer wässrigen Lösung aus drei verschiedenen Polysacchariden durchgeführt. Die Ergebnisse der SEC-Analyse sind für den Feed, das Permeat und das Retentat in Abbildung 4.33 (b) dargestellt. Für den Feed zeigt sich ein Peak bei einer Retentionszeit von 30 min, der Dextran 40 repräsentiert, sowie eine höhere Intensität über einen breiten Bereich zwischen 22 und 29 min. Dieser resultiert aus Dextran 500. Zudem findet sich bei einer Retentionszeit von 37 min ein Peak, der das Monosaccharid Saccharose repräsentiert. In Übereinstimmung mit dem Einkomponententest erfolgt eine Konzentration von Dextran 500 und Dextran 40 im Retentat. Die Konzentration beider Dextranfraktionen ist mit einem etwa dreifach höheren RI-Signal zu erkennen. Die Konzentration an Saccharose ist im Retentat geringer als im Feed. Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich trotzdem noch ein Peak bei 37 min für das Retentat zeigt, somit wird auch ein Teil der Saccharose zurückgehalten. Dies ist eine konstruktive Folge der Dynotest, da sich das Retentat in der Filterkammer bildet, während gleichzeitig der Saccharose enthaltende Feed in die Kammer strömt. Das bedeutet, dass gegen Ende der Filtration die Saccharose aus dem Feed nicht mehr genügend Zeit hat, die Membran zu passieren und daher den in Abbildung 4.33 sichtbaren Peak bildet. Zum Vergleich ist im Permeat nur noch ein Peak erkennbar, der den Einfachzucker zeigt.

Somit sind beide Dextranfraktionen im Gegensatz zur Saccharose nicht in der Lage, die Membran zu passieren.

Dieses Kapitel zeigt, dass die selektive Abtrennung höher- von niedermolekularer Substanzen mittels dynamischer Cross-Flow-Filtration in der Dynotest realisierbar ist. Zusätzlich erfolgt durch die Membran eine Konzentrierung der höhermolekularen Substanzen im Retentat. Da es ohne großen Aufwand möglich ist, die im Retentat aufkonzentrierten EPS nach der Filtration zu waschen, bietet dieses Verfahren das Potential ein EPS-Präparat mit hoher Reinheit zum Einsatz als Lebensmittelzusatzstoff zu erzeugen. Da es sich bei Fermentationsmedien allerdings um deutlich komplexere Mischungen handelt als das betrachtete Modellsystem, ist bei deren Aufarbeitung mit weiteren Problemstellungen und Herausforderungen zu rechnen.

4.4.3. Filtration des Fermentationsmediums

Im Fokus stand bisher die Bewertung der Trennleistung des Modellsystems mittels Cross-Flow-Filtration. Da die Ergebnisse des Modellversuchs vielversprechende Ansatzpunkte zur Klärung von molekularen Polysacchariden mit dieser Methode zeigen, beschäftigen sich die folgenden Kapiteln mit der Validierung des Verfahrens an einer realen Fermentationsbrühe. Die betrachtete Fermentationsbrühe stammt aus der Produktion von Milchsäurebakterien der Gattung *Streptococcus thermophilus* und enthält etwa $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ EPS. Da zusätzlich zur grundsätzlichen Machbarkeit der Abtrennung von EPS über die dynamische Cross-Flow-Filtration auch der Einfluss verschiedener EPS-Formen auf die Durchführbarkeit von Interesse ist, kamen zwei Bakterienstämme zum Einsatz. Zum einen der kapsuläre EPS bildende Stamm *ST-C*, sowie der freie EPS bildende Stamm *ST-E*. Beide Zellarten wurden bereits in Kapitel 4.2 hinsichtlich der Abtrennung der Zellen aus dem Fermentationsmedium bewertet. Die Zellabtrennung erfolgte bereits beim Hersteller mit Hilfe eines Tellerseparators. Wie in Kapitel 4.3 beschrieben, führt diese Abtrennmethode zwar zur Separation eines Großteils des zellulären Materials, allerdings verbleiben trotzdem noch ein geringer Anteil an Zellen und Zellbruchstücken im Fermentationsmedium. Außerdem enthält dieses zusätzlich zu den Bakterienzellen und deren Stoffwechselprodukten auch weitere Komponenten wie Salze und Nährstoffe, die aus dem Nährstoffmedium während der Fermentation stammen. Aufgrund dieser komplexen Medienzusammensetzung ist eine direkte SEC-Analyse, wie bei der Auswertung des Modellsystems, nicht möglich. Daher kam für die weiteren Analysen ein Reinigungsverfahren und eine Größenausschlusschromatographie nach der Aufreinigung, sowie die Bestimmung des quantitativen Kohlenhydratgehalts mittels Phenol-Schwefelsäure-Methode zum Einsatz. Zur Bewertung der Mediumstrübung dient eine optische Zentrifuge.

4.4.3.1. Bestimmung des optimalen Transmembrandrucks für die Mikro- und Ultrafiltration des Fermentationsmediums

Obwohl die Entfernung der meisten Zellen direkt nach der Fermentation bereits vom Hersteller stattfand, verbleibt ein geringer Anteil an Zellen und Zellbruchstücken in der Fermentationsbrühe. Diese größeren Verbindungen sind vor den weiteren Aufarbeitungsschritten zu entfernen. Daher sind optimierte Filtrationsparameter für deren Abtrennung in der Dynotest zu ermitteln. Aufgrund der vorliegenden Zell- und Fragmentgröße eignet sich für die Abtrennung von Verbindungen größer als $0,2 \mu\text{m}$ eine NADIR MV020 T Polyvinylidenfluorid-Mikrofiltrationsmembran. Neben der Art der Membran und der Rührerdrehzahl ist einer der einflussreichsten Parameter der angewandte Transmembrandruck. Für die experimentelle Bestimmung der optimalen Bedingungen wird dieser zwischen 25 kPa bis 400 kPa für die Fermentationsbrühe von *ST-E* variiert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.4.1 ist als Optimum der Rührergeschwindigkeit in der Filtrationskammer 1.200 rpm bestimmt. Abbildung 4.34 (a) zeigt den Flux in Abhängigkeit der Permeatmenge und des Transmembrandrucks. Abbildung 4.34 (b) zeigt die Transmission, bestimmt mittels LUMiSizer, die sich bei den verschiedenen Transmembrandrücken für das Permeat einstellt.

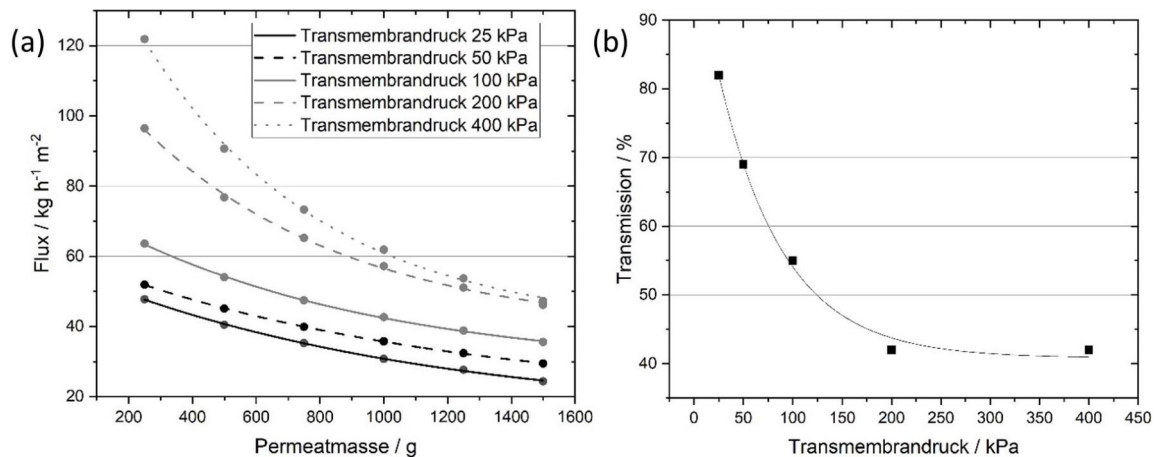


Abbildung 4.34.: Flux in Abhängigkeit der Permeatmenge (a) und Transmission in Abhängigkeit des Transmembrandrucks (b) für den Stamm *ST-E* bei der Mikrofiltration

Zunächst wird deutlich, dass der Flux mit zunehmender Permeatmenge abnimmt. Dies lässt auf eine Belegung der Membran mit Zellbestandteilen schließen. Dieser exponentielle Verlauf stellt sich für alle Transmembrandrücke ein. Gleichzeitig nimmt der Flux mit steigendem Druck zu. Zur Bewertung der Qualität der Filtration ist in Abbildung 4.34 (b) die Transmission bei den unterschiedlichen Transmembrandrücken aufgeführt. Die Transmission des Permeats nimmt von 82 % bei einem Druck von 25 kPa auf 42 % bei einem Druck von 400 kPa ab. Aus diesen

Ergebnissen lässt sich schließen, dass ein höherer Druck in der einer Verformung oder Zerstörung von Zellen und Zellfragmenten durch die einwirkenden Kräfte resultiert, sodass nachfolgende Zellfragmente die Membranporen passieren können. Zwar bedingt ein höherer TMP auch einen höheren Flux, jedoch ermöglicht dieser den Durchbruch von Partikeln und erzeugt damit eine Verringerung der Transmissionswerte des Permeats. Als optimaler Parameter für die Abtrennung von Zellen und Zellfragmenten aus der Fermentationsbrühe durch Mikrofiltration wurde daher ein TMP von 25 *kPa* definiert.

Nach der Zellabtrennung erfolgt die Aufkonzentrierung der EPS mittels Ultrafiltration. Dabei ist das Permeat aus der Mikrofiltration der Feed für die Ultrafiltration. Um auch hierfür die optimalen Filtrationsbedingungen zu identifizieren, wird analog zur Mikrofiltration der Transmembrandruck variiert und dessen Einfluss auf den Flux und die Transmission des Permeats bestimmt. Da für die Ultrafiltration aufgrund der geringeren Porenweite und des höheren kapillaren Eintrittsdruckes ein im Vergleich zur Mikrofiltration höherer Transmembrandruck erforderlich ist, variiert dieser zwischen den Einstellung von 300 *kPa* und 400 *kPa* bei einer konstanten Rührerdrehzahl von 1.200 *rpm* und mit einer Ultrafiltrationsmembran NADIR UP005 P. Die Ergebnisse für den Flux sind in Abbildung 4.35 (a) und für die Transmission in Abbildung 4.35 (b) gezeigt.

Im Gegensatz zur Mikrofiltration ist kein Unterschied zwischen den Transmissionswerten des Permeats nach der Filtration mit unterschiedlichen *TMP* sichtbar. Während Zellen und Zellbruchstücke sensitiv auf mechanische Belastung reagieren, bleiben molekulare Bestandteile von erhöhtem Druck unbeeinflusst. Mit steigendem *TMP* ergeben sich jedoch höhere Fluxwerte, so dass der Flux bei 400 *kPa* etwa 30 % höher ist als bei 300 *kPa*. Aufgrund dieser Ergebnisse fanden die weiteren Ultrafiltrationsversuche bei einer Rührerdrehzahl von 1.200 *rpm* und einem Transmembrandruck von 400 *kPa* statt.

4.4.3.2. Kombinierte Mikro- und Ultrafiltration zur Aufreinigung von EPS des Bakterienstamms ST-C

Zunächst erfolgen Versuche zur zweistufigen Filtration für den Bakterienstamm *ST-C*, welche eine Mikrofiltration zur Abtrennung der Zellbruchstücke mit einer NADIR MV020 T Polyvinylidenfluorid-Mikrofiltrationsmembran bei einem Transmembrandruck von 25 *kPa* beinhaltet. Daran schließt sich eine Ultrafiltration zur Aufkonzentrierung der EPS-Moleküle mittels Ultrafiltrationsmembran NADIR UP005 P und einem Transmembrandruck von 400 *kPa* an. Die Rührerdrehzahl liegt für beide Filtrationen konstant bei 1.200 *rpm*. Für die Analyse der Trockenmasse, des Kohlenhydratgehaltes und der EPS-Konzentration wurden Proben vom Feed vor der Filtration (Fe), des Permeats kurz vor Filtrationsende (Pe) und des Retentats (Re) entnommen. Die Trockenmassenbestimmung

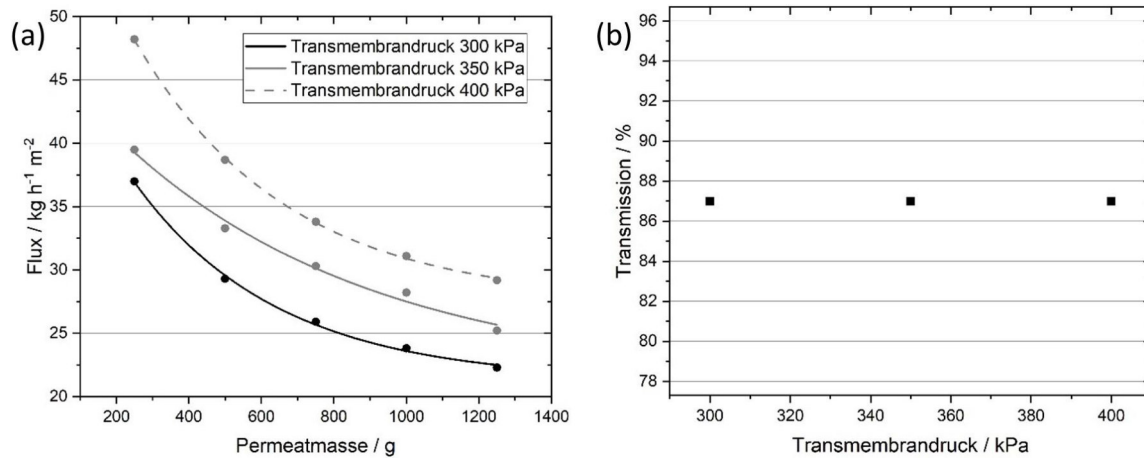


Abbildung 4.35.: Flux in Abhängigkeit der Permeatmasse (a) und Transmission in Abhängigkeit des Transmembrandrucks (b) für den Stamm *ST-E* bei der Ultrafiltration

erfolgte gravimetrisch nach Gefriertrocknung, die Bestimmung der Kohlenhydratkonzentration, sowie des EPS-Gehalt nach zusätzlicher Aufreinigung über die Phenol-Schwefelsäure-Methode. Für die weitere Auswertung wird die Konzentrierung der Massenströme, unabhängig von der Art und Konzentration der Beladung, als

$$\text{Massenanteil} = \frac{m_{\text{Fe/Pe/Re}}}{m_{\text{Fe}}} \cdot 100 \quad (4.4)$$

definiert. Der Gehalt an Trockenmasse im jeweiligen Strom ergibt sich über den Zusammenhang

$$\text{Trockenmassengehalt} = \frac{m_{\text{TM Fe/Pe/Re}}}{m_{\text{Fe/Pe/Re}}} \cdot 100. \quad (4.5)$$

Das Verhältnis, in welchem sich die im Feed vorhandene Trockenmasse auf das Permeat und Retentat aufteilt, gibt der Massenanteil der Trockenmasse

$$w_{\text{TM}} = \frac{m_{\text{TM Fe/Pe/Re}}}{m_{\text{TM, Fe}}} \quad (4.6)$$

wieder. Der Anteil an Kohlenhydraten in der Trockenmasse ergibt sich zu

$$w_{\text{KH}} = \frac{m_{\text{KH Fe/Pe/Re}}}{m_{\text{TM Fe/Pe/Re}}}. \quad (4.7)$$

Analog zu w_{TM} gibt

$$w_{\text{KH, relativ}} = \frac{m_{\text{KH, Fe/Pe/Re}}}{m_{\text{KH, Fe}}}. \quad (4.8)$$

das Verhältnis an, in welchem sich die Kohlenhydrate auf die beiden Ströme Permeat und Retentat verteilen. In gleicher Weise werden die beiden Werte w_{EPS} und $w_{\text{EPS,relativ}}$ hinsichtlich der Zielsubstanz EPS bewertet. Während die bisherigen Kenndaten die einzelnen Prozessschritte bewerten, sind anhand der Ausbeute_{TM} mit dem Zusammenhang

$$\text{Ausbeute}_{\text{TM}} = \frac{m_{\text{TM, finales Retentat}}}{m_{\text{TM, Ausgangsfeed}}}. \quad (4.9)$$

und der Reinheit als

$$\text{Reinheit} = \frac{m_{\text{EPS, finales Retentat}}}{m_{\text{TM, finales Retentat}}}. \quad (4.10)$$

Vergleiche integral über alle Prozessschritte möglich. Analog erfolgt die Bestimmung der Ausbeute an EPS über alle Prozessschritte mit Ausbeute_{EPS}. Für die bessere Nachvollziehbarkeit sind für alle weiteren Versuche die Ausgangs- und Endströme der ersten Prozessstufe, also Mikrofiltration oder Zentrifugation, mit A gekennzeichnet, während die Stoffströme bei der Ultrafiltration mit B ergänzt sind. Bei allen dargestellten Kenndaten handelt es sich um Verhältnisse zwischen verschiedenen Stoffströmen. Zur Erhöhung der Nachvollziehbarkeit sind deren Einheiten in den folgenden Tabellen als $g \cdot g^{-1}$ -Einheit dargestellt. Im Text werden diese Werte in prozentualer Form verwendet, um die prinzipiellen Zusammenhänge klarer hervorzuheben.

Tabelle 4.2.: Charakteristische Größen nach Mikrofiltration von *ST-C* in der Dynotest

Parameter	Einheit	Feed A	Retentat A	Permeat A
Massenanteil	%	100,0	8,5	91,5
Trockenmassengehalt	%	5,98	7,28	5,70
w_{TM}	$g_{TM} \cdot g_{TM,Feed A}^{-1}$	1,000	0,103	0,872
w_{KH}	$g_{KH} \cdot g_{TM}^{-1}$	0,046	0,144	0,026
$w_{KH,relativ}$	$g_{KH} \cdot g_{KH,Feed A}^{-1}$	1,000	0,321	0,488
w_{EPS}	$g_{EPS} \cdot g_{TM}^{-1}$	0,003	0,011	0,001
$w_{EPS,relativ}$	$g_{EPS} \cdot g_{EPS,Feed A}^{-1}$	1,000	0,411	0,301

In Tabelle 4.2 sind die wichtigsten Parameter der Mikrofiltration zu Abtrennung der Zellfragmente für den Bakterienstamm *ST-C* zusammengefasst. Ohne Berücksichtigung der Inhaltsstoffe, teilt sich der Feedstrom zu 92 % in das Permeat und zu 8 % in das Retentat auf. w_{TM} zeigt dabei, dass 87 % der löslichen Stoffe im Feed in das Permeat gelangen, während etwa 10 % der Trockenmasse im Retentat verbleibt und die von der Membran zurückgehaltenen Partikel größer als $0,2 \mu m$ repräsentiert. Dennoch fehlen in der Massenbilanz etwa 2,5 % an Trockenmasse. Dieser Verlust ist auf die Bildung der Foulingschicht auf der Membran zurückzuführen. Aufgrund des Versuchsaufbaus ist diese Masse nicht quantifizierbar.

Zusätzlich zu dem Effekt der Mikrofiltration auf die absolute Trockenmasse ist auch deren Einfluss insbesondere auf Kohlenhydrate und EPS von großem Interesse. Ziel ist es im Mikrofiltrationsschritt, ohne Verluste hinsichtlich des EPS-Gehaltes, möglichst viele Zellbestandteile abzutrennen. Für die Verteilung der Kohlenhydrate ergibt sich über den Zusammenhang $w_{KH,relativ}$ ein Anteil von 32 % im Retentat und 49 % im Permeat. Der größere Teil der Kohlenhydrate kann damit die Membran passieren. Der fehlende Rest von 19 % reichert sich analog zur Trockenmasse in der Foulingschicht an, wo zusätzlich zu Zellbruchstücken und Zellen auch größere Kohlenhydrate und andere Stoffe zu finden sind.

Einen weiteren Hinweis auf die Zusammensetzung der Trockenmasse gibt der Wert w_{KH} . Auffällig ist hierbei, dass 14,4 % der Trockenmasse im Retentat aus Kohlenhydraten besteht, während diese im Permeat nur 2,6 % ausmachen. Dies lässt den Schluss zu, dass insbesondere kleinere Stoffe wie Salze und andere Verbindungen die Membran passieren und im Permeat zu finden sind. Die Masse an EPS im Vergleich teilt sich zu 41 % ins Retentat und 30 % ins Permeat auf. Lediglich 1,0 % der Trockenmasse im Retentat und 0,1 % im Permeat sind tatsächlich EPS-Moleküle. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass der Anteil an EPS in der Trockenmasse des Feeds ebenfalls nur 0,3 % ausmacht. Somit kommt es durch die Mikrofiltration zu einer unerwünschten Aufkonzentrierung der EPS im Retentat. Dabei ist davon auszugehen, dass die Foulingschicht nicht

nur zu einer allgemeinen Abreicherung an EPS führt, sondern auch das Passieren der Moleküle erschwert und sie dadurch im Retentat verbleiben. Der hohe Produktverlust im Vergleich zu den Kohlenhydraten lässt sich dabei durch die verzweigte Struktur des EPS erklären. Im Vergleich zu den meist linearen Kohlenhydraten sind die EPS-Moleküle länger und verzweigter. Der Rückhalt durch die Deckschicht ist dadurch erleichtert.

Zusammenfassend ist die Mikrofiltration nicht das optimale Verfahren zur Abtrennung der Zellbruchstücke aus dem Fermentationsmedium, da damit auch ein deutlicher Ausbeuteverlust an EPS verbunden ist. Allerdings ist dies auch auf den Batch-Versuchsaufbau zurückzuführen. Im industriellen Maßstab wird die Cross-Flow-Filtration in einem kontinuierlichen Prozess mit Retentataustrag durchgeführt. Durch optimale Betriebsbedingungen minimiert sich der Einfluss der Deckschicht, sodass die Auswirkungen in einem industriellen Prozess deutlich geringer ausfallen. In Anbetracht dessen sind die mit dem dargestellten Versuchsaufbau erzielten Ergebnisse vielversprechend.

Für die folgende Ultrafiltration kommt als Feed das Permeat der Mikrofiltration zum Einsatz, wobei sich deren Zusammensetzung geringfügig unterscheidet. Dies ist auf die Probennahme des Permeats zurückzuführen. Während für die Analyse von Permeat A die Probennahme am Ende der Filtration erfolgte, repräsentieren die Werte für Feed B das gesamte Permeat. Diese geringen Abweichungen sind dennoch vernachlässigbar. Daher werden im Folgenden die Parameter zur Beschreibung des einzelnen Prozessschrittes, wie beispielsweise w_{TM} , auf den Feed B bezogen, während die integralen Größen wie $Ausbeute_{EPS}$ auf Feed A bezogen sind.

Die Ergebnisse für die Ultrafiltration sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Als Betriebsparameter wurde ein TMP von 400 kPa und eine Rührerdrehzahl von 1.200 rpm in Verbindung mit einer NADIR UP005 P Ultrafiltrationsmembran gewählt. Nach der Ultrafiltration verblieb das Retentat in der Filterkammer, wonach eine Waschung mit der 8,6 fachen Retentat B-Menge vollentsalztem Wasser erfolgte.

Der Trockenmassenanteil, sowie die Kohlenhydrat- und EPS-Konzentration von Retentat A stimmen annähernd mit den Werten für Feed B überein. Zwar sind kleinere Unterschiede, wie beispielsweise im Trockenmassenanteil von 5,7 % zu 5,6 % erkennbar, diese lassen sich allerdings auch mit Messungenauigkeiten und versuchsbedingten Abweichungen erklären. Im Vergleich zur Mikrofiltration verbleiben 34 % des Feeds im Retentat. Durch die Waschung mit Wasser sinkt dabei der Trockenmassengehalt deutlich von 5,6 % auf 1,4 %. Gleichzeitig nimmt der Anteil an Kohlenhydraten in der Trockenmasse w_{KH} von 1,8 % auf 15,6 % zu. Unter Berücksichtigung des Anteils an Kohlenhydraten des Feeds $w_{KH,relativ}$, die in die Teilströme übergehen, zeigt sich, dass 76 % der Kohlenhydrate im Retentat verbleiben und die Membran nicht passieren können.

Tabelle 4.3.: Charakteristische Größen nach Ultrafiltration von *ST-C* in der Dynotest

Parameter	Einheit	Feed B	Retentat B
Massenanteil	%	100,0	33,8
Trockenmassengehalt	%	5,58	1,44
w_{TM}	$g_{TM} \cdot g_{TM,Feed A}^{-1}$	1,000	0,087
w_{KH}	$g_{KH} \cdot g_{TM}^{-1}$	0,018	0,156
$w_{KH,relativ}$	$g_{KH} \cdot g_{KH,Feed A}^{-1}$	1,000	0,764
w_{EPS}	$g_{EPS} \cdot g_{TM}^{-1}$	0,004	0,008
$w_{EPS,relativ}$	$g_{EPS} \cdot g_{EPS,Feed A}^{-1}$	1,000	1,538
Ausbeute _{EPS}	$g_{EPS} \cdot g_{EPS,Feed A}^{-1}$	0,130	0,200
Ausbeute _{TM}	$g_{TM} \cdot g_{TM,Feed A}^{-1}$	-	0,075
Reinheit _{EPS}	$g_{EPS} \cdot g_{TM}^{-1}$	0,004	0,008

Für den Verbleib der EPS suggeriert $w_{EPS,relativ}$ ein Wert von 154 %, dass mehr EPS im Retentat vorhanden ist, als im Feed überhaupt zur Verfügung standen. Dies ergibt physikalisch keinen Sinn und ist daher auf eine fehlerbehaftete Messmethodik zurückzuführen. Die EPS-Bestimmung unterläuft eine Reihe von Reinigungsschritten und resultiert in der Regel in EPS-Mengen im niedrigen mg-Bereich. Kleine Schwankungen können dabei einen großen Effekt auf den prozentualen Vergleich haben. Es ist davon auszugehen, dass nahezu die komplette im Feed vorhandene Menge an EPS im Retentat verbleibt. Bei der integralen Betrachtung der beiden Prozessschritte Mikrofiltration und Ultrafiltration wird eine Ausbeute von 20 % EPS erreicht. Die Ausbeute an Trockenmasse liegt dabei mit 7,5 %, bei einer sehr geringen EPS-Reinheit von 0,8 %.

Die erzielte Ausbeute über den gesamten Prozess ist nicht zufriedenstellend hinsichtlich eines industriellen Prozesses. Dabei ist der größte Verlust an EPS in der Mikrofiltration begründet, da durch die Deckschichtbildung eine erhebliche Masse an EPS verloren geht. Trotzdem bietet das Verfahren Potential zur Optimierung. Anhand des Versuchsaufbaus zeigte sich, dass die Aufreinigung und Isolierung von EPS als pulverförmiges Präparat mittels zweistufiger Filtration möglich ist.

4.4.3.3. Kombinierte Ultrazentrifugation und -filtration zur Aufreinigung von EPS des Bakterienstamms *ST-C*

Da die Mikrofiltration zur Zellabtrennung zu einem deutlichen Verlust an EPS führt, ersetzt diese im folgenden Kapitel die Zentrifugation in einer Röhrenzentrifuge (Z11, Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Lahr, Deutschland). Daran schließt sich analog eine Ultrafiltration und Waschung

Tabelle 4.4.: Charakteristische Größen nach Ultrazentrifugation und -filtration von *ST-C*

Parameter	Einheit	Feed B	Retentat B
Massenanteil	%	100,0	33,6
Trockenmassengehalt	%	6,02	1,38
w_{TM}	$g_{TM} \cdot g_{TM,Feed A}^{-1}$	1,000	0,077
w_{KH}	$g_{KH} \cdot g_{TM}^{-1}$	0,073	0,211
$w_{KH,relativ}$	$g_{KH} \cdot g_{KH,Feed A}^{-1}$	1,000	0,222
w_{EPS}	$g_{EPS} \cdot g_{TM}^{-1}$	0,018	0,233
$w_{EPS,relativ}$	$g_{EPS} \cdot g_{EPS,Feed A}^{-1}$	1,000	0,975
$Ausbeute_{EPS}$	$g_{EPS} \cdot g_{EPS,Feed A}^{-1}$	6,475	6,312
$Ausbeute_{TM}$	$g_{TM} \cdot g_{TM,Feed A}^{-1}$	-	0,078
$Reinheit_{EPS}$	$g_{EPS} \cdot g_{TM}^{-1}$	0,018	0,233

des Zentrats an. Für die Versuche dient erneut das Fermentationsmedium des Bakterienstammes *ST-C* als Feed. Die Zentrifugation erfolgte bei 30.000 *rpm* und einem Feedmassenstrom von 100 $ml \cdot min^{-1}$. Die Ultrafiltration wurde analog zu Kapitel 4.4.3.1 bei einem Transmembrandruck von 400 *kPa*, einer Rührerdrehzahl von 1.200 *rpm* mit einer NADIR UP005 P Ultrafiltrationsmembran durchgeführt. Die Waschung erfolgte mit der 7,9 fachen Retentat-Menge an vollentsalztem Wasser.

Tabelle 4.4 fasst die Ergebnisse der Ultrafiltration zusammen. Zur besseren Vergleichbarkeit bezeichnet Feed B das geklärte Zentrat des Zentrifugationsschritts. Da der Feed für die Zentrifugation und die Mikrofiltration gleich ist, beziehen sich die Werte $Ausbeute_{EPS}$ und $Ausbeute_{TM}$ auf den Feed A von *ST-C* aus Kapitel 4.4.3.2.

Es ist erkennbar, dass durch die Zentrifugation weniger lösliche Substanzen zusätzlich zu den Zellbruchstücken abgetrennt sind. Der Anteil an Kohlenhydraten in der Trockenmasse von Feed B ist mit 7,3 % deutlich höher als nach der Mikrofiltration mit 1,8 %. Analog ergibt sich auch für den EPS-Anteil in der Trockenmasse w_{EPS} eine Steigerung von 0,04 % auf 1,8 %. Somit erzielt die Zentrifugation im Vergleich zur Mikrofiltration bereits eine Steigerung der für die Ultrafiltration zur Verfügung stehenden Menge an EPS.

Ähnlich wie bei der Ultrafiltration bei zweistufiger Filtration führt die Kombination von Ultrafiltration und Waschen zu einer erheblichen Reduktion des Trockenmassengehalts von 6,02 % auf 1,38 %. Auch die Menge des Feeds, die im Retentat zurückbleibt von 33,64 % entspricht der

Größenordnung der Ultrafiltration aus Kapitel 4.4.3.2. Aufgrund der bereits im Feed höheren Konzentration an Kohlenhydraten, ist deren Anteil durch die Ultrafiltration von 7,3 % weiter auf 21,1 % gestiegen. Die EPS-Konzentration ist sogar von 1,8 % auf 23,3 % steigerbar. Dies ist eine deutliche Verbesserung im Vergleich zur zweistufigen Filtration. Die Ergebnisse für $w_{\text{EPS,relativ}}$ verdeutlichen analog zu Kapitel 4.4.3.2, dass nahezu alle EPS-Moleküle im Retentat verbleiben. Hinsichtlich der Gesamtergebnisse, ist die EPS-Ausbeute mit 631 % im Vergleich deutlich zu hoch. Hier kann es sich allerdings nicht um einen Messfehler handeln, da die Menge nicht nur geringfügig, sondern signifikant überschätzt wird. Der Effekt erklärt sich durch das Ablösen von kapsulärem EPS von Zellen und Zellbruchstücken während des Zentrifugationsschrittes. Der Einfluss der Scherbeanspruchung auf die Ablösung der kapsulären EPS ist bereits in den Kapiteln 4.1.2 und 4.2.2 diskutiert.

Der weitere Vergleich berücksichtigt die Ausbeute an EPS nicht weiter, sondern konzentriert sich auf die Kombination der Ausbeute an Trockenmasse und deren EPS-Reinheit. Eine Trockenmasseausbeute von 7,8 % ist für die Kombination aus Zentrifugation und Ultrafiltration analog erreichbar wie für die zweistufige Filtration. Die Mikrofiltration und die Zentrifugation führen also zum gleichen Trockenmasseverlust. Dagegen ist die Reinheit mit einem Wert von 23,3 % im Vergleich zur zweistufigen Filtration deutlich höher. Eine Erklärung hierfür ist einerseits eine bessere Reinigungsmethode per se oder andererseits die Zunahme der EPS-Masse durch die Ablösung der kapsulären EPS. Das Verfahren der Zentrifugation und Ultrafiltration ist somit eine vielversprechende Möglichkeit mit einem hohen Potenzial für die industrielle Anwendung.

4.4.3.4. Kombinierte Mikro- und Ultrafiltration zur Aufreinigung von EPS des Bakterienstamms *ST-E*

Für einen Vergleich zweier unterschiedlicher Bakterienstämme und des Einflusses der EPS-Eigenschaften auf deren Aufreinigungseffizienz, sind in den folgenden beiden Kapiteln die Experimente zur zweistufigen Filtration, sowie zur kombinierten Zentrifugation und Ultrafiltration für den freien EPS-bildenden Bakterienstamm *ST-E* gezeigt. Die Ergebnisse der Mikrofiltration im zweistufigen Filtrationsprozess bei einem Transmembrandruck von 25 kPa, einer Rührerdrehzahl von 1.200 rpm und mit einer NADIR MV020 T Polyvinylidenfluorid-Mikrofiltrationsmembran sind in Tabelle 4.5 aufgeführt.

Die Feedmasse teilt sich zu 24 % ins Retentat und zu 76 % ins Permeat auf. Im Vergleich zur Mikrofiltration von *ST-C* zeigt sich hier der erste Unterschied, da für *ST-C* ein deutlich größerer Anteil von 92 % ins Permeat übergeht. Dabei beträgt der Anteil der Partikel w_{TM} , die die Membran passieren können, etwa 73 %, während 27 % im Retentat verbleiben. Im Vergleich zu den Ergebnissen der *ST-C*-Versuche können in der Mikrofiltrationsstufe weniger Partikel die Membran

Tabelle 4.5.: Charakteristische Größen nach Mikrofiltration von *ST-E* in der Dynotest

Parameter	Einheit	Feed A	Retentat A	Permeat A
Massenanteil	%	100,0	24,0	76,0
Trockenmassengehalt	%	8,61	9,58	8,27
w_{TM}	$g_{TM} \cdot g_{TM,Feed A}^{-1}$	1,000	0,267	0,730
w_{KH}	$g_{KH} \cdot g_{TM}^{-1}$	0,007	0,191	0,017
$w_{KH,relativ}$	$g_{KH} \cdot g_{KH,Feed A}^{-1}$	1,000	7,322	1,811
w_{EPS}	$g_{EPS} \cdot g_{TM}^{-1}$	0,000	0,011	0,001
$w_{EPS,relativ}$	$g_{EPS} \cdot g_{EPS,Feed A}^{-1}$	1,000	6,167	2,333

passieren.

Der Hauptunterschied zwischen den Stämmen betrifft die Werte für den Kohlenhydrat- und EPS-Gehalt. Bereits im Feed von *ST-E* ist der Anteil der Kohlenhydrate in der Trockenmasse mit ca. 0,7 % deutlich niedriger als der Gehalt von 4,6 % bei *ST-C*. Dennoch liegt das Gewichtsverhältnis $w_{KH,relativ}$ des Retentats mit 19,1 % und des Permeats mit 1,7 % wieder im Bereich von *ST-C* mit 14,4 % im Retentat und 2,6 % im Permeat. Bei diesem unerwarteten Verlauf ergibt sich ein unrealistischer Anstieg der Kohlenhydrate von 732,2 % im Retentat bezogen auf den Ausgangsfeed. Analoges gilt für die Zunahme an Kohlenhydraten im Permeat mit 181,1 %.

Dieser Effekt ist auch für den EPS-Gehalt zu sehen. Für den Anteil an EPS, die im Retentat verbleiben, ergibt sich im Verhältnis zum Ausgangsfeed ein Wert von rund 600 %. Aufgrund der systematischen Reproduzierbarkeit hinsichtlich einer niedrigen Kohlenhydrat-, bzw. EPS-Konzentration im Feed im Vergleich zu einer hohen Kohlenhydrat-, bzw. EPS-Konzentration im Retentat und Permeat ist eine physikalische Erklärung erforderlich. Eine Hypothese für diese Ergebnisse beruht auf dem stark adhäsiven Charakter der freien EPS. Die Zelle segregiert freie EPS-Moleküle in das umgebende Medium. Sie haften somit nicht an der Zelloberfläche, sondern bewegen sich frei im Medium. Aufgrund ihrer Oberflächeneigenschaften neigen freie EPS dazu, miteinander zu agglomerieren und Polysaccharid-Cluster zu bilden. Abbildung 2.9 veranschaulicht die Bildung von EPS-Agglomeraten. Während Zellen und andere Komponenten aufgrund der Färbung mit Tinte dunkel erscheinen, kontrastieren die EPS hell. Kapsuläre EPS ordnen sich um die Zellen an, wohingegen die freien EPS Bereiche hoher Konzentration bilden. In diesen koagulierten Strukturen können zusätzlich andere Bestandteile wie Salze und Kohlenhydrate eingeschlossen sein. Während diese Cluster für die Analytik nur schwer zugänglich sind, wird ihre agglomerierte Struktur durch die Scherbeanspruchung des Rührers zerstört und ist damit für die verwendete Analysemethode nachweisbar. Aufgrund der Unzugänglichkeit der EPS-Moleküle

Tabelle 4.6.: Charakteristische Größen nach Ultrafiltration von *ST-E* in der Dynotest

Parameter	Einheit	Feed B	Retentat B
Massenanteil	%	100,0	43,5
Trockenmassengehalt	%	8,15	8,53
w_{TM}	$g_{TM} \cdot g_{TM,Feed A}^{-1}$	1,000	0,455
w_{KH}	$g_{KH} \cdot g_{TM}^{-1}$	0,002	0,004
$w_{KH,relativ}$	$g_{KH} \cdot g_{KH,Feed A}^{-1}$	1,000	0,936
w_{EPS}	$g_{EPS} \cdot g_{TM}^{-1}$	0,001	0,009
$w_{EPS,relativ}$	$g_{EPS} \cdot g_{EPS,Feed A}^{-1}$	1,000	3,625
Ausbeute_{EPS}	$g_{EPS} \cdot g_{EPS,Feed A}^{-1}$	1,838	6,663
Ausbeute_{TM}	$g_{TM} \cdot g_{TM,Feed A}^{-1}$	-	0,328
Reinheit_{EPS}	$g_{EPS} \cdot g_{TM}^{-1}$	0,001	0,009

im Feed des *ST-E* Stammes ist die EPS-Ausbeute nicht weiter als integraler Bewertungsparameter zu betrachten.

Anstelle dessen dient die Ausbeute an Trockenmasse, sowie die Reinheit an EPS in der Trockenmasse als vergleichendes Qualitätskriterien zur Bewertung der Trenneffizienz. Der Vergleich zwischen Retentat und Permeat zeigt, dass sich in der durch die Membran zurückgehaltenen Trockenmasse die 11-fach höhere Menge an Kohlenhydraten befindet als im Permeat. Für den Stamm *ST-C* zeigt sich hierbei eine Zunahme um das 6-fache. Somit ist die Konzentration der Trockenmasse, unabhängig von der Art der enthaltenen Verbindungen, für den *ST-E*-Stamm höher. Auch bei der Mikrofiltration des *ST-E* Stammes gehen somit erhebliche Mengen an Zielprodukt verloren. So gehen etwa 72,5 % der EPS durch die Entsorgung des Retentats verloren, während 25 % der EPS für die weitere Verarbeitung zur Verfügung stehen. Zur weiteren Aufarbeitung und Isolierung der EPS ist das Permeat der Ausgangsfeed. Die Ultrafiltration wird bei einem Transmembrandruck von 400 kPa, einer Rührerdrehzahl von 1.200 rpm und mit der Ultrafiltrationsmembran NADIR UP005 P durchgeführt. Die Waschung erfolgte mit der 5,4 fachen Retentat-Masse mit vollentsalztem Wasser. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst.

Ungefähr 44 % der Feedmasse und 46 % der Trockenmasse verbleiben nach der Ultrafiltration im Retentat. In der Trockenmasse zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Stämmen *ST-C* und *ST-E*. Während für *ST-E* fast die Hälfte an Trockenmasse im Retentat zurückbleibt, sind für den Stamm *ST-C* nur noch 9 % vorhanden. Es zeigt sich, dass die Waschung im Falle des freien EPS-Bildners keine Verbesserung des Ergebnisses erzielt. Dieser Effekt ist auf den kohäsiven

Charakter der freien EPS und dessen Koagulatbildung zurückzuführen. So entsteht im Falle des *ST-E* Stammes eine deutlich kompaktere Deckschicht, die im Vergleich zu *ST-C* undurchlässiger ist. Als Konsequenz verbleiben deutlich mehr niedermolekulare Bestandteile im Retentat B. Dies verdeutlicht sich an der Verteilung der Trockenmasse auf das Retentat. Während bei der Mikrofiltration nur 26,7 % der Trockenmasse im Retentat verbleiben, sind es nach der Ultrafiltration 46 %. Die für die Mikrofiltration verwendete Membran hat eine größere Porengröße, sodass ein Teil der Verbindungen diese passieren kann und die Beeinflussung der Trenneffizienz weniger stark durch die Deckschicht vermindert ist. Hinsichtlich des Kohlenhydrat- und EPS-Gehalts bei der Ultrafiltration, verbleiben 93,6 % der ursprünglichen Kohlenhydrate und 362,5 % der ursprünglichen EPS-Masse im Retentat. Analog zur Mikrofiltration führen die hohen Scherkräfte des Rührers zur Zerkleinerung der EPS-Cluster, weshalb die EPS-Menge im Retentat deutlicher höher ist als die Ausgangsmenge im Feed B. Für *ST-C* lagen diese Werte bei 77 % und 100 %. Dieser Unterschied verdeutlicht, dass die Waschung im Falle von *ST-E* nicht erfolgreich war. Die Trockenmasse, die das finale EPS-Präparat darstellt, enthält weiterhin eine hohe Konzentration an unerwünschten Nebenkomponenten wie Salze und weitere niedermolekulare Substanzen. Daher ist die Trockenmassenausbeute mit 33 % deutlich höher im Vergleich zur Ausbeute von 8 % bei der zweistufigen Filtration des *ST-C*-Stamms. Die Reinheit der *ST-E*-Reinigung liegt mit 0,9 % in der gleichen Größenordnung wie bei *ST-C* mit 0,8 %. Trotz der unzureichenden Waschung konnte somit eine vergleichbare Reinheit erzielt werden. Dies ist auf eine höhere EPS-Konzentration in der initialen Fermentationsbrühe zurückzuführen. Zusammenfassend ist somit auch die absolute Masse an EPS im finalen Präparat für den Stamm *ST-E* höher, da die Gesamtausbeute an Trockenmasse bei gleicher Reinheit höher ist.

4.4.3.5. Kombinierte Ultrazentrifugation und -filtration zur Aufreinigung von EPS des Bakterienstamms *ST-E*

Für den Vergleich analog zu Kapitel 4.4.3.3 ersetzt die Zentrifugation in einer Röhrenzentrifuge die Mikrofiltration. Im Anschluss erfolgte die Ultrafiltration analog zu Kapitel 4.4.3.3. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst.

Im Retentat verbleibt mit 20,37 % der Feedmasse etwas weniger im Vergleich zu *ST-C* mit 33,6 %, sowie zur zweistufigen Filtration mit 44 %. Auch der Anteil an Trockenmasse im Retentat w_{TM} ist mit 18,8 % bei der kombinierten Zentrifugation und Ultrafiltration niedriger als bei der zweistufigen Filtration mit 46 %. Gleichzeitig ist der Anteil an zurückgehaltenen Kohlenhydraten im Retentat w_{KH} mit 59 % deutlich höher als im Falle der zweistufigen Filtration mit 0,4 %. Daraus lässt sich schließen, dass der Zentrifugationsschritt einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung der Trockenmasse hat. Bilden die freien EPS Agglomerate, die auch kleinere Moleküle

Tabelle 4.7.: Charakteristische Größen nach Ultrazentrifugation und -filtration von *ST-E*

Parameter	Einheit	Feed B	Retentat B
Massenanteil	%	100,0	20,4
Trockenmassengehalt	%	9,58	8,83
w_{TM}	$g_{TM} \cdot g_{TM,Feed A}^{-1}$	1,000	0,188
w_{KH}	$g_{KH} \cdot g_{TM}^{-1}$	0,592	0,585
$w_{KH,relativ}$	$g_{KH} \cdot g_{KH,Feed A}^{-1}$	1,000	0,188
w_{EPS}	$g_{EPS} \cdot g_{TM}^{-1}$	0,002	0,082
$w_{EPS,relativ}$	$g_{EPS} \cdot g_{EPS,Feed A}^{-1}$	1,000	9,321
$Ausbeute_{EPS}$	$g_{EPS} \cdot g_{EPS,Feed A}^{-1}$	-	-
$Ausbeute_{TM}$	$g_{TM} \cdot g_{TM,Feed A}^{-1}$	-	0,209
$Reinheit_{EPS}$	$g_{EPS} \cdot g_{TM}^{-1}$	0,002	0,186

einschließen, werden diese Clusterstrukturen teilweise nach der Zentrifugation mit dem Restsediment ausgetragen. Größere Kohlenhydrate lassen sich nicht so leicht an diese Agglomerate binden und verbleiben im Überstand. Somit besteht ein großer Teil der Trockenmasse aus Kohlenhydraten und EPS. Der deutlich höhere Anteil an EPS der Trockenmasse w_{EPS} mit 8,2 % im Vergleich zu 0,9 % bei der zweistufigen Filtration bestärkt diese Vermutung. Zusätzlich zu den vergleichsweise niedrigen Werten für den Kohlenhydrat- und EPS-Gehalt ist auch der Trockenmassengehalt des Retentats mit 8,83 % im Vergleich zu 8,53 % nur geringfügig niedriger. Ähnlich wie bei der zweistufigen Filtration von *ST-E* in Kapitel 4.4.3.4 ist die Bildung einer Deckschicht durch die freien EPS ein Grund für diesen Effekt. Während die löslichen Bestandteile bei *ST-C* durch den Waschschrift aus dem Retentat entfernenbar sind, erfolgt dies bei der undurchlässigen Deckschicht aus freiem EPS nicht.

Über den gesamten Prozess lässt sich mit dieser Methode eine Trockenmasseausbeute von 20,9 % bei einer Reinheit von 8,2 % erreichen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1. Zusammenfassung

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Betrachtung des Downstream-Prozess von Exopolysaccharid-produzierenden, bakteriellen Sporen und vitalen Zellen aus industriell hergestellten Fermentationsmedien. Der erste Teil der Arbeit widmet sich der Optimierung des Separationsprozesses von Sporen und Zellen durch deren Scherbeanspruchung. Zur Scherung der Sporen bzw. Zellen sind ein Ultra-Turrax Zahnkranzdispergierer, sowie ein Emulsiflex C5 Hochdruckhomogenisator im Einsatz. Die Charakterisierung der Sedimentationseigenschaften erfolgt über die optische Zentrifugation LUMiSizer und eine Scheibenzentrifuge. Der anschließende Scale-Up mittels Pathfinder FSC1-Tellerseparator, zeigt die Übertragbarkeit der Laborergebnisse in den Pilot-Maßstab. Der zweite Teil der Untersuchungen beschäftigt sich mit der Isolierung der nach der industriellen Zellabtrennung im Fermentationsüberstand verbleibenden Exopolysaccharide im Pilot-Maßstab. Ziel ist die Gewinnung eines pulverförmigen Lebensmittelzusatzstoffes. Die Aufarbeitung des Fermentationsüberstandes erfolgt dabei ohne Zusatz von Lösemitteln, oder sonstigen Additiven. Die Machbarkeit des Verfahrens zur Isolierung der EPS-Moleküle mittels dynamischer Cross-Flow-Filtration in Kombination mit einer Ultrazentrifugation ist als Proof-of-Principle demonstriert.

Einfluss der Scherbeanspruchung auf die Sedimentationseigenschaften von Bakteriosporen des Stammes *Bacillus licheniformis* und *Bacillus subtilis*

Der erste Teil der Arbeit verdeutlicht die Komplexität des Downstreams biologischer Materialien. Bereits die Konzentration der Zellen im Fermentationsmedium hat einen entscheidenden Einfluss auf die Sedimentationseigenschaften des gesamten Partikelkollektivs. So zeigte die Verdünnung des sporenhaltigen Fermentationsmediums mit isotonischer Kochsalzlösung bei einem der untersuchten Stämme eine Steigerung der Separationseffizienz, trotz der dadurch erhöhten Flüssigkeitslast. Ferner führt die Verdünnung durch Reduktion der Wechselwirkungen zwischen den Sporen zu Änderungen der mittleren Sedimentationsgeschwindigkeit und der Verteilungsform. Auch die Medienviskosität ist durch die Verdünnung und Variation der Messtemperatur signifikant

beeinflusst. Die Scherbeanspruchung der Sporen weist ebenfalls einen deutlichen Einfluss auf die Sedimentationseigenschaften der Sporen auf. Einer Erhöhung der Sedimentationsgeschwindigkeit durch das Ablösen kapsulärer EPS, sowie der Reduktion der Medienviskosität steht deren Erniedrigung durch Zerstörung von Sporenagglomeraten gegenüber. Die jeweiligen Änderungen der Sedimentationsgeschwindigkeit variierten hinsichtlich des sporenbildenden Stammes, sowie den Eigenschaften der produzierten EPS. Analog zur Sedimentationsgeschwindigkeit hat die Scherbeanspruchung auch einen deutlichen Einfluss auf die Sedimentkompression der Sporen gezeigt. Die Sedimente aller Proben zeigten nach der Scherbeanspruchung ein deutlich kompakteres Sediment, was hauptsächlich auf das Abscheren kapsulärer EPS, sowie die Zerstörung von Sporenagglomeraten zurückzuführen ist. Die experimentellen Untersuchungen verdeutlichen die Schwierigkeiten hinsichtlich eines allgemein gültigen Ansatzes zur Optimierung der Abtrenneigenschaften. Somit ist eine genaue Bewertung der Eigenschaften eines individuellen Bakterienstamms bezüglich des Einflusses von Verdünnung und Scherbeanspruchung essenziell für eine optimale Auslegung eines großtechnischen Prozesses.

Einfluss der Scherbeanspruchung auf die Sedimentationseigenschaften von vitalen Zellen des Stamms *Streptococcus thermophilus*

Analog zu den Untersuchungen der Bakteriosporen ist ein deutlicher Einfluss der Probenkonzentration auf die Sedimentationseigenschaften der Bakterienzellen nachweisbar. Mit abnehmender Partikelzahl in der Suspension veränderte sich die Form der Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilung der drei unterschiedlichen Stämme. Wie zuvor bei den Sporen ist diese Änderung der Verteilungsform durch eine Verringerung der Wechselwirkungen zwischen den Zellen, sowie Viskositätsänderungen des Fermentationsmediums bedingt. Die Scherbeanspruchung der Bakterienzellen führte, abhängig von dem jeweiligen Scherapparat und Bakterienstamm, zu unterschiedlichen Änderungen in der Sedimentationsgeschwindigkeit. Einerseits resultierte eine Zunahme durch das Ablösen kapsulärer EPS von der Zelloberfläche, sowie durch die Reduktion der Medienviskosität. Der gegenteilige Effekt war hauptsächlich durch die Zerstörung von Zellketten bedingt. Bildete der Stamm weder kapsuläre EPS, noch lange Zellketten, so war kaum eine Änderung der Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen zu beobachten. In Anlehnung an die Sedimentationsgeschwindigkeit war auch die Änderung der Sedimentkompression stammabhängig. Dabei führten die Abscherung kapsulärer EPS, sowie die Zerstörung von Zellketten zu deutlich kompakteren Sedimenten. Allerdings ist der Einfluss auf die Kompression durch Erhöhung der Zentrifugalbeschleunigung wesentlich deutlicher ausgeprägt als bei den Bakteriosporen. Dieses Ergebnis verdeutlicht die geringere Stabilität der Zellstruktur, welche durch eine Verformung ihrer Hülle zu einem dichteren Sediment komprimiert werden. Dieser Unterschied zu den Bakteriosporen liegt vor allem darin begründet, dass die Sporenform der Zellen zum

Überleben bei ungünstigen äußeren Einflüssen dient. Sporen sind kleiner als ihre zugehörige vitale Zellform und daher auch deutlich kompakter aufgebaut. Durch mechanische Belastung sind sie somit in geringerem Maße komprimierbar. Durch die Betrachtung der durch die Scherung eingetragenen Energie zeigte sich eine Abhängigkeit hinsichtlich der Art der Belastung. Kurze Scherbeanspruchung mit einer hohen Intensität begünstigen die Abscherung kapsulärer EPS, während im umgekehrten Fall die Zerstörung von Zellketten begünstigt war. Diese Erkenntnis gibt in einem großtechnischen Prozess die Möglichkeit über eine gezielte Einstellung der Scherintensität und -dauer differenzierte Effekte auf den jeweiligen Bakterienstämme zu erzielen.

Übertragung der Laborergebnisse auf der Pilot-Scale anhand verschiedener Bakterienstämme des *Streptococcus thermophilus*

In dieser Arbeit gelang ein erfolgreicher Scale-Up der im Labormaßstab gewonnenen Erkenntnisse in den Pilot-Maßstab. Mit dem Hintergrund, dass die Sinkgeschwindigkeit der Partikel in direktem Verhältnis zur Verweilzeit der Partikel im Tellerseparator steht, erfolgte die Validierung der Ergebnisse bezüglich der Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen durch Variation des Feed-Volumenstromes. Dabei resultierte nach Abtrennen von kapsulären EPS eine deutliche Erhöhung des prozessierbaren Volumenstromes. Der Scale-Up der Erkenntnisse zur Sedimentkompression der Zellen ist anhand der Betriebszeit des Separators bis zum Erreichen des maximalen Füllgrades demonstriert. Je kompakter das Sediment der Bakterien ist, desto länger war die Standzeit bis zur nächsten Entleerung. Die Scherung der Zellen des kapsulären EPS synthetisierenden Stammes führt zu deutlich längerer Laufzeit der Separators, bevor eine Entleerung des Sediments notwendig ist. Die erfolgreiche Übertragung der Laborergebnisse in den Pilot-Maßstab zeigt, dass anhand gezielter Laboranalysen der Separationsprozess der Zellen eine Optimierung möglich ist. Eine gezielte Vorbehandlung der Zellsuspensionen bietet ein hohes Potential zur Verbesserung des Abtrennprozesses.

EPS-Isolierung aus dem Fermentationsüberstand der Starterkulturen-Produktion

Nachdem die Zellen bei der industriellen Starterkulturen-Produktion von dem Fermentationsmedium separiert sind, enthält dieses Medium in etwa 1 g/l EPS. In der Literatur sind bereits Extraktionsverfahren zur Gewinnung dieser EPS beschrieben (Roca et al., 2015), allerdings sind die dabei gewonnenen Mengen und die angewandten Methoden für die industrielle Nutzung meist irrelevant. Der zweite Teil dieser Arbeit zeigt im Rahmen eines Proof-of-Principle einen Verfahrensablauf zur Isolierung von EPS-Molekülen aus dem Restmedium der Starterkulturenproduktion in prozesstechnisch relevanten Mengen. Die Kombination aus Ultrazentrifugation und -filtration mit anschließender Waschung und Gefriertrocknung erzielte ein pulverförmige,

EPS-haltige Präparat als Endprodukt. Durch den Verzicht auf die Zugabe von Lösungsmitteln, sowie die Nutzung von Verfahrensschritten mit hohem Durchsatz, sind die Kosten im Vergleich zu den Extraktionsverfahren deutlich geringer und ermöglichen daher eine wirtschaftliche industrielle Nutzung des Verfahrens. Das gezeigte Verfahren hat dabei noch Optimierungspotential, um sowohl die Ausbeute an Präparatmenge, als auch die EPS-Reinheit weiter zu erhöhen. Im Rahmen dieser Arbeit gelang der Proof-Of-Principle zur Herstellung eines EPS-Präparates aus den Abfallstrom der Starterkulturenproduktion mittels industriell relevanter, verfahrenstechnischer Grundoperationen.

5.2. Ausblick

Die in dieser Arbeit gezeigten Analysemethoden zur Charakterisierung der Sedimentationseigenschaften von EPS produzierenden Bakteriosporen und Bakterienzellen bieten eine Basis zur Charakterisierung der Abtrenneigenschaften von biologischen Materialien. Durch die systematische Untersuchung weiterer EPS-produzierender Bakterienstämme kann damit ein wichtiger Beitrag zum Verständnis über die Wechselwirkungen zwischen Zellen und EPS, sowie dem Fermentationsmedium geleistet werden. Eine nachfolgende chemische Analyse der EPS könnte Aufschlüsse über den Zusammenhang der gezeigten Wechselwirkungen und der chemischen Struktur der EPS liefern. Von Seiten der Starterkulturen-Industrie bieten diese Analyseverfahren ein schnelles und kostengünstiges Werkzeug, um die Sedimentationseigenschaften ihrer Produkte zu analysieren und Rückschlüsse auf vorteilhafte Vorbehandlungsschritte zu ziehen. Mit den daraus resultierenden Ergebnissen kann der Separationsprozess bestehender Produkte optimiert, oder neue Produkte möglichst effizient in die laufende Produktion zu integrieren. Wie bereits erwähnt bietet die Isolierung der EPS im Pilot-Maßstab durch die Kombination aus Ultrazentrifugation und -filtration noch deutliches Optimierungspotential. Im nächsten Schritt wäre zu prüfen, ob eine Kombination aus Zellabtrennung und EPS-Konzentrierung grundsätzlich zielführend ist, da eine direkte Ultrafiltration erhebliche Produktverluste vermeidet. Durch längere Prozesszeiten bzw. kontinuierliche Betriebsweise verliert der Produktverlust durch die Fouling-Schicht an Bedeutung und die Effizienz des Verfahrens ist zunehmend steigerbar. Alternativ ist eine Optimierung hinsichtlich der eingesetzten Membranen vielversprechend hinsichtlich Selektivität und Ausbeute.

6. Abkürzungen und Symbole

Lateinische Buchstaben

A	Fläche	m^2
a	Abstand zwischen zwei Tellern	m
C	Schleuderziffer	$x \text{ g}$
c	Konzentration	g m^{-3}
c_W	Widerstandsbeiwert	-
d	Durchmesser	m
d_{ST}	Äquivalentdurchmesser	m
d_S	Durchmesser einer oberflächengleichen Kugel	m
d_V	Durchmesser einer volumengleichen Kugel	m
E_V	volumetrischer Energieeintrag	J m^{-3}
F	Kraft	N
g	Erdbeschleunigung	m s^{-2}
h	Höhe	m
J	Flux	$\text{kg h}^{-1} \text{m}^{-2}$
N	Anzahl an Tellern	-
Ne	Newtonzahl	-
n	Drehzahl	rpm
n_{90}	Maximalanzahl an Kokken, die 90 % des Kollektivs aufweisen	-
n_{RZ}	empirischer Parameter	-
O	Oberfläche	m^2
$Q(x)$	Summenverteilung	-
q	Effizienzverhältnis	$\mu\text{m m}^{-3}$
$q(x)$	Dichteverteilung	-
P	Permeabilität	g
P_L	Leistungseintrag ins Medium	W
p	Druck	Pa

p_K	Kapillardruck	Pa
p_0	Umgebungsdruck	Pa
p_h	hydrostatischer Druck	Pa
p_S	Feststoffgerüstdruck	Pa
R	Radius	m
R_F	Foulingwiderstand	m^{-1}
R_L	Radiale Position	m
R_M	hydraulischer Widerstand	m^{-1}
R_T	Gesamtwiderstand	m^{-1}
Re	Reynoldszahl	-
r_e	Bezugsradius	m
r_M	Abstand Rotorachse zum Meniskus	m
r_S	Abstand Rotorachse zum Sediment	m
s_e	Bezugsstrecke	m
$span$	Verteilungsbreite	-
t	Zeit	s
V	Volumen	m^3
\dot{V}	Volumenstrom	$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$
v	Geschwindigkeit	m s^{-1}
We	Weberzahl	-
w	Massenanteil	g g^{-1}
x	Partikeldurchmesser	μm
x_M	Modalwert	μm
x_{50}	Medianwert	μm
$\overline{x_R}$	mittlere Partikelgröße	μm

Griechische Buchstaben

α	Höhenspezifischer Filtrationswiderstand	m^{-2}
γ	Grenzflächenspannung	kg s^{-2}
δ	Membrandicke	μm
ε	Porosität	-
η	Dynamische Viskosität	mPa s
η_i	intrinsische Viskosität	mPa s
λ	Wellenlänge	nm
ν	kinematische Viskosität	$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$
ν_{SV}	Korrekturfaktor	-
ρ	Dichte	kg m^{-3}
Σ	Äquivalente Klärfläche	m^2
σ	Normalspannung	N m^{-2}
ϕ	Feststoffkonzentration	-
ψ	Sphärizität	-
ω	Winkelgeschwindigkeit	s^{-1}

Indizes

<i>A</i>	Auftrieb
<i>belastet</i>	nach Scherbeanspruchung
<i>unbelastet</i>	vor Scherbeanspruchung
<i>d</i>	disperse Phase
<i>F</i>	Fluid
<i>Fe</i>	Feed
<i>G</i>	Gewicht
<i>H</i>	Homogenisator
<i>KH</i>	Kohlenhydrat
<i>krit</i>	kritisch
<i>k</i>	Kugel
<i>Lab</i>	Labor
<i>max</i>	maximal
<i>P</i>	Partikel
<i>Pe</i>	Permeat
<i>R</i>	Rotor
<i>Re</i>	Retentat
<i>Sed</i>	Sedimentation

<i>ST</i>	Stokes
<i>Susp</i>	Suspension
<i>TM</i>	Trockenmasse
<i>W</i>	Widerstand
<i>Z</i>	Zentrifugalfeld

Abkürzungen

BAC	Bakterienstämme der <i>Bacillus</i> -Gattung
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EPS	Exopolysaccharide
FCM	Durchflusszytometrie
LPS	Lipopolysaccharide
MFI	Modified fouling index
OD	Optische Dichte
RNA	Ribonucleinsäure
SEC	Größenausschlusschromatographie
SOP	Standard Operating Procedure LUMiSizer
ST	Bakterienstämme der <i>Streptococcus thermophilus</i> -Gattung
TMP	Transmembrandruck

Literatur

- [1] Schueler, J. und Ostler, T. „Biopharmaceutical Startup’s Need of Regulatory Intelligence.“ In: *Journal of Commercial Biotechnology* 22.1 (2016).
- [2] Joshi, M., Patel, H., Gupte, S. und Gupte, A. „Nutrient improvement for simultaneous production of exopolysaccharide and mycelial biomass by submerged cultivation of *Schizophyllum commune* AGMJ-1 using statistical optimization“. In: *3 Biotech* 3.4 (2013), S. 307–318.
- [3] Villay, A., Laroche, C., Roriz, D., El Alaoui, H., Delbac, F. und Michaud, P. „Optimisation of culture parameters for exopolysaccharides production by the microalga *Rhodella violacea*“. In: *Bioresource technology* 146 (2013), S. 732–735.
- [4] Patel, M., Patel, U., Gupte, S. u. a. „Production of exopolysaccharide (EPS) and its application by new fungal isolates SGMP1 and SGMP2“. In: *International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology* 7.Special issue (2014), S. 511.
- [5] Freitas, F., Torres, C. A. und Reis, M. A. „Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production“. In: *Bioresource technology* 245 (2017), S. 1674–1683.
- [6] Vijayendra, S. u. a. „Microbial biopolymers: the exopolysaccharides“. In: *Microbial factories*. Springer, 2015, S. 113–125.
- [7] Chmiel, H., Takors, R. und Weuster-Botz, D. *Bioprozesstechnik*. Springer, 2018.
- [8] Merkel, T., Blättler, O. und Königsson, S. „Flocculant screening method at lab scale for application in disc stack centrifuges with hermetic design“. In: *Chemical engineering & technology* 41.12 (2018), S. 2312–2322.
- [9] Arndt, F., Ehlen, F., Schütz, S., Anlauf, H. und Nirschl, H. „Influence of operating parameters and membrane materials on fouling of ceramic hollow fibre membranes“. In: *Separation and Purification Technology* 171 (2016), S. 289–296.
- [10] Zondervan, E., Nawaz, M., Haan, A. B. de, Woodley, J. M. und Gani, R. „Optimal design of a multi-product biorefinery system“. In: *Computers & Chemical Engineering* 35.9 (2011), S. 1752–1766.

- [11] Bott, R., Langeloh, T. und Ehrfeld, E. „Dynamic cross flow filtration“. In: *Chemical Engineering Journal* 80.1-3 (2000), S. 245–249.
- [12] Stoffels, L., Finlan, A., Mannall, G., Purton, S. und Parker, B. „Downstream Processing of *Chlamydomonas reinhardtii* TN72 for Recombinant Protein Recovery“. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 7 (2019), S. 383.
- [13] Roca, C., Alves, V. D., Freitas, F. und Reis, M. A. „Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications“. In: *Frontiers in microbiology* 6 (2015), S. 288.
- [14] Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J.-L. und Agnely, F. „Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?“ In: *International journal of pharmaceutics* 436.1-2 (2012), S. 359–378.
- [15] Tobacman, J. K. „The common food additive carrageenan and the alpha-gal epitope“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136.6 (2015), S. 1708–1709.
- [16] Mende, S., Peter, M., Bartels, K., Rohm, H. und Jaros, D. „Addition of purified exopolysaccharide isolates from *S. thermophilus* to milk and their impact on the rheology of acid gels“. In: *Food Hydrocolloids* 32.1 (2013), S. 178–185.
- [17] Girard, M. und Schaffer-Lequart, C. „Gelation of skim milk containing anionic exopolysaccharides and recovery of texture after shearing“. In: *Food Hydrocolloids* 21.7 (2007), S. 1031–1040.
- [18] Yang, T., Wu, K., Wang, F., Liang, X., Liu, Q., Li, G. und Li, Q. „Effect of exopolysaccharides from lactic acid bacteria on the texture and microstructure of buffalo yoghurt“. In: *International Dairy Journal* 34.2 (2014), S. 252–256.
- [19] Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. und Schorr-Galindo, S. „Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction“. In: *Carbohydrate Polymers* 87.2 (2012), S. 951–962.
- [20] Patel, A. K., Laroche, C., Marcati, A., Ursu, A. V., Jubeau, S., Marchal, L., Petit, E., Djelveh, G. und Michaud, P. „Separation and fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*“. In: *Bioresource technology* 145 (2013), S. 345–350.
- [21] Torino, M. I., Font de Valdez, G. und Mozzi, F. „Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages“. In: *Frontiers in microbiology* 6 (2015), S. 834.
- [22] Leroy, F. und De Vuyst, L. „Advances in production and simplified methods for recovery and quantification of exopolysaccharides for applications in food and health“. In: *Journal of dairy science* 99.4 (2016), S. 3229–3238.

- [23] Sheng, G.-P., Yu, H.-Q. und Li, X.-Y. „Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review“. In: *Biotechnology advances* 28.6 (2010), S. 882–894.
- [24] Mishra, A. und Jha, B. „Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress“. In: *Bioresource technology* 100.13 (2009), S. 3382–3386.
- [25] Li, H., Li, Z., Xiong, S., Zhang, H., Li, N., Zhou, S., Liu, Y. und Huang, Z. „Pilot-scale isolation of bioactive extracellular polymeric substances from cell-free media of mass microalgal cultures using tangential-flow ultrafiltration“. In: *Process Biochemistry* 46.5 (2011), S. 1104–1109.
- [26] Micheli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C. und Crescenzi, V. „Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran“. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 53.1 (1999), S. 69–74.
- [27] Jaros, D., Mende, S., Häffele, F., Nachtigall, C., Nirschl, H. und Rohm, H. „Shear treatment of starter culture medium improves separation behavior of *Streptococcus thermophilus* cells“. In: *Engineering in Life Sciences* 18.1 (2018), S. 62–69.
- [28] Fritsche, O. *Mikrobiologie*. Springer-Verlag, 2016.
- [29] Munk, K., Abröll, C., Kurth, T., Langer, T. und Nethe-Jaenchen, R. *Biochemie-Zellbiologie*. Georg Thieme Verlag, 2008.
- [30] Hahn, H., Kaufmann, S. H., Schulz, T. F., Suerbaum, S., Adler, K., Schad, D. und Ulrichs, T. *Medizinische mikrobiologie und infektologie*. Springer-Verlag, 2009.
- [31] Eitinger, T. und Schlegel, H. G. *Allgemeine mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, 2007.
- [32] Errington, J. „*Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis“. In: *Microbiological reviews* 57.1 (1993), S. 1–33.
- [33] Higgins, D. und Dworkin, J. „Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation“. In: *FEMS microbiology reviews* 36.1 (2012), S. 131–148.
- [34] Piggot, P. J. und Hilbert, D. W. „Sporulation of *Bacillus subtilis*“. In: *Current opinion in microbiology* 7.6 (2004), S. 579–586.
- [35] Errington, J. „Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*“. In: *Nature Reviews Microbiology* 1.2 (2003), S. 117–126.
- [36] Pörtner, R. „Grundlagen der Bioverfahrenstechnik“. In: *Angewandte Mikrobiologie*. Springer, 2006, S. 237–251.

- [37] Keller, K., Friedmann, T. und Boxman, A. „The bioseparation needs for tomorrow“. In: *TRENDS in Biotechnology* 19.11 (2001), S. 438–441.
- [38] Suresh Kumar, A., Mody, K. und Jha, B. „Bacterial exopolysaccharides—a perception“. In: *Journal of basic microbiology* 47.2 (2007), S. 103–117.
- [39] Nwodo, U. U., Green, E. und Okoh, A. I. „Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects“. In: *International journal of molecular sciences* 13.11 (2012), S. 14002–14015.
- [40] Fogal, J., Kessler, C. und Varsamis, G. „Application of shear anisotropy from a new generation crossed dipole acoustic tool“. In: *SPE Annual Technical Conference and Exhibition. OnePetro*. 2002.
- [41] Roach, A. und Harte, F. „Disruption and sedimentation of casein micelles and casein micelle isolates under high-pressure homogenization“. In: *Innovative food science & emerging technologies* 9.1 (2008), S. 1–8.
- [42] Walstra, P. „Physical chemistry of milk fat globules“. In: *Developments in Dairy Chemistry—2*. Springer, 1983, S. 119–158.
- [43] Schubert, H. und Armbruster, H. „Prinzipien der Herstellung und stabilität von emulsionen“. In: *Chemie Ingenieur Technik* 61.9 (1989), S. 701–711.
- [44] Behrend, O. und Schubert, H. „Influence of hydrostatic pressure and gas content on continuous ultrasound emulsification“. In: *Ultrasonics Sonochemistry* 8.3 (2001), S. 271–276.
- [45] Bechtel, S., Gilbert, N. und Wagner, H.-G. „Grundlagenuntersuchungen zur Herstellung von Öl/Wasser-Emulsionen im Ultraschallfeld“. In: *Chemie Ingenieur Technik* 71.8 (1999), S. 810–817.
- [46] Bechtel, S., Gilbert, N. und Wagner, H.-G. „Grundlagenuntersuchungen zur Herstellung von Emulsionen im Ultraschallfeld—Teil 2“. In: *Chemie Ingenieur Technik* 72.5 (2000), S. 451–457.
- [47] Schuchmann, H. P. und Danner, T. „Emulsification: more than just comminution“. In: *Chemie Ingenieur Technik* 76.4 (2004), S. 364–375.
- [48] Håkansson, A., Fuchs, L., Innings, F., Revstedt, J., Bergenståhl, B. und Trägårdh, C. „Visual observations and acoustic measurements of cavitation in an experimental model of a high-pressure homogenizer“. In: *Journal of Food Engineering* 100.3 (2010), S. 504–513.
- [49] Guraya, H. S. und James, C. „Deagglomeration of rice starch-protein aggregates by high-pressure homogenization“. In: *Starch-Stärke* 54.3-4 (2002), S. 108–116.
- [50] Stieß, M. *Mechanische Verfahrenstechnik-Partikeltechnologie 1*. Springer-Verlag, 2008.

- [51] Anlauf, H. *Wet Cake Filtration: Fundamentals, Equipment, and Strategies*. John Wiley & Sons, 2019.
- [52] Zierep, J. und Bühler, K. *Grundzüge der Strömungslehre: Grundlagen, Statik und Dynamik der Fluide*. Springer-Verlag, 2018.
- [53] Kürten, H., Raasch, J. und Rumpf, H. „Beschleunigung eines kugelförmigen Feststoffteilchens im Strömungsfeld konstanter Geschwindigkeit“. In: *Chemie Ingenieur Technik* 38.9 (1966), S. 941–948.
- [54] Gleiß, M. *Dynamische Simulation der Mechanischen Flüssigkeitsabtrennung in Vollmantelzentrifugen*. KIT Scientific Publishing, 2018.
- [55] Kaye, B. und Boardman, R. „Proc. Symposium on Interaction between Fluids and Particles“. In: (1962).
- [56] Bhatti, J. I. „Clusters formation during sedimentation of dilute suspensions“. In: *Separation Science and Technology* 21.9 (1986), S. 953–967.
- [57] John, R. „Einfluß der Konzentration einer monodispersen Suspension auf die Sinkgeschwindigkeit ihrer Teilchen“. In: *Chemie Ingenieur Technik* 38.4 (1966), S. 428–430.
- [58] Beiser, M., Bickert, G. und Scharfer, P. „Comparison of sedimentation behavior and structure analysis with regard to destabilization processes in suspensions“. In: *Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry-Plant Equipment-Process Engineering-Biotechnology* 27.10 (2004), S. 1084–1088.
- [59] Richardson, J. und Zaki, W. „Sedimentation and fluidisation: Part I“. In: *Chemical Engineering Research and Design* 75 (1997), S82–S100.
- [60] Ekdawi, N. und Hunter, R. J. „Sedimentation of disperse and coagulated suspensions at high particle concentrations“. In: *Colloids and surfaces* 15 (1985), S. 147–159.
- [61] Stahl, W. und Band, I. *Fest-Flüssig-Trennung Industrie-Zentrifugen Maschinen- & Verfahrenstechnik, vol. II*. 2004.
- [62] Alles, C. M. und Anlauf, H. „Filtration mit kompressiblen Kuchen: Effiziente Konzeptefür eine anspruchsvolle Trennaufgabe“. In: *Chemie Ingenieur Technik* 75.9 (2003), S. 1221–1230.
- [63] Auzerais, F., Jackson, R. und Russel, W. „The resolution of shocks and the effects of compressible sediments in transient settling“. In: *Journal of Fluid Mechanics* 195 (1988), S. 437–462.
- [64] Buscall, R. und White, L. R. „The consolidation of concentrated suspensions. Part 1.—The theory of sedimentation“. In: *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* 83.3 (1987), S. 873–891.

- [65] Green, M. D., Eberl, M. und Landman, K. A. „Compressive yield stress of flocculated suspensions: determination via experiment“. In: *AIChE journal* 42.8 (1996), S. 2308–2318.
- [66] Landman, K. A., White, L. R. und Eberl, M. „Pressure filtration of flocculated suspensions“. In: *AIChE Journal* 41.7 (1995), S. 1687–1700.
- [67] Usher, S. P., Studer, L. J., Wall, R. C. und Scales, P. J. „Characterisation of dewaterability from equilibrium and transient centrifugation test data“. In: *Chemical Engineering Science* 93 (2013), S. 277–291.
- [68] Sambuichi, M., Nakakura, H. und Osasa, K. „Zone settling of concentrated slurries in a centrifugal field“. In: *Journal of chemical engineering of Japan* 24.4 (1991), S. 489–494.
- [69] Kempken, R., Preißmann, A., Schäfer, J. und Berthold, W. „Application of an industrial disc stack centrifuge for the separation of hybridoma cells as a first step in downstream processing“. In: *Animal Cell Technology*. Elsevier, 1994, S. 383–385.
- [70] Chlup, P. H., Bernard, D. und Stewart, G. G. „Disc stack centrifuge operating parameters and their impact on yeast physiology“. In: *Journal of the Institute of Brewing* 114.1 (2008), S. 45–61.
- [71] Maybury, J., Mannweiler, K., Titchener-Hooker, N., Hoare, M. und Dunnill, P. „The performance of a scaled down industrial disc stack centrifuge with a reduced feed material requirement“. In: *Bioprocess Engineering* 18.3 (1998), S. 191–199.
- [72] Ambler, C. M. „The theory of scaling up laboratory data for the sedimentation type centrifuge“. In: *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* 1.2 (1959), S. 185–205.
- [73] Svarovsky, L. „Introduction to solid-liquid separation“. In: *Solid-Liquid Separation*. Elsevier, 2001, S. 1–29.
- [74] Mannwieler, K. *The recovery of biological particles in high-speed continuous centrifuges with special reference to feed-zone break-up effects*. University of London, University College London (United Kingdom), 1990.
- [75] Wakeman, R. und Tarleton, S. *Solid/liquid separation: principles of industrial filtration*. Elsevier, 2005.
- [76] Rushton, A., Ward, A. S. und Holdich, R. G. *Solid-liquid filtration and separation technology*. John Wiley & Sons, 2008.
- [77] Melin, T. und Rautenbach, R. *Membranverfahren: Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung*. Springer-Verlag, 2007.

- [78] Saravia, F. „Entfernung von organischen Spurenstoffen und Untersuchung von Foulingprozessen in getauchten Membranen und Hybridverfahren“. Diss. Lehrstuhl für Wasserchemie am Engler-Bunte-Inst., 2009.
- [79] Pinnekamp, J. und Friedrich, H. *Bd. 1: Membrantechnik für die Abwasserreinigung*. 2006.
- [80] Matthiasson, E. und Sivik, B. „Concentration polarization and fouling“. In: *Desalination* 35 (1980), S. 59–103.
- [81] Cheryan, M. *Ultrafiltration and microfiltration handbook*. CRC press, 1998.
- [82] Rode, A. „Isolierung und Charakterisierung von bakteriellen extrazellulären polymeren Substanzen aus Biofilmen“. In: *Dissertationsarbeit: Universität Duisburg-Essen* (2004).
- [83] Flemming, H.-C. und Wingender, J. „Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects“. In: *Water science and technology* 43.6 (2001), S. 1–8.
- [84] Nataraj, S., Schomäcker, R., Kraume, M., Mishra, I. und Drews, A. „Analyses of polysaccharide fouling mechanisms during crossflow membrane filtration“. In: *Journal of Membrane Science* 308.1-2 (2008), S. 152–161.
- [85] Nielson, P., Jahn, A., Wingender, J., Neu, T. und Flemming, H. *Extraction of EPS Microbial extracellular polymeric substances*. 1999.
- [86] Yiantsios, S. und Karabelas, A. „An experimental study of humic acid and powdered activated carbon deposition on UF membranes and their removal by backwashing“. In: *Desalination* 140.2 (2001), S. 195–209.
- [87] Lee, S. und Elimelech, M. „Relating organic fouling of reverse osmosis membranes to intermolecular adhesion forces“. In: *Environmental science & technology* 40.3 (2006), S. 980–987.
- [88] Field, R. „Fundamentals of fouling“. In: *Membranes for water treatment* 4 (2010), S. 1–23.
- [89] Schippers, J. und Verdouw, J. „The modified fouling index, a method of determining the fouling characteristics of water“. In: *Desalination* 32 (1980), S. 137–148.
- [90] Listiarini, K., Sun, D. D. und Leckie, J. O. „Organic fouling of nanofiltration membranes: Evaluating the effects of humic acid, calcium, alum coagulant and their combinations on the specific cake resistance“. In: *Journal of membrane science* 332.1-2 (2009), S. 56–62.
- [91] Müller, G. *Grundlagen der Lebensmittelmikrobiologie: eine Einführung*. Springer-Verlag, 2013.

- [92] Kekez, B., Gojgic-Cvijovic, G., Jakovljevic, D., Kojic, J. S., Markovic, M., Beskoski, V. und Vrvic, M. „High levan production by *Bacillus licheniformis* NS032 using ammonium chloride as the sole nitrogen source“. In: *Applied biochemistry and biotechnology* 175.6 (2015), S. 3068–3083.
- [93] Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Welker, D. L., Oberg, C. J. und Moineau, S. „Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review“. In: *Journal of dairy science* 86.2 (2003), S. 407–423.
- [94] De Vuyst, L. und Degeest, B. „Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria“. In: *FEMS microbiology reviews* 23.2 (1999), S. 153–177.
- [95] Vaningelgem, F., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, M., Swings, J. und De Vuyst, L. „Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics“. In: *Applied and environmental microbiology* 70.2 (2004), S. 900–912.
- [96] Laidlaw, I. und Steinmetz, M. „Introduction to differential sedimentation“. In: *Analytical ultracentrifugation: Techniques and methods* 31.0 (2005), S. 270–290.
- [97] Lerche, D. „Comprehensive characterization of nano- and microparticles by in-situ visualization of particle movement using advanced sedimentation techniques“. In: *KONA Powder and Particle Journal* 36 (2019), S. 156–186.
- [98] Lerche, D. „Dispersion stability and particle characterization by sedimentation kinetics in a centrifugal field“. In: *Journal of Dispersion Science and Technology* 23.5 (2002), S. 699–709.
- [99] Detloff, T., Sobisch, T. und Lerche, D. „Particle size distribution by space or time dependent extinction profiles obtained by analytical centrifugation (concentrated systems)“. In: *Powder Technology* 174.1-2 (2007), S. 50–55.
- [100] Detloff, T. und Lerche, D. „Centrifugal separation in tube and disc geometries: experiments and theoretical models“. In: *Acta mechanica* 201.1 (2008), S. 83–94.
- [101] Ashraf, R. und Shah, N. P. „Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt—A review“. In: *International journal of food microbiology* 149.3 (2011), S. 194–208.
- [102] Shapiro, H. M. *Practical flow cytometry*. John Wiley & Sons, 2005.
- [103] Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Roberts, P. und Smith, F. „Phenol sulphuric acid method for carbohydrate determination“. In: *Ann Chem* 28.3 (1956), S. 350–359.

- [104] Nachtigall, C., Berger, C., Kovanović, T., Wefers, D., Jaros, D. und Rohm, H. „Shear induced molecular changes of exopolysaccharides from lactic acid bacteria“. In: *Food Hydrocolloids* 97 (2019), S. 105181.
- [105] Zlokarnik, M. *Rührtechnik: Theorie und Praxis*. Springer-Verlag, 2013.
- [106] Vieweg, R. „Verfahrenstechnische Berechnungsmethoden Teil 4: Stoffvereinigen in fluiden Phasen—Ausrüstungen und ihre Berechnung von einem Autorenkollektiv unter Federführung von F. Liepe (Herausgeber der Reihe: Herausgeberkollektiv unter Leitung von S. Weiß); Leipzig, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 1988; 232 Seiten mit 306 Bildern und 61 Tabellen; Format 21, 0 cm× 29, 5 cm, Ln. mit Schutzumschlag, DDR 215,—M, Ausland 215,—DM; ISBN 3-342-00155-0; Bestell-Nr.: 5419008“. In: *Zeitschrift für Chemie* 28.11 (1988), S. 417–418.
- [107] Köhler, K. *Simultanes Emulgieren und Mischen*. Logos Verlag Berlin GmbH, 2010.
- [108] Wengeler, R. und Nirschl, H. „Dispergierung nanoskaliger Agglomerate mittels Hochdruckverfahren“. In: *Chemie Ingenieur Technik* 76.9 (2004), S. 1387–1388.
- [109] Cornehl, B., Weinkötz, D. und Nirschl, H. „Downscaling cake filtration—correlations between compressibility of lysozyme crystal filter cakes and filter area“. In: *Engineering in Life Sciences* 13.3 (2013), S. 271–277.
- [110] Liu, C., Lu, J., Lu, L., Liu, Y., Wang, F. und Xiao, M. „Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1“. In: *Bioresource technology* 101.14 (2010), S. 5528–5533.
- [111] Higgins, M. J. und Novak, J. T. „Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation“. In: *Journal of environmental engineering* 123.5 (1997), S. 479–485.
- [112] Wingender, J., Neu, T. R. und Flemming, H.-C. „What are bacterial extracellular polymeric substances?“ In: *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer, 1999, S. 1–19.
- [113] Leduy, A., Marsan, A. und Coupal, B. „A study of the rheological properties of a non-Newtonian fermentation broth“. In: *Biotechnology and bioengineering* 16.1 (1974), S. 61–76.
- [114] Sobisch, T. und Lerche, D. „Thickener performance traced by multisample analytical centrifugation“. In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 331.1-2 (2008), S. 114–118.
- [115] Lerche, D. und Sobisch, T. „Evaluation of particle interactions by in situ visualization of separation behaviour“. In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 440 (2014), S. 122–130.

- [116] Häffele, F., Jaros, D., Mende, S., Rohm, H. und Nirschl, H. „Separation of Starter Cultures After High-Pressure Homogenization“. In: *Chemie Ingenieur Technik* 90.7 (2018), S. 1016–1020.
- [117] Baker, R. W. *Membrane technology and applications*. John Wiley & Sons, 2012.