

ZENTRUM ANGEWANDTE CHEMIE

**Institut für Technische Chemie
der Universität Hannover**

**Nitratanreicherung in Molke und Molkenkonzentrat
zum wertgesteigerten Einsatz der Molkenprodukte**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Chem. Dirk Schnitzmeier
geboren am 13.04.1970 in Fröndenberg

Hannover, Dezember 2003

Hauptreferent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Roland Ulber

Tag der Promotion: 1.12.2003

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel sowie eventuelle zu Hilfeleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, Dezember 2003

Dirk Schnitzmeier

CURRICULUM VITAE

Name: **Dirk Schnitzmeier**
Geburtsdatum: 13.04.1970
Geburtsort: Fröndenberg
Eltern: Reinhard Schnitzmeier, Ingenieur
Monika Schnitzmeier, Industriekauffrau
Familienstand: ledig

SCHULBILDUNG

1976 - 1980 Gemeinschaftsgrundschule Langschede/Ardey
1980 - 1989 Pestalozzi-Gymnasium Unna
mit Abitur abgeschlossen, Note 2,8

HOCHSCHULBILDUNG

10/89 - 09/92 Studiengang Chemie (Diplom), Universität Dortmund
10/92 Diplom-Vorprüfung
10/92 - 03/93 Studiengang Chemie (Diplom), RWTH Aachen
04/93 - 10/95 Studiengang Chemie (Diplom), WWU Münster
10/96 - 08/99 Studiengang Chemie (Diplom), Universität Dortmund
08/99 Diplomarbeit am Fachbereich Chemietechnik, Universität Dortmund: „Homogenkatalytische Telomerisation von Isopren und Methanol unter Anwendung der Flüssig/Flüssig-Zweiphasentechnik“
Hauptreferent: Prof. Dr. A. Behr, Lehrstuhl für Technische Chemie A, Fachbereich Chemietechnik, Universität Dortmund,
Korreferent: Prof. Dr. P. Eilbracht, Lehrbereich Organische Chemie, Fachbereich Chemie, Universität Dortmund
Note: „sehr gut“; Gesamtnote: „gut“

BERUFLICHER WERDEGANG

05/00 - 04/03 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, Prof. Dr. T. Scheper
02/01 - 12/01 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Fa. Texys GmbH, Hannover

DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation entstand in der Zeit von Mai 2000 bis September 2003 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper, dem ich für die freundliche Aufnahme eines „Auswärtigen“ in seinen Arbeitskreis, die gute Betreuung und die hervorragenden Arbeitsbedingungen ganz herzlich danken möchte.

Für die sehr persönliche Betreuung der wissenschaftlichen Arbeit, die zahlreichen Anregungen und vieles mehr, sowie nicht zuletzt die Übernahme des Korreferats danke ich ganz herzlich Herrn Priv.-Doz. Dr. Roland Ulber.

Dr. Heinrich Buchholz und Hans-Jörg Denzler sowie allen Mitarbeitern der Fa. Biolac GmbH danke ich vielmals für die hilfsbereite Zusammenarbeit sowie für die leckere Molke.

Bedanken möchte ich mich bei den Firmen Bayer, Purolite und Sybron für die Bereitstellung von Anionenaustauscherharzen sowie bei der Fa. Applexion für die Chromatographiesäule und Harz. Dank auch an Herrn Richarts von der ZMP für die Daten zum Molkenmarkt.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Martina Weiß, ohne deren Wissen eine praktische Arbeit am Institut fast unmöglich ist. Vielen Dank auch an die mechanische Werkstatt, besonders für ihre Geduld beim Bau der Reaktorkaskade. Ich danke auch der Elektrowerkstatt für die Reparatur diverser Geräte.

Dank an „meine“ Diplomanden Michael Fritzsche und Johann Schwarz sowie alle Schwerpunkt- und Schülerpraktikanten.

Arne Burzlaff, Kirsten Hantelmann, Kai Muffler, Jörg Schaper, Henning Stückmann und Oliver Schweder danke ich für die gründliche Korrektur dieser Arbeit.

Kirsten, danke für's Da-Sein, im Labor, auf den Fluren, im Sozialraum und nicht zuletzt bei der Tour.

Danke an Ralf für die ausgiebige Einführung in meine Aufgaben als Kellermeister.

Allen Hannoverschen Biotechnologen möchte ich danken, dass sie einen Westfalen so fern der Heimat freundlichst aufgenommen haben, auch wenn ihr von Fußball einfach keine Ahnung habt. Das Arbeitsklima und die Stimmung hier ist einmalig!

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich in jeder Art und Weise während des Studiums unterstützt haben und ohne die vieles nicht möglich gewesen wäre.

Mein größter Dank gilt Anne.

ABSTRACT (D)

Die Nahrungsmittelindustrien in Europa, den USA und Fernost müssen sich den wachsenden Ansprüchen der Konsumenten an ihre Produkte in Bezug auf Vielfalt, Gesundheit, Zweckmäßigkeit und Qualität stellen. Der gesundheitliche Aspekt spielt besonders bei der Herstellung von Säuglingsnahrung eine bedeutende Rolle. Molke, ein Nebenprodukt der Käse- und Kaseinherstellung, stellt mit seinem hohen Gehalt an Lactose und physiologisch wertvollem Eiweiß einen geeigneten Grundstoff für Säuglingsnahrung dar. Bei der Käseherstellung wird der Milch allerdings häufig Kaliumnitrat zugesetzt, welches in der Molke verbleibt und ein gesundheitliches Risiko besonders für Kleinkinder darstellt. Es wird ein kombinierter Prozess aus Anionenaustausch und mikrobieller Denitrifikation zur Entfernung des Nitrats aus Molkenkonzentrat vorgestellt.

Ein Analyseverfahren für Nitrat und Nitrit in den untersuchten Flüssigkeiten mittels reflektometrischer Detektion einer Farbreaktion wird etabliert.

In der ersten Stufe des Prozesses wird Nitrat mittels Anionenaustauscherharzen aus dem Molkenkonzentrat entfernt. Hierzu werden verschiedene Harze, Reaktortypen und Reaktionsbedingungen untersucht. Mit einem Harz der Fa. Applexion können in einer Chromatographiesäule über einen langen Zeitraum über 95% des Nitrats entfernt werden.

Die anschließende Regeneration des Anionenaustauscherharzes mit Natriumchlorid wird besonders im Hinblick auf Kochsalzkonzentrationen, in deren Gegenwart eine mikrobielle Denitrifikation möglich ist, untersucht. Die Regeneration ist bei einer Konzentration von 35 g/L problemlos möglich.

Um die Umweltbelastung durch Salzfrachten und Nitrat zu minimieren, wird die Denitrifikation des Eluats aus der chromatographischen Stufe mittels *Paracoccus denitrificans* untersucht. Es ist mit diesem Mikroorganismus möglich, Nitrat auch in Gegenwart von 35 g/L NaCl vollständig zu molekularem Stickstoff zu reduzieren. Die so denitrifizierte Kochsalzlösung kann erneut zur Regeneration des Anionenaustauscherharzes in der ersten Stufe des Prozesses eingesetzt werden.

Auf Basis der ermittelten Daten zur Nitratbereicherung in Molkenkonzentrat mittels Anionenaustauscherharzen und der Kinetik der mikrobiellen Denitrifikation wird eine Abschätzung der Dimensionierung einer industriellen Anlage für die Fa. Biolac durchgeführt.

Stichworte: Molke, Nitrat, Ionenaustausch, Denitrifikation

ABSTRACT (E)

The food industries in Europe, the United States and the Far East have to follow the consumers' demands on food products concerning variety, health, convenience and quality. The health aspect is of great significance for the production of baby food. Whey, a by-product of the cheese-making industry, constitutes a good basic material for baby food because of its high content of lactose and physiologically valuable proteins. Potassium nitrate is often added to the milk during the process of cheese production. This nitrate remains in the whey and poses a risk for the health of small children. A process combined of ion exchange and biological denitrification for the removal of nitrate from whey concentrate is presented.

An analytical method for the detection of nitrate and nitrite in the tested liquids using reflectometric methods is established.

Nitrate is removed from whey concentrate using ion exchange resins in the first step of the process. For this, different resins, types of reactors and reaction conditions are tested. More than 95% of the nitrate can be removed over a long period of time using a Applexion resin in a chromatographic column.

The subsequent regeneration of the ion exchange resin using sodium chloride is investigated particularly with regard to the salt concentration in the presence of which a biological denitrification is possible. The regeneration is possible with a salt concentration of 35 g/L.

The biological denitrification of the used regenerant from the chromatographic step using *Paracoccus denitrificans* is studied to minimize the environmental impact of waste salt and nitrate. It is possible to reduce nitrate to molecular nitrogen with this microorganism even in the presence of sodium chloride concentrations of 35 g/L. This denitrified salt solution can again be used for the regeneration of the ion exchange resin in the first step of the process.

An assessment of the dimensioning of an industrial facility for the Biolac company is made using the acquired data concerning nitrate removal from whey concentrate and the kinetics of the biological denitrification.

Key words: whey, nitrate, ion exchange, denitrification

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Theoretische Grundlagen	4
2.1	Molke	4
2.1.1	Zusammensetzung von Molke	4
2.1.2	Verarbeitung von Molke	5
2.1.3	Markt	6
2.2	Nitrat	9
2.2.1	Gesundheitliche Aspekte	9
2.2.2	Nitrat in Molke	10
2.2.3	Nitratanreicherung	11
2.3	Ionenaustausch	14
2.4	Biologische Denitrifikation	15
2.4.1	<i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Paracoccus pantotrophus</i>	17
2.4.2	Grundlagen der Enzymkinetik	18
3	Nitrat- und Nitritanalytik	21
3.1	Nitratanalytik mittels Ionenselektiver Elektrode	21
3.2	Reflektometrische Nitrat- und Nitritanalytik	22
3.2.1	Analytik in Molke	23
3.2.2	Analytik in Molkenkonzentrat	24
3.2.3	Analytik in Gegenwart hoher Chlorid-Konzentrationen	27
3.2.4	Korrekturfaktoren für die Nitrat- und Nitritanalytik	28
4	Chromatographischer Nitratabbau in Molke und Molkenkonzentrat	30
4.1	Vorversuche	30
4.1.1	Auswahl geeigneter Anionenaustauscherharze	31
4.1.2	Kontinuierliche Denitrifikation von Molkenkonzentrat	32
4.2	Nitratanreicherung in Molke und Molkenkonzentrat in einer vierstufigen Rührkesselkaskade	34
4.2.1	Verweilzeitverhalten der Reaktorkaskade	36
4.2.2	Nitratanreicherung in Molke	39
4.2.3	Nitratanreicherung in Molkenkonzentrat	41
4.2.4	Regeneration des Anionenaustauscherharzes	42
4.3	Nitratanreicherung in Molkenkonzentrat mittels Chromatographiesäule	43
4.3.1	Verblockung der Säule durch Molkenkonzentrat	43
4.3.2	Temperaturabhängigkeit der Denitrifikation	44
4.3.3	Regeneration des Anionenaustauscherharzes	46
4.4	Vergleich von Rührkesselkaskade und Chromatographiesäule	50
5	Mikrobielle Denitrifikation	53
5.1	Kultivierung und Stammhaltung	53

5.1.1	Durchführung	53
5.1.2	Wachstum von <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>P. pantotrophus</i>	56
5.2	Optimierung der Denitrifikationsbedingungen.....	58
5.2.1	Einfluss der Wachstumsbedingungen	59
5.2.2	Einfluss der Kohlenstoffquelle	60
5.2.3	Einfluss des Puffers	63
5.2.4	Einfluss von Temperatur und Salzkonzentration	64
5.3	Kinetik der Denitrifikation.....	66
5.3.1	Nitratabbau durch <i>Paracoccus denitrificans</i>	66
5.3.2	Einfluss der Zelldichte auf den Nitratabbau.....	67
5.3.3	Einfluss des Zellalters auf den Nitratabbau.....	69
5.3.4	Nitritakkumulation.....	70
5.3.5	Denitrifikation durch <i>Paracoccus pantotrophus</i>	72
5.4	Denitrifikation durch immobilisierte Mikroorganismen	73
5.4.1	Verfahren der Immobilisierung	74
5.4.2	Nitratabbau in Natriumchloridlösung	75
5.4.3	Nitratabbau in Molkenkonzentrat.....	78
6	Kombination der Verfahren.....	81
6.1	Chromatographische und mikrobielle Denitrifikation	82
6.2	Abschätzung der Auslegung eines industriellen Prozesses	84
6.2.1	Dimensionierung der chromatographischen Stufe	85
6.2.2	Dimensionierung der biologischen Stufe	86
7	Zusammenfassung und Ausblick.....	91
8	Anhang.....	95
8.1	Bakterielles Wachstum	95
8.2	Bestimmung der Zelldichte durch Trübungsmessung	98
8.3	Nitratabbau in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle	99
8.4	Nitratabbau in Abhängigkeit von Temperatur und Salzkonzentration.....	100
8.5	Nitratabbau in Abhängigkeit von der Acetatkonzentration.....	101
8.6	Herleitung der Gleichungen zum Aktivitätsverlust	102
8.6.1	Satzweise Zellerneuerung.....	102
8.6.2	Kontinuierliche Zellerneuerung.....	102
8.7	Abkürzungsverzeichnis	104
8.8	Literaturverzeichnis	105

1 Einleitung und Zielsetzung

Molke ist ein Nebenprodukt der Käseherstellung und enthält viele wertvolle Bestandteile der Milch, die nicht in den Käse übergehen, z.B. Lactose und wasserlösliche Molkenproteine [1]. Bei der Herstellung von Schnittkäse wird der Käsereimilch Kaliumnitrat zugesetzt, um den Fermentationsfehler der Spätblähung zu unterdrücken. Der gut wasserlösliche Salpeter verbleibt dabei zu einem großen Teil in dem flüssigen Koppelprodukt, der Molke. Es werden dabei Nitratkonzentrationen von über 50 mg/L Nitrat in der Dünnmolke erreicht. Da Dünnmolke nur einen Trockenmasseanteil von ca. 6% aufweist, enthalten die verkaufsfähigen Trockenprodukte der Molke dementsprechend einen deutlich höheren Nitratgehalt 850 mg/kg.

Diese hohen Nitratkonzentrationen spielen in vielen Verwendungen von Molkenprodukten keine oder nur eine untergeordnete Rolle, da Nitrat für einen gesunden Erwachsenen unbedenklich ist. Es kann allerdings im menschlichen Körper durch Bakterien und Enzyme zu Nitrit umgewandelt werden, welches wiederum Hämoglobin im Blut oxidiert und es damit für den Sauerstofftransport unbrauchbar macht [2]. Da bei Kleinkindern der enzymatische Schutzmechanismus gegen diese Hämoglobin-Oxidation noch nicht ausgeprägt ist, kann es zu einer Methämoglobinämie, auch bekannt unter dem Namen *Blue-Baby-Syndrome* und damit zum Erstickungstod des Kindes kommen. Diese Gefahr verbietet den Einsatz von nitratbelasteten Molkenprodukten in der Säuglingsernährung. Auch in anderen Spezialanwendungen wie der Herstellung von Diätprodukten wird eine Nitratkontamination als bedenklich angesehen, beziehungsweise ist aus anderen Gründen nicht möglich. So ist ein Einsatz von nitrathaltigem Molkenpulver bei der Herstellung von Likörpralinen unmöglich, da der Zucker aus Liköre in Gegenwart von Nitrat auskristallisieren, was die sensorischen Eigenschaften des Produktes extrem verschlechtert.

Nachdem Molke lange Zeit als Abfallprodukt betrachtet wurde, dessen Entsorgung sich zunehmend schwierig gestaltete, werden Molkenprodukte nun schon seit vielen Jahren als wichtige Rohstoffe, z.B. bei der Tablettenherstellung und in der Nahrungsmittelindustrie genutzt. Molke bleibt allerdings ein preiswerter Rohstoff, zur Zeit sind nur ca. 30 Cent für ein Kilogramm Molkenpulver zu erzielen. Die Verfügbarkeit von Molke steigt ständig an, da die Produktionsmengen für Käse und

damit die Menge des anfallenden Koppelproduktes Molke auch in den letzten Jahren ständig weiter gestiegen ist. Während der Molkeanfall in Deutschland 1999 10,3 Mio. Tonnen betrug, waren es 2001 bereits 12,0 Mio. Tonnen. Eine Verarbeitung in Spezialprodukten könnte nicht nur zusätzliche Absatzfelder erschließen, es könnten in diesen Bereichen auch höhere Preise erzielt werden. Eine Bereitstellung von nachweisbar nitratfreien Molkenprodukten könnte somit die Stellung eines molkeverarbeitenden Betriebes deutlich verbessern.

Molke wird bei den verarbeitenden Betrieben nicht als genuine Dünnmolke angeliefert, sondern als Molkenkonzentrat, bei dem der Trockenmasseanteil auf ca. 30% aufkonzentriert wurde. Dieses wird durch schonenden Wasserentzug erreicht, bei dem die Molkenbestandteile möglichst wenig verändert werden. Dieses Verfahren ist notwendig, da es in Deutschland nur wenige Anlagen zur Verarbeitung von Molke gibt und deshalb die Transportwege von der Käserei, bei der die Molke anfällt, zu dem verarbeitenden Betrieb sehr groß sein können. Um nicht unnötigerweise Wasser über weite Strecken zu transportieren, was sowohl ökologisch als auch ökonomisch nachteilig wäre, wird die Molke deshalb vor ihrem Transport entsprechend aufkonzentriert.

Diese Arbeit wurde in Kooperation mit dem größten Molkeverarbeitenden Unternehmen im norddeutschen Raum, der Fa. Biolac GmbH in Harbarnsen durchgeführt. Ziel der Arbeit war es, das Nitrat im Molkenkonzentrat soweit wie möglich zu entfernen. Die Fokussierung lag dabei auf zwei grundsätzlichen Verfahren, die in der Nitratentfernung aus Trinkwasser bereits angewendet werden. Es handelt sich dabei um den Austausch von Nitrat-Ionen gegen unbedenkliche Ionen, z.B. Chlorid, mittels stark basischer Anionenaustauscherharze und um den mikrobiellen Nitratabbau zu molekularem Stickstoff. Es schien sinnvoll, eine Kombination aus den beiden zuvor genannten Verfahren zu untersuchen, da hierdurch die möglichen ökologischen oder gesundheitlichen Nachteile beider Einzelverfahren eventuell zu vermeiden sind. Darüber hinaus musste ein schnelles und zuverlässiges Verfahren zur Analyse von Nitrat und Nitrit in den verwendeten Medien etabliert werden, da besonders für Molkenkonzentrat eine entsprechende Analytik nicht beschrieben ist.

Konkret wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Faktoren untersucht:

- Reflektometrische Methoden zur Bestimmung des Nitrit- und Nitratgehalts von Molke und Molkenkonzentrat.
- Nitrat- und Nitritanalytik in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen.
- Bestimmung geeigneter Harze und Reaktortypen für den Nitratabbau in Molke und Molkenkonzentrat mittels Anionenaustauscherchromatographie.
- Optimierung der Beladung des Anionenaustauscherharzes mit Nitrat aus Molkenkonzentrat und der anschließenden Regeneration des Harzes.
- Optimierung der mikrobiellen Denitrifikation durch *Paracoccus denitrificans* in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen.
- Bestimmung der Kinetik der mikrobiellen Denitrifikation.
- Einsatz immobilisierter Mikroorganismen zur Denitrifikation von Kochsalzlösungen und Molkenkonzentrat.
- Kombination des chromatographischen Nitratabbaus in Molkenkonzentrat und der mikrobiellen Denitrifikation des Eluats aus der Regeneration der Anionenaustauscherstufe.
- Auslegung eines industriellen Prozesses.

2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel wird auf einige Grundlagen eingegangen, die für das Verständnis der weiteren Abschnitte von Bedeutung sind. Zunächst wird das Produkt Molke und das hieraus zu entfernende Nitrat behandelt. Anschließend werden die in dieser Arbeit verwendeten Verfahren zum Nitratabbau, der Anionenaustausch und die mikrobielle Denitrifikation, näher beschrieben.

2.1 Molke

Molke ist der in dieser Arbeit behandelte landwirtschaftliche Rohstoff. Unter dem Begriff „Molke“ sind die flüssigen Rückstände der Käse- und Kaseinherstellung sowie der Sojaverarbeitung zu verstehen [3]. Dabei werden je nach Art der Kaseinfällung drei Arten von Molke unterschieden.

Bei der Produktion von Käse werden Lab-Enzyme eingesetzt, die daraus resultierende Molke wird als Süßmolke bezeichnet. Zur Produktion von Frischkäse und Quark erfolgt die Kaseinfällung durch Zusatz von milchsäurebildenden Bakterien, die entstehende Molke heißt Sauermolke. Diese macht jedoch nur ca. 20% des Gesamtmolkenaufkommens aus [4]. Bei der Herstellung von technischem Kasein wird dieses durch Zugabe von Mineralsäuren (Salz- oder Schwefelsäure) zur Milch gefällt. Dabei entsteht eine besondere Art von Sauermolke, die Kaseinmolke oder technische Molke [5]. Der häufigste Typ ist die Süßmolke, die in dieser Arbeit ausschließlich behandelt wird. Die Bedeutung der technischen Molke ist zu vernachlässigen.

2.1.1 Zusammensetzung von Molke

Eine Reihe von Veröffentlichungen beschäftigt sich mit der Zusammensetzung von Molke und Molkenprodukten [6, 7] und auch mit den saisonalen Schwankungen dieser Zusammensetzung [8]. Süßmolke besteht zu über 93% aus Wasser. Der Gesamtanteil an Feststoffen (Trockenmassegehalt) beträgt ca. 6,6%, wobei die Schwankungen, abhängig von der hergestellten Käsesorte, im Bereich von wenigen Promille liegen. Die Trockenmasse besteht zu einem großen Teil aus Milchzucker (Lactose) sowie zu geringeren Anteilen aus Proteinen, anorganischen Salzen (Asche) und Fett. Abbildung 1 zeigt die typische Zusammensetzung des

Feststoffanteils von Süßmolke. Der pH-Wert von Süßmolke liegt normalerweise bei > 6 , kann aber auch darunter liegen, was besonders im Sommer auftritt. Die Salze bestehen im Wesentlichen aus den Kationen Kalium, Natrium und Calcium, sowie aus den Anionen Citrat und Chlorid. Neben den Vitaminen B₁ und C enthält Molke eine hohe Konzentration an Vitamin B₂ (Riboflavin), welches der Molke ihre charakteristische gelbe Farbe verleiht.

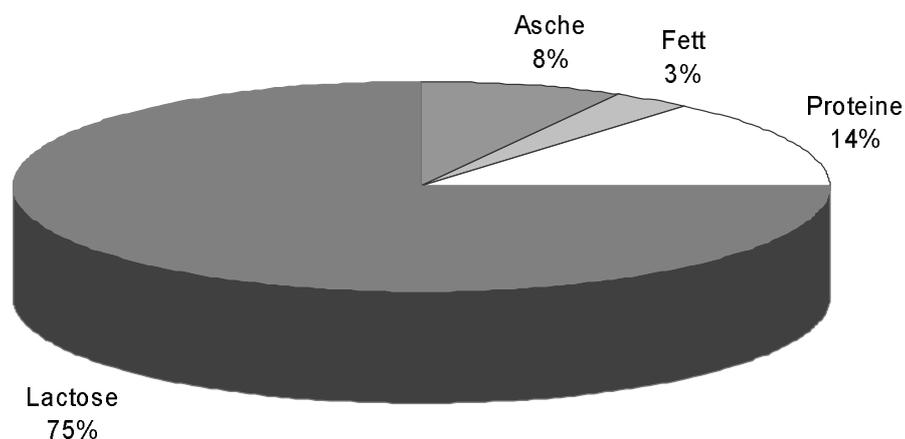


Abbildung 1: Typische Zusammensetzung von Molkenfeststoffen [8]

Molke zeigt neben den erwähnten Schwankungen des pH-Wertes auch Variationen der Konzentrationen der Hauptbestandteile über das Jahr. So zeigte sich in einer Untersuchung von Molkenproben, dass der Proteingehalt der analysierten Molken im späten Frühjahr am geringsten (12,9%) und im Herbst am größten (15,7%) war [8].

2.1.2 Verarbeitung von Molke

Aus Molke werden neben dem einfachen Trocknungsprodukt Molkenpulver, welches überwiegend in der Tierversütterung eingesetzt wird, hauptsächlich zwei Produktgruppen gewonnen: Lactose und Molkenproteine. Während die Lactose in reiner Form hergestellt wird, werden die Proteinprodukte in der Regel nur mit Proteingehalten von bis zu 35% geliefert. Um die beiden Hauptbestandteile zu trennen sind verschiedene Verfahren möglich [9]. Bei der Fa. Biolac GmbH werden die Molkenproteine zunächst mittels Ultrafiltration aus dem Molkenkonzentrat

abgetrennt und getrocknet. Die im Permeat verbleibende Lactose wird auskristallisiert und gegebenenfalls weiter aufgereinigt. Eine Reinigung ist für den Einsatz als Tablettenfüllstoff besonders in Hinsicht auf das Riboflavin notwendig, da hier die starke gelb-grüne Färbung als störend empfunden wird. Die folgende Abbildung 2 zeigt schematisch die Weiterverarbeitung des angelieferten Süßmolkenkonzentrats zu den beiden Produktgruppen Lactose und Molkenproteine bei der Fa. Biolac GmbH.

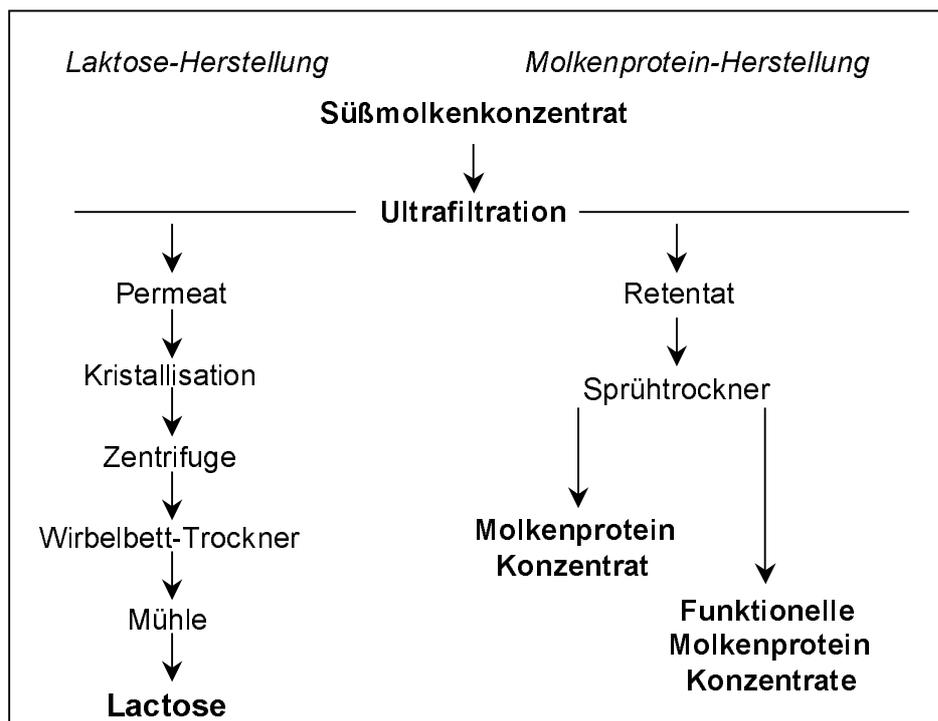


Abbildung 2: Molkenverarbeitung Fa. Biolac GmbH [10]

Im Werk der Fa. Biolac GmbH werden dabei aus ca. 170.000 t Molkenkonzentrat jährlich ca. 30.000 t Lactose und 20.000 t Proteinkonzentrate hergestellt. Bei dieser Verarbeitung des Molkenkonzentrats wurde beobachtet, dass im Molkenkonzentrat vorhandenes Nitrat nahezu vollständig in den Molkenproteinkonzentraten verbleibt [11].

2.1.3 Markt

Der Käseverbrauch in Deutschland, wie auch weltweit, steigt seit Jahren kontinuierlich an. Damit steigt zwangsläufig das Aufkommen an Molke, dem Koppelprodukt der Käseherstellung. Eine Trendwende ist hierbei nicht in Sicht. Abbildung 3 verdeutlicht diese Entwicklung.

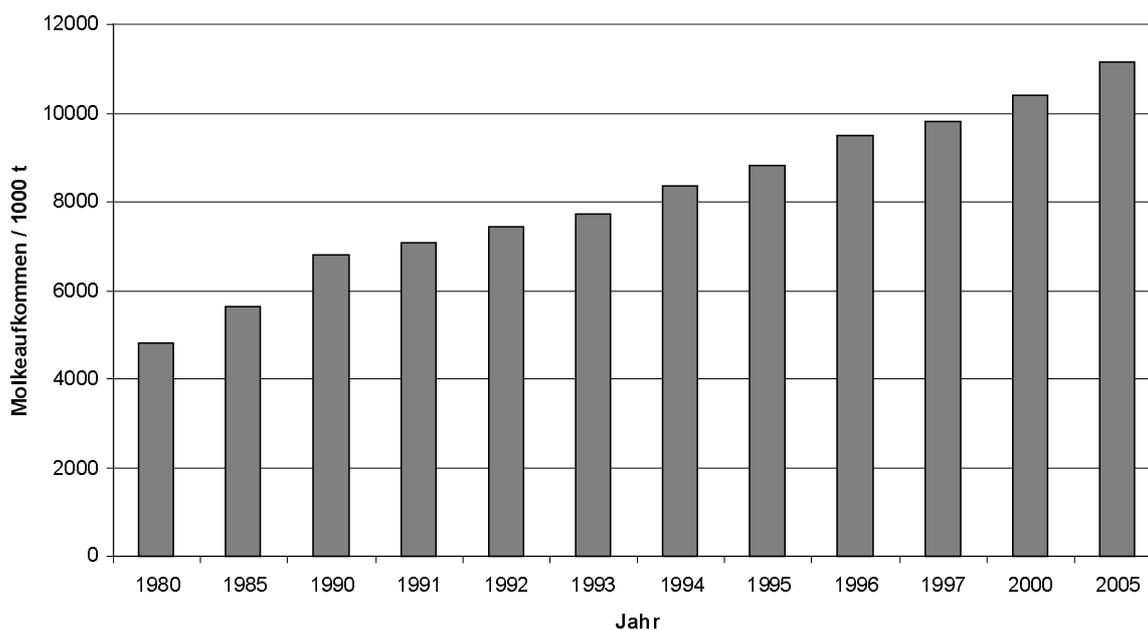


Abbildung 3: Molkeaufkommen in Deutschland (2005 geschätzt) [12]

Die milchverarbeitende Industrie stellt einen bedeutenden Markt in Deutschland dar. So betrug der Gesamtumsatz im Jahre 2002 von deutschen Molkereien, Käseereien und anderen milchindustriellen Betrieben 19,2 Milliarden Euro [13]. In der folgenden Tabelle 1 sind einige relevante Daten der Milch- und Molkenindustrie in Europa und der Europäischen Union aufgeführt.

Tabelle 1: Marktdaten Milch- und Molkenindustrie in Deutschland und EU [13]

		1998	1999	2000	2001	2002
Milcherzeugung / 1000 t	D	28378	28334	28332	28191	28900
	EU	k. A.	114996	114886	115510	115873
Käseerzeugung / 1000 t	D	1709	1705	1804	1885	1885
	EU	k. A.	6953	7154	7389	7454
Käseverbrauch pro Kopf / kg	D	20,6	20,7	21,2	21,5	21,7
	EU	k. A.	17,9	18,3	18,8	19,0
Molkenanfall / 1000 t	D	10430	10310	11600	12000	11850
	EU	53650	54760	56550	57350	56950
Molkenpulvererzeugung / 1000 t	D	203	196	228	236	250
	EU	1320	1355	1420	1460	1465
Lactoseerzeugung / 1000 t	D	78	80	86	92	96
	EU	340	320	340	350	350

Die Molkengewinnung entspricht sowohl in der EU als auch in den USA, die nach der Europäischen Union der wichtigste Molkenproduzent sind, etwa der Hälfte der an die Molkereien gelieferten Milch. Der größte Teil der anfallenden Molke wird durch einfache Trocknung zu Molkenpulver verarbeitet, welches zu ca. zwei Dritteln in Form von Milchaustauschern in der Tierfütterung eingesetzt wird. Die Verfütterung hat seit 1988 aufgrund von Verknappungen bei Magermilchpulver stark zugenommen. Allerdings ist seit 2002 ein Rückgang zu verzeichnen, da die für die Verfütterung zur Verfügung stehenden Mengen an Magermilchpulver zunehmen. Dieses hat die Marktpreise stark beeinflusst, wie Abbildung 4 zeigt.

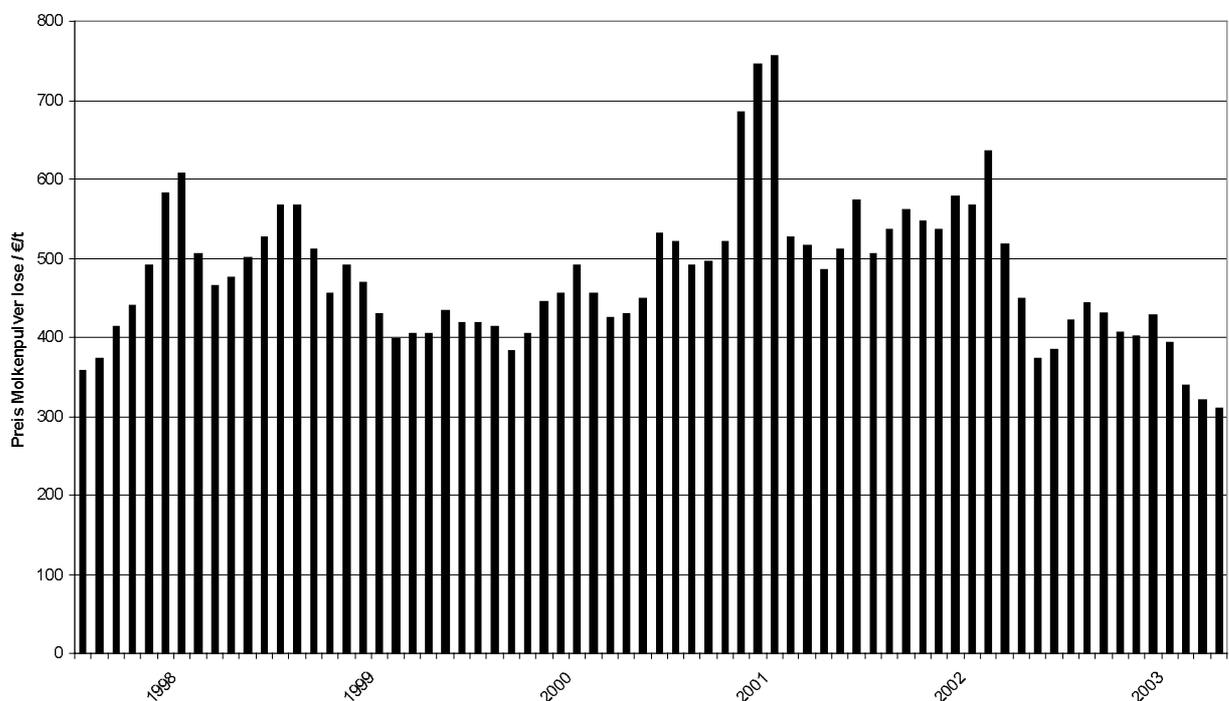


Abbildung 4: Entwicklung der Marktpreise für Molkenpulver in Deutschland, Bulkware [13]

Es ist eine große Schwankungsbreite für die Preise des einfachsten Molkenprodukts zu erkennen. Vom Maximum Anfang des Jahres 2001 fand bis zum April des Jahres 2003 ein Preisverfall von 59% statt. Dieser Preisdruck erhöht für die molkeverarbeitende Industrie die Notwendigkeit, entsprechend veredelte Produkte in anderen, höherpreisigen Marktsegmenten zu platzieren. So werden in den Vereinigten Staaten nach Angaben des American Dairy Products Institute bereits über 40% des Molkenpulvers in der Lebensmittelindustrie eingesetzt [13]. Im internationalen Handel nehmen besonders Importeure mit schnell wachsender Nachfrage nach Eiscreme und Säuglingsnahrung wie China, Japan und Korea eine

bedeutende Stellung ein. Speziell in dem Wachstumsmarkt Säuglingsnahrung können mit nitratfreien Molkenprodukten deutliche Wettbewerbsvorteile erreicht werden. In den folgenden Abschnitten wird deshalb darauf eingegangen, weshalb Nitrat besonders für Kleinkinder ein gesundheitliches Risiko darstellt und wie die Kontamination der Molke mit Nitrat erfolgt. Zudem wird der Stand der Technik bei der Nitratentfernung dargestellt.

2.2 Nitrat

Nitrat ist in der Umwelt weit verbreitet, wobei es sowohl im Grundwasser als auch in Pflanzen zu finden ist [14]. Pflanzen nehmen Nitrat über ihre Wurzeln als Stickstoffquelle auf, weshalb es in der Landwirtschaft in Form von Kunstdünger oder als organischer Dünger ausgebracht wird. Dieses kann bei Überdüngung zu einer Anreicherung von Nitrat im Grundwasser führen.

2.2.1 Gesundheitliche Aspekte

Nitrat besitzt keine nennenswerte Primärtoxizität. Die letale Dosis (LD_{50}) oral für Ratten liegt bei 2000 mg/kg (KNO_3). Nitrat kann allerdings auf verschiedene Weisen zu Nitrit reduziert werden, welches als toxisch eingestuft ist [15]. Die Reduktion erfolgt beispielsweise direkt im nitrathaltigen Lebensmittel durch Bakterien, wenn die Keimzahl bei der Aufbewahrung $10^7 / g_{\text{Speise}}$ übersteigt. Die Umwandlung kann aber auch durch Entzündungen im Darm- oder Harntrakt erfolgen, weshalb besonders dyspeptische Säuglinge gefährdet sind. Letztlich ist auch eine enzymatische Reduktion des Nitrats in geringeren Mengen schon im Speichel möglich.

Das gebildete Nitrit kann mit sekundären Aminen im Magen-/Darmtrakt zu Nitrosaminen reagieren, die als krebserregend bekannt sind. Von 300 untersuchten N-Nitrosoverbindungen ($R_2-N-N=O$) zeigen 90% eine organspezifische Cancerogenität [16]. Eine unmittelbare Gefahr geht aber von dem Oxidationspotential des Nitrats und besonders von hieraus gebildetem Nitrit aus. Durch dieses kann das Eisen im Hämoglobin oxidiert werden. Das so entstehende Methämoglobin ist nicht in der Lage, Sauerstoff zu transportieren. Liegen mehr als 10% des roten Blutfarbstoffs in der oxidierten Form vor, äußert sich dieses durch Cyanose, Tachycardie und Kurzatmigkeit oder Cephalgien mit möglicher Todesfolge [15]. Während bei Erwachsenen die Aufnahme von ca. 500 mg Nitrit für das

Auftreten einer Methämoglobinämie notwendig sind, reichen bei Säuglingen eventuell wenige Milligramm aus. Neben dem geringeren Körpergewicht spielen dabei zwei Gründe eine Rolle: Zum einen wird das Hämoglobin des fetalen Blutes doppelt so schnell oxidiert wie bei Erwachsenen, zum anderen ist der enzymatische Schutzmechanismus des Säuglings noch nicht voll ausgebildet. Die Aktivität des NADH-abhängigen Enzyms Diaphorase in den Erythrocyten des Säuglings, das für die Reduktion des Methämoglobins zu Hämoglobin verantwortlich ist, ist deutlich geringer als bei Erwachsenen.

Aufgrund dieses Gefährdungspotentials des Nitrats wurden verschiedene Grenzwerte festgelegt. So schreibt die Trinkwasserverordnung einen Grenzwert von 50 mg/L vor [17], doch wird als Richtwert eine Obergrenze von 25 mg/L Nitrat für Trinkwasser empfohlen. Für die Herstellung von Säuglingsnahrung wird eine Obergrenze von nur 10 mg/L vorgeschrieben, unterhalb der Lebensmittel als nitratfrei gelten [1].

2.2.2 Nitrat in Molke

Ein Problem bei der Käseherstellung stellt die sogenannte Spätblähung dar. Bei diesem auch Buttersäure-Gärung genannten Fermentationsfehler wird durch Mikroorganismen während der Käsereifung Milchsäure in Buttersäure, Kohlendioxid und Wasserstoff umgewandelt [18]. Tritt dieser Prozess auf, so wird die betroffene Käse-Charge unbrauchbar. Die Spätgärung wird durch *Clostridium butyrium* und *C. tyrobutyricum* ausgelöst. Diese Mikroorganismen können nicht durch Pasteurisierung abgetötet werden, da sie in Form von hitzeresistenten Sporen vorliegen können [19]. Sie können allerdings effektiv durch die Zugabe von Kaliumnitrat zur Käsereimilch gehemmt werden, ohne dass dadurch auch das Wachstum der Milchsäurebakterien, das im Käse gewünscht ist, inhibiert wird. Aus diesem Grund ist es in vielen Ländern noch zulässig, der Käsereimilch bis zu 0,15 g Salpeter pro Liter Milch zuzusetzen [1]. Da Kaliumnitrat gut wasserlöslich ist, verbleibt der eingesetzte Salpeter nach der Käseherstellung im Wesentlichen nicht im Käse, sondern in der flüssigen Molke. In dieser konnten im Rahmen dieser Arbeit Nitratkonzentrationen von bis zu 60 mg/L nachgewiesen werden, doch kann dieser Wert auch noch überschritten werden [20]. Im verkaufsfertigen, pulverigen Produkt liegen diese Konzentrationen selbstverständlich deutlich höher, bereits in dem in dieser Arbeit verwendeten Molkenkonzentrat wurden Nitratkonzentrationen von 300 mg/L gemessen.

2.2.3 Nitratbreicherung

Durch Online-Recherchen wurden zahlreiche Literaturstellen mit dem Stichwort „nitrate removal“ gefunden [21], jedoch handelte es sich hierbei zumeist um Artikel, die den Nitratabbau in Wasser behandelten, sei es Grund-, Trink- oder Abwasser. Um die Suche weiter einzuengen, wurden als zusätzliche Suchbegriffe „vegetab*“ (Gemüsesäfte), „food*“ (Lebensmittel) bzw. „whey“ (Molke) eingegeben. Insgesamt wurden hierdurch vier Ergebnisse geliefert, die sich allerdings auch alle auf die Nitratbreicherung in Wasser bezogen.

Eine Patentrecherche für den Suchbegriff „nitrate removal“ erbrachte 88 Treffer [22], die sich erneut im Wesentlichen auf die Nitratbreicherung von Wasser und einige Spezialanwendungen bezogen. Wurden die Stichworte „nitrate“ und „food“ verwendet, so ergaben sich vier Treffer, von denen sich drei mit der Nitratanalytik in Lebensmitteln beschäftigen. Ein japanisches Patent [23] beschreibt die Nitratbreicherung in Futtermitteln und pflanzlichen Nahrungsmitteln. Hiernach werden die Lebensmittel direkt mit Hefen des Typs *Pichia* versetzt, was zu einer Entfernung des Nitrats führt.

Mehrere Veröffentlichungen [24 - 30] der Arbeitsgruppe von Professor Schubert, Karlsruhe, beschäftigen sich mit dem mikrobiellen Nitratabbau in flüssigen Lebensmitteln. In diesen Artikeln wird die Nitratreduktion mittels *P. denitrificans DSM 65* beschrieben. Die meisten beschriebenen Experimente wurden dabei allerdings nicht in flüssigen Lebensmitteln, sondern in Modelllösungen, die neben Kaliumnitrat noch Phosphat-Puffer sowie Glucose bzw. Zucker-Mischungen enthielten, durchgeführt. Wurden reale Lebensmittel verwendet, so handelte es sich in der Regel um Karottensaft-Ultrafiltrat.

Von Schubert et al. wurden zwei Methoden untersucht, um Biokatalysator und Fluid zu trennen: die Immobilisierung mittels Geleinschluss und die Verwendung von Kapillarmembran-Reaktoren. Beide Verfahren sind offensichtlich zur Nitratbreicherung in Modelllösungen und Karottensaft-Ultrafiltrat im Labormaßstab geeignet. Die Eignung von Kapillarmembran-Reaktoren für die Denitrifikation von Lebensmitteln, die hohe Feststoffanteile aufweisen, ist allerdings aufgrund der Verblockungsgefahr nicht wahrscheinlich.

Technisch deutlich fortgeschritten ist die Nitratentfernung aus Trinkwasser, hierzu existieren eine Vielzahl von Arbeiten und auch großtechnische Anlagen. Die Möglichkeiten werden im Folgenden kurz zusammengefasst [31, 32].

Beim Umkehrosmoseverfahren wird das Rohwasser unter hohem Druck durch semipermeable Membranwände gepresst, die einen Großteil der gelösten Inhaltsstoffe zurückhalten. Auf diese Weise entsteht vollentsalztes Wasser auf der einen Seite der Membran und eine stark salzhaltige Lauge auf der anderen Seite. Dieses Verfahren ist damit nicht für die Nitratentfernung aus flüssigen Lebensmitteln geeignet, da auch alle anderen Molkenbestandteile entfernt würden.

In Abwandlung dazu wandern die gelösten Ionen beim Elektrodialyseverfahren unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes durch Ionentauschermembranen. Die Anwendbarkeit dieses Verfahrens auf Molke ist zweifelhaft, da auch die in der Molke enthaltenen Proteine mit elektrischen Ladungen behaftet sind. Auch ist es wahrscheinlich, dass die Membranen durch den Kontakt mit Molkenkonzentrat, welches einen hohen Anteil von organischen Feststoffen aufweist, sofort verblocken (fouling). Zudem handelt es sich um ein sehr kostenintensives Verfahren, das bisher auch in der Abwasseraufbereitung keine großtechnische Anwendung findet.

Die chemische Denitrifizierung erfolgt durch Zugabe eines 15fachen Überschusses von Eisen(II)hydroxid. Nitrat wird dabei zu Ammoniak reduziert, welches durch Einblasen von Luft ausgetrieben werden muss. Zudem entstehen große Mengen Eisenschlamm, dessen Entfernung Probleme bereitet. Für den Einsatz in flüssigen Lebensmitteln ist ein solches Verfahren deshalb nicht geeignet.

Bei der katalytischen Denitrifizierung reduzieren Palladium/Aluminium-Katalysatoren das Nitrat in Gegenwart von Wasserstoff zu Stickstoff und Ammoniak. Es wurden dabei weitaus höhere Aktivitäten gemessen als bei der mikrobiellen Denitrifizierung. Auch die Reaktionstemperaturen lagen mit 10 °C in einem günstigen Bereich [33], da bei dieser Temperatur keine starke Vermehrung von Mikroorganismen in der Molke zu erwarten wäre. Das Verfahren befindet sich allerdings noch im Entwicklungsstadium, und über die Langzeitstabilität der Katalysatoren ist noch wenig bekannt. Weiterhin ist eine Immobilisierung des Katalysators notwendig. So wurde der heterogene Katalysator beispielsweise in eine mikroporöse Membran eingebunden [34]. Dieses Verfahren ist im vorliegenden Fall nicht geeignet, da ein Durchströmen einer Katalyse-Membran mit Molkenkonzentrat zu einem Verblocken dieser Membran führen kann.

Im Anionenaustauschverfahren werden Nitrat- und Sulfat-Ionen mittels kugelförmiger, stark basischer Anionenaustauscherharze gegen Chlorid- oder Hydrogencarbonat-Ionen ausgetauscht. Nach Erschöpfung der Kapazität des

Austauschers muss dieser mit konzentrierten Kochsalz- bzw. Natriumhydrogencarbonat-Lösungen regeneriert werden. Dieses führt zu hohen Salzfrachten, die im Vorfluter entsorgt werden müssen. Es wurde aber auch schon Meerwasser als alternativer Eluent diskutiert [35]. In der Trinkwasseraufbereitung ist der Ionenaustausch ein etablierter Prozess. Im Jahr 1992 waren allein in den Vereinigten Staaten 15 großtechnische Anlagen im Betrieb. Eine Abwandlung dieses Verfahrens stellt ein von Kreevoy et al. angemeldetes Patent [36] dar. Die Nitrat-Ionen werden hierbei von in einer Membran gelösten sekundären Aminen gebunden. Der Transport erfolgt durch die Wanderung von Gegenionen, z.B. Protonen, die durch einen hohen pH-Wert auf der anderen Seite der Membran zu einem Durchtritt gezwungen werden.

Die biologische Denitrifikation ist weit verbreitet in der Abwasseraufbereitung in Kläranlagen. Nitrat wird hier unter anaeroben Bedingungen von denitrifizierenden Bakterien-Mischkulturen über mehrere Zwischenstufen zu elementarem Stickstoff reduziert. Die Umsetzung dieser Technologie zur Trinkwasseraufbereitung erfolgt allerdings nur zögernd, da Bedenken bezüglich der Kontaminierung des Trinkwassers durch Bakterien oder organischen Rückständen bestehen. Seit ca. 15 Jahren werden in Europa einige Testanlagen, auch großtechnischen Maßstabs, betrieben, in denen die Mikroorganismen in Festbettreaktoren, z.B. auf Styroporkugeln oder Aktivkohle, angesiedelt werden.

Eine Kombination von Ionenaustausch und biologischer Denitrifikation umgeht die wesentlichen Nachteile der beiden einzelnen Verfahren. Durch die mikrobielle Behandlung des Eluats aus dem Ionenaustauschverfahren kommt das behandelte Wasser nicht mit den Mikroorganismen in Kontakt. In Versuchen konnte zudem eine 95%ige Reduktion der zu entsorgenden Salzlauge erreicht werden. Es wurden dabei Salzkonzentrationen von 10 bis 30 g/L verwendet. Das kombinierte Verfahren zur Trinkwasseraufbereitung soll in den USA in einer mobilen Testanlage verwirklicht werden. Eine großtechnische Anwendung ist zur Zeit nicht vorhanden.

Ein neuer Ansatzpunkt ist die Kombination von Ionenaustausch und katalytischer Denitrifikation [37]. Das Eluat aus dem Ionenaustausch mit einer maximalen Salzkonzentration von 10 g/L wird in einem mit Pd-Cu/ γ -Al₂O₃-Katalysator gefüllten Festbettreaktor denitrifiziert. Dieses Verfahren wurde bisher nur im Labormaßstab durchgeführt. Eine Elution mit diesen, gegenüber den üblichen 50 bis 100 g/L

geringen Salzkonzentrationen verlängert zudem die Dauer dieses Prozessschrittes enorm.

Von den zuvor beschriebenen Verfahren zur Nitratbereicherung in Trinkwasser werden zwei in dieser Arbeit bezüglich der Denitrifikation von Molke untersucht. Die beiden Verfahren, der Anionenaustausch und die mikrobielle Denitrifikation werden in den folgenden Kapiteln näher beschrieben.

2.3 Ionenaustausch

Unter Ionenaustausch versteht man den wechselseitigen Übergang von Anionen oder Kationen zwischen zwei Phasen eines heterogenen Systems. Im vorliegenden Fall wird die stationäre Phase durch ein kugelförmiges Ionenaustauscherharz gebildet, dessen Basisstruktur aus copolymerisiertem Styrol und Divinylbenzol besteht. An dieses Gerüst sind Festionen gebunden, nach deren Beschaffenheit die Ionenaustauscher in basische, saure und amphotere Harze eingeteilt werden. Weiterhin erfolgt durch die Art des Festions eine Unterscheidung in schwach beziehungsweise stark saure oder basische Ionenaustauscher. In der vorliegenden Arbeit werden ausschließlich stark basische Harze eingesetzt. Bei diesen Harzen bestehen die Festionen aus quartären Aminen, die im einsatzbereiten Zustand in der Regel mit Chlorid als Gegenionen beladen sind. Diese quartären Amine weisen eine Affinitätsreihenfolge $\text{SO}_4^{2-} > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^-$ gegenüber möglichen Gegenionen auf. Aufgrund der größeren Affinität zu Sulfat und Nitrat gegenüber Chlorid, mit dem sie ursprünglich beladen sind, geben die stark basischen Ionenaustauscher Chlorid an eine mobile Phase ab, wobei sie eine stöchiometrische Menge Sulfat- oder Nitrat-Ionen aus der mobilen Phase aufnehmen. Da eine Entfernung von Sulfat in der vorliegenden Arbeit nicht gewünscht ist, weil sie zu einer Verringerung der Aufnahmekapazität des Harzes für Nitrat führt, werden hier spezielle, Nitrat-hochspezifische Ionenaustauscher eingesetzt. Diese zeichnen sich durch längere Kohlenstoffreste, z. B. Butylgruppen, an den quartären Aminen aus, was die normale Affinitätsreihenfolge gegenüber Anionen zu $\text{NO}_3^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^-$ verändert. Dieser Effekt wird durch die sterische Hinderung erreicht, die auftritt, wenn ein zweifach geladenes Sulfation durch zwei einfach geladene Festionen gebunden werden muss.

Die Anzahl der Festionen in einer gegebenen Menge Harz ist beschränkt, was dazu führt, dass die Aufnahmekapazität des Ionenaustauschers für Nitrat-Ionen endlich ist.

Ist die Kapazität erschöpft, so steigt die Nitratkonzentration am Ablauf kontinuierlich, bis sie letztlich mit der am Zulauf identisch ist. Überschreitet die Konzentration am Ablauf einen festgelegten Grenzwert, muss das Harz regeneriert werden. Dieses erfolgt in der Regel mittels einer konzentrierten Kochsalz-Lösung. Die Austauschreaktion, deren Gleichgewicht normalerweise auf Seiten der Nitratbindung liegt, wird durch die hohe Chloridkonzentration im Eluenten umgekehrt. So werden die gebundenen Nitrat-Ionen an die mobile Phase abgegeben und mit dem Eluenten aus dem System entfernt. Die Festionen hingegen werden erneut mit Chlorid-Ionen beladen. Nachdem alle Nitrat-Ionen vom Anionenaustauscherharz entfernt wurden, steht dieses in einem weiteren Zyklus erneut zur Nitratabreicherung zur Verfügung. Die Nitratkonzentration im Eluat weist ein ausgeprägtes Tailing auf. Da sich hierdurch ein Großteil des Nitrats im ersten Teil des für eine vollständige Regenerierung benötigten Eluenten findet, ist gegebenenfalls eine Teilelution ökonomisch sinnvoll [38]. Hierbei wird das Nitrat nur teilweise vom Chromatographiematerial entfernt, wodurch zwar der folgende Beladungszyklus bis zum Nitratdurchbruch verkürzt wird, aber der Regenerationsaufwand deutlich verringert wird.

2.4 Biologische Denitrifikation

Im Falle der biologischen Denitrifikation erfolgt die Nitratentfernung mit Hilfe von Mikroorganismen. Man unterscheidet assimilatorische und dissimilatorische Denitrifikation. Verschiedene Algen, Pilze und Bakterien können Nitrat als Stickstoffquelle für den Aufbau ihrer Zellsubstanz nutzen und sind somit als assimilatorische Denitrifizierer zu bezeichnen.

Eine Reihe von Mikroorganismen sind in der Lage, bei Abwesenheit von Sauerstoff andere anorganische Elektronenakzeptoren wie zum Beispiel Nitrat, Sulfat oder Eisen(III)-Ionen für die Energiegewinnung zu nutzen [39]. Ein wichtiges Beispiel für einen solchen anaeroben Atmungsprozess ist die dissimilatorische Denitrifikation. Die biologische Umwandlung von Nitrat in molekularen Stickstoff spielt eine bedeutende Rolle im Stickstoffkreislauf der Natur und findet Anwendung in der Behandlung von Abwässern [1]. Beispiele für denitrifizierende Bakterien sind *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Thiobacillus denitrificans* oder der hier verwendete *P. denitrificans* [1].

Die Denitrifikation ist ein enzymkatalysierter Prozess, bei dem Elektronen von einem geeigneten Donor auf den Nitrat-Stickstoff übertragen werden, so dass dieser schrittweise über Nitrit und Stickstoffoxide bis zur Oxidationsstufe 0 reduziert wird [40, 41]. In Abbildung 5 sind schematisch die Schritte der Denitrifikation durch *P. denitrificans* mit den daran beteiligten Enzymen dargestellt [42].

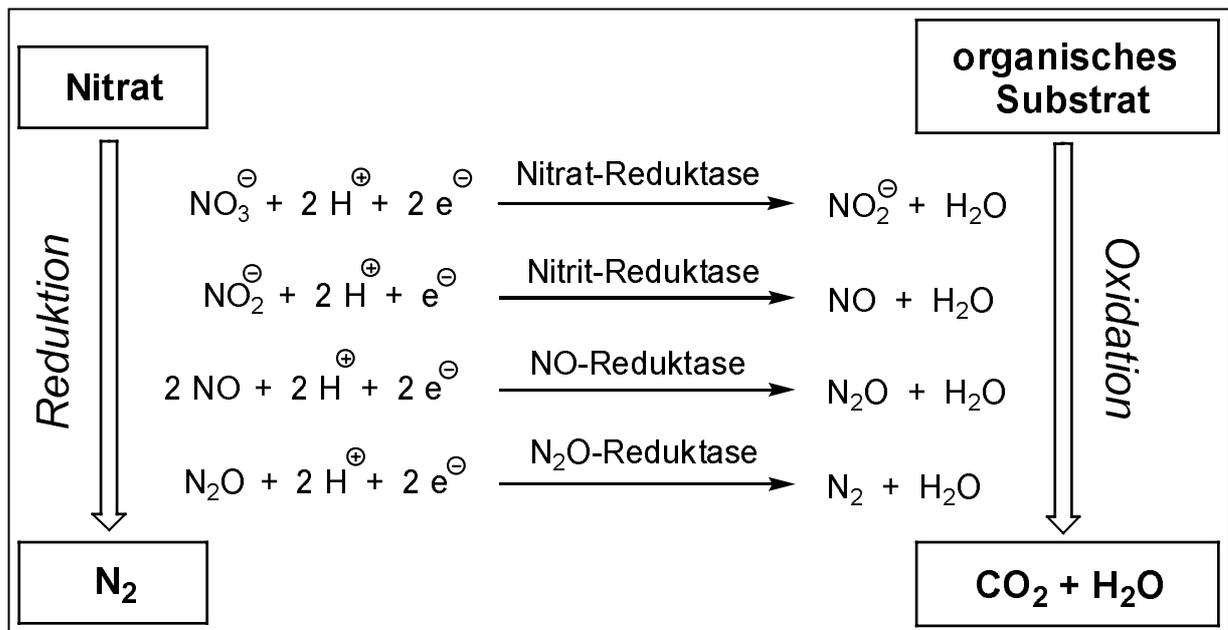
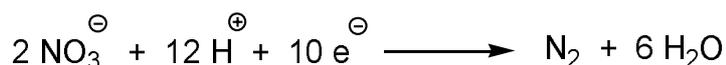


Abbildung 5: Schematischer Verlauf der mikrobiellen Nitratreduktion [40]

Aus den Reaktionsgleichungen für die Teilschritte ergibt sich als Gesamtgleichung für die Reduktion von Nitrat zu molekularem Stickstoff:



Wie aus dieser Reaktionsgleichung hervorgeht, werden bei der Reaktion 6 mol Protonen für die Reduktion eines Mols Nitrat verbraucht. Die Folge ist ein Anstieg des pH-Wertes im Verlauf der Denitrifikation, sofern die Reaktionslösung nicht über eine ausreichende Pufferkapazität verfügt.

Das im ersten Reduktionsschritt gebildete Nitrit kann unter ungünstigen Reaktionsbedingungen akkumulieren, wenn die Denitrifikation nur unvollständig abläuft, was vor allem bei Abweichungen vom optimalen pH-Bereich der Fall ist [43, 44]. Nitrit kann toxisch für die Mikroorganismen sein. Besonders ist aber im Hinblick auf die lebensmitteltechnische Anwendung des Verfahrens auf einen vollständigen Abbau dieses Zwischenproduktes zu achten, um nicht eine gesundheitlich bedenkliche Substanz durch eine giftige zu ersetzen.

Die theoretischen Grundlagen des bakteriellen Wachstums sowie der Bestimmung der Zelldichte durch Trübungsmessungen sind im Anhang beschrieben.

2.4.1 *Paracoccus denitrificans* und *Paracoccus pantotrophus*

P. denitrificans wurde 1910 zum ersten Mal von Beijerinck und Minkmann aus Gartenerde isoliert [45]. Die gramnegativen Bakterien treten entweder kugelförmig (Durchmesser: 1,1 – 1,3 μm) oder als kurzes Stäbchen (Länge: 0,9 – 1,2 μm) auf [2, 45] und sind vor allem im Boden sowie in Klärschlamm zu finden [46]. Dieser vielseitige Organismus ist fakultativ anaerob und kann somit sowohl molekularen Sauerstoff als auch Nitrat, Nitrit oder Distickstoffmonoxid als terminalen Elektronenakzeptor für die Energiegewinnung nutzen. Außerdem sind die Bakterien fakultativ autotroph [99], das heißt, neben verschiedenen organischen Substanzen kann ihnen auch Kohlendioxid als Quelle für den Zellkohlenstoff dienen. Wegen seiner Befähigung zur Oxidation von molekularem Wasserstoff zählt *P. denitrificans* zu den sogenannten Knallgasbakterien.

P. denitrificans ist sowohl zu aeroben als auch zu anaerobem Wachstum fähig. Die folgende Abbildung 6 zeigt den Transport der Elektronen und den daraus resultierenden chemiosmotischen Gradienten über der Cytoplasmamembran unter anaeroben und aeroben Bedingungen in *P. denitrificans* [47]. Im Falle des aeroben Wachstums beginnt der Elektronentransport bei der NADH- und Succinat-Dehydrogenase. Die Elektronen werden über Ubiquinon, den bc_1 -Komplex und Cytochrom c_{550}/c_{552} zur terminalen Cytochrom aa_3 -Typ-Oxidase weitergeleitet. Ein alternativer Weg zweigt beim Ubiquinon ab und überträgt die Elektronen zur Cytochrom o -Typ-Oxidase. Über die Regulation und die Steuerung des Elektronenflusses ist nichts bekannt [47]. Bei anaeroben Wachstum beginnt der Elektronentransport ebenfalls bei der NADH- und Succinat-Dehydrogenase und verläuft über Ubiquinon zur Nitratreduktase. Das Nitrat im Cytoplasma wird zu Nitrit reduziert und über ein Nitrat/Nitrit-Antiporter ins Periplasma transportiert, wo es weiter bis zum molekularem Stickstoff reduziert werden kann.

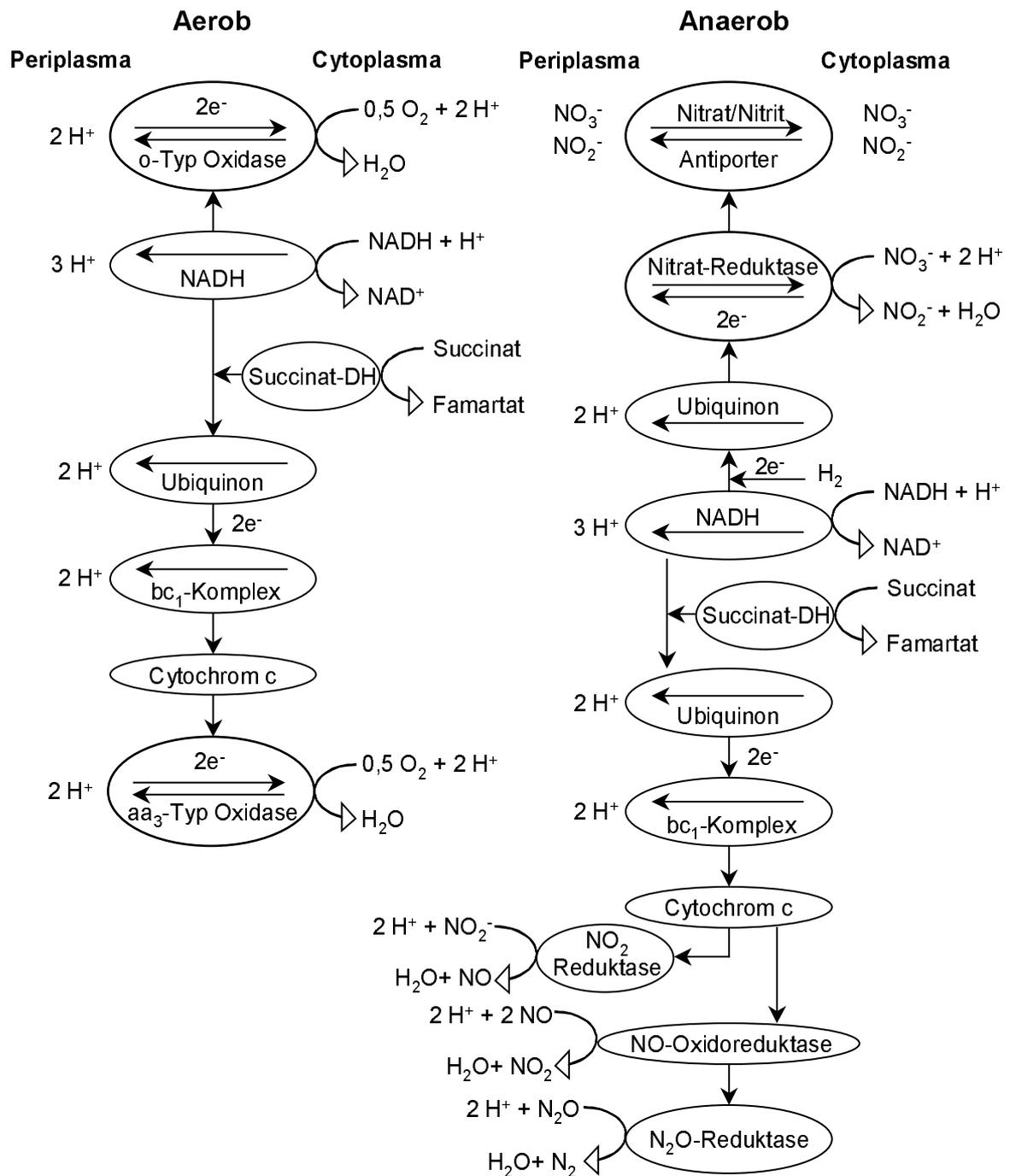
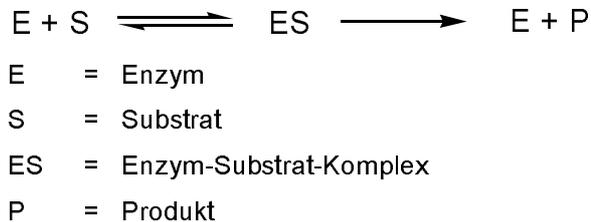


Abbildung 6: Elektronentransport in *P. denitrificans* (nach [48])

2.4.2 Grundlagen der Enzymkinetik

In dieser Arbeit wurde die Kinetik der mikrobiellen Denitrifikation durch *P. denitrificans* untersucht, um einen industriellen Prozess auslegen zu können. Da es sich bei der Denitrifikation um einen enzymkatalysierten Prozess handelt, wird im Folgenden auf die Grundlagen der Enzymkinetik eingegangen.

Das Michaelis-Menten-Modell bildet die Grundlage für die Beschreibung der Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen. Es wird davon ausgegangen, dass Enzym und Substrat einen Komplex bilden, der nach der folgenden Gleichung in Enzym und Produkt abreagiert:



Nimmt man einen stationären Zustand an

$$\left(\frac{d[ES]}{dt} = 0 \right)$$

so erhält man die folgende Beziehung [99]:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = v_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad \text{(Gleichung 1)}$$

- v = Reaktionsgeschwindigkeit
 v_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit
 [P] = Produktkonzentration
 [S] = Substratkonzentration
 K_m = Michaelis-Menten-Konstante

Die Michaelis-Menten-Konstante K_m beschreibt diejenige Substratkonzentration, bei der die Hälfte des Biokatalysators mit Substrat gesättigt ist, so dass die Reaktion mit der halbmaximalen Geschwindigkeit abläuft. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} wird dagegen erst bei vollständiger Sättigung des Enzyms erreicht. Die Michaelis-Menten-Konstante ist charakteristisch für die Wechselwirkung eines gegebenen Enzyms mit einem speziellen Substrat.

Für die obige Gleichung lassen sich zwei Grenzfälle betrachten. Liegt eine hohe Substratkonzentration vor, so kann K_m gegenüber [S] vernachlässigt werden, und das Geschwindigkeitsgesetz entspricht dem einer Reaktion nach einer Kinetik nullter Ordnung:

$$v \approx v_{\max} \quad \text{(Gleichung 2)}$$

Im zweiten Grenzfall ist die Konzentration an Substrat dagegen so gering, dass sie gegenüber der Michaelis-Konstante vernachlässigt werden kann. Die Reaktion

verläuft dann näherungsweise nach einer Kinetik erster Ordnung bezüglich des Substrats:

$$v = \frac{v_{\max}}{K_m} \cdot [S] \quad \text{(Gleichung 3)}$$

Zur Ermittlung der enzymkinetischen Parameter erfolgt die Umstellung der Geschwindigkeitsgleichung nach Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad \text{(Gleichung 4)}$$

Durch Auftragung der reziproken Reaktionsgeschwindigkeit gegen die reziproke Substratkonzentration, wie in der folgenden Abbildung 7 dargestellt, erhält man als Schnittpunkte mit Ordinate und Abszisse die Parameter der Michaelis-Menten-Kinetik.

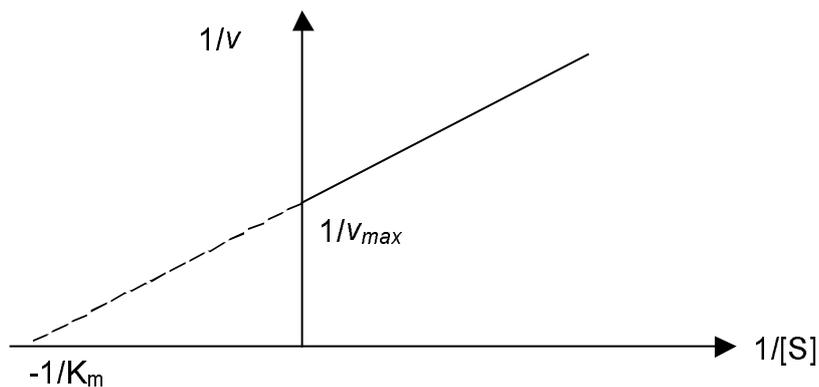


Abbildung 7: Auftragung zur Ermittlung der enzymkinetischen Parameter nach Lineweaver-Burk [49]

3 Nitrat- und Nitritanalytik

Es war im Rahmen dieser Arbeit zunächst notwendig, eine schnelle und zuverlässige Nitratanalytik in den verwendeten Medien zu etablieren. Da bei einer biologischen Denitrifikation auch Nitrit als Zwischenprodukt entsteht, musste auch dieses quantitativ nachgewiesen werden können. In wässrigen Lösungen kommen generell mehrere Methoden in Betracht, die allerdings alle einen relativ hohen analytischen Aufwand fordern [50]. Die Normverfahren zur Nitratanalytik sind photometrische Methoden, wobei entweder Farbreaktionen direkt mit Nitrat durchgeführt werden [51], oder Azokupplungen mit Nitrit, das aus Nitrat durch Reduktion über einer Cadmium-Säule gebildet wird [52]. Für Online-Überwachungen, z.B. in Kläranlagen, werden dafür Fließ-Injektions-Analysen-(FIA)-Systeme verwendet [53, 54]. Daneben werden eine Vielzahl von Analysemethoden für Nitrat beschrieben, so die Kapillarelektrophorese [55], die Hochgeschwindigkeits-Flüssigchromatographie [56], Fluoreszenz-basierte Sensoren [57] und Biosensoren [58, 59], deren Anwendbarkeit in Molke und besonders in Molkenkonzentrat aber aufgrund des hohen Anteils an Feststoffen problematisch erscheint. Verschiedene Veröffentlichungen beschreiben die Nitratbestimmung in Milchprodukten [60, 61, 62, 63], in Molkenpulver [64, 65, 66] und in flüssigen Molkenprodukten [67, 68]. Die beschriebenen Analysemethoden zeichnen sich aber durch einen hohen Analysenaufwand, ein großes benötigtes Probevolumen, eine sehr geringe Genauigkeit oder eine sehr hohe untere Nachweisgrenze aus und sind somit schlecht zu implementieren.

3.1 Nitratanalytik mittels Ionenselektiver Elektrode

Eine Methode, die nicht die beschriebenen Nachteile aufweist, ist die Nitratanalyse mittels einer Ionenselektiven Elektrode [69], wie sie für Online-Analysen von wässrigen Medien [70, 71], aber auch für den Nachweis in Medien mit hohem Anteil an organischem Material [72, 73] beschrieben wird. Die Bestimmung des Nitratgehaltes einer Probe erfolgt dabei wahlweise über eine Kalibrationsgerade oder die einfache bzw. doppelte Standardaddition [74]. Eine weitere Möglichkeit ist die Verdünnungsmethode, welche die Nitratbestimmung mit einer Ionenselektiven Elektrode auch in Gegenwart hoher Chloridkonzentrationen ermöglichen soll [75]. Versuche mit einer Nitrat-Elektrode der Fa. Orion (Model 97-07 ionplus®) zeigten jedoch, dass bereits in normaler Molke eine Nitratanalytik mittels der Ionenselektiven

Elektrode nicht möglich ist. Trotz Zugabe verschiedener Zusätze, die laut Herstellerangabe die Ionenstärke verbessern sollten und Störeinflüsse, zum Beispiel durch Chlorid oder organische Substanzen, unterdrücken sollten, war es nicht möglich, durch eines der genannten Verfahren einen sinnvollen oder auch nur reproduzierbaren Wert zu erhalten. Dieses lag darin begründet, dass sich die durch die Elektrode gelieferte Spannung ständig veränderte. Auch eine Wartezeit von 30 Minuten für jeden Messwert, die nicht einem schnellen Analyseverfahren entsprach, lieferte keine konstanten Messwerte. Bei einer Analyse von Molkenkonzentrat, in dem eine hohe Nitratkonzentration von 620 mg/L eingestellt worden war, wurden beispielsweise nach der Methode der doppelten Standardaddition nur 22 mg/L Nitrat nachgewiesen. Andere Versuche nach der Verdünnungsmethode ergaben in Proben, denen 50 mg/L Nitrat zugesetzt wurden, Wiederfindungsraten von 200%. Die Verwendung einer Ionenselektiven Elektrode für die Nitratanalytik in Molke war aus diesen Gründen nicht möglich.

3.2 Reflektometrische Nitrat- und Nitritanalytik

Für den analytischen Fertigtest Reflectoquant[®] der Fa. Merck KGaA wird vom Hersteller angegeben, dass er zur Nitratanalytik in Molke, die einen Feststoffgehalt von $6 \pm 1\%$ aufweist, verwendet werden kann [76]. Das Messprinzip dieses analytischen Fertigtests basiert auf der Reaktion von Nitrit mit einem aromatischen Amin zu dem entsprechenden Diazoniumsalz, welches anschließend mit N-(1-Naphthyl)-ethylenamin eine Azokupplung eingeht. Die Konzentration des dabei gebildeten rotvioletten Farbstoffes auf dem Teststreifen wird reflektometrisch mittels des zugehörigen Reflektometers RQflex[®] der Fa. Merck KGaA bestimmt. Im Fall des Nitrattests wird der Analyt in einem vorgeschalteten Reduktionsschritt zunächst in Nitrit überführt. Enthält die Probe Nitrit, muss dieses vor der Nitratbestimmung durch Zugabe einer 10%igen Lösung von Amidoschwefelsäure zerstört werden (ca. 1 Tropfen je mL Probe), da ansonsten zu hohe Nitratkonzentrationen gemessen werden. Der Messbereich des Nitrattests reicht von 3 bis 90 mg/L, während mit dem Nitrittest Konzentrationen zwischen 0,5 und 25 mg/L bestimmt werden können. Die Reagenzien sind auf Teststreifen aufgebracht, welche in die Analytlösung eingetaucht werden. Das benötigte Probenvolumen betrug standardmäßig 2 mL, konnte aber, wenn nötig, auf etwa 0,2 mL gesenkt werden. Im Falle der Nitratanalytik in Molke muss der erhaltene Messwert laut Herstellerangaben mit einem

Korrekturfaktor von 1,4 multipliziert werden, um die korrekte Nitratkonzentration zu erhalten. Dieses wurde experimentell überprüft, zugleich wurde untersucht, ob das Testsystem Reflectoquant[®] auch zur Nitrit- und Nitratanalytik in anderen in dieser Arbeit verwendeten Medien geeignet ist.

3.2.1 Analytik in Molke

Zur Validierung des vom Hersteller angegebenen Korrekturfaktors zur Nitratanalytik in Molke sowie zur Bestimmung eines Korrekturfaktors für die Messung des Nitritgehaltes in diesem Medium wurden Molkenproben mit einer Trockenmasse von ca. 6%, die aufgrund ihres Herstellungsverfahrens nur mit geringen Nitratkonzentrationen belastet waren, mit verschiedenen Volumina von Nitrat-beziehungsweise Nitritstandards versetzt. Aufgrund der hohen Konzentrationen der Standards und des somit geringen Volumens im Vergleich zum Volumen der Molkenproben kann der Verdünnungseffekt bezüglich der Matrix vernachlässigt werden. Die Proben wurden mittels des jeweiligen Reflectoquant[®]-Systems auf ihren Nitrat- oder Nitritgehalt untersucht. Die erhaltenen Analyseergebnisse wurden gegen die theoretisch berechnete zugesetzte Konzentration aufgetragen. Die folgende Abbildung 8 zeigt diesen Zusammenhang für Nitrat in Molke.

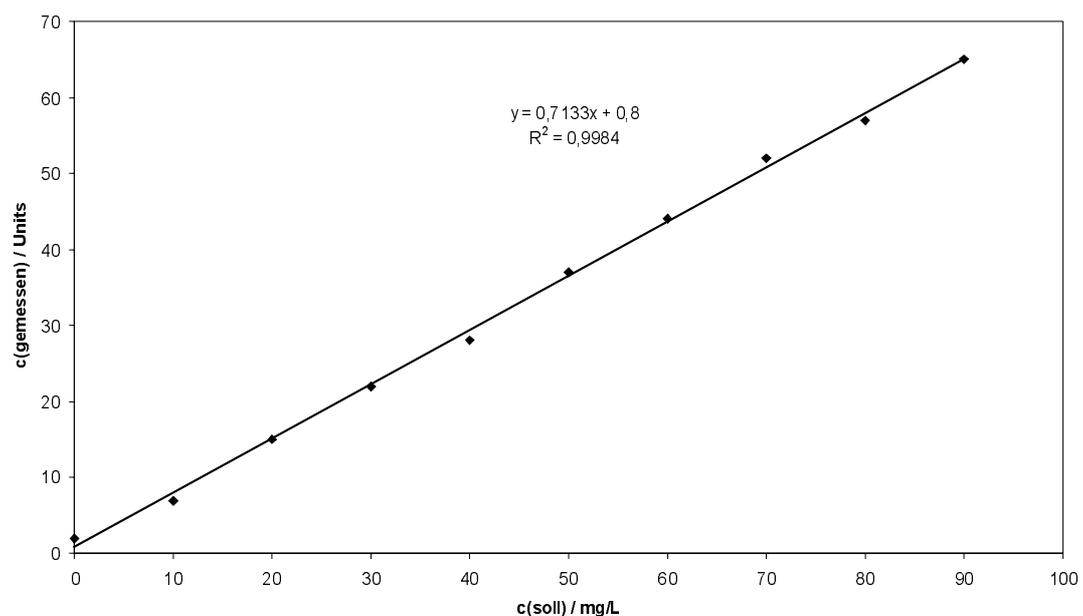


Abbildung 8: Nitratanalytik mit Merck Reflectoquant[®] in Molke (Trockenmasse ca. 6%), RT, pH 6,6

Das Bestimmtheitsmaß R^2 zeigt die Wahrscheinlichkeit für einen linearen Zusammenhang an und beträgt im vorliegenden Fall 0,9984. Es ist deshalb möglich, die Steigung und den Achsenabschnitt der Ausgleichsgerade durch lineare Regression zu bestimmen. Der erhaltene Achsenabschnitt stellt dabei lediglich dar, wieviel Nitrat die Molkenprobe selbst schon enthielt und ist für diese Versuche nicht bedeutsam. Von größerer Aussagekraft ist die Steigung der Geraden. Der reziproke Wert dieser Steigung stellt den Korrekturfaktor dar, mit dem ein mittels des Analysensystems Reflectoquant[®] ermittelter Wert multipliziert werden muss, um den Nitratgehalt der Probe zu bestimmen. Die Steigung der Geraden betrug in diesem Falle 0,7133. Als reziproker Wert ergibt sich hieraus 1,402, was mit dem vom Hersteller angegebenen Wert von 1,4 sehr gut übereinstimmt.

Auf analoge Weise wurden auch Versuche zur Ermittlung eines Korrekturfaktors zur Bestimmung von Nitrit in Molke durchgeführt. Dabei wurden in drei Versuchsreihen Nitritkonzentrationen von maximal 28,3 mg/L untersucht. Alle drei Versuchsreihen zeigten einen guten linearen Zusammenhang zwischen zugesetzter und analysierter Nitritkonzentration, wobei das Bestimmtheitsmaß mindestens 0,997 betrug. Als reziproke Werte der Geradensteigungen ergaben sich Korrekturfaktoren zwischen 1,33 und 1,39, wobei der Mittelwert 1,36 betrug. Für die Nitritanalytik in Molke mittels des Analysensystems Reflectoquant[®] wurde in dieser Arbeit im Folgenden ein Korrekturfaktor von 1,36 verwendet.

3.2.2 Analytik in Molkenkonzentrat

Da Molkenkonzentrat einen fünffach erhöhten Feststoffanteil gegenüber genuiner Molke aufweist, ist zu erwarten, dass bei der Nitrat- und Nitritanalytik mittels des Reflectoquant[®]-Systems in Molkenkonzentrat deutlich andere Ergebnisse erhalten werden als in Molke. In der molkenverarbeitenden Industrie ist trotz der großen Bedeutung, die der Nitratkontamination beigemessen wird, keine standardisierte Analysenmethode etabliert [77]. Deshalb wurde die Anwendbarkeit des Reflectoquant[®]-Systems auf dieses Medium genau untersucht. Es wurden Proben von Molkenkonzentrat aus verschiedenen Käsereien untersucht. Die Messungen wurden nochmals nach ein bis zwei Tagen gekühlter Lagerung wiederholt, um eventuelle Veränderungen durch Alterungsprozesse des Molkenkonzentrats zu erfassen. Es wurden hierbei allerdings nur Molkenkonzentrate verwendet, die nur geringe Nitratkonzentrationen aufwiesen, da ansonsten durch eine Addition des

Nitratstandards der Messbereich des Analysensystems zu schnell überschritten worden wäre. Insgesamt wurden 19 verschiedene Messreihen durchgeführt, bei denen, wie bereits zuvor für die Analytik in Molke beschrieben, steigende Konzentrationen von Nitrat zugegeben wurden und die erhaltenen Messergebnisse gegen diesen Sollwert aufgetragen wurden. Abbildung 9 zeigt ein repräsentatives Ergebnis dieser Auftragungen.

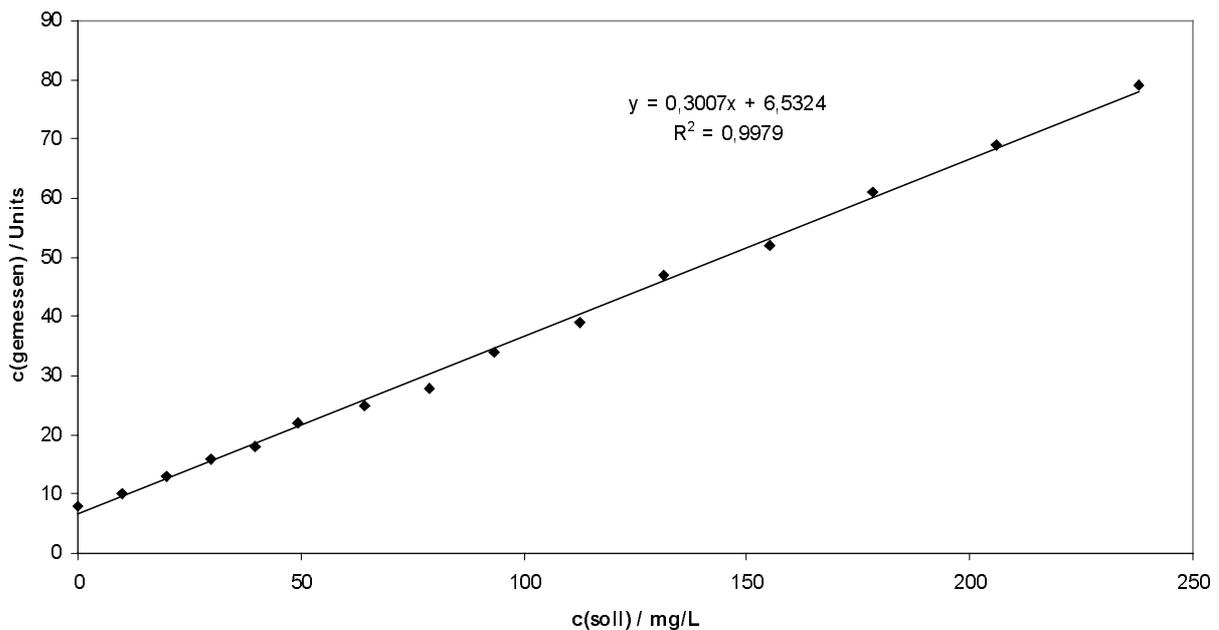


Abbildung 9: Nitratanalytik mit Merck Reflectoquant® in Molkenkonzentrat (Fa. Kraft, Trockenmasse ca. 31%), RT, pH 6,6

Es besteht ein guter linearer Zusammenhang zwischen Nitratkonzentration und Messergebnis. Der Messwert ohne Zugabe von Nitrat ($c(\text{soll}) = 0$) stimmt gut mit dem Achsenabschnitt der linearen Regression überein und stellt die Anfangsbelastung der Probe dar. Das Bestimmtheitsmaß R^2 lag im ungünstigsten Fall der 19 Versuchsreihen bei 0,982, doch wurde ein Wert von 0,99 nur in vier Fällen unterschritten.

Der mittlere Korrekturfaktor der aus allen 19 Versuchsreihen ermittelten reziproken Geradensteigungen beträgt dabei 3,30. Der minimale Wert lag bei 3,07 und der maximale bei 3,57. Dieses entspricht Abweichungen von 7,0% beziehungsweise 8,2% vom Mittelwert. Zur Verdeutlichung der relativen Genauigkeit dieses Testsystems sind in der folgenden Tabelle 2 die unter Verwendung des mittleren Korrekturfaktors 3,3 berechneten Wiederfindungsraten für zwei Testreihen von Molkenkonzentraten unterschiedlicher Hersteller dargestellt. Die in den Proben vor der Standardzugabe schon vorhandenen Nitratkonzentrationen wurden als

Achsenabschnitt der jeweiligen Regressionsgerade ermittelt und von den weiteren Messwerten subtrahiert, so dass sich die Wiederfindungsrate ausschließlich auf die zugesetzte Menge Nitrat bezieht.

Tabelle 2: Wiederfindungsraten bei Nitratanalytik in Molkenkonzentrat verschiedener Hersteller mit Merck Reflectoquant[®], Korrekturfaktor 3,3

Probennummer	c(soll) / mg/L	Wiederfindungsrate / %	
		Probe 1	Probe 2
1	7,0	106	103
2	13,8	101	99
3	20,6	84	99
4	27,2	100	111
5	33,8	90	99
6	40,3	100	100
7	46,7	94	100
8	53,0	101	101
9	59,3	96	107
10	64,4	97	102

Obwohl die aus den beiden oben dargestellten Versuchsreihen ermittelten Korrekturfaktoren 3,41 respektive 3,23 betragen, werden bei der Berechnung der Wiederfindungsraten mittels eines Korrekturfaktors von 3,3 keine gravierenden Fehler offensichtlich. Nur zwei der 20 dargestellten Werte weichen mehr als 10% vom Sollwert ab, hingegen liegen 70% der Ergebnisse innerhalb einer Fehlergrenze von nur 4%. Aufgrund der dargestellten Ergebnisse eignet sich das Analysensystem Reflectoquant[®] der Fa. Merck KGaA für die Nitratanalytik in Molkenkonzentrat (Trockenmasse ~ 31%). Daher wurde der Korrekturfaktor von 3,3 in den folgenden Kapiteln dieser Arbeit für die Bestimmung von Nitratkonzentrationen in Molkenkonzentrat verwendet.

Wie zuvor dargestellt, wurde durch Standardadditionsreihen auch ein Korrekturfaktor für die Nitritanalytik in Molkenkonzentrat mittels Merck Reflectoquant[®] ermittelt. Hierzu wurden drei Versuchsreihen durchgeführt, bei denen jeweils 13 Proben in einem Nitritkonzentrationen von bis zu 32,7 mg/L untersucht wurden. Alle drei Versuchsreihen zeigten auch in diesem Fall einen eindeutigen linearen Zusammenhang, wobei das Bestimmtheitsmaß mindestens 0,997 betrug. Die aus der mittels linearer Regression ermittelten Steigung berechneten Korrekturfaktoren

der drei Reihen lagen zwischen 1,39 und 1,42 mit einem Mittelwert von 1,40. Dieser Mittelwert wird in den folgenden Kapiteln dieser Arbeit als Berechnungsgrundlage für die Ermittlung von Nitritkonzentrationen in Molkenkonzentrat verwendet.

3.2.3 Analytik in Gegenwart hoher Chlorid-Konzentrationen

Nach Angaben des Herstellers werden die Ergebnisse der Reflectoquant®-Tests sowohl im Falle des Nitrats als auch des Nitrits durch Chlorid-Konzentrationen von mehr als 500 mg/L in der Probe gestört. Für diese Arbeit ist es allerdings notwendig, Nitrat auch in Gegenwart höherer Chloridkonzentrationen analysieren zu können, da Kochsalzlösungen zur Regeneration eines nitratbelasteten Ionenaustauschers verwendet werden und ein biologischer Nitratabbau in diesen Medien erfolgen soll. Wie zuvor für die Analytik in Molke beschrieben, wurden auch in Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration aus Standardlösungen unterschiedliche Nitrat-beziehungsweise Nitritkonzentrationen eingestellt. Nach Vermessung der Proben mittels der Reflectoquant®-Teststreifen wurden die Ergebnisse gegen die Sollkonzentrationen aufgetragen, wie in der folgenden Abbildung 10 für Nitrat dargestellt.

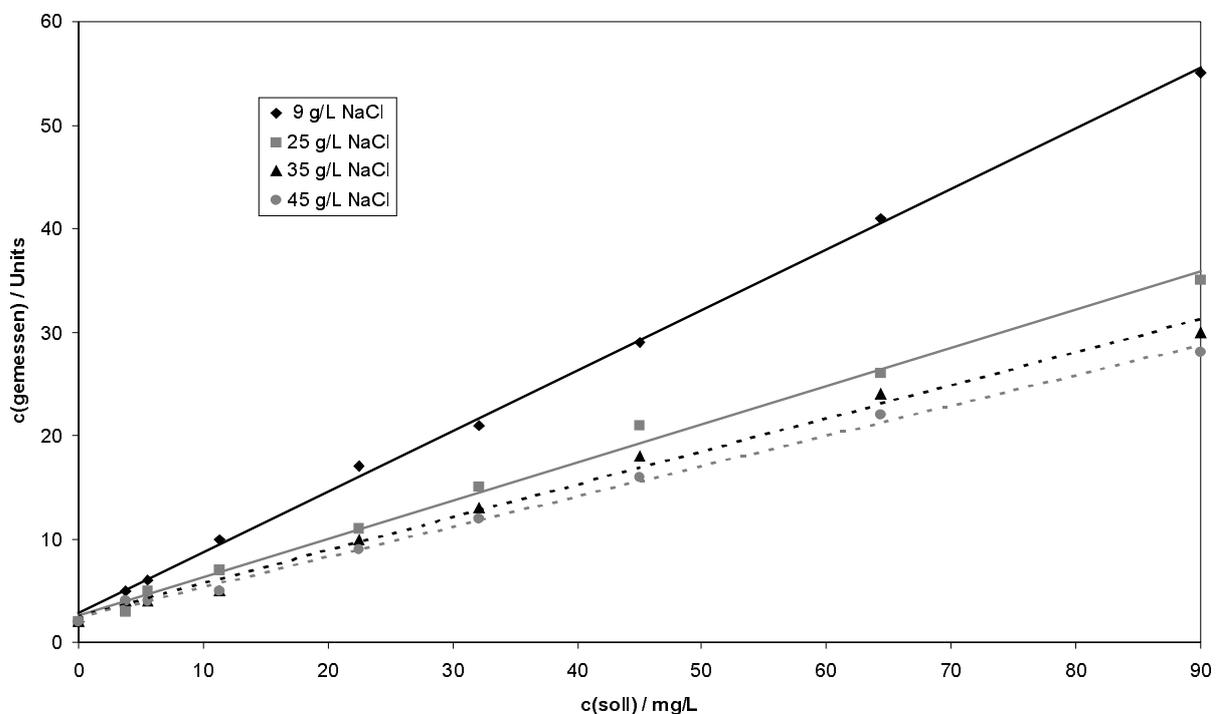


Abbildung 10: Nitratanalytik in NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen mittels Merck Reflectoquant®, RT

Auch für die Nitratanalyse in Gegenwart hoher Chloridkonzentrationen lässt sich erkennen, dass das Analysensystem Reflectoquant® lediglich systematische Minderbefunde zeigt, die bei gegebener Natriumchloridkonzentration durch einen Korrekturfaktor ausgeglichen werden können. Analog konnte dieses auch für den Nachweis von Nitrit gezeigt werden. Die aus diesen Versuchsreihen ermittelten Korrekturfaktoren für die Nitrat- und Nitritanalytik in Kochsalzlösungen sind im folgenden Kapitel zusammengefasst.

3.2.4 Korrekturfaktoren für die Nitrat- und Nitritanalytik

In den vorher gehenden Kapiteln wurde gezeigt, dass die Quantifizierung von Nitrat-beziehungsweise Nitritkonzentrationen in den für diese Arbeit relevanten Medien mittels der Teststreifen Reflectoquant® in Kombination mit dem Reflektometer RQflex der Fa. Merck KGaA möglich ist. In allen hier untersuchten Medien zeigten sich sowohl im Falle des Nitrats als auch des Nitrits systematische Minderbefunde. Durch Standardadditions-Versuche konnte allerdings gezeigt werden, dass der Zusammenhang zwischen Nitratkonzentration und Analyseergebnis in den betrachteten Konzentrationsbereichen stets linear war. Es ist deshalb möglich, mittels eines für jedes Medium spezifischen Korrekturfaktors das Analyseergebnis, welches mittels des Reflectoquant®-Systems erhalten wird, in die tatsächliche Konzentration umzurechnen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Korrekturfaktoren für die Nitrat- und Nitritanalytik mit Merck Reflectoquant® in verschiedenen Medien

Medium	Konzentration	Korrekturfaktor	
		Nitrat	Nitrit
Molke	6% Trockenmasse	1,4	1,36
Molkenkonzentrat	31% Trockenmasse	3,3	1,40
NaCl-Lösung	9 g/L	1,7	1,14
	25 g/L	2,7	1,16
	35 g/L	3,1	1,22
	45 g/L	3,4	1,25

Im Falle der Nitratanalytik bei Experimenten zur mikrobiellen Denitrifikation (siehe Kapitel 5) ist zu beachten, dass bei dieser Reaktion Nitrit entstehen kann, welches den Nachweis von Nitrat mittels des Analysensystems Reflectoquant® stört. Ist in einer Probe Nitrit nachweisbar, so muss es vor dem Nachweis von Nitrat durch Amidoschwefelsäure zerstört werden.

4 Chromatographischer Nitratabbau in Molke und Molkenkonzentrat

Molke und insbesondere Molkenkonzentrat sind viskose Flüssigkeiten mit einem hohen Trockenmassegehalt von 6% respektive 31%. Aufgrund dieses hohen Anteils an suspendierten Feststoffen kann es bei säulenchromatographischen Verfahren schnell zu Verblockungen und somit zum Erliegen des Flusses durch die Säule kommen [12]. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen ist das Expanded-Bed-Verfahren [78, 79], bei dem das Festbett in einer speziellen Säule von unten angeströmt wird, wodurch eine Expansion des Betts erfolgt. Hierzu sind allerdings spezielle Harze mit Stahlkernen notwendig [80], die nur für hochpreisige Spezialanwendungen, beispielsweise Proteinaufreinigung, lieferbar sind. Um das Problem der Verblockung zumindest in der Anfangsphase der Verfahrensentwicklung zu umgehen, wurden die Voruntersuchungen in Batchversuchen, in einem kontinuierlichen Rührkessel sowie in einer dafür konstruierten Rührkesselkaskade durchgeführt. In diesen Reaktortypen liegt kein Festbett vor, welches durch Ablagerungen verblockt werden könnte. Abschließend wurde eine Optimierung des Nitratabbaus in Molkenkonzentrat sowie der anschließenden Regeneration des Ionenaustauscherharzes in einer temperierbaren Chromatographiesäule mit einem Innendurchmesser von 20 mm und einer Höhe von 80 cm durchgeführt. Für die Untersuchungen stand nicht ständig frische Molke beziehungsweise Molkenkonzentrat zur Verfügung. Es stellte sich heraus, dass Molke mit einem geringen Nitratgehalt länger gekühlt haltbar war als solche, die aufgrund ihres Herstellungsverfahrens eine hohe Nitratkonzentration aufwies, da in nitrathaltigen Lösungen die Vermehrung von Mikroorganismen begünstigt ist. Für die folgenden Versuche wurde deshalb zumeist Molke oder Molkenkonzentrat mit geringem Nitratgehalt verwendet. Erhöhte Nitratkonzentrationen wurden unmittelbar vor den Untersuchungen durch Zugabe von Kaliumnitrat eingestellt.

4.1 Vorversuche

Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden zum Teil unter Verwendung von genuiner Molke durchgeführt, um die Verblockungsprobleme, die bei der Verwendung von Molkenkonzentrat auftreten, zu umgehen.

4.1.1 Auswahl geeigneter Anionenaustauscherharze

Die Versuche zur Auswahl geeigneter Anionenaustauscherharze erfolgten in einem Batch-Reaktor, der aus einer Filtrationseinheit SM 165 26 der Fa. Sartorius konstruiert wurde und ein Volumen von 150 mL aufwies. Der Magnetrührstab war hierbei an einer Welle aufgehängt, so dass er den Reaktorboden nicht berührte, was die mechanische Belastung der Harzkugeln verringerte, da ein Zerreiben der Harzkugeln zwischen Magnetrührstab und Reaktorboden verhindert wurde. Proben verschiedener stark basischer Anionenaustauscherharze wurden in diesem Rührkessel mit nitrathaltiger Molke versetzt. Die verbliebene Nitratbelastung der Molke wurde in regelmäßigen Abständen analysiert. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen mit den bemusterten Anionenaustauscherharzen dargestellt.

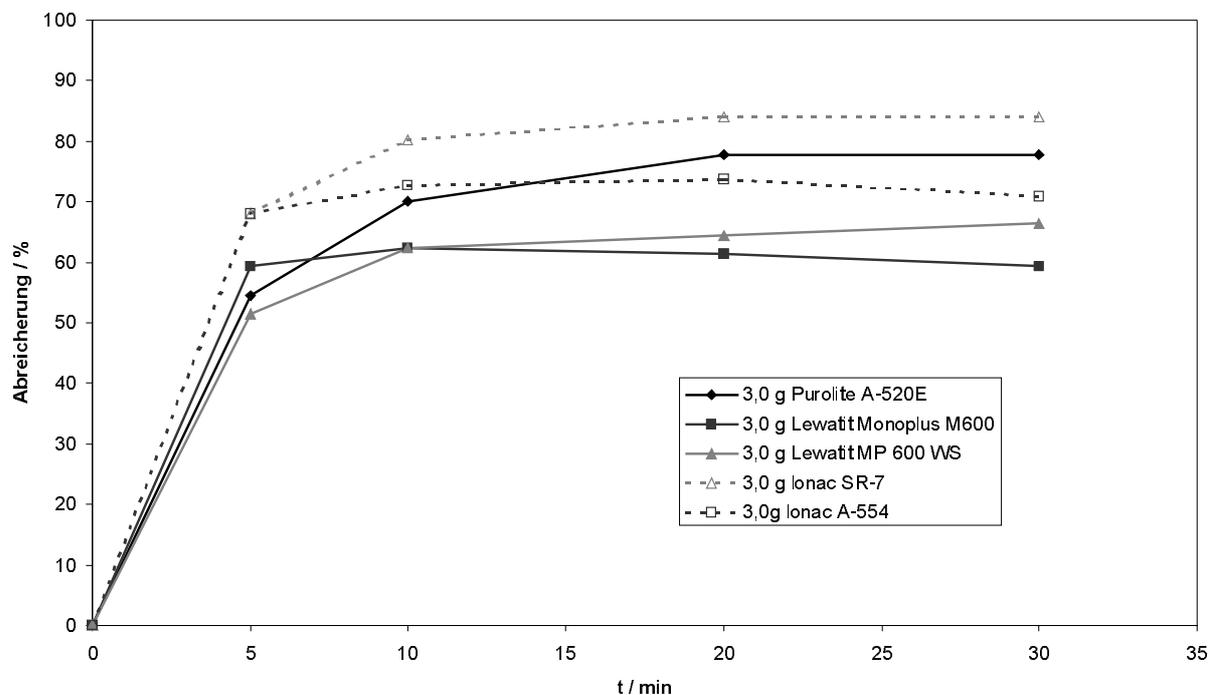


Abbildung 11: Versuche zur Bestimmung eines geeigneten Austauscherharzes, 150 mL Molke, Ausgangskonzentration 90 - 106 mg/L Nitrat, RT, pH 6,6

Wie zur erkennen ist, liefern von den untersuchten Austauscherharzen im Batch-Versuch die Produkte A-520 E der Fa. Purolite und Ionac SR-7 der Fa. Sybron die besten Ergebnisse. Im Fall von Purolite A-520 E wurde eine statische Beladung von $3,5 \text{ mg}_{\text{Nitrat}} \text{ g}_{\text{Harz}}^{-1}$ erreicht, mit Ionac SR-7 sogar $4,45 \text{ mg}_{\text{Nitrat}} \text{ g}_{\text{Harz}}^{-1}$. Bei diesen beiden Harzen handelt es sich um speziell für die Nitrat-Abreicherung entwickelte Produkte, durch die ein Neutaltausch von Nitrat gegen Chlorid-Ionen erfolgt. Bei

dem Austauscherharz Ionac SR-7 war allerdings nach dem Versuch ein signifikanter Anteil der Harzkugeln zerbrochen, weshalb für die weiteren Versuche das Harz der Fa. Purolite verwendet wurde. Die maximale Austauschgeschwindigkeit des Harzes für das vorliegende System wurde zu $3,1 \text{ mg}_{\text{Nitrat}} \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{Harz}}^{-1}$ bestimmt. Die Totalkapazität wird vom Hersteller mit mindestens $1 \text{ eq L}_{\text{Harzbett}}^{-1}$ angegeben. Die Schüttdichte des Harzes wurde zu $0,66 \text{ kg}_{\text{Harz}} \text{ L}_{\text{Bettvolumen}}^{-1}$ bestimmt, damit ergibt sich eine Totalkapazität von ca. $40,9 \text{ mg}_{\text{Nitrat}} \text{ g}_{\text{Harz}}^{-1}$. Diese wird im vorliegenden Fall nur zu ca. 9% genutzt. Da Purolite A-520 E zur Wasseraufbereitung hergestellt wird, liegen für die nutzbare Volumenkapazität (NVK) und den Nitratschlupf in komplexen Medien keine Daten vor. Der NVK-Wert weicht von der Totalkapazität ab, da der Austauscher auch andere Anionen (insbesondere SO_4^{2-}) bindet. Diese werden schnell wieder an das Medium abgegeben. Durch diese Wechselwirkungen kommt es aber zu dem sogenannten Nitratschlupf, so dass eine größere Menge Austauscher benötigt wird als theoretisch notwendig wäre. So wären für die Entfernung von 93 mg/L Nitrat ($1,5 \text{ meq/L}$) aus 1.000 Litern Trinkwasser theoretisch $1,5$ Liter Harz notwendig. Bei Anwesenheit von 98 mg/L Sulfat ($2,0 \text{ meq/L}$) werden aber insgesamt $3,6$ Liter benötigt [12].

Bei späteren Untersuchungen in einer Chromatographiesäule stellte sich heraus, dass das Purolite-Harz bei der Beladung mit Molkenkonzentrat sofort verblockte. Für diese Versuche wurde deshalb ein Harz der Fa. Applexion, Epone, verwendet, welches speziell für diese Anwendung zur Verfügung gestellt wurde und in den Untersuchungen eine deutlich geringere Tendenz zum Verblocken der Säule aufwies.

4.1.2 Kontinuierliche Denitrifikation von Molkenkonzentrat

Da eine Nitratbreicherung kontinuierlich erfolgen sollte, war die Verwendung des im vorigen Abschnitt beschriebenen Rührkessels nicht möglich. Der Batch-Reaktor wurde deshalb zu einem CSTR umgebaut. Ein Zulauf am Boden des Kessels, sowie ein Überlauf im oberen Bereich des Rührkessels wurden mit einem Edelstahl-Maschendraht mit einer Maschenweite von $230 \mu\text{m}$ versehen. Die Maschenweite wurde gewählt, da als unterer Wert für die Korngrößenverteilung des Anionenaustauscherharzes Purolite A-520 E $0,3 \text{ mm}$ angegeben sind und so das Harz sicher im Reaktor zurück gehalten werden konnte. Erste Versuche mit Molkenkonzentrat in diesem Reaktor zeigten ein Problem, dass durch die hohe

Viskosität und Dichte von Molkenkonzentrat auftritt. Da die Dichte von Molkenkonzentrat über der des Anionenaustauscherharzes lag und der Magnetrührstab nicht in der Lage war, eine Vermischung im gesamten Reaktorvolumen von 200 mL sicher zu stellen, setzte sich das Harz am Überlauf des Reaktors ab und verblockte den Abfluss des Molkenkonzentrats. Der Einsatz eines zusätzlichen Schrägblattrührers in halber Höhe des Reaktors konnte dieses Problem vermindern, führte aber auch zu einer erhöhten mechanischen Belastung des Harzes. Die folgende Abbildung 12 zeigt die in diesem CSTR erreichbare, kontinuierliche Nitratbreicherung in verschiedenen Medien.

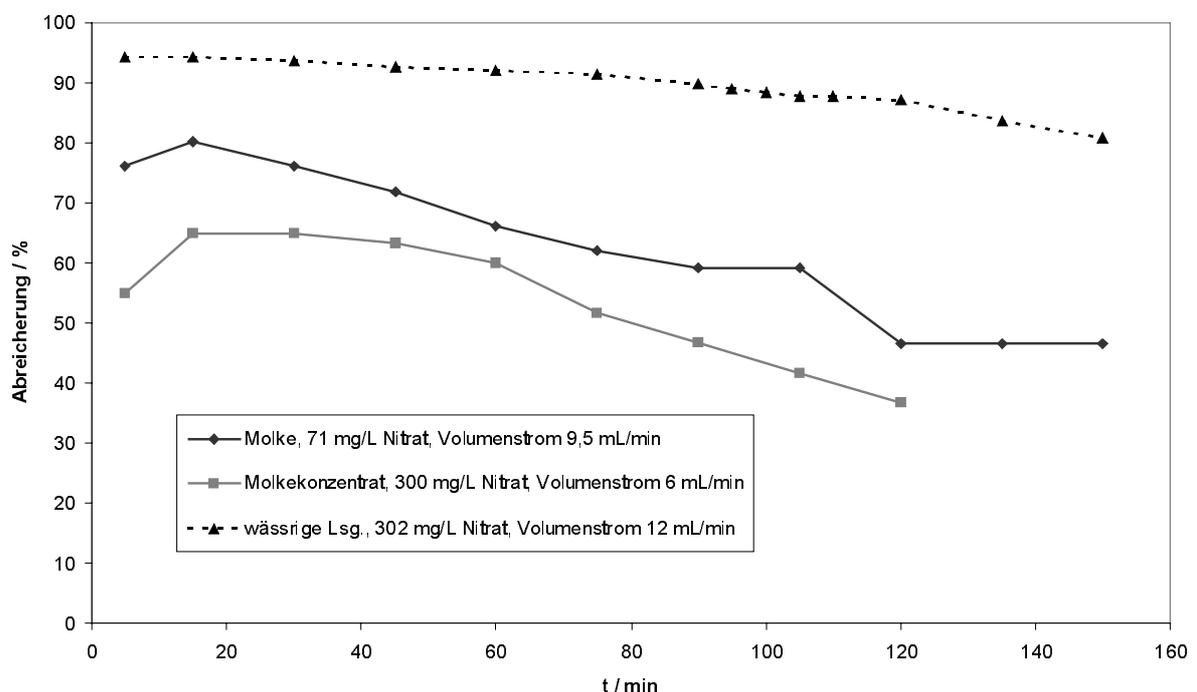


Abbildung 12: Nitratbreicherung in verschiedenen Medien in einem CSTR, $V = 200$ mL, 10,0 g Purolite A-520 E (20,0 g bei Molkenkonzentrat)

Es ist zu erkennen, dass die Fähigkeit des Harzes zur Nitratbindung besonders bei den komplexen Medien Molke und Molkenkonzentrat im Verlauf des Experiments sinkt. Die Schwierigkeiten, die durch das komplexe Medium entstehen, werden besonders deutlich durch den Vergleich zwischen Molkenkonzentrat und einer wässrigen Nitratlösung. Obwohl die Nitratbelastung beider Medien gleich ist und im Fall des Molkenkonzentrats der Volumenstrom nur halb und die Harzmenge doppelt so groß ist, ist die erreichte Nitratreduktion in wässriger Lösung deutlich größer. Sie verringert sich im Verlauf des Versuchs auch nur in geringerem Maße als bei der Verwendung von Molkenkonzentrat. Dieses lässt darauf schließen, dass zum einen auch andere in der Molke enthaltene Anionen an das Harz binden, zum anderen

größere Moleküle aus dem Molkenkonzentrat das Harz mechanisch belegen können und so die Bindung von Nitrat verhindern. Es ist nach diesen Ergebnissen davon auszugehen, dass die nutzbare Kapazität des Harzes bei der Verwendung von Molkenkonzentrat deutlich unterhalb der maximalen Kapazität liegt und auch geringer ist als bei der Nitratanreicherung in Trink- und Brauchwässern. Die Kapazität wird im CSTR allerdings deutlich besser genutzt als im Batch-Reaktor. Obwohl die Kapazität des Harzes zu Versuchsende noch nicht vollständig erschöpft war, konnte eine Beladung des Harzes mit $6,1 \text{ mg}_{\text{Nitrat}} \text{ g}_{\text{Harz}}^{-1}$ mit Molke, beziehungsweise $5,7 \text{ mg}_{\text{Nitrat}} \text{ g}_{\text{Harz}}^{-1}$ mit Molkenkonzentrat erreicht werden. Bei statischer Beladung wurde mit diesem Anionenaustauscherharz nur ein Austausch von $3,5 \text{ mg}_{\text{Nitrat}} \text{ g}_{\text{Harz}}^{-1}$ erzielt.

Weiterhin ist aus Abbildung 12 zu erkennen, dass eine kontinuierliche Denitrifikation in einem einzelnen CSTR nicht möglich ist, da aufgrund des Gleichgewichtscharakters der Austauschreaktion frühzeitig ein signifikanter Nitratschlupf auftritt, obwohl die Kapazität des Harzes noch nicht erschöpft ist. Im Fall der Molke verringert sich die Anreicherung bereits nach 15 min, die in der Molke verbleibende Nitratkonzentration nimmt im Verlauf des Versuchs kontinuierlich zu. Ein Grenzwert für die Nitratkonzentration im Ablauf des Reaktors wird somit schnell überschritten, obwohl die Kapazität des Harzes noch nicht erschöpft wurde.

4.2 Nitratanreicherung in Molke und Molkenkonzentrat in einer vierstufigen Rührkesselkaskade

Im vorigen Abschnitt wurde dargestellt, dass die Austauschkapazität des Harzes in einem CSTR schnell erschöpft ist und in einer Chromatographiesäule, welche dem Reaktortyp eines Rohrreaktors entspricht, die Gefahr des Verblockens besteht. Deshalb wurden weitere Versuche in einem Reaktortyp durchgeführt, der einen Übergang vom CSTR zum PFR darstellt, nämlich einer Rührkesselkaskade, wie sie in Abbildung 13 schematisch dargestellt ist.

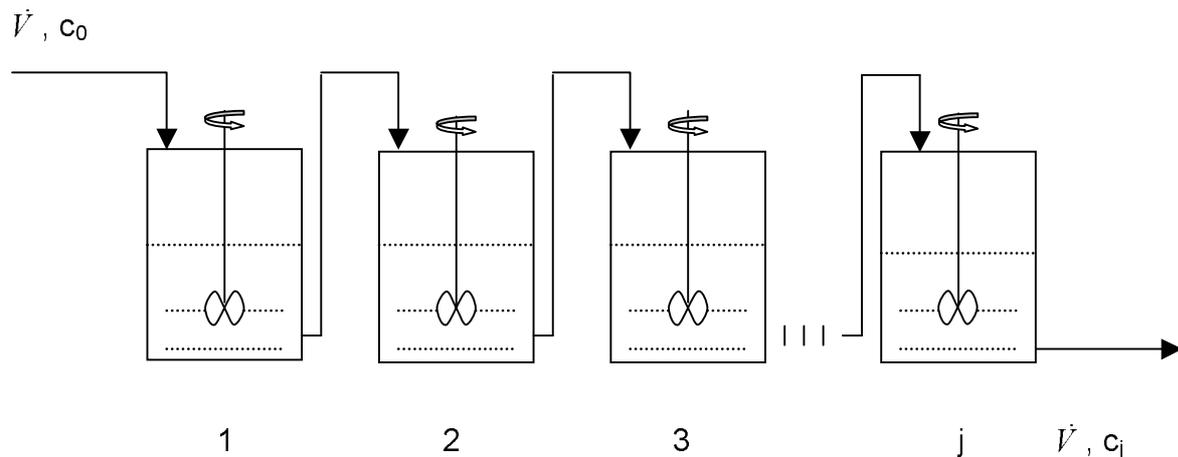


Abbildung 13: Schema einer j-stufigen Rührkesselkaskade [81]

Abhängig von der Anzahl der Kessel bei konstantem Gesamtvolumen ähnelt das Verweilzeitverhalten einer Rührkesselkaskade dem eines idealen Rührkessels oder dem eines idealen Rohrreaktors. Abbildung 14 stellt diesen Übergang von einem Kessel (CSTR) zu unendlich vielen Kesseln (PFR) dar.

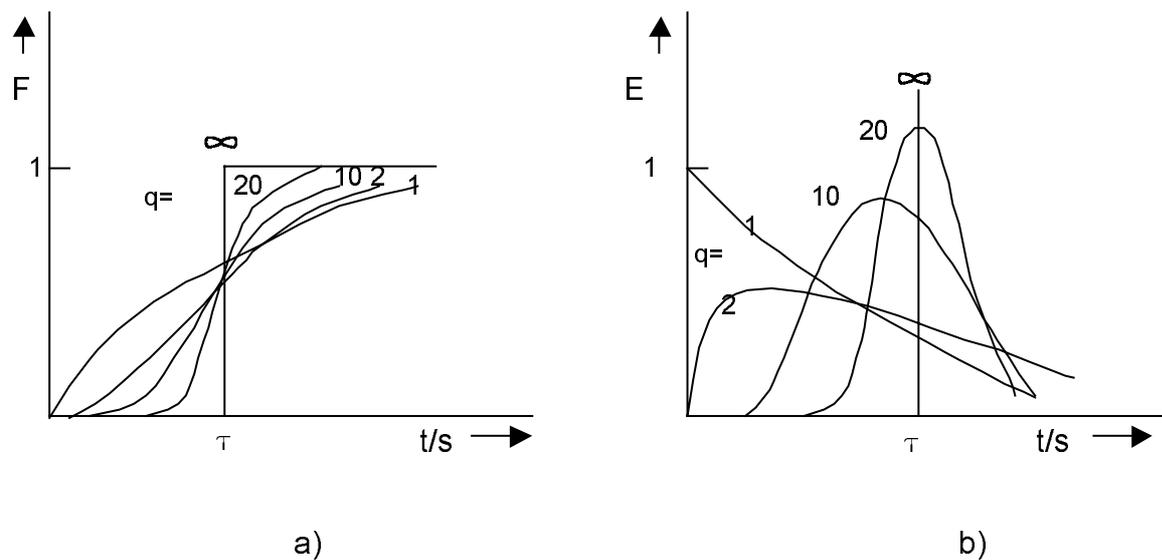


Abbildung 14: a) Verweilzeitsummenkurve (F-Funktion), b) Verweilzeitspektrum (E-Funktion) einer Reaktorkaskade mit der Kesselzahl q als Parameter [82]



Abbildung 15: Vierstufige Rührkesselkaskade

Die konstruierte Rührkesselkaskade (Abbildung 15) bestand aus vier Kesseln mit einem Volumen von jeweils 120 mL. Die Reaktoren waren mit Temperiermänteln versehen und konnten mittels einer peristaltischen Pumpe aus einem ebenfalls temperierbaren Vorratsgefäß befüllt werden. Die Durchmischung erfolgte mit Schrägblattrührern, die durch einen zentralen Motor gleichmäßig angetrieben wurden. Die Kessel waren oberhalb ihrer Abläufe mit Edelstahl-Siebböden ausgestattet, durch die das Anionenaustauscherharz in den Kesseln zurück gehalten wurde. Die Maschenweite des Siebbodens betrug zunächst 230 μm . Bei Versuchen mit Molkenkonzentrat zeigte sich allerdings, dass diese Maschenweite zu klein war, um akzeptable Volumenströme mit diesem Medium sicher zu stellen. Um Verblockungen zu verhindern, wurde die Maschenweite der Siebböden deshalb auf 400 μm erweitert. Um einen Austrag des Harzes während der Versuche und eine Verblockung des

Siebbodens durch Harzkugeln zu vermeiden, wurde das eingesetzte Purolite A-520 E, welches laut Hersteller eine Korngrößenverteilung von 0,3 bis 1,0 mm aufweist, auf eine Korngröße von größer 450 μm ausgesiebt.

4.2.1 Verweilzeitverhalten der Reaktorkaskade

Um zu überprüfen, ob das Verweilzeitverhalten der mit Anionenaustauscherharz befüllten Reaktorkaskade stark vom idealen Verhalten abweicht, wurde die Verweilzeitsummenkurve der Kaskade experimentell bestimmt und der theoretisch berechneten F-Funktion einer idealen Reaktorkaskade gegenüber gestellt. Für eine ideale Reaktorkaskade ergibt sich die Verweilzeitsummenkurve $F(t)$ zu [82]:

$$F(t) = 1 - \left[1 + \frac{t}{\tau} + \frac{1}{2!} \left(\frac{t}{\tau} \right)^2 + \frac{1}{3!} \left(\frac{t}{\tau} \right)^3 + \dots + \frac{1}{(j-1)!} \left(\frac{t}{\tau} \right)^{j-1} \right] \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad \text{(Gleichung 5)}$$

$j = \text{Laufzahl}$

$\tau = \text{Verweilzeit}$

$t = \text{Zeit}$

mit

$$\tau = \frac{V_R}{\dot{V}} \quad \text{(Gleichung 6)}$$

$V_R = \text{Reaktorvolumen}$

$\dot{V} = \text{Volumenstrom}$

Um Reaktoren unterschiedlicher Größe miteinander vergleichen zu können, wird die reduzierte Verweilzeit θ eingeführt [83]:

$$\theta = \frac{t}{\tau} \quad \text{(Gleichung 7)}$$

Die Ermittlung der realen Verweilzeitsummenkurve erfolgte durch eine Methode der Störungs-Antwort-Technik. Dabei wird im Zulaufstrom eine Störung erzeugt, indem ein Tracer zugegeben wird, und als Antwort die Konzentration des Tracers im Ablauf detektiert. Die Störung wurde als Sprungsignal eingebracht, da diese als Antwort nach Normierung auf einen Bereich von 0 bis 1 direkt die F-Funktion liefert.

Experimentell erfolgte die Störung als Umschalten von bidest. Wasser auf eine 0,025 M Kaliumchloridlösung zum Zeitpunkt $t = 0$. Als Antwort wurde die Leitfähigkeit am Ablauf der Reaktorkaskade mittels einer Durchflussmesszelle bestimmt. Da die Messzelle nur einen sehr geringen Querschnitt hatte, was den Ablauf deutlich blockierte, wurde sie in einem Bypass eingebaut.

Die Verweilzeitspektren (E-Funktionen) wurden aus den Verweilzeitsummenkurven (F-Funktionen) durch Differenzierung errechnet. Die folgende Abbildung 16 stellt die so erhaltenen E- und F-Funktionen der mit Anionenaustauscherharz gefüllten, vierstufigen Reaktorkaskade denen einer idealen Reaktorkaskade gegenüber.

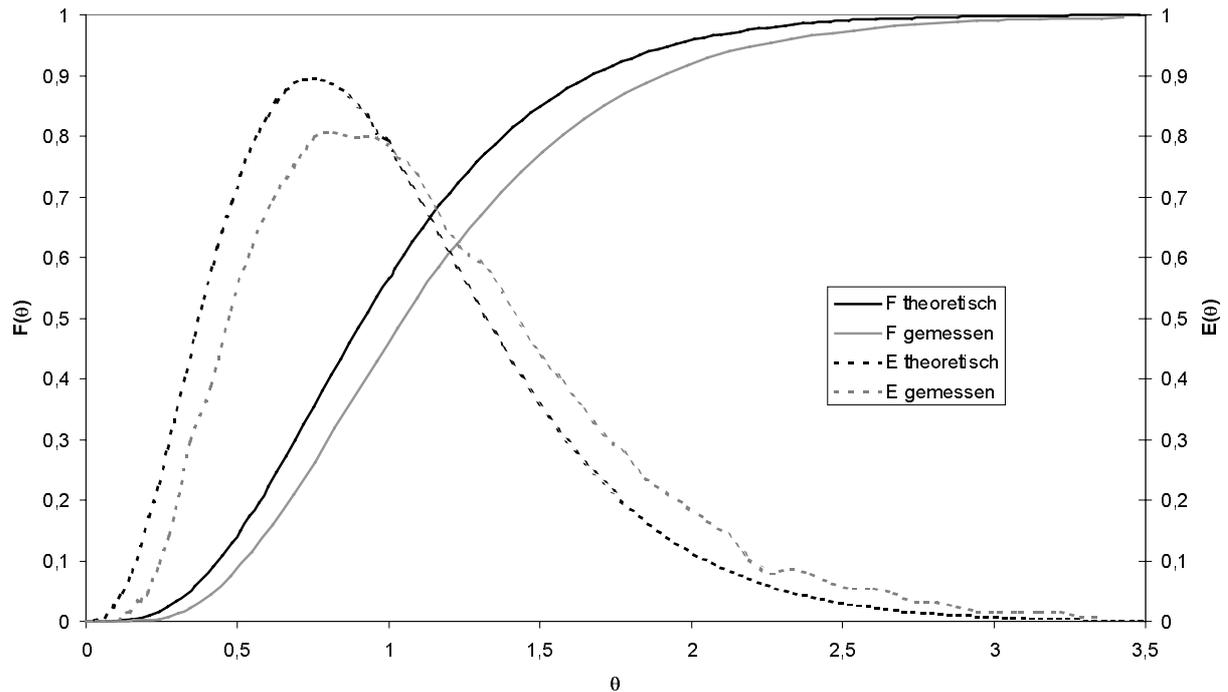


Abbildung 16: Theoretisch berechnete und experimentell ermittelte Verweilzeitfunktion $E(t)$ und Verweilzeitsummenkurve $F(t)$ der vierstufigen Reaktorkaskade

Es ist zu erkennen, dass die praktisch ermittelten E- und F-Funktionen gegenüber den theoretisch berechneten geringfügig zu höheren Verweilzeiten verschoben sind. So liegt das Maximum des Verweilzeitspektrums theoretisch bei $\theta = 0,75$ und praktisch bei $\theta = 0,82$. Eine wesentliche Verbreiterung der E-Funktion, die auf Kanalbildung, unzureichende Durchmischung oder das Vorhandensein von Toträumen hinweisen würde, zeigt sich aber nicht. Die Verschiebung zu höheren Verweilzeiten kann auf Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Reaktorvolumina zurückzuführen sein, die dadurch auftraten, dass der Füllstand der Reaktoren im Betrieb durch ein hydrodynamisches Gleichgewicht bestimmt war. Aus den Gleichungen 12 und 13 zur Berechnung der reduzierten Verweilzeit ist zu erkennen, dass Minderbefunde bei der Bestimmung der Reaktorvolumina zu einer Vergrößerung der reduzierten Verweilzeit führen. Diese Fehlerquelle tritt nur bei den experimentell ermittelten Daten auf, da das Reaktorvolumen in die theoretischen Berechnungen nicht eingeht. Somit ist eventuell die beobachtete Verschiebung zu erklären. Insgesamt ist das Verweilzeitverhalten der mit Anionenaustauscherharz gefüllten Reaktorkaskade gut mit dem Verhalten einer idealen, vierstufigen Reaktorkaskade zu beschreiben.

4.2.2 Nitratbreicherung in Molke

Um zunächst die Problematik des Verblockens des Anionenaustauscherharzes zu minimieren, wurden erste Versuche zur Nitratbreicherung mit Molke (TM ca. 6%) durchgeführt. Die Reaktoren wurden mit jeweils 15 g des stark basischen Anionenaustauscherharzes Purolite A-520 E gefüllt. Molke mit einem Nitratgehalt von 45 mg/L wurde mit einem Volumenstrom von 25 mL/min durch die Rührkesselkaskade gepumpt. In regelmäßigen Abständen wurden an den Abläufen der einzelnen Kessel Proben entnommen ihr Nitratgehalt bestimmt. Abbildung 17 zeigt die in den einzelnen Kesseln erreichte prozentuale Nitratbreicherung.

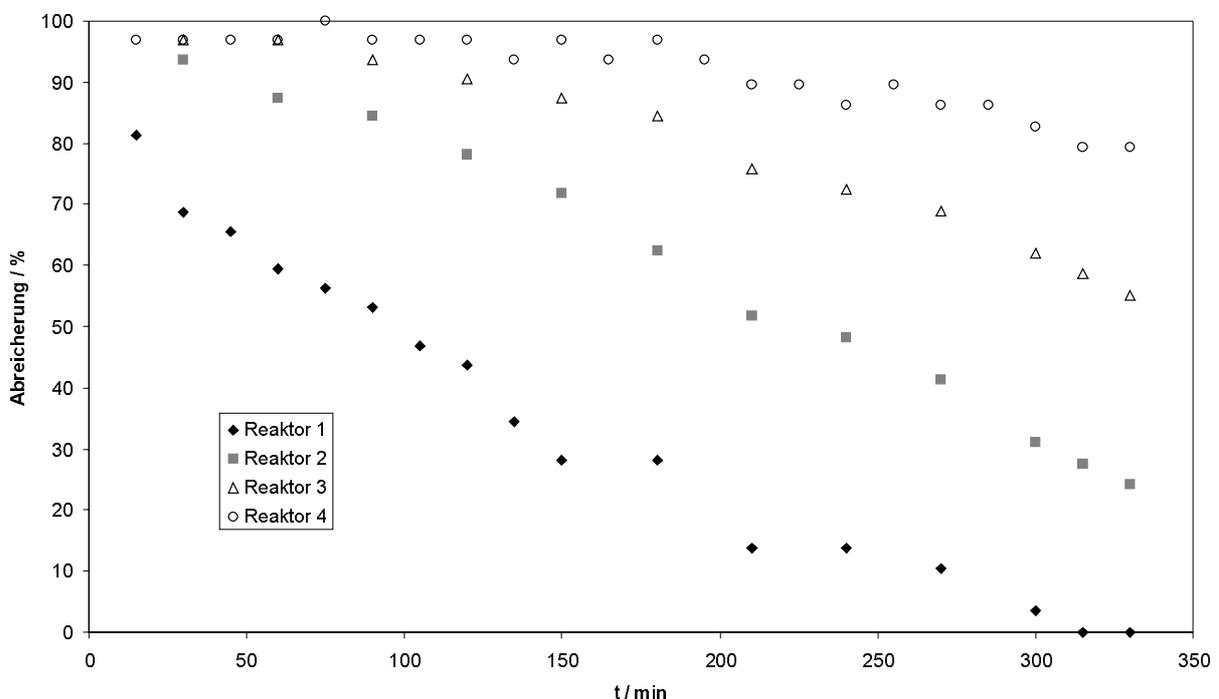


Abbildung 17: Nitratbreicherung in Molke (TM ~ 6%) in vierstufiger Reaktorkaskade, $c_{\text{Nitrat}} = 45 \text{ mg/L}$, Volumenstrom 25 mL/min, 15 g Purolite A-520 E pro Kessel, RT

Es ist zu erkennen, dass die Verwendung einer Rührkesselkaskade deutliche Vorteile gegenüber einem einzelnen CSTR zeigt, dessen Verhalten dem des ersten Reaktors der Kaskade entspricht. Im Ablauf des vierten Kessels wird über vier Stunden eine Abreicherung von über 90% erreicht, während der Nitratschlupf am Ablauf des ersten Kessels bereits zu Beginn des Versuches ca. 20% beträgt. In diesem Versuch wurden im ersten Kessel 87 mg Nitrat gebunden. Das entspricht einer Beladung von $5,8 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}/\text{g}_{\text{Harz}}$, was nahezu identisch mit der Beladung im CSTR von $6,1 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}/\text{g}_{\text{Harz}}$ ist. Die Kapazität dieses Harzes im Batch-Versuch betrug nur $3,5 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}/\text{g}_{\text{Harz}}$. In der gesamten Rührkesselkaskade wurden in diesem Versuch

235 mg Nitrat gebunden, was einer Gesamtkapazität von $3,9 \text{ mg}_{\text{Nitrat}}/\text{g}_{\text{Harz}}$ entspricht. Dieser Mittelwert ist geringer als der im ersten Kessel erreichte Wert, da die Kapazität des Harzes nicht in der gesamten Rührkesselkaskade erschöpft wurde. Wie aus Abbildung 17 zu erkennen ist, wurde am Ende des Versuchs im Ablauf des letzten Kessels noch eine Abreicherung von über 80% erreicht. Wenn auch die Kapazität des Harzes also noch nicht völlig erschöpft war, so lässt sich doch erkennen, dass zu diesem Zeitpunkt ein Nitratdurchbruch erreicht war, der die für eine praktische Anwendung tolerierbare Nitratgrenze bereits überschritten hatte.

Von einem CSTR mit dem gleichen Gesamtvolumen wie die Rührkesselkaskade ist aufgrund des Gleichgewichtscharakters der Austauschreaktion ein schlechteres Abreicherungsverhalten zu erwarten. Um das Abreicherungsverhalten in CSTR und Rührkesselkaskade miteinander zu vergleichen, ist in Abbildung 18 die Nitratbreicherung gegen die reduzierte Verweilzeit θ aufgetragen.

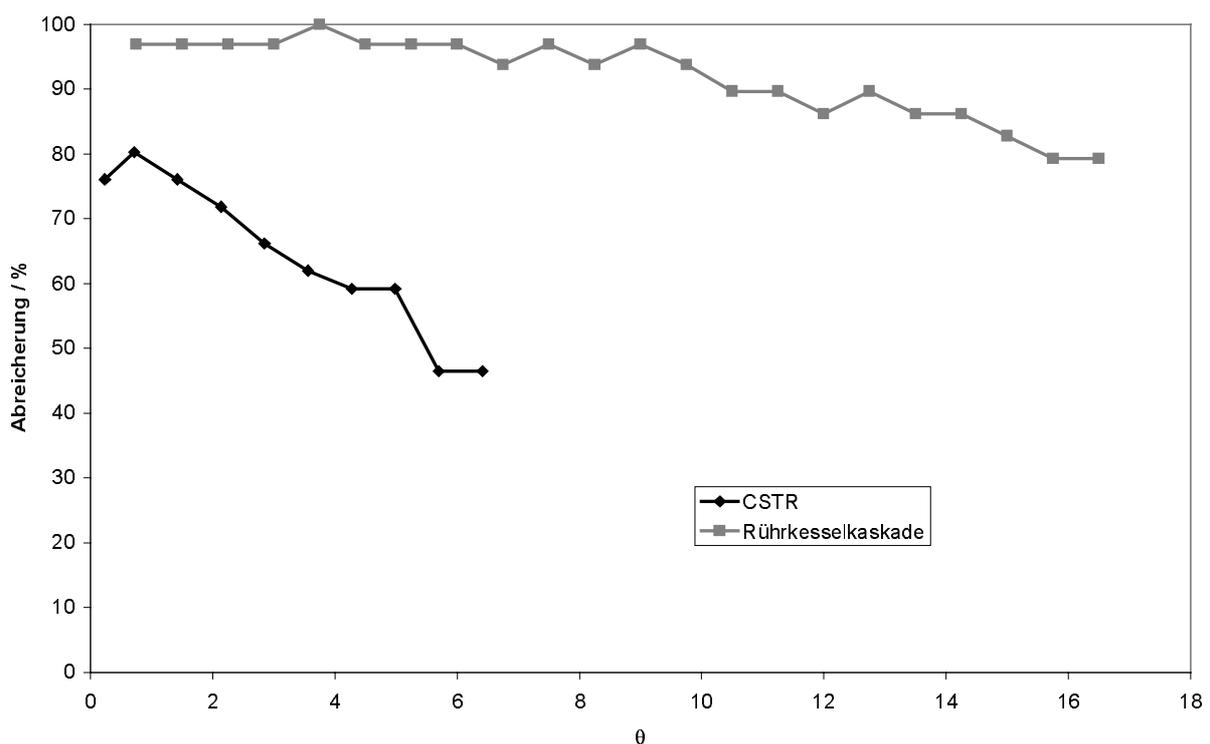


Abbildung 18: Vergleich der Nitratbreicherung in Molke in CSTR ($V = 200 \text{ mL}$, 10 g Purolite A-520 E, $\dot{V} = 9,5 \text{ mL/min}$, $c_{\text{Nitrat}} = 71 \text{ mg/L}$) und in einer vierstufigen Rührkesselkaskade ($V = 200 \text{ mL}$, 120 g Purolite A-520, $\dot{V} = 25 \text{ mL/min}$, $c_{\text{Nitrat}} = 45 \text{ mg/L}$) bei Raumtemperatur

Während in der vierstufigen Rührkesselkaskade auch über eine längere reduzierte Verweilzeit eine gute Nitratbreicherung erzielt werden konnte, war im CSTR bereits nach kurzer Zeit ein verstärkter Nitratschlupf zu registrieren.

4.2.3 Nitratbreicherung in Molkenkonzentrat

Nach den in Kapitel 4.2 beschriebenen Modifikationen an der Rührkesselkaskade konnte auch Molkenkonzentrat (TM ~ 31%) in der Kaskade verarbeitet werden. Der Volumenstrom wurde, wie in den Versuchen mit Molke, auf 25 mL/min eingestellt. Den höheren Nitratkonzentrationen in Molkenkonzentrat, die in diesem Versuch 180 mg/L betragen, wurde Rechnung getragen, indem die Reaktoren nun mit jeweils 30 g Anionenaustauscherharz befüllt wurden. In regelmäßigen Abständen wurden Proben an den Abläufen der einzelnen Reaktoren entnommen und die Nitratkonzentrationen bestimmt. Die folgende Abbildung 19 zeigt die in den Kesseln erreichte Nitratbreicherung.

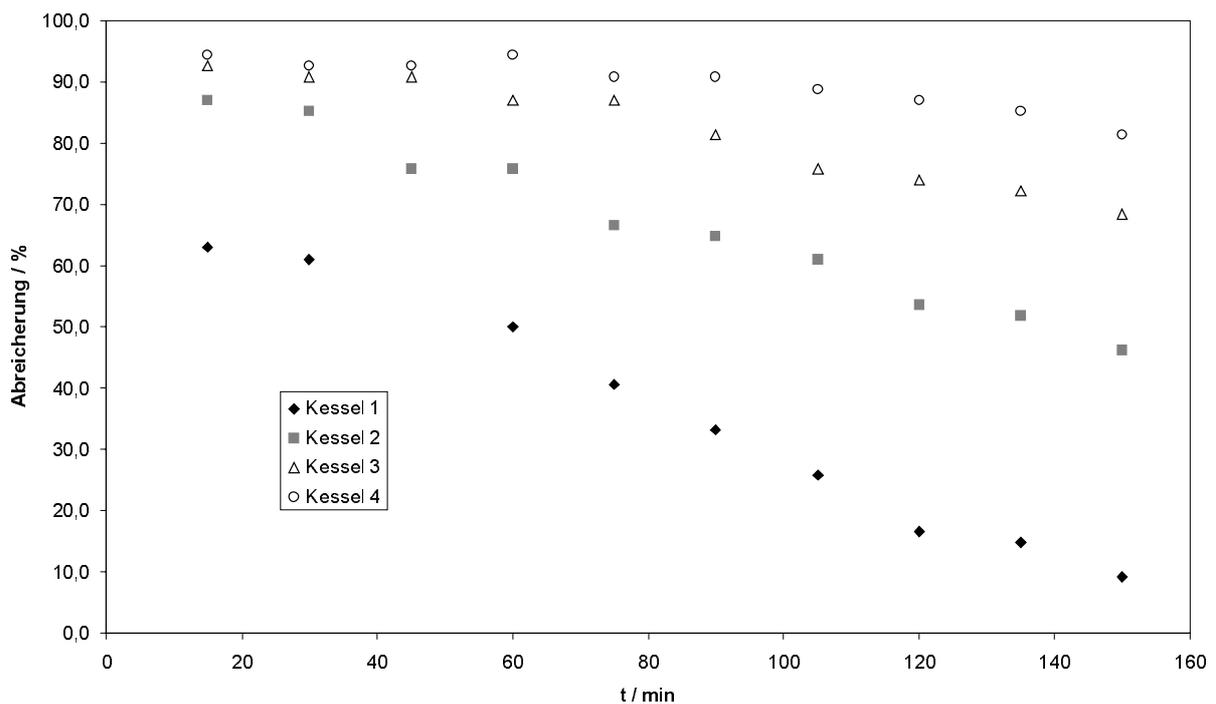


Abbildung 19: Nitratbreicherung in Molkenkonzentrat (TM ca. 31%) in vierstufiger Reaktorkaskade, $c_{\text{Nitrat}} = 180 \text{ mg/L}$, Volumenstrom 25 mL/min, 30 g Purolite A-520 E pro Kessel, RT

Wie die Abbildung zeigt, ist die Nitratbreicherung auch in Molkenkonzentrat in einer Rührkesselkaskade mittels Anionenaustauscherharzen möglich. Insgesamt konnten in diesem Versuch 427 mg Nitrat aus Molkenkonzentrat auf dem Anionenaustauscherharz gebunden werden. Es ergibt sich somit eine Kapazität von

3,6 mg_{Nitrat}/g_{Harz}, was nur geringfügig unter dem mit genuiner Molke erreichten Wert von 3,9 mg_{Nitrat}/g_{Harz} liegt.

4.2.4 Regeneration des Anionenaustauscherharzes

Durch die Beladung mit Nitrat aus dem Molkenkonzentrat erschöpft sich die Kapazität des Anionenaustauscherharzes, so dass nach einem Beladungszyklus eine Regeneration des Harzes mit einer konzentrierten Natriumchlorid-Lösung erfolgen muss. In Kapitel 5 wird gezeigt, dass ein Nitratabbau durch Mikroorganismen nur in Kochsalzlösungen von maximal 35 g/L effektiv erfolgen kann. Da eine Kombination von Ionenaustausch und biologischer Denitrifikation Ziel dieser Arbeit ist, erfolgte die Regeneration des Anionenaustauscherharzes mit einem Eluenten dieser Konzentration. Abbildung 20 stellt den Verlauf der Regeneration dar.

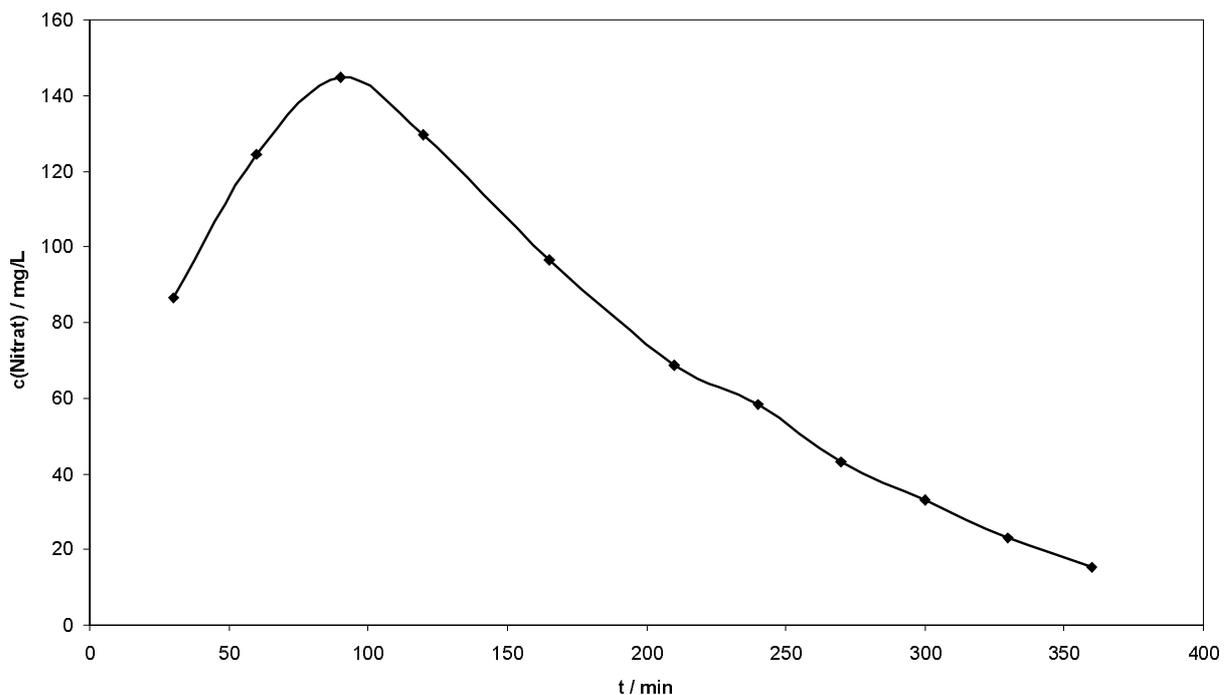


Abbildung 20: Regeneration von Purolite A-520 E in vierstufiger Rührkesselkaskade mit 35 g/L NaCl; Volumenstrom 5 BV/h; RT

Es ist zu erkennen, dass die Regeneration ein starkes Tailing aufweist. Aus den Volumina sowie den Start- und Endnitratkonzentrationen des Molkenkonzentrats respektive der Kochsalzlösung lassen sich die Nitratmengen berechnen, die auf dem Harz gebunden beziehungsweise eluiert wurden. Im vorliegenden Fall wurden 308 mg Nitrat aus Molkenkonzentrat auf dem Harz gebunden. Im Eluenten wurden nach der Regeneration 296 mg Nitrat detektiert, was lediglich einer Differenz von 4%

entspricht. Berücksichtigt man die Messgenauigkeit von ± 3 mg/L bei der Bestimmung der Nitratkonzentrationen, kann man von einer vollständigen Regeneration des Harzes ausgehen.

Da es sich bei der Regeneration um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, ist diese nur im kontinuierlichen Betrieb möglich. Bei Versuchen in der vierstufigen Rührkesselkaskade konnte gezeigt werden, dass eine mehrfache Verwendung des Eluenten nicht möglich ist. Hierbei wurde das Harz mit einem geringen Volumen an Natriumchloridlösung teilweise regeneriert, anschließend wurde dieses nitratbelastete Eluat erneut über das Harz geleitet. Die Nitratkonzentration im Eluat stieg in diesem Versuch nicht weiter an, woraus geschlossen werden kann, dass keine weitere Regeneration des Ionentauschers erfolgte.

4.3 Nitratbreicherung in Molkenkonzentrat mittels Chromatographiesäule

Anionenaustauschprozesse werden im industriellen Maßstab in Säulen durchgeführt. Von der Verwendung einer Reaktorkaskade, wie zuvor beschrieben, sind neben einer schlechteren Ausnutzung der Kapazität des Harzes aufgrund des Gleichgewichtscharakters des Ionenaustauschs auch Probleme beim Up-Scaling zu erwarten. Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob die in einer Reaktorkaskade erfolgreich durchgeführte Nitratbreicherung in Molkenkonzentrat auch in einer Chromatographiesäule realisierbar ist. Für die Nitratbreicherung wurde eine temperierbare Säule mit einem Innendurchmesser von 20 mm und einer Länge von 80 cm verwendet, die von der Fa. Applexion zur Verfügung gestellt wurde.

4.3.1 Verblockung der Säule durch Molkenkonzentrat

In ersten Versuchen der Nitratbreicherung in einer Chromatographiesäule mit den in den bisherigen Versuchen verwendeten Anionenaustauscherharzen Purolite A-520 E und Ionac SR-7 verblockte die Säule bei der Auftragung von Molkenkonzentrat innerhalb weniger Minuten vollständig. Es wurde daraufhin erneut Kontakt zu Herstellern von Anionenaustauscherharzen aufgenommen. Die Fa. Applexion stellte nun das Anionenaustauscherharz Resin XA455 zur Verfügung, das nach Herstellerangaben für die Verwendung in komplexen Medien geeignet ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die Problematik des Verblockens bei Verwendung dieses Harzes deutlich reduziert war. Allerdings traten bei dem gewählten

Versuchsaufbau weiterhin Probleme auf. Diese lagen teilweise darin begründet, dass das verwendete Molkenkonzentrat bei der gekühlten Lagerung sedimentierte. Es bildeten sich hauptsächlich aus Lactose bestehende Konglomerate. Dieses im Labormaßstab beobachtete Phänomen lässt aber keinen Rückschluss auf das Verhalten in einem industriellen Prozess zu, da das Molkenkonzentrat dort frisch verarbeitet wird und zudem praktisch ständig in Bewegung ist, so dass eine Sedimentation nicht stattfinden kann.

Ein weiteres Problem, das bei den im Folgenden beschriebenen Versuchen im Labormaßstab auftrat, war eine schleichende Verblockung durch Ablagerungen im oberen Bereich der Säule, die den Fluss durch die Säule im Laufe mehrerer Zyklen verschlechterten. Die Ablagerungen sind wahrscheinlich durch ein Rückspülen der Säule zwischen den Zyklen, das heißt einen Waschgang, bei dem die Säule von unten angeströmt wird, auszuspülen. Die Spülung der vorhandenen Laborsäule konnte nur von oben erfolgen, da das Harz beim Rückspülen aufgeschwemmt wird und der gegebene Freiraum im oberen Bereich der Säule nicht ausreichte, um die Säule von unten anzuströmen, ohne dass der Anionenaustauscher ausgetragen wurde.

Zudem kann die Problematik des schleichenden Verblockens in einer Laborsäule nicht abschließend bewertet werden, da ein Scale-Up die Verhältnisse aufgrund der Veränderung des Schlankheitsgrades voraussichtlich verbessert. Bei Säulen im industriellen Maßstab ist das Verhältnis von Querschnitt zum Volumen der Säule deutlich größer als bei der verwendeten Laborsäule. Das Volumen der Säule und damit des Harzbettes bestimmt die Menge an Molkenkonzentrat, mit der die Säule in einem Zyklus beladen werden kann. Eine Vergrößerung des Querschnitts der Säule bei konstantem Volumen verringert entsprechend die Eindringtiefe der abgelagerten Feststoffe in das Säulenmaterial und erleichtert so das Ausspülen.

4.3.2 Temperaturabhängigkeit der Denitrifikation

Die Säule wurde durchströmt, indem die Flüssigkeit am Ablauf der Säule mittels einer peristaltischen Pumpe abgepumpt wurde. Da die Säule ein geschlossenes System darstellt, wird durch den entstehenden Unterdruck das Medium aus einem Vorratsbehälter angesaugt, wodurch ein definierter Volumenstrom durch die Säule eingestellt werden konnte. Mit dieser Anordnung konnte die Schwierigkeit umgangen werden, zwei Pumpen am Zu- und Ablauf zu synchronisieren, da geringe

Schwankungen der Pumpgeschwindigkeit aufgrund des geringen Säulenvolumens gravierende Auswirkungen hätten. Die Dichtigkeit der Säule war ausreichend, um über mehrere Stunden einen konstanten Flüssigkeitspegel zu gewährleisten.

Die Beladung der Chromatographiesäule mit Molkenkonzentrat erfolgte zunächst bei Raumtemperatur. Für eine Anwendung im Nahrungsmittelbereich ist es jedoch unumgänglich, die Molke während des Prozesses zu kühlen, da ansonsten eine starke Vermehrung von in der Molke vorhandenen Mikroorganismen zu erwarten ist. Das führt zu Qualitätsverlusten bis hin zum Verderben der Molke. Die Nitratbreicherung in der Chromatographiesäule wurde deshalb auch bei einer Temperatur von 5 °C durchgeführt, wobei sowohl das Vorlagegefäß als auch die Säule gekühlt wurden.

Die Beladung der Säule erfolgte in beiden Fällen mit einem Volumenstrom von 11,5 mL/min, das entspricht bei einem Volumen des Harzes von 220 mL einem Volumenstrom von drei Bettvolumen (BV) pro Stunde. In regelmäßigen Abständen wurden Proben am Ablauf der Säule genommen und auf ihren Nitratgehalt analysiert. Abbildung 21 zeigt den zeitlichen Verlauf der Nitratbreicherung bei beiden Temperaturen. Die Ausgangskonzentration an Nitrat im Molkenkonzentrat variierte bei den beiden Messungen und lag im Falle der Messung bei Raumtemperatur bei 238 mg/L und im gekühlten Versuch bei 300 mg/L.

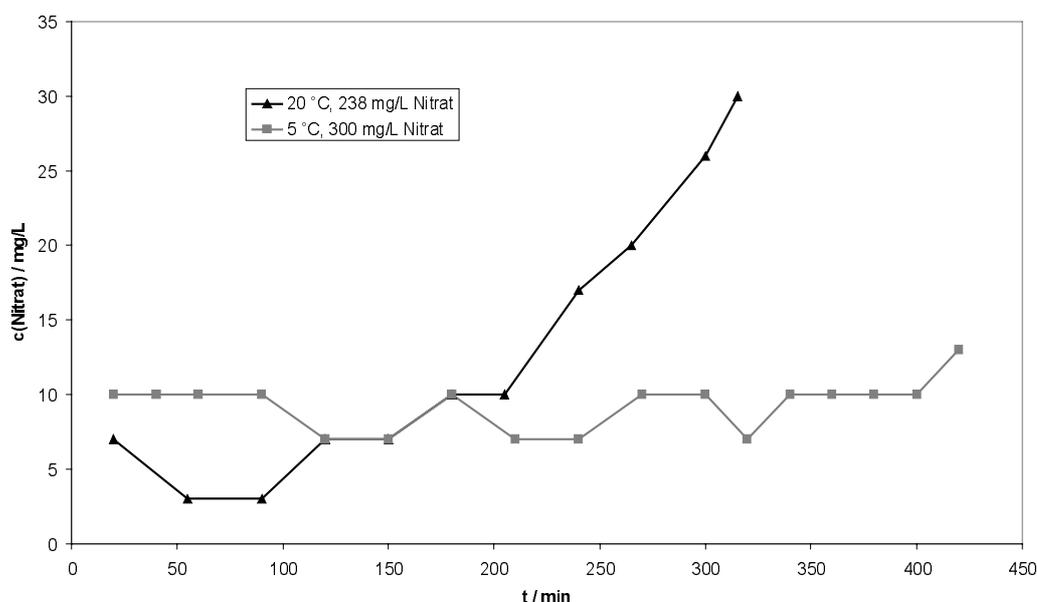


Abbildung 21: Nitratkonzentration am Ablauf der Chromatographiesäule bei Beladung mit Molkenkonzentrat bei verschiedenen Temperaturen, 220 mL Applexion Resin XA 455, Volumenstrom 3 BV/h

Es ist zu erkennen, dass durch eine Kühlung des Molkenkonzentrats über einen deutlich längeren Zeitraum ein Restnitratgehalt von 10 mg/L nicht überschritten wurde. Bei konstantem Volumenstrom entspricht dieses einer größeren Menge an Molkenkonzentrat, das denitrifiziert werden kann, bevor ein relevanter Nitratschlupf eintritt. Damit erhöht sich die nutzbare Volumenkapazität (NVK) des Harzes. Berücksichtigt man die unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen des Nitrats im Molkenkonzentrat, so lässt sich durch Integration der Kurven ermitteln, dass bis zu dem Zeitpunkt, bei dem eine Nitratkonzentration von 10 mg/L überschritten wird, bei Raumtemperatur 490 mg und bei 5 °C 1380 mg Nitrat gebunden werden. Das entspricht einer Steigerung der NVK des Harzes um den Faktor 2,8. Bei einer Temperatur von 5 °C werden $6,25 \text{ g}_{\text{Nitrat}} / \text{L}_{\text{Harz}}$ ausgetauscht. Die Totalkapazität wird für dieses Harz vom Hersteller mit mindestens $0,8 \text{ eq L}_{\text{Harzbett}}^{-1}$ angegeben, das heißt, sie wird in diesem Fall zu ca. 13% genutzt. Die relativ geringe Nutzbarkeit der Totalkapazität ist, wie schon im Abschnitt 4.1.2 gezeigt, auf die Komplexität des Mediums Molkenkonzentrat zurückzuführen.

4.3.3 Regeneration des Anionenaustauscherharzes

Für die Untersuchungen zum Regenerationsverhalten des Anionenaustauscherharzes Applexion Resin XA 455 in einer Chromatographiesäule wurde dieses Harz vor den Versuchen mit Nitrat aus Molkenkonzentrat beladen. Aus Gründen der Zeitersparnis wurden hohe Nitratkonzentrationen von maximal 300 mg/L in dem Molkenkonzentrat eingestellt. Um eine hohe Beladung des Harzes mit Nitrat zu erreichen, wurde diese Beladung bei 5 °C durchgeführt, wie im vorigen Kapitel beschrieben. Nach der Beladung und nach der Regeneration wurde die Säule jeweils mit destilliertem Wasser gespült. Wie schon zuvor erwähnt, wird in Kapitel 5 zur biologischen Denitrifikation dargestellt, dass ein effektiver Nitratabbau durch Mikroorganismen nur in Gegenwart von maximal 35 g/L NaCl möglich ist. Das schränkt die Konzentration des Eluenten im Hinblick auf ein mögliches Verfahren, bei dem die Salzlauge biologisch regeneriert wird, ein. Dessen ungeachtet wurde auch die Regeneration des Harzes durch höher konzentrierte Salzlösungen untersucht, da für einen industriellen Einsatz auch ein rein chromatographisches Verfahren, bei dem das Eluat nach einem Zyklus verworfen wird, denkbar ist. Abbildung 22 zeigt den Verlauf der Regeneration des Anionenaustauscherharzes mit Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration.

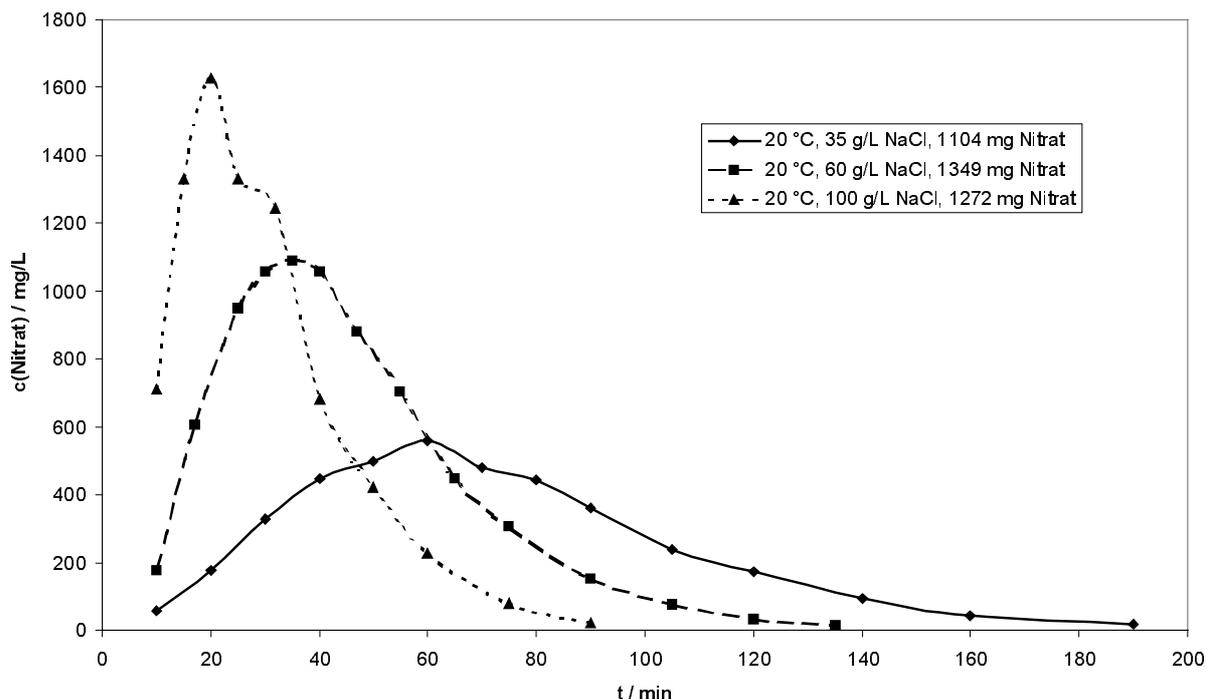


Abbildung 22: Nitratkonzentration am Ablauf der Chromatographie-Säule bei Regeneration mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen, 220 mL Applexion Resin XA 455, Volumenstrom 6,8 BV/h, RT

Es ist zu erkennen, dass die Regeneration mit zunehmender Natriumchloridkonzentration schneller verläuft. Die Peaks werden schmaler, und bei konstantem Volumenstrom sinkt damit das benötigte Eluentenvolumen. Durch Integration der Kurven und Multiplikation des Ergebnisses mit dem Volumenstrom erhält man die im Eluat befindliche Nitratmenge. So ist es möglich, das benötigte Volumen für die Elution einer bestimmten Nitratmenge und die Effektivität des eingesetzten Natriumchlorids zu berechnen. Diese Werte sind in der folgenden Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Regeneration der Anionentauscherharzes mit verschiedenen Kochsalz-Konzentrationen, 20 °C, Volumenstrom 6,8 BV/h

$C_{\text{NaCl}} / \text{g/L}$	Benötigter Eluent / L/g _{Nitrat}	Effektivität / mg _{Nitrat} /g _{NaCl}
35	4,1	6,9
60	2,3	7,2
100	1,6	6,0

Das benötigte Eluentenvolumen bezogen auf die eluierte Nitratmenge sinkt mit zunehmender Konzentration der Kochsalzlösung, wobei eine Erhöhung von 60 auf 100 g/L nur eine geringe Erniedrigung des Eluentenvolumens bewirkt. Die Effektivität des eingesetzten Natriumchlorids, die bei Konzentrationen von 35 und 60 g/L annähernd gleich ist, fällt bei der hohen Konzentration von 100 g/L deutlich ab. Eine Konzentration des Eluenten von 60 g/L NaCl ist offensichtlich für die Regeneration ideal, aber auch mit einer NaCl-Konzentration von 35 g/L ist eine effektive Regeneration des Anionenaustauscherharzes möglich.

Für eine Eluentenkonzentration von 35 g/L NaCl wurde des Weiteren die Temperaturabhängigkeit der Elution untersucht. Dieses ist in der folgenden Abbildung 23 dargestellt.

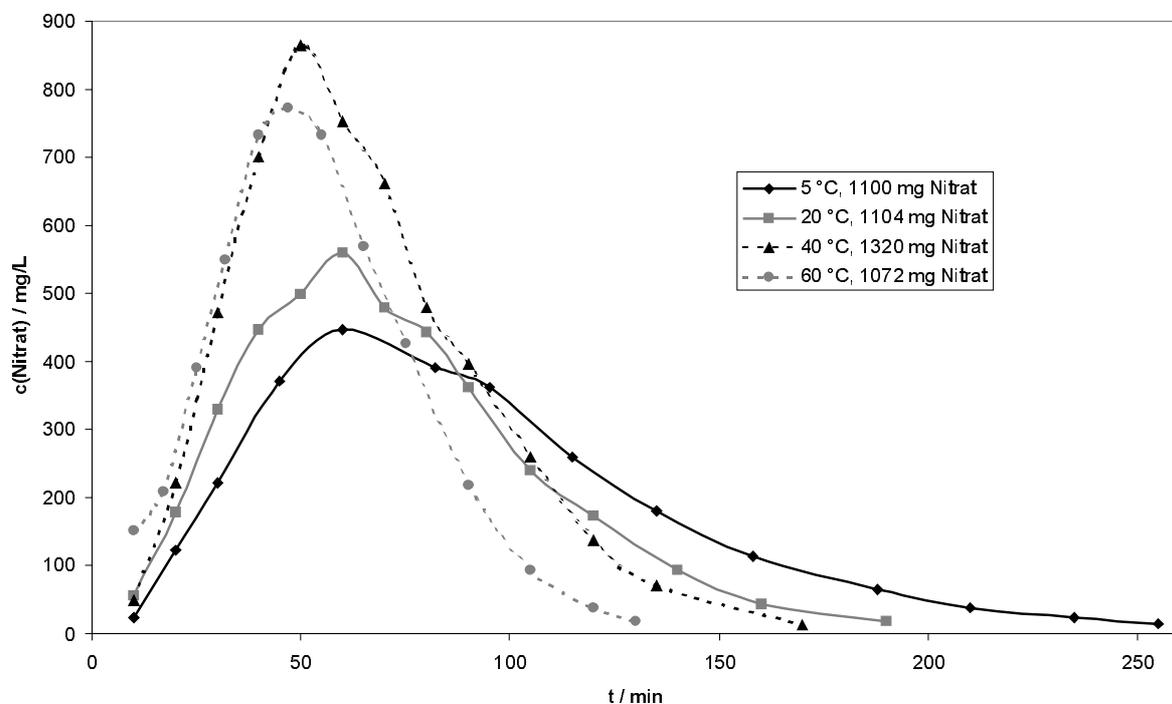


Abbildung 23: Nitratkonzentration am Ablauf der Chromatographie-Säule während der Regeneration bei verschiedenen Temperaturen, 35 g/L NaCl, 220 mL Applexion Resin XA 455, Volumenstrom 6,8 BV/h

Offensichtlich erbringt eine Erhöhung der Temperatur bei der Regeneration des Harzes eine Verringerung des benötigten Volumens an Kochsalzlösung. In der graphischen Darstellung ist allerdings nicht berücksichtigt, dass die Beladung des Anionenaustauscherharzes mit Nitrat bei den verschiedenen Versuchen variierte. Deshalb wurden die benötigten Volumina an Eluent pro Gramm Nitrat und die Effektivität des eingesetzten Natriumchlorids berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Regeneration der Anionentauscherharzes bei verschiedenen Temperaturen,
 $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/L}$, Volumenstrom 6,8 BV/h

T / °C	Benötigter Eluent / L/g _{Nitrat}	Effektivität / mg _{Nitrat} /g _{NaCl}
5	5,6	5,1
20	4,1	6,9
40	3,0	9,5
60	3,0	9,5

Aus diesen Werten ist zu erkennen, dass eine Erhöhung der Temperatur des Eluenten auf 60 °C keine Verbesserung der Elution erbringt. Benötigtes Eluentenvolumen und Effektivität des Natriumchlorids sind identisch mit den bei 40 °C ermittelten Werten. Zudem zeigte sich während der Regeneration des Anionenaustauscherharzes bei einer Temperatur von 60 °C eine Blasenbildung im Harzbett, die das Strömungsverhalten und den Kontakt des Mediums mit dem Harz verschlechtert. Diesen Ergebnissen zufolge beträgt die optimale Temperatur für die Elution des Nitrats von dem Anionenaustauscherharz Applexion Resin XA 455 40 °C. Im Laborversuch erfolgte die Temperierung der Elutionsmittels dabei nur über den Säulenmantel. Aufgrund des kleineren Verhältnisses von Manteloberfläche zum Volumen bei einer Säule, wie sie im industriellen Maßstab eingesetzt wird, sollte der Eluent bei einer solchen Anwendung vortemperiert werden, da ansonsten ein deutlicher Temperaturgradient innerhalb des Harzbettes zu erwarten ist. In einem industriellen Prozess ist es eventuell ökonomisch sinnvoll, nur eine Teilelution durch zu führen [38]. Dieser Vorteil ergibt sich aus der Tatsache, dass die Elution mit fortschreitender Regeneration des Harzes langsamer verläuft, also ein Tailing aufweist. So kann man durch Integration der Regenerationskurven errechnen, dass beispielsweise im Fall der Regeneration bei 40 °C für die Elution von 95% des Nitrats nur 80% der Kochsalzlösung der vollständigen Regeneration benötigt werden. Eine Entfernung von 80% des gebundenen Nitrats ist bereits durch 52% des Eluenten zu erreichen. Die ökonomischen Vorteile sind allerdings nur für eine allein betriebene Ionenaustauscheranlage beschrieben. Im Fall der Kombination der Chromatographie mit einer mikrobiellen Denitrifikation ergibt sich hier kein Vorteil durch Einsparungen bei der Menge des Eluenten, da dieser wieder aufgearbeitet wird, weshalb eine Teilregeneration des Anionenaustauscherharzes hier nicht näher untersucht wurde.

4.4 Vergleich von Rührkesselkaskade und Chromatographiesäule

Um die Abreicherung in der vierstufigen Rührkesselkaskade und der Chromatographiesäule vergleichen zu können, wurden jeweils Versuche ausgewählt, die bei Raumtemperatur durchgeführt wurden. Um die Nitratabreicherung in der Rührkesselkaskade und der Chromatographiesäule vergleichen zu können, mussten unterschiedliche Ausgangskonzentrationen des Nitrats im Molkenkonzentrat, Volumenströme und Harzmengen bei beiden Versuchen relativiert werden. Hierzu wurde die relative Abreicherung am Ablauf der Säule respektive der Rührkesselkaskade gegen das abgereicherte Volumen an Molkenkonzentrat, bezogen auf die eingesetzte Harzmenge, aufgetragen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

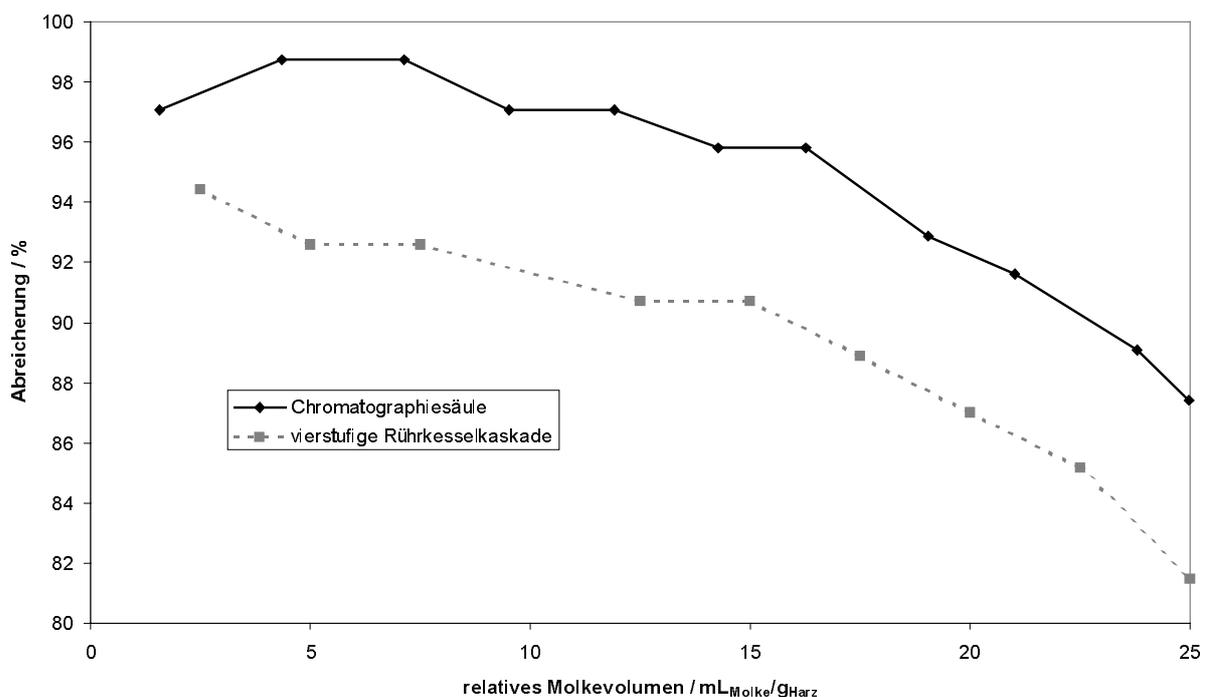


Abbildung 24: Vergleich der Nitratabreicherung von Molkenkonzentrat in einer Chromatographiesäule (145 g Applexion Resin XA 455, Volumenstrom 11,5 mL/min, 238 mg/L Nitrat) und einer vierstufigen Rührkesselkaskade (120 g Purolite A 520E, Volumenstrom 20 mL/min, 178 mg/L Nitrat) bei Raumtemperatur

Beide Reaktortypen zeigen ein ähnliches Abreicherungsverhalten. Die Tatsache, dass im Fall der Rührkesselkaskade eine geringere Abreicherung erzielt wurde, ist damit zu begründen, dass der Volumenstrom bezogen auf die eingesetzte

Harzmenge mit 5 BV/h deutlich größer war als bei der Säule mit 3 BV/h, was in der obigen Abbildung nicht berücksichtigt werden kann.

Trotz eines vergleichbaren Abreicherungsverhaltens ist für eine industrielle Anwendung die Chromatographiesäule einer Rührkesselkaskade vorzuziehen. Dieses ist zum Einen in der Problematik des Scale-Ups begründet. Während Chromatographiesäulen in einem Bereich bis zu 100 m³ zum industriellen Standard gehören, liegen entsprechende Daten für Rührkesselkaskaden nicht vor. Des Weiteren können die Fraktionen beim Wechsel von Beladung zur Regeneration mit zwischenzeitlichen Spülgängen aufgrund der Vermischung in den einzelnen Kesseln nicht, wie bei einer Chromatographiesäule, scharf getrennt werden, was zu Verlusten führt. Auch die mechanische Belastung des Anionenaustauscherharzes durch die Rührwerke einer Rührkesselkaskade ist als kritischer Punkt anzusehen.

Abschließend soll noch das Regenerationsverhalten der beiden Reaktortypen betrachtet werden. Um auch in diesem Fall variierende Parameter bei beiden Versuchen auszugleichen, wurde die Nitratkonzentration am Ablauf der Reaktoren, bezogen auf die absolute Nitratbelastung des Harzes, gegen das Eluentenvolumen, bezogen auf die eingesetzte Harzmenge, aufgetragen. Dieses ist in der folgenden Abbildung 25 dargestellt.

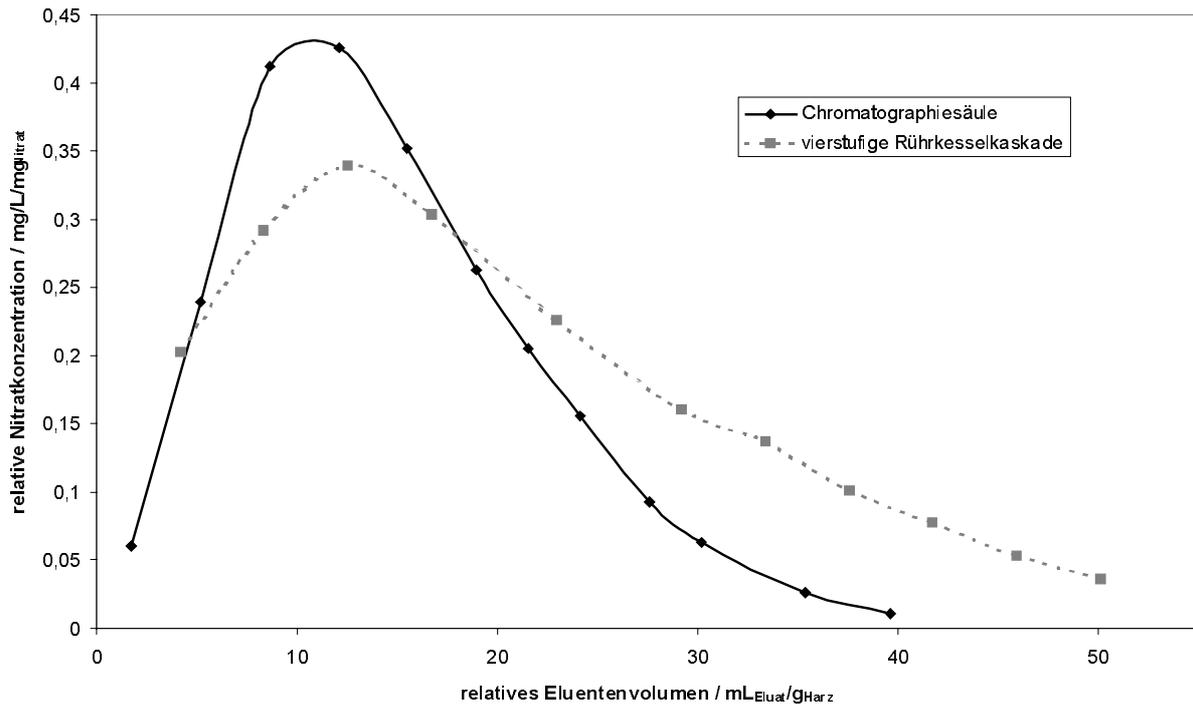


Abbildung 25: Vergleich der Regeneration von Anionenaustauscherharz mit Natriumchloridlösung (35 g/L) in einer Chromatographiesäule (145 g Applexion Resin XA 455, 764 mg Nitrat, Volumenstrom 25 mL/min) und einer vierstufigen Rührkesselkaskade (120 g Purolite A 520E, 427 mg Nitrat, Volumenstrom 16,7 mL/min) bei Raumtemperatur

Der Nitrat-Peak ist im Fall der Chromatographiesäule deutlich schärfer. Das bedeutet, dass eine Regeneration schneller und mit einem geringeren Eluentenvolumen durchzuführen ist als im Falle der Rührkesselkaskade. Dieses ist besonders in Hinblick auf eine mikrobielle Denitrifikation des Eluats von Bedeutung, aber auch bei einer reinen Nitratbreicherung durch Anionenaustauscherharze sinken so die Kosten für die Beseitigung des Regenerationsmittels.

5 Mikrobielle Denitrifikation

In dem folgenden Kapitel wird die Denitrifikation durch *P. denitrificans* (DSM 413) untersucht. Vergleichend wurden Experimente mit einem ähnlichen Stamm, *P. pantotrophus* (DSM 65), durchgeführt, der bis vor wenigen Jahren ebenfalls unter dem Namen *P. denitrificans* geführt wurde. *P. pantotrophus* zeichnet sich nach Literaturangaben durch eine geringere Neigung zur Nitritakkumulation aus [30]. In Hinblick auf eine Kombination der Nitratabreicherung in Molkenkonzentrat mittels stark basischen Anionenaustauscherharzen und der mikrobiellen Denitrifikation des Eluats dieser chromatographischen Stufe, wurden die Untersuchungen besonders in Gegenwart hoher Kochsalzkonzentrationen durchgeführt. Es erfolgten aber auch Versuche zur direkten mikrobiellen Denitrifikation von Molkenkonzentrat mittels immobilisierter Bakterien.

5.1 Kultivierung und Stammhaltung

Die Kultivierung der für die Denitrifikation erforderlichen Biomassen erfolgte jeweils unmittelbar vor den Versuchen zum Nitratabbau. Als Voraussetzung für die erfolgreiche Anzucht der Bakterien musste zunächst das Wachstum von *P. denitrificans* in dem verwendeten Medium und unter den vorliegenden Kultivierungsbedingungen untersucht werden.

5.1.1 Durchführung

Für die Kultivierung von *P. denitrificans* und *P. pantotrophus* wurde das für diese Bakterienstämme von der DSMZ empfohlene, komplexe Kulturmedium verwendet [84], welches als Hauptbestandteile Pepton und Fleischextrakt enthält. Der pH-Wert wurde durch Zusatz eines Phosphatpuffers auf 7,4 eingestellt. Für alle Kultivierungen unter anaeroben Bedingungen wurden dem Medium außerdem 5 g/L Kaliumnitrat zugegeben. Die genaue Zusammensetzung ist Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Komplexes Kulturmedium für die Kultivierung von *P. denitrificans* und *P. pantotrophus* [84]

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

Das Medium wurde 30 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Dabei sank der pH-Wert geringfügig ab. Für die Herstellung von Agarplatten zur Stammhaltung wurde das Medium vor dem Autoklavieren mit etwa 16 g/L Agar-Agar versetzt. Die Agarplatten wurden nach dem Beimpfen für 48 h bei 30 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Nach ca. vierwöchiger Lagerung wurde auf neue Agarplatten über geimpft.

Um die erforderlichen Biomassen für die Nitratabbau-Versuche anzuziehen, wurden die Agarkulturen zum Anlegen von Vorkulturen verwendet, welche in 2 mL-Mikroreaktionsgefäßen der Fa. Eppendorf 24 Stunden bei 28 °C und 120 rpm im Inkubationsschüttler bebrütet wurden. Die somit erhaltenen Zellsuspensionen dienten anschließend zum Animpfen der Schüttelkulturen, wobei mit jeweils einem Hundertstel des zu kultivierenden Volumens beimpft wurde.

Als Kulturgefäße wurden Schraubverschlusskolben (100 mL) mit Schikanen verwendet. Für aerobe Kulturen wurden diese mit je 30 mL Medium beschickt. Der Deckel wurde nur lose aufgesetzt. Für Kultivierungen unter anaeroben Bedingungen wurden die Kolben vollständig mit 100 mL Medium gefüllt und anschließend dicht verschlossen. Für Versuche, bei denen größere Mengen an Biomasse benötigt wurden, erfolgte die Kultivierung in 1 L-Schottflaschen ohne Schikanen mit Schraubverschluss, beziehungsweise in einem 5 L-Schüttelkolben mit Schikanen, der luftdicht verschlossen wurde. Die Beimpfung erfolgte dabei aus einer zweiten Vorkultur, die in 100 mL-Kolben gezogen wurde.

Für die Untersuchungen zum Zellwachstum wurden die Kolben mit einem Silikonseptum verschlossen um Probennahmen unter anaeroben Bedingungen zu ermöglichen.

Nach Erreichen der maximalen optischen Dichte wurden die Zellen durch Zentrifugieren geerntet und nach zweimaligem Waschen mit physiologischer Natriumchloridlösung in den Denitrifikationsversuchen eingesetzt.

Das in dieser Arbeit verwendete Medium wies eine gelbe Färbung auf, das heißt, es absorbiert blaues Licht. Die Messungen der optischen Dichte zur Bestimmung der Zelldichte erfolgten deshalb im roten Bereich des sichtbaren Lichts bei einer Wellenlänge von 660 nm. Sie wurden in einem Zweistrahlphotometer (Kontron Instruments, Unikon Spektrometer 922) gegen eine physiologische Kochsalzlösung (9 g/L NaCl) durchgeführt. Auch eine Verdünnung der Proben bei zu hohen Zelldichten, die eine Abweichung vom Lambert-Beerschen Gesetz zur Folge hätten, erfolgte mit einer physiologischen Kochsalzlösung, da die Absorption des Mediums bei der verwendeten Wellenlänge zu vernachlässigen war. Zur Bestimmung der Korrelation zwischen Zelldichte und scheinbarer Extinktion wurden Proben mit verschiedener Zelldichte vermessen und anschließend die Biotrockenmasse nach Waschen mit dest. Wasser und Trocknen der Zellen bei 105 °C ausgewogen. Der so erhaltene Zusammenhang zwischen Zelldichte und scheinbarer Extinktion ist in Abbildung 26 für *P. denitrificans* dargestellt.

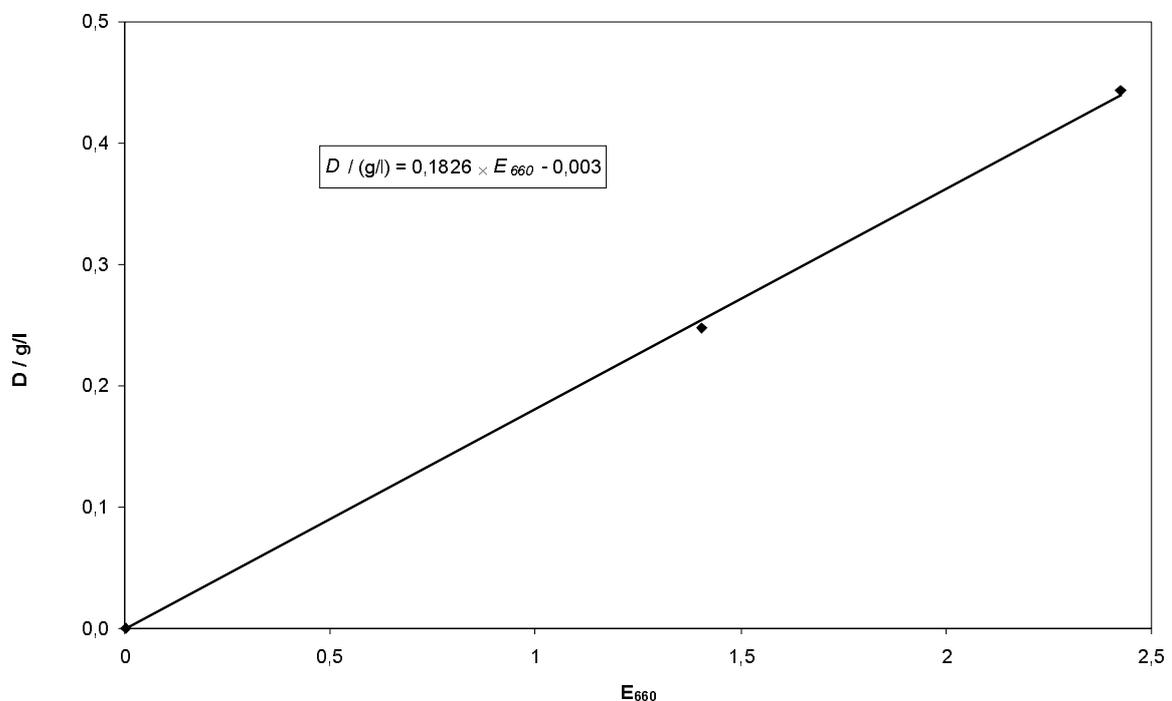


Abbildung 26: Bestimmung der Zelldichte D einer Bakteriensuspension von *P. denitrificans* aus der Extinktion bei 660 nm [85]

Die in der Abbildung dargestellte Formel der Ausgleichsgerade wurde durch lineare Regression bestimmt und wird im Folgenden zur Berechnung der Zelldichte herangezogen. Im Falle des ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismus *P. pantotrophus* wurde der Korrelationsfaktor zwischen Zelldichte und scheinbarer Extinktion zu 0,2441 bestimmt [48].

5.1.2 Wachstum von *Paracoccus denitrificans* und *P. pantotrophus*

Es ist bekannt, dass *P. denitrificans* als fakultativ anaerobes Bakterium sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen zu kultivieren ist. Es musste daher untersucht werden, welche Wachstumsbedingungen im Hinblick auf den Einsatz der Bakterien in einer Denitrifikation besser geeignet sind. Erhöhte Salzgehalte hemmen das Wachstum von *P. denitrificans*. Bei Konzentrationen ab 50 g/L Natriumchlorid wächst dieser Mikroorganismus nach Literaturangaben nur noch geringfügig [45]. Kultivierungen mit Zusatz von Kochsalz zum Medium sollten zeigen, inwieweit bereits Salzgehalte von 25 g/L einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum ausüben.

Abbildung 27 zeigt die zeitliche Entwicklung der Zelldichte D während der Kultivierungen unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit und ohne Zusatz von Natriumchlorid.

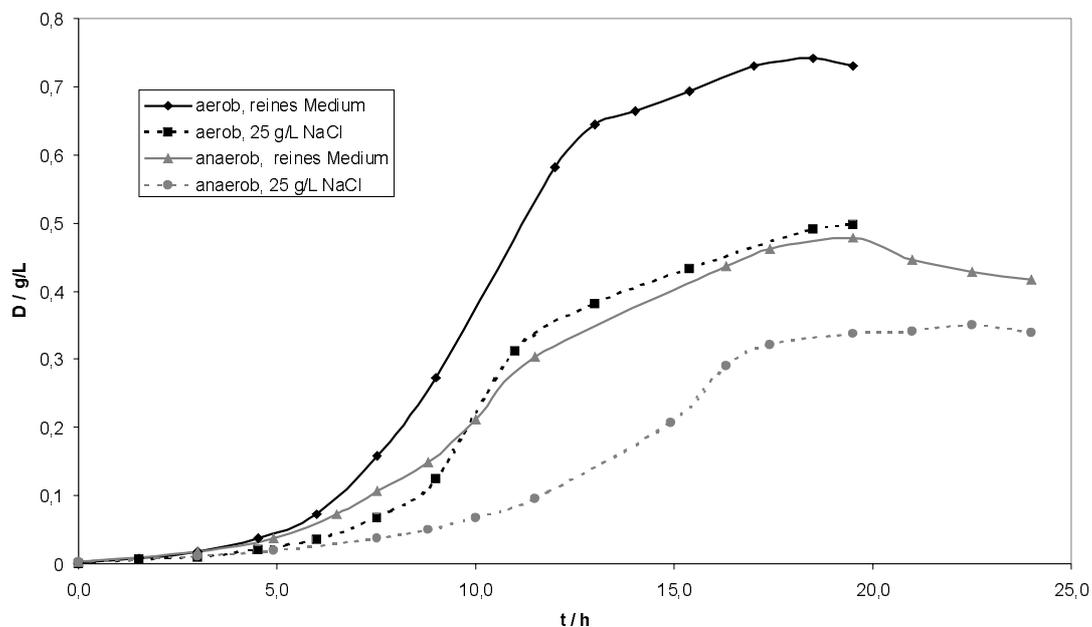


Abbildung 27: Wachstum von *P. denitrificans*, 28 °C, 120 rpm, Komplexmedium, pH 7,4 nach [85]

Aus den aufgezeichneten Wachstumskurven lassen sich die in Kapitel 8.1 beschriebenen Wachstumsparameter berechnen, die in Tabelle 7 zusammengefasst sind.

Tabelle 7: Parameter des aeroben und des anaeroben Wachstums von *P. denitrificans* jeweils mit und ohne Zusatz von 25 g/L Natriumchlorid zum Kulturmedium [85]

	aerob		anaerob	
	ohne NaCl	25 g/L NaCl	ohne NaCl	25 g/L NaCl
μ / h^{-1}	0,49	0,41	0,34	0,24
t_d / h	1,41	1,69	2,04	2,89
$X / \text{g}_{\text{TM}}/\text{L}$	0,74	0,50	0,48	0,35
t_1 / h	0,02	0,03	0,09	0,00

Die Bakterienkulturen erreichten sowohl bei aerobem, als auch bei anaerobem Wachstum nach etwa 19 Stunden ihre maximale optische Dichte. Die Kurven fallen danach allerdings wieder ab, ohne einen konstanten Wert zu erreichen. In der Literatur [86] wird für das Wachstum von *P. denitrificans* ein Rückgang der scheinbaren Extinktion und Trockenmasse bei gleichbleibender Zellzahl während der stationären Phase beschrieben. Dieses Verhalten ist vermutlich auf die Verwendung von Speicherstoffen zur endogenen Atmung zurückzuführen.

Der Zusatz von 25 g/L Natriumchlorid zum Kulturmedium resultierte in einer Verringerung der Biotrockenmasse um etwa ein Drittel. Da keine positiven Effekte durch eine Gewöhnung der Bakterien an erhöhte Salzkonzentrationen zu erwarten sind, welche die gravierenden Nachteile des gehemmten Wachstums übertreffen, wurden die Kultivierungen im Weiteren ohne Zusatz von Natriumchlorid durchgeführt. Ein Vergleich des aeroben und anaeroben Wachstums zeigt, dass eine sauerstoffhaltige Umgebung beim Wachstum in signifikant höheren Biomassen resultiert. In späteren Versuchen konnte allerdings gezeigt werden, dass die so gewonnenen Zellen für den Nitratabbau aufgrund ihrer Neigung zur Nitritakkumulation nicht geeignet sind. Daher wurde die Wachstumskurve für den zweiten verwendeten Bakterienstamm, *P. pantotrophus*, nur unter anaeroben Bedingungen aufgezeichnet. Abbildung 28 stellt den zeitlichen Verlauf der Zelldichte während der Kultivierung für diesen Mikroorganismus dar.

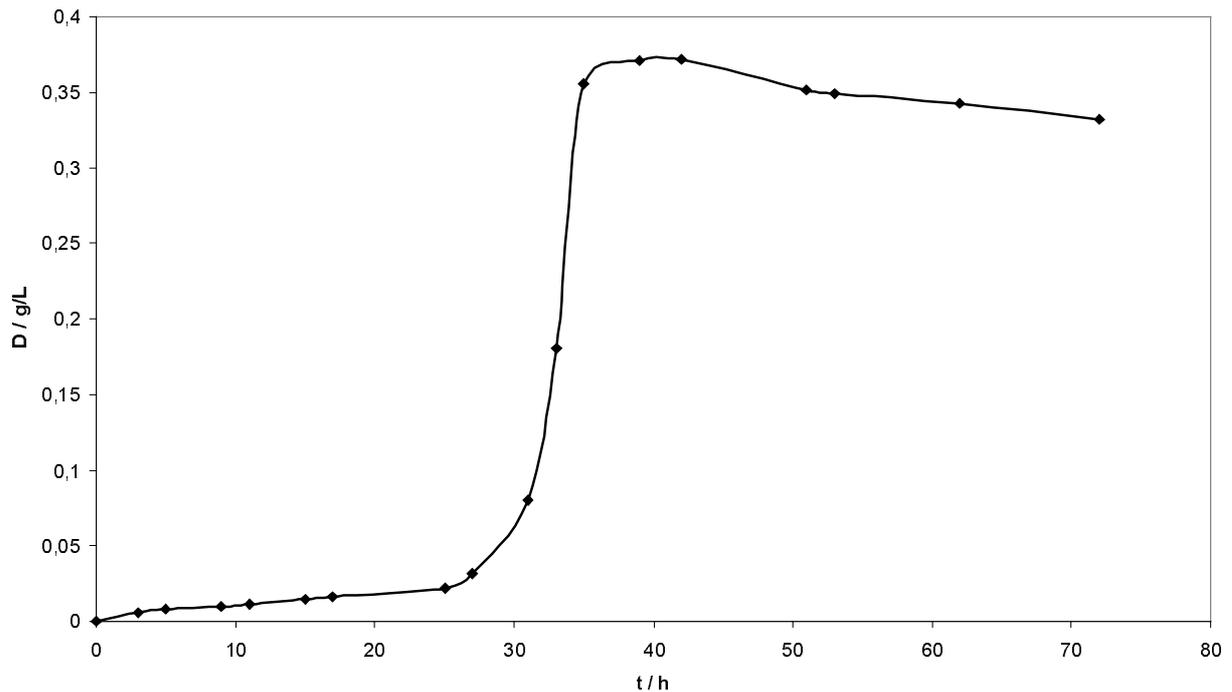


Abbildung 28: Anaerobes Wachstum von *P. pantotrophus*, 28 °C, 120 rpm, Komplexmedium, pH 7,4 nach [48]

Die maximale Zelldichte wird in diesem Fall erst nach ca. 40 h erreicht. Auch die Wachstumsparameter unter gleichen Bedingungen fallen ungünstiger aus, wie der Vergleich in Tabelle 8 zeigt.

Tabelle 8: Parameter des anaeroben Wachstums von *P. denitrificans* und *P. pantotrophus*

	<i>P. pantotrophus</i>	<i>P. denitrificans</i>
μ / h^{-1}	0,29	0,34
t_d / h	2,39	2,04
$X / \text{g}_{\text{TM}}/\text{L}$	0,38	0,48
t_1 / h	0,50	0,09

5.2 Optimierung der Denitrifikationsbedingungen

Neben den oben beschriebenen Wachstumsbedingungen sollten die grundlegenden Parameter für die Denitrifikation, also der Einfluss von Kohlenstoffquellen, Puffersystemen, Temperatur und Salzkonzentration bestimmt werden.

Die Kultivierung der für den Nitratabbau benötigten Biomassen erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, wie in Kapitel 5.1.1 dargestellt unter anaeroben Bedingungen.

Die 19 Stunden kultivierten Zellen wurden durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 4000 rpm geerntet, je einmal mit physiologischer Kochsalzlösung und der kochsalzhaltigen Versuchslösung gewaschen und anschließend in letzterer suspendiert. Die Zelldichten dieser Suspensionen lagen bei $D = 0,25 \text{ g}_{\text{TM}}/\text{L}$. Die Versuche wurden in verschließbaren 2 mL-Mikroreaktionsgefäßen der Firma Eppendorf durchgeführt. Sofern keine anderen Salzkonzentrationen oder Temperaturen angegeben sind, erfolgte der Nitratabbau in einer physiologischen Kochsalzlösung (9 g/L NaCl) und bei Raumtemperatur (20 °C). Zur Stabilisierung des pH-Wertes 7,5 enthielten die Lösungen 0,28 g/L KH_2PO_4 und 1,456 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,01 M Phosphat). Der Nitratgehalt wurde durch Zugabe von Kaliumnitrat auf 80 mg/L eingestellt. Unmittelbar nach dem Befüllen mit je 2 mL dieser Suspension wurden die Reaktionsgefäße verschlossen und gegebenenfalls im Inkubationsschüttler auf die Reaktionstemperatur gebracht. Aufgrund der geringen Reaktionsvolumina ist von einer raschen Einstellung der gewünschten Reaktionstemperatur auszugehen. Vor der Bestimmung des Nitratgehaltes sowie der Konzentration des Zwischenproduktes Nitrit wurden die Zellen durch 1,5 min Zentrifugieren bei $16\,000 \text{ U min}^{-1}$ von der Lösung getrennt.

5.2.1 Einfluss der Wachstumsbedingungen

Obschon aerobe Wachstumsbedingungen in höheren Biomassen resultieren als anaerobe Kulturen (Kapitel 5.1.2), kann sich bei der Verwendung dieser Zellen für die Denitrifikation das Problem stellen, dass die entsprechenden Enzymsysteme bei der für den Nitratabbau notwendigen Umstellung auf anaerobe Bedingungen nicht sofort zur Verfügung stehen [87]. Insbesondere von der Nitritreduktase ist bekannt, dass die Bildung erst mit 1,5stündiger Verzögerung einsetzt [44, 46]. Durch einen Vergleich der Denitrifikation von aerob beziehungsweise anaerob kultivierten Zellen sollte die Dauer dieser Induktionsphase untersucht werden (Abbildung 29).

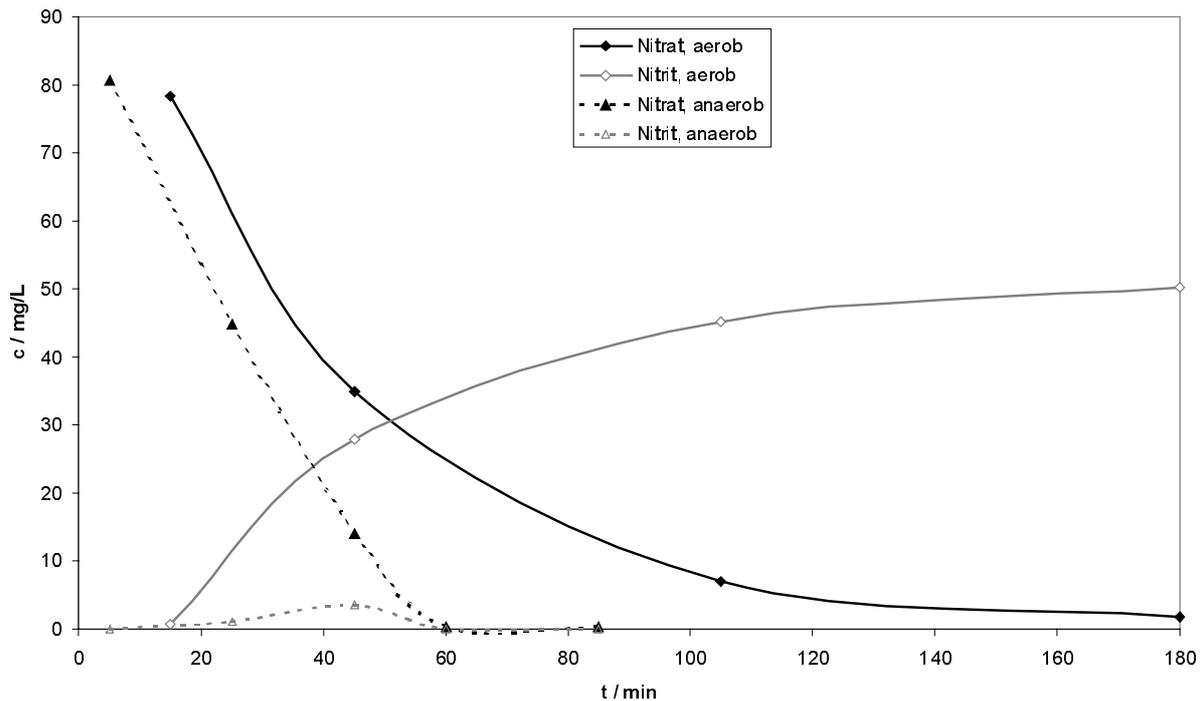


Abbildung 29: Nitrat- und Nitritkonzentrationen bei der Denitrifikation mit aerob und anaerob gewachsenen Zellen von *P. denitrificans*, 20 °C, Acetat als Elektronendonator, physiologische Kochsalzlösung (0,9%), pH 7,5

Es ist zu erkennen, dass der Nitratabbau durch anaerob gewachsene Zellen rasch und nahezu linear verläuft, ohne dass es zur Bildung nennenswerter Nitritkonzentrationen kommt. Im Fall der aerob kultivierten Zellen hingegen verläuft der Nitratabbau mit abnehmender Geschwindigkeit. Dieses ist wahrscheinlich auf eine Vergiftung der Zellen durch Nitrit zurück zu führen, dessen Konzentration im gesamten, dreistündigen Versuchszeitraum ansteigt. Berücksichtigt man die geringere Molmasse von Nitrit (aus 1 g Nitrat entstehen 0,74 g Nitrit), kann man schließen, dass die Denitrifikation durch aerob gewachsene Zellen von *P. denitrificans* auf der Stufe des Nitrits stehen bleibt und durch die akkumulierten Nitritmengen selbsthemmend verläuft, da die Expression der Nitritreduktase nicht oder erst mit mehr als dreistündiger Verzögerung erfolgt. Die Verwendung von aerob kultivierten Zellen ist deshalb zur Erreichung der in dieser Arbeit verfolgten Ziele nicht möglich.

5.2.2 Einfluss der Kohlenstoffquelle

Da bei der mikrobiellen Denitrifikation Nitrat als terminaler Elektronenakzeptor des Energiestoffwechsels verwendet wird, ist auch die Gegenwart eines

Elektronendonators in Form einer Kohlenstoffquelle notwendig. Der Nitratabbau verläuft unter Verwendung von Acetat als Kohlenstoffquelle schneller als mit Glucose, Ethanol oder Methanol [2]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden außer Acetat auch Molke, der Molkenbestandteil Lactose sowie Lactat bezüglich ihrer Eignung als Elektronendonator für die Denitrifikation untersucht. Die Nitratlösung wurde dazu vor Versuchsbeginn mit 250 mg/L des Elektronendonors versetzt. Im Fall der Molke wurden 50 mL je Liter Versuchslösung zugegeben, das entspricht ca. 230 mg/L an Lactose.

Die erhaltenen Nitratabbaukurven sind im Anhang dargestellt. Sie weisen zu Versuchsbeginn unterschiedliche Verläufe auf, was mit der Adaption der Zellen an die Versuchsbedingungen zu erklären ist. Um die Geschwindigkeiten des Nitratabbaus qualitativ miteinander vergleichen zu können, wurde die mittlere Abbaurate v_m berechnet, die als durchschnittliche Geschwindigkeit der Denitrifikation bezogen auf die Zelldichte zu verstehen ist.

$$v_m = \frac{c_0 - c_E}{t \cdot D} \quad \text{(Gleichung 8)}$$

- c_0 = Nitratkonzentration zu Versuchsbeginn in mg/L
- c_E = Nitratkonzentration in mg/L zu Versuchsende bzw. letzte gemessene Konzentration von mehr als 3 mg/L
- t = Dauer des Nitratabbaus in min
- D = Zelldichte in g_{TM}/L

Abbildung 30 zeigt die auf diese Weise erhaltenen mittleren Abbauraten für die Denitrifikation mit den verschiedenen Elektronendonatoren.

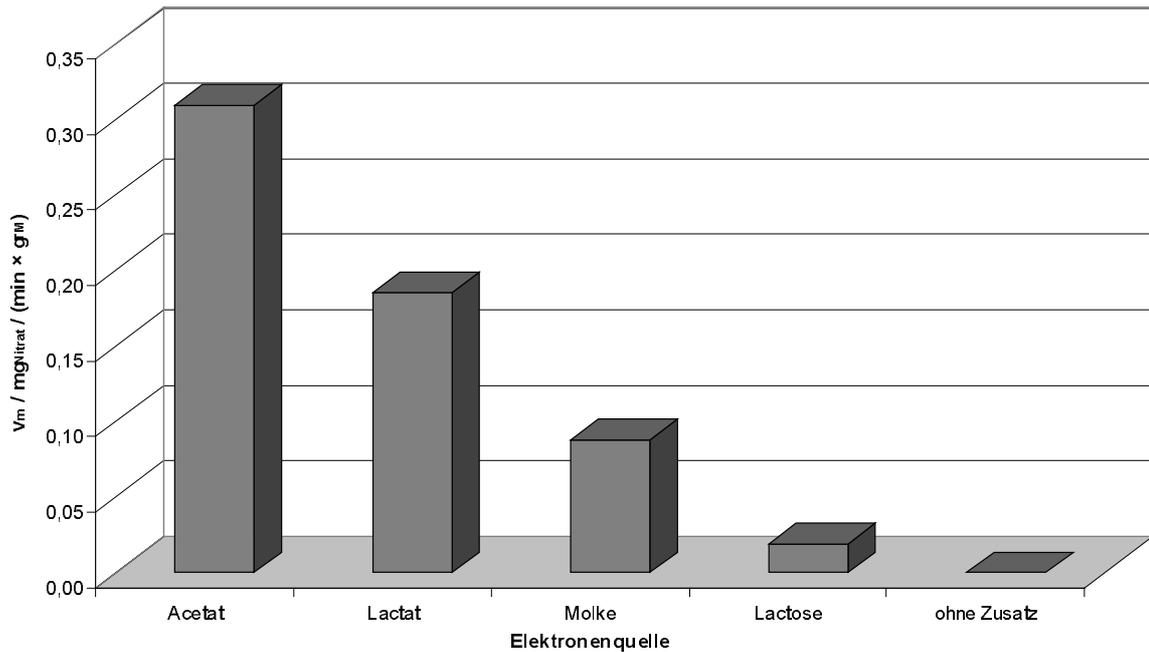


Abbildung 30: Mittlere Abbauraten für die Denitrifikation durch *P. denitrificans* mit verschiedenen Substraten als Elektronendonatoren, 20 °C, physiologische Kochsalzlösung (0,9%), pH 7,5, [85]

Acetat stellte sich von den untersuchten Kohlenstoffquellen als geeignetster Elektronendonator heraus. Neben der Tatsache, dass mit Acetat die höchste Abbaugeschwindigkeit erreicht wurde, war nur mit diesem Substrat im beobachteten Zeitraum ein vollständiger Nitratabbau möglich.

Die zwischenzeitlich auftretenden Nitritkonzentrationen waren im Allgemeinen gering. Nur im Fall des schnellen Nitratabbaus mit Acetat wurden vorübergehend Werte von bis zu 8 mg/L gemessen. Nach vollständiger Reduktion des Nitrates konnte aber auch hier kein Nitrit mehr nachgewiesen werden.

Für alle folgenden Versuche wurde daher Acetat als Elektronendonator verwendet. Die Reaktionsgleichung für diesen Prozess kann wie folgt formuliert werden [43]:



Um eine Limitierung der Reaktionsgeschwindigkeit durch dieses Substrat zu vermeiden, wurde mit 250 mg/L etwa das Fünffache der gemäß obiger Reaktionsgleichung theoretisch benötigten Acetatmenge eingesetzt. In weiteren Versuchen wurde die eingesetzte Substratkonzentration sowohl auf 125 mg/L

halbiert als auch auf 375 mg/L erhöht. Die erhaltenen Abbaukurven sind im Anhang dargestellt. Die Variationen der Acetatkonzentration zeigten keinen Einfluss auf den Nitratabbau. Bei Zugabe eines 2,5fachen stöchiometrischen Überschusses an Substrat ist somit keine Limitierung der Denitrifikation zu erwarten.

5.2.3 Einfluss des Puffers

Der optimale pH-Bereich des mikrobiellen Nitratabbaus liegt zwischen pH 7 und pH 8 [43]. Für den Nitratabbau durch das in dieser Arbeit verwendete Bakterium *P. denitrificans* wird in der Literatur ein optimaler pH-Wert von 7,5 angegeben [2], der durch Zusatz eines Phosphatpuffers eingestellt wurde. Um die Notwendigkeit dieser Pufferung zu überprüfen, wurde die Denitrifikation bei Raumtemperatur mit und ohne Pufferzusatz verglichen.

Zu Beginn des Versuches lag der pH-Wert der ungepufferten Versuchslösung bei 6,8 und stieg im Verlauf der Denitrifikation auf etwa 7,5. Dieser Anstieg ist auf den Verbrauch von Protonen bei der Reduktion des Nitrates zurückzuführen, wie in Kapitel 2.4 beschrieben. Die Steigerung des pH-Werts fällt geringer aus als nach der in Kapitel 5.2.2 dargestellten Reaktionsgleichung zu erwarten ist, was darauf zurück zu führen ist, dass auch das als Kohlenstoffquelle eingesetzte Acetat eine gewisse Pufferwirkung besitzt. Der zeitliche Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentrationen mit und ohne Pufferzusatz zur Versuchslösung ist in Abbildung 31 dargestellt.

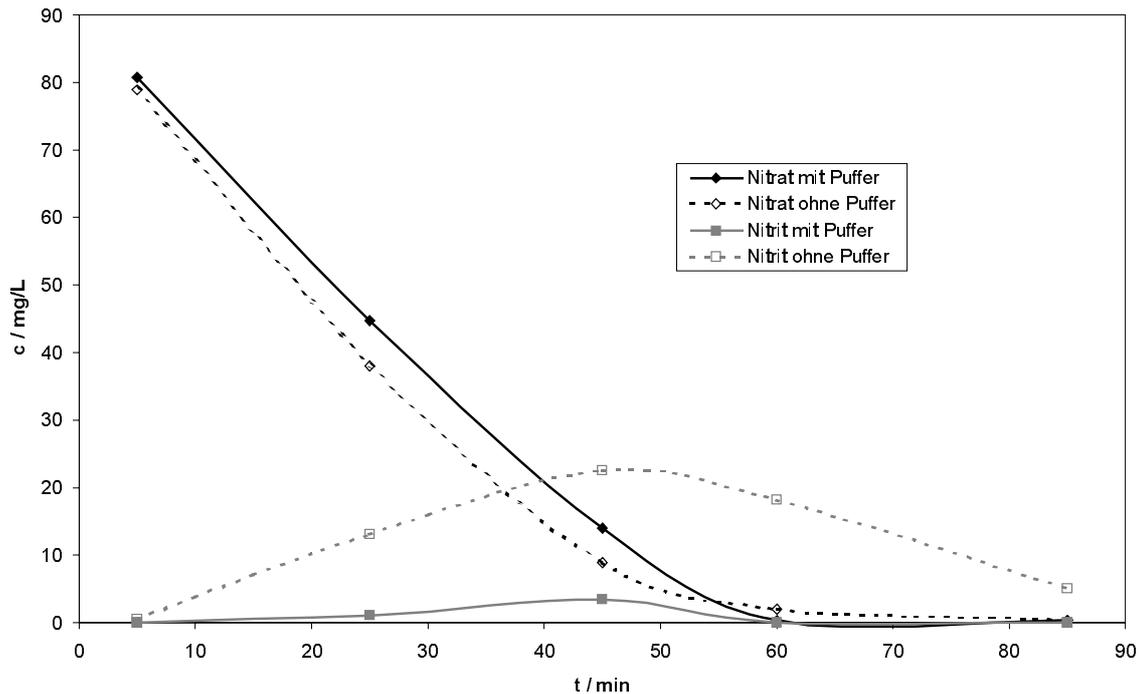


Abbildung 31: Einfluss des Puffers (pH 7,5) auf den Nitratabbau durch *P. denitrificans*, 20 °C, 250 mg/L Acetat, physiologische Kochsalzlösung (0,9%) [85]

Die Pufferung hat keinen nennenswerten Einfluss auf den Nitratabbau, beeinflusst aber sehr wohl den Folgeschritt des Nitritabbaus. In ungepufferter Reaktionslösung reichern sich erhebliche Nitritkonzentrationen an, die erst langsam abgebaut wurden nachdem die Denitrifikation quantitativ erfolgte. Dieses würde die benötigte Reaktionszeit unnötig verlängern, weshalb im Folgenden stets gepufferte Reaktionslösungen verwendet wurden. Die Beobachtungen lassen auf ein unterschiedliches Verhalten von Nitrat- und Nitritreduktase schließen, wie es in der Literatur auch für die autotrophe Denitrifikation von *P. denitrificans* mit Wasserstoff beschrieben wurde [88]. Für den Nitratabbau wurde hier ein geeigneter pH-Bereich von 5,8 bis 8,9 beschrieben, während die Nitritreduktion nur bei pH-Werten zwischen 7,2 und 8,7 schnell genug verläuft, um eine Akkumulation des Zwischenproduktes zu vermeiden.

5.2.4 Einfluss von Temperatur und Salzkonzentration

Im Hinblick auf die Kombination von chromatographischer Nitratabreicherung in Molkenkonzentrat und mikrobieller Denitrifikation, bei welcher der biologische Nitratabbau im Eluat aus der Anionenaustauscherstufe erfolgen soll, ist es notwendig, die Denitrifikation in Gegenwart erhöhter Salzkonzentrationen zu

untersuchen. Die Notwendigkeit möglichst hoher Natriumchloridkonzentrationen für eine effektive Regeneration der Anionenaustauscherharzes (vergleiche Kapitel 4.3.3) steht dabei einer bekannten Hemmung der Denitrifikation durch erhöhte Salzkonzentrationen gegenüber. So wurden für denitrifizierende Mischkulturen Verringerungen der Effektivität des Nitratabbaus von 40% bei einer Salzkonzentration von 30 g/L [89] beziehungsweise von 70% bei 50 g/L NaCl [90] beschrieben. Eine Erhöhung der Temperatur bis zu einem Optimum von 37 °C wird hingegen als beschleunigend auf die Denitrifikation beschrieben [2]. Es wurde daher der Nitratabbau durch *P. denitrificans* bei verschiedenen Temperaturen und Natriumchloridkonzentrationen untersucht, wie im Anhang dargestellt. Aus den Abbaukurven wurde, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, die Abbaurrate v_m bezogen auf die Zelldichte D berechnet. Diese Abbauraten sind in Abbildung 32 dargestellt.

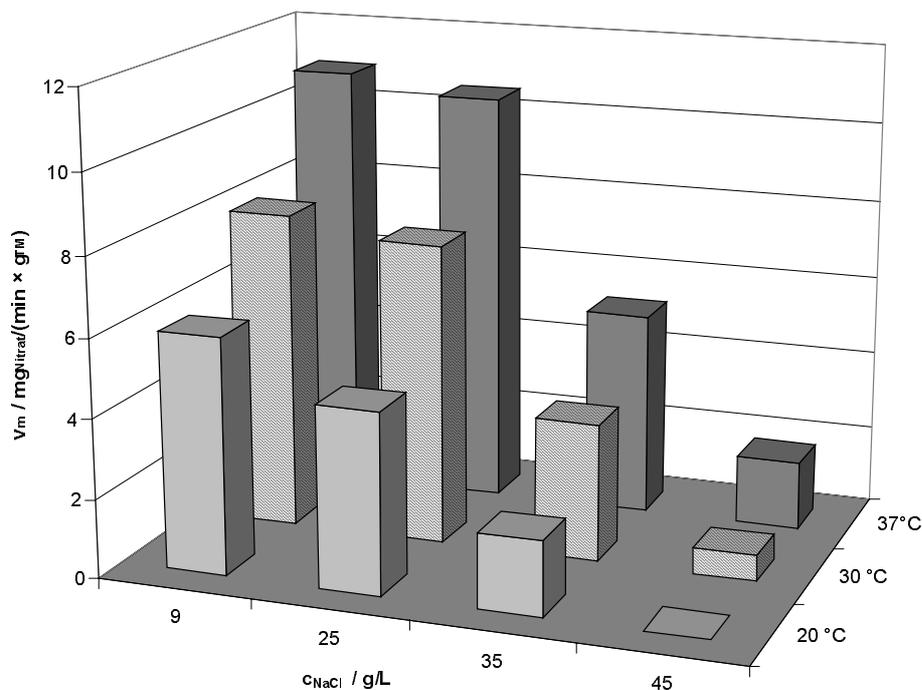


Abbildung 32: Mittlere Abbauraten der Denitrifikation durch *P. denitrificans* bei verschiedenen Temperaturen und Salzkonzentrationen, Kohlenstoffquelle Acetat, pH 7,5 [85]

Sowohl Salzkonzentration als auch Temperatur haben einen deutlichen Einfluss auf die Denitrifikationsgeschwindigkeit. Eine Salzkonzentration von 45 g/L erscheint nach diesen Versuchen als zu hoch, um noch eine effiziente Denitrifikation zu gewährleisten. Bei einer Konzentration von 35 g/L werden hingegen bei einer Temperatur von 37 °C noch Abbauraten erreicht, die mit denen in physiologischer Kochsalzlösung bei Raumtemperatur vergleichbar sind. Da, wie in Kapitel 4.3.3

beschrieben, mit Eluenten dieser Natriumchloridkonzentration eine effektive Regeneration des Anionenaustauscherharzes möglich ist, stellt sie einen geeigneten Kompromiss für die Kombination der Verfahren dar.

5.3 Kinetik der Denitrifikation

Die Kinetik des Nitratabbaus wurde bei den im vorigen Kapitel beschriebenen Bedingungen untersucht. Die Kultivierung der Mikroorganismen erfolgte unter anaeroben Bedingungen (Kapitel 5.1.1). Die Zellen wurden für diese Untersuchungen an die Versuchsbedingungen adaptiert, indem zum Einen die kochsalzhaltige Reaktionslösung vor dem Versuch auf die Reaktionstemperatur von 37 °C erwärmt wurde, und zum Anderen die Zellen vor dem Versuch bereits einmal mit Nitrat versetzt wurden. Nach der Zugabe von Nitrat und Acetat zu den in Natriumchloridlösung ($c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/L}$) suspendierten Zellen zum Zeitpunkt $t = 0$ wurden in regelmäßigen Abständen Proben durch einen Sterilfilter entnommen.

5.3.1 Nitratabbau durch *Paracoccus denitrificans*

Die zeitlichen Verläufe des Nitratabbaus durch *P. denitrificans* bei zwei verschiedenen Zelldichten sind in der folgenden Abbildung 33 dargestellt.

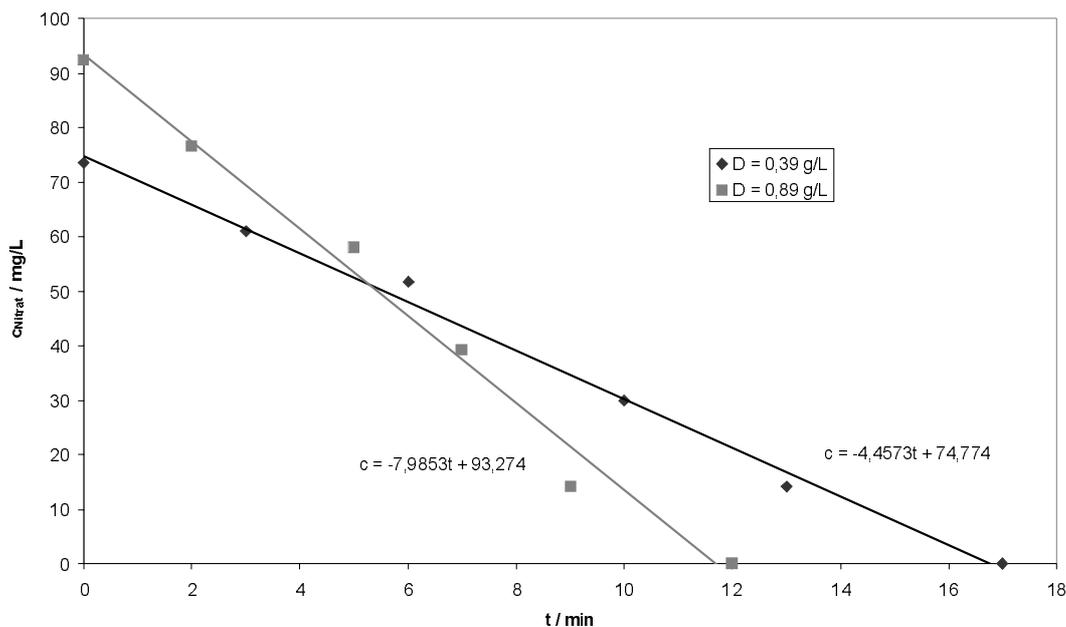


Abbildung 33: Verlauf der Denitrifikation durch *P. denitrificans* bei 37 °C, pH 7,5, $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/L}$, Acetat als Elektronendonator [85]

Es ist zu erkennen, dass die Denitrifikation einen linearen Verlauf nimmt, von dem auch bei geringen Nitratkonzentrationen keine Abweichung zu erkennen ist. Nach der in Kapitel 2.4.2 beschriebenen Enzymkinetik nach Michaelis-Menten bedeutet dieses, dass die Michaelis-Konstante K_m sehr klein sein muss und die Kinetik des Nitrat-Abbaus somit in dem analytisch zu erfassenden Konzentrationsbereich als Reaktion nullter Ordnung beschrieben werden kann. Auch bei kleinen Michaelis-Konstanten sind bei geringen Substrat-Konzentrationen Abweichungen vom linearen Verlauf zu erwarten, doch treten diese im vorliegenden Fall offensichtlich erst unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Analysesystems auf, die bei dem gegebenen Medium bei 6 mg/L liegt. Eine Ermittlung der Michaelis-Konstante ist deshalb für die Denitrifikation durch *P. denitrificans* nicht möglich. Integriert man das Geschwindigkeitsgesetz der Michaelis-Menten-Kinetik (Kapitel 2.4.2)

$$t = \frac{K_m \cdot \left(\ln \frac{c}{c_0} \right) + c - c_0}{v_{\max}} \quad \text{(Gleichung 9)}$$

und setzt in diese Gleichung als maximale Reaktionsgeschwindigkeit die durch lineare Regression ermittelte Geradensteigung (siehe Abbildung 33) ein, so kann man abschätzen, dass bei einer Michaelis-Konstante von $K_m = 2$ mg/L bereits Abweichungen vom linearen Verlauf sichtbar werden, die auch mit dem gegebenen Analysesystem zu detektieren wären. Die tatsächliche Michaelis-Konstante für den Nitrat-Abbau durch *P. denitrificans* unter den untersuchten Bedingungen muss also einen geringeren Wert als $K_m = 2$ mg/L aufweisen.

5.3.2 Einfluss der Zelldichte auf den Nitrat-Abbau

Für die Beurteilung des Einflusses der Zelldichte auf die Denitrifikation durch *P. denitrificans* ist es sinnvoll, eine auf die Zelldichte D bezogene Reaktionsgeschwindigkeit v_z einzuführen:

$$v_z = \frac{v}{D} = \frac{dm_{\text{Nitrat}}}{dt} \cdot \frac{1}{m_{\text{Zellen}}} \quad \text{(Gleichung 10)}$$

Wie schon im vorigen Abschnitt gesehen, ist die Geschwindigkeit der Denitrifikation v abhängig von der Zelldichte. Unter der Annahme, dass die Zellen nicht miteinander wechselwirken, sollte die auf die Zelldichte bezogene Reaktionsgeschwindigkeit v_z

unabhängig von der Zelldichte eine Konstante darstellen. In der Literatur wird für *P. denitrificans* angegeben, dass für Zelldichten bis zu $D = 130 \text{ g}_{\text{TM}}/\text{L}$ keine Verringerung der spezifischen Abbaurrate zu beobachten ist [91]. In der folgenden Abbildung 34 sind die auf die Zelldichte bezogenen Denitrifikationsgeschwindigkeiten bei Zelldichten von bis zu $1,6 \text{ g/L}$ aufgetragen.

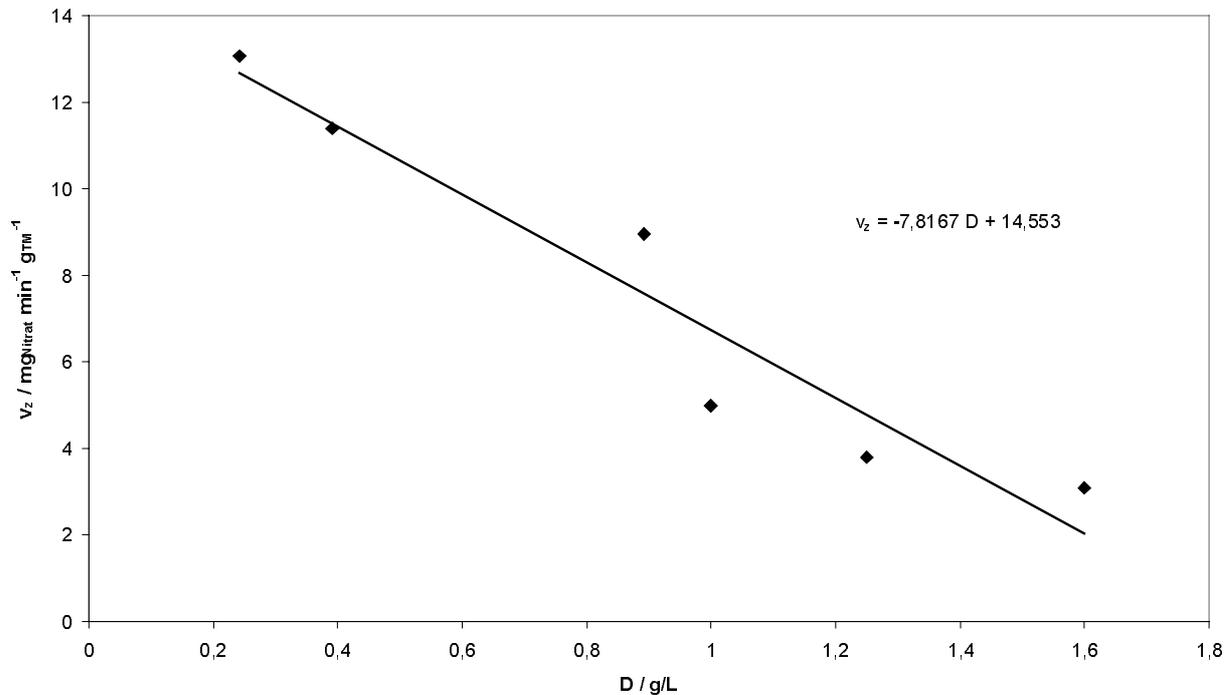


Abbildung 34: Abhängigkeit der auf die Zelldichte bezogenen Abbaugeschwindigkeit v_z von der Zelldichte D bei der Denitrifikation durch *P. denitrificans*, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 35 g/L NaCl , $\text{pH } 7,5$, Kohlenstoffquelle Acetat

Es ist zu erkennen, dass v_z keineswegs unabhängig von der Zelldichte ist, was möglicherweise auf die Ausscheidung von toxischen Stoffwechselprodukten zurück zu führen ist, welche die Aktivität der Mikroorganismen in hohen Konzentrationen beeinträchtigen. Postuliert man trotz der Streuung der Werte in erster Näherung einen linearen Zusammenhang zwischen spezifischer Reaktionsgeschwindigkeit und Zelldichte, so kann man durch Multiplikation der durch lineare Regression ermittelten Geradengleichung mit der Zelldichte eine Beziehung zwischen absoluter Reaktionsgeschwindigkeit und der Zelldichte voraussagen, wie sie in Abbildung 35 dargestellt ist.

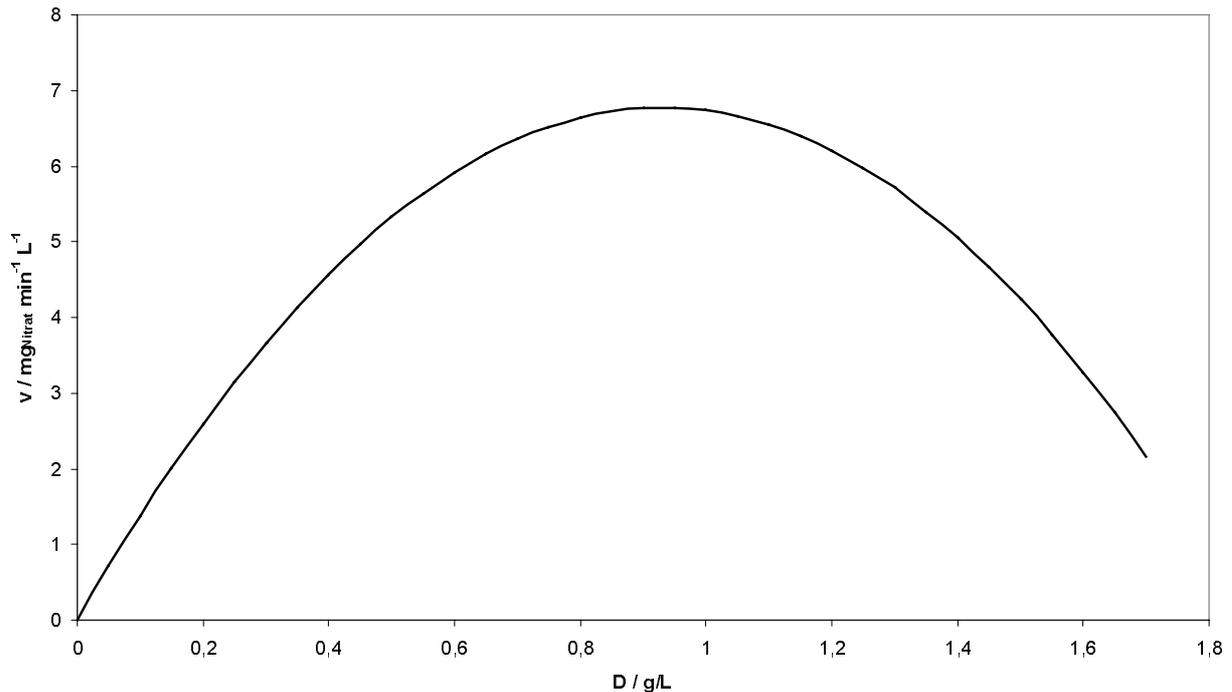


Abbildung 35: Theoretisch berechnete Abhängigkeit der Nitratabbaurate v von der Zelldichte für die Denitrifikation durch *P. denitrificans*, 37 °C, 35 g/L NaCl, pH 7,5, Kohlenstoffquelle Acetat

Hiernach wäre davon auszugehen, dass die Abbaugeschwindigkeit bei einer Zelldichte von $D = 0,95 \text{ g}_{\text{TM}}/\text{L}$ ein Maximum durchläuft, bevor die Reaktionsgeschwindigkeit bei höheren Zelldichten wieder absinkt. Die Tatsache, dass die ermittelten Abbauraten im Bereich zwischen 1,0 und 1,6 $\text{g}_{\text{TM}}/\text{L}$ annähernd konstant waren, lässt allerdings die Annahme des linearen Zusammenhangs zwischen der auf die Zelldichte bezogenen Reaktionsgeschwindigkeit und der Zelldichte und somit das postulierte Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Zelldichte von $D = 0,95 \text{ g}_{\text{TM}}/\text{L}$ zweifelhaft erscheinen. Die Ergebnisse weisen offensichtlich eine zu große Streuung auf, um hier einen gesicherten Zusammenhang aufzustellen. Es ist allerdings davon auszugehen, dass die Zelldichte nicht beliebig hoch gewählt werden kann, ohne dass es zu einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit kommt.

5.3.3 Einfluss des Zellalters auf den Nitratabbau

Um eventuelle Aktivitätsverluste der Zellen durch Lagerung zu bestimmen, wurden Versuche zum Nitratabbau über mehrere Tage wiederholt, wobei die Zellen zwischen den Versuchen unter anaeroben Bedingungen bei 4 °C gelagert wurden. Aus den

erhaltenen Abbaukurven wurde die Abbaugeschwindigkeit, bezogen auf die Zelldichte, ermittelt. Abbildung 36 stellt den Verlauf dieser Abbaurrate über einen Zeitraum von fünf Tagen dar.

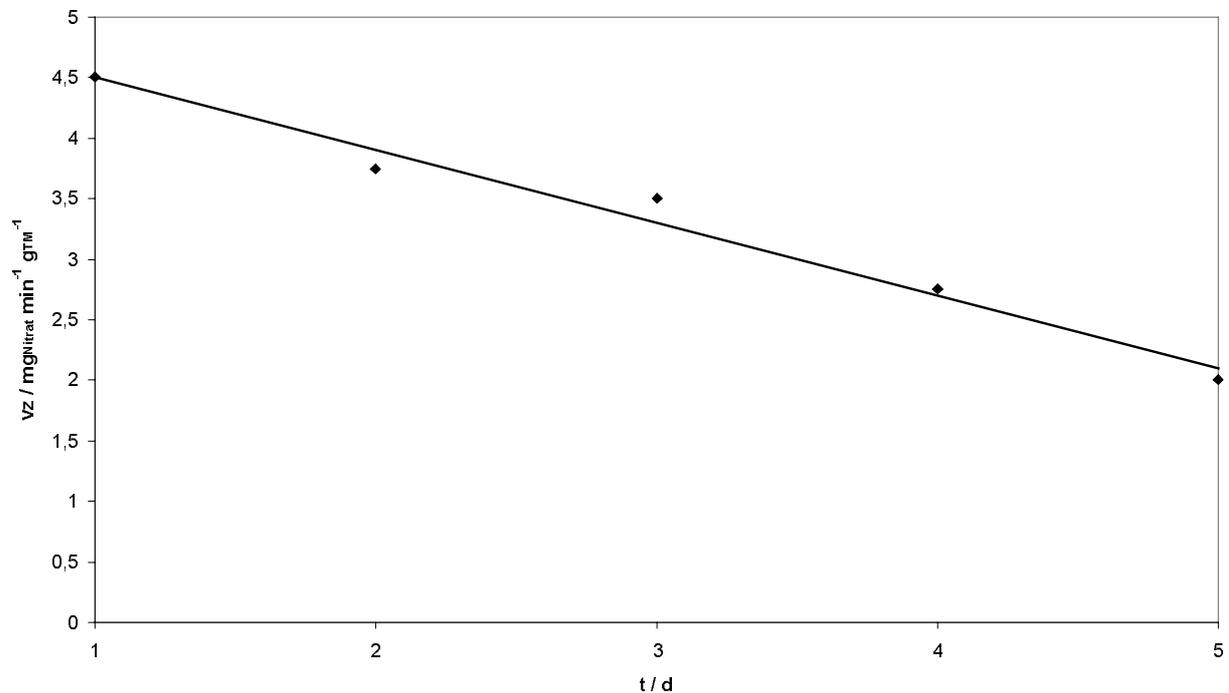


Abbildung 36: Abhängigkeit der Nitratabbaugeschwindigkeit vom Alter der Bakterien bei der Denitrifikation durch *P. denitrificans*, T = 37 °C, 35 g/L NaCl, D = 0,4 g/L, pH 7,4, Kohlenstoffquelle Acetat [48]

Wie zu erkennen ist, sinkt die Abbaugeschwindigkeit mit zunehmendem Alter der Zellen. Die Abnahme der Abbaurrate zeigt dabei einen linearen Verlauf. Aus der durch lineare Regression ermittelten Geradengleichung kann man einen Verlustfaktor α für die Aktivität der Zellen ermitteln. Der Aktivitätsverlust betrug im vorliegenden Fall 11,8% pro Tag über einen Zeitraum von fünf Tagen, das entspricht einem stündlichen Aktivitätsverlust von 0,5% des Ausgangswerts. Der Verlustfaktor bezogen auf eine Stunde beträgt also $\alpha = 0,995$. Dieser Verlustfaktor wird in Kapitel 6.2.2 zur Dimensionierung der biologischen Stufe eines industriellen Prozesses herangezogen.

5.3.4 Nitritakkumulation

Eine Abhängigkeit der Nitritakkumulation von der Zelldichte während des Nitratabbaus durch *P. denitrificans* ist bei der Verwendung frisch kultivierter Zellen nicht festzustellen. Es wurde allerdings ein Zusammenhang mit dem Alter der

verwendeten Bakterien beobachtet. Diese Abhängigkeit ist in Abbildung 37 dargestellt.

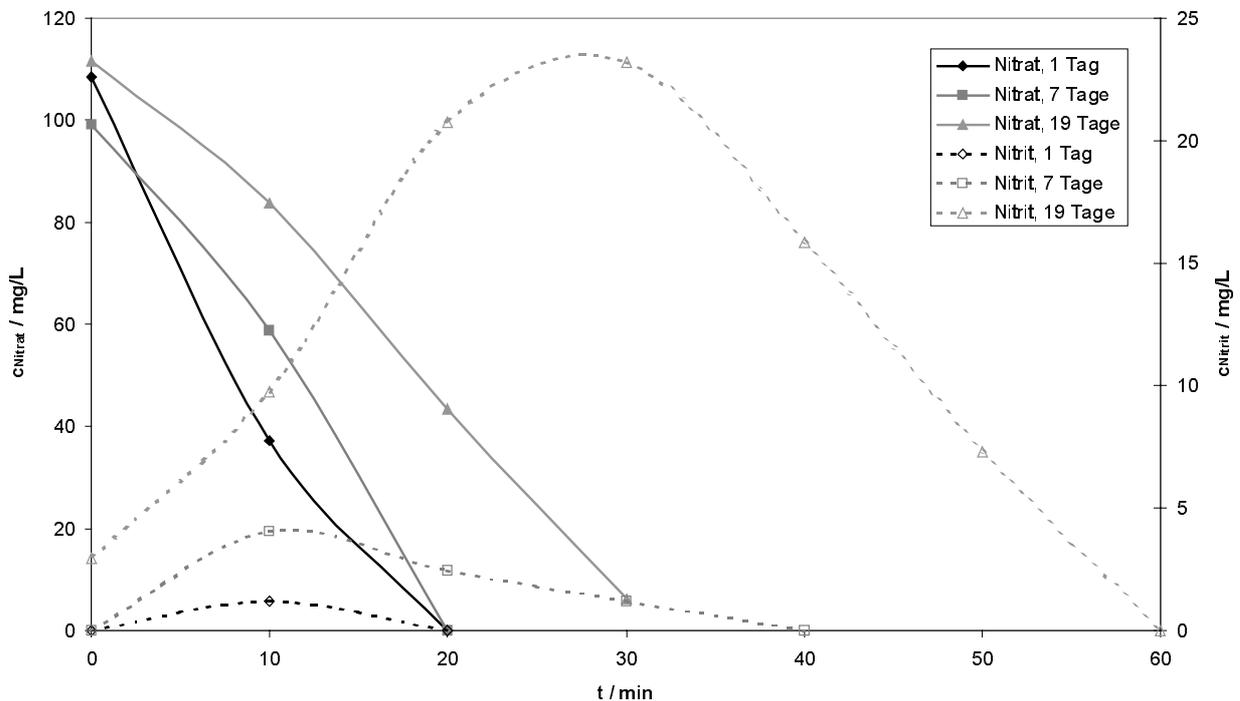


Abbildung 37: Abhängigkeit der Nitritakkumulation vom Alter der Bakterien bei der Denitrifikation durch *P. denitrificans*, $T = 37\text{ °C}$, $c_{\text{NaCl}} = 35\text{ g/L}$, $D = 1,6\text{ g/L}$, $\text{pH } 7,4$, Kohlenstoffquelle Acetat

Während bei der Verwendung frischer Zellen nur geringe Nitritkonzentrationen gemessen wurden, die nach vollständigem Nitratabbau ebenfalls abgebaut waren, wurden bei einer Woche alten Zellen bereits relevante Nitritmengen registriert, deren vollständiger Abbau längere Zeit in Anspruch nahm als der Nitratabbau. Im Fall von 19 Tage alten Zellen wurden erhebliche Nitritkonzentrationen von bis zu 24 mg/L gemessen, deren Abbau etwa doppelt soviel Zeit benötigte wie der Nitratabbau. Der enzymatische Nitritabbau durch die Expression der Nitritreduktase stellt offensichtlich ein empfindliches System dar. Sowohl die abrupte Umstellung von aeroben auf anaerobe Bedingungen, als auch ungenügende Pufferung und zunehmendes Zellalter schränken die Geschwindigkeit dieser Folgereaktion der Nitratreduktion stark ein.

Neben dem im vorigen Kapitel beschriebenen Aktivitätsverlust der Zellen für die Denitrifikation liefert also auch die Bildung des Zwischenprodukts Nitrit ein Argument für geringe Standzeiten des Biokatalysators in diesem Prozess, da die Entstehung von größeren Mengen des giftigen Nitrts in der Lebensmittelverarbeitung nicht hin genommen werden kann.

5.3.5 Denitrifikation durch *Paracoccus pantotrophus*

Bei Schubert et al. [25] wird der Mikroorganismus *P. pantotrophus* (DSM 65), der in dieser Veröffentlichung noch als *P. denitrificans* klassifiziert wurde, als besser geeignet für den Nitratabbau in Lebensmitteln bezeichnet als *P. denitrificans* (DSM 413), da er sich durch höhere Abbauraten bei nicht nachweisbarer Nitritakkumulation auszeichnete. Um dieses zu überprüfen, wurden auch mit diesem Bakterium Versuche zur Denitrifikation in Kochsalzlösungen ($c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/L}$) bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C durchgeführt. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 5.1 für *P. denitrificans* beschrieben, unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Aufgrund der in Kapitel 5.1.2 beschriebenen Wachstumskurve erfolgte das Abernten der Zellen nach einer Kultivierungsdauer von 40 Stunden. Abbildung 38 zeigt einen Vergleich der Nitritakkumulation während der Denitrifikation durch die beiden Mikroorganismen für frische und gealterte Zellen.

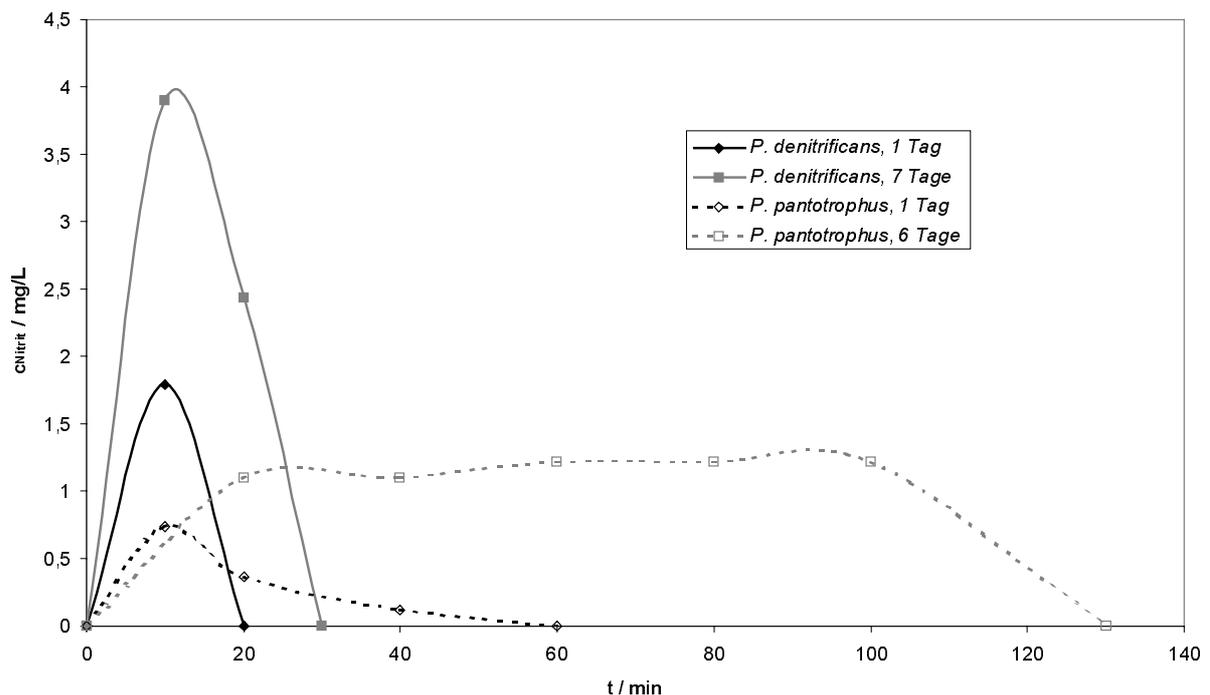


Abbildung 38: Nitritakkumulation während der Denitrifikation durch *P. denitrificans* ($D = 1,0 \text{ g/L}$) und *P. pantotrophus* ($D = 0,8 \text{ g/L}$) in Abhängigkeit vom Zellalter, $T = 37 \text{ °C}$, $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/L}$, $\text{pH } 7,4$, Kohlenstoffquelle Acetat

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die zwischenzeitlich auftretenden Nitritkonzentrationen bei der Verwendung von *P. pantotrophus* zwar tatsächlich deutlich geringer ausfielen als bei *P. denitrificans*, diese jedoch andererseits über

einen deutlich längeren Zeitraum bestehen blieben. Für eine Verwendung in der Lebensmittelverarbeitung ist eine möglichst geringe zwischenzeitlich auftretende Nitritkonzentration von Interesse. Wesentlicher ist aber, dass nach Abschluss der Reaktion kein Nitrit mehr nachzuweisen ist, was für *P. denitrificans* auch gegeben ist. Argumente gegen die Verwendung von *P. pantotrophus* für die Denitrifikation in Salzlösungen liefert der zeitliche Verlauf des Nitratabbaus, wie er in Abbildung 39 im Vergleich der beiden Mikroorganismen dargestellt ist.

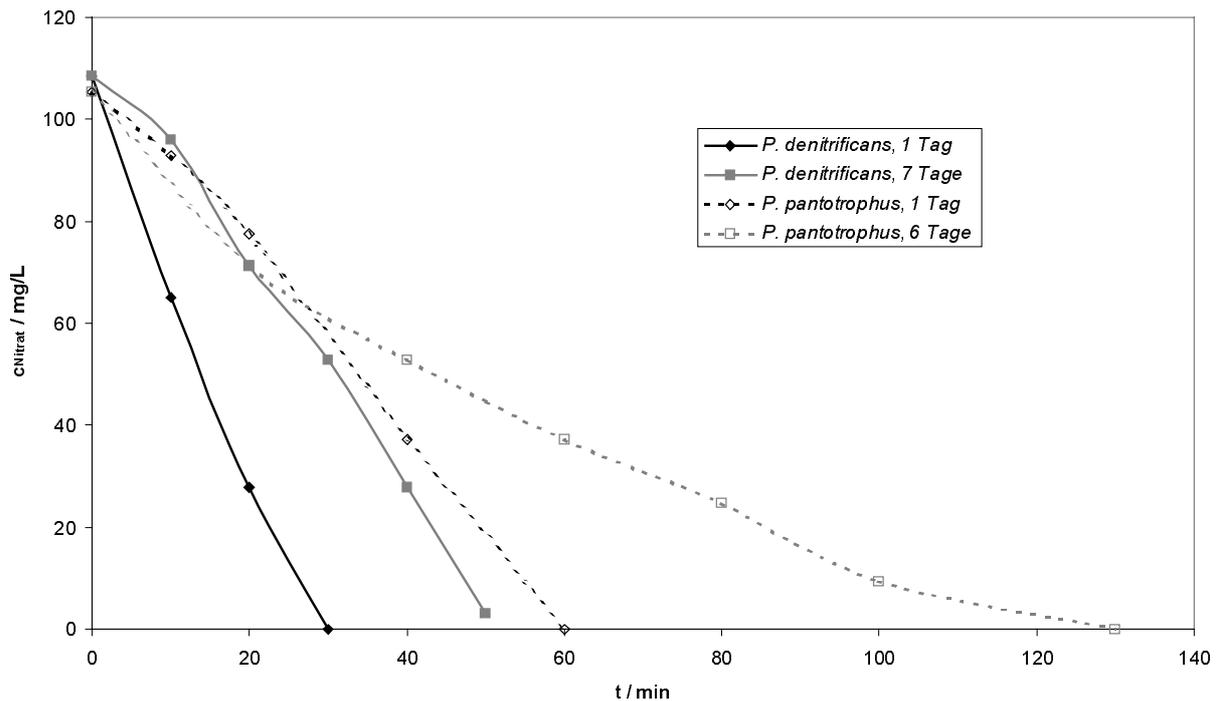


Abbildung 39: Nitratabbau durch *P. denitrificans* ($D = 1,0 \text{ g/L}$) und *P. pantotrophus* ($D = 0,8 \text{ g/L}$) in Abhängigkeit vom Zellalter, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/L}$, $\text{pH } 7,4$, Kohlenstoffquelle Acetat

Es ist zu erkennen, dass der Nitratabbau mit frischen Zellen durch *P. pantotrophus* 100% länger dauerte wie die Denitrifikation durch *P. denitrificans*. Bei gealterten Zellen erfolgte die Denitrifikation durch *P. pantotrophus* nur noch sehr langsam. Ein Vergleich von Abbildung 38 und Abbildung 39 zeigt, dass in allen betrachteten Fällen nach vollständig erfolgtem Nitratabbau kein Nitrit mehr nachzuweisen war. Die Denitrifikation nahm aber mit *P. pantotrophus* einen längeren Zeitraum in Anspruch.

5.4 Denitrifikation durch immobilisierte Mikroorganismen

Werden Bakterien in technischen Prozessen eingesetzt, so müssen diese im Anschluss an die Reaktion vom Medium getrennt werden. Im vorliegenden Fall

dürfen keine Mikroorganismen im denitrifizierten Eluenten verbleiben, da dieser erneut auf die Chromatographiesäule aufgebracht werden soll und sonst eine Kontamination des Molkenkonzentrats mit Bakterien erfolgen würde. Als alternatives Verfahren zur Kombination von Nitratabreicherung mittels Anionentausch und Regeneration des Eluats mittels mikrobieller Denitrifikation wäre ein direkter Einsatz der denitrifizierenden Bakterien in Molkenkonzentrat denkbar. Die Bakterien müssten für die Denitrifikation in direkten Kontakt mit dem Molkenkonzentrat gebracht und anschließend vollständig wieder abgetrennt werden. In diesem Fall sind die gängigen Verfahren der Abtrennung von Mikroorganismen, wie Filtration oder Sedimentation, aufgrund des hohen Feststoffanteils von Molkenkonzentrat nicht anwendbar.

Es existieren verschiedene Verfahren zur Fixierung von Mikroorganismen, Enzymen oder Zellen als Biokatalysatoren, wodurch die Handhabung erheblich vereinfacht wird. Die Methoden werden zusammenfassend als Immobilisierung bezeichnet und lassen sich grundsätzlich in die drei Kategorien Quervernetzung, Einschluss und Trägerbindung einteilen [1]. Neben der leichten Abtrennbarkeit des Biokatalysators bringt die Immobilisierung oft den Vorteil einer erhöhten Langzeitstabilität mit sich [2]. Als Nachteile der Immobilisierung sind der Stress für die Mikroorganismen durch die Immobilisierung, der zu Aktivitätsverlusten führen kann, und Probleme beim Kontakt zwischen Edukt und Biokatalysator zu nennen. Es können Stofftransporthemmungen durch Diffusionsbarrieren im Immobilisat auftreten und Teile des Biokatalysators können so fixiert sein, dass ein Kontakt mit den Edukten gar nicht möglich ist.

5.4.1 Verfahren der Immobilisierung

P. denitrificans und *P. pantotrophus* wurden für die folgenden Versuche in flache Linsen aus Polyvinylalkohol, sogenannten LentiKats[®], eingeschlossen [92]. Hierzu wurde die Suspension der gewaschenen Bakterien mit dem zuvor aufgeschmolzenen Polyvinylalkohol (LentiKat[®] Liquid) im Verhältnis 1:4 gemischt und anschließend mittels des LentiKat[®]-Printers auf Kunststoffschalen aufgetropft [93]. Durch Verwendung verschiedener Printer-Köpfe konnten so in einem Arbeitsgang 174 oder 400 gleichförmige Tropfen erzeugt werden. Abbildung 40 zeigt den verwendeten Printer sowie die Geometrie der damit hergestellten Immobilisate.

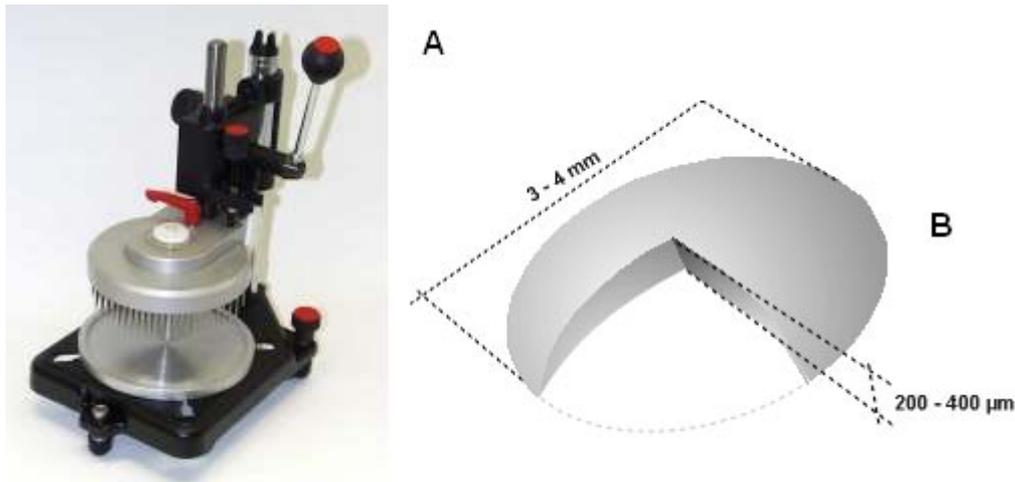


Abbildung 40: LentiKat®-Printer (A), schematische Darstellung der LentiKats® (B) [94]

Die Tropfen gelierten bei Raumtemperatur unter Verlust von Wasser und bildeten flache Linsen von ca. 3 mm Durchmesser. Nachdem diese bis zu einem bestimmten Anteil ihres Nassgewichtes getrocknet waren, wurden sie zum Ablösen von der Unterlage mit einer Mineralsalzlösung übergossen und anschließend zur Stabilisierung bei Raumtemperatur in dieser Lösung gerührt. Es zeigte sich, dass bei Variation des Trocknungsgrads zwischen 18 und 28% keine signifikanten Unterschiede der Aktivität der immobilisierten Bakterien beobachtet wurden. Die Stabilisierungsdauer sollte zwei Stunden nicht überschreiten, da bei längeren Stabilisierungszeiten eine deutliche Verringerung der Denitrifikationsgeschwindigkeit der so immobilisierten Bakterien beobachtet wurde. Bakterien, die für 12 h in der Stabilisierungslösung gerührt wurden, zeigten keine Aktivität mehr. Die Immobilisate wurden nach der Herstellung und zwischen den Versuchen unter anaeroben Bedingungen in Kochsalzlösung (35 g/L) bei 4 °C gelagert.

5.4.2 Nitratabbau in Natriumchloridlösung

Die Versuche zur Denitrifikation mit immobilisiertem *P. denitrificans* wurden unter den selben Bedingungen durchgeführt wie die Denitrifikation durch freie Zellen (siehe Kapitel 5.3), das heißt in Kochsalzlösung ($c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/L}$) bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C. Bei den Versuchen wurde eine Zelldichte von 1,4 g/L Biotrockenmasse an immobilisierten Bakterien eingesetzt. Abbildung 41 zeigt die Nitratabbaukurven bei unterschiedlichem Alter der Immobilisate.

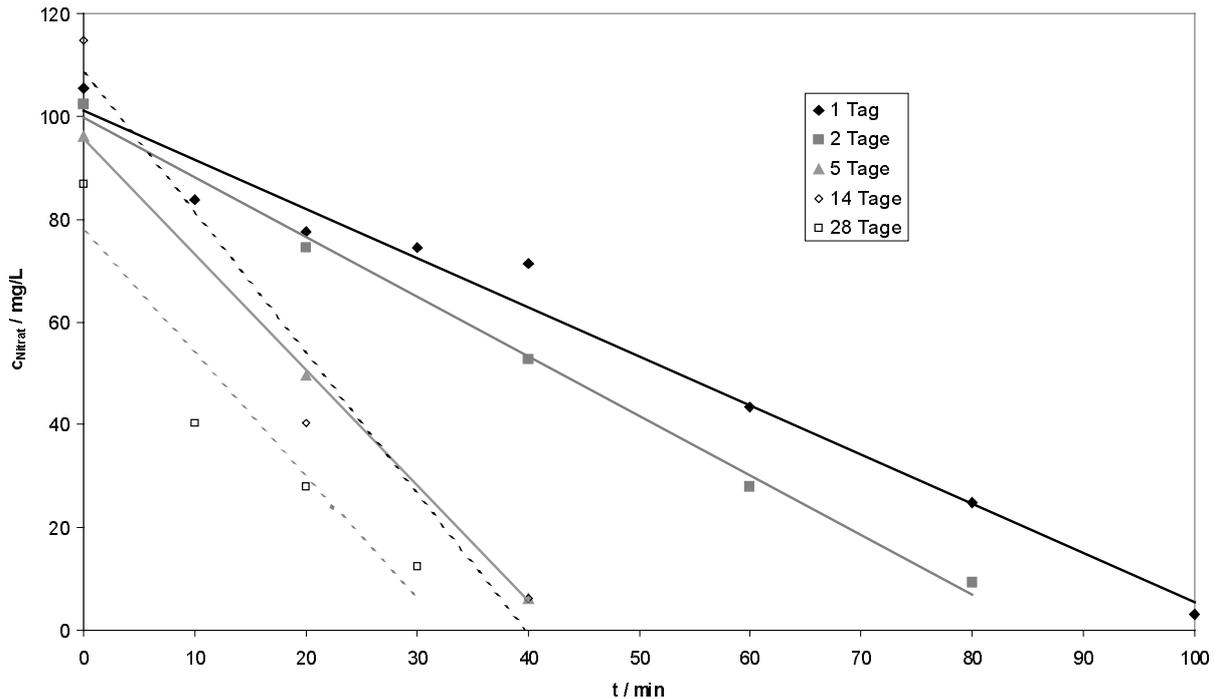


Abbildung 41: Nitratabbau durch immobilisierte *P. denitrificans*, LentiKats[®], T = 37 °C, $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/L}$, pH 7,4, D = 1,4 g/L, Kohlenstoffquelle Acetat [48]

Auch die Denitrifikation durch immobilisierte *P. denitrificans* zeigte einen linearen Verlauf, die Reaktion folgte also im analytisch erfassbaren Konzentrationsbereich einem Geschwindigkeitsgesetz nullter Ordnung. Unerwartet war allerdings, dass die Denitrifikation durch gealterte Zellen schneller verlief. Während beim Nitratabbau durch freie Zellen bereits in den ersten Tagen eine deutliche Verringerung der Abbaugeschwindigkeit zu beobachten war (siehe Kapitel 5.3.3), wurde der schnellste Nitratabbau durch immobilisierte Zellen nach zwei Wochen registriert. Dieses Phänomen ist nicht ausschließlich durch eine Adaption der Zellen an die Umgebungsbedingungen zu erklären. Ein Wachstum der Zellen im Immobilisat kann ausgeschlossen werden, da die Lagerung zwischen den Versuchen bei 4 °C in nährstofffreiem Medium erfolgte. Eine mögliche Erklärung für die Beschleunigung der Denitrifikation mit zunehmendem Alter des Immobilisats ist eine zunehmende Porosität der Linsen. Dadurch würde die Diffusionshemmung verringert und ein besserer Kontakt von Nitrat und Biokatalysator ermöglicht.

Die Reaktionsgeschwindigkeit des Nitratabbaus durch immobilisierte Zellen ist allerdings deutlich geringer als durch freie Zellen. So wurden durch immobilisierte Zellen maximal Geschwindigkeiten von $v = 2,8 \text{ mg}_{\text{Nitrat}} \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ erreicht, wo hingegen durch die Verwendung freier Zellen Abbauraten von bis zu $8 \text{ mg}_{\text{Nitrat}} \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ realisiert wurden. Die bei der Denitrifikation durch immobilisierte *P. denitrificans*

zwischenzeitlich auftretenden Nitritkonzentrationen waren auch bei gealterten Zellen sehr gering und nach erfolgtem Nitratabbau nicht mehr nachweisbar.

Um die Möglichkeit eines kontinuierlichen Nitratabbaus durch immobilisierte Zellen zu überprüfen, wurden Immobilisate unterschiedlichen Alters in Minisäulen ($V = 12 \text{ mL}$) gefüllt, die einen Siebboden eingebaut hatten. Es wurden vier Minisäulen hintereinander geschaltet, so dass sich ein Gesamtvolumen von 48 mL ergab. Mittels einer peristaltischen Pumpe wurden die immobilisierten Zellen in diesen Säulen mit einer Natriumchloridlösung ($c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/L}$) überströmt, die neben 220 mg/L Nitrat auch 250 mg/L Acetat als Elektronendonator enthielt. Abbildung 42 zeigt den Nitratgehalt am Ablauf der vierten Säule bei unterschiedlichen Volumenströmen über einen Zeitraum von zwei Tagen.

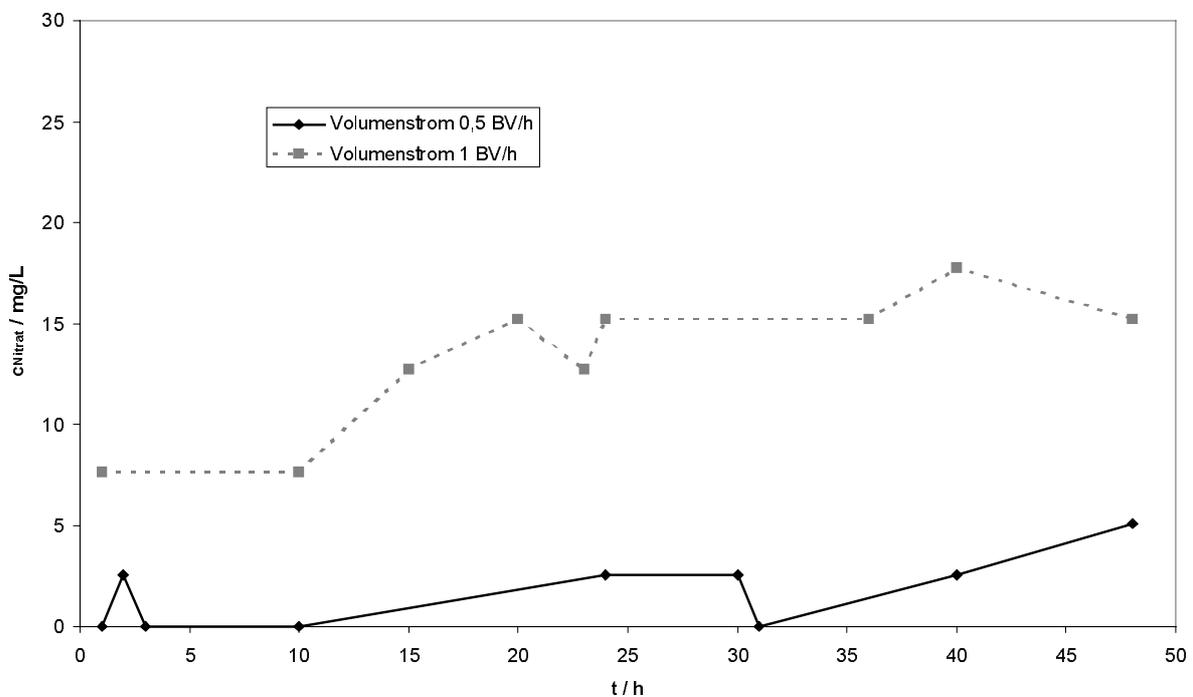


Abbildung 42: Kontinuierliche Nitratbreicherung mit immobilisierten Zellen; pH 7,4; $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/L}$; $\text{BTM} = 8,5 \text{ g/L}$; $V = 48 \text{ mL}$; $c_{\text{Nitrat}} = 220 \text{ mg/L}$; Kohlenstoffquelle Acetat [48]

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass bei einem geringen Volumenstrom von $0,5 \text{ BV/h}$ eine kontinuierliche Denitrifikation möglich ist, bei der in der Kochsalzlösung nur eine Restnitratkonzentration im Bereich der unteren Nachweisgrenze verbleibt. Die Tatsache, dass bei einem doppelt so großen Volumenstrom, das heißt der halben Verweilzeit, auch mehr als 200 mg/L Nitrat abgebaut werden, spricht allerdings gegen die Gültigkeit eines Geschwindigkeitsgesetzes nullter Ordnung in diesem Experiment. Würde sich bei geringem Volumenstrom tatsächlich noch Nitrat

in der Versuchslösung befinden, so wären bei kürzerer Verweilzeit deutlich höhere Nitratkonzentrationen im Ablauf zu erwarten. Es ist allerdings möglich, dass die ermittelten sehr geringen Nitratkonzentrationen bei einem Volumenstrom von 0,5 BV/h täuschen, da sie sich unterhalb der gesicherten Nachweisgrenze des Analysesystems, die in diesem Medium bei ca. 9 mg/L liegt, befinden. Es liegen also eventuell falsche Positivbefunde vor.

5.4.3 Nitratabbau in Molkenkonzentrat

Da die Aktivität von immobilisiertem *P. denitrificans* in LentiKats® nach einer Alterungsphase steigt, wie im vorigen Kapitel gezeigt, wurden für die direkte Denitrifikation in Molkenkonzentrat Immobilisate verwendet, die zunächst einige Tage unter anaeroben Bedingungen bei 4 °C gelagert wurden. Sie wurden anschließend mit Molkenkonzentrat versetzt, wobei der Nitratabbau sowohl bei Raumtemperatur als auch bei der für die Denitrifikation optimalen Temperatur von 37 °C untersucht wurde. Das Molkenkonzentrat wies einen pH-Wert von 6,6 auf, der in einer industriellen Anwendung auch nicht zu verändern ist. Um eventuelle Auswirkungen dieses nicht idealen pH-Werts zu überprüfen, wurden Vergleichsexperimente durchgeführt, bei denen mit Natronlauge ein Wert von pH 7,4 eingestellt wurde. Dem Molkenkonzentrat wurden für diese Untersuchungen keine zusätzlichen Elektronendonatoren zugesetzt. Die Versuche bei verschiedenen Reaktionstemperaturen wurden wiederholt, nachdem die Zellen ein Alter von einem Monat erreicht hatten. Abbildung 43 zeigt die Verläufe der Denitrifikation.

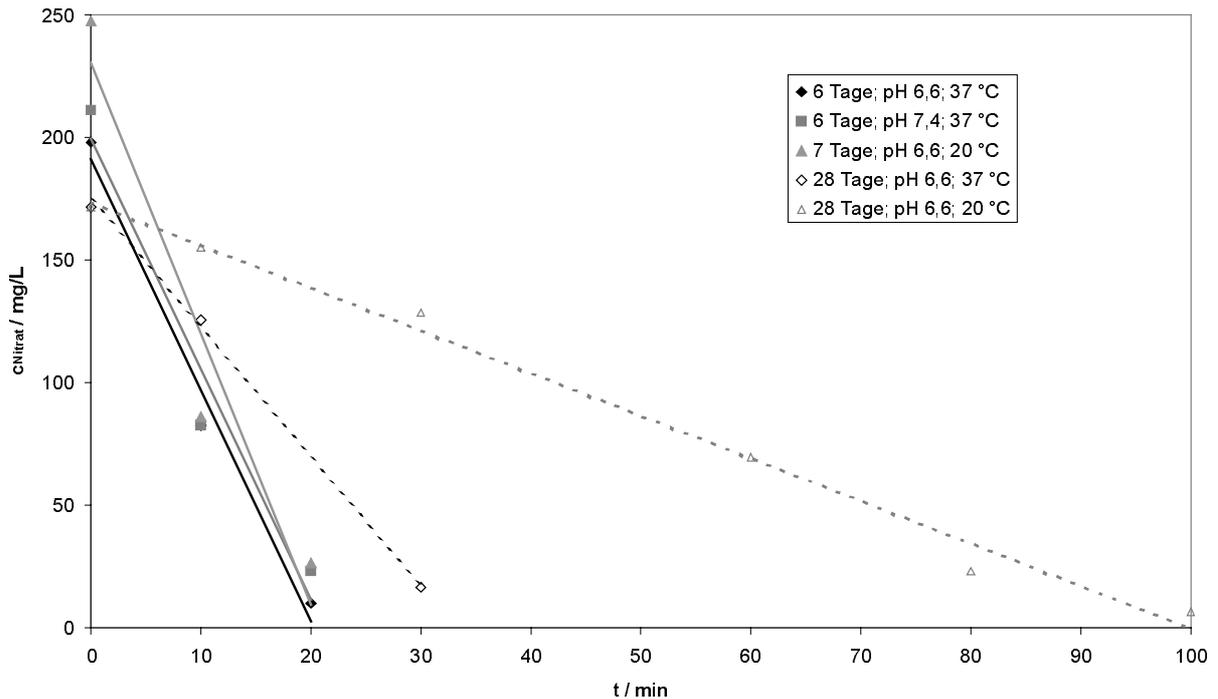


Abbildung 43: Denitrifikation von Molkenkonzentrat durch immobilisierte *P. denitrificans* bei verschiedenen Temperaturen und Zellaltern [48]

Es ist zu erkennen, dass bei der Verwendung von nur einige Tage alten Zellen im Rahmen der Messgenauigkeit weder die Reaktionstemperatur noch der pH-Wert Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit hatten. Im Falle der einen Monat alten Zellen war allerdings eine deutliche Abhängigkeit der Abbaurrate von der Temperatur zu erkennen. Während die Denitrifikation bei 37 °C nur wenig langsamer verlief als mit jungen Zellen, war die Reaktion bei Raumtemperatur deutlich verlangsamt. Die mit jungen Zellen erreichten Abbaugeschwindigkeiten entsprachen mit $v = 2,8 \text{ mg}_{\text{Nitrat}} \text{ min}^{-1} \text{ L}^{-1}$ denen, die mit immobilisierten Zellen in Kochsalzlösungen erreicht wurden (siehe Kapitel 5.4.2).

Deutliche Unterschiede zeigten sich bei verschiedenen Temperaturen und Zellaltern bezüglich der Nitritakkumulation, wie die folgende Abbildung 44 zeigt.

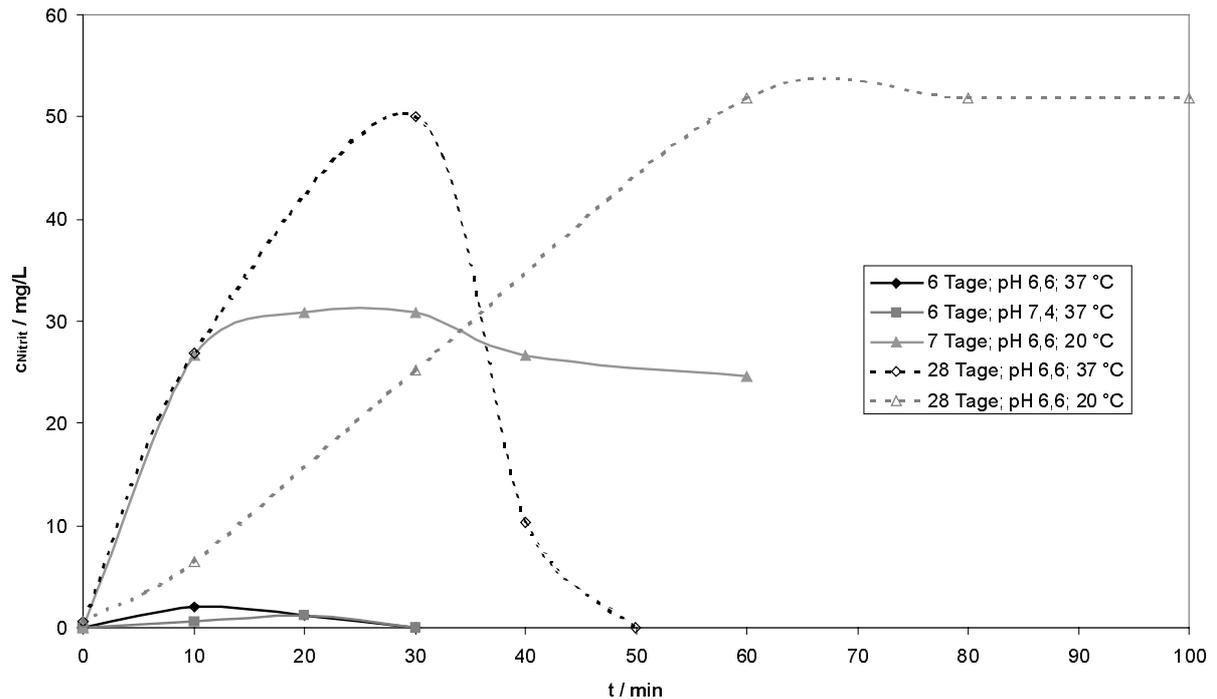


Abbildung 44: Nitritakkumulation bei der Denitrifikation von Molkenkonzentrat durch immobilisierte *P. denitrificans* bei verschiedenen Temperaturen und Zellaltern [48]

Junge Immobilisate produzierten bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C nur geringe Nitritkonzentrationen, die nach erfolgter Denitrifikation abgebaut waren. Die gealterten Zellen führten bei dieser erhöhten Temperatur bereits zu hohen Nitritgehalten, die zwar vollständig wieder abgebaut wurden. Allerdings begann dieser Abbau erst nach der Denitrifikation. Bei Raumtemperatur entstanden jeweils große Mengen Nitrit, deren Abbau nicht registriert wurde.

Da bei einer Temperatur von 37 °C eine starke Vermehrung von im Molkenkonzentrat vorhandenen Mikroorganismen zu erwarten ist, wurden Versuche zur kontinuierlichen Denitrifikation trotz der obigen Ergebnisse bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Molkenkonzentrat, welches 95 mg/L Nitrat enthielt, wurde dabei in einem größeren Versuchsmaßstab durch eine Säule über in LentiKats® immobilisierte *P. denitrificans* mit einem Bettvolumen von ca. 120 mL geleitet. Der Volumenstrom wurde über einen Zeitraum von drei Tagen zwischen 1,0 und 0,5 BV/h variiert. Bei dem sehr geringen Volumenstrom zeigte sich bereits optisch eine Qualitätsveränderung des Molkenkonzentrats (Farbänderung und Ausflocken). Es wurden über den gesamten Zeitraum relevante Nitritkonzentrationen zwischen 4,2 und 7,4 mg/L detektiert. Ein kontinuierlicher Nitratabbau durch *P. denitrificans* in Molkenkonzentrat ist also bei Raumtemperatur nicht möglich.

6 Kombination der Verfahren

Das Ziel der Kombination von chromatographischem Nitratabbau in Molkenkonzentrat mittels stark basischer Anionenaustauscherharze und der biologischen Denitrifikation des Eluats aus der chromatographischen Stufe ist die vollständige Entfernung von Nitrat aus dem Molkenkonzentrat und seine Umwandlung in unbedenklichen Stickstoff. Die einzelnen Stufen weisen für sich gesehen Nachteile auf, die durch eine Kombination, wie sie in der folgenden Abbildung 45 schematisch dargestellt ist, eliminiert werden können.

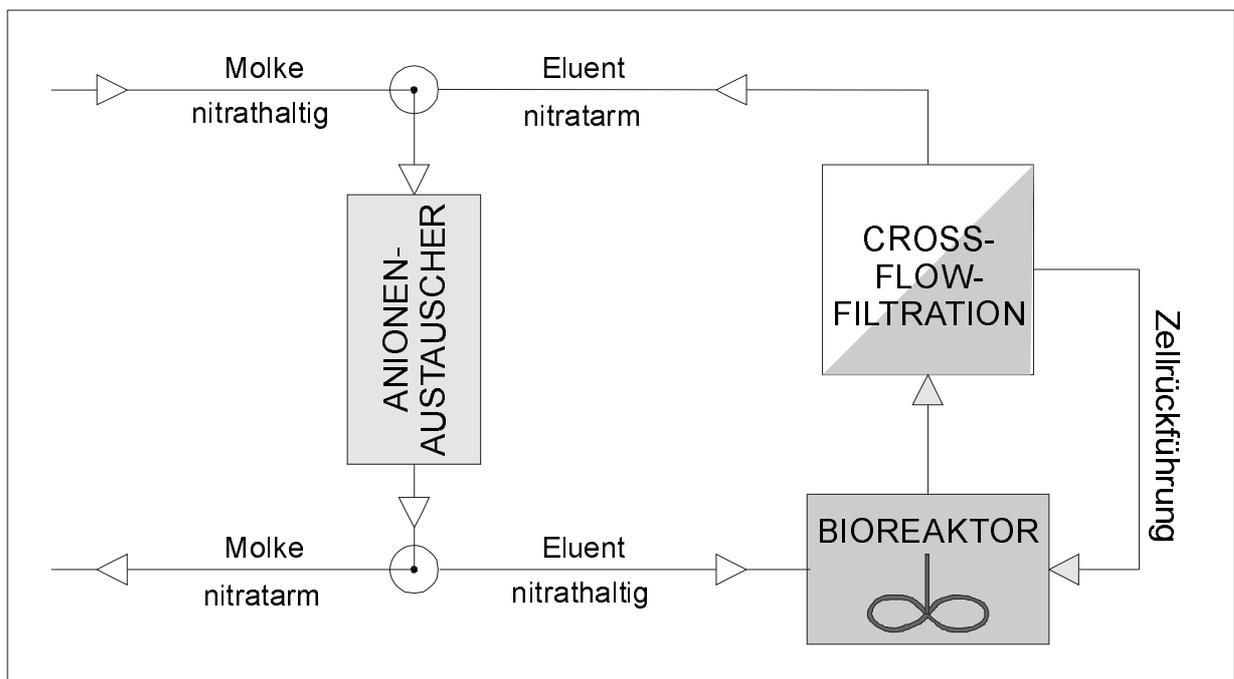


Abbildung 45: Schematische Darstellung der Kombination von Anionenaustausch und Denitrifikation zur Nitratentfernung aus Molke

Mittels Anionenaustauscherharzen ist es zwar möglich, das Nitrat aus dem Molkenkonzentrat zu entfernen, doch verbleibt es nach der notwendigen Regeneration des Harzes im Eluat und muss letztlich in einer Kläranlage biologisch denitrifiziert werden, da ansonsten eine Überdüngung der Gewässer zu befürchten ist. In dieser Arbeit wurden im Eluat, dessen Kochsalzkonzentration 100 g/L betrug, ca. 600 mg/L Nitrat detektiert (siehe Kapitel 4.3.3). Eine Kochsalzkonzentration von 100 g/L ist nach Herstellerangaben üblich für die Regeneration von Austauscherharzen in einer allein arbeitenden Anionenaustauscheranlage. Sie kann

allerdings in einem Kombinationsverfahren nach Abbildung 45 nicht verwendet werden, da in Gegenwart dieser Salzkonzentrationen keine mikrobielle Denitrifikation möglich ist (siehe Kapitel 5.2.4). Die im Eluat gemessene Nitratkonzentration könnte durch eine Erhöhung der Regenerationstemperatur noch steigen. Durch eine allein stehende Anionenaustauscheranlage zur Nitratanreicherung in Molkenkonzentrat würden also die Kläranlagen durch hohe Nitratkonzentrationen belastet. Zusätzlich würden hohe Salzfrachten in die Gewässer eingeleitet, da das verwendete Natriumchlorid in einer Kläranlage nicht entfernt wird und direkt in den Vorfluter gelangt.

Eine direkte biologische Denitrifikation von Molkenkonzentrat hat neben den dargestellten praktischen Problemen (siehe Kapitel 5.4.3) den Nachteil, dass die Mikroorganismen mit dem Lebensmittel in Kontakt kommen. So muss ständig der Nachweis geführt werden, dass ein Verbleib der Bakterien im Lebensmittel ausgeschlossen werden kann, was besonders in den sensiblen Bereichen Babyfood und Diätätika zu Problemen führen kann. Zudem nutzen die Mikroorganismen Kohlenstoffquellen aus dem Molkenkonzentrat als Elektronendonatoren, wodurch die Produktausbeuten verringert werden.

Eine Kombination der beiden Verfahren umgeht die beschriebenen Probleme, da hier das gesundheitlich bedenkliche Nitrat in unschädlichen Stickstoff umgewandelt wird, ohne dass große Salzfrachten in die Umwelt entlassen werden und die Bakterien mit dem Lebensmittelgrundstoff Molkenkonzentrat in Kontakt kommen.

6.1 Chromatographische und mikrobielle Denitrifikation

Die Kombination der beiden Verfahrensschritte, wie oben beschrieben, konnte im Labormaßstab in zwei Zyklen realisiert werden. Die Beladung des Anionenaustauscherharzes Applexion Resin XA455 erfolgte mit nitrat-haltigem Molkenkonzentrat. Anschließend wurde das Harz mit einer Kochsalzlösung ($c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/L}$), die zudem 250 mg/L Acetat als Elektronendonator für die folgende Denitrifikation enthielt, und mittels eines Phosphatpuffers auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt war, regeneriert. Bei der Regeneration fielen 4,7 L nitratbelastetes Eluat an. Dieses Eluat wurde in einem 5 L Kolben mit ca. 0,4 g/L frei suspendierten Zellen von *P. denitrificans* versetzt und bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen zur Reaktion gebracht. Nach vollständiger Denitrifikation erfolgte eine Zellabtrennung mittels eines Mikrofiltrationsmoduls „Sartocon Slice“ der Fa. Sartorius, welches eine

mittlere Porengröße von $0,2\ \mu\text{m}$ bei einer wirksamen Filtrationsfläche von $0,1\ \text{m}^2$ aufwies. Insgesamt konnten $4\ \text{L}$ denitrifiziertes Eluat abgetrennt werden, das in einem zweiten Zyklus erneut zur Regeneration des zuvor mit Nitrat aus Molkenkonzentrat beladenen Anionenaustauscherharzes eingesetzt werden konnte. Das nitrathaltige Eluat des zweiten Zyklus' konnte erneut durch die abgetrennten Zellen von *P. denitrificans* denitrifiziert werden. Die Verläufe der Nitratkonzentrationen bei den einzelnen Verfahrensschritten dieses Kombinationsprozesses sind in Abbildung 46 dargestellt.

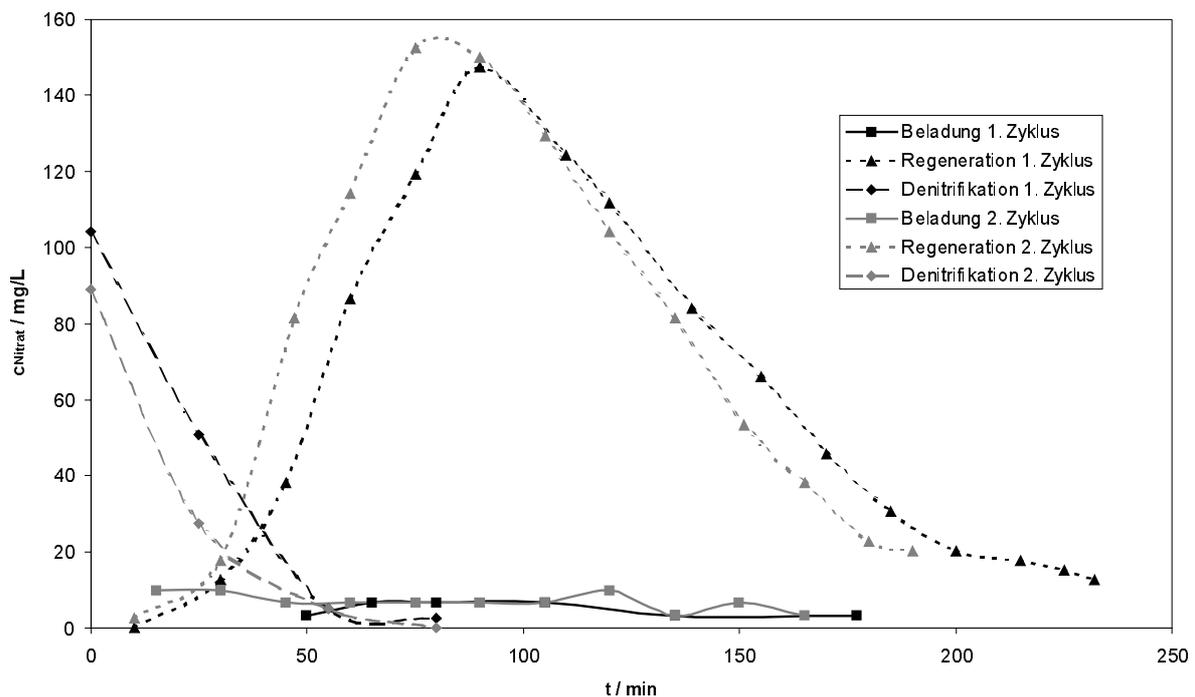


Abbildung 46: Kombination der Nitratanreicherung von Molkenkonzentrat in einer Chromatographie-Säule und mikrobieller Denitrifikation des Eluenten durch *P. denitrificans*

In Tabelle 9 sind die Nitratbilanzen der einzelnen Schritte aufgeführt, wobei die Konzentrationen im Eluat über die Integrale der Regenerationskurven berechnet wurden.

Tabelle 9: Nitratbilanz der Kombination von chromatographischer Nitratanreicherung von Molkenkonzentrat und biologischer Denitrifikation des Eluenten ($c_{\text{NaCl}} = 35\ \text{g/L}$)

Zyklus- #	c_{Nitrat} (Molkenkonz.) / mg/L		c_{Nitrat} (Eluat) / mg/L	Gesamtmenge Nitrat / mg	
	vor Ab- reicherung	nach Ab- reicherung		aus Molken- konzentrat	im Eluat
1	152	3	71	313	321
2	158	7	71	323	320

Die Regeneration erfolgte in beiden Zyklen vollständig, auch wiesen die Flächen der Regenerationskurven in beiden Versuchsreihen nur eine Differenz von 0,4% auf. Eine Kombination der Verfahren ist nach diesen Ergebnissen möglich.

Ein Problem im Labormaßstab stellte allerdings die Zellseparation dar. Mit dem verwendeten Mikrofiltrationsmodul wurden zunächst akzeptable Flüsse erreicht, doch verblockte die Membran schnell, was zu einem Absinken des Permeatflusses führte. Insgesamt wurden für die Abtrennung von 4 L Eluent 45 min benötigt. Der Wasserwert der Membran betrug nach einmaliger Abtrennung nur noch weniger als 10% der Initialflüsse. Durch Reinigungsprozeduren mit 0,1 M NaOH, 1 M Zitronensäure und 1 M NaOH konnte die Membran zwar soweit wieder gereinigt werden, dass ein Wasserwert von ca. 90% der Initialflüsse erreicht wurde, doch lässt sich eine derartig häufige und aufwendige Reinigung nicht in einem kontinuierlichen Prozess realisieren. Die schnelle Verblockung der Membran ist eventuell auf die Bauweise des verwendeten Moduls, welches sich durch große Filtrationsflächen bei verhältnismäßig kleiner Anströmfläche auszeichnet, zurück zu führen. Hierdurch werden nur geringe Überströmgeschwindigkeiten erreicht, was die Ausbildung eines Belags auf der Membran begünstigt. Andere Module, beispielsweise Rohrmodule, zeichnen sich durch günstigere Verhältnisse aus, doch sind diese Module nicht im Labormaßstab erhältlich und konnten deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet werden. Es ist aber zu erwarten, dass die Zellseparation im industriellen Maßstab kein Problem darstellt, da es sich um ein allgemein etabliertes Verfahren handelt [95, 96].

6.2 Abschätzung der Auslegung eines industriellen Prozesses

Um eine industrielle Anlage auslegen zu können, in der die Denitrifikation von Molkenkonzentrat nach der in dieser Arbeit beschriebenen Kombination von chromatographischen und mikrobiellen Verfahrensschritten erfolgt, werden Daten für die Dimensionierung der Chromatographiesäule und des Bioreaktors benötigt. Ausschlaggebend für die Größe der Chromatographiesäulen ist das Molkenaufkommen, die Nitratbelastung, die nutzbare Kapazität des Anionenaustauscherharzes, sowie die Volumenstromkapazität der nachgeschalteten Verfahrensschritte. Für die Dimensionierung des Bioreaktors sind Kenntnisse über die Kinetik der mikrobiellen Denitrifikation unter den gegebenen Bedingungen notwendig.

6.2.1 Dimensionierung der chromatographischen Stufe

Im folgenden sollen die Dimensionen einer solchen Anlage für die Fa. Biolac GmbH abgeschätzt werden. Für dieses Unternehmen wird ein jährlich zu verarbeitendes Molkenaufkommen von 800.000 t angesetzt [97]. Ausgehend von einer Dichte von 1 g/L und einer fünffachen Aufkonzentration der Molke ergibt sich ein Volumen von 160.000 m³ Molkenkonzentrat. Es wird angenommen, dass dieses Molkenkonzentrat mit durchschnittlich 100 mg/L Nitrat belastet ist, welches vollständig aus dem gesamten Molkenaufkommen entfernt werden soll. Die Molkenverarbeitung bei der Fa. Biolac erfolgt kontinuierlich bei nur zwei Tagen Stillstand im Jahr. Daraus folgt, dass ein Volumenstrom von 306 L/min verarbeitet werden muss und pro Minute 30,6 g Nitrat entfernt werden müssen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Anionenaustauscherharz mit einem Volumenstrom von 3 BV/h belastet werden kann, wobei das Nitrat vollständig aus dem Molkenkonzentrat entfernt wurde und keine Verblockungen der Säule auftraten. Um den gesamten Molkestrom von 18,36 m³/h kontinuierlich zu denitrifizieren ergibt sich ein benötigtes Säulenvolumen von 6,1 m³. Die zur Trennung von Molkenproteinen und Lactose nachgeschaltete Ultrafiltrationsanlage wird allerdings mit einem Volumenstrom von 35 m³/h betrieben, der im Verlauf eines Ultrafiltrations-Zyklus auf 30 m³/h absinkt [97]. Da eine Zwischenlagerung des Molkenkonzentrats nicht möglich ist, muss von der Denitrifikationssäule dieser maximale Volumenstrom erreichbar sein, was das Volumen dieser Säule auf 11,7 m³ vergrößert. Diese Größe stellt kein Problem dar, es existieren beispielsweise für die Melasseverarbeitung bei der Fa. Amino, Frelstedt, Chromatographieanlagen mit einem Bettvolumen von 60 m³ [12]. Um einen quasi-kontinuierlichen Betrieb zu gewährleisten, ist die Verwendung einer Zwillingsanlage notwendig, so dass stets eine Säule beladen und eine andere regeneriert wird.

In dieser Arbeit konnten durch das Anionenaustauscherharz 6,25 g_{Nitrat} / L_{Harz} gebunden werden, bevor ein Durchbruch des Nitrats nachweisbar war. Davon ausgehend, dass sich dieser Wert beim Up-Scaling nicht verändert, können durch eine Säule des oben angegebenen Volumens 72,9 kg Nitrat gebunden werden, bevor es zu einem Durchbruch kommt. Die Säule kann also in einem Zyklus mit 729 m³ Molkenkonzentrat beladen werden, was einer Beladungsdauer von 20,8 h entspricht.

Bei einer Regeneration des Chromatographiematerials durch eine Kochsalzlösung ($c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/L}$) wurden bei einer Temperatur von $40 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem Volumenstrom von $6,8 \text{ BV/h}$ $3,0 \text{ L}$ Eluent benötigt, um ein Gramm Nitrat von der Säule zu entfernen. Für die Elution von $72,9 \text{ kg}$ Nitrat von der Säule werden im vorliegenden Fall also $218,7 \text{ m}^3$ Eluent benötigt, wobei die Elutionszeit $2,78 \text{ h}$ beträgt. Die Nitratkonzentration im gepoolten Eluat beträgt 333 mg/L . Die Möglichkeit einer nur teilweisen Regeneration des Harzes, die eventuell im Betrieb Vorteile bringen könnte [32], ist hier nicht berücksichtigt. Es sei allerdings darauf hingewiesen, dass die Regeneration ein ausgeprägtes Tailing aufweist. So konnten im Laborversuch 95% des Nitrats mit nur 70% des zur vollständigen Regeneration benötigten Eluenten entfernt werden. Durch den Austausch gegen Nitrat werden aus dem Eluenten 1176 mol Chlorid entfernt, die nach der biologischen Denitrifikation in Form von Salzsäure wieder zugegeben werden müssen, da Natriumionen im Eluat verbleiben und beim mikrobiellen Nitratabbau Protonen verbraucht werden.

Setzt man für die Spülgänge nach Beladung der Säule mit Molkenkonzentrat und der Regeneration jeweils eine Dauer von einer Stunde an, so ergibt sich für die mikrobielle Denitrifikation des Eluats ein Zeitraum von 16 h , bevor dieses wieder für die Regeneration der zweiten Säule zur Verfügung stehen muss.

6.2.2 Dimensionierung der biologischen Stufe

Aus den Abschätzungen für die chromatographische Stufe ergibt sich, dass in der biologischen Stufe $218,7 \text{ m}^3$ Eluat mit einem Nitratgehalt von 333 mg/L innerhalb von 16 h denitrifiziert werden müssen. In einem Bioreaktor muss somit ein Volumenstrom von $227,8 \text{ L/min}$ und ein Nitratstrom von $75,9 \text{ g/min}$ verarbeitet werden. Die biologische Stufe muss so ausgelegt sein, dass sie sowohl den Volumenstrom bewerkstelligen als auch die benötigte Abbauleistung erbringen kann.

Für die Kinetik der Denitrifikation wird von dem Ansatz der Michaelis-Menten-Kinetik ausgegangen. Es konnte allerdings gezeigt werden (siehe Kapitel 5.3), dass die Michaelis-Konstante offensichtlich sehr klein ist. Für den nachweisbaren Konzentrationsbereich (die gesicherte untere Nachweisgrenze in diesem Medium liegt bei ca. 9 mg/L) bedeutet das, dass die Michaelis-Menten-Konstante gegenüber der Substratkonzentration zu vernachlässigen ist, was dazu führt, dass die Reaktion unabhängig von der Substratkonzentration ist und einem Geschwindigkeitsgesetz für eine Kinetik nullter Ordnung folgt. In dieser Arbeit wurde eine maximale Abbaurrate

von $v = 5 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ erreicht, die für die folgenden Berechnungen zugrunde gelegt wird.

Zur Auslegung der Denitrifikation in einem kontinuierlichen Rührkessel, der unter den Bedingungen betrieben werden kann, für welche die Kinetik bestimmt wurde ($T = 37 \text{ °C}$, $\text{pH} = 7,5$, $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/L}$), muss die Design-Gleichung für einen CSTR gelöst werden:

$$\tau = \frac{c_0}{v} \cdot U \quad (\text{Gleichung 11})$$

τ = mittlere hydrodynamische Verweilzeit in min^{-1}

c_0 = Nitratkonzentration im Zulauf in mg/L

U = Umsatz

v = Reaktionsgeschwindigkeit in $\text{mg L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

Unter der Voraussetzung, dass die Denitrifikation unter den gegebenen Reaktionsbedingungen im betrachteten Konzentrationsbereich dem Geschwindigkeitsgesetz einer Kinetik nullter Ordnung gehorcht, kann die Reaktionsgeschwindigkeit v als konstant und somit als unabhängig vom Umsatz angesehen werden. Ersetzt man die Verweilzeit durch den Quotienten \dot{V}/V , lässt sich Gleichung 18 umformen zu:

$$V = \frac{\dot{V} \cdot c_0 \cdot U}{v} = \frac{\dot{m} \cdot U}{v} \quad (\text{Gleichung 12})$$

\dot{V} = Volumenstrom durch den Reaktor in min^{-1}

V = Reaktorvolumen

\dot{m} = Nitratstrom in mg/min

In diese Gleichung wird der Volumenstrom von $227,8 \text{ L/min}$ und der Nitratstrom von $75,9 \text{ g/min}$ eingesetzt. Für den Umsatz wird ein Wert von $0,99$ gewählt, das entspricht einem Abbau der ursprünglich in dem Molkenkonzentrat enthaltenen 100 mg/L auf 1 mg/L . Mit der ermittelten maximalen Abbaurrate von $5 \text{ mg}_{\text{Nitrat}} \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ erhält man ein benötigtes Reaktorvolumen von $15,0 \text{ m}^3$.

Bei obiger Berechnung bleibt allerdings der Aktivitätsverlust der Zellen durch Alterung völlig unberücksichtigt. Tatsächlich zeigte sich bei Untersuchungen über fünf Tage ein linearer Aktivitätsverlust der Zellen, wobei der Verlustfaktor bezogen

auf eine Stunde $\alpha = 0,995$ betrug (siehe Kapitel 5.3.3). Dieser Verlust an Aktivität muss bei der Auslegung der biologischen Stufe berücksichtigt werden [85].

Die zeitliche Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit kann nach Einführen des Verlustfaktors α nach folgender Gleichung beschrieben werden:

$$v(t) = \alpha^{\frac{t}{\Theta}} \cdot v_0 \quad \text{(Gleichung 13)}$$

Dabei stellt v_0 die Abbaurate frischer Zellen dar, die weiterhin mit $5 \text{ mg}_{\text{Nitrat}} \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ angenommen wird, und Θ die Normzeit, auf die der Verlustfaktor α bezogen wird, in diesem Fall 1 h. Um einen kontinuierlichen Abbau des Nitrats sicherzustellen, müssen dem System entsprechend dem Aktivitätsverlust frische Zellen zugeführt werden, wofür zwei Prinzipien denkbar sind [85]:

1. Bei satzweisem Betrieb der mikrobiellen Denitrifikation hinsichtlich des Biokatalysators wird der Prozess nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen des kontinuierlichen Nitratabbaus gestoppt und die Zellen im Reaktor komplett ausgetauscht. In diesem Fall berechnet sich das benötigte Reaktorvolumen nach der folgenden Gleichung, deren Herleitung im Anhang aufgeführt ist:

$$V = \frac{\bar{m} \cdot t_s \cdot U}{v_0 \cdot \frac{\Theta}{\ln \alpha} \left(\alpha^{\frac{t_s}{\Theta}} - 1 \right)} \quad \text{(Gleichung 14)}$$

2. Werden dem System kontinuierlich frische Zellen zugeführt, so ergibt sich das notwendige Reaktorvolumen nach der folgenden Gleichung (Herleitung siehe Anhang):

$$V = \frac{1}{\frac{v_0}{\bar{m} \cdot U} + \frac{\ln \alpha}{\Theta \cdot \dot{V}_z}} \quad \text{(Gleichung 15)}$$

\bar{m} = mittlerer Massefluss von Nitrat in den Reaktor in $\text{mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$

t_s = Standzeit des Systems beim satzweisen Austausch der Zellen in min

v_0 = Abbaurate frischer Zellen in $\text{mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$

Θ = Normzeit (60 min)

\dot{V}_z = Volumenstrom der alten Zellen aus dem Reaktor in L/h

Legt man neben der bekannten maximalen Abbaurate und dem Nitratstrom von 75,9 g/min einen erwünschten Umsatz von 99% und einen Verlustfaktor $\alpha = 0,995$ pro Stunde zugrunde, so lassen sich die benötigten Reaktorvolumina bei den beiden Verfahren zur Zellerneuerung berechnen.

Für den ersten Fall, dem satzweisen Austausch der Zellen, beträgt die benötigte Standzeit der Zellen 16 h für den ersten Zyklus. Für jeden weiteren Zyklus erhöht sich die Standzeit der Zellen um die Beladungsdauer der chromatographischen Stufe von 20,8 h. Das benötigte Reaktorvolumen in Abhängigkeit von der Zahl der Zyklen, nach denen ein Austausch der Zellen erfolgt, ist in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Benötigtes Volumen des Bioreaktors bei satzweisem Austausch der Zellen in Abhängigkeit von der Standzeit der Zellen

Zahl der Zyklen	1	2	3	4
Standzeit / h	16,0	36,8	57,6	78,4
Reaktorvolumen / m ³	15,6	16,5	17,3	18,2

Es ist darauf zu achten, dass die Standzeit der Mikroorganismen nicht beliebig verlängerbar ist, da sich die Tendenz zur Nitritakkumulation mit zunehmendem Zellalter erhöht.

Für den zweiten Fall, der kontinuierlichen Zugabe frischer Zellen, ergibt sich für einen Zellstrom \dot{V}_z von 300 L/h ein benötigtes Reaktorvolumen von 20,0 m³.

Welches Verfahren in einem industriellen Prozess realisiert werden kann, hängt neben diesen berechneten Größen auch von der Praktikabilität der beiden Verfahren ab. Bei der satzweisen Erneuerung der Zellen entstehen Totzeiten durch das Entleeren und erneute Befüllen des Reaktors. Dadurch wird sich die Auslegung der Anlage ändern, da am Anfang dieser Betrachtungen davon ausgegangen worden ist, dass die chromatographische Stufe kontinuierlich über eine Zwillingsanlage betrieben wird. Für die Denitrifikation stehen bei dieser Annahme keine Totzeiten zur Verfügung. Setzt man für den Austausch der Zellen beispielsweise eine Stunde an und tauscht die Zellen nach jedem zweiten Zyklus aus, so verringert sich entsprechend die für die Denitrifikation zur Verfügung stehende Zeit und damit der Massenstrom an Nitrat, aber auch die benötigte Standzeit der Zellen. Legt man diese Daten zugrunde, so vergrößert sich das benötigte Reaktorvolumen im vorliegenden Fall nur geringfügig von 16,5 m³ auf 16,6 m³.

Bei dem kontinuierlichen Austausch ergibt sich das Problem, wie der Zellaustrag aus dem Reaktor realisiert werden soll. Die Zellen können nicht mit dem Eluenten ausgetragen werden, da dieser eben durch eine Cross-Flow-Filtration zellfrei gehalten werden soll. Sie müssten also auf anderem Wege aus dem Reaktor entfernt werden, was zu einem Verlust an Eluenten führt. Neben dem berechneten höheren Reaktorvolumen im Vergleich zum satzweisen Zellaustausch besteht ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens darin, dass eine kontinuierliche Kultivierung von frischen Zellen erfolgen muss. Im Falle des satzweisen Betriebs kann die Kultivierung der Zellen in einem großen separaten Bioreaktor so erfolgen, dass diese nach einer optimalen Kultivierungsdauer von 19 h (siehe Kapitel 5.1.2) geerntet und direkt in die Denitrifikationsstufe überführt werden. Im kontinuierlichen Betrieb müsste die Kultivierung der Biomasse in einer Vielzahl kleiner Reaktoren erfolgen, um eine quasi-kontinuierliche Versorgung der Denitrifikationsstufe mit frischen Zellen zu gewährleisten.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein kombinierter Prozess zur Nitratanreicherung in Molkenkonzentrat mittels Anionenaustauscherharzen und mikrobieller Denitrifikation des Eluats aus der Regeneration der chromatographischen Stufe entwickelt. Zudem wurde eine schnelle und hinreichend genaue Nitrat- und Nitritanalytik in den relevanten Medien etabliert. Basierend auf den erhaltenen Daten für die einzelnen Prozessschritte konnte eine Abschätzung der Dimensionierung eines Prozesses im industriellen Maßstab erfolgen.

Die Nitrat- und Nitritanalytik erfolgte mittels des analytischen Fertigtests Reflectoquant[®] der Fa. Merck KGaA durch reflektometrische Messung einer Farbreaktion. Für beide untersuchten Ionen konnten in allen verwendeten Medien (Molke, Molkenkonzentrat und Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration) systematische Minderbefunde durch das Analysensystem festgestellt werden. Es ergab sich aber in allen Fällen ein linearer Zusammenhang zwischen Messergebnis und realer Konzentration, so dass für alle Kombinationen von Nitrat und Nitrit in den verschiedenen Medien Korrekturfaktoren ermittelt werden konnten, mit denen von dem Analyseergebnis auf die tatsächliche Konzentration geschlossen werden kann (Kapitel 3). Für einen Prozess im industriellen Maßstab ist es allerdings notwendig, die Prozessanalytik zu automatisieren. Dieses ist mit einem auf Teststreifen basierenden System nur sehr eingeschränkt möglich. Eine photometrische Analytik ist zumindest im Falle des Molkenkonzentrats aufgrund der Trübung dieses Mediums nicht möglich, und eine Klärung des Molkenkonzentrats durch Filtration oder Zentrifugation ist problematisch. Deshalb sollte hier überlegt werden, ob eine reflektometrische Messung eventuell in einer Fließ-Injektions-Analyse-Anlage möglich wäre.

Die Nitratentfernung aus Molkenkonzentrat mittels stark basischer, Nitrat-hochspezifischer Anionenaustauscherharze ist reproduzierbar möglich (Kapitel 4). In einer Chromatographiesäule wurden dabei bessere Ergebnisse erhalten als in einer vierstufigen Rührkesselkaskade. Als geeignetes Anionenaustauscherharz stellte sich das Applexion Resin XA 455 heraus, welches in der Chromatographiesäule eine geringere Tendenz zur Verblockung der Säule bei der Beladung mit Molkenkonzentrat zeigte als das ansonsten ebenfalls zur Nitratanreicherung von Molkenkonzentrat geeignete Purolite A-520 E. Die Beladung des Harzes mit

Molkenkonzentrat konnte bei einem hohen Volumenstrom von drei Bettvolumen pro Stunde erfolgen, wobei sich zeigte, dass tiefe Temperaturen von 5 °C die nutzbare Kapazität des Harzes positiv beeinflussen. Dieses ist insofern günstig, als dass bei dieser Temperatur eine Vermehrung der im Molkenkonzentrat vorhandenen Mikroorganismen und damit verbundene Qualitätseinbußen nicht zu erwarten sind. Die vom Hersteller angegebene maximale Kapazität des Anionenaustauscherharzes konnte in diesem Fall nur zu ca. 13% genutzt werden, bis es zu einem messbaren Nitratdurchbruch kam. Dieses ist auf die komplexe Matrix des Molkenkonzentrats zurückzuführen. Probleme mit Verblockungen der Säule durch Molkenkonzentrat waren im Laborversuch in zwei Fällen festzustellen. Zum einem verblockte die Säule, wenn sie mit Molkenkonzentrat beschickt wurde, welches bereits längere Zeit gelagert war. Dieses ist darauf zurück zu führen, dass suspendierte Feststoffe in dem Medium konglomerierten und sedimentierten. Dieses Problem ist in einem industriellen Prozess nicht zu erwarten, da dort keine nennenswerten Lagerungszeiten auftreten. Zum anderen erfolgten schleichende Verblockungen der Säule nach einigen Zyklen der Beladung und Regeneration. Die Laborsäule konnte allerdings aufgrund ihres hohen Füllstandes mit Harz nicht, wie es für Ionentauschersäulen üblich ist, zwischen den Zyklen im Gegenstrom gespült werden, da es hierbei zu einem Austrag von Harz kam. Dieses sollte bei einer entsprechend dimensionierten industriellen Säule möglich sein, wodurch Ablagerungen im oberen Bereich des Säulenmaterials ausgespült werden können. Die Regeneration des Anionenaustauscherharzes mit Natriumchloridlösung war nicht nur bei den für diese Prozesse üblichen Konzentrationen von $c_{\text{NaCl}} = 50\text{-}100$ g/L möglich, sondern auch bei einer Kochsalzkonzentration von nur 35 g/L, die für eine mikrobielle Denitrifikation des Eluats geeignet ist. Als optimale Temperatur für die Regeneration stellte sich 40 °C bei einem Volumenstrom des Eluenten von ca. 7 BV/h heraus. Geringere Temperaturen resultierten in einer schlechteren Ausnutzung des Eluenten, höhere Temperaturen ergaben bei erhöhtem Energieaufwand keine Vorteile für die Elution, zudem war bei 60 °C bereits eine Blasenbildung im Harzbett zu erkennen.

Im Bereich der mikrobiellen Denitrifikation zeigte sich, dass der verwendete Mikroorganismus *P. denitrificans* für den Nitratabbau im Eluat der chromatographischen Nitratanreicherung, das heißt in einer Lösung von 35 g/L Natriumchlorid, geeignet ist (Kapitel 5). Es zeigte sich, dass bereits die Kultivierung des Bakteriums anaerob erfolgen muss, um eine Nitritakkumulation bei der späteren

Denitrifikation zu vermeiden. Als geeignete Denitrifikationsbedingungen stellten sich eine Temperatur von 37 °C, ein pH-Wert von 7,5 und die Zugabe von Acetat als Kohlenstoffquelle heraus. Ungepufferte Systeme und gealterte Zellen zeichneten sich durch eine verstärkte Neigung zur Nitritakkumulation aus. Der Verbleib von Nitrit im System ist unbedingt zu vermeiden, da dieses giftig ist. Zwar traten in allen Experimenten während des mikrobiellen Nitratabbaus auch geringe Nitritkonzentrationen auf, doch war bei optimierten Bedingungen nach vollständig erfolgter Denitrifikation kein Nitrit mehr nachweisbar.

Mit frei suspendierten Zellen wurde eine optimale Abbaugeschwindigkeit bei einer Zelldichte von ca. 1 g/L erreicht. Die Abtrennung der Zellen zur Rückführung des Eluenten in die chromatographische Stufe gestaltete sich im Labormaßstab als schwierig, da das für diesen Maßstab von einigen Litern Medium geeignete Mikrofiltrationsmodul bei der Zellseparation verblockte, was zu einer deutlichen Verringerung des Permeatflusses im Verlaufe der Abtrennung führte. Das verwendete Plattenmodul zeichnete sich dabei durch eine bauartbedingt geringe Überströmgeschwindigkeit aus. Rohrmodule sind vermutlich besser geeignet, doch standen diese nicht in einem geeigneten Maßstab zur Verfügung.

Ein Vergleich mit einem anderen denitrifizierenden Bakterium, *P. pantotrophus*, zeigte, dass dieses bei geringeren Abbaugeschwindigkeiten zwar geringere intermediäre Nitritkonzentrationen lieferte, diese aber auch über den erfolgten Nitratabbau hinaus bestanden.

Immobilisierte Mikroorganismen zeichneten sich durch eine hohe Langzeitstabilität aber geringere Abbauraten im Vergleich zu freien Zellen aus. Durch die Immobilisierung wird die Zellabtrennung vereinfacht, doch handelt es sich bei der Immobilisierung selbst um einem aufwändigen Schritt. Durch immobilisierte Zellen konnte eine kontinuierliche Denitrifikation von Kochsalzlösung realisiert werden. Ein direkter Einsatz von immobilisierten Bakterien in Molkenkonzentrat erwies sich als nicht möglich, da hierbei im Molkenkonzentrat signifikante Mengen an Nitrit nachgewiesen werden konnten, was die Verwendung in der Lebensmittelbehandlung verbietet.

Eine Kombination der beiden Verfahrensschritte soll die Nachteile der beiden einzelnen Stufen umgehen. So erfolgt eine vollständige Entfernung des gesundheitlich bedenklichen Nitrats aus der Umwelt und nicht nur eine Verlagerung in ein anders Medium wie dieses bei einer allein stehenden Ionenaustauscheranlage

der Fall wäre. Zudem werden durch die Aufbereitung des Eluats keine wesentlichen Salzfrachten in die Umwelt abgegeben. Außerdem kommen bei dieser Kombination weder die Mikroorganismen noch eventuell entstehendes Nitrit in direkten Kontakt mit dem Lebensmittel Molke. Die Kombination der chromatographischen Nitratentfernung aus Molkenkonzentrat und der anschließenden mikrobiellen Denitrifikation des nitratbelasteten Eluats konnte im Labormaßstab durchgeführt werden (Kapitel 6). Die Abschätzung der Dimensionierung einer solchen Anlage für die Fa. Biolac ergab, dass sowohl für die chromatographische als auch für die mikrobielle Stufe des Verfahrens Dimensionen zu erwarten sind, die im Rahmen üblicher industrieller Anlagen liegen. Zur Verarbeitung von 800.000 t Molke jährlich ergaben sich aus den vorhandenen Daten ein benötigtes Volumen für die Ionentauschersäule von $11,7 \text{ m}^3$ und ein Volumen des Bioreaktors zwischen $15,6$ und $20,0 \text{ m}^3$, abhängig von der Art der Zellerneuerung.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit kann mit dem Aufbau einer Pilotanlage zum Nitratabbau in Molkenkonzentrat mittels eines kombinierten chromatographischen und biologischen Verfahrens begonnen werden. Dabei sollten neben den üblichen Problemen des Up-Scalings die folgenden Punkte Beachtung finden:

- Es muss ein automatisierbares Verfahren zur Nitratanalytik in Molkenkonzentrat entwickelt werden.
- Die Problematik des Verblockens der Ionentauschersäule muss in größerem Maßstab untersucht werden.
- Es muss eine geeignete Cross-Flow-Filtrationsanlage zur Zellseparation entwickelt werden.

8 Anhang

8.1 Bakteriellles Wachstum

Bakterien vermehren sich durch Zweiteilung. Demzufolge beträgt die Zellzahl N nach n Teilungen $N = N_0 \cdot 2^n$, wobei N_0 der Zellzahl vor dem Beginn der Teilungen entspricht [98]. Als Teilungsrate bezeichnet man die Anzahl der Teilungen pro Zeiteinheit, wohingegen die Generationszeit als die für einen Teilungszyklus benötigte Zeit definiert ist. In der Praxis bezieht man sich jedoch häufig nicht auf die Zellzahl sondern auf eine Zelldichte D , welche der Konzentration an Biotrockenmasse im Medium entspricht [99]. Dabei betrachtet man die Kultur als ein sich autokatalytisch vermehrendes System. Bei ungehemmtem Wachstum ist die zeitliche Änderung der Zelldichte proportional zu D :

$$\frac{dD}{dt} = \mu \cdot D \quad \text{(Gleichung 16)}$$

Die Wachstumsrate μ stellt hier ein Maß für die Geschwindigkeit des Zuwachses an Biotrockenmasse dar. Die Zeitspanne, innerhalb derer sich die Zelldichte verdoppelt, wird als Verdopplungszeit t_d bezeichnet. Das ungehemmte Wachstum verläuft entsprechend einem Konzentration-Zeit-Gesetz erster Ordnung:

$$D = D_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{(Gleichung 17)}$$

D_0 = Zelldichte zum Zeitpunkt $t = 0$

Werden in einer Kultur weder Nährstoffe zugeführt noch Stoffwechselprodukte abgeführt, spricht man von einer statischen Kultur. In dieser Arbeit wurden die für die Denitrifikation benötigten Biomassen stets in statischer Kultur gezogen. In einer solchen sind die Bedingungen für ein exponentielles Wachstum nicht durchgängig erfüllt. Die Wachstumsrate μ ist nach dem Animpfen der Kultur zunächst geringer als bei ungehemmtem Wachstum, da die Bakterien sich zunächst erst an die neuen Umgebungsbedingungen anpassen müssen. Nachdem die Bakterien danach eine Zeit lang ein ungehemmtes Wachstum durchlaufen, führt schließlich der Verbrauch von Substraten und die Anhäufung von Stoffwechselprodukten zu einer Verlangsamung der Vermehrung und zum Absterben der Zellen. Man unterteilt daher das Wachstum in statischer Kultur in verschiedene Phasen:

- 1) Anlaufphase oder lag-Phase (Adaption an die Lebensbedingungen)
- 2) exponentielle Phase (ungehemmtes Wachstum)
- 3) stationäre Phase (kein weiteres Wachstum)
- 4) Absterbe-Phase

Die folgende Abbildung 47 stellt den prinzipiellen Verlauf einer Wachstumskurve in logarithmischer Auftragung dar.

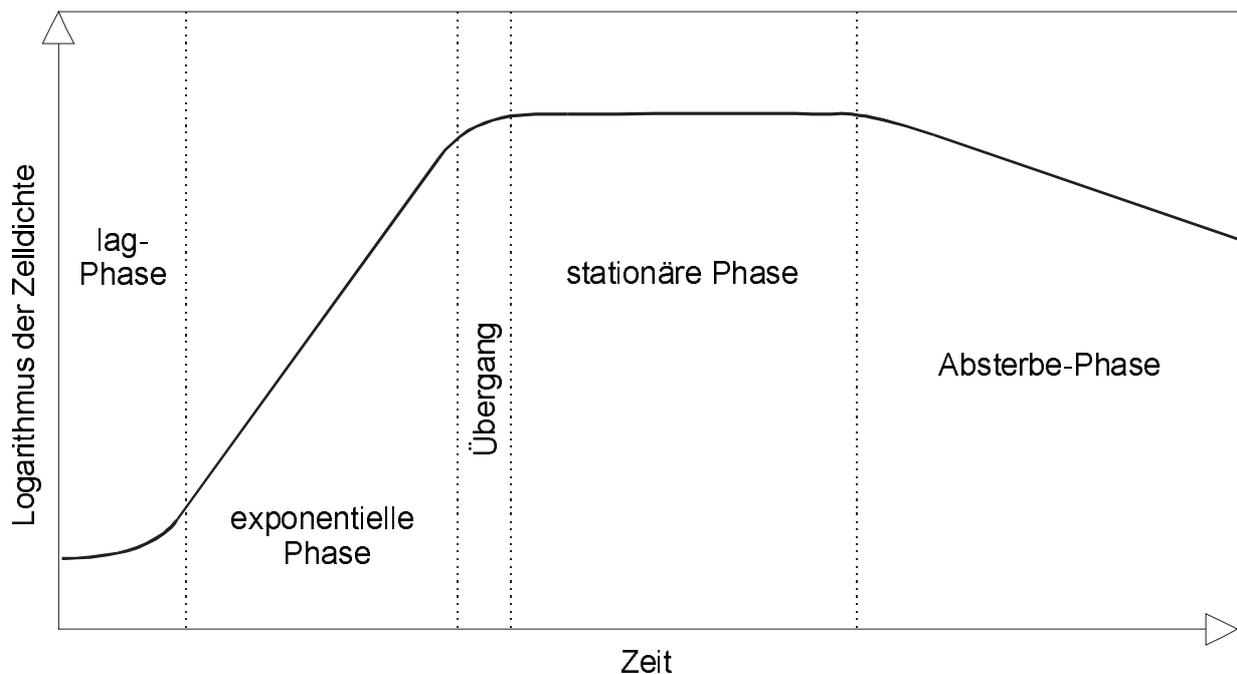


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Wachstumskurve einer Bakterienkultur [98]

Ein wichtiger Parameter des Wachstums ist der Ertrag X , welcher die Differenz zwischen der maximalen und der anfänglichen Zelltrockenmasse angibt und somit dem Zuwachs an Biomasse während der Kultivierung entspricht.

Weiterhin entscheidend ist die exponentielle Wachstumsrate μ , die aus dem exponentiellen Teil der Wachstumskurve ermittelt wird. Sie wird erhalten aus der Steigung der Geraden der Auftragung der logarithmischen Zelldichte gegen die Zeit.

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t - t_0} \quad \text{(Gleichung 18)}$$

Aus der Wachstumsrate lässt sich die Verdopplungszeit t_d bestimmen:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{(Gleichung 19)}$$

Die Anlaufzeit t_l ist die Zeitdifferenz zwischen einem beliebigen Zeitpunkt während der exponentiellen Phase, zu dem in der Kultur eine gegebene Zelldichte vorliegt, und demjenigen Zeitpunkt, zu welchem diese Zelldichte erreicht worden wäre, wenn sich von Beginn an ein exponentielles Wachstum stattgefunden hätte. Die Anlaufzeit berechnet sich nach der Formel

$$t_l = t_r - \frac{\ln D_r - \ln D_0}{\mu} \quad \text{(Gleichung 20)}$$

8.2 Bestimmung der Zelldichte durch Trübungsmessung

Zur Bestimmung des Gehalts an Biomasse in der Probe wird die Trübung der Zellkultur heran gezogen [100]. Durch die Streuung des einfallenden Lichts an den Zellen erscheint eine Zellsuspension trübe, was durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben werden kann:

$$\Theta_{aus} = \Theta_{ein} \cdot e^{-(s \cdot c \cdot d)} \quad \text{(Gleichung 21)}$$

Θ_{aus} = Strahlungsfluss des austretenden Lichtes

Θ_{ein} = Strahlungsfluss des eintretenden Lichtes

s = Streukoeffizient

c = Partikelkonzentration

d = Länge des Lichtweges durch die Suspension

Um eine direkte Proportionalität zur Länge des Lichtweges und der Zelldichte zu erhalten, verwendet man als Messgröße bei der Bestimmung der Trübung in der Regel die Extinktion E :

$$E = \log \frac{\Theta_{ein}}{\Theta_{aus}} = s \cdot c \cdot d \quad \text{(Gleichung 22)}$$

Allgemein wird der Begriff Extinktion im Zusammenhang mit der Absorption von Licht verwendet, daher ist es korrekter, in vorliegenden Fall von einer scheinbaren Extinktion zu sprechen, um klar zu stellen, dass die Lichtschwächung bei der Trübungsmessung in erster Linie auf das Phänomen der Streuung zurückzuführen ist. Voraussetzung hierfür ist, dass weder die Lösung, noch die Zellen selbst bei der eingestrahnten Wellenlänge eine signifikante Absorption zeigen. Die scheinbare Extinktion lässt sich nicht nur relativ schnell bestimmen sondern sie hat außerdem den Vorteil, in guter Näherung zu der Konzentration an Zelltrockenmasse in der Suspension direkt proportional zu sein [100].

8.3 Nitratabbau in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle

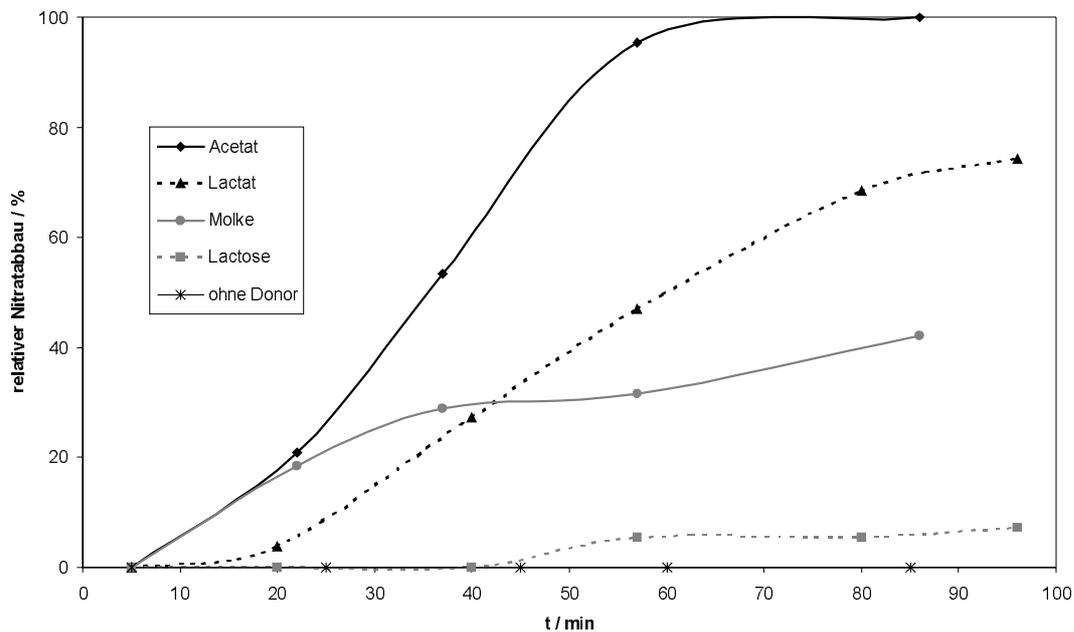


Abbildung 48: Einfluss der Kohlenstoffquelle (250 mg/L) auf den Nitratabbau durch *P. denitrificans*, 20 °C, pH 7,4, physiologische Kochsalzlösung (0,9%)

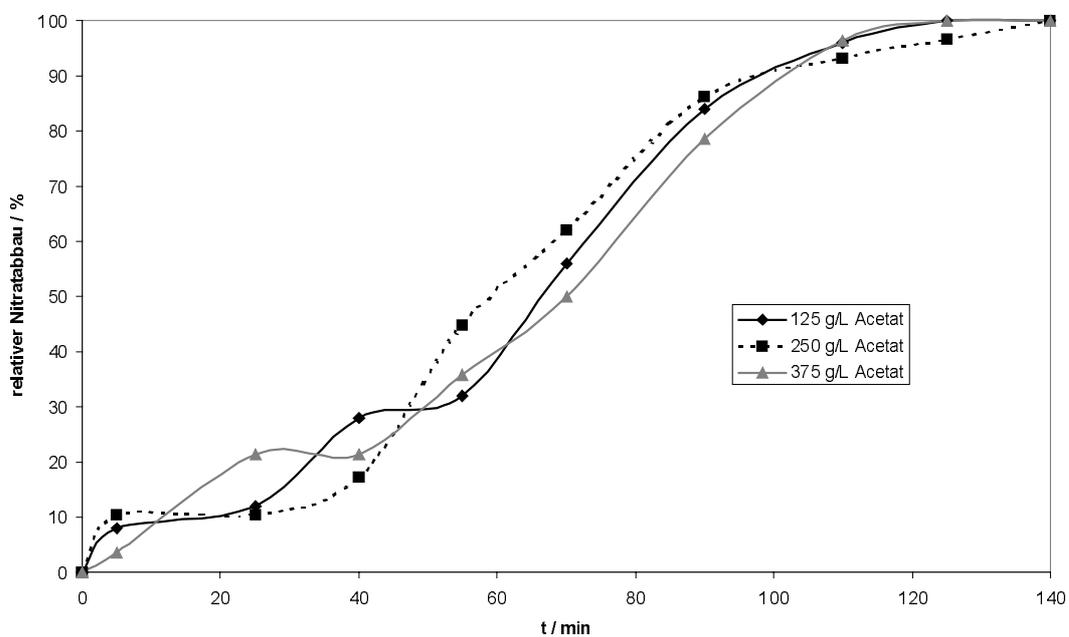


Abbildung 49: Einfluss der Acetatkonzentration auf den Nitratabbau durch *P. denitrificans*, 20 °C, pH 7,4, physiologische Kochsalzlösung (0,9%)

8.4 Nitratabbau in Abhängigkeit von Temperatur und Salzkonzentration

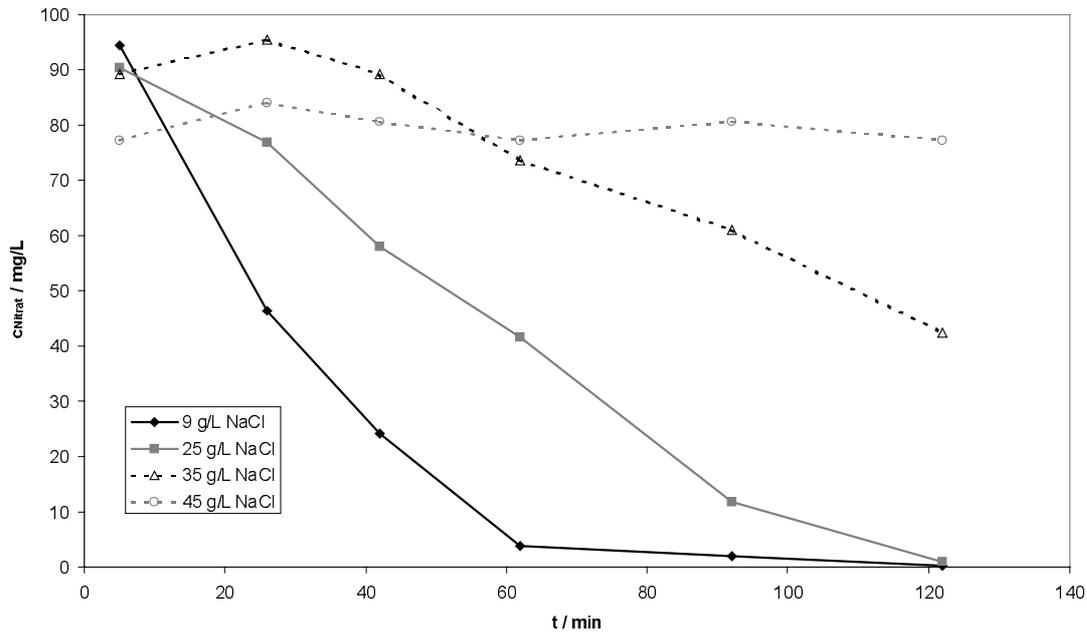


Abbildung 50: Nitratabbau durch *P. denitrificans* bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen, 20 °C, pH 7,4, Kohlenstoffquelle Acetat

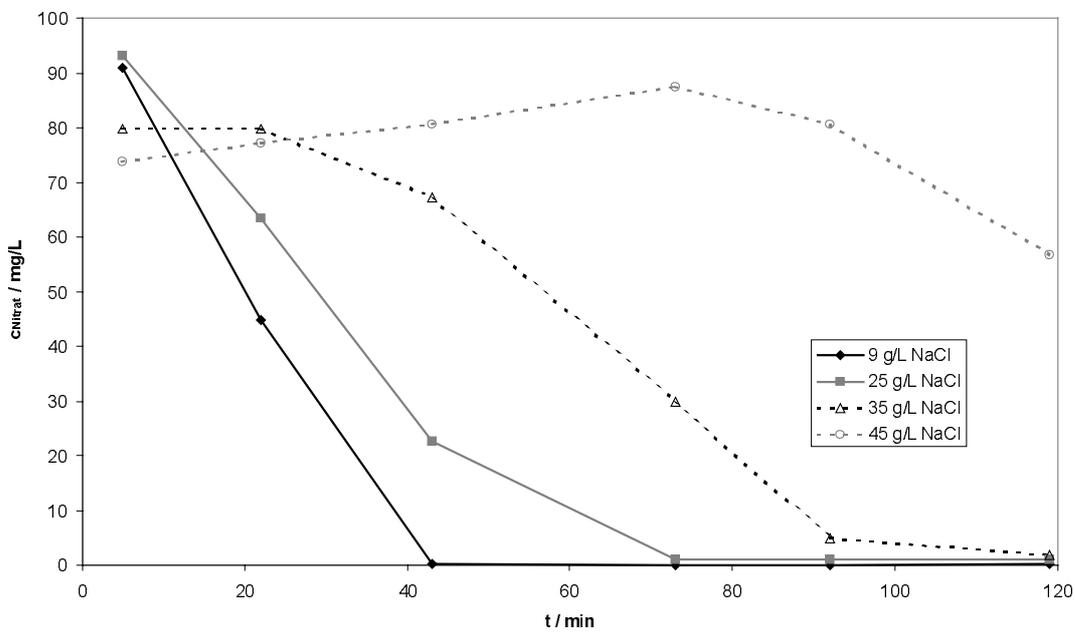


Abbildung 51: Nitratabbau durch *P. denitrificans* bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen, 30 °C, pH 7,4, Kohlenstoffquelle Acetat

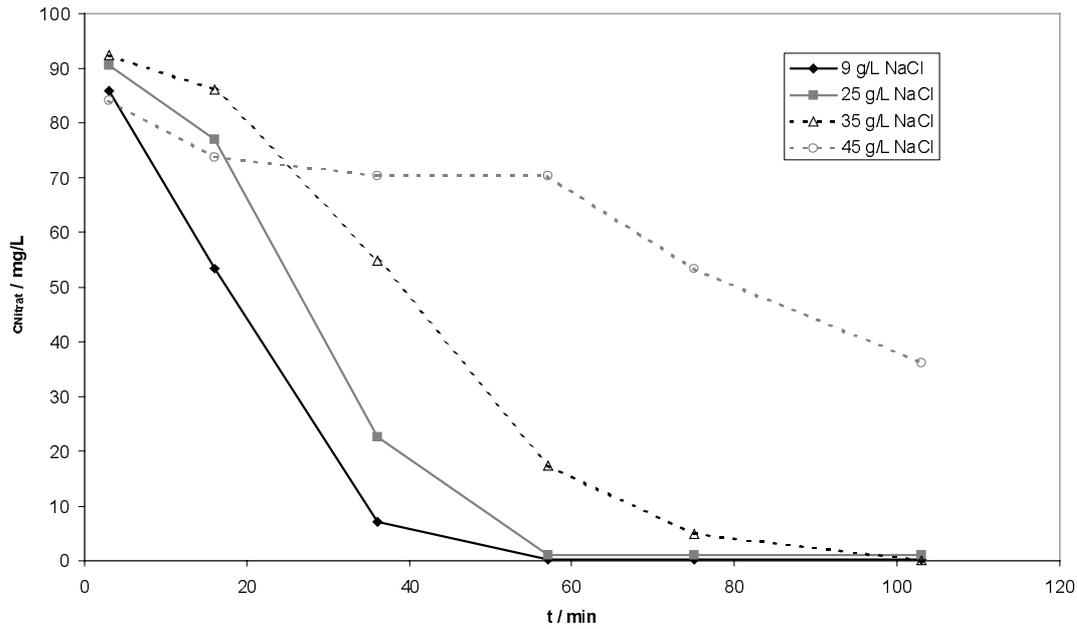


Abbildung 52: Nitratabbau durch *P. denitrificans* bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen, 37 °C, pH 7,4, Kohlenstoffquelle Acetat

8.5 Nitratabbau in Abhängigkeit von der Acetatkonzentration

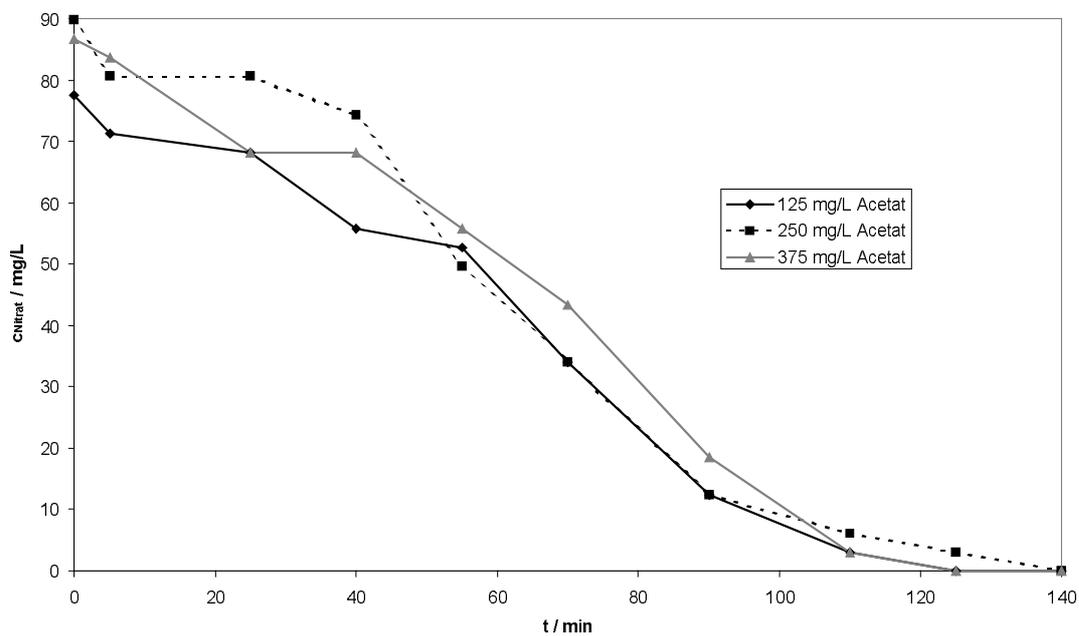


Abbildung 53: Nitratabbau durch *P. denitrificans* bei verschiedenen Acetat-Konzentrationen, $c_{\text{NaCl}} = 35 \text{ g/L}$, 37 °C, pH 7,4

8.6 Herleitung der Gleichungen zum Aktivitätsverlust

8.6.1 Satzweise Zellerneuerung

Wenn die Reaktionsgeschwindigkeit eine Funktion des Zellalters ist, muss innerhalb der Standzeit t_s der Zufluss an Nitrat \dot{m} entsprechend variiert werden, damit der Umsatz U beibehalten wird. Durch Einsetzen der zeitabhängigen Reaktionsgeschwindigkeit (Gleichung 13) in Gleichung 12 erhält man für den Nitratstrom den folgenden zeitlichen Verlauf:

$$\dot{m}(t) = \frac{V}{U} \cdot v(t) = \frac{V}{U} \cdot \alpha^{\frac{t}{\Theta}} \cdot v_0 \quad (\text{Gleichung 23})$$

Der Mittelwert über die Zeitspanne t_s ist gegeben durch

$$\bar{\dot{m}} = \frac{1}{t_s} \int_0^{t_s} \dot{m}(t) dt \quad (\text{Gleichung 24})$$

Einsetzen von Gleichung 23 in Gleichung 24 liefert nach Integration und Auflösen nach V die Gleichung 14.

8.6.2 Kontinuierliche Zellerneuerung

Wenn einem idealen Rührkesselreaktor kontinuierlich frische Mikroorganismen zugeführt werden, während die durchmischte Suspension aus Zellen unterschiedlichen Alters den Reaktionsraum mit dem gleichen Volumenstrom \dot{V}_z wieder verlässt, wird die Altersverteilung der Bakterien im Reaktor durch die normierte Funktion

$$l(t) = \frac{1}{\tau_z} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_z}} \quad (\text{Gleichung 25})$$

$l(t)$ = Innere Altersverteilung der Mikroorganismen

τ_z = mittlere hydrodynamische Verweilzeit der Zellen im Reaktor

beschrieben. Um die mittlere Reaktionsgeschwindigkeit \bar{v} im Reaktor zu bestimmen, ist das Produkt aus $l(t)$ und $v(t)$ über t zu integrieren:

$$\bar{v} = \int_0^{\infty} v(t) \cdot l(t) dt = \frac{\Theta \cdot v_0}{\Theta - \tau_z \cdot \ln \alpha} \quad (\text{Gleichung 26})$$

Dieser Mittelwert kann in die Beziehung zur Bestimmung des Reaktorvolumens (Gleichung 12) eingesetzt werden. Wenn die Verweilzeit der Zellen τ_z durch den Quotienten aus Reaktorvolumen V und Zellstrom \dot{V}_z ausgedrückt wird, ergibt sich durch Umstellen nach V die Gleichung 15.

8.7 Abkürzungsverzeichnis

μ	Wachstumsrate
τ	mittlere hydrodynamische Verweilzeit
Θ	Einheitszeit (60 min)
α	Verlustfaktor
[S]	Substratkonzentration
Ac ⁻	Acetat
bidest.	bidestilliert
BV	Bettvolumen
c	Konzentration
ca.	circa
CSTR	Continuously Stirred Tank Reactor (kontinuierlicher Rührkessel)
D	Zelldichte
D ₀	Anfangszelldichte
D _{max}	theoretisch berechnete Zelldichte für eine maximale Abbaurrate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
E	Extinktion
EU	Europäische Union
eq	Molares Äquivalent
Fa.	Firma
FIA	Fließinjektionsanalyse
g	Gramm
h	Stunde
k. A.	Keine Angaben
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter
M	molar
m	Masse
min	Minute
Mio.	Millionen
N	Zellzahl
N ₀	Anfangszellzahl
NVK	Nutzbare Volumenkapazität
PFR	Plug Flow Reactor (Rohrreaktor)
R ²	Bestimmtheitsmaß
RT	Raumtemperatur
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
t ₁	Anlaufzeit
t _d	Verdopplungszeit oder Generationszeit
TM	Trockenmasse (Feststoffgehalt)
U	Umsatz
V	Volumen
\dot{V}	Volumenstrom
\dot{V}_z	Volumenstrom der Zellsuspension
v	Nitratabbaurate bzw. Reaktionsgeschwindigkeit
v _m	mittlere Nitratabbaurate
v _z	auf Zelltrockenmasse bezogene Nitratabbaurate
X	Ertrag an Zelltrockenmasse

8.8 Literaturverzeichnis

- [1] RÖMPP CHEMIE LEXIKON: Lebensmittelchemie
9. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1995)
- [2] YANG-HEE, C.
Entwicklung von Gel-in-Matrix (GIM)-Systemen zur Immobilisierung von *Paracoccus denitrifikans* DSM 65
Dissertation, Technische Universität Berlin (1994)
- [3] WONG, N.P.
Fundamentals of Dairy Chemistry
3rd ed., Van Nostrand Reinold, New York (1988)
- [4] ZADOW, J.G.
Whey and Lactose Processing
Elsevier Applied Science, London-New York (1992)
- [5] MILCH UND MARKT INFORMATIONSBÜRO DER DEUTSCHEN MILCHINDUSTRIE
Die deutsche Milchindustrie - Zahlen und Fakten
Informationsbroschüre (2000)
- [6] US DEPARTMENT OF AGRICULTURE
Agricultural Handbook no. 8-1. Composition of foods, 01.112-01.115 (1976)
- [7] JELEN, P., CURRIE, R., KADIS, V.W.
Compositional analysis of commercial whey drinks
J. Dairy Sci. **70** (1987) 892-895
- [8] OLLING, CH.C.J., VAN LUIN, F.J.P.
The composition of cheese whey in Friesland
Neth. Milk Dairy J. **42** (1988) 485-499
- [9] ALPAVIT online im Internet
<http://www.molke.de>
Abrufdatum: 18.02.2003
- [10] BIOLAC online im Internet
<http://www.biolac.de>
Abrufdatum: 18.02.2003
- [11] DENZLER, H.-J.
Mündliche Mitteilung, 09/2003
- [12] ULBER, R.
Biotechnologische Methoden zur effizienteren Rohstoffnutzung
Habilitation, Universität Hannover, 2002
- [13] HERBERTZ, G., RICHARTS, E.
IMQ Market Report 2003: Der Markt für Milch und Molkenprodukte in 2003
Bericht, Institut für Marktwirtschaftliche Qualitätsfragen, Veröffentlichung geplant 2003

- [14] DERYAGINA, V.P., ZHUKOVA, G.F., KHOTIMCHENKO, S.A.
Food levels of nitrates and nitrites and their potential daily uptake
Vopr. Pitan. **4** (1993) 47-52
- [15] BALTES, W.
Lebensmittelchemie
5., vollständig überarbeitete Aufl., Springer-Verlag, Berlin (2000)
- [16] WILLKE, B.
Problemorientierte Stammentwicklung von *Paracoccus denitrificans* zur
Trinkwasserdenitrifikation und neue, lichtmikroskopische Methoden zur In-vivo-
Untersuchung von immobilisierten Mikroorganismen
Dissertation, Technische Universität Braunschweig (1989)
- [17] TRINKWASSER online im Internet
<http://home.t-online.de/home/070728479-0001/triwass.htm#Anlage2>
Abrufdatum: 18.02.2003
- [18] DEVOYOD, J.-J.
L'employ des nitrates dans la fabrication des fromages
Ann. Nutr. Alim. **30** (1976) 789-792
- [19] BUTYRIC ACID BACTERIA online im Internet
<http://www.dairykorea.com/fdk/2000/2368-00059.htm>
Abrufdatum: 19.02.2003
- [20] DENZLER, H.-J.
Mündliche Mitteilung, 11/2000
- [21] WEB OF SCIENCE online im Internet
<http://wos.isiglobalnet2.com/CIW.cgi>
Abrufdatum: 13.01.2003
- [22] ESP@CENET online im Internet
<http://de.espacenet.com>
Abrufdatum: 12.01.2003
- [23] SHINICHIRO, H. (NOUINSUISANSHIYOU CHIKUSAN SHIKENJIYOUCHIYOU)
Method for removing Nitrate Nitrogen in crude feed, horticultural food or the like
Japanisches Patent JP4207160, 1992
- [24] GERNHARDS, CH., RATHJEN, A., MAYER-MIEBACH, E., SCHUBERT, H.
Einschlußimmobilisierung von Mikroorganismen für den Nitratabbau in flüssigen
Lebensmittel
BIOforum **6** (1993) 206 – 209
- [25] RATHJEN, A., KERNER, M., MAYER-MIEBACH, E., SCHUBERT, H.
Verringerung des Nitratgehalts pflanzlicher Lebensmittel durch immobilisierte
Mikroorganismen
in K.D. Jany, B. Tauscher (Hrsg.): Biotechnologie im Ernährungsbereich; Karlsruhe
1992, S. 64-70

- [26] KERNER, M., WILK, M., SCHUBERT, H.
Biokatalytische Umwandlungsprozesse in Membranreaktoren – Anwendung auf den mikrobiellen Nitratabbau in Fluiden (Teil 1)
Int. Z. f. Lebensmitteltechnik **44** (1993) EFS 10-15
- [27] WILK, M., RATHJEN, A., SCHUBERT, H.
Einsatz eines Membranreaktors und eines neuartigen Geleinschlußkonzeptes am Beispiel der mikrobiellen Denitrifikation
BIOforum **16** (1993) 163-166
- [28] GERNHARDS, CH., RATHJEN, A., MAYER-MIEBACH, E., SCHUBERT, H.
Immobilization of Microorganisms for the Biological Reduction of Nitrate in Fluid Foods by Inclusion in Gels
in G. Kreysa, A.J. Driesel (Hrsg.): DECHEMA Biotechnology Conferences, Vol. 5, Part B; Weinheim 1992, S. 591-594
- [29] KERNER, M., SCHUBERT, H.
Mikrobieller Nitratabbau in einem Membranreaktor
Chem.-Ing.-Tech. **63** (1991) 361-368
- [30] KERNER, M.
Untersuchungen zum mikrobiellen Nitratabbau in einem Membranreaktor
Dissertation, Universität Karlsruhe 1991
- [31] ROHMANN, U.
Technische Maßnahmen zur Nitratentfernung aus dem Trinkwasser
Gewässerschutz, Wasser, Abwasser **109** (1988) 249-281
- [32] KAPOOR, A., VIRARAGHAVAN, T.
Nitrate Removal from Drinking Water – Review
J. Environmental Engineering **123** (1997) 371-380
- [33] HÖROLD, S., TACKE, T., VORLOP, K.D.
Catalytic removal of nitrate and nitrite from drinking water; 1: Screening for hydrogenation catalysts and influence of reaction conditions on activity and selectivity
Envir. Technol. **14** (1993) 931-939
- [34] LÜDTKE, K., PEINEMANN, K.-V., KASCHE, V., BEHLING, R.-D.
Nitrate removal of drinking water by means of catalytically active membranes
J. Membr. Sci. **151** (1998) 3-11
- [35] KORNGOLD, E.
Removal of Nitrates from potable water by ion exchange
Water Air Soil Pollution **2** (1973) 15-22
- [36] KREEVOY, M., KOTCHEVAR, A. (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA)
Liquid membrane system for the removal of nitrate from water
Int. Patent WO 86/05477
- [37] PINTAR, A., BATISTA, J., LEVEC, J.
Catalytic denitrification: direct and indirect removal of nitrates from potable water
Catalysis Today **66** (2001) 503-510

- [38] CLIFFORD, D., LIU, X.
Ion exchange for Nitrate removal
J. AWWA **85** (1993) 135-143
- [39] CYPIONKA, H.
Grundlagen der Mikrobiologie
Springer-Verlag, Berlin (1999)
- [40] VAN SPANNING, R. J. M., DE BOER, A. P. N., REIJNDERS, W. N. M., DE GIER, J.-W. L., DELORME, C. O., STOUTHAMER, A. H., WESTERHOFF, H. V., HARMS, N., VON DER OOST, J.
Regulation of Oxidative Phosphorylation: The Flexible Respiratory Network of *Paracoccus denitrificans*
Journal of Bioenergetics and Biomembranes **27** (1995) 499
- [41] RUTISHAUSER FREI, R. S.
The behaviour of the various cytochromes of *Paracoccus denitrificans* during transitions between oxic and anoxic growth conditions
Dissertation, ETH Zürich (1992)
- [42] BAERNS, M., HOFMANN, H., RENKEN, A.
Chemische Reaktionstechnik
3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1999)
- [43] ROHMANN, U., SONTHEIMER, H.
Nitrat in Grundwasser
DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe (1985)
- [44] BAUMANN, B., VAN DER MEER, J. R., SNOZZI, M., ZEHNDER, A. J. B.
Inhibition of denitrification activity but not of mRNA induction in *Paracoccus denitrificans* by nitrite at a suboptimal pH,
Antonie van Leeuwenhoek **72** (1997) 183-189
- [45] VAN VERSEVELD, H. W., STOUTHAMER, A. H.
The Genus *Paracoccus*, The Prokaryotes - A Handbook of the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications
Springer-Verlag, New York (1991)
- [46] BAUMANN, B., SNOZZI, M., ZEHNDER, A. J. B., VAN DER MEER, J. R.
Dynamics of Denitrification Activity of *Paracoccus denitrificans* in Continuous Culture during Aerobic-Anaerobic Changes
J. Bacteriology **178** (1996) 4376-4374
- [47] HOEREN, F. U.
Identifizierung des für die di-Stickstoffoxidoreduktase kodierenden Gens aus *Paracoccus denitrificans*: Klonierung, Sequenzierung und Expression des nosZ Gens
Dissertation, Universität Braunschweig (1993)
- [48] SCHWARZ, J.
Optimierung der biologischen Stufe bei der gekoppelten chromatographischen – biologischen Nitratentfernung aus flüssigen Lebensmitteln
Diplomarbeit, Universität Hannover (2002)

- [49] SCHEPER, T.
Bioprozesstechnik
Vorlesungskript, Universität Hannover (2000)
- [50] CLESCERI, L.S., GREENBERG, A.E., TRUSSELL, R.R. (ED.)
Standard methods for the examination of water and wastewater
17th ed., Washington (1989) 4131-4139
- [51] DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E.V.
Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung,
Anionen (Gruppe D), Bestimmung des Nitrat-Ions (D9)
DIN 38405 Teil 9 (1979)
- [52] EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
Bestimmung von Nitritstickstoff, Nitratstickstoff und der Summe von beiden mit der
Fließanalytik (CFA und FIA) und spektrometrischer Detektion
EN ISO 13395 (1996)
- [53] GERNAEY, K., VANDERHASSELT, A., BOGAERT, H., VANROLLEGHEM, P., VERSTAETE, W.
Sensors to monitor biological nitrogen removal and activated sludge settling
J. Microbiol. Meth. **32** (1998) 193-204
- [54] ROCHA, F.R.P., NÓBREGA, J.A.
Flow injection spectrometric determination of nitrate in electrolyte of lead-acid
batteries
Talanta **45** (1997) 265-271
- [55] ÖZTKIN, N., NUTKU, M.S., ERIM, F.B.
Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by
capillary electrophoresis
Food Chemistry **76** (2002) 103-106
- [56] LEUENBERGER, U., GAUCH, R., RIEDER, K., BAUMGARTNER, E.
Determination of nitrate and bromide in foodstuffs by high-performance liquid
chromatography
J. Chromatography **202** (1980) 461-468
- [57] SASAKI, S., ANDO, Y., DEJIMA, M., ARIKAWA, Y., KARUBE, I.
A fluorescence-based sensor for ammonium and nitrate
Anal. Lett. **31**(4) (1998) 555-567
- [58] KIRSTEIN, D., KIRSTEIN, L., SCHELLER, F., BORCHERDING, H., RONNENBERG, J.,
DIEKMANN, S., STEINRÜCKE, P.
Amperometric nitrate biosensors on the basis of *Pseudomonas stutzeri* nitrate
reductase
J. Electroanal. Chem. **474** (1999) 43-51
- [59] TAKAYAMA, K.
Biocatalyst electrode modified with whole-cells of *P. denitrificans* for the determination
of nitrate
Bioelectrochem. Bioenerg. **45** (1998) 67-72

- [60] BINDER, E.
Nitrat – Bedeutung und Nachweis in Milchprodukten
Milchwirtsch. Ber. Bundesanst. Wolfpassing Rotholz **48** (1976) 177-180
- [61] LORENZ, W.
Nitrat- und Nitritbestimmung in Milchprodukten
Milchwirtsch. Ber. Bundesanst. Wolfpassing Rotholz **76** (1983) 185-188
- [62] MUNKSGAARD, L.L., THYMARK, L.
La determinazione di nitriti e nitrati nel latte e suoi derivati mediante la „Flow Injection Analysis“
Latte **13** (1988) 410-411
- [63] DUARTE, M., RIBEIRO, A., MIDIO, A.F.
Padronizaçã de um método espectrofotométrico para determinaçã de nitratos e nitritos em leite e em mistura com soro
Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo **33** (1997) 37-45
- [64] ROHM, H., WINKLER-MACHEINER, U.
Eine enzymatische Methode zur Nitratbestimmung in Anwendung auf Molkepulver und Käse
Ernährung **11** (1987) 9-13
- [65] SEN, N.R., LEE, Y.C.
Determination of nitrate and nitrite in whey powder
J. Agric. Food. Chem. **27** (1979) 1277-1279
- [66] NYGREN, O.
Determination of nitrate content in whey and milk powders at a dairy after an occupational accident with nitric acid
Scand. J. Work Environ. Health **8** (1982) 227-230
- [67] OLIVEIRA, C.P., GLÓRIA, M.B.A., BARBOUR, J.F., SCANLAN, R.A.
Nitrate, Nitrite, and volatile Nitrosamines in whey-containing food
J. Agric. Food Chem. **43** (1995) 967-969
- [68] RICHARDSON, R.K.
A direct spectrophotometric determination of nitrate in liquid and powdered milk and whey
N. Z. J. Dairy Sci. Technol. **23** (1988) 165-172
- [69] EBOCK, V.
Ionenselektive Einstabmeßkette für die Nitratbestimmung
Chem. Techn. **32** (1980) 91-92
- [70] KOLB, M., KLAMPT, W., MÜLLER, F.
Erfahrungen mit on-line Analysatoren auf einer Kläranlage
Korrespondenz Abwasser **40** (1993) 1640-1643
- [71] SIEPMANN, M., PÖHLMANN, W., KOPF, W.
Möglichkeiten und Erfahrungen mit Meßstationen an Fließgewässern, insbesondere der kontinuierlichen Erfassung von Ammonium, Nitrat, Kohlenstoffdioxid, o-Phosphat und Chlorophyll-a
Z. Wasser-Abwasser-Forsch. **22** (1989) 145-151

- [72] KRISHNAKUMAR, A.K., GEORGE, E.S., KARTHIKAKUTTY AMMA, M.
A comparison of UV spectroscopy and ion selective electrode in the determination of nitrate in *hevea* foliage
Indian J. Nat. Rubb. Res. **3** (1990) 135-137
- [73] CONSALTER, A., RIGATO, A., CLAMOR, L., GIANDON, P.
Determination of nitrate in vegetables using an ion-selective electrode
J. Food Compos. Anal. **5** (1992) 252-256
- [74] ORION RESEARCH, INC.
Nitrate electrode instruction manual model 97-07 ionplus®
Bedienungsanleitung (1996)
- [75] GUR'EV, I.A., GUR'EVA, Z.M., KUZENKOVA, G.V.
Potentiometric determination of nitrate ions by the dilution method with ion-selective electrodes
J. Anal. Chem. **51** (1996) 576-579
- [76] MERCK KGAA online im Internet
<http://pb.merck.de/servlet/PB/menu/1020630/index.html>
Abrufdatum: 09.04.2003
- [77] DENZLER, H.-J.
Mündliche Mitteilung, 08/2000
- [78] HJORTH, R.
Expanded bed adsorption: elution in expanded bed mode
Bioseparation **8** (1999) 1-9
- [79] BARNFIELD FREY, A.-K., JOHANSSON, H.-J., JOHANSSON, S., LEIJON, P.
Expanded bed adsorption at production scale: Scale-up verification, process example and sanitization of column and adsorbent
Bioprocess Engineering **16** (1997) 57-63
- [80] UPFRONT online im Internet
<http://www.upfront-dk.com/FAQ/faq.html>
Abrufdatum: 18.04.2002
- [81] SCHWARZ, J.
Industrielle Nitratbreicherung in Molke und Molkeprodukten
Bericht zum Schwerpunktpraktikum, Universität Hannover (2001)
- [82] JAKUBITH, M.
Chemische Verfahrenstechnik: Einführung in Reaktionstechnik und Grundoperationen
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge (1991)
- [83] STEINHOF, R.
Industrielle Nitratbreicherung in Molke und Molkeprodukten
Bericht zum Schwerpunktpraktikum, Universität Hannover (2002)
- [84] DSMZ-LIST OF MEDIA ONLINE IM INTERNET
<http://www.dsmz.de>
Abrufdatum: 11.05.2003

- [85] FRITZSCHE, M.
Denitrifikation von Molke
Diplomarbeit, Universität Hannover (2001)
- [86] BANERJEE, A. K., SCHLEGEL, H. G.
Zur Rolle des Hefeextraktes während des chemolithotrophen Wachstums von
Micrococcus denitrificans
Archiv für Mikrobiologie **53** (1966) 132-153
- [87] PEUKER, T.
Mündliche Mitteilung, 12/2000
- [88] CHANG C.-C., TSENG, S.-K.
The optimum condition for autotrophic denitrification by *Paracoccus denitrificans*
Journal of the Chinese Institute of Environmental Engineering **8** (1998) 233-237
- [89] YANG, P. Y., NITISORAVUT, S., WU, J. S.
Nitrate removal using a mixed-culture entrapped microbial cell immobilization process
under high salt conditions
Water Research **29** (1995) 1525-1532
- [90] DINÇER, A. R., KARGI, F.
Salt inhibition of nitrification and denitrification in saline wastewater
Environmental Technology **20** (1999) 1147-1153
- [91] WILK, M., SCHUBERT, H.
Mikrobielle Denitrifikation in einem Membran-Bioreaktor mit hoher Zelldichte
Chemie Ingenieur Technik **9** (1995) 1085
- [92] JEKEL, M., BUHR, A., WILLKE, T., VORLOP, K.-D.
Neuartige Geleinschlussimmobilisate (LentiKats) in der Biotechnologie
Chemie Ingenieur Technik **70** (1998) 438-441
- [93] GENIALAB BIOTECHNOLOGIE PRODUKTE UND DIENSTLEISTUNGEN GMBH
LentiKats: Tips & Tricks,
Broschüre, Braunschweig (2000)
- [94] GENIALAB ONLINE IM INTERNET
<http://www.genialab.de>
Abrufdatum: 10.09.2003
- [95] ZOKAEE, F., KAGHAZCHI, T., ZARE, A.
Cell harvesting by microfiltration in a deadend system
Process Biochemistry **34** (1999) 803-810
- [96] VERA, L., VILLAROEL-LÓPEZ, R., DELGADO, S., ELMALEH, S.
Cross-flow microfiltration of biologically treated wastewater
Desalination **114** (1997) 65-75
- [97] BUCHHOLZ, H.
Mündliche Mitteilung, 6/2003

- [98] SCHLEGEL, H. G.
Allgemeine Mikrobiologie
6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1985)
- [99] WEIDE, H., AURICH, H.
Allgemeine Mikrobiologie
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1979)
- [100] ECKHARD, B.
Mikrobiologische Methoden: eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin (1999)