**Downstream processing of lactic acid
fermentation broth from renewable feed stocks**

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur

Hendrik Laube

ORCID-ID: 0000-0003-2157-3564

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:

Prof. Dr.-Ing. Vera Meyer (TU Berlin)

Gutachter:

Prof. Dr. Peter Neubauer (TU Berlin)

Prof. Dr. Daniel Pleissner (Universität Leuphana)

Dr. rer. nat. M. Klocke (ATB Potsdam)

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 15. Januar 2019
Berlin 2019

Inhaltsverzeichnis

Kapitelname	Seitenzahl
-------------	------------

Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Abstrakt

Abstract

1 Einleitung	1
---------------------	----------

1.1 Die Milchsäure: sowohl als Mono- als auch als Polymer ein Allrounder	3
1.2 Das Marktpotential von Milchsäure und Poly-Milchsäure	11
1.3 Industrielle Herstellung von Milchsäure	14
1.3.1 Chemische Synthese von Milchsäure	14
1.3.2 Biologische Herstellung von Milchsäure	15
1.3.3 Die drei Kategorien von pflanzlichen Bausteinen	16
1.3.4 Zuckerquellen und deren Verwertung durch Milchsäurebakterien	16
1.3.5 Physikalischer Aufschluss und Hydrolyse der Zuckerquellen	18
1.3.6 Fermentation der Rohzuckerlösung durch Mikroorganismen	18
1.3.7 Stoffwechselwege für die Produktion von Lactose aus Einfachzucker	21
1.3.8 Die benötigten Inhaltstoffe für eine homofermentative Milchsäurefermentation	26
1.3.9 Einfluss der Milchsäure auf den Verlauf der Fermentation	27
1.3.10 Technische Realisierung der Fermentation	29
1.3.11 Reinigung der Fermentationslösung	35

Fortführung des Inhaltsverzeichnisses auf der nächsten Seite

Inhaltsverzeichnis - fortgeführt

Kapitelname	Seitenzahl
2 Ziele der Studie	38
2.1 Entwicklung einer Analysemethode zur Erfassung von organischen Verbindungen	38
2.2 Anwendung der Kapillarelektrophorese-Methode zur Analyse des Reinigungsprozess	39
2.2.1 Einfluss von organischen Verbindungen auf die technischen Eigenschaften von Milchsäure	42
2.3 Einsatz von Bio-Adsorbern in der Bioraffinerie	44
2.4 Untersuchung von Membran-Filtereinheiten	47
3 Darstellung der Ergebnisse	50
3.1 Entwicklung einer Analysemethode zur Erfassung von organischen Verbindungen	50
3.2 Anwendung der Kapillarelektrophorese-Methode zur Analyse des Reinigungsprozess	52
3.2.1 Einfluss von organischen Verbindungen auf die technischen Eigenschaften von Milchsäure	55
3.3 Einsatz von Bio-Adsorbern in der Bioraffinerie	56
3.5 Untersuchung von Membran-Filtereinheiten	60

Fortführung des Inhaltsverzeichnisses auf der nächsten Seite

Inhaltsverzeichnis - fortgeführt

Kapitelname	Seitenzahl
4 Zusammenfassung	64
5 Ausblick	65
6 Literaturverzeichnis	67
7 veröffentlichte wissenschaftliche Fachartikel	82
7.1 Capillary electrophoresis method for the analysis of organic acids and amino acids in the presence of strongly alternating concentrations of aqueous lactic acid	82
7.2 CE-UV/VIS and CE-MS for monitoring organic impurities during the downstream processing of fermentative-produced lactic acid from second-generation renewable feedstocks	111
7.3 Application of biosorbents for ion removal from sodium lactate fermentation broth	148
7.4 Investigation of spiral-wound membrane modules for the cross-flow nanofiltration of fermentation broth obtained from a pilot plant fermentation reactor for the continuous production of lactic acid	178
8 Supporting Information	206
8.1 Capillary electrophoresis method for the analysis of organic acids and amino acids in the presence of strongly alternating concentrations of aqueous lactic acid	206
8.2 CE-UV/VIS and CE-MS for monitoring organic impurities during the downstream processing of fermentative-produced lactic acid from second-generation renewable feedstocks	215
8.3 Application of biosorbents for ion removal from sodium lactate fermentation broth	229
8.4 Investigation of spiral-wound membrane modules for the cross-flow nanofiltration of fermentation broth obtained from a pilot plant fermentation reactor for the continuous production of lactic acid	235

Liste der wissenschaftlichen Publikationen

In chronologischer Reihenfolge:

1. **Laube, H.;** Toufiq, R. M. Application of biosorbents for ion removal from sodium lactate fermentation broth
Journal of Environmental Chemical Engineering, **2016**, 4 (1)
ISSN: 2213-3437
DOI: [10.1016/j.jece.2015.10.044](https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.10.044)
verwendete Version: akzeptiertes Manuskript
2. **Laube, H.;** Matysik, F.; Schmidberger, A.; Mehlmann, K.; Toursel, A.; Boden, J. CE-UV/VIS and CE-MS for monitoring organic impurities during the downstream processing of fermentative-produced lactic acid from second-generation renewable feedstocks
Journal of Biological Engineering, **2016**, 10 (7)
ISSN: 1754-1611
DOI: [10.1186/s13036-016-0027-2](https://doi.org/10.1186/s13036-016-0027-2)
verwendete Version: akzeptiertes Manuskript
3. **Laube, H.;** Venus, J.; Schneider, R. Investigation of spiral-wound membrane modules for the cross-flow nanofiltration of fermentation broth obtained from a pilot plant fermentation reactor for the continuous production of lactic acid
Bioresources and Bioprocessing, **2017**, 4 (4)
ISSN: 2197-4365
DOI: [10.1186/s40643-016-0133-5](https://doi.org/10.1186/s40643-016-0133-5)
verwendete Version: akzeptiertes Manuskript
4. **Laube, H.;** Boden, J.; Schneider, R. Capillary electrophoresis method for the analysis of organic acids and amino acids in the presence of strongly alternating concentrations of aqueous lactic acid
Bioprocess and Biosystems Engineering, **2017**, 40(7)
ISSN: 1615-7591
DOI: [10.1007/s00449-017-1761-7](https://doi.org/10.1007/s00449-017-1761-7)
verwendete Version: akzeptiertes Manuskript

Darstellung des Eigenanteils

Abkürzungen der Personen: Roland Schneider (RS), Frank-Michael Matysik (FM), Andreas Toursel (AT), Joachim Venus (JV), Andreas Schmidberger (AS), Hendrik Laube (HL), Toufiq Reza (TR), Kerstin Mehlmann (KM), Jana Boden (JD)

Investigation of spiral-wound membrane modules for the cross-flow nanofiltration of fermentation broth obtained from a pilot plant fermentation reactor for the continuous production of lactic acid

HL designed and coordinated the study, performed the data analysis and drafted the manuscript. RS carried out the fermentation procedure.

Application of biosorbents for ion removal from sodium lactate fermentation broth

HL designed and coordinated the study, performed the data analysis and drafted the manuscript. TR drafted the manuscript and coordinated the hydrolysis-process of the bio-char. RS carried out the fermentation procedure.

CE-UV/VIS and CE-MS for monitoring organic impurities during the downstream processing of fermentative-produced lactic acid from second-generation renewable feedstocks

HL designed and coordinated the study, performed the data analysis and drafted the manuscript. FM carried out the mass spectrometry studies and helped to draft the manuscript. AS participated in the mass spectrometry studies. KM carried out the fermentation procedure. AT carried out the downstream processing procedure. JB performed the analysis on the CE-UV/Vis system.

Capillary electrophoresis method for the analysis of organic acids and amino acids in the presence of strongly alternating concentrations of aqueous lactic acid

HL designed and coordinated the study, performed the data analysis, and drafted the manuscript. JB performed the analysis on the CE-UV/Vis system and helped draft the manuscript. RS carried out the fermentation procedure.

All Manuscripts were language edited and revised by the American Journal Experts (AJE).

Es ist schwieriger, eine vorgefasste Meinung zu zertrümmern als ein Atom.

[Albert Einstein]

Abstrakt

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Aufreinigung von Milchsäure aus Fermentationslösungen als Ausgangsstoff für die Polymerchemie. Dabei kommt der chemischen Prozessanalyse als Ausgangspunkt für die Evaluierung der jeweiligen Effektivität des Prozessschrittes eine wichtige Rolle zu. Es wurde eine Kapillarelektrophorese-Methode mittels UV/VIS-Detektor entwickelt, welche neben Milchsäure weitere organische Säuren und Aminosäuren erfasst. Dabei konnte der intrazelluläre Metabolit, Pyroglutamin, identifiziert und anhand von Laborversuchen sein negativer Einfluss auf den Polymerisationsprozess der Milchsäure nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurden an Chitosan, Alginat, Weide und Papel, und ihren pyrolysierten Aktivkohleprodukten Ionenaustauschversuche durchgeführt und diese mit den Werten kommerzieller Adsorber verglichen. Die Versuche haben gezeigt, dass sowohl die Ionenart als auch die adsorbierte Menge von dem verwendeten Rohstoff als auch im Bereich des Holzes von der Pyrolyse abhängig ist. Die Fähigkeit zur Regenerierung dieser natürlichen Adsorbern, für den erneuten Einsatz, wurde ebenfalls belegt. Diese biologisch abbaubaren Adsorbern können nach ihrer Erschöpfung weiter als Bodenverbesserer in der Landwirtschaft verwendet werden. Demnach entfällt eine kostenpflichtige Entsorgung, was deren Wirtschaftlichkeit erhöht.

Im Bereich der Nanofiltration wurde eine Methode zur Bestimmung des Membranwiderstandes innerhalb einer Filtrationsanlage entwickelt. Dabei wurden sieben Nanofiltrationsmodule auf ihre Verwendbarkeit für die Filtration von Milchsäure-Fermentationslösungen hin untersucht. Die Methode erlaubt es dabei den wirtschaftlich optimalen Betriebsdruck des Membranmoduls zu ermitteln. Der Druck auf der Feed-Seite hatte zwar Einfluss auf den Volumenstrom auf der Permeat-Seite, jedoch wurde die Milchsäure-Rückhaltung stark durch das Membranmaterial beeinflusst. Eine Untersuchung der Metaboliten im Permeat hat gezeigt, dass alle Membranen die gleichen Fraktionen an Verunreinigungen durchlassen. Diese Untersuchungen sind insofern wichtig, da anhand der Herstellerangaben sich keine eindeutige Kaufempfehlung von Modulen für die Nanofiltration von Milchsäure geben lässt.

Abstract

The primary focus of this thesis is the chemical analysis of a downstream process (DSP) to produce lactic acid as a feedstock for the polymer industry. The feedstock for the lactic acid fermentation process consists of renewable resources. Lactate is produced in its sodium lactate form by bacteria and must be cleaned and converted into its acid form by the DSP. Chemical analysis is of great importance because it permits an evaluation of the efficiency of both the single unit operation and the entire DSP. In this thesis, a capillary electrophoresis method based on UV/VIS detection was developed. This method can detect lactic acid, various organic acids and amino acids in a single run. Peak identification was conducted either by spiking the samples with reference substances or by using a mass spectrometry detector to find the metabolite, pyroglutamic acid. Laboratory experiments proved that pyroglutamic acid negatively affects the polymerization of lactic acid into poly-lactic acid.

The use of renewables for lactic acid production was expanded from the fermentation process to the DSP. The renewables alginate, chitosan, papule, willow and their activated char forms were used for ion adsorption. The results were compared to those obtained for commercial adsorber resins. The experiments showed that the type of ion and the number of adsorbed ions depended on the type of resource and, in the case of wood, could be altered through pyrolysis. The capacity for biologic adsorbent regeneration was also demonstrated. The biologic adsorbents can be further used as fertilizers after they are exhausted. In contrast to petrochemical adsorber resins, no waste disposal costs are charged, which enhances the economic potential of bio-adsorber resins.

Furthermore, a method for estimating the nanofiltration membrane resistance of the filtration modules was introduced. Seven different nanofiltration modules were investigated for their lactic acid fermentation broth filtration performance. The method permits the estimation of the economically optimal feed pressure operating conditions. The feed pressure strongly influenced the permeate stream velocity. However, lactic acid rejection was dependent on the membrane material. The generated membrane performance data are very important because none are provided by the manufacturer.

1 Einleitung

Die technische Exploration von Rohöl zur Mitte des 19. Jahrhunderts läutete den Beginn des Erdölzeitalters ein. Die hohe Dichte an Kohlenwasserstoffverbindungen im Rohöl macht es sowohl als Energieträger als auch als Grundchemikalie für die moderne Industrie unverzichtbar. Seine komplexe Zusammensetzung kann durch eine Vielzahl an Destillationsschritten zu kurzkettigen Kohlenstoffverbindungen aufgespalten werden. Die erhaltenen Chemikalien dienen als Grundbausteine für rund 90 % der chemischen Produkte weltweit, einschließlich Plastik.

Die weltweite wirtschaftliche Abhängigkeit vom Rohöl hat zwei wesentliche Nachteile: Zum einen kann der steigende Bedarf an Rohöl in Zukunft nicht mehr von den endlichen fossilen Vorkommen gedeckt werden, zum anderen hat der kontinuierliche Verbrauch von Rohöl einen stark negativen Einfluss auf das globale Klima und die Umwelt (Keller et al, 2014; Tsoskounoglou et al, 2008). Dies hat insbesondere in den letzten Jahren zu einer verstärkten Suche nach Alternativen geführt (Rockström et al, 2017).

Das Konzept der Bio-Raffinerie stellt eine vielversprechende Alternative zu erdölbasierten Industrie-Konzepten dar. Hier erfolgt eine biologische Synthese von Grundchemikalien durch die mikrobielle Umwandlung von Bestandteilen von nachwachsenden Rohstoffen (Biokonversion). Die gebildeten Verbindungen können dann aus der Fermentationslösung isoliert, gereinigt und konzentriert werden. Anschließend können diese Verbindungen innerhalb von etablierten Prozessen weiterverarbeitet werden.

Im Wesentlichen liegen die gewünschten Produkte nach der Fermentation als fertige organische Verbindungen vor. Sie müssen danach nicht weiter durch chemische Reaktionen strukturell grundlegend verändert werden. In einer Bio-Raffinerie ist das Reinigungsverfahren so aufgebaut, dass Unterschiede in den physikalisch-chemischen Eigenschaften zwischen den Verunreinigungen und dem gewünschten Produkt genutzt werden, um eine Separation herbeizuführen. Hierzu zählen unter anderem Adsorption, Extraktion und Filtration.

Im Gegensatz dazu liegt das Rohöl zu Beginn eines petrochemischen Raffinerieprozesses als Edukt vor. Dieses zeichnet sich durch einen sehr hohen Anteil an Kohlenwasserstoffverbindungen aus. Darüber hinaus hat Rohöl so gut wie keinen

Wasseranteil. Daher wird das Rohöl in einer petrochemischen Raffinerie durch mehrere chemische Verfahren, das sogenannte Fracking, aufgespalten. Dabei entstehen mehrere unterschiedlich lange Kohlenstoffverbindungen, sogenannte Fraktionen. Diese Fraktionen werden, durch thermische Trennverfahren, in sogenannten Destillations-Kolonnen voneinander getrennt. Die Trennung erfolgt durch die jeweilige Siedetemperatur. So wird über den Kopf der Kolonnen die leicht siedende Fraktion und über den Sumpf die schwer siedende Fraktion abgezogen.

Für die weitere Aufreinigung einer Fraktion können erneut Destillations-Kolonnen zum Einsatz kommen. Der Einsatz einer weiteren Kolonne kann aber auch unwirtschaftlich sein. Dieser Fall ist durch das Auftreten eines Azeotropes oder nah beieinanderliegende Siedepunkte gegeben. In diesem Fall würden andere Trennverfahren eingesetzt werden, welche Unterschiede in anderen physikalisch-chemischen Eigenschaften zwischen Produkt und Verunreinigung bzw. Neben-Produkt ausnutzen. Somit können die Reinigungsverfahren von Bio- und petrochemischen Raffinerien ähnlich sein; oft ist dies aber aus den oben genannten Gründen nicht der Fall.

Um den gleichen Reinheitsgrad bei einem konkurrenzfähigen Preis gewährleisten zu können, muss das Reinigungsverfahren der Bio-Raffinerie speziell auf die zu erzeugende Zielsubstanz hin optimiert werden. Ebenso sollte dieses Verfahren auf biologisch nachhaltigen Materialien basieren und idealerweise von einer geeigneten Online-Analytik überwacht werden.

Milchsäure (MS) stellt aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften ein wichtiges Zwischenprodukt dar, vor allem in den Branchen der Lebensmittelindustrie, der Pharmazie und der Textilindustrie. Zu den wichtigsten Eigenschaften der MS zählen unter anderem die gute Verwertbarkeit innerhalb des menschlichen Darms, die biologische Abbaubarkeit ihrer Mono- und Polymere in der Natur, ihre antibakterielle Wirksamkeit sowie ihre hygroskopischen Eigenschaften als konzentrierte Lösung. Aufgrund der Tatsache, dass sie nicht nur chemisch, sondern auch mikrobiologisch hergestellt werden kann, wird sie zunehmend durch den Prozess der Fermentation gewonnen. Dabei kommt der Reinigung der MS von den restlichen Bestandteilen der Fermentationslösung eine technologisch wichtige Bedeutung zu.

Die Weiterentwicklung von einzelnen Komponenten der Bio-Raffinerie hin zu einem nachhaltigen Prozess ist Gegenstand dieser Forschungsarbeit. Dabei stehen die folgenden drei Schwerpunkte im Fokus: (I) die Entwicklung einer prozessbegleitenden Analytik von biologischen Verbindungen zur Erfassung der Produktqualität, (II) die Optimierung der Nano-Filtration zur Reduzierung der Betriebskosten und (III) die Integration von Bio-Adsorbern als neue nachhaltige Technologien zur umweltschonenden Entfernung von anorganischen Ionen aus dem Reinigungsprozess.

1.1 Die Milchsäure: sowohl als Mono- als auch als Polymer ein Allrounder

Das **Molekül der MS** besteht aus drei Kohlenstoffatomen, drei Sauerstoffatomen und sechs Wasserstoffatomen in Form einer Carboxylgruppe und einer Hydroxylgruppe (Abb. 1). Die beiden Gruppen sind über ein delokalisiertes Elektronenpaar untereinander verbunden und bilden zusammen eine funktionelle Gruppe in Form der Hydroxycarbonsäure. Somit erhält die MS nach der IUPAC-Nomenklatur für chemische Moleküle die Bezeichnung als 2-Hydroxypropansäure (Holten, 1971). Die bi-funktionelle Gruppe der Hydroxycarbonsäure bedingt maßgeblich die physikalisch-chemischen Eigenschaften der MS. Dazu zählt unter anderem das acide Verhalten in wässrigen Medien, welches sich in einem niedrigen pK_s-Wert von 3,90 widerspiegelt. Des Weiteren ist das Molekül der MS in der Lage, eine Vielzahl von chemischen Verbindungen mit anderen Molekülen einzugehen (Abdel-Rahman et al, 2013; Castillo Martinez et al, 2013).

Aus der Struktur des Milchsäuremoleküls ergibt sich ein stöchiometrisches Zentrum, welches das Vorkommen von zwei Stereoisomeren bedingt (Benninga, 1990). Diese beiden Stereoisomere haben grundsätzlich die gleiche Struktur (Konstitution) und Summenformel, unterscheiden sich jedoch durch die räumliche Anordnung (Konfiguration) der Atome um das stöchiometrische Zentrum. Stereoisomere, welche sich zueinander wie nicht deckungsgleiches Spiegelbild verhalten, werden Enantiomere genannt. Man nennt sie aufgrund dieser Tatsache auch Spiegelbildisomere. Diese Art der Isomerie wird als Chiralität (Händigkeit, von dem

griechischen Wort Hand) bezeichnet. Die MS besitzt zwei Enantiomere, welche in Abb. 1 dargestellt sind.

Abb. 1: Enantiomere der MS (Castro-Aguirre et al, 2016)

Die Enantiomere haben die gleichen physikalischen und chemischen Eigenschaften, unterscheiden sich jedoch in ihrer biologischen bzw. physiologischen Wirkung. Des Weiteren haben sie jeweils unterschiedliche optische Aktivitäten (Collins et al, 1995). Daher gibt es die linksdrehende MS (D-(–)-Milchsäure oder auch als (R)-Milchsäure bezeichnet) und die rechtsdrehende Milchsäure (L-(+)-Milchsäure oder auch als (S)-Milchsäure bezeichnet) (Castillo Martinez et al, 2013). Im Gegensatz zu D(–)-Milchsäure wird L(+)-Milchsäure im menschlichen Stoffwechsel, z. B. in den Muskelzellen, gebildet (Holten, 1971). Dieses ist darauf zurückzuführen, dass Enzyme stereospezifisch selektiv sind und somit zwischen den Enantiomeren unterscheiden können (Oude Elferink et al, 2001).

Die industrielle **Verwendung von MS** ist vielfältig und erstreckt sich über mehrere Branchen. In der **Lebensmittelindustrie** wird sie unter anderem als Konservierungsmittel verwendet, z. B. in der Bäckerei- und der Getränkeindustrie zum Haltbarmachen von Teig, Süßspeisen und Fruchtsäften. Aufgrund ihrer kalklösenden Eigenschaft wird MS zum Anreichern von Sportgetränken mit Calcium verwendet. Bei der Herstellung von Lebensmitteln durch Milchsäuregärung entstehen unter anderem milchsäurefermentiertes Gemüse wie Sauerkraut, Rote Bete, das russische Borschtsch oder das japanische Kimchi (Park et al, 2014). Bei der Herstellung von Käse wird die Eigenschaft der MS, den pH-Wert zu senken, ausgenutzt, um die Ausbildung von Casein-Mizellen bei niedrigen pH-Werten zu veranlassen (Lee & Lee, 1993). Ebenso werden auch Frischfuttermittel wie Gras und Heu haltbar gemacht (Silierung).

In der **Textil- und Papierindustrie** wird MS als Kalklöser verwendet. In der **Lederindustrie** wird sie zum beim Gerben von Häuten eingesetzt (Abdel-Rahman et al, 2011; Singhvi et al, 2010). Im Bereich der Herstellung von **Haushaltschemikalien** wird die antibakterielle Wirkung von MS in Flüssigseifen, z. B. bei Reinigungs- und Geschirrspülmitteln, genutzt. In der **Kosmetikindustrie** wird MS für die Herstellung qualitativ hochwertiger und ästhetisch anspruchsvoller Produkte verwendet, da sie feuchtigkeitsspendende, antimikrobielle und das Hautbild verjüngende Eigenschaften besitzt. In der **Dentalindustrie** wird sie wegen ihrer hygroskopischen und Emulsionen bildenden Eigenschaften für die Herstellung von Pasten verwendet (Gao et al, 2011). In der **pharmazeutischen Industrie** wird MS als Supplement für die Synthese von dermatologischen Produkten und als Heilmittel zur Behandlung von Osteoporose eingesetzt. In der **Chemieindustrie** dient MS als Vorstufe für die Synthese kleinerer (1,2-Propandiol) und größerer (Acrylpolymer) Moleküle (San-Martín et al, 2007).

Die **Poly-Milchsäure (poly lactic acid, PLA)** und deren Weiterverarbeitung zu Biokunststoff stellt eine weitere wichtige Anwendungsmöglichkeit von MS dar. PLA-Biokunststoff besitzt im Gegensatz zum petrochemisch hergestellten Kunststoff mehrere Vorteile (San-Martín et al, 2007). Ein Vorteil ist der umweltschonende Herstellungsprozess unter Wegfall des Zusatzes von gesundheitsschädlichen Weichmachern wie z. B. Phthalaten (Tullo, 2015).

Innerhalb der **biologisch abbaubaren Polymeren** kann zwischen den biologisch gewonnenen und petrochemisch synthetisierten Polymeren unterschieden werden. Zu den **biologisch gewonnenen** Polymeren zählen neben PLA unter anderem auch Polyhydroxybutyrat (PHB), Polyhydroxyalkanoate (PHA) und thermoplastische Stärke (TPS). Zu der Gruppe der **petrochemisch synthetisierten** Polymere gehören unter anderem aliphatische Polyester wie Polybutylenadipat-Terephthalat (PBAT), Polybutylenadipat (PBA), Polybutylensuccinatadipat (PBSA), Polybutylensuccinat (PBS) und Polycaprolacton (PLC). Die genannten Polymere haben unterschiedliche physikalische Eigenschaften im Vergleich zu den etablierten **nicht biologisch abbaubaren, petrochemisch synthetisierten Polymeren**. Zu Letzteren zählen unter anderem Polyethylen (PE), und zwar in der Form high-density und low-density (PE-HD/LD), Polyethylenterephthalat (PET), Polystyrol (PS) und Polyvinylchlorid (PVC).

Die Kernanforderung seitens der Industrie besteht darin, die physikalischen Eigenschaften wie Reißfestigkeit, Beständigkeit und Dehnbarkeit der Polymer-Filme positiv zu beeinflussen. Dieses kann durch die gezielte Kombination der unterschiedlichen Materialien und deren Verarbeitung erzielt werden. Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht zu den aktuellen Anwendungen von biologisch abbaubaren Polymeren in den jeweiligen Industrien wieder. Dabei sind die eventuell vorhandenen Begrenzungen bei der Anwendung der biologisch abbaubaren Polymeren zu den petrochemisch synthetisierten Polymeren beschrieben. Sollte eine solche Begrenzung bei der Anwendung bei einem biologisch abbaubaren Polymer vorhanden sein und es existiert ein anderes biologisch abbaubares Polymer, welches diese Begrenzung nicht besitzt, so wird diese biologisch abbaubare Alternative angegeben.

Als vereinfachtes Beispiel ist hier die Einkaufstüte, die wahlweise aus Bio-Plastik oder Papier bestehen kann, zu nennen. Aus der Tabelle 1 ist für dieses Beispiel zu entnehmen, dass die Verwendung von flexiblen Polymer-Filmen bei Mülltüten bereits Marktreife erlangt hat. Jedoch ist die Verwendung von reinem PLA oder PHB zur Herstellung von Mülltüten noch nicht gegeben. Das liegt daran, dass deren Reißfestigkeit und Beständigkeit im Vergleich zu PE noch nicht ausreichend sind. Mülltüten aus reinem PLA würden also nicht die gleiche Stabilität wie Mülltüten aus PE besitzen. Mülltüten aus PBS/PBSA als auch die Kombination von PBAT mit wahlweise Stärke oder PLA sind in der Lage, vollständig die von der Industrie gewünschten Anforderungen hinsichtlich der Reißfestigkeit zu erfüllen. PCL dagegen fehlt noch ein gewisses Maß an Festigkeit, um diesen Status zu erreichen.

Produkte, welche eine Kombination aus verschiedenen Polymeren wie z. B. PBAT mit Stärke oder PLA darstellen, haben oft schon die Marktreife erreicht. Hingegen besitzen Produkte, welche nur aus einem einzelnen Polymer wie PLA und PHB gefertigt wurden, noch nicht die gewünschten Eigenschaften für einen breiten Einsatz im Markt. Durch die Kombination von unterschiedlichen Materialien ist es möglich, einem Produkt die gewünschten Eigenschaften zu verleihen. Als Beispiel ist hier der „Pappbecher“ zu nennen. Dieser kombiniert die Strukturfestigkeit der Pappe auf der Außenseite des Zylinders mit den wasserabweisenden Eigenschaften der PLA-Folie auf der Innenseite des Zylinders. Im Gegensatz dazu

ist es aktuell noch sehr schwierig, einen Getränkebecher ausschließlich nur aus PLA-Kunststoff bestehend anzufertigen.

Tabelle 1: Verwendung von biologisch abbaubaren Polymeren und Verbindungen (verändert nach Ullmans (Elvers, 2016)).

Die Symbole verdeutlichen den jeweiligen Grad der Erfüllung der Anforderungen (● Eigenschaften werden vollständig erfüllt; ◐ 1 Eigenschaft wird nicht erfüllt; ◑ 2 bis 3 Eigenschaften werden nicht erfüllt, ○ mehr als 3 Eigenschaften werden nicht erfüllt); k. A. = keine Angabe.

Anwendung	Referenz-Polymer	Anwendungsanforderungen erfüllt zu:						biologisch abbaubare Alternative	Kommentar
		PLA	Stärke + PBAT	PLA + PBAT	PHB	PBS/ PBSA	PCL		
Grundlagen: flexible Filme, kompos-tierbare Mülltüten	PE	○	●	●	○	●	◐	Papier	Materialauswahl hängt von den gewünschten Eigenschaften ab, z. B.: PE-LD- oder PE-HD-ähnlich
Mulchfolien	PE	○	◐	◐	○	◐	◐	Papier	Kernfrage: biologische Abbaubarkeit, welche stark von den lokalen klimatischen Bedingungen abhängt
Entwicklungsstand: flexible Folien, Einkaufstüten	PE	○	●	●	○	●	◐	Papier, Baumwolle	Materialauswahl hängt von den gewünschten Eigenschaften ab, z. B.: PE-LD- oder PE-HD-ähnlich
Klarsichtfolien	PE	○	◐	●	k. A.	k. A.	k. A.		
Hygieneverpackungen	PE	○	●	●	○	◐	◐		
gewirkte Netze	PE-HD	◐	◐	●	◐	◐	◐	Baumwolle	Entwicklungsstand, biologische Abbaubarkeit hängt ab von der Art der spannungsinduzierten Kristallisation
starre Behälter, Extrusion + Thermoforming	PET, PP, PS, PVC	◐	○	◐	◐	◐	◐	Kartonage	mit Kunststoff verkleidete Kartonagen stellen eine Alternative für nicht transparente Verpackungen dar
Spritzgussanwendungen Spritzstreckblasformen	PET, PP, PS	◐	◐	◐	◐	◐	●		Entwicklungsstand, biologische Abbaubarkeit von Flaschen muss gesteigert werden

Der **Polymerisationsprozess** von MS zu PLA läuft wie folgt ab: Ein Monomer der MS (Lactat) verbindet sich mit einem weiteren MS-Monomer zu einem Dimer (Lactid). Dabei können die in Abb. 2 dargestellten Racemate entstehen. Ausschlaggebend ist die jeweilige Position der beiden Methylgruppen (Endres & Siebert-Raths, 2009).

Abb. 2: Enantiomere des Lactid (veränd. nach Garlotta *et al.* (Garlotta, 2001))

Die Dimere können sich durch eine Ringöffnung mit weiteren Dimeren oder Monomeren zu Polymeren, den sogenannten Polylactiden, verbinden (Endres & Siebert-Raths, 2009). Diese Polymerisationsreaktion erfolgt bei steigender Konzentration und unter Abspaltung eines Wassermoleküls aus dem Polymermolekül (Abb. 3) (Garlotta, 2001). Um ein industriell verwendbares Milchsäurepolymer herzustellen, muss ein hoher Polymerisationsgrad von mehr als 100.000 Monomeren erreicht werden. Dieser kann jedoch nicht durch jede Art von Polymerisationsreaktion erreicht werden. Das Monomer kann durch eine Polykondensation lediglich Polymermoleküle mit einer niedrigen Kettenlänge bilden. Erst bei einer azeotropen dehydrativen Polykondensation entsteht eine höhere Kettenlänge. Diese höhere Kettenlänge kann alternativ entweder durch das Anlagern von kurzkettigen Polymeren aneinander oder durch eine wiederholte Ringöffnungspolymerisation eines Lactids gebildet werden (Garlotta, 2001).

Abb. 3: Polymerisationsprozess der Milchsäure (veränd. nach Garlotta *et al.* (Garlotta, 2001))

1.2 Das Marktpotenzial von Milchsäure und Poly-Milchsäure

Der weltweite Markt für MS umfasste ein Volumen von 81.450 Tonnen in 2005, 140.000 Tonnen in 2007, 259.000 Tonnen in 2012 und 329.000 Tonnen in 2015 (Mujtaba et al, 2012; Wasewar, 2005). Somit entsprach die Wachstumsrate 36 %, 17 %, 9 % für die Jahre von 2005 bis 2015.

Der Weltmarkt für MS und PLA konzentriert sich auf die Regionen in Nordamerika, Europa und Asien. Der Marktanteil von MS und PLA wächst in den jeweiligen Märkten unterschiedlich schnell. Dies ist auf verschiedene Faktoren zurückzuführen. Dazu zählt u. a. die bereits bestehende Erschließung des Marktes, da der Markt in den Industrienationen nicht so schnell wächst wie der in den Schwellenländern. Des Weiteren spielt die jeweilige politische und regulatorische Unterstützung von nachhaltigen Industriezweigen und die bestehende Recycling-Infrastruktur in dem jeweiligen Land eine Rolle. Im Jahr 2015 war Nordamerika der größte Verbraucher von MS, wobei die Hauptanwendung in der Produktion von PLA bestand. MS als Lebensmittelzusatz war dagegen nur von nachrangiger Bedeutung. In Asien, dem zweitgrößten Markt, entstand das Wachstum hauptsächlich durch die Verwendung von MS in der Lebensmittelindustrie; die Weiterverarbeitung zu PLA spielte hier nur eine untergeordnete Rolle (IHS-Markit, 2015).

In Europa wird MS derzeit ebenfalls hauptsächlich für den Einsatz in der Lebensmittelindustrie verwendet. Hier ist die Produktion von PLA noch nicht weit genug vorangeschritten, um den Eigenbedarf zu decken, wodurch ein Import von PLA notwendig ist (IHS-Markit, 2015).

Rund 70 % der weltweiten Produktion von MS entfallen auf die Lebensmittelindustrie. Hier wird mittels der Milchsäurefermentation Joghurt und Käse produziert (Salminen et al, 1993). In Abb. 4 sind die Produktionskosten für MS pro Tonne wiedergegeben. Dabei sind die Herstellung auf dem petrochemischen Weg und die fermentative Gewinnung aufgeführt. Die Kosten für die Bereitstellung der Basischemikalien bei der petrochemischen Herstellung betragen zurzeit 797 € pro Tonne. Die Bereitstellung der nachwachsenden Rohstoffe als Ausgangsstoffe für die Fermentation hingegen erfordert nur 178 € pro Tonne (Juodeikiene et al, 2015).

Bei den weiteren Herstellungsschritten, wie der Rückgewinnung, Veresterung/Fermentation, Destillation/Trennung und der Hydrolyse betragen die Kosten für eine fermentative Herstellung bis zu dem 3-fachen der Produktionskosten des petrochemischen Prozesses (Juodeikiene et al, 2015). Insbesondere stellt die Reinigung der MS aus der Fermentationsbrühe mit bis zu 50 % der gesamten Herstellungskosten einen wesentlichen Kostenfaktor dar (Abdel-Rahman et al, 2013). Daher sind die Kosten für die Bereitstellung der Basischemikalien bei der petrochemischen Herstellung der Grund dafür, dass die fermentative Gewinnung insgesamt wirtschaftlicher ist (Wasewar, 2005).

Die Kosten in Bezug auf den Energieverbrauch der einzelnen Verfahrensschritte für die petrochemische und fermentative Herstellung sind in Abb. 5 dargestellt. Die größten Unterschiede in den Energiekosten treten hinsichtlich der Bearbeitung der nachwachsenden Rohstoffe und der Bereitstellung der Basischemikalien auf. Hier beansprucht der petrochemische Herstellungsprozess neun Gigajoule pro Tonne mehr als die fermentative Herstellung. Des Weiteren übersteigen die Energiekosten für die Veresterung bei der petrochemischen Herstellung mit acht Gigajoule pro Tonne die der Fermentation. Grundsätzlich übersteigen jedoch stets bei allen der vier aufgeführten Positionen die Energiekosten der petrochemischen Teilschritte die der fermentativen Teilschritte. Die gesamten Energiekosten für das petrochemische Verfahren belaufen sich auf 61 Gigajoule pro Tonne, während diese sich bei der fermentativen Herstellung auf 36 Gigajoule je Tonne belaufen (Juodeikiene et al, 2015).

Insgesamt beträgt der Gesamtpreis für eine Tonne MS, welche auf dem petrochemischen Weg hergestellt worden ist, 1039 €, für eine Tonne MS, die fermentativ hergestellt wurde, dagegen 865 €. Die Kosten der fermentativen Herstellung betragen damit lediglich 83 % der petrochemischen Herstellung, wodurch sich ein nicht unerheblicher marktwirtschaftlicher Vorteil ergibt (John et al, 2007a).

Abb. 4: Anfallende Produktionskosten bei der petrochemischen und fermentativen Herstellung von MS (verändert nach Juodeikiene *et al.* (Juodeikiene et al, 2015))

Abb. 5 Anfallende Energiekosten bei der petrochemischen und fermentativen Herstellung von MS (verändert nach Juodeikiene *et al.* (Juodeikiene et al, 2015))

1.3 Industrielle Herstellung von Milchsäure

1.3.1 Chemische Synthese von Milchsäure

Aufgrund der vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten der MS hat sich schon frühzeitig ein großer industrieller Bedarf an MS ergeben. Dieser wurde zuerst durch die chemische Synthese und anschließend durch die biologische Herstellung gedeckt.

Obwohl die Milchsäuregärung seit frühester Zeit angewendet wurde, war es die chemische Industrie im Zuge der industriellen Revolution, welche zuerst die großtechnische Produktion von MS auf synthetischem Wege realisierte. Bei diesem Verfahren reagiert Acetaldehyd (Ethanal) mit Cyanwasserstoff (Blausäure) und einer Base zu Lactonitril. Die Reaktion findet in wässriger Lösung unter hohem

Druck statt. Anschließend wird das Lactonitril abgetrennt und durch Destillation gereinigt. Das gereinigte Lactonitril wird durch die Zugabe von Chlorsäure und Schwefelsäure hydrolysiert, wodurch dann MS entsteht. Die hergestellte MS liegt nach diesem Verfahrensschritt in einem Gemisch mit anderen Komponenten vor, die nur schwer zu trennen sind. Daher erfolgt eine Esterbildung der MS mit Methanol zu Milchsäureethylester (Ethyllactat). Der Milchsäureethylester hat einen niedrigeren Siedepunkt und kann daher durch Destillation aus dem Gemisch entfernt werden. Das Destillat wird dann zu MS und Methanol hydrolysiert. Das Methanol kann durch erneute Destillation aus dem Gemisch entfernt und wieder zur Esterbildung eingesetzt werden (Dey & Pal, 2012; Narayanan et al, 2004).

Alternative Syntheseverfahren umfassen die basen-katalysierte Reduktion von Zuckern, die Oxidation von Propylenglykol oder Kohlenstoffmonoxid in wässriger Lösung bei hohem Druck und Temperatur, die Hydrolyse von 2-Chlorpropionsäure und die Oxidation von Propylene durch Salpetersäure (Castillo Martinez et al, 2013; John et al, 2007b).

Es ist wichtig zu berücksichtigen, dass sämtliche chemischen Synthesewege für die Herstellung von MS stets ein Racemat aus 50 % R- und 50 % L-Milchsäure produzieren. Diese Tatsache ist der nicht-stereospezifischen Natur der chemischen Reaktion geschuldet. Die Tatsache, dass biologische, also enzymatisch katalysierte und somit stereospezifische Reaktionen fast enantiomer-reine Produkte herstellen können, verschafft ihnen einen großen Vorteil (vgl. Kap. 1.3.7).

1.3.2 Biologische Herstellung von Milchsäure

Die MS-Fermentation ist vergleichsweise schnell, hat hohe Ausbeuten und kann, im Gegensatz zu chemischen Reaktionen, gezielt eines der beiden Stereoisomere der MS erzeugen (L. & S., 2000; Salminen et al, 2004). Um die Fermentation in Gang zu setzen, muss eine Zuckerlösung mit Nährstoffen versetzt und die gewünschte Bakterienkultur zugegeben werden. Dabei ist es wichtig, die für die Bakterienkultur am besten geeigneten Kulturbedingungen anhand von geeigneten Parametern für die Fermentation einzustellen. Zu solchen Parametern gehören Temperatur, pH-Wert, Belüftung und Umwälzung des Fermentationsmediums. Alle diese Parameter sollten entsprechend der jeweiligen Bakterienart bzw. des jeweiligen Bakterienstammes gewählt werden. Um die Kosten der Fermentation zu

reduzieren, wurden in den letzten Jahren intensive Forschungsarbeiten durchgeführt, um vor allem günstige Kohlenhydratquellen aus nachwachsenden Rohstoffen zu erschließen.

1.3.3 Die drei Kategorien von pflanzlichen Bausteinen

Die nachwachsenden Rohstoffe bestehen, vereinfacht dargestellt, aus unterschiedlichen Polysacchariden. Die vielen unterschiedlichen Polysaccharide können anhand ihres Aufbaus in drei Arten von Zucker unterteilt werden, Mono- und Disaccharide, Oligosaccharide und Polysaccharide (Castillo Martinez et al, 2013).

Die erste Kategorie umfasst die sogenannten Einfach- und Zweifachzucker, welche den Namen nach entweder aus einem oder aus zwei Einfachzuckermolekülen bestehen. Hierzu zählen unter anderem Glucose, Fructose und Galactose bei den Einfachzuckern und Lactose, Saccharose und Malzzucker bei den Zweifachzuckern.

Die zweite Kategorie umfasst die Oligosaccharide, welche aus drei bis neun Einfachzuckermolekülen bestehen. Hierzu zählen die Raffinose, Stachyose und Verbascose. Diese Zucker kommen vor allem in Hülsenfrüchten wie Erbsen und Bohnen vor.

Die dritte Kategorie sind die Polysaccharide (Mehrfachzucker) bestehen aus mindestens zehn Einfachzuckermolekülen. Hierzu zählen die Stärke, Dextrine, Glykogen und Ballaststoffe. Polysaccharide können durch bestimmte Mikroorganismen bzw. deren Enzyme wieder zu Einfachzuckern abgebaut werden. Dieser Prozess wird Hydrolyse genannt.

1.3.4 Zuckerquellen und deren Verwertung durch Milchsäurebakterien

Je nach Art der Milchsäurebakterien können diese nur bestimmte Arten von Zuckermolekülen verwerten. Dazu zählen die Pentosen und Hexosen; beide gehören in die Gruppe der Monosaccharide und haben fünf bzw. sechs Kohlenstoffatome. Diese Art von Einfachzuckern kommen in der Lebensmittelindustrie in Form von Melasse (Zuckersirup) und Molke vor. Melasse hat einen hohen Anteil an Saccharose (Kotzamanidis et al, 2002).

Polysaccharide können von den meisten Milchsäurebakterien nicht direkt aufgenommen werden und müssen demnach zuerst abgebaut werden. Dieser Prozess wird Hydrolyse genannt und folgend am Beispiel von Stärke veranschaulicht.

Stärke ist ein komplexes Polysaccharid, welches seinerseits aus den Polysacchariden Amylose und Amylopectin aufgebaut ist (Peters, 2006). Amylose und Amylopectin sind wiederum aus mehreren Einheiten des Einfachzuckers Glucose aufgebaut. Hierbei ist die Amylose ausschließlich aus alpha-1,4-glycosidischen Bindungen von linearen Kohlenstoff-Ketten aufgebaut. Das Amylopectin hingegen besitzt neben den alpha-1,4- auch alpha-1,6-glycosidische Bindungen. Des Weiteren ergibt sich durch die durchschnittliche Kettenlänge und Anzahl an Seitenarmen ein unterschiedlicher Aufbau von Amylose zu Amylopectin. Bei der Amylose sind lange Ketten mit einer vergleichsweise geringen Zahl an Verzweigungen vorhanden und bei dem Amylopectin sind kurze Kettenlängen und eine vergleichsweise hohe Zahl an Seitenarmen vorhanden (Cui et al, 2011).

Ein weiterer wichtiger Vertreter der Polysaccharide ist die Cellulose. Dieses Biopolymer stellt einen hauptsächlichen Bestandteil der pflanzlichen Zellwand dar. Es besteht aus β -D-Glucose-Molekülen, welche verzweigt miteinander verbunden sind (Taherzadeh & Karimi, 2008). *Moldes et al.* haben erfolgreich MS aus unbehandelten Holz hergestellt, in dem eine Kombination mit dem Milchsäurebakterium *L. delbrueckii* und des Bakteriums *Eucalyptus globulus* verwendet wurde (Moldes et al, 2001b).

1.3.5 Physikalischer Aufschluss und Hydrolyse der Zuckerquellen

Die **Vorbehandlung** (Pretreatment) stellt den ersten Schritt bei der Herstellung einer Zuckerlösung aus nachwachsenden Rohstoffen dar. Dieser Schritt dient dazu, die Polysaccharide in Einfachzucker abzubauen und somit für die Bakterien zugänglich zu machen. Zuerst wird durch den physikalischen Aufschluss des Rohstoffs eine Oberflächenvergrößerung herbeiführt. Dies kann durch eine Mühle oder einen Schredder erfolgen. Das erhaltene Mehl wird mit Wasser vermischt.

Um die nachfolgende **Hydrolyse** einzuleiten, wird das thermostabile Enzym alpha-Amylase hinzugefügt. Es spaltet die alpha-1,4- und alpha-1,6-Bindungen und baut damit Polysaccharide zu Monosaccharide ab. Dieser Prozess wird auch Verzuckerung genannt. Die Zugabe von dem Enzym Amyloglucosidase verhindert die Verkleisterung der Stärke (Alvira et al, 2010).

Durch einen einfachen Reinigungsschritt wie der Filtration werden die nicht abbaubaren Rückstände von der Rohzuckerlösung entfernt. Diese wird anschließend durch Autoklavieren sterilisiert (Fuchs & Schlegel, 2006).

1.3.6 Fermentation der Rohzuckerlösung durch Mikroorganismen

Die sterilisierte Rohzuckerlösung kann direkt als Kohlenstoffquelle für die fermentative Herstellung von MS verwendet werden. Hierbei wird die Glucose in der Rohzuckerlösung von den Mikroorganismen aufgenommen und verstoffwechselt. In Verbindung mit der zuvor durchgeführten Hydrolyse wird dieses Verfahren auch als separate Hydrolyse und Fermentation (**Separate Hydrolysis and Fermentation**, SHF) genannt (Sasaki et al, 2014). Der Nachteil einer separaten Hydrolyse liegt in der inhibierenden Wirkung der Hydrolyse-Produkte, Glucose, Zellobiose und Xylose, auf die Enzyme, welche die Hydrolyse durchführen (Abdel-Rahman et al, 2011). Glucose und Cellobiose inhibieren z.B. die Aktivität von Cellulasen (Alvira et al, 2010). Dies führt zu einer niedrigeren Ausbeute an fermentierbaren Mono- und Disacchariden, welche aus den Polysacchariden rein theoretisch gewonnen werden könnten (Ask et al, 2012).

Es gibt jedoch auch Mikroorganismen, welche Polysaccharide ohne vorherigen Hydrolyse-Prozess fermentieren können. Diese sind in der Lage, die Amylase extrazellulär freizusetzen. Hierzu zählen *Trichoderma reesei* und *Aspergillus*

niger, welche als Enzyme Cellulasen, endo/exo-Glucanasen und beta-Glucosidasen produzieren und somit Cellulose aufspalten können (Tong et al, 2004).

In den letzten Jahren wurde der Prozess der simultanen Verzuckerung und Fermentation (**Simultaneous Saccharification and Fermentation**, SSF) für die Herstellung von MS aus Lignocellulose angewandt (Iyer & Lee, 1999). Durch die vergleichsweise ähnlichen Prozessbedingungen bei Hydrolyse und Fermentation besteht die Möglichkeit, beide Schritte zeitgleich in einem Fermenter durchzuführen (Olofsson et al, 2008). Dabei werden die Polysaccharide, die Enzyme oder Mikroorganismen für die Hydrolyse und die Mikroorganismen zur Produktion der MS zeitgleich in einen Fermenter gegeben (Jiang et al, 2019).

Durch die Zusammenlegung der Hydrolyse und Fermentation kann der zuvor beschriebene Effekt der negativen Feedback Inhibierung, der Glucose auf die Aktivität der Cellulasen, reduziert werden (Kádár et al, 2004; Romaní et al, 2008). Da die gebildete Glucose direkt durch die MS-Bakterien zu MS umgewandelt wird werden hohe Konzentrationen von Glucose im Reaktor verhindert (Wang et al, 2019). Aus der technologischen Sichtweise stellt die Aufspaltung der Polysaccharide den zeitlich limitierenden Schritt dar, da die freigesetzte Glucose unmittelbar zu MS verstoffwechselt wird (Cheng et al, 2018).

Der SSF Prozess bietet durch die Zusammenlegung von Hydrolyse und Fermentation gegenüber dem SHF Prozess die beiden folgenden Kostenvorteile. Der Zusatz von aufgereinigten Enzymen entfällt oder wird mindestens reduziert. Es wird nur noch einen Reaktor für beide Prozess benötigt, wodurch die Investitions- und Betriebskosten für den Prozess gesenkt werden (Dahnum et al, 2015).

Als Beispiel für einen SSF Prozess bei dem die Hydrolyse durch einen Mikroorganismus durchgeführt wurde, kann die Arbeit von Ge *et al.* genannt werden. Hierbei wurde der stärkehaltige Rohstoff, die Wurzeln der Topinambur-Knolle, mittels *Aspergillus niger* SL-09 hydrolytisch aufgeschlossen und die freigesetzte Glucose durch *Lactobacillus* sp. G-02 in MS umgewandelt (Ge et al, 2009).

Als Beispiel für einen SSF Prozess bei dem industriell gewonnen Enzyme für die Hydrolyse verwendet wurden, kann die Arbeit von Berlowska *et al.* genannt werden. Hierbei wurde der stärkehaltige Rohstoff, Zuckerrübenschnitzel, mit den Enzym-Präparaten Viscozyme® und Ultraflo Max® der Firma Novozyme (Bagsværd, Dänemark) hydrolytisch aufgeschlossen und die freigesetzte Glucose

durch *Lactococcus lactis* PCM 2379, *Lactobacillus acidophilus* PCM 2510, *Lactobacillus delbrueckii* PCM 490 und *Lactobacillus plantarum* R, jeweils in einzelnen Versuchen in MS umgewandelt. Hierbei konnten wurden mit den genannten Enzymen und Mikroorganismen, sowohl der SHF und der SSF Prozess durchlaufen. Dabei wurde bei einer LA Konzentration von 30 g/L im SSF Prozess eine 80% bis 90% höhere Ausbeute im Vergleich zum SHF Prozess erzielt (Berlowska et al, 2018).

Für die Gewinnung von MS können Bakterien aber auch einige einzellige Pilzarten eingesetzt werden. Hierbei liegt der Hauptunterschied darin, dass die Pilze in der Lage sind, das Enzym Amylase extrazellulär freizusetzen. Hierdurch sind Pilze in der Lage selbstständig, stärkehaltige Materialien, hydrolysieren zu können, ohne vorherige Hydrolyse-Prozesse zu benötigen (Deng et al, 2012; Jin et al, 2005). Hinzu kommt eine vereinfachte Trennung der Biomasse von der Fermentationsbrühe aufgrund des Wachstums von Pilzen in weitverzweigten, fadenförmigen Zellen, den sogenannten Myzelien (Park, 2004).

Die am häufigsten für eine Fermentation verwendeten **Pilzarten** gehören zu der Gattung *Rhizopus*. Diese Gattung produziert hauptsächlich das L(+)-Milchsäure-Isomer (Liu et al, 2006). Mit Pilzarten der Gattung *Rhizopus* wurde bereits erfolgreich Stärke aus verschiedenen nachwachsenden Rohstoffen hydrolysiert: Hierzu zählen Mais (Bai et al, 2004), Reis (Fukushima et al, 2004), Kartoffeln, Weizen, Ananas (Jin et al, 2005), Maiskolben (Miura et al, 2004), Pinie (Woiciechowski et al, 1999) und, last but not least, sogar Papierabfälle (Marques et al, 2017),(Marques et al, 2008).

In der biotechnologischen Industrie werden derzeit jedoch hauptsächlich **Milchsäurebakterien** verwendet. Von den fakultativ anaeroben Milchsäurebakterien sind viele Arten aerotolerant, das heißt, sie besitzen die genetischen Voraussetzungen, um einige Enzyme für die Atmungskette zu bilden. Zu den Enzymkomplexen der Atmungskette gehören NADH-Dehydrogenase (Komplex I), Succinat-Dehydrogenase (Komplex II), Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III), Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) und ATP-Synthase (Komplex V) (Fitch, 1976). Milchsäurebakterien sind jedoch nicht in der Lage, die prosthetische Häm-Gruppe zu bilden, welche an der Bildung von Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III) und Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) beteiligt ist. Dies trifft auch für einige

Milchsäurebakterien im Bezug auf das Vitamin K2 (Menachinon) zu (L. & S., 2000). Daher können Milchsäurebakterien nur dann aerobe Atmung betreiben, wenn dem Fermentationsmedium Häm und nach Bedarf auch Vitamin K2 hinzugegeben wird (Pedersen et al, 2012).

Eine weitere wesentliche Eigenschaft der Milchsäurebakterien ist, dass sie größtenteils katalase-negativ sind, keine Sporen bilden, eine optimale Wachstumstemperatur von 20 °C bis 45 °C haben und eine hohe Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten von unter 5 aufweisen (Salminen et al, 2004). In den vergangenen Jahren wurde durch die Forschung belegt, dass Milchsäurebakterien eine enorme Vielfalt an Zuckerquellen aus nachwachsenden Rohstoffen erfolgreich in MS umwandeln können. Hierzu zählen unter anderem Melassesirup (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000; Kotzamanidis et al, 2002), Ahornsirup (Ueno et al, 2003), Mais (Vishnu et al, 2002), Weizenkleie (Naveena et al, 2005), Reis (Fukushima et al, 2004), Yucca-Pflanzen (John et al, 2007a), Bambus (Asada et al, 2005), Wellpappe (Yáñez et al, 2004), Alfalfa-Fasern (Sreenath et al, 2001a), Sojafasern (Sreenath et al, 2001b), Traubentrester (Portilla Rivera et al, 2007), Abfallpapier (Marques et al, 2017) und Brauereigerste (Mussatto et al, 2007).

Einsatz in der Industrie finden am häufigsten Vertreter der Gattung *Lactobacillus*. Das liegt daran, dass diese Gattung viele Arten umfasst, welche ihrerseits wiederum unterschiedliche biochemische und physiologische Eigenschaften aufweisen, wie z. B. eine unterschiedlich hohe Toleranz gegenüber sauren Umgebungen. Insgesamt zeichnet sich die Gattung durch ihre hohe Wachstumsrate und Produktivität aus (Kyla-Nikkila et al, 2000).

1.3.7 Stoffwechselwege für die Produktion von Lactose aus Einfachzuckern

Es gibt **zwei Stoffwechselwege** durch die Einfachzucker in Lactose umgewandelt werden. Je nachdem, welchen der beiden Wege eine Bakterienart benutzen kann, wird zwischen homofermentativen und heterofermentativen Milchsäurebakterien unterschieden (Gao et al, 2011; Mayo et al, 2010).

Homofermentative Milchsäurebakterien bilden aus einem Mol Glucose zwei Mol MS. Dieser Prozess läuft in zwei Schritten ab: Der erste ist die sogenannte Glycolyse oder auch nach ihren Entdeckern Gustav Embden, Otto

Meyerhof und Jakub Karol Parnas, Embden-Meyerhof-Parnas-Weg, kurz EMP-Weg genannt (Ronimus & Morgan, 2003). Ein Molekül von dem Einfachzucker, Glucose, wird durch die Glycolyse in zwei Moleküle Pyruvat (Brenztraubensäure) umgewandelt. Anschließend wird das Pyruvat in MS umgewandelt. Dabei wird als Reduktionsmittel NADH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) verwendet, welches zuvor während der Glycolyse gebildet worden ist. Somit stellt MS, abgesehen von der Energiegewinnung, das einzige chemische Produkt dieses Stoffwechselweges dar. Es ergibt sich folgende Gleichung (1):

Milchsäurebakterien, welche nur diesen Stoffwechselweg verwenden, werden auch homofermentative Milchsäurebakterien genannt. Zu dieser Art zählen unter anderem *Lactobacillus acidophilus*, *L. amylophilus*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus* und *L. salivarius* (Mayo et al, 2010; Nigatu, 2000; Sanders & Klaenhammer, 2001). Während nach Gleichung 1 theoretisch 1 Mol Glucose zu 2 Mol MS umgesetzt wird, findet sich diese Stöchiometrie in der Natur nur zum Teil. Dieses liegt daran, dass ein Anteil des Kohlenstoffs in der Glucose auch für das Zellwachstum verwendet wird. Daher sind in der Praxis Ausbeuten von 0,74 bis 0,99 Gramm Produkt pro Gramm Substrat üblich, während die Biomasseausbeute sich im Bereich von 0,07 bis 0,22 Gramm Biomasse pro Gramm Substrat bewegt (Bruno-Bárcena et al, 1999; Srivastava et al, 1992).

Einige homofermentative Milchsäurebakterien können bei einem Mangel an Glucose auch Formiat (Ameisensäure) durch die gemischte Säuregärung mittels des Enzyms Formiat-Acetyltransferase (früher Pyruvat-Formiat-Lyase, PFL) bilden. Die gemischte Säuregärung kann durch zwei weitere Stressfaktoren begünstigt werden: einen sehr hohen pH-Wert und niedrige Temperaturen. Hierzu zählen die homofermentativen Milchsäurebakterien der Gattungen *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* und *Enterococcus* (Gao et al, 2011; Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000; Mayo et al, 2010).

Bei **heterofermentativen Milchsäurebakterien** entstehen neben dem Hauptprodukt, der MS, noch weitere (Neben-)Produkte wie Kohlenstoffdioxid, Ethanol und/oder Essigsäure. Die ersten drei Reaktionen der Verstoffwechselung von Glucose geschehen hierbei, genau wie bei der homofermentativen Milchsäuregärung, wie folgt. Glucose wird durch das Enzym Hexokinase zu Glucose-6-

phosphat umgewandelt. Glucose-6-phosphat wird durch das Enzym Fructose-6-phosphat zu Fructose-6-phosphat umgewandelt. Fructose-6-phosphat wird durch das Enzym Phosphofructokinase 1 zu Fructose-1,6-bisphosphat umgewandelt. Da homofermentativen Milchsäurebakterien das Enzym Aldolase fehlt, kann eine weitere Umwandlung, wie bei den heterofermentativen Bakterien von Fructose-1,6-bisphosphat in Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) nicht durchgeführt werden (L. & S., 2000).

Heterofermentative Milchsäurebakterien können hingegen Hexosen (Glucose, Fructose, etc.) und Pentosen (Xylose, Ribose) durch den Verbrauch von ATP in Xylulose-5-phosphat überführen. Anschließend wird das Xylulose-5-phosphat unter Phosphate-Verbrauch in der Phosphoketolase in GAP und Acetylphosphat aufgespalten. GAP tritt in den Stoffwechselweg der Glycolyse ein und wird dort zu MS umgewandelt. Acetyl-Phosphat wird seinerseits zu Essigsäure und/oder Ethanol reduziert. Hieraus ergibt sich für das jeweilige Nebenprodukt folgende Stöchiometrie (Salminen et al, 2004).

Durch die Entstehung der Nebenprodukte wird die theoretische Ausbeute an MS auf 0,5 Gramm MS pro Gramm Glucose gesenkt. Dabei wird das Verhältnis zwischen den Mengen an gebildeter Essigsäure und Ethanol durch die Fähigkeit des jeweiligen Bakteriums bestimmt, wie effektiv es die im NADH gespeicherte Energie wieder freisetzen kann, welche zu Beginn des Pentosephosphatweges gebildet worden ist, und wie hoch sein aktueller Energiebedarf ist. Milchsäurebakterien, welche nur diesen Stoffwechselweg benutzen können, werden obligatorische heterofermentative Milchsäurebakterien genannt. Zu dieser Art zählen unter anderem *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum*, *L. parabuchneri* und *L. reuteri* (Mayo et al, 2010; Nigatu, 2000; Sanders & Klaenhammer, 2001).

Wie bereits erwähnt, gehören zu den Einfachzuckern, welche von den Milchsäurebakterien verwertet werden können, Hexosen und Pentosen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Arten von Milchsäurebakterien, welche Hexosen verstoffwechseln können, nicht in der Lage sind, Pentosen zu verwerten. Es gibt

jedoch Arten dieser Gattung, welche als fakultativ heterofermentativ bezeichnet werden. Zu ihnen zählen unter anderem *Lactobacillus alimentarius*, *L. plantarum* (Gobbetti et al, 2000), *L. casei*, *L. rhamnosus* (Nigatu, 2000; Rivas et al, 2007; Romani et al, 2008), *L. lactis* (Joshi et al, 2010), *L. pentosus* (Bustos et al, 2005; Moldes et al, 2001a; b) und *L. xylosus* (Tyree et al, 1990). Sie sind in der Lage, beide Arten von Monosacchariden abzubauen. Dabei verwerten sie Hexosen über den homolactischen und Pentosen über den heterolactischen Fermentationsweg.

Die homolactische Gärung ist die einfachste Art der Fermentation. Hierbei wird das Pyruvat, welches aus der Glycolyse gewonnen wurde, durch Redox-Reaktion in Milchsäure umgewandelt. Dabei entstehen aus einem Molekül Glucose zwei Moleküle Milchsäure. Bei der heterolactischen Fermentation wird die Glucose in Kohlendioxid (CO₂), Ethanol und Lactat umwandelt.

Pentosen werden über den Pentosephosphatweg verstoffwechselt, wobei ihre Intermediate wie folgt umgewandelt werden: Xylose wird z. B. zu Xylulose umgewandelt und anschließend zu Xylulose 5-phosphat phosphoryliert. Arabinose wird zu Ribulose umgewandelt, welche ihrerseits zu Ribulose 5-phosphat phosphoryliert wird (Gao et al, 2011; Mayo et al, 2010).

Für die Verwertung von Lignocellulose als Zuckerquelle ist die Fähigkeit zum Aufschluss der darin in hohen Anteilen enthaltenen Xylose besonders wichtig (Yoshida et al, 2011). In der praktischen Anwendung wurden bereits erfolgreich Versuche zu der Produktion von MS aus einem Gemisch von Xylose und Glucose mit den folgenden Arten und Rohstoffen durchgeführt. So wurde ein Hemicellulose-Hydrolysat aus dem Rohstoff Holz gewonnen, welches mit den Milchsäurebakterienarten *Lactobacillus rhamnosus* (Iyer et al, 2000) und *L. xylosus* (Tyree et al, 1990) zu MS umgewandelt wurde. Mit der Bakterienart *L. pentosus* (Perttunen et al, 2002) wurde MS sowohl aus Schilf als auch aus dem Rückschnitt von Weinreben gewonnen (Bustos et al, 2005). Des Weiteren wurden auch Mischkulturen für eine schnellere Verwertung von Hexosen und Pentosen, Cellulose und Hemicellulose untersucht (Cui et al, 2011). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Mischkulturen eine Mischung aus unterschiedlichen Polysacchariden besser verwerten können als einzelne Kulturen (Cui et al, 2011).

Die Verstoffwechselung von Pentosen generiert kein überschüssiges NADH; daher wird das Acetyl-phosphat direkt zu Acetat dephosphoryliert, wobei ein Gewinn von zwei Mol ATP entsteht:

Einige Milchsäurebakterien können auch Cellobiose verwerten. Cellobiose ist ein Disaccharid, welches aus zwei Molekülen Glucose besteht, die über eine alpha-1,4-glycosidische Verbindung miteinander verknüpft sind. Cellobiose ist der Grundbaustein von Cellulose. Daher ist die Eigenschaft, Cellobiose verwerten zu können, besonders wichtig bei solchen Prozessen, in denen hydrolisierte Cellulose als Zuckerquelle eingesetzt wird. Das Milchsäurebakterium *Lactobacillus rhamnosus* besitzt diese Fähigkeit (Marques et al, 2008).

Einer der häufig genannten Vorteile der biologischen Herstellung von MS ist die Fähigkeit, eines der beiden Enantiomere der MS (D- oder L-Milchsäure) selektiv zu produzieren. Dabei ist diese Fähigkeit weder unter allen Milchsäurebakterienarten verbreitet, noch beschränkt sie sich auf ausschließlich ein Enantiomer. Vielmehr hängt diese Fähigkeit von der Anwesenheit des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) ab (Castillo Martinez et al, 2013). LDH katalysiert die reversible Reaktion, bei der Pyruvat und NADH zu Lactat und NAD⁺ *umgewandelt* werden (Hofvendahl & Hahn–Hägerdal, 2000). Somit ist LDH ein essenzieller Bestandteil der Milchsäuregärung. L-Lactatdehydrogenase findet sich in den Zellen fast aller Säugetiere und Reptilien, wohingegen die D-Lactatdehydrogenase bei Pflanzen und Mikroorganismen verbreitet ist. Zu der Gruppe von Milchsäurebakterien, welche unter anderem das Enantiomer L(+)-Milchsäure produzieren, gehören die folgenden Arten: *Lactobacillus amilophylus*, *L. brevis* und *L. buchneri*, *L. casei* (John et al, 2007a), *L. delbrueckii* (John et al, 2007b; Thomas, 2000), *L. rhamnosus* (Marques et al, 2008; Narayanan et al, 2004). Milchsäurebakterien, welche das Enantiomer D(-)-Milchsäure bilden, sind unter anderem *Lactobacillus coryniformis* (Bustos et al, 2004a; Yáñez et al, 2004) und *L. helveticus* (Kyla-Nikkila et al, 2000). Eine Mischung aus beiden Enantiomeren wird von den Milchsäurebakterien *Lactobacillus plantarum* und *L. pentosus* erzeugt (Hofvendahl & Hahn–Hägerdal, 2000).

1.3.8 Die benötigten Inhaltstoffe für eine homofermentative Milchsäurefermentation

Neben der Bereitstellung von Nährstoffen in Form von Einfachzuckern ist die Versorgung mit den nötigen Mineralien und Spurenelementen wichtig für eine erfolgreiche Milchsäurefermentation. Zu diesen Verbindungen zählen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen, Mineralien und Vitamine (Mussatto et al, 2007). Die benötigten Kohlenstoffverbindungen können in Form von Zucker, Aminosäuren oder organischen Säuren vorliegen (Cui et al, 2011). Stickstoffverbindungen können in Form von Aminosäuren, Peptiden und anorganischen Verbindungen zur Verfügung gestellt werden und werden üblicherweise in Form von Pepton, Hefeextrakt, Harnstoff oder Ammoniumsulfat der Fermentationsbrühe zugesetzt (Nancib et al, 2001).

Die benötigten Mineralien fungieren bei enzymatischen Reaktionen als Co-Faktoren und sind daher besonders wichtig. Sie werden typischerweise als Salze in Form von MgSO_4 , MnSO_4 und FeSO_4 hinzugefügt. Vitamine werden meist in Form von Hefeextrakt zur Fermentationslösung gegeben. Hierbei handelt es sich meistens um Vertreter der Vitamingruppe B. B-Vitamine werden benötigt, um als Vorstufen für Koenzyme zu fungieren (Fitzpatrick & O'Keeffe, 2001).

Der Zusatz von konventionellem Hefeextrakt als Nährstoffquelle beansprucht rund 38 % der Herstellungskosten für die Fermentationslösung (Tejayadi & Cheryan, 1995). Daher ist die Erschließung kostengünstiger Alternativen für den Ersatz von Hefeextrakt von wirtschaftlichem Interesse und Gegenstand der aktuellen Forschung (Castillo Martinez et al, 2013). In Analogie zu der Erschließung geeigneter Zuckerquellen für eine kontrollierte Fermentation wurden Untersuchungen zu der Nutzbarkeit von nachwachsenden Rohstoffen als Nährstoffquelle durchgeführt. Hierbei wurde unter anderem Maisquellwasser (Oh et al, 2005; Wee et al, 2005) und der Bodensatz von der Weinmaischeerzeugung untersucht (Bustos et al, 2004a; b; 2005). Hierbei musste jedoch festgestellt werden, dass diese industriellen Reststoffe noch nicht vollständig die Zugabe von Hefeextrakt ersetzen können.

1.3.9 Einfluss der Milchsäure auf den Verlauf der Fermentation

Zum Beginn der Fermentation erfolgt das Animpfen des jeweiligen Mediums durch die Zugabe einer Bakterienkultur. Das Medium setzt sich aus einer Zuckerquelle, welche ggf. zuvor durch Hydrolyse aufgeschlossen wurde, und den oben aufgeführten Nährstoffen zusammen. Durch die Umwandlung von Einfachzucker in MS resultiert eine Absenkung des pH-Werts der Fermentationsbrühe. Dieser Effekt wirkt sich zwangsläufig negativ auf das Wachstumsverhalten der Milchsäurebakterien aus, wenn der pH-Wert den Bereich zwischen 5 und 7 verlässt (Mussatto et al, 2007; Nomura et al, 1987). Um den pH-Wert im optimalen Bereich zu halten, muss die gebildete MS entweder aus der Fermentationsbrühe entfernt oder neutralisiert werden. Durch die Zugabe von basisch wirkenden Puffern kann der pH-Wert auf einem bestimmten Wert gehalten werden. Üblicherweise eingesetzte Puffer sind Ammoniumhydroxid, Natriumhydroxid, Calciumcarbonat, Dimethylamin und Trimethylamin (Peeva & Peev, 1997).

MS besitzt eine Endprodukt-Hemmung auf das Zellwachstum und den Metabolismus von Bakterien. Dieser inhibierende Effekt ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass MS, wie viele andere Substanzen auch, den osmotischen Druck in dem jeweiligen Medium, in dem es sich befindet, erhöht (Lin et al, 2008). Der gleiche Effekt des hohen osmotischen Drucks wird bei der Herstellung von Konfitüre, also der Haltbarmachung durch einen hohen Zuckeranteil, ausgenutzt. Einen ähnlichen Effekt haben auch andere Nebenprodukte der Milchsäurefermentation. Hierzu zählen z. B. Ameisensäure und Essigsäure (Loubiere et al, 1997). Hinzu kommt, dass die MS in ihrer nicht-dissoziierten Form eine stärkere inhibierende Wirkung aufweist als das Lactat (Erickson & Yee-Chak Fung, 1988; Monteagudo et al, 1997). Um diesen unerwünschten Effekt zu vermeiden, wurden unterschiedliche Lösungsansätze untersucht, wie z. B. die Entfernung der MS aus der Fermentationsbrühe bereits während der Fermentation (Kaufman et al, 1996; Moldes et al, 2001b), die Neutralisierung der MS, um sie in die dissoziierte und somit geringer inhibierende Form zu überführen (Madzingaidzo et al, 2002), oder die Verwendung einer toleranten Bakterienart bzw. einer Mischkultur bestehend aus verschiedenen Bakterien (Cui et al, 2011; Tsai et al, 1993).

Die Konzentration und die Art des Einfachzuckers können ebenfalls einen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Mikroorganismen haben.

Hierbei ist der Einfluss jedoch stark von der Bakterienart abhängig. Im Falle von Glucose führte eine hohe Anfangskonzentration von 119 g L^{-1} zu einer reduzierten spezifischen Produktivität und Ausbeute bei den Bakterienarten *Lactobacillus delbrueckii* und *L. bulgaricus* (Burgos-Rubio et al, 2000), wohingegen Saccharose bei der Bakterienart *L. casei* in Konzentrationen bis 110 g L^{-1} keinen Einfluss zeigte (Büyükkileci & Harsa, 2004). Xylose zeigte auf das Wachstum von *L. brevis* und *L. pentosus* keinen Einfluss bis Konzentrationen von 20 g L^{-1} (Garde et al, 2002). Lactose wiederum wirkte sich auf das Wachstum von *L. helveticus* bis Konzentrationen von 110 g L^{-1} nicht negativ aus (Willem Schepers et al, 2002). Um solchen Effekten entgegenzuwirken, kann die Fermentation im Fed-Batch-Verfahren ausgeführt werden (Roukas & Kotzekidou, 1998) (Kap. 1.3.10).

Alternativ zur Abscheidung oder Neutralisation der MS kann auch ein genetisch veränderter Mikroorganismus (GVO) verwendet werden, welcher eine höhere Toleranz für niedrige pH-Werte besitzt als Wildtypstämme. Ausschlaggebend hierfür ist die Aufrechterhaltung des pH-Werts innerhalb der Bakterienzelle. Dies geschieht durch die zellinterne Verwertung von Arginin durch das Enzym Arginin-Deiminase, wodurch Ammoniak entsteht (Araque et al, 2013; Roukas & Kotzekidou, 1998). Der technische Vorteil bei der Verwendung von GVOs liegt darin, dass die Verwendung von neutralisierenden Substanzen während der Fermentation entfällt oder zumindest stark reduziert werden kann. Diese Substanzen müssen später nicht wieder von der MS abgetrennt werden, wodurch die Herstellungskosten reduziert werden.

Während der Verstoffwechselung von Zucker werden verschiedene organische Verbindungen, sogenannte Metabolite, hergestellt. Diese benötigt die Zelle für die Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels und der Zellfunktionen. Am Ende des Lebenszyklus eines Bakteriums tritt der Zelltod ein und es kommt zur einer Zellyse. Dabei zerfällt die Zellmembran; und alle Metabolite innerhalb der Zelle werden in die Fermentationsbrühe freigesetzt. Die meisten der so freigesetzten Metabolite können von anderen Mikroorganismen mittels Membran gebundener Transportsysteme aufgenommen und wiederum verstoffwechselt werden.

1.3.10 Technische Realisierung der Fermentation

Die **technische Realisierung der Fermentation** kann auf drei Wegen erfolgen, welche sich durch den Zeitpunkt der Zugabe von dem Medium in den Fermenter unterscheiden (Fuchs & Schlegel, 2006). Das Medium muss zusätzlich zur Zuckerlösung noch verschiedene weitere Bestandteile umfassen, um einen reibungslosen Fermentationsverlauf gewährleisten zu können. Dazu zählen im Fall vom *Bacillus coagulans* eine Mischung aus Proteinen und anorganischen Ionen, ein pH-Puffer (z. B. EVERZIT® Dol) und ein Hefe-Extrakt, welcher ebenfalls Proteine enthält. Proteine und anorganische Ionen werden meist als Gemisch in Form einer MRS-Bouillon zugesetzt. Hierbei handelt es sich um ein einfach zu handhabendes Kulturmedium zum Wachstum aller Lactobazillen, welches von den Forschern J. C. De Man, M. Rogosa und M. Elisabeth Sharpe entwickelt wurde. Zusätzlich erfolgt eine Einstellung des pH-Werts auf 6,5.

Bei der **Batch-Fermentation** wird die gesamte Zuckerlösung als ein Ansatz (Batch) einmalig in den Fermenter vorgelegt. Um eine maximale Ausbeute des Mediums zu erreichen, wird die Fermentationsdauer bis zu dem Zeitpunkt gewählt, an dem die Zuckerkonzentration das Minimum und die Milchsäurekonzentration das Maximum erreicht hat (Fuchs & Schlegel, 2006). In Abb. 6 ist exemplarisch der Konzentrationsverlauf von Glucose und Lactat während einer Batch-Fermentation von *Bacillus coagulans* mit einer Startkonzentration von 120 g L⁻¹ Glucose und 15 g L⁻¹ Hefeextrakt dargestellt. Über einen Zeitverlauf von 50 Stunden wird die gesamte Glucose verstoffwechselt und liegt dann unterhalb der Nachweisgrenze. Dabei entsteht mikrobielle Biomasse und als primäres Stoffwechselendprodukt Lactat mit einer Endkonzentration von 93,2 g L⁻¹. Anhand der jeweiligen Kurvenverläufe für die Glucose- und Lactatkonzentration lässt sich die biologische Aktivität von *Bacillus coagulans* gut nachvollziehen.

Abb. 6: Ab- und Zunahme der Konzentration von Glucose und Laktat im Nährmedium während einer Batch-Fermentation von *Bacillus coagulans* bei einer Startkonzentration von 120 g L^{-1} Glucose und 15 g L^{-1} Hefeextrakt (Daten aus Laborversuche, unpubliziert)

Während dieser Zeitspanne folgt die Zahl der Mikroorganismen innerhalb der Fermentationsbrühe einer typischen Wachstumskurve (Abb. 7). Diese kann in die folgenden vier Phasen unterteilt werden: (I) Die erste Phase (Lag-Phase) direkt nach dem Animpfen des Mediums besteht aus einer leichten Verzögerung des Einsetzens der Wachstumsphase. Diese resultiert daraus, dass sich die Zellen an das neue Kulturmedium anpassen müssen. (II) Ist dies geschehen, setzt die Wachstumsphase (Log-Phase) ein. Diese verläuft meist so stark, dass das Wachstum der Zell-Population durch eine exponentielle Funktion beschrieben werden kann. (III) Ist das Gros des Zuckers im Medium verbraucht, verlangsamt sich das Wachstum zunehmend und geht in einen Zustand gleichbleibender Zellanzahl über (stationäre Phase). (IV) Wenn die Nährstoffe verstoffwechselt wurden, eine kritische Dichte an Zellen erreicht wurde und/oder sich toxische Stoffwechselprodukte angesammelt haben, kann das Absterben der Mikroorganismen deren Neubildung überwiegen (Absterbephase) (Fuchs & Schlegel, 2006).

Im Fall der **Milchsäurefermentation** liegt die MS als extrazelluläres Produkt vor. Bei zu hoher Konzentration von MS im Medium tritt eine negative Produkt-Feed-Back-Inhibierung auf (Madzingaidzo et al, 2002). In der Folge wird die

Produktion von weiterer MS durch die Milchsäurebakterien gehemmt (Ghaffar et al, 2014).

Abb. 7: Wachstumskurve einer fiktiven Bakterienkultur mit den einzelnen Wachstums-Phasen, n steht hierbei für die Anzahl an Bakterienzellen

Aus den oben erwähnten Punkten ergibt sich, dass der optimale Betriebspunkt für eine MS-Fermentation in dem Gleichgewicht aus Kohlenstoff-Quelle und Kohlenstoff-Senke liegt. Hierbei stellt zuckerhaltige Nährlösung die Kohlenstoff-Quelle und die abgeführte MS die Kohlenstoff-Senke dar. Im Folgenden werden die aus technischer Sicht möglichen Fermentationsverfahren dargestellt.

Aus technischer Sicht betrachtet ergeben sich für die Batch-Kultur verschiedene Vor- und Nachteile. Um ein steriles Arbeiten zu ermöglichen, muss der gesamte Behälter zwischen den einzelnen Batches gereinigt und sterilisiert werden. Des Weiteren ist der Behälter auch während der unproduktiven Lag- und stationären Phasen belegt. Daher ergibt sich im Vergleich zur Conti-Kultur (siehe unten) eine geringere Produktivität bezogen auf den Quotienten aus gebildetem Produkt, dem Volumen des Fermenters und der Zeit (Amrane, 2001). Demgegenüber steht eine einfache Steuerung des Prozessablaufs. Dies geschieht durch regelmäßiges Entnehmen von Proben aus der Fermentationslösung und deren Analyse hinsichtlich Zellzahl, Zucker- und Milchsäuregehalt (Korbekandi et al, 2007). Des Weiteren besteht eine große Flexibilität in Bezug auf den Einsatz von

unterschiedlichen Mikroorganismen und der Produktion von weiteren Produkten wie z. B. anderen organischen Säuren oder Aminosäuren.

Bei der **Conti-Kultur** wird die Zuckerlösung über den gesamten Zeitraum der Fermentation, also kontinuierlich, hinzugegeben (Zhang et al, 2011). Ebenso kontinuierlich wird die gebildete MS zusammen mit weiteren Bestandteilen der Fermentationslösung aus dem Fermenter entfernt (Dey & Pal, 2012). Während des gesamten Prozesses bleibt die Zellanzahl auf einem gleichbleibenden Niveau. Durch das Entfallen der Reinigungs- und Sterilisierungszeiten ergibt sich eine höhere Produktivität verglichen mit dem Batch-Ansatz (Castillo Martinez et al, 2013). Jedoch ist das Risiko einer Kontamination durch ungewollt mit der Zuckerlösung eingebrachte Mikroorganismen erhöht (Kwon et al, 2001). Des Weiteren kann die gezielte Zugabe der Nährstofflösung in den Fermenter bei der Conti-Kultur eine Herausforderung darstellen. Hierbei muss die Zuckerlösung über die gesamte Fermentationszeit hinweg so genau dosiert werden, dass die Nährstoffe nicht in zu hoher oder zu geringer Konzentration vorliegen (Salgado et al, 2012).

Aufgrund der konstant bleibenden Bedingungen während der Fermentation wird die Conti-Kultur auch als **Chemostat** bezeichnet (Stanbury et al, 2013). Im Allgemeinen ist ein Chemostat dazu geeignet die physiologischen Eigenschaften eines Mikroorganismus zu erforschen. Da dieser den Einfluss der Wachstumsrate und der Substratlimitierung auf die Produktion von Metaboliten ermöglicht (Stanbury et al, 2013). Der Chemostat wirkt sehr selektiv auf die in ihm kultivierten Mikroorganismen. Dies kann negative Folgen für die Produktion von Metaboliten haben. Durch die Einführung eines neuen Mikroorganismus, entweder von außen durch eine Verunreinigung oder von Innen durch eine Mutation des bestehenden Mikroorganismus kann ungewollt ein zweiter Mikroorganismus vorliegen. Dieser stellt dann ggf. nicht mehr das gewünschte Produkt her, sondern verwendet die Nährstoffe um eine höhere Wachstumsrate aufrecht zu erhalten. Der ursprünglich zur Produktion verwendete Mikroorganismus wird dann aus dem System dem Chemostat verdrängt bzw. ausgewaschen (Stanbury et al, 2013).

Bei der **Conti-Kultur mit Zellrückführung** besteht die technische Herausforderung im Allgemeinen darin, das Medium und die Bakterien im Fermenter zurückzuhalten und das Produkt abzutrennen. Im Falle der kontinuierlichen Milchsäurefermentation ist der Unterschied in der Molekülgröße zwischen MS

und Glucose ausreichend groß, um mittels einer einfachen Mikrofiltration eine Trennung von Milchsäurebakterien und Zucker einerseits und MS und niedermolekularer Metabolite andererseits zu realisieren (Lu et al, 2012; Lunelli et al, 2011). Hierbei wird die Fermentations-Lösung aus dem Fermenter heraus in ein Mikrofiltrationsmodul gepumpt (Venus, 2011). In dem Mikrofiltrationsmodul befinden sich Hohlfasern. Als Herstellungsmaterial wird unter anderem Zellulose, Acryl oder Keramik mit Titan eingesetzt. Es können bis zu 20'000 dieser Hohlfasern in einem Modul eingebaut werden. Dabei werden die einzelnen Hohlfasern bis zu tausenden in einem Bündel zusammengefasst (Auckenthaler & Huggenberger, 2013). Die Hohlfasern weisen einen Durchmesser von bis zu 0,5 mm auf. Dabei haben die Mikrofiltrations-Hohlfasern einen Porendurchmesser von 0,1 bis 10 μm und einen Außendurchmesser von 0,5 mm (Muro et al, 2012). Durch die kontinuierliche Abtrennung der MS aus der Fermentationslösung wird eine negative Feedback Inhibierung unterbunden (Senedese et al, 2015).

Bei der **Fed-Batch-Fermentation** wird die Zuckerlösung kontinuierlich hinzugefügt, ohne das Medium aus dem Fermenter entfernt wird. Der Begriff der Fed-Batch-Fermentation wurde von Yoshida *et al.* im Jahre 1973 zum ersten Mal eingeführt (Yoshida et al, 1973). Hierbei kann die Fed-Batch-Fermentation in vier Strategien angewendet werden. Diese unterscheiden sich wie folgt:

1) Die gleiche Zuckerlösung, welche zu Beginn der Fermentation verwendet wurde wird weiter zugeführt. Hierdurch wird das Volumen der Fermentationslösung erhöht.

2) Eine Lösung des Wachstums-limitierenden Substrates wird mit der gleichen Konzentration, wie sie in der anfänglich verwendeten Zuckerlösung vorlag, hinzugeführt. Hierdurch wird das Volumen der Fermentationslösung erhöht.

3) Eine konzentrierte Lösung des Wachstums-limitierenden Substrates wird hinzugefügt. Dabei ist die Rate mit der dieses Konzentrat hinzugeführt wird niedriger als in der Strategie 1) und 2). Hierdurch wird das Volumen nur bedingt erhöht.

4) Eine hoch konzentrierte Lösung des Wachstums-limitierenden Substrates wird mit einer Rate hinzugefügt, welche niedriger ist als in der Strategie 1), 2) und 3). Hierdurch wird das Volumen nur in einem zu vernachlässigbaren Anteil erhöht.

Dem Einfluss auf den Verlauf des Fermentationsvolumens nach werden die ersten beiden Strategien als **variables Volumen** Fed-Batch-Fermentation und die vierte als **konstanten Volumen** Fed-Batch-Fermentation bezeichnet (Stanbury et al, 2013). Durch den Einfluss der unterschiedlichen Strategien auf das Volumen der Fermentationslösung resultieren die unterschiedlichen Verläufe von der Wachstumsrate, der Biomassen-Konzentration und der Konzentration der nicht Wachstums-limitierenden Substrate (Liang et al, 2015). Bei der variablen Volumen Strategie sinkt die Wachstumsrate zu Beginn der Fermentation ab und wird danach konstant, die Biomasse-Konzentration bleibt konstant, genau wie die Konzentration der nicht Wachstums-limitierenden Substrate (Domingos et al, 2018). Bei der konstanten Volumen Fed-Batch-Fermentation sinkt die Wachstumsrate leicht ab, bis zum Ende der Fermentation, die Biomasse-Konzentration steigt linear mit der Zeit an und die Konzentration der nicht Wachstums-limitierenden Substrate fällt linear mit der Zeit ab (Hu et al, 2016).

Bei der **(pulsierten) Fed-Batch-Fermentation** wird die Zuckerlösung in regelmäßigen Abständen als Dosis hinzuzugeben (Marques et al, 2016). Dabei wird zunächst eine Vorlage der Zuckerlösung wie bei der Batch-Kultur angesetzt. Ist die stationäre Phase erreicht, wird in regelmäßigen Abständen weitere Zuckerlösung hinzugegeben. Der hauptsächliche Vorteil der Fed-Batch-Kultur liegt in der Durchführbarkeit auch von solchen Fermentationen, welche durch eine Substratinhibierung limitiert werden. Durch das anfängliche Durchlaufen der gesamten Wachstumskurve und das anschließende Hinzufügen weiteren Mediums kann eine niedrige Substratkonzentration bei einer gleichzeitig gleichbleibend hohen Zellkonzentration gewährleistet werden. So können hohe Endkonzentrationen an mikrobieller Biomasse erreicht werden, was vor allem bei intrazellulären Produkten, wie z. B. Cyanophycin, von Vorteil ist (Du et al, 2017; Fuchs & Schlegel, 2006). Somit ist die kontinuierliche Fermentation in großtechnischen Anlagen die bevorzugte Produktionsart von MS (Fuchs & Schlegel, 2006).

1.3.11 Reinigung der Fermentationslösung

Die Kosten für die Reinigung der produzierten MS betragen ca. 37 % der Gesamtkosten (vgl. Abb. 4, Rückgewinnung und Trennung) (Abdel-Rahman et al, 2011; Tong et al, 2004). Daher muss bei der Auswahl der Rohstoffe und der Zugabe von Nährstoffen insbesondere darauf geachtet werden, nur das Nötigste hinzuzugeben, da diese Stoffe später wieder entfernt werden müssen, was die Produktionskosten zusätzlich steigert (Büyükkileci & Harsa, 2004).

Die Fermentationsbrühe beinhaltet die von den Milchsäurebakterien produzierte MS in Form des Natrium-Lactats, hinzu kommen diverse Metabolite, Restzucker und anorganische Ionen. Um einen wirtschaftlichen Wert zu erlangen, muss das Na-Lactat von allen Bestandteilen gereinigt werden. Anschließend erfolgt ein Austausch der Natrium-Ionen gegen Wasserstoff-Ionen, um reine MS zu erhalten (Hilbold & Schab, 2013).

In den vergangenen Jahren wurden unterschiedliche Verfahren untersucht, um die Reinigung von MS durchzuführen. Hierzu zählen unter anderem Flüssig-flüssig-Extraktion (Jarvinen et al, 2000), Membranfiltration (Persson et al, 2001), der Einsatz von Ionenaustauschern, Elektrodialyse (Bailly, 2002) und Destillation (Mujtaba et al, 2012).

Jedes dieser Verfahren besitzt jedoch spezifische Nachteile. Das Destillationsverfahren ist aufgrund des hohen Siedepunktes (122 °C) von MS energetisch ungünstig (Khunnonkwao et al, 2012). Die Elektrodialyse ermöglicht die gezielte Abtrennung von geladenen Verbindungen. Gleich geladene Verbindungen wie z. B. Amino- und Carbonsäuren verbleiben dabei in der MS-Lösung (Sikder et al, 2012). Die Nanofiltration ermöglicht die Abtrennung hochmolekularer Verbindungen. Da MS eine vergleichsweise geringe Molmasse besitzt, kann hiermit bereits eine gute Abtrennung von anderen organischen Verbindungen erzielt werden. Ebenfalls kann die polare Eigenschaft der MS verwendet werden, um sie von anderen Verbindungen zu trennen. Hierfür sind Ionenaustauscher und Aktivkohle gut geeignet (Bayazit et al, 2011; Cao et al, 2002). Aufgrund der hohen Milchsäurekonzentration in der Fermentationsbrühe eignen sich Ionenaustauscher grundsätzlich besser für die Abtrennung von organischen Verbindungen aus der MS-Lösung. Dies geschieht in Form von Prozessen wie der Entfärbung und der Enthärtung (Aljundi et al, 2005). Darüber hinaus belegen Studien, dass die Ionenaustauscher

sich in der Funktion der bipolaren Elektrodialyse besser einsetzen lassen (Greiter et al, 2004).

Keines der erwähnten Verfahren ist jedoch alleine in der Lage, MS in einer hohen Reinheit zu generieren. Daher werden die Verfahren in einer geeigneten Sequenz hintereinander angewendet. Dieses Vorgehen ist üblich für fast sämtlich Produkte in der Industrie. Ein solches Hintereinanderschalten von einzelnen Verfahrensschritten wird auch Reinigungsprozess bzw. Downstream-Processing (DSP) genannt.

Der **Aufbau des DSP**, wie er in dieser Studie eingesetzt wurde, ist exemplarisch in Abb. 8 dargestellt. Nach der Mikrofiltration folgt eine weitere Filtrationsstufe, die Nanofiltration, um weitere niedermolekulare Metabolite und organische Verbindungen abzutrennen. Anschließend folgen mehrere Reinigungsschritte mit Ionenaustauscher- und Adsorptions-Kolonnen (González et al, 2006). Dabei werden zunächst Farbpigmente durch eine Entfärbung entfernt. Danach werden, jeweils in einer separaten Kolonne, Anionen, Kationen und bivalente Ionen abgeschieden bzw. gegen Na^+ -Ionen getauscht.

Durch eine bipolare Elektrodialyse erfolgt die eigentliche Konversion des Na-Lactats zu MS (González et al, 2006). Durch eine anschließende Aufkonzentrierung mittels Vakuum-Destillation erfolgt die Entfernung des überschüssigen Wassers.

Abb. 8: Fließbild eines DSP (Laube et al, 2016)

Legende: #1 Permeat der Mikrofiltration, #2 Permeat der Nanofiltration, #3 Retentat der Nanofiltration, #4 erste Enthärtung, #5 Säure-Strom der monopolen Elektrodialyse, #6 Base-Strom der monopolen Elektrodialyse, #7 zweite Enthärtung, #8 Säure-Strom aus der bipolaren Elektrodialyse, #9 Salz-Strom aus der bipolaren Elektrodialyse, #10 Base-Strom aus der bipolaren Elektrodialyse, #11 erste Entfärbung, #12 zweite Entfärbung, #13 Kationenaustausch, #14 Anionenaustausch, #15 MS-Konzentrat der Destillation, #16 Wasser Destillat der Destillation.

2 Ziele der Studie

2.1 Entwicklung einer Analysemethode zur Erfassung von organischen Verbindungen

Eine geeigneten Analysemethode für eine prozessbegleitende Qualitätskontrolle von MS muss die folgenden drei Anforderungen erfüllen. Als Erstes muss sie die MS bei niedrigen und bei hohen MS-Konzentrationen quantitativ bestimmen können. Zum Zweiten muss sie eine Vielzahl von verschiedenen organischen Verbindungen detektieren. Zum Dritten muss sie in der komplexen Matrix, wie einer Fermentationsbrühe, die beiden ersten Kriterien erfüllen können. Hierzu zählt das Detektieren anderer organischer Verbindungen. Dazu zählen Metaboliten, wie Aminosäuren, Proteine und organische Säuren.

Ist die Analysemethode in der Lage diese drei Anforderungen zu erfüllen, ist sie für eine Prozessanalyse geeignet. Eine solche Analysemethode ermöglicht eine Aussage über die Reinheit der MS, d. h. deren Produktqualität, zu treffen. Aus den Messergebnissen kann die Effektivität des Reinigungsverfahrens bestimmt werden.

Diese drei Anforderungen sollten idealerweise ergänzt werden durch eine möglichst kurze Laufzeit von unter 10 Minuten und einen geringen Vorbereitungsaufwand des Probenmaterials.

In den vergangenen drei Jahrzehnten wurde die Kapillarelektrophorese (CE) für den Einsatz als kommerzielle Analytik-Plattform intensiv erforscht. Kenney *et al.* haben 1991 zum ersten Mal erfolgreich MS zusammen mit Zitronensäure, Weinsäure, Apfelsäure, Bernsteinsäure und Essigsäure durch eine CE-Methode basierend auf einer Quarzglas-(Fused-Silica-)Kapillarsäule und einem Elektrolyt-Puffer aus Kaliumhydrogenphthalat in Proben aus Nahrungsmitteln nachgewiesen (Kenney, 1991). Lagoutte *et al.* haben die organischen Säuren Glycolsäure, MS, Ameisensäure und Essigsäure in Proben von Zigarettenrauch detektiert. Dabei wurde ebenfalls eine Quarzglaskapillare zusammen mit Kaliumhydrogenphthalat verwendet (Lagoutte et al, 1994). Mainka *et al.* haben 29 unterschiedliche Carbonsäuren und Carbonylverbindungen mit Hilfe einer Quarzglas-kapillare und Dodecyltrimethylammoniumhydroxide als Elektrolyt-Puffer in

Regentropfen nachgewiesen (Mainka et al, 1997). In den folgenden Jahren erwies sich die CE zunehmend als besonders geeignet für die Analyse von organischen Verbindungen in komplexen Matrices (Klampfl et al, 2000; Lagoutte et al, 1994; Mainka et al, 1997).

Die Detektion von organischen Verbindungen ist Grundlage für die Auswahl der Verfahrensschritte und deren anschließende Optimierung. Daher ist ihre Bedeutung nicht allein in der Qualitätskontrolle, sondern in der gesamten Prozessentwicklung zu sehen. Dieser Aspekt ist von besonderer Bedeutung bei der Herstellung von Bulk-Chemikalien. Diese Chemikalien verbleiben bei ihrer Aufreinigung in der wässrigen Phase der ursprünglichen Fermentationslösung. Somit müssen alle unerwünschten organischen und anorganischen Verbindungen entfernt werden.

Im Fokus der aktuellen Forschung, im Bereich der Kapillarelektrophorese, steht die Konzentrationsmessung von organischen und Aminosäuren in Nahrungsmitteln als Nachweis für Beginn eines durch Bakterien verursachten Zersetzungsprozess (Acunha et al, 2016; Pérez-Míguez et al, 2016; Poinso et al, 2016). Bei den genannten Studien wurden jedoch nur Konzentrationsbereich von bis zu 5.000 ppm an MS untersucht.

Ziel dieser Studie ist es eine CE-Methode zu entwickeln, welche auch bei hohen MS-Konzentrationen von 60.000 ppm bis 650.000 ppm und niedrigen Konzentrationen an organischen Verunreinigungen von 0,1 ppm bis 1,0 ppm die drei oben genannten Anforderungen erfüllt.

2.2 Anwendung der Kapillarelektrophorese-Methode zur Analyse des Reinigungs-Prozesses

Die CE hat sich in den vergangenen Jahrzehnten als zuverlässige Analyseplattform für organische Verbindungen in komplexen Matrices etabliert. Als Beispiel ist hier die Bestimmung von organischen Säuren und Aminosäuren in Nahrungsmitteln zu nennen (Kenney, 1991; Poinso et al, 2016; Rockström et al, 2017). Der Einsatz einer CE-Methode für die Analyse von Proben aus einem Aufreinigungsprozess wurde bisher nicht dokumentieren. Hierbei treten andere Herausforderungen auf, wie sie bei einer herkömmlichen Nahrungsmittel-Analyse

anzutreffen sind. Zu Beginn des Aufreinigungsverfahrens liegt die MS mit vielen Verunreinigungen in der Probe vor. Zum Ende des Aufreinigungsverfahrens liegt die MS in hoher Konzentration mit wenigen Verunreinigungen vor. Zudem erfolgt durch die Aufkonzentrierung der MS auch ein Anstieg im pH-Wert der Probe.

Demnach muss die CE-Methode über das gesamte Aufreinigungsverfahren hinweg in der Lage sein, die Proben ausreichend analysieren zu können. Hierzu zählt in erster Linie eine Separation der MS von den restlichen Verunreinigungen und des Weiteren eine Separation der Verunreinigungen untereinander.

Die meisten Literaturquellen im Bereich der Entwicklung von CE-Methoden konzentrierten sich auf die Detektion von vielen organischen Verbindungen mit einer jeweils geringen Konzentration innerhalb einer kurzen Analysezeit (Rockström et al, 2017).

Das Reinigungsverfahren hat einen Einfluss auf die Eigenschaften des Probenmaterials. Die CE-Methode muss in der Lage sein, alle Proben aus den ganzen Down-Stream Prozess analysieren zu können. Dabei ist davon auszugehen, dass die vielen organischen Verbindungen, z. B. nach der Mikrofiltration, zu Überlagerungen von einzelnen lokalen Peaks führen können. Der gleiche Effekt kann durch einen Anstieg der Konzentration der MS, z. B. während der Fermentation oder nach der Aufkonzentrierung in dem Reinigungsprozess, bedingt werden.

Der Effekt der Überlagerung von lokalen Maxima ist bereits aus der Auswertung von Chromatogrammen bekannt. Da die CE zwar unterschiedliche Mechanismen zur Trennung, jedoch den gleichen Mechanismus (UV-VIS) zur Detektion der Inhaltsstoffe verwendet, ist auch in einem Elektropherogramm eine Überlagerung von lokalen Maxima prinzipiell möglich. Dieser Effekt würde verstärkt werden, wenn viele Komponenten mit ähnlichen Eluierungszeitpunkten in den Proben vorhanden sind.

Durch eine Verlängerung der Laufzeit ist es eventuell möglich, später eluierende Verbindungen zu detektieren. Dabei ist die Verlängerung der Laufzeit nicht in Analogie zum Gradienten bei einer HPLC-Methode zu sehen, wo mit der Zeit die Zusammensetzung des Eluierungsmittels geändert wird. Sämtliche Micellen liegen bei der CE-Methode zu Beginn der Injektion in die Kapillare vor und werden durch das elektromagnetische Feld aufgetrennt. Dadurch werden

Micellen, die später eluieren, auch erst sichtbar, wenn die Detektionszeit die der Eluierungszeit überschreitet.

Im Folgenden wurde die entwickelte CE-Methode für die Analyse von Proben aus einem Aufreinigungsprozess angewendet. Dieser Aufreinigungsprozess wurde zuvor noch nie auf seine organischen Verunreinigungen hin untersucht. Das Ziel dieses Vorgehens ist es herauszufinden, ob die entwickelte CE-Methode für die Analyse des Aufreinigungsverfahrens geeignet ist. Die aufgezeichneten Elektropherogramme wurden unter den folgenden Aspekten ausgewertet.

Zu Beginn der Auswertung wurde untersucht, ob der Peak der MS stets von denen der Verunreinigungen getrennt ist. Anschließend wurde untersucht, ob die anderen Peaks der Verunreinigungen voneinander getrennt sind. Wenn die erste Bedingung erfüllt ist, kann das Flächenvergleichsverfahren angewendet werden. Hierbei wird die Fläche des Milchsäurepeaks mit der Summe der Flächen von den Peaks der Verunreinigungen verglichen.

Dieses Vorgehen ermöglicht es den Verlauf der Reinheit der MS, bzw. die Abtrennung der organischen Verbindungen zu verfolgen. Somit kann der Aufreinigungsprozess genauer ausgewertet werden. Dabei ist es von Interesse die folgenden Eigenschaften zu erfahren.

Wurden sämtliche Verunreinigungen durch das Aufreinigungsverfahren von der MS abgetrennt? Falls, dies nicht der Fall ist, welche Verunreinigungen waren bis zum Schluss in den Proben des Aufreinigungsverfahrens vorhanden? Welche Analysemethode war zur Identifizierung dieser Verunreinigungen nötig? Hatten die Verunreinigungen einen Einfluss auf die technische Verwertbarkeit der MS? Welches der einzelnen Reinigungsschritte hat den größten Einfluss auf die Reinheit der MS?

Die oben aufgeführten Fragestellungen werden wie folgt untersucht. Aus dem vorhandenen Aufreinigungsverfahren, wird nach jedem einzelnen Reinigungsschritt eine Probe genommen. Die hierdurch erhaltenen Proben werden mit der entwickelten CE-Methode analysiert. Die daraus erhaltenen Elektropherogramme werden auf zwei Arten untersucht.

Zum einen mittels der Flächenbeitragsmethode. Hierbei wird der Flächeninhalt des MS-Peak durch die Summe der Peaks der Verunreinigungen geteilt. Der erhaltene Wert wird als Prozentangabe wiedergegeben.

Zum anderen werden die einzelnen Peaks in den Elektropherogrammen und deren Verhalten untereinander untersucht. Dabei wird zum einen darauf geachtet welche Fraktionen an Peaks, durch welche Aufreinigungsschritte abgetrennt wurden. Zum anderen wird die Auflösung der CE-Methode untersucht. Hierfür wurden die Proben mit den meisten Verunreinigungen ausgewählt.

Bei der Untersuchung der Auflösung der Methode wird des Weiteren darauf geachtet, ob eine gewisse Menge an Peaks zu Überlagerungseffekten führen kann. Dabei wird zum einen darauf geachtet, ob nah beieinanderliegende Peaks dazu neigen, sich gegenseitig zu überlagern. Zum anderen, ob mehrere Peaks im gleichen Zweitraum eluieren.

2.2.1 Einfluss von organischen Verbindungen auf die technischen Eigenschaften von Milchsäure

Biologisch hergestellte MS muss in gereinigter Form, also ohne weitere organische Verbindungen, vorliegen, damit sie am Weltmarkt zu einem wirtschaftlich akzeptablen Preis verkauft werden kann. Im Gegensatz zu dem Verfahren der MS-Fermentation liegen nur wenige Studien zu möglichen Reinigungsprozessen von MS vor (Venus, 2011). Diese Studien, welche sich mit einzelnen Reinigungsschritten im Reinigungsprozess befassen, fokussieren sich auf die Entfernung von anorganischen Ionen aus der MS-Lösung (Laube & Reza, 2016; Panesar et al, 2010; Thang & Novalín, 2008; Tong et al, 2004).

Solche Reinigungsschritte sind unter anderem notwendig, um anschließend das Na-Lactat in seine protonierte Form, die MS, überführen zu können. Im Rahmen der Qualitätskontrolle von Nahrungsmitteln stehen wiederum die Konzentrationen an mikrobiellen Nebenprodukten, wie anderen organischen Säuren und Aminosäuren, im Fokus (Kenney, 1991). Dabei wird deren Konzentrationsveränderung in Lebensmitteln als Indikator für die Anwesenheit von ggf. unerwünschten Bakterien, wie pathogenen Keimen und Lebensmittelverderbern, verwendet (Mainka et al, 1997; Pérez-Míguez et al, 2016).

Nach dem Stand der Literatur ist davon auszugehen, dass bestimmte organische Verbindungen, wie z. B. Metabolite der Milchsäurebakterien, in einer wässrigen MS-Lösung nach der Fermentation und den ersten Reinigungsschritten immer noch vorhanden sind (Ghaffar et al, 2014). Solche organischen Verbindungen

können durch ihre funktionellen Gruppen in eine chemische Wechselwirkung mit der MS treten oder auch die physikalischen Eigenschaften der gesamten MS-Lösung beeinflussen. Hierzu zählt ein starker Einfluss auf die optischen und technischen Eigenschaften der MS-Lösung, z. B. hinsichtlich Farbe, Haltbarkeit und Polymerisations-Fähigkeit (Ahuja, 2000; Novalin & Zweckmair, 2009). Eine Beeinflussung der physikalischen Eigenschaften kann im Fall der Farbe dadurch erfolgen, dass die organischen Verbindungen in bestimmten Wellenlängen-Bereichen das Licht absorbieren. In der Folge erscheint die mikrobiell erzeugte MS-Lösung, in der noch organische Verbindungen enthalten sind, dunkler als eine Lösung von chemisch reiner MS. Die Färbung der MS-Lösung ist dazu in der Lage sich auf das erzeugte Bio-Plastik bzw. PLA zu übertragen. Eine hieraus resultierende gelbe oder bräunliche Färbung des PLA lässt ein Färben in die gewünschte Farbe im späteren Verarbeitungsprozess nicht mehr zu.

Um den Einfluss der Verunreinigungen auf die Färbung der MS-Lösung zu ermitteln, wurde wie folgt vorgegangen. Die Zahl der verunreinigenden Stoffe wurde mittels Elektrophorese bestimmt und in Relation zu den optischen Eigenschaften der MS gesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, ob mit zunehmender Anzahl an organischen Verbindungen in den Elektropherogrammen eine zunehmende Färbung in den Proben aus dem Prozess zu erkennen ist.

Um den Einfluss der Verunreinigungen auf die technische Verwertbarkeit der MS-Lösung zu ermitteln, wurde wie folgt vorgegangen. Als Indikator für die technische Verwertbarkeit wurden hier die Ergebnisse eines Polymerisationstest ausgewertet. Hierfür wurde eine MS-Lösung mit einer bekannten Verunreinigung, Pyroglutaminsäure (PGA), vermischt (Laube et al, 2017a). Zur Prüfung des Einflusses der Konzentration der PGA wurden zwei Proben aus wässriger industrieller MS mit einem niedrigen (0,5 ppm) und einem mittleren (5.000 ppm) Anteil an PGA erstellt. Diese Proben wurden dann einem Polymerisationstest unterzogen.

Vergleichbare Polymerisationstest sind aus der Forschung bekannt (Inkinen et al, 2011). Hierbei wurde eine wässrige Lösung von MS weiter eingedampft, bis sich Lactid gebildet hat. Das Lactid wurde mittels eines Gaschromatografen mit einer Varian-cyclodextrine-b-236M-19 Kapillare bei 150 °C und Helium als Trägergas gemessen. Mit diesem Verfahren konnten alle drei Arten: L,L-meso-Lactid und D,D-Lactid gemessen werden (Tsukegi et al, 2007).

Der Polymerisationstest hat zwei Messwerte generiert. Zum einen die Lactid-Ausbeute und zum anderen der Grad der Racemisierung des Lactid. Hierbei ist ein Grad der Racemisierung laut Angaben der Firma Uhde-Inventa-Fischer von unter 3,0 % als gut und von über 5,0 % als unzureichend für eine MS-Probe als Ausgangsmaterial für PLA einzustufen.

2.3 Einsatz von Bio-Adsorbern in der Bioraffinerie

Bei dem in dieser Studie angewandten Reinigungsverfahren für MS werden sogenannte Harze auf Basis von Polymerkügelchen verwendet (Zhou et al, 2011). Diese Harze werden je nach vorgesehener Anwendung bei ihrer Herstellung an ihrer Oberfläche mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen versehen. Je nach Art der funktionellen Gruppe können die Harze zum Austausch von An- oder Kationen und der Adsorption von größeren Molekülen eingesetzt werden (Bathen & Breitbach, 2013).

Nachwachsende Rohstoffe besitzen ebenfalls funktionelle Gruppen auf ihrer Oberfläche. Zu diesen funktionellen Gruppen zählen die Carboxyl-Gruppe, Lactone und Phenole (Aydın et al, 2008). Lactone sind zyklische Ester, welche durch intramolekulare Esterifizierung entstehen. Dieses geschieht, indem die Hydroxycarboxyl-Gruppe als Säure fungiert und mit dem basischen Ende des Moleküls eine Bindung eingeht. Hierdurch wird aus der Kohlenstoffkette ein Ring. Phenole bestehen aus einer Hydroxyl-Gruppe, welche direkt an ein aromatisches Kohlenwasserstoffmolekül gebunden ist.

Carboxyl-Gruppen liegen bei einem pH-Wert unterhalb von 4,0 in protonierter und oberhalb von 4,0 in deprotonierter Form vor (Krishnani et al, 2008). Im deprotonierten Zustand kann die Carboxyl-Gruppe positiv geladene Ionen binden. Durch diese funktionellen Gruppen können die nachwachsenden Rohstoffe ähnliche Eigenschaften bei der Adsorption aufweisen wie die petrochemisch hergestellten Harze (Ali et al, 2012).

Nachwachsende Rohstoffe, welche zur Adsorption verwendet werden, werden auch Bio-Adsorber genannt. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Holz (Ansari et al, 2012), Kornhülsen (Bulut et al, 2007), Orangen- und Bananenschalen (Namasivayam et al, 1996), Apfelkerngehäuse (Robinson et al, 2002), Kokosnussreste (Bhatnagar et al, 2010), entkoffeinierte Kaffeebohnen (Baek et al,

2010) und Algenmasse (Aksu, 2005; Vilar et al, 2007) adsorbierende Eigenschaften besitzen. Durch das Behandeln der Oberfläche, z. B. durch thermische Einwirkung, kann die Adsorptionsfähigkeit von nachwachsenden Rohstoffen beeinflusst werden. Das bekannteste Beispiel hierfür ist die Aktivkohle (Reza et al, 2014a).

In den oben aufgeführten Versuchen wurde die Kapazität von Bio-Adsorbern untersucht. Hierbei wurden die Bio-Adsorber in einem idealen Gemisch in Kontakt gebracht. Das ideale Gemisch besteht dabei aus Wasser und einer reinen Substanz. Diese reine Substanz ist in Analogie zu einem Standard in der chemischen Analyse zu sehen. Mittels eines solchen Versuchsansatzes kann die Kapazität eines Bio-Adsorbers für die jeweilige Testsubstanz bestimmt werden.

Aus den oben aufgeführten Versuchen kann die Annahme getroffen werden, dass Bio-Adsorber in einer Bioraffinerie zum Adsorbieren und Austauschen von Ionen verwendet werden können. Hierbei sind die Bio-Adsorber, wie Holz oder Bio-Aktivkohle, in der Lage, Ionen aus der MS-Lösung zu adsorbieren und so die MS-Lösung zu reinigen.

Die Ergebnisse der Adsorptionsversuche, die in der Literatur beschrieben werden und in denen ideale Gemische verwendet wurden, lassen jedoch keinen genauen Rückschluss auf die eigentliche Kapazität für diese reine Substanz in einem komplexen Prozessstrom zu. Daher sind die Ergebnisse nur begrenzt übertragbar auf industrielle Prozesse, in denen komplexe Prozessströme vorliegen. Konsequenterweise sollten daher Versuche mit komplexen Prozessströmen durchgeführt werden, um die Kapazität von Bio-Adsorbern für die Adsorption von Ionen aus komplexen Prozessströmen zu messen.

Durch zahlreiche Studien wurde die Adsorptionsfähigkeit von nachwachsenden Rohstoffen belegt. Hierbei bleibt jedoch der Nachweis zur Verwendbarkeit in einer Kolonne noch aus. Demnach müssen Versuche in Adsorptions-Kolonnen ausgeführt werden, um die Einsatzfähigkeit von ausgewählten Bio-Adsorbern zu belegen. So können erste wichtige Erkenntnisse zu dem hydrodynamischen Verhalten von Bio-Adsorbern in Kolonnen gemessen werden.

Die Kenntnis dieses hydrodynamischen Verhaltens ist insofern wichtig, als die Bildung von Agglomeraten dazu führen würde, dass die MS-Lösung an den Bio-Adsorber vorbei strömen würden. Hierdurch wäre kein optimaler Austausch von

Ionen aus der MS-Lösung mit den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der Bio-Adsorber gegeben.

Durch die entscheidende Funktion der Oberfläche bei der Adsorption und den großen Einfluss, welchen die Pyrolyse auf die Oberfläche als auch die Struktur von Holz hat, sollte ein Einfluss auf die Adsorptions-Eigenschaften der Bio-Adsorber vermutet werden und dieser auch nachweisbar sein. Als Pyrolyse wird das Verfahren bezeichnet, bei dem Holz durch den Einfluss von hohen Temperaturen und die Abwesenheit von Luft-Sauerstoff in Holz-Kohle überführt wird. Dieses Verfahren kann auch in Wasser unter hohem Druck ausgeführt werden. In den Studien über Aktivkohle, welche als Produkt aus dem Prozess der Pyrolyse hervorgeht, sind eindeutig adsorbierende Eigenschaften belegt (Ahmad & Hameed, 2010; Reza et al, 2014b). Dabei sind die folgenden Zusammenhänge noch ungeklärt: Besteht ein Einfluss der MS auf die Protonierung der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche eines Bio-Adsorbers, der dazu führt, dass der Bio-Adsorber selektiver für bestimmte Ionenarten wird? In diesem Zusammenhang ist auch die Frage zu sehen, ob sich, je länger ein Rohstoff, wie z. B. Holz, dem Verfahren der Pyrolyse ausgesetzt wurde, desto stärker die Zusammensetzung der funktionellen Gruppen an seiner Oberfläche und somit seine Adsorptionseigenschaften ändern.

Zuerst müssen Bio-Adsorber aus nachwachsenden Rohstoffen hergestellt werden, die ähnliche Eigenschaften wie industrielle petrochemisch hergestellte Adsorber aufweisen. Insbesondere ist hierfür die Oberfläche entscheidend. Um ein ähnliches Verhältnis der Oberflächen zu erreichen, wurden die Holzspäne aus Pappel und Weide nach dem Zerkleinern gesiebt. Die beiden Holzarten Pappel und Weide wurden am Standort des ATB auf einem Versuchsfeld angebaut. Dabei wurde ein Sieb mit einer Maschenweite von 2 μm verwendet. Dieses Maß entspricht den Angaben für die Partikelgröße der industriell hergestellten Adsorberharze.

Der Einfluss der MS auf die Protonierung der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche eines Bio-Adsorbers wurde durch den folgenden Ansatz überprüft: Die Bio-Adsorber wurden in eine Kolonne eingebracht und mit mehreren Litern Probenmaterial aus dem DSP in Kontakt gebracht. Dabei wurde das Probenmaterial von unten in die Kolonne eingepumpt. Beim Austritt aus der Kolonne ist eine Leitfähigkeitssonde installiert worden. Wenn die Leitfähigkeit sich geändert

hatte, wurden Proben entnommen. Diese wurden auf ihre Konzentration an Ionen mittels einer HPLC-Ionenchromatography untersucht. Aus der Differenz der Konzentration von Ionen im eingehenden und im ausgehenden Prozessstrom der Kolonne wurde die Kapazität des jeweiligen Bio-Adsorbers für die jeweiligen Ionen errechnet.

Der Einfluss der Dichte wurde in Analogie zu dem zuvor präsentierten Ansatz überprüft. Hierbei wurden die Bio-Adsorber in die Kolonne eingebracht und mit VE-Wasser gespült. Der Spülvorgang wurde für ca. 5 Minuten fortgeführt und danach beendet. Nachdem sich das Adsorber-Bett gelegt hatte, wurde die Höhe gemessen. Im Anschluss wurden unterschiedliche Volumenströme über die Regulierung der Pumpe eingestellt. Dabei wurde erneut VE-Wasser verwendet. Die Strömung des VE-Wassers durch das Adsorber-Bett führte zu dessen Expansion nach oben in der Kolonne. Diese jeweiligen Werte der Adsorber-Bett-Expansion für jeden Adsorber und für den jeweiligen Volumenstrom wurden aufgezeichnet.

Die Zusammensetzung der funktionellen Gruppen an der Bio-Adsorber-Oberfläche wurde untersucht, indem Teile der Bio-Adsorber aus Weide und Pappel einem Pyrolyse-Prozess unterzogen wurden. Dadurch entstand dann Aktivkohle. Somit lagen folgende Materialien für die Untersuchung vor: Weide als Bio-Adsorber, Aktivkohle-Weide als Bio-Adsorber, Pappel als Bio-Adsorber und Aktivkohle-Pappel als Bio-Adsorber. Mit diesen vier Bio-Adsorbern wurden die gleichen Experimente durchgeführt wie beim Einfluss der Protonierung durch die MS. Die Ergebnisse zu den Adsorptionskurven wurden dann verglichen.

2.4 Untersuchung von Membran-Filtereinheiten

Das Molekül der MS besitzt eine geringe Molmasse und ist somit wesentlich kleiner als ein Großteil der Bestandteile der Fermentationslösung (Salehi, 2014). Daher eignet sich der Einsatz von Membran-Filtereinheiten für die Reinigung von MS-haltigen Fermentationsbrühen (Carrère et al, 2001). Die Durchflussrate auf der Permeat-Seite der Membran ist beeinflusst durch den Druck auf der Feed-Seite (Muro et al, 2012). Dieses Verhältnis ist jedoch nicht zwangsläufig linear, sondern von dem Widerstand der Membran und dem allgemeinen Strömungswiderstand abhängig (Luo et al, 2012). Daher ist der Aufbau der gesamten Anlage für die Aussagekraft der Messwerte mitentscheidend.

Der Druck auf der Feed-Seite hat einen Einfluss auf die Konzentration der MS in dem Permeat-Strom (Ecker et al, 2012). Ab einem bestimmten Druckniveau ist ein Zustand erreicht, bei welchem der Druck keinen wesentlichen Einfluss mehr hat, weder auf das Volumen des Permeat-Stroms noch auf den in ihm enthaltenen Anteil an MS.

Aktuelle Studien beziehen sich fast ausschließlich auf die Bilanzierung einer einzelnen Membran-Filtereinheit (Hilal et al, 2004). Dieses ist möglich, da diese Untersuchungen in speziellen Versuchsanlagen stattfinden, welche mit den dafür nötigen Messinstrumenten ausgestattet sind. Eine einfache Produktionsanlage hingegen verfügt über solche Messinstrumente nicht. In diesem Fall kann jedoch die Leistung der Membran-Filtereinheit durch einen Ansatz eines Bilanzraumes, der die gesamte Anlage umfasst, berechnet werden. Hierbei kann von der Annahme ausgegangen werden, dass die Verwendung von unterschiedlichen Membranfiltereinheiten die Leistung der gesamten Membranfilteranlage beeinflusst. Es kann die These aufgestellt werden, dass der interne Druckwiderstand von einer Membran-Filtereinheit sich auf die Durchflussrate und die MS-Konzentration im Permeat-Strom überträgt.

Der Ansatz der Bilanzierung einer vollständigen Filtrationsanlage wurde noch nicht publiziert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bisher der Versuchsstand auf die zu untersuchenden Membraneigenschaften ausgelegt wurde. Durch den in dieser Studie erarbeiteten Ansatz wird der Einfluss der Membran-Filtereinheit auf die Anlagenkennlinie deutlich gemacht. Es wurden sieben Membran-Filtereinheiten aus der Industrie hinsichtlich ihrer Eigenschaften für die Aufreinigung von MS untersucht. Die Herstellerangaben zu den Eigenschaften der Membranen sind sehr allgemein gehalten. Die folgenden Zusammenhänge im Bezug auf die Eigenschaften der Membranen wurden untersucht. Je größer der Druck auf der Feed-Seite ist, desto höher ist die Durchflussrate auf der Permeat-Seite und desto höher ist die MS-Konzentration im Permeat. Auch wird davon ausgegangen, dass je geschickter der Bilanzierungsraum gewählt wird, desto weniger Messarmaturen notwendig sind, um die Leistung der Membranfiltereinheit zu charakterisieren.

Der Einfluss des Drucks auf der Feed-Seite wurde untersucht, indem die jeweiligen Membranfiltermodule in der Anlage installiert wurden. Anschließend

wurde der Vorlagebehälter mit VE-Wasser befüllt und die Pumpe gestartet. Der Druck auf der Feed-Seite wurde in 5-bar-Schritten erhöht. Bei jeder Erhöhung des Druckes wurde die Flussrate auf der Permeat-Seite gemessen. Zur Ermittlung der MS-Konzentration wurde jedoch anstelle von VE-Wasser Probenmaterial aus dem DSP verwendet (Permeat der Mikrofiltration). Zusätzliche Proben wurden von dem Permeat-Strom genommen und mittels HPLC wurde der MS-Anteil bestimmt.

Die Messwerte aus den Druck-Versuchen wurden verwendet, um die Leistung der Membranfiltereinheit charakterisieren zu können. Diese wurden in die Bilanzierungsformel für die Anlagen-Kennlinie eingesetzt. Anschließend erfolgte eine grafische Auswertung der Parameter für jede einzelne Membran und die jeweilige Druckstufe. Hieraus wurde dann der spezifische Membran-Widerstand abgelesen.

3 Darstellung der Ergebnisse

3.1 Entwicklung einer Analysemethode zur Erfassung von organischen Verbindungen

In Abb. 9 sind die Elektropherogramme von Probenmaterial aus dem DSP wiedergegeben. Die Proben wurden mit Standards von unterschiedlichen Aminosäuren versetzt. Dabei wurden unter anderem die folgenden Aminosäuren zugesetzt: Alanin, Valin, Lysin, Methionin, Tryptophan, Cystein, Glycin, Taurin, Arginin, Cystein, Histidin, Phenylalanin und Tyrosin. Alle Aminosäuren eluierten innerhalb eines Zeitraums von vier bis sechs Minuten, mit Ausnahme von Asparagin, welches erst bei sieben Minuten eluierte.

Ein großer Teil der organischen Säuren, welche ebenfalls als Standards dem Probenmaterial hinzugegeben wurde, konnte auf den Elektropherogrammen als lokales Maximum wiedergefunden werden. Diese organischen Säuren wurden zum großen Teil nach sechs bis acht Minuten eluiert. Hierzu zählen Glutamat, Glyoxylate, Propionat und Sorbat. Nicotinamid eluiert als einzige organische Säure bereits bei 3,5 Minuten. Eine gleichzeitige Eluierung mit der MS hat im Falle von Phosphat stattgefunden. Eine Verlängerung der Aufnahmezeit der Elektropherogramme führte zu einer Detektion von weiteren organischen Verbindungen. Eine Verlängerung der Aufnahmezeit um weitere vier Minuten ermöglichte eine Detektion von zusätzlich fünf Verbindungen. Hinzu kommt, dass ein Unterschied zwischen den Zeitpunkten, zu denen Aminosäuren und organische Säuren eluieren, festgestellt werden konnte. Die Aminosäuren eluieren tendenziell unter sechs Minuten; die organischen Säuren dagegen eher ab acht Minuten.

Die hohe MS-Konzentration hatte keinen negativen Einfluss auf die Auflösung der entwickelten CE-Methode. Alle Peaks waren gut voneinander getrennt. Im nächsten Schritt, wird nun die CE-Methode verwendet, um das sämtliche Proben aus einem Aufreinigungsverfahren zu untersuchen.

Im Vergleich zur HPLC-Methode konnte die CE-Methode MS und eine ganze Reihe weiterer Aminosäure und organischer Säuren in einem Durchlauf detektieren. Die gezielt auf die Detektion der MS ausgelegte HPLC-Methode wies

ausschließlich MS nach. Darüber hinaus wurden von der HPLC-Methode keine weiteren organischen Verbindungen in dem untersuchten Probenmaterial detektiert.

Abb. 9: Elektropherogramme von Proben mit zugesetzten Aminosäuren (Laube et al, 2017a).

3.2 Anwendung der Kapillarelektrophorese-Methode zur Analyse des Reinigungs-Prozesses

Der untersuchte DSP, welcher am ATB etabliert wurde ist in der Abb. 8 wiedergegeben. Dabei wurden die jeweiligen Units (Reinigungsschritte) durchnummeriert und entsprechend mit einem „#“-Symbol gekennzeichnet. Die gleiche Nummerierung wurde auf den Elektropherogrammen wiedergegeben. Die aufgezeichneten Elektropherogramme sind im Folgenden in Abb. 10 wiedergegeben.

Abb. 10: Elektropherogramme der Proben aus dem DSP (Laube et al, 2016)

Mit den Einstellungen der entwickelten CE-Methode, eluiert die MS nach sieben Minuten. Keiner der Reinigungsschritte wurde unter der Zuhilfenahme einer geeigneten Analyse­methode für die Detektion von organischen Verbindungen optimiert. Daraus resultierend waren auch sämtliche Reinigungsschritte nicht in der Lage, gezielt organische Verbindungen aus dem MS-Prozessstrom zu entfernen.

Die bipolare Elektrodialyse war als einziger Reinigungsschritt in der Lage, eine Fraktion von organischen Verbindungen aus dem MS-Prozess abzutrennen. Dieses ist aus den folgenden Elektropherogrammen ersichtlich. Zu dieser Fraktion gehören sowohl der ein- (#7) und ausgehende (#8) Prozessstrom in die bipolare Elektrodialyse als auch die Prozessströme aus den Wasser- (#9) und Lauge- (#10) Kompartiments. Ein Teil des PGA und fast die gesamte Fraktion der Verbindungen, welche unterhalb von sechs Minuten eluieren, werden durch die bipolare Elektrodialyse abgetrennt.

Die CE-Methode konnte auch für Proben mit einer hohen MS-Konzentrationen verwendet werden. Das konnte durch die Auswertung der Elektropherogramme von dem Probenmaterial nach der Destillation (#15) bestätigt werden. Hier lag die MS-Konzentrationen bei 774 g pro Liter. Das lokale Maximum der PGA und das der MS waren eindeutig voneinander separiert. Ein Anstieg der Milchsäurekonzentration führte nicht zu einer Überlagerung des MS-Peaks mit dem PGA-Peak oder den Peaks anderer organischen Verbindungen.

Der Einfluss der Anzahl von Verunreinigungen auf die Auflösung der Analyse­methode kann mit den in Abb. 10 dargestellten Elektropherogrammen abgeschätzt werden. Hierfür wurden die Elektropherogramme der Reinigungsschritte, welche am Anfang der Aufreinigungs­verfahren durchgeführt werden untersucht. Hierzu zählen die Mikrofiltration (#1) sowie das Permeat (#2) und das Retentat (#3) der Nanofiltration.

In der Probe aus der Mikrofiltration war das lokale Maximum der MS an seiner Basis von anderen lokalen Maxima überlagert. Dies kann auf eine parallele Detektion vieler weiterer Komponenten in der Probe zurückgeführt werden. In Abb. 11 ist der Verlauf der Reinheit im Aufreinigungs­verfahren dargestellt. Zum einen basierend auf den Konzentrationen der anorganischen Ionen und zum anderen anhand der Ergebnisse der CE-Methode. Im Folgenden wird nur die CE-

Methode und deren Reinheit betrachtet. Bei der Mikrofiltration betrug die gemessene Reinheit der MS nach Auswertung der Flächen der lokalen Maxima im Elektropherogramm 23 %.

Bei der Probe des Retentats der Nanofiltration (#3) war die Konzentration an organischen Verbindungen so hoch, dass die jeweiligen lokalen Maxima sich im Elektropherogramm überlagert haben. Es entstand eine Art „Berg“ im Elektropherogramm. Die gemessene Reinheit der MS betrug 3,2 %.

Bei der Probe des Permeats der Nanofiltration (#2) war bereits eine eindeutige Reinigung der MS zu erkennen. Neben dem lokalen Maximum der MS bei ca. sieben Minuten war noch das lokale Maximum von PGA bei ca. sechs Minuten und eine kleine Fraktion von lokalen Maxima bei ca. vier Minuten zu erkennen. Hier betrug die gemessene Reinheit der MS bereits 44 %.

Abb. 11: Veränderung der MS-Reinheit im Aufreinigungsprozess (Laube et al, 2016)

Daraus ergibt sich, dass eine zu hohe Konzentration an organischen Verbindungen zu einer Überlagerung der lokalen Maxima in den Elektropherogrammen führt. Daher eignet sich die entwickelte CE-Methode für die genaue Analyse des Aufreinigungsverfahrens ab der Nanofiltration.

3.2.1 Einfluss von organischen Verbindungen auf die technischen Eigenschaften von Milchsäure

In Abb. 10 sind die Elektropherogramme aus dem Probenmaterial des DSP wiedergegeben. Die jeweiligen Proben werden hinsichtlich ihrer Färbung mit dem Anteil an Peaks in den Elektropherogrammen verglichen. In Abb. 12 sind zur Veranschaulichung einige Proben aus dem Prozess dargestellt. Zunächst kann bereits bei einem ersten Blick auf den starken farblichen Unterschied zwischen den Proben aus der Nanofiltration festgestellt werden, dass die Anzahl der organischen Verbindungen einen Einfluss auf die optischen Eigenschaften hat. Im Vergleich der Farbe von der Permeat- mit der Retentat-Probe ist visuell ein eindeutiger farblicher Unterschied zu erkennen.

Abb. 12: Der Einfluss von Verunreinigungen auf die Färbung der MS-Lösung. Dabei handelt es sich um die ersten Reinigungsschritte des DSP nach der Fermentation. Von links nach rechts: Fermentation, Mikrofiltration, Enthärtung, Elektrodialyse; mono- und bipolar

Die Färbung der Proben lässt auf die erfolgreiche Abtrennung von Verunreinigungen in irgendeiner Form schließen. Je mehr lokale Maxima als Indikatoren für unerwünschte organische Verbindungen in dem Elektropherogramm zu sehen waren, umso dunkler war die Probe aus dem Prozess. Auch die Proben mit einer mittleren Belastung an organischen Verbindungen hatten immer noch einen unerwünschten braun-gelblichen Farbton.

Die Ergebnisse zu der technischen Verwertbarkeit der MS-Lösung hat die folgenden Ergebnisse geliefert. Bei einer vergleichsweise geringen PGA-Konz. von 0,5 ppm konnte eine Lactid-Ausbeute von 96,2 % bei einem Racemierungs-Grad von 2,8 % erreicht werden. Bei einer vergleichsweise hohen PGA-Konz. von 5.000 ppm konnte eine Lactid-Ausbeute von 96,3 % bei einem Racemisierungs-Grad von 3,7 % erzielt werden.

Die Ergebnisse bestätigten, dass eine hohe PGA-Konz. die Polymerisationseigenschaften der MS verschlechtern (Laube et al, 2016). Ein Einfluss der PGA-Konz. auf die Lactid-Ausbeute konnte nicht nachgewiesen werden.

Somit spielt der Reinheitsgrad bei MS, die zu Bioplastik verarbeitet werden soll, eine entscheidende Rolle. Im Gegensatz zu Anwendungen von MS in der Lebensmittelindustrie, bei der die Anwesenheit von weiteren Metaboliten keine negativen Einflüsse hat, stört bei der Polymerisation fast jede Verunreinigung den Prozess. Im Fall der Anwesenheit von PGA wird die Verteilung zwischen L-Lactid und Meso-Lactid hin zum Meso-Lactid verschoben.

3.3 Einsatz von Bio-Adsorbern in der Bioraffinerie

Die Ergebnisse der Experimente zur Verwendbarkeit der Bio-Adsorber für die Aufreinigung der MS-Lösung sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Na^+ -Ionen und das Lactat lagen in dem untersuchten Probenmaterial in hohen Konzentrationen vor. Demnach haben diese Verbindungen durch ihre hohe Konzentration andere Ionen von den Adsorptionsstellen an den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der Bio-Adsorber verdrängt. Es wurde jedoch fünf Mal mehr Lactat gebunden als Na^+ -Ionen. Diese Verteilung würde dafürsprechen, dass die vorhandenen Carboxyl-Gruppen auf der Oberfläche der Bio-Adsorber bei der Adsorption im protonierten Zustand vorlagen. Hierbei haben die Bio-Adsorber eine mehr als drei Mal höhere Kapazität ($>141 \text{ mg g}^{-1}$) für Na^+ -Ionen und MS gezeigt als industriell hergestellte Adsorber ($<40 \text{ mg g}^{-1}$). Unter den Bio-Adsorbern hatte Alginat die höchste Kapazität für Lactat (619 mg g^{-1}).

Tabelle 2: Ionen-Kapazität der eingesetzten Bio-Adsorber. (Laube & Reza, 2016)

Name	Ionen-Kapazität [$\text{mg}_{\text{Ion}}/\text{g}_{\text{Sorbent}}$]							
Bio-Adsorber	LA	Na^+	NH_4^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	SO_4^{2-}
A 103 S	0,9	1,5	0,001	0,014	0,000	0,001	0,043	0,002
MN 100	31,4	7,8	0,011	0,096	0,004	0,014	1,219	0,030
MN 102	28,4	6,4	0,006	0,087	0,004	0,008	0,240	0,027
MN 150	27,8	6,5	0,005	0,068	0,002	0,006	0,017	0,024
MN 502	40,7	8,2	0,006	0,060	0,009	0,028	0,018	0,036
AC	37,7	9,4	0,013	0,112	0,001	0,004	1,091	0,039
Willow	330,0	67,2	0,076	0,942	0,134	0,819	0,064	0,269
Poplar	183,4	38,0	0,170	0,525	0,105	0,522	0,094	0,133
HTC-Willow	534,3	111,2	0,221	1,521	0,075	0,138	0,172	0,448
HTC-Poplar	332,3	56,3	0,116	0,782	0,020	0,039	0,127	0,192
Alginate	619,6	122,9	0,215	1,533	0,041	0,760	0,314	0,312
Chitosan	141,8	26,1	0,056	0,389	0,009	0,019	0,061	0,101
MS-Lösung	Konzentration [ppm]							
SLFB	101.000	21.605	39,0	298,0	10,0	22,0	39,0	76,0

Die Ergebnisse der Experimente zur Dichte der Adsorbers sind in Abb. 13 dargestellt. Es sind drei Gruppen zu erkennen. Die erste Gruppe umfasst die Bio-Adsorber Weide, HTC-Weide, Pappel und HTC-Pappel. Deren Dichte liegt im Bereich von 1,0 bis 1,8 g ml^{-1} . Die zweite Gruppe umfasst Aktivkohle, MN 100, MN 102, MN 150, A 103 S und MN 502. Deren Dichte liegt im Bereich von 4,0 bis 6,5 g ml^{-1} . In der dritten Gruppe befinden sich Alginat und Chitosan mit beinahe 1,0 g ml^{-1} .

Abb. 13: Dichte aller verwendeten Adsorber. (Laube & Reza, 2016)

Die Abb. 14 zeigt die Expansion des Adsorber-Betts in Prozentangaben in Abhängigkeit von dem eingestellten Volumenstrom. Hierbei zeigten sich die folgenden drei Gruppen: Die erste Gruppe bildete bei geringen Volumenströmen von unter 5 l h^{-1} eine Bett-Expansion von mehr als 20 % aus. Hierzu zählten sämtliche industriellen Adsorber (A 103 S, MN 100, MN 102, MN 150 und MN 502) und HTC-Pappel. Die zweite Gruppe begann zwischen 7 und 12 l h^{-1} eine Bett-Expansion von mindestens 10 % zu zeigen. Zu dieser Gruppe zählten Weide, Chitosan und Alginat. Die dritte Gruppe bildete erst bei Volumenströmen von mehr als 15 l h^{-1} eine Bett-Expansion aus, diese übersteigt jedoch nicht den Wert von 10 %. Hierzu gehörten Pappel, HTC-Weide und Aktivkohle.

Abb. 14: Bett-Expansion der verwendeten Adsorber. (Laube & Reza, 2016)

Die Ergebnisse aus Abb. 13 und Abb. 14 zeigen, dass die jeweiligen Bio-Adsorber ein unterschiedliches Verhalten hinsichtlich der Expansion des Betts haben. Jedoch waren sämtliche Bio-Adsorber für den Einsatz in den Kolonnen geeignet. Es kam bei keinem Bio-Adsorber zu dem Fall, dass dieser an der Wasseroberfläche aufgetrieben worden ist und in der Folge die Kolonne verstopft hätte. Somit waren alle Bio-Adsorber unabhängig ihrer Dichte zum Einsatz in den Kolonnen geeignet.

Die Auswertung der experimentellen Ergebnisse zum Einfluss der Pyrolyse ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Hierbei ist der direkte Vergleich der Kapazität für das Lactat, maßgeblich. Durch den Prozess der Pyrolyse wurde aus einem Teil des Bio-Adsorbers Weide bzw. Pappel der entsprechende Bio-Adsorber HTC-Weide bzw. HTC-Pappel hergestellt. Die Adsorber-Kapazität von Weide für Lactat war mit 330 mg g^{-1} bereits 55 % höher als die von Pappel (183 mg g^{-1}). Durch den Prozess der Pyrolyse wurde die Kapazität der Weide bzw. HTC-Weide um 62 % gesteigert (534 mg g^{-1}) und die der Pappel bzw. HTC-Pappel um 55 % (332 mg g^{-1}). Daher

konnte der Prozess der Pyrolyse die Kapazität von beiden Materialien steigern, wobei die Proportion zwischen beiden Materialien erhalten blieb. HTC-Weide adsorbierte 62 % mehr Lactat als HTC-Pappel. Durch die Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass sowohl durch die richtige Wahl des Materials als auch durch den Einsatz der Pyrolyisierung die Kapazität von Bio-Adsorbenten positiv beeinflusst werden kann.

Ein Großteil der verwendeten Rohstoffe erwies sich als widerstandsfähig gegenüber einer chemischen Zersetzung durch die MS. Demzufolge eigneten sich die meisten Rohstoffe gut für die Aufreinigung. Alginat hingegen war eher ungeeignet, da es sich in Kontakt mit der MS bzw. dem deionisierten Wasser auflöste.

3.4 Untersuchung von Membran-Filtereinheiten

Die Ergebnisse der Experimente zum Einfluss des Drucks auf der Feed-Seite auf die Durchflussrate der Permeat-Seite sind in Abb. 15 dargestellt.

Legende

■	DL73	●	DK73	▲	NP30	◆	NF45
□	TW30	○	NF90	△	N/A	◇	SW30

Abb. 15: VE-Wasser Volumenstrom der Membran-Modulen (Laube et al, 2017b)

Die Membranen DL73, DK73 und NF45 wiesen einen abnehmenden Widerstandswert bei zunehmendem Feed-Druck auf. Dieses resultierte in flach verlaufenden Kurven. Hierbei zeigten die Membran DL73 den geringsten Membran-

Widerstand, was zu einer Halbierung des Membran-Widerstands bei einer Verdoppelung des Feed-Drucks (102 m / 55 %) und zu einem Drittel des Membran-Widerstandes bei einer Verdreifachung des Feed-Drucks (153 m / 30 %) führte (vgl. Abb. 16).

Abb. 16: Prozentuale Veränderung der Durchflussrate von VE-Wasser. (Laube et al, 2017b)

Es wurde gezeigt, dass der Feed-Druck bei den Membranen NP30, TW30 und SW30 nur einen geringen Einfluss auf den Membran-Widerstand hatte. Dieses resultierte in der Abb. 15 zu einem flachen Kurvenverlauf. Der Membran-Widerstand betrug noch 88 % bei einem Feed-Druck von 102 m und reduzierte sich auf 48 % bei einem Feed-Druck von 153 m. Eine weitere Erhöhung des Feed-Drucks auf 204, 255 und 306 m hatte nur einen geringen Einfluss auf den Membran-Widerstand in Form von 38, 35 und 33 % Reduzierung.

Es existiert ein exponentieller Zusammenhang zwischen Feed-Druck und Permeat-Strom. Jedoch liegen die Exponenten im Bereich von 12 bis 19. Daher dürfen diese Werte nur im Vergleich zueinander interpretiert werden und nur im Zusammenhang mit der Anlage, auf der sie gemessen wurden. Ab einer Druckstufe von 30 bar ist keine Steigerung des Permeat-Stroms mehr möglich. Es wird die Rückhaltekraft der Membran-Filtereinheit überschritten, und es kommt zu einem „Not-Ausfall“-Signal der Anlage.

Die Ergebnisse der Experimente zum Einfluss des Drucks auf der Feed-Seite auf die MS-Konzentration der Permeat-Seite wurden in Abb. 17. Dort wurde der Feed-Druck in Meter Wassersäule über dem MS-Permeat-Volumenstrom der jeweiligen Membran abgebildet. Da die MS nur einen Teil des Prozessstroms darstellt, sind ebenfalls die MS-Permeat-Volumenströme geringer im Vergleich zu den Experimenten mit VE-Wasser als Feed.

Legende

■	DL73	●	DK73	▲	NP30	◆	NF45
□	TW30	○	NF90	△	N/A	◇	SW30

Abb. 17: MS-Volumenstrom auf der Permeat-Seite. (Laube et al, 2017b)

Der MS-Membran-Widerstand ist stark unterschiedlich zwischen den jeweiligen Membranen ausgefallen. Im Fall der Membran SW30 war dieser sehr hoch. Eine Erhöhung des Feed-Drucks führte zu keiner Steigerung des MS-Permeat-Volumenstroms. Bei drei Membranen war ein starker Einfluss vom Feed-Druck auf den MS-Membran-Widerstand zu verzeichnen. Die Membran TW30 hat bei einer Steigerung des Feed-Drucks von 255 auf 286 m mit einer Erhöhung des MS-Membran-Widerstandes um 348 % reagiert. Der Membran-Widerstand der Membran NP30 stieg von 79 % bei 184 m auf 117 % bei 204 m an. Der Membran-Widerstand der Membran NF45 stieg von 44 % bei 204 m auf 83 % bei 255 m Feed-Druck an (vgl. Abb. 18).

Abb. 18: Prozentuale Veränderung der Durchflussrate von MS. (Laube et al, 2017b)

Die Ergebnisse der Experimente zum Bilanzierungsraum sind in Abb. 17 und Abb. 18 wiedergegeben. Hierbei ist gut zu erkennen, dass die Aufstellung und Umformung des Bilanzraumes es ermöglicht hat, ein einheitliches und grafisch einfach auszuwertendes Schema für den Vergleich der Leistung von einzelnen Membran-Filtereinheiten zu liefern. Anhand von Abb. 18 ist ersichtlich, dass Membran DL73 bei einem Feed-Druck von 184 m nur noch ein Viertel (15 %) des MS-Membran-Widerstands aufwies, welchen sie noch bei einem Feed-Druck von 82 m hatte. Anhand von Abb. 17 ist zu erkennen, dass bei der Steigerung des Feed-Drucks von 153 auf 184 m sich der MS-Permeat-Volumenstrom fast verdoppelt.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Studie wurden Lösungsansätze zu Problemstellungen aus den drei Themengebieten **Chemische Analytik**, **Membranfiltration** und **Bio-Adsorption** für die Anwendung im Bereich der Aufreinigung und Qualitätsbeurteilung von Milchsäure (MS) aus Fermentationsbrühen erarbeitet.

Im Bereich der **chemischen Analytik** bestand die Problemstellung darin, ein geeignetes Verfahren für die Erfassung von ungewollten organischen Verbindungen aus dem Fermentationsprozess in dem Reinigungsprozess für die MS nachzuweisen. Als Lösungsstrategie wurde eine Kapillarelektrophorese-Methode mit einem Borat-SDS-Elektrolyt und einer Quarzglaskapillare etabliert. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl an mikrobiellen Metaboliten in den unterschiedlichen MS-Lösungen vorhanden war. Eine Reihe von Metaboliten konnte exakt identifiziert werden. Diese waren Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan und Pyroglutaminsäure.

Auf dem Gebiet der **Adsorption** lag die Herausforderung darin, die Einsatzfähigkeit von nachwachsenden Rohstoffen für die Verwendung als Bio-Adsorber zur Reinigung von MS-Lösungen in der Praxis belegen zu können. Die Problemstellung konnte durch die Messung der Dichte, der Expansion des Adsorber-Betts in der Kolonne und der spezifischen Kapazität für anorganische Ionen von den jeweiligen Bio-Adsorbern gelöst werden. Hierbei konnte am Beispiel von Natrium gezeigt werden, dass die Kapazität der typischen biogenen Rohstoffe wie Weide ($67,2 \text{ mg g}^{-1}$), Pappel ($38,0 \text{ mg g}^{-1}$), Alginat ($122,9 \text{ mg g}^{-1}$) und Chitosan ($26,1 \text{ mg g}^{-1}$) um ein Vielfaches höher ist als die von konventionellen Ionenaustauschern ($<10,0 \text{ mg g}^{-1}$). Des Weiteren wurde erfolgreich der Einfluss der Pyrolyse auf die Holzarten, Weide ($67,2 \text{ mg g}^{-1}$) und Pappel ($38,0 \text{ mg g}^{-1}$), welche zu HTC-Weide ($111,2 \text{ mg g}^{-1}$) und HTC-Pappel ($56,3 \text{ mg g}^{-1}$) pyrolysiert wurden, aufgezeigt.

Bei der Technologie der **Membranfiltration** resultierte die Problematik daraus, den Einfluss des Membranwiderstands von Membran-Filtereinheiten für die Nanofiltration von wässrigen MS-Lösungen messbar zu machen. Hierbei konnte die Aufstellung eines geeigneten Bilanzraums unter Zuhilfenahme einer grafischen Auswertungsmethode entwickelt werden. Durch diesen Ansatz konnte gezeigt werden, dass die Membranen DK73, NP30 und DL73 bei einem Feed-Druck von 250 mWS bereits eine 2-, 3- und 4-fach höhere Permeat-Fließgeschwindigkeit aufweisen als die Membranen TW30 und NF45.

5 Ausblick

Der in dieser Studie **entwickelte Ansatz zur chemischen Analytik** für die Detektion von organischen Verunreinigungen im DSP der MS-Lösung sollte auf die Optimierung des Fermentations- und Reinigungsprozesses angewendet werden. Dabei spielt vor allem die gesamte Feinreinigung, beginnend mit der Entfärbung bis hin zur mono- und bi-polaren Elektrodialyse, eine wichtige Rolle. Hierbei ist die angelegte elektrische Spannung, aber auch die Art der verwendeten bipolaren Membran und die jeweiligen Konzentrationen an MS in der zugeführten Lösung von entscheidender Bedeutung. Im Bezug auf die Reinigung der MS muss die vollständige Abtrennung der Pyroglutaminsäure realisiert werden.

Durch die Kopplung eines **Massenspektrometers** anstelle eines UV/VIS-Detektors mit der Kapillarelektrophorese würde die Zeit, welche für die Identifizierung weiterer organischer Verunreinigungen benötigt wird, drastisch verringert werden. Hierdurch könnten innerhalb eines vergleichsweise kurzen Zeitraums sämtliche organischen Verbindungen identifiziert werden. So wäre man in der Lage, neben der MS andere organische Säuren und unterschiedliche Zuckermoleküle, aber auch die Polymere der MS, wie z. B. die Lactide, in einem einzigen Durchgang zu messen. Dies würde den Informationsstand stark erhöhen und in letzter Konsequenz auch dazu führen, dass sämtliche Quellen der organischen Verbindungen identifiziert werden könnten. Dadurch könnte man sowohl die Auswahl der geeigneten Mikroorganismen als auch der Rohstoffe dahingehend optimieren, dass bestimmte kritische Verunreinigungen nicht oder nur in geringem Maße während der Fermentation entstehen.

Die CE-Methode kann dann auf die Optimierung der jeweiligen **Nanofiltrations-Membranen** und deren optimalen Betriebspunkt angewendet werden. Dabei könnte ebenfalls der Einfluss der MS-Konzentration im Feed, die Temperatur und der Feed-Druck auf die Trennleistung der Membran und die hindurchtretenden organischen Verunreinigungen untersucht werden. Den größten Einfluss hierbei wird die Ladung der Oberfläche der Membran haben. Hierzu müssten ebenfalls Versuche mit einem idealen Gemisch aus MS und weiteren Standards durchgeführt werden.

Im Bereich der **Bio-Adsorber** besteht angesichts der positiven ersten Ergebnisse ebenfalls ein weiterer Forschungsbedarf. Zum einen muss die Beständigkeit der Bio-Adsorber in Langzeitversuchen geklärt werden. Einem industriellen Adsorber wird ein ca. 800-maliges Durchlaufen eines Zyklus aus Adsorbieren, Waschen, Resorbieren, Waschen und erneutem Beladen mit den jeweiligen Co-Ionen attestiert. Es müsste geklärt werden, ob die Bio-Adsorber ein ähnlich langes Einsatzverhalten aufweisen. Alternativ müsste der genaue Wert als Bodenverbesserer, den die Bio-Adsorber haben, den Entsorgungskosten der industriellen Adsorber entgegengestellt werden. Daraus könnte dann die wirtschaftlich optimale Einsatzdauer der Bio-Adsorber abgeleitet werden.

Für den Fall, dass erneut komplexe Prozessströme mit den Bio-Adsorbern in Kontakt gebracht werden, kann auch hier die erarbeitete CE-Methode verwendet werden. Hierbei wäre der Vorteil gegeben, dass direkt das Adsorptionsverhalten von mehreren organischen Verbindungen in einer komplexen Matrix an der Oberfläche von Bio-Adsorbern gemessen werden könnte. Darüber hinaus könnte auch die Frage geklärt werden, ob evtl. organische Verbindungen aus den Bio-Adsorbern durch z. B. die MS herausgelöst werden.

Abschließend bleibt jedoch Folgendes zu beurteilen: Unabhängig davon, welches Produkt man biologisch herstellen möchte, seien es organische Säuren, Aminosäuren, Vitamine, Farbstoffe oder Antioxidantien, das Wissen über die Zusammensetzung der komplexen Prozessströme, ausgehend von dem jeweiligen Fermentationsprozess, stellt die Grundlage für die Erstellung eines ganzheitlichen, optimal funktionierenden und somit in letzter Konsequenz wirtschaftlichen Aufreinigungsprozess dar.

6 Literaturverzeichnis

Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y. & Sonomoto, K. (2011) Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology*, 156(4), 286-301.

Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y. & Sonomoto, K. (2013) Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 31(6), 877-902.

Acunha, T., Ibáñez, C., García-Cañas, V., Simó, C. & Cifuentes, A. (2016) Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics. *Electrophoresis*, 37(1), 111-141.

Ahmad, A. A. & Hameed, B. H. (2010) Fixed-bed adsorption of reactive azo dye onto granular activated carbon prepared from waste. *Journal of hazardous materials*, 175(1-3), 298-303.

Ahuja, S. (ed), (2000) *Separation Science and Technology : Handbook of Bioseparations* Academic Press.

Aksu, Z. (2005) Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry*, 40(3-4), 997-1026.

Ali, I., Asim, M. & Khan, T. A. (2012) Low cost adsorbents for the removal of organic pollutants from wastewater. *Journal of Environmental Management*, 113, 170-183.

Aljundi, I. H., Belovich, J. M. & Talu, O. (2005) Adsorption of lactic acid from fermentation broth and aqueous solutions on Zeolite molecular sieves. *Chemical Engineering Science*, 60(18), 5004-5009.

Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. & Negro, M. J. (2010) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851-4861.

Amrane, A. (2001) Batch cultures of supplemented whey permeate using *Lactobacillus helveticus*: unstructured model for biomass formation, substrate consumption and lactic acid production. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(9-10), 827-834.

Ansari, R., Seyghali, B., Mohammad-khah, A. & Zanjanchi, M. A. (2012) Highly Efficient Adsorption of Anionic Dyes from Aqueous Solutions Using Sawdust Modified by Cationic Surfactant of Cetyltrimethylammonium Bromide. *Journal of Surfactants and Detergents*, 15(5), 557-565.

Araque, I., Bordons, A. & Reguant, C. (2013) Effect of ethanol and low pH on citrulline and ornithine excretion and arc gene expression by strains of *Lactobacillus brevis* and *Pediococcus pentosaceus*. *Food Microbiology*, 33(1), 107-113.

Asada, C., Nakamura, Y. & Kobayashi, F. (2005) Waste reduction system for production of useful materials from un-utilized bamboo using steam explosion followed by various conversion methods. *Biochemical Engineering Journal*, 23(2), 131-137.

Ask, M., Olofsson, K., Di Felice, T., Ruohonen, L., Penttilä, M., Lidén, G. & Olsson, L. (2012) Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochemistry*, 47(10), 1452-1459.

Auckenthaler, A. & Huggenberger, P. (2013) *Pathogene Mikroorganismen im Grund- und Trinkwasser: Transport - Nachweismethoden - Wassermanagement* Birkhäuser Basel.

Aydın, H., Bulut, Y. & Yerlikaya, Ç. (2008) Removal of copper (II) from aqueous solution by adsorption onto low-cost adsorbents. *Journal of Environmental Management*, 87(1), 37-45.

Baek, M.-H., Ijagbemi, C. O., O, S.-J. & Kim, D.-S. (2010) Removal of Malachite Green from aqueous solution using degreased coffee bean. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1-3), 820-828.

Bai, D.-M., Zhao, X.-M., Li, X.-G. & Xu, S.-M. (2004) Strain improvement and metabolic flux analysis in the wild-type and a mutant *Lactobacillus lactis* strain for L(+)-lactic acid production. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(6), 681-689.

Bailly, M. (2002) Production of organic acids by bipolar electrodialysis: realizations and perspectives. *Desalination*, 144(1-3), 157-162.

Bathen, D. & Breitbach, M. (2013) *Adsorptionstechnik*. Berlin: Springer.

Bayazit, S. a. S., İnci, I. s. & Uslu, H. (2011) Adsorption of Lactic Acid from Model Fermentation Broth onto Activated Carbon and Amberlite IRA-67. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 56(5), 1751-1754.

Benninga, H. (1990) *A history of lactic acid making : a chapter in the history of biotechnology*. Translated from English by. Boston: Kluwer Academic Publishers.

Berlowska, J., Cieciora-Wloch, W., Kalinowska, H., Kregiel, D., Borowski, S., Pawlikowska, E., Binczarski, M. & Witonska, I. (2018) Enzymatic Conversion of Sugar Beet Pulp: A Comparison of Simultaneous Saccharification and Fermentation and Separate Hydrolysis and Fermentation for Lactic Acid Production. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2).

Bhatnagar, A., Vilar, V. J. P., Botelho, C. M. S. & Boaventura, R. A. R. (2010) Coconut-based biosorbents for water treatment — A review of the recent literature. *Advances in Colloid and Interface Science*, 160(1-2), 1-15.

Bruno-Bárcena, J. M., Ragout, A. L., Córdoba, P. R. & Siñeriz, F. (1999) Continuous production of L (+)-lactic acid by *Lactobacillus casei* in two-stage systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(3), 316-324.

- Bulut, Y., Gözübenli, N. & Aydın, H. (2007) Equilibrium and kinetics studies for adsorption of direct blue 71 from aqueous solution by wheat shells. *Journal of Hazardous Materials*, 144(1–2), 300-306.
- Burgos-Rubio, C. N., Okos, M. R. & Wankat, P. C. (2000) Kinetic Study of the Conversion of Different Substrates to Lactic Acid Using *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology Progress*, 16(3), 305-314.
- Bustos, G., Moldes, A. B., Cruz, J. M. & Domínguez, J. M. (2004a) Evaluation of Vinification Lees as a General Medium for *Lactobacillus* Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5233-5239.
- Bustos, G., Moldes, A. B., Cruz, J. M. & Domínguez, J. M. (2004b) Formulation of Low-Cost Fermentative Media for Lactic Acid Production with *Lactobacillus rhamnosus* Using Vinification Lees as Nutrients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(4), 801-808.
- Bustos, G., Moldes, A. B., Cruz, J. M. & Domínguez, J. M. (2005) Production of lactic acid from vine-trimming wastes and viticulture lees using a simultaneous saccharification fermentation method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(3), 466-472.
- Büyükkileci, A. O. & Harsa, S. (2004) Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei*(NRRL B-441). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 79(9), 1036-1040.
- Cao, X., Yun, H. S. & Koo, Y.-M. (2002) Recovery of L-(+)-lactic acid by anion exchange resin Amberlite IRA-400. *Biochemical Engineering Journal*, 11(2–3), 189-196.
- Carrère, H., Blaszkow, F. & Balmann, H. R. d. (2001) Modelling the clarification of lactic acid fermentation broths by cross-flow microfiltration. *Journal of Membrane Science*, 186(2), 219-230.
- Castillo Martinez, F. A., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., Domínguez González, J. M., Converti, A. & Oliveira, R. P. d. S. (2013) Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 30(1), 70-83.
- Castro-Aguirre, E., Iñiguez-Franco, F., Samsudin, H., Fang, X. & Auras, R. (2016) Poly(lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 333-366.
- Cheng, Q., Shi, X., Liu, Y., Liu, X., Dou, S., Ning, C., Liu, Z. q., Sun, S., Chen, X. & Ren, X. (2018) Production of nisin and lactic acid from corn stover through simultaneous saccharification and fermentation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 420-426.
- Collins, A. N., Sheldrake, G. & Crosby, J. (1995) *Chirality in Industry: The Commercial Manufacture and Applications of Optically Active Compounds*. Weinheim, Germany: Wiley.
- Cui, F., Li, Y. & Wan, C. (2011) Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresource Technology*, 102(2), 1831-1836.

- Dahnum, D., Tasum, S. O., Triwahyuni, E., Nurdin, M. & Abimanyu, H. (2015) Comparison of SHF and SSF Processes Using Enzyme and Dry Yeast for Optimization of Bioethanol Production from Empty Fruit Bunch. *Energy Procedia*, 68, 107-116.
- Deng, Y., Li, S., Xu, Q., Gao, M. & Huang, H. (2012) Production of fumaric acid by simultaneous saccharification and fermentation of starchy materials with 2-deoxyglucose-resistant mutant strains of *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*, 107, 363-367.
- Dey, P. & Pal, P. (2012) Direct production of L (+) lactic acid in a continuous and fully membrane-integrated hybrid reactor system under non-neutralizing conditions. *Journal of Membrane Science*, 389, 355-362.
- Domingos, J. M. B., Puccio, S., Martinez, G. A., Amaral, N., Reis, M. A. M., Bandini, S., Fava, F. & Bertin, L. (2018) Cheese whey integrated valorisation: Production, concentration and exploitation of carboxylic acids for the production of polyhydroxyalkanoates by a fed-batch culture. *Chemical Engineering Journal*, 336, 47-53.
- Du, J., Li, L. & Zhou, S. (2017) Enhanced cyanophycin production by *Escherichia coli* overexpressing the heterologous *cphA* gene from a deep sea metagenomic library. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(2), 239-244.
- Ecker, J., Raab, T. & Harasek, M. (2012) Nanofiltration as key technology for the separation of LA and AA. *Journal of Membrane Science*, 389(0), 389-398.
- Elvers, B. (2016) *Market Overview and Growth Drivers*, 4. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Endres, H.-J. & Siebert-Raths, A. (2009) *Technische Biopolymere Rahmenbedingungen, Marktsituation, Herstellung, Aufbau und Eigenschaften*. München, Germany: Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG
- Erickson, L. E. & Yee-Chak Fung, D. (1988) *Handbook of Anaerobic Fermentations*. New York, United States: Taylor & Francis.
- Fitch, W. M. (1976) The molecular evolution of cytochrome c in eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, 8(1), 13-40.
- Fitzpatrick, J. J. & O'Keeffe, U. (2001) Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. *Process Biochemistry*, 37(2), 183-186.
- Fuchs, G. & Schlegel, H. G. (2006) *Allgemeine Mikrobiologie: Begründet von Hans-Günter Schlege/Thieme*.
- Fukushima, K., Sogo, K., Miura, S. & Kimura, Y. (2004) Production of D-Lactic Acid by Bacterial Fermentation of Rice Starch. *Macromolecular Bioscience*, 4(11), 1021-1027.
- Gao, C., Ma, C. & Xu, P. (2011) Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnology Advances*, 29(6), 930-939.

Garde, A., Jonsson, G., Schmidt, A. S. & Ahring, B. K. (2002) Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresource Technology*, 81(3), 217-23.

Garlotta, D. (2001) A Literature Review of Poly(Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment*, 9(2), 63-84.

Ge, X.-Y., Qian, H. & Zhang, W.-G. (2009) Improvement of L-lactic acid production from Jerusalem artichoke tubers by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Lactobacillus* sp. *Bioresource Technology*, 100(5), 1872-1874.

Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aqil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., Kamran, M., Ehsan, N. & Mehmood, S. (2014) Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 222-229.

Gobbetti, M., Lavermicocca, P., Minervini, F., de Angelis, M. & Corsetti, A. (2000) Arabinose fermentation by *Lactobacillus plantarum* in sourdough with added pentosans and alpha-L-arabinofuranosidase: a tool to increase the production of acetic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 317-24.

González, M. I., Álvarez, S., Riera, F. A. & Álvarez, R. (2006) Purification of Lactic Acid from Fermentation Broths by Ion-Exchange Resins. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(9), 3243-3247.

Greiter, M., Novalin, S., Wendland, M., Kulbe, K.-D. & Fischer, J. (2004) Electrodialysis versus ion exchange: comparison of the cumulative energy demand by means of two applications. *Journal of Membrane Science*, 233(1-2), 11-19.

Hilal, N., Al-Zoubi, H., Darwish, N. A., Mohamma, A. W. & Abu Arabi, M. (2004) A comprehensive review of nanofiltration membranes: Treatment, pretreatment, modelling, and atomic force microscopy. *Desalination*, 170(3), 281-308.

Hilbold, N.-J. & Schab, F. (2013) Bio-based building blocks, case study of a large-scale manufacturing process. *Chimica Oggi-Chemistry Today*(31), 6-21.

Hofvendahl, K. & Hahn-Hägerdal, B. (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2-4), 87-107.

Holten, C. H. (1971) *Lactic acid. Properties and chemistry of lactic acid and derivatives* Verlag Chemie, Weinheim.

Hu, J., Lin, Y., Zhang, Z., Xiang, T., Mei, Y., Zhao, S., Liang, Y. & Peng, N. (2016) High-titer lactic acid production by *Lactobacillus pentosus* FL0421 from corn stover using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, 214, 74-80.

IHS-Markit (2015) *Chemical Economics Handbook: Lactic Acid, Its Salts and Esters*, 2015. Available online: <https://www.ih.com/products/lactic-acid-its-salts-chemical-economics-handbook.html> [Accessed].

Inkinen, S., Hakkarainen, M., Albertsson, A.-C. & Södergård, A. (2011) From Lactic Acid to Poly(lactic acid) (PLA): Characterization and Analysis of PLA and Its Precursors. *Biomacromolecules*, 12(3), 523-532.

Iyer, P. V. & Lee, Y. Y. (1999) Product inhibition in simultaneous saccharification and fermentation of cellulose into lactic acid. *Biotechnology Letters*, 21(5), 371-373.

Iyer, P. V., Thomas, S. & Lee, Y. Y. (2000) High-yield fermentation of pentoses into lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84(1), 665-677.

Jarvinen, M., Myllykoski, L., Keiski, R. & Sohlo, J. (2000) Separation of lactic acid from fermented broth by reactive extraction. *Bioseparation*, 9(3), 163-6.

Jiang, S., Xu, P. & Tao, F. (2019) L-Lactic acid production by *Bacillus coagulans* through simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic corncob residue. *Bioresource Technology Reports*, 6, 131-137.

Jin, B., Yin, P., Ma, Y. & Zhao, L. (2005) Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus* fungi from food processing waste streams. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32(11-12), 678-686.

John, R. P., Nampoothiri, K. M. & Pandey, A. (2007a) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(3), 524-534.

John, R. P., Sukumaran, R. K., Nampoothiri, K. M. & Pandey, A. (2007b) Statistical optimization of simultaneous saccharification and L(+)-lactic acid fermentation from cassava bagasse using mixed culture of lactobacilli by response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 36(3), 262-267.

Joshi, D. S., Singhvi, M. S., Khire, J. M. & Gokhale, D. V. (2010) Strain improvement of *Lactobacillus lactis* for D-lactic acid production. *Biotechnology Letters*, 32(4), 517-520.

Juodeikiene, G., Vidmantienė, D., Basinskiene, L., Cernauskas, D., Bartkiene, E. & Cizeikiene, D. (2015) Green metrics for sustainability of biobased lactic acid from starchy biomass vs chemical synthesis. *Catalysis Today*, 239, 11-16.

Kádár, Z., Szengyel, Z. & Réczey, K. (2004) Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products*, 20(1), 103-110.

Kaufman, E. N., Cooper, S. P., Budner, M. K. & Richardson, G. R. (1996) Continuous and simultaneous fermentation and recovery of lactic acid in a biparticle fluidized-bed bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57(1), 503-515.

Keller, D. P., Feng, E. Y. & Oschlies, A. (2014) Potential climate engineering effectiveness and side effects during a high carbon dioxide-emission scenario. *Nature Communications*, 5, 3304-3316.

Kenney, B. F. (1991) Determination of organic acids in food samples by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 546, 423-430.

Khunnonkwao, P., Boontawan, P., Haltrich, D., Maischberger, T. & Boontawan, A. (2012) Purification of L-(+)-lactic acid from pre-treated fermentation broth using vapor permeation-assisted esterification. *Process Biochemistry*, 47(12), 1948-1956.

Klampfl, C. W., Buchberger, W. & Haddad, P. R. (2000) Determination of organic acids in food samples by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 357-364.

Korbekandi, H., Abedi, D., Jalali, M., Fazeli, M.-R. & Heidari, M. (2007) Optimization of *Lactobacillus casei* growth and lactic acid production in batch culture. *Journal of Biotechnology*, 131(2), 182-183.

Kotzamanidis, C., Roukas, T. & Skaracis, G. (2002) Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(5), 441-448.

Krishnani, K., Meng, X., Christodoulatos, C. & Boddu, V. (2008) Biosorption mechanism of nine different heavy metals onto biomatrix from rice husk. *Journal of Hazardous Materials*, 153(3), 1222-1234.

Kwon, S., Yoo, I.-K., Lee, W. G., Chang, H. N. & Chang, Y. K. (2001) High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell-recycle bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 73(1), 25-34.

Kyla-Nikkila, K., Hujanen, M., Leisola, M. & Palva, A. (2000) Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)-lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3835-41.

L., A. & S., A. (2000) *Lactic Acid Bacteria*. Dordrecht: Springer.

Lagoutte, D., Lombard, G., Nisseron, S., Papet, M. P. & Saint-Jalm, Y. (1994) Determination of organic acids in cigarette smoke by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 684(2), 251-257.

Laube, H., Boden, J. & Schneider, R. (2017a) Capillary electrophoresis method for the analysis of organic acids and amino acids in the presence of strongly alternating concentrations of aqueous lactic acid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(7), 981-988.

Laube, H., Matysik, F.-M., Schmidberger, A., Mehlmann, K., Toursel, A. & Boden, J. (2016) CE-UV/VIS and CE-MS for monitoring organic impurities during the downstream processing of

fermentative-produced lactic acid from second-generation renewable feedstocks. *Journal of Biological Engineering*, 10(7), 1-11.

Laube, H. & Reza, M. T. (2016) Application of biosorbents for ion removal from sodium lactate fermentation broth. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(1), 10-19.

Laube, H., Schneider, R. & Venus, J. (2017b) Investigation of spiral-wound membrane modules for the cross-flow nanofiltration of fermentation broth obtained from a pilot plant fermentation reactor for the continuous production of lactic acid. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 4.

Lee, K.-S. & Lee, D.-S. (1993) A kinetic model for lactic acid production in kimchi, a Korean fermented vegetable dish. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75(5), 392-394.

Liang, S., McDonald, A. G. & Coats, E. R. (2015) Lactic acid production from potato peel waste by anaerobic sequencing batch fermentation using undefined mixed culture. *Waste Management*, 45, 51-56.

Lin, S. K. C., Du, C., Koutinas, A., Wang, R. & Webb, C. (2008) Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Biochemical Engineering Journal*, 41(2), 128-135.

Liu, Y., Liao, W., Liu, C. & Chen, S. (2006) Optimization of L-(+)-lactic acid production using pelletized filamentous *Rhizopus oryzae* NRRL 395. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 131(1-3), 844-853.

Loubiere, P., Coccagn-Bousquet, M., Matos, J., Goma, G. & Lindley, N. D. (1997) Influence of end-products inhibition and nutrient limitations on the growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, 82(1), 95-100.

Lu, Z., Wei, M. & Yu, L. (2012) Enhancement of pilot scale production of L-(+)-lactic acid by fermentation coupled with separation using membrane bioreactor. *Process Biochemistry*, 47(3), 410-415.

Lunelli, B. H., Melo, D. N. C., de Moraes, E. R., Victorino, I. R. S., Vasco de Toledo, E. C., Regina Wolf Maciel, M. & Filho, R. M. (2011) Real-time optimization for lactic acid production from sucrose fermentation by *Lactobacillus plantarum*. *Computer Aided Chemical Engineering*, 29, 1396-1400.

Luo, J., Huang, W., Song, W., Hang, X., Ding, L. & Wan, Y. (2012) A pilot-plant test on desalination of soy sauce by nanofiltration. *Separation and Purification Technology*, 89(0), 217-224.

Madzingaidzo, L., Danner, H. & Braun, R. (2002) Process development and optimisation of lactic acid purification using electrodialysis. *Journal of Biotechnology*, 96(3), 223-239.

Mainka, A., Ebert, P., Kibler, M., Prokop, T., Tenberken, B. & Bächmann, K. (1997) Development of new methods for the analysis of carboxylic acids and carbonyl compounds in

size classified raindrops by CE for application in modelling atmospheric processes. *Chromatographia*, 45(1), 158-162.

Marques, S., Gírio, F. M., Santos, J. A. L. & Roseiro, J. C. (2016) Pulsed fed-batch strategy towards intensified process for lactic acid production using recycled paper sludge. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 7(2), 127-137.

Marques, S., Matos, C. T., Gírio, F. M., Roseiro, J. C. & Santos, J. A. L. (2017) Lactic acid production from recycled paper sludge: Process intensification by running fed-batch into a membrane-recycle bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 120, 63-72.

Marques, S., Santos, J. A. L., Gírio, F. M. & Roseiro, J. C. (2008) Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 41(3), 210-216.

Mayo, B., Piekarczyk, T. A., Kowalczyk, M., Pablo, A. & Bardowski, J. (2010) Updates in the metabolism of lactic acid bacteria, in Mozzi, F., Raya, R. R. & Vignolo, G. M. (eds), *Biotechnology of lactic acid bacteria novel applications*, 2 edition. Weinheim, Germany: Wiley.

Miura, S., Arimura, T., Itoda, N., Dwiarti, L., Feng, J. B., Bin, C. H. & Okabe, M. (2004) Production of L-lactic acid from corncob. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(3), 153-157.

Moldes, A. B., Alonso, J. L. & Parajó, J. C. (2001a) Resin selection and single-step production and recovery of lactic acid from pretreated wood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 95(2), 69-81.

Moldes, A. B., Alonso, J. L. & Parajó, J. C. (2001b) Strategies to improve the bioconversion of processed wood into lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 76(3), 279-284.

Monteagudo, J. M., Rodríguez, L., Rincón, J. & Fuertes, J. (1997) Kinetics of Lactic Acid Fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* Grown on Beet Molasses. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 68(3), 271-276.

Mujtaba, Iqbal, M., Edreder, E. A. & Emtir, M. (2012) Significant thermal energy reduction in lactic acid production process. *Applied Energy*, 89(1), 7.

Muro, C., Riera, F. & Díaz, M. a. d. C. (2012) Membrane Separation Process in Wastewater Treatment of Food Industry, in Valdez, B. (ed), *Food Industrial Processes - Methods and Equipment*. London, UK: InTechOpen.

Mussatto, S. I., Fernandes, M., Dragone, G., Mancilha, I. M. & Roberto, I. C. (2007) Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotechnology Letters*, 29(12), 1973-1976.

Namasivayam, C., Muniasamy, N., Gayatri, K., Rani, M. & Ranganathan, K. (1996) Removal of dyes from aqueous solutions by cellulosic waste orange peel. *Bioresource Technology*, 57(1), 37-43.

Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F. & Boudrant, J. (2001) The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus*. *Bioresource Technology*, 78(2), 149-153.

Narayanan, N., Roychoudhury, P. K. & Srivastava, A. (2004) L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(2), 16.

Naveena, B. J., Altaf, M., Bhadrappa, K., Madhavendra, S. S. & Reddy, G. (2005) Direct fermentation of starch to l(+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate: medium optimization using RSM. *Process Biochemistry*, 40(2), 681-690.

Nigatu, A. (2000) Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lact. fermentum*, *Lact. rhannosus*, *Lact. sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from kocho and tef. *Journal of Applied Microbiology*, 89(6), 969-78.

Nomura, Y., Iwahara, M. & Hongo, M. (1987) Lactic acid production by electrodialysis fermentation using immobilized growing cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 30(6), 788-793.

Novalin, S. & Zweckmair, T. (2009) Renewable resources - green biorefinery: separation of valuable substances from fluid-fractions by means of membrane technology. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 3(1), 20-27.

Oh, H., Wee, Y.-J., Yun, J.-S., Ho Han, S., Jung, S. & Ryu, H.-W. (2005) Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource Technology*, 96(13), 1492-1498.

Olofsson, K., Bertilsson, M. & Lidén, G. (2008) A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1(1), 7.

Oude Elferink, S. J. W. H., Krooneman, J., Gottschal, J. C., Spoelstra, S. F., Faber, F. & Driehuis, F. (2001) Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1,2-Propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 125-132.

Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Knill, C. J. & Kosseva, M. (2010) Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 219-226.

Park, E. (2004) Bioconversion of waste office paper to L-(+)-lactic acid by the filamentous fungus *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*, 93(1), 77-83.

Park, K. Y., Jeong, J. K., Lee, Y. E. & Daily, J. W., 3rd (2014) Health benefits of kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. *Journal of Medicinal Food*, 17(1), 6-20.

Pedersen, M. B., Gaudu, P., Lechardeur, D., Petit, M.-A. & Gruss, A. (2012) Aerobic Respiration Metabolism in Lactic Acid Bacteria and Uses in Biotechnology. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 37-58.

Peeva, L. & Peev, G. (1997) A new method for pH stabilization of the lactoacidic fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(3), 176-181.

Pérez-Míguez, R., Marina, M. L. & Castro-Puyana, M. (2016) Capillary electrophoresis determination of non-protein amino acids as quality markers in foods. *Journal of Chromatography A*, 1428, 97-114.

Persson, A., Jonsson, A. S. & Zacchi, G. (2001) Separation of lactic acid-producing bacteria from fermentation broth using a ceramic microfiltration membrane with constant permeate flow. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(3), 269-77.

Perttunen, J., Myllykoski, L. & Keiski, R. (2002) Lactic acid fermentation of hemicellulose liquors and their activated carbon pretreatments. *Engineering and Manufacturing for Biotechnology*, 4(1), 10.

Peters, D. (2006) Carbohydrates for fermentation. *Biotechnology Journal*, 1(7-8), 806-814.

Poinsot, V., Ong-Meang, V., Gavard, P. & Couderc, F. (2016) Recent advances in amino acid analysis by capillary electromigration methods, 2013-2015. *Electrophoresis*, 37(1), 142-161.

Portilla Rivera, O. M., Moldes Menduiña, A. B., Torrado Agrasar, A. M. & Domínguez González, J. M. (2007) Biosurfactants from grape marc: Stability study. *Journal of Biotechnology*, 131(2), 136-147.

Reza, M. T., Andert, J., Wirth, B., Busch, D., Pielert, J., Lynam, J. G. & Mumme, J. (2014a) Hydrothermal Carbonization of Biomass for Energy and Crop Production. *Applied Bioenergy*, 1(1), 135-147.

Reza, M. T., Uddin, M. H., Lynam, J. G. & Coronella, C. J. (2014b) Engineered pellets from dry torrefied and HTC biochar blends. *Biomass and Bioenergy*, 63(0), 229-238.

Rivas, B., Torrado, A., Rivas, S., Moldes, A. B. & Domínguez, J. M. (2007) Simultaneous lactic acid and xylitol production from vine trimming wastes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(8), 1603-1612.

Robinson, T., Chandran, B. & Nigam, P. (2002) Removal of dyes from a synthetic textile dye effluent by biosorption on apple pomace and wheat straw. *Water Research*, 36(11), 2824-2830.

Rockström, J., Gaffney, O., Rogelj, J., Meinshausen, M., Nakicenovic, N. & Schellnhuber, H. J. (2017) A roadmap for rapid decarbonization. *Science*, 355(6331), 1269-1271.

Romaní, A., Yáñez, R., Garrote, G. & Alonso, J. L. (2008) SSF production of lactic acid from cellulosic biosludges. *Bioresource Technology*, 99(10), 4247-4254.

Ronimus, R. S. & Morgan, H. W. (2003) Distribution and phylogenies of enzymes of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway from archaea and hyperthermophilic bacteria support a gluconeogenic origin of metabolism. *Archaea*, 1(3), 199-221.

Roukas, T. & Kotzekidou, P. (1998) Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(3), 199-204.

Salehi, F. (2014) Current and future applications for nanofiltration technology in the food processing. *Advances in Bioseparations for Food and Bioprocessing*, 92(2), 161-177.

Salgado, J. M., Rodríguez, N., Cortés, S. & Domínguez, J. M. (2012) Coupling two sizes of CSTR-type bioreactors for sequential lactic acid and xylitol production from hemicellulosic hydrolysates of vineshoot trimmings. *New Biotechnology*, 29(3), 421-427.

Salminen, S., Ouwehand, A., Wright, A. V. & Daly, C. (1993) Future aspects of research and product development of lactic acid bacteria., in Salminen, S., Wright, A. & Ouwehand, A. (eds), *Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects*. New York: Marcel Dekker, 429 - 432.

Salminen, S., Wright, A. v. & Ouwehand, A. (2004) *Lactic acid bacteria : microbiology and functional aspects*, 3rd edition. New York: Marcel Dekker.

San-Martín, M., Pazos, C. & Coca, J. (2007) Reactive extraction of lactic acid with Alamine 336 in the presence of salts and lactose. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 54(1), 1-6.

Sanders, M. E. & Klaenhammer, T. R. (2001) Invited Review: The Scientific Basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM Functionality as a Probiotic. *Journal of Dairy Science*, 84(2), 319-331.

Sasaki, C., Kushiki, Y., Asada, C. & Nakamura, Y. (2014) Acetone–butanol–ethanol production by separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SSF) methods using acorns and wood chips of *Quercus acutissima* as a carbon source. *Industrial Crops and Products*, 62, 286-292.

Senedese, A. L. C., Maciel Filho, R. & Maciel, M. R. W. (2015) L-Lactic Acid Production by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863. *The Scientific World Journal*, 2015, 1-6.

Sikder, J., Chakraborty, S., Pal, P., Drioli, E. & Bhattacharjee, C. (2012) Purification of lactic acid from microfiltrate fermentation broth by cross-flow nanofiltration. *Biochemical Engineering Journal*, 69(0), 130-137.

Singhvi, M., Joshi, D., Adsul, M., Varma, A. & Gokhale, D. (2010) d-(–)-Lactic acid production from cellobiose and cellulose by *Lactobacillus lactis* mutant RM2-24. *Green Chemistry*, 12(6), 1106.

- Sreenath, H. K., Moldes, A. B., Koegel, R. G. & Straub, R. J. (2001a) Lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of alfalfa fiber. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(6), 518-523.
- Sreenath, H. K., Moldes, A. B., Koegel, R. G. & Straub, R. J. (2001b) Lactic acid production from agriculture residues. *Biotechnology Letters*, 23(3), 179-184.
- Srivastava, A., Roychoudhury, P. K. & Sahai, V. (1992) Extractive lactic acid fermentation using ion-exchange resin. *Biotechnology and Bioengineering*, 39(6), 607-613.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A. & Hall, S. J. (2013) *Principles of Fermentation Technology* Elsevier Science.
- Taherzadeh, M. J. & Karimi, K. (2008) Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(9), 1621-1651.
- Tejayadi, S. & Cheryan, M. (1995) Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(2), 242-248.
- Thang, V. H. & Novalin, S. (2008) Green Biorefinery: Separation of lactic acid from grass silage juice by chromatography using neutral polymeric resin. *Bioresource Technology*, 99(10), 4368-4379.
- Thomas, S. (2000) Production of lactic acid from pulp mill solid waste and xylose using *Lactobacillus delbrueckii* (NRRL B445). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84(1), 455-468.
- Tong, W.-Y., Fu, X.-Y., Lee, S.-M., Yu, J., Liu, J.-W., Wei, D.-Z. & Koo, Y.-M. (2004) Purification of l(+)-lactic acid from fermentation broth with paper sludge as a cellulosic feedstock using weak anion exchanger Amberlite IRA-92. *Biochemical Engineering Journal*, 18(2), 89-96.
- Tsai, S. P., Coleman, R. D., Moon, S. H., Schneider, K. A. & Millard, C. S. (1993) Strain screening and development for industrial lactic acid fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 39(1), 323-335.
- Tsokounoglou, M., Ayerides, G. & Tritopoulou, E. (2008) The end of cheap oil: Current status and prospects. *Energy Policy*, 36(10), 3797-3806.
- Tsukegi, T., Motoyama, T., Shirai, Y., Nishida, H. & Endo, T. (2007) Racemization behavior of l,l-lactide during heating. *Polymer Degradation and Stability*, 92(4), 552-559.
- Tullo, A. H. (2015) Plasticizer Makers Want A Piece Of The Phthalates Pie. *Chemical & Engineering News*, 93(25), 16-18.
- Tyree, R. W., Clausen, E. C. & Gaddy, J. L. (1990) The fermentative characteristics of *Lactobacillus xylosus* on glucose and xylose. *Biotechnology Letters*, 12(1), 51-56.

Ueno, T., Ozawa, Y., Ishikawa, M., Nakanishi, K. & Kimura, T. (2003) Lactic acid production using two food processing wastes, canned pineapple syrup and grape invertase, as substrate and enzyme. *Biotechnology Letters*, 25(7), 573-577.

Venus, J. (2011) Feedstocks and (Bio)Technologies for Biorefineries, in Zaikov, G. E., Pudél, F. & Szychalski, G. (eds), *Renewable resources and biotechnology for material applications*. Materials science and technologies M4 - Citavi. New York, USA: Nova Science, 299-301.

Vilar, V. J. P., Botelho, C. M. S. & Boavenutra, R. A. R. (2007) Methylene blue adsorption by algal biomass based materials: Biosorbents characterization and process behaviour. *Journal of Hazardous Materials*, 147(1-2), 120-132.

Vishnu, C., Seenayya, G. & Reddy, G. (2002) Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(5), 429-433.

Wang, Y., Cao, W., Luo, J., Qi, B. & Wan, Y. (2019) One step open fermentation for lactic acid production from inedible starchy biomass by thermophilic *Bacillus coagulans* IPE22. *Bioresource Technology*, 272, 398-406.

Wasewar, K. L. (2005) Separation of Lactic Acid: Recent Advances. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 19 (2), 159-172.

Wee, Y.-J., Yun, J.-S., Lee, Y. Y., Zeng, A.-P. & Ryu, H.-W. (2005) Recovery of lactic acid by repeated batch electrodialysis and lactic acid production using electrodialysis wastewater. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(2), 104-108.

Willem Schepers, A., Thibault, J. & Lacroix, C. (2002) *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. multiple factor kinetic analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(2), 176-186.

Woiciechowski, A. L., Soccol, C. R., Ramos, L. P. & Pandey, A. (1999) Experimental design to enhance the production of L-(+)-lactic acid from steam-exploded wood hydrolysate using *Rhizopus oryzae* in a mixed-acid fermentation. *Process Biochemistry*, 34(9), 949-955.

Yáñez, R., Alonso, J. L. & Parajó, J. C. (2004) Production of hemicellulosic sugars and glucose from residual corrugated cardboard. *Process Biochemistry*, 39(11), 1543-1551.

Yoshida, F., Yamane, T. & Nakamoto, K.-I. (1973) Fed-batch hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed. *Biotechnology and Bioengineering*, 15(2), 257-270.

Yoshida, S., Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C. & Kondo, A. (2011) Homo-d-lactic acid production from mixed sugars using xylose-assimilating operon-integrated *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(1), 67-79.

Zhang, Y., Cong, W. & Shi, S. Y. (2011) Repeated fed-batch lactic acid production in a packed bed-stirred fermentor system using a pH feedback feeding method. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(1), 67-73.

Zhou, J., Bi, W. & Row, K. H. (2011) Purification of lactic acid from fermentation broth by spherical anion exchange polymer. *Journal of Applied Polymer Science*, 120(5), 2673-2677.

7 Veröffentlichte wissenschaftliche Fachartikel

7.1 Capillary electrophoresis method for the analysis of organic acids and amino acids in the presence of strongly alternating concentrations of aqueous lactic acid

Autoren:

Hendrik Laube^{1*}, Jana Boden², Roland Schneider¹

Adressen:

¹Department of Bioengineering, Leibniz-Institute for Agricultural Engineering Potsdam-Bornim e.V., Potsdam, Brandenburg, Germany

²ICA Boden-Haumann-Mainka, Engineering society for chemical analysis, Langen, Hessen, Germany

Fachzeitschrift:

Bioprocess and Biosystems Engineering

Bioprocess and Biosystems Engineering, Capillary electrophoresis method for the analysis of organic acids and amino acids in the presence of strongly alternating concentrations of aqueous lactic acid, Volume 40, Issue 7, 2017, pp 981–988, H. Laube, J. Boden, R. Schneider, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017, With permission of Springer

Abstract

During the production of bio-based bulk chemicals, such as lactic acid (LA), organic impurities have to be removed to produce a ready-to-market product. A capillary electrophoresis method for the simultaneous detection of LA and organic impurities in less than 10 min was developed. LA and organic impurities were detected using a direct UV detection method with micellar background electrolyte, which consisted of borate and sodium dodecyl sulfate. We investigated the effects of electrolyte composition and temperature on the speed, sensitivity and robustness of the separation. A few validation parameters, such as linearity, limit of detection and internal and external standards, were evaluated under optimized conditions. The method was applied for the detection of LA and organic impurities, including tyrosine, phenylalanine and pyroglutamic acid, in samples from a continuous LA fermentation process from post-extraction tapioca starch and yeast extract.

1 Introduction

Lactic acid (LA) has a wide application range in various industries. As one of the organic acids that naturally occur in human metabolism, LA has full biological compatibility with humans. Therefore, LA has been used in the food and pharmaceutical industries as a natural preservative, acidulate and flavor enhancer. LA is also used for tanning leather and as a mild bleaching agent in the textile industry. It has been identified by the U.S. Department of Energy as one of the top value-added chemicals and has attracted significant attention due to its ability to polymerize to poly LA[1]. This bio-plastic polymer can be further processed into biodegradable polymer products.

The exhaustion of fossil-based resources has driven the development of alternative fuel sources based on biomass. In the past few decades, LA has been successfully produced from renewable resources. Biological production reached industrial levels in 2001 when Nature Works LLC (Blair, NE, USA) started a plant with an estimated 180,000 tons annual production capacity [2]. The production process uses corn as its feedstock to extract starch to convert into dextrose, which is then fermented by LA bacteria (LAB) into LA. As a first generation raw material, corn ensures a constant feedstock quality at a comparably high price and therefore, may not be a commercially-sustainable process. Due to these economic and environmental considerations, feedstock diversification will require a shift from first to second generation raw materials. However, typically complex compositions of second generation raw materials present new challenges for the production of pure LA.

Potential contaminants and impurities are present in many raw materials and can also originate from LAB metabolism and the LA production process. Impurities and contaminants can induce unwanted chemical reactions during LA polymerization or alter the colorization of LA. Therefore, their presence reduces LA quality and potential market prices. Hence, the contaminants and impurities need to be removed to prepare a ready-to-market product [3; 4].

To monitor the production process of LA, validate LA quality and evaluate the separation efficiency of the unit operations, a rapid, robust and reliable analytical method is necessary. Ideally, this method would simultaneously detect LA and impurities in the process samples.

In the past two decades, capillary electrophoresis has emerged as a powerful separation tool. The first references on using capillary zone electrophoresis (CZE) for the separation of LA and other organic acids were made in 1991 and 1992.

Since then, electrophoresis has been used a number of applications, for example, Romano *et al.* [5] described the investigation of dental plaque and human saliva, Kenney *et al.* analyzed food samples [6], and Jones and Jandik presented optimized methods for separating organic acids and other analytes in several matrices [7]. Since these early investigations, hundreds of CE separations have been described for the determination of low molecular mass organic acids in various matrices using different detection modes. Klampfl *et al.* [8] presented a comprehensive survey on the use of CZE for the determination of organic acids in food and beverage samples. A review article by Galli *et al.* [9] presented an overview of developed CE methods for short-chain organic acids and inorganic anions in a wide variety of matrices. Furthermore, the determination of LA and related organic acids by CZE has been applied for foods and beverages and even cigarette smoke [10], rain drops [11], supercritical water [12] and oligomeric distributions in dermatological formulations [13].

In most of these studies, LA was detected using indirect UV methods with electrolyte systems comprising chromophores and electroosmotic flow (EOF) modifiers for fast co-electroosmotic separations.

However, other organic acids can also be detected via direct measurements at 200 nm (or lower) by measuring the absorption of carboxylate groups. The composition of the background electrolyte is then dictated by the UV transparency at the selected wavelength [8; 9]. For example, the quantity of lactic acid in a fermentation broth of sorghum was determined using phosphate buffer for direct detection, an EOF modifier and high amounts of calcium [14].

Recent findings in the field of non-protein amino acids analyses in food by CE and micro-chip CE have been reviewed by Perez-Miguel *et al.* [15]. The analysis of amino acids in food and agricultural application by CE from 2013 to 2015 was reviewed by Poinot *et al.* [16]. Acunha *et al.* reviewed CE applications in food analyses and Foodomics for a large variety of food-related molecules with different chemical properties [17].

No known studies have investigated the use of CE on industrial samples consisting primarily of aqueous LA (60,000–650,000 ppm) and trace amounts (0.1–1 ppm) of impurities.

The objective of this work was to analyze LA, and possible impurities in form of 10 selected organic acids (pyruvic acid, acetic acid, glutamic acid, glycolic acid, glyoxalic acid, methane sulfonic acid, nicotinamide, phosphoric acid, propionic acid, sorbic acid), and 15 selected aromatic amino acids (alanine, arginine, asparagine, cysteine, cystine, glycine, histidine, lysine, methionine, phenylalanine, taurine, tryptamine, tryptophan, tyrosine, valine) in the fermentation broth of different renewable resources. These were especially challenging samples due to low pH values, high levels of LA and low levels of impurities.

The herein developed and validated method was applied to samples taken from a downstream LA purification process. The process incorporated 11 separation units, ranging from filtration, adsorption and ion exchange to electrodialysis and distillation, and 15 different second-generation renewable feedstocks [18].

2 Materials and methods

2.1 Materials

SDS was purchased from Merck (Darmstadt, Germany), and sodium tetraborate decahydrate was obtained from Roth (Karlsruhe, Germany) at the highest available purity. An electrolyte solution with 50 mM borate and 100 mM SDS was obtained from Agilent Technologies Deutschland GmbH (Waldbronn, Germany). As a reference standard for the determination of LA concentration, lithium-L-lactate salt from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany) was used. It is important to consider the use of an acid or a salt as a reference. At higher concentrations, LA can form covalent bonds, which lead to the formation of dimers and higher oligomers. Those can generate additional peaks in the electropherogram, which can complicate the quantification [12, 14]. All other chemicals were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2 CE Instrumentation and procedures

All experiments were performed with the Agilent 7100 Capillary Electrophoresis System with ChemStation Software (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany). Detection was performed with direct UV monitoring using a photodiode array detector at 200 nm wavelength with a bandwidth of 2 nm. For peak identification, the spectral data of each peak was collected. Uncoated fused-silica capillaries of 50 μm ID with an enhanced detection window ("bubble cell") and lengths of 56 cm/64.5 cm (effective length/total length) were employed (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany). New capillaries were preconditioned using 0.1 N NaOH for 3 min, rinsed with ultrapure water for 1 min and conditioned with buffer for 5 min. Between analyses, the capillaries were rinsed with an electrolyte solution at 1 bar for 3 min. Afterwards, 5 blank runs were processed to establish constant migration times. The samples were hydrodynamically injected for 10 s at 50 mbar, followed by an injection of electrolyte for 5 s at the same pressure.

A complete sampling sequence consisted of sequential runs of 1 blank, 1 standard solution, between 1 and up to 10 samples, 1 standard solution and finally, 1 blank. For the calculation of LA concentration, the average of the peak areas of the first and the second runs of the standard solution was used.

2.3 Estimation of the sample purity

The amounts of impurities were determined using the area-percent (area%) method for the lactate peak. The area% method was not the appropriate quantification method due to the different UV properties of each peaks. However, when combined with the LA concentration, the method provides a reasonable estimation of the sample purity. In selected samples, the identified amino acids and PGA were also quantified using external standard solutions.

2.4 Sample preparation

LA was produced as described in detail by Laube *et al.* [4]. Briefly, the LA fermentation broth was prepared from a raw feed solution by mixing deionized water with tapioca starch and yeast extract. The temperature was set to 80 °C and the pH to 6.0 using NaOH. A hydrolysate was prepared by mixing the raw feed solution with α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens*, (Novozymes, Bagsværd, Denmark) and CaCl_2 for 20 min. The hydrolysate was thermally sterilized at 121 °C and 2 bar for 20 min. Afterwards, coarse particles were removed by microfiltration. After sterilization, the fermentation was carried out in continuous mode, and cell retention was established by pumping the fermentation broth over hollow fiber membranes. Finally, the fermentation broth was divided into 60-liter aliquots and frozen until use.

3 Results and Discussion

A method was developed to quantify the amount of LA and to detect a maximum amount of organic impurity peaks with overall good peak resolution. The use of indirect detection mode has been more commonly used, especially for the more sensitive detection of aliphatic organic acids. However, to detect other organic compounds with aromatic structures, direct UV detection mode was used. Therefore, a low wavelength at 200 nm, a UV-transparent borate electrolyte, and micellar electrolytes were tested. The EOF was not reversed, and therefore, a counter-electroosmotic separation was performed. This method was demonstrated for determining the purification performance of different filtration and dialysis steps.

3.1 Optimization of the electrolyte system

The application of the direct detection mode required the use of an electrolyte system with weak ultraviolet-absorbing activity. We investigated different borate electrolytes at pH 9.1 and at a low detection wavelength of 200 nm. In such a system without a modified EOF, the migration was superimposed by the EOF, leading to an inversion in the normal elution mode. Hence, early analytes had low ion mobility and analytes after the LA peak had higher ion mobility. To determine the optimal electrolyte composition, the borate and SDS concentrations were varied.

For the optimization experiments, an LA sample was chosen after the cleaning procedures of a fermentation broth. This sample contained a high amount of LA and some organic impurities.

The tested borate-SDS-electrolyte compositions are summarized in Table 1.

Table 1 Optimization of the electrolyte system and temperature. Abbreviations: peak width (W), migration time (t), sodium dodecyl sulfate (SDS).

no	electrolyte system	T [°C]	W [min]	t [min]
1	50 mM borate	30	0.26	9.9
2	25 mM borate	30	0.16	6.8
3	50 mM borate, 100 mM SDS	30	0.31	11.2
4	25 mM borate, 25 mM SDS	30	0.17	6.8
5	25 mM borate, 50 mM SDS	30	0.19	7.5
6	25 mM borate, 85 mM SDS	30	0.23	8.2
7	25 mM borate, 50 mM SDS	20	0.23	9.6
8	25 mM borate, 50 mM SDS	25	0.21	8.5
9	25 mM borate, 50 mM SDS	35	0.18	6.8
10	25 mM borate, 50 mM SDS	40	0.17	6.3

In the electropherograms shown in Figure S1 (see Supporting Information Figure S1), the EOFs at a high pH were strong enough for the simultaneous detection of LA and impurities.

Supporting Information Figure S1 Method development - Conditions: Electrolyte, see Figure, Capillary: fused silica, 50 μ m ID, enhanced detection cell (“bubble cell”), 56 cm, total 64.5 cm; Voltage: +30 kV, Temperature: 25°C; Injection: 10 s at 50 mbar, followed by electrolyte injection: 5 s at 50 mbar. Detection wavelength: 200 nm.

Furthermore, the LA peak was a “standalone peak”, i.e., no co-migration with impurities was detected. The best resolution for the organic impurities was obtained using a micellar SDS-electrolyte. Regarding the peak width and migration time for LA, the optimal electrolyte compositions used 25 mM borate and 50

mM SDS. With this composition, a good separation of two primary impurity peaks and a narrow LA peak were realized.

For a final optimization, the influence of temperatures between 20 °C and 40 °C on peak width, resolution and analysis time was investigated. In Table 1, the results according to peak width are summarized in lines 6 to 10. The electropherograms are given in Figure S1 (see Supporting Information Figure S1). Due to the decreasing viscosity at higher temperatures, the EOF became stronger, and thus, the analysis time was reduced, i.e., the migration time of the LA peak decreased from 9.6 min to 6.3 min. Additionally, the temperature also influenced the selectivity for impurities as illustrated in the electropherograms taken from the temperature optimization, Figure S2 (see Supporting Information Figure S2). At 35 °C, the resolution of the two impurity peaks was high enough to reveal a third minor peak between them. Additionally, the analysis time was reduced to 8 min. Hence, a temperature of 35 °C was selected for the validation experiments and the analyses of the real samples.

Supporting Information Figure S2 Influence of the temperature - Conditions: Electrolyte, 25 mM borate, 50 mM SDS, Capillary: fused silica, 50 μ m ID, enhanced detection cell (“bubble cell”), 56 cm, total 64.5 cm; Voltage: +30 kV, Temperature: see Figures; Injection: 10 s at 50 mbar, followed by electrolyte injection: 5 s at 50 mbar. Detection wavelength: 200 nm.

3.2 Peak identification

The metabolomics of LA production in *Bacillus coagulans* have been investigated in detail by process modeling [19]. The presence of a variety of amino acids

and organic acids was predicted. Based on this investigation, a few selected organic acids and amino acids were assumed to comprise the unknown impurities found in the sample solutions. Using the standard addition method and by comparing the UV spectra of the unknown peaks with the UV spectra of selected substances, peak identification was successful for most of the impurities.

The migration time of LA, the ten organic acids and the 15 amino acids, as well as the relative migration time as the quotient of LA migration time by the respective substance migration time, can be found in Table 2 and Table 3, respectively.

Table 2 Migration time of LA, migration time of the selected organic acid, and the relative migration.

No	organic acids	Migration time		
		Relative [-]	Substance [min.]	LA [min.]
1	pyruvic acid	> 1	Peak deformation	-
2	acetic acid	> 1	Peak deformation	-
3	glutamic acid	0.932	6.297	6.757
4	glycolic acid	> 1	Peak deformation	-
5	glyoxalic acid	1.142	7.633	6.686
6	methane sulfonic acid	0.935	6.432	6.879
7	nicotinamide	0.493	3.373	6.836
8	phosphoric acid	1.0	Co migration	-
9	propionic acid	1.056	6.998	6.625
10	sorbic acid	0.863	6.030	6.989

Table 3 Migration time of LA, migration time of the selected amino acids, and the relative migration time.

No	amino acids	Migration time		
		Relative [-]	Substance [min.]	LA [min.]
1	alanine	< 1	Peak deformation	-
2	arginine	0.628	4.296	6.838
3	asparagine	0.978	6.754	6.905
4	cysteine	0.868	5.929	6.832
5	cystine	0.947	6.437	6.798
6	glycine	0.593	4.061	6.843
7	histidine	0.616	4.211	6.831
8	lysine	0.487	3.369	6.914
9	methionine	0.634	4.387	6.925
10	phenylalanine	0.641	4.472	6.972
11	taurine	0.761	5.338	7.012
12	tryptamine	1.443	9.972	6.909
13	tryptophan	0.626	4.342	6.934
14	tyrosine	0.624	4.305	6.902
15	valine	0.567	3.908	6.897

The electropherograms are given in Figure 1, Figure S5, and Figure S6 (see Supporting Information Figure S5 and Supporting Information Figure S6).

Figure 1 The electropherograms taken from the impurity peak identification by addition of amino acids

Supporting Information Figure S5 Electropherograms taken from the impurity peak identification by addition of organic acids

Supporting Information Figure S6 Electropherograms taken from the impurity peak identification by addition of amino acids

The two major peaks were tyrosine (Tyr) and phenylalanine (Phe), and the smaller peaks were glycine (Gly), tryptophan (Trp) and taurine (see Figure 2). A major unknown component before the LA peak was observed in a few samples. This component was successfully identified as pyroglutamic acid (PGA) using coupled CE/MS [18]. The presence of PGA was verified using standard addition tests. The method proved to be effective enough to detect 0.3 ppm of PGA in the presence of 718,400 ppm of LA.

Figure 2 Electropherograms of the blank, the standard solution and the sample solutions

Conditions: Electrolyte, 25 mM borate, 50 mM SDS at pH 9.1; Capillary: fused silica, 50 μ m ID, enhanced detection cell ("bubble cell"), 56 cm, total 64.5 cm; Voltage: +30 kV, Temperature: 35 $^{\circ}$ C; Injection: 10 s at 50 mbar, followed by electrolyte injection: 5 s at 50 mbar. Detection wavelength: 200 nm.

3.2 Method validation

Before using this method in routine analyses, various parameters, i.e., linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), relative standard deviation (RSD) and quantification type, were studied to validate the method.

The linearity of the optimized method was investigated using nine standard solutions of LA ranging from 20 ppm to 20,000 ppm and prepared from a stock solution of 20,000 ppm. Each concentration was measured in triplicate, and averages of the LA peak area were calculated. A calibration plot was linear for the whole concentration range (i.e., with a high R^2 correlation; Figure S3, see Supporting Information Figure S3) and had a slope $m = 0.50068$, intercept $n = -0.03468$ and correlation coefficient $R^2 = 0.99986$.

Peak areas:

concentration [g/l]:	0,02	0,2	1	2	3	5
1. Injection	9,41980E-03	1,02688E-01	4,89165E-01	1,00716E+00	1,45670E+00	2,42742E+00
2. Injection	9,47295E-03	1,05289E-01	4,71767E-01	9,80117E-01	1,45251E+00	2,48533E+00
3. Injection	1,04742E-02	1,00555E-01	4,64153E-01	9,75411E-01	1,45130E+00	2,40646E+00
average peak area	0,0098	0,1028	0,4750	0,9876	1,4535	2,4397
deviation:	6,07 %	2,31 %	2,70 %	1,73 %	0,19 %	1,67 %

	7,5	10	15	20
	3,68546E+00	4,90259E+00	7,49237E+00	1,00115E+01
	3,66871E+00	4,84441E+00	7,48092E+00	9,98865E+00
	3,63914E+00	4,97602E+00	7,47540E+00	1,00983E+01
	3,6644	4,9077	7,4829	10,0328
	0,64 %	1,34 %	0,12 %	0,58 %

Linearity:

Supporting Information Figure S3 Linearity of LA - Conditions: Electrolyte, 25 mM borate, 50 mM SDS, Capillary: fused silica, 50 μ m ID, enhanced detection cell ("bubble cell"), 56 cm, total 64.5 cm; Voltage: +30 kV, Temperature: 35°C; Injection: 10 s at 50 mbar, followed by electrolyte injection: 5 s at 50 mbar. Detection wavelength: 200 nm.

However, as shown in Figure S4 (see Supporting Information Figure S4), the shape of the LA peak indicated peak broadening for samples with high LA

concentrations. This could result in the LA peak overlapping with neighboring peaks and thus prevent accurate quantification. Hence, samples should be diluted to a 10,000 ppm maximum concentration to prevent co-migration.

Supporting Information Figure S4 Linearity of LA – electropherograms - Conditions: Electrolyte, 25 mM borate, 50 mM SDS, Capillary: fused silica, 50 μm ID, enhanced detection cell (“bubble cell”), 56 cm, total 64.5 cm; Voltage: +30 kV, Temperature: 35°C; Injection: 10 s at 50 mbar, followed by electrolyte injection: 5 s at 50 mbar. Detection wavelength: 200 nm.

The LOD and LOQ of the analytical technique were determined based on signal-to-noise (S/N) ratios according to quality guidelines reported in [20]. An LOD of 17 ppm and an LOQ of 57 ppm were sufficient for the determination of real samples because LA was the matrix peak in all samples of interest. Thus, the working range for the determination of LA can be defined from the LOQ of 60 ppm to 10,000 ppm.

The injection precision for the peak area (expressed in terms of relative standard deviation, RSD) for six measurements of a sample solution and a 5,000 ppm standard solution was found to be beyond 1%. For the sample solution, an RSD of 0.51% was calculated; for the standard solution, the RSD was 0.45%.

Quantification complications could occur, for example, if the sample has a very different viscosity than the standard solution. The injected volumes of the sample and the standard would be different, and thus, an unreliable measurement would be reported. These types of failures can be prevented using the standard addition method, which ensures that the sample and standard solutions have the same viscosity and matrix.

To investigate the influence of the matrix on the quantification accuracy, two different methods of standardization, i.e., an external standard method and the standard addition method, were tested and compared. For the external standard method, a standard solution with 5,000 ppm LA was prepared. For the standard addition method, a final concentration of 2,500 ppm LA was added to the 1:20 diluted sample solution. The 1:20 diluted sample solution, the external standard solution and the standard addition solution were injected, and the LA content in the sample was calculated. Concentrations of 78,100 ppm and 79,700 ppm LA were obtained when using the external standard method and the standard addition method, respectively. Both methods generated similar results. The sample dilution step of the standard addition method may have had an annihilating effect on the viscosity difference. Due to the similar results of both methods, for routine tests, the simpler but time-consuming external standard method can be used.

Overall, the developed method proved to be suitable for the task of impurity monitoring. The method was also validated for PGA, the results can be found in Laube *et al.* [18].

3.3 Method application

In an additional experiment, the purification performances of six different nanofiltration membrane modules were tested. To evaluate the effectiveness of a purification process, it is necessary to consider the LA concentration and the amount of impurities. In general, filtration is a rough purification step that removes macromolecules and other large particles. The membranes were used for the filtration of the LA samples. The LA concentrations and corresponding peak area purities in the permeate streams were determined, and the results are shown in Figure 3.

Figure 3 Feed and permeate quality by means of LA concentration (circles) and peak area purity (squares) of six different nanofiltration membranes with.

The electropherograms are given in Figure S7 (see Supporting Information Figure S7).

Supporting Information Figure S7 Electropherograms taken from the nano-filtration of the process sample material

The two-way valve on the feed line was adjusted to the point, where the flow meter, for the membrane module indicated a cross-flow velocity of 300 L/h at 20 °C

and the feed pressure was set to 25 bar. The following membranes were investigated, from General Electric (GE Power & Water) the model DK73 (DK2540F1073) [21] and DL73 (DL2540F1073) [22], from Microdyn-Nadir the model NP30 (Nadir NP030P) [23], from Dow Chemical Company (Dow Water & Process Solutions) the TW30 (FILMTEC TW30-2549) [24], the SW30 (FILMTEC SW 30-2540) [25], and the NF45 (FILMTEC NF45-2540) [26]. All membranes were made of polyamide thin film composite material.

The selectivity of a membrane toward LA can be calculated from the LA concentration in the permeate stream and the LA peak area purity. All membranes showed a selectivity towards the impurities, which is not favorable. However, four of six membranes allowed for an enrichment of the LA above the feed concentration, ranging from 67,800 ppm LA (NP30) to 60,100 ppm of LA (NF45). The overproportional enrichment of impurities in the permeate of NP30, with a purity of 58,5% and the strong holdback of LA in the permeate of SW30 with a LA concentration of 4,400 ppm, disqualified these membranes.

Overall, a 50% increase in product concentration with a loss of 5% in purity, the NF45 was found the best nanofiltration membrane.

4 Concluding remarks

A method based on a borate-SDS electrolyte and direct UV detection was optimized for the rapid, robust and accurate analyses of LA concentrations in fermentatively-produced lactic acid. The micellar-based mechanism simultaneously detected LA and several organic impurities, such as tyrosine, phenylalanine, tryptophan and pyroglutamic acid. The presented analytical method was validated and proved to be a rapid and reliable method for downstream process control. This method will enable the rapid benchmarking of different cleaning procedures and improve methods for the production of pure LA from different fermentation solutions. In our related work this method was successfully applied to downstream processes for a broad variety of renewable feedstocks.

Acknowledgement

The authors would like to thank the Department of Bioengineering at the Leibniz-Institute for Agricultural Engineering (ATB) for the provision of sample material from the SynRg research project and the Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR)/Bundesministerium für Landwirtschaft, Ernährung und Verbraucherschutz (BMELV) for funding the SynRg (22023008) research project and the American Journal Experts (AJE) for language editing and manuscript revision. This research is supported by funds from the Bioenergy 2020 program allocated from the German Federal Ministry of Research and Education to Project Management Jülich (PtJ). The analytical part was supported by ICA, a company for chemical analysis located in Langen (Germany).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contributions

HL designed and coordinated the study, performed the data analysis and drafted the manuscript. JB performed the analysis on the CE-UV/Vis system and helped draft the manuscript. RS carried out the fermentation procedure. All authors read and approved the final manuscript.

References

- [1] Werpy, T., and G. Petersen, Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume 1: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas.
- [2] Vink, E. T. H., S. Davies, and J. J. Kolstad (2010) ORIGINAL RESEARCH: The eco-profile for current Ingeo® polylactide production. *Industrial Biotechnology*. 6: 212–224.
- [3] Norwood, D. L., F. Qiu, and J. O. Mullis (2006) Trace Level Impurity Analysis. pp. 3797–3813. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition*. Informa Healthcare, City.
- [4] Laube, H., and M. T. Reza (2016) Application of biosorbents for ion removal from sodium lactate fermentation broth. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 4: 10-19.
- [5] Romano, J. J., P; Jones, W.R; Jackson, P.E. (1991) Optimization of inorganic capillary electrophoresis for the analysis of anionic solutes in real samples. *J. Chromatogr.* 546: 10.
- [6] Kenney, B. F. (1991) Determination of organic acids in food samples by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 546: 423-430.
- [7] Jones, W. R., and P. Jandik (1992) Various approaches to analysis of difficult sample matrices of anions using capillary ion electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 608: 385-393.
- [8] Klampfl, C. W., W. Buchberger, and P. R. Haddad (2000) Determination of organic acids in food samples by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 881: 357-364.
- [9] Galli, V., A. García, L. Saavedra, and C. Barbas (2003) Capillary electrophoresis for short-chain organic acids and inorganic anions in different samples. *Electrophoresis*. 24: 1951-1981.
- [10] Lagoutte, D., G. Lombard, S. Nisseron, M. P. Papet, and Y. Saint-Jalm (1994) Determination of organic acids in cigarette smoke by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 684: 251-257.
- [11] Mainka, A., P. Ebert, M. Kibler, T. Prokop, B. Tenberken, and K. Bächmann (1997) Development of new methods for the analysis of carboxylic acids and carbonyl compounds in size classified raindrops by CE for application in modelling atmospheric processes. *Chromatographia*. 45: 158-162.
- [12] Volgger, D., A. J. Zemmann, G. K. Bonn, and M. J. Antal (1997) High-speed separation of carboxylic acids by co-electroosmotic capillary electrophoresis with direct and indirect UV detection. *Journal of Chromatography A*. 758: 263-276.
- [13] Sharman, D. C. (1997) Determination of lactic acid and poly(lactic acid)s in a dermatological formulation by capillary electrophoresis. *Analyst*. 122: 709-713.
- [14] Schober, T. J., S. R. Bean, and D. Wang (2009) Capillary Electrophoresis as a Tool for Evaluating Lactic Acid Production from Sorghum. *Cereal Chemistry*. 86: 117-121.
- [15] Pérez-Míguez, R., M. L. Marina, and M. Castro-Puyana (2016) Capillary electrophoresis determination of non-protein amino acids as quality markers in foods. *Journal of Chromatography A*. 1428: 97-114.
- [16] Poinot, V., V. Ong-Meang, P. Gavard, and F. Couderc (2016) Recent advances in amino acid analysis by capillary electromigration methods, 2013-2015. *Electrophoresis*. 37: 142-161.

- [17] Acunha, T., C. Ibáñez, V. García-Cañas, C. Simó, and A. Cifuentes (2016) Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics. *Electrophoresis*. 37: 111-141.
- [18] Laube, H., F.-M. Matysik, A. Schmidberger, K. Mehlmann, A. Toursel, and J. Boden (2016) CE-UV/VIS and CE-MS for monitoring organic impurities during the downstream processing of fermentative-produced lactic acid from second-generation renewable feedstocks. *Journal of Biological Engineering*. 10: 1-11.
- [19] Trenkamp, S. (2012) Entwicklung einer sensorbasierten Systemlösung für das Online-Monitoring von Bioprozessen in Fermenter.: Untersuchungen zur 3D-Sensorpositionierung und Entwicklung eines Prozessmodells als Basis für die Prozessoptimierung. In: Editor (ed.)^(eds.)|. *Book Title*|. Publisher|, City|.
- [20] EMEA, ICH Topic Q 2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.
- [21] Electric, G. (2014) DK Series. In: Editor (ed.)^(eds.)|. *Book Title*|. Publisher|, City|.
- [22] Electric, G. (2014) DL Series. In: Editor (ed.)^(eds.)|. *Book Title*|. Publisher|, City|.
- [23] Microdyn-Nadir (2014) Productcatalog. In: Editor (ed.)^(eds.)|. *Book Title*|. Publisher|, City|.
- [24] Dow, C. (2014) FILMTEC™ TW30-2540. In: Editor (ed.)^(eds.)|. *Book Title*|. Publisher|, City|.
- [25] Dow, C. (2014) FILMTEC™ SW30-2540. In: Editor (ed.)^(eds.)|. *Book Title*|. Publisher|, City|.
- [26] Dow, C. (2014) FILMTEC™ NF-4040 In: Editor (ed.)^(eds.)|. *Book Title*|. Publisher|, City|.

7.2 CE-UV/VIS and CE-MS for monitoring organic impurities during the downstream processing of fermentative-produced lactic acid from second-generation renewable feedstocks

Autoren:

Hendrik Laube¹, Frank-Michael Matysik², Andreas Schmidberger², Kerstin Mehlmann¹, Andreas Toursel¹, Jana Boden³

zuzuordnende Forschungseinrichtungen:

¹Department of Bioengineering, Leibniz-Institute for Agricultural Engineering (ATB), Max-Eyth-Allee 100, Potsdam 14469, Germany

²Institute of Analytical Chemistry, Chemo- and Biosensors, University of Regensburg, Regensburg, Germany

³ICA Boden-Haumann-Mainka, Engineering society for chemical analysis, Langen, Hessen, Germany

wissenschaftliche Fachzeitschrift:

Journal of Biological Engineering

veröffentlicht unter [CC-BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Abstract

During the production of bio-based bulk chemicals, such as lactic acid (LA), organic impurities have to be removed to produce a ready-to-market product. A capillary electrophoresis method for the simultaneous detection of LA and organic impurities in less than 10 min was developed. LA and organic impurities were detected using a direct UV detection method with micellar background electrolyte, which consisted of borate and sodium dodecyl sulfate. We investigated the effects of electrolyte composition and temperature on the speed, sensitivity and robustness of the separation. A few validation parameters, such as linearity, limit of detection and internal and external standards, were evaluated under optimized conditions. The method was applied for the detection of LA and organic impurities, including tyrosine, phenylalanine and pyroglutamic acid, in samples from a continuous LA fermentation process from post-extraction tapioca starch and yeast extract.

1 Introduction

Lactic acid (LA) has a wide application range in various industries. As one of the organic acids that naturally occur in human metabolism, LA has full biological compatibility with humans. Therefore, LA has been used in the food and pharmaceutical industries as a natural preservative, acidulate and flavor enhancer. LA is also used for tanning leather and as a mild bleaching agent in the textile industry. It has been identified by the U.S. Department of Energy as one of the top value-added chemicals and has attracted significant attention due to its ability to polymerize to poly LA[1]. This bio-plastic polymer can be further processed into biodegradable polymer products.

The exhaustion of fossil-based resources has driven the development of alternative fuel sources based on biomass. In the past few decades, LA has been successfully produced from renewable resources. Biological production reached industrial levels in 2001 when Nature Works LLC (Blair, NE, USA) started a plant with an estimated 180,000 tons annual production capacity [2]. The production process uses corn as its feedstock to extract starch to convert into dextrose, which is then fermented by LA bacteria (LAB) into LA. As a first generation raw material, corn ensures a constant feedstock quality at a comparably high price and therefore, may not be a commercially-sustainable process. Due to these economic and environmental considerations, feedstock diversification will require a shift from first to second generation raw materials. However, typically complex compositions of second generation raw materials present new challenges for the production of pure LA.

Potential contaminants and impurities are present in many raw materials and can also originate from LAB metabolism and the LA production process. Impurities and contaminants can induce unwanted chemical reactions during LA polymerization or alter the colorization of LA. Therefore, their presence reduces LA quality and potential market prices. Hence, the contaminants and impurities need to be removed to prepare a ready-to-market product [3; 4].

To monitor the production process of LA, validate LA quality and evaluate the separation efficiency of the unit operations, a rapid, robust and reliable analytical method is necessary. Ideally, this method would simultaneously detect LA and impurities in the process samples.

In the past two decades, capillary electrophoresis has emerged as a powerful separation tool. The first references on using capillary zone electrophoresis (CZE) for the separation of LA and other organic acids were made in 1991 and 1992.

Since then, electrophoresis has been used a number of applications, for example, Romano *et al.* [5] described the investigation of dental plaque and human saliva, Kenney *et al.* analyzed food samples [6], and Jones and Jandik presented optimized methods for separating organic acids and other analytes in several matrices [7]. Since these early investigations, hundreds of CE separations have been described for the determination of low molecular mass organic acids in various matrices using different detection modes. Klampfl *et al.* [8] presented a comprehensive survey on the use of CZE for the determination of organic acids in food and beverage samples. A review article by Galli *et al.* [9] presented an overview of developed CE methods for short-chain organic acids and inorganic anions in a wide variety of matrices. Furthermore, the determination of LA and related organic acids by CZE has been applied for foods and beverages and even cigarette smoke [10], rain drops [11], supercritical water [12] and oligomeric distributions in dermatological formulations [13].

In most of these studies, LA was detected using indirect UV methods with electrolyte systems comprising chromophores and electroosmotic flow (EOF) modifiers for fast co-electroosmotic separations.

However, other organic acids can also be detected via direct measurements at 200 nm (or lower) by measuring the absorption of carboxylate groups. The composition of the background electrolyte is then dictated by the UV transparency at the selected wavelength [8; 9]. For example, the quantity of lactic acid in a fermentation broth of sorghum was determined using phosphate buffer for direct detection, an EOF modifier and high amounts of calcium [14].

Recent findings in the field of non-protein amino acids analyses in food by CE and micro-chip CE have been reviewed by Perez-Miguel *et al.* [15]. The analysis of amino acids in food and agricultural application by CE from 2013 to 2015 was reviewed by Poinot *et al.* [16]. Acunha *et al.* reviewed CE applications in food analyses and Foodomics for a large variety of food-related molecules with different chemical properties [17].

No known studies have investigated the use of CE on industrial samples consisting primarily of aqueous LA (60,000–650,000 ppm) and trace amounts (0.1–1 ppm) of impurities.

The objective of this work was to analyze LA, and possible impurities in form of 10 selected organic acids (pyruvic acid, acetic acid, glutamic acid, glycolic acid, glyoxalic acid, methane sulfonic acid, nicotinamide, phosphoric acid, propionic acid, sorbic acid), and 15 selected aromatic amino acids (alanine, arginine, asparagine, cysteine, cystine, glycine, histidine, lysine, methionine, phenylalanine, taurine, tryptamine, tryptophan, tyrosine, valine) in the fermentation broth of different renewable resources. These were especially challenging samples due to low pH values, high levels of LA and low levels of impurities.

The herein developed and validated method was applied to samples taken from a downstream LA purification process. The process incorporated 11 separation units, ranging from filtration, adsorption and ion exchange to electrodialysis and distillation, and 15 different second-generation renewable feedstocks [18].

2 Materials and methods

2.1 Materials

SDS was purchased from Merck (Darmstadt, Germany), and sodium tetraborate decahydrate was obtained from Roth (Karlsruhe, Germany) at the highest available purity. An electrolyte solution with 50 mM borate and 100 mM SDS was obtained from Agilent Technologies Deutschland GmbH (Waldbronn, Germany). As a reference standard for the determination of LA concentration, lithium-L-lactate salt from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany) was used. It is important to consider the use of an acid or a salt as a reference. At higher concentrations, LA can form covalent bonds, which lead to the formation of dimers and higher oligomers. Those can generate additional peaks in the electropherogram, which can complicate the quantification [12, 14]. All other chemicals were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2 CE Instrumentation and procedures

All experiments were performed with the Agilent 7100 Capillary Electrophoresis System with ChemStation Software (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany). Detection was performed with direct UV monitoring using a photodiode array detector at 200 nm wavelength with a bandwidth of 2 nm. For peak identification, the spectral data of each peak was collected. Uncoated fused-silica capillaries of 50 μm ID with an enhanced detection window ("bubble cell") and lengths of 56 cm/64.5 cm (effective length/total length) were employed (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany). New capillaries were preconditioned using 0.1 N NaOH for 3 min, rinsed with ultrapure water for 1 min and conditioned with buffer for 5 min. Between analyses, the capillaries were rinsed with an electrolyte solution at 1 bar for 3 min. Afterwards, 5 blank runs were processed to establish constant migration times. The samples were hydrodynamically injected for 10 s at 50 mbar, followed by an injection of electrolyte for 5 s at the same pressure.

A complete sampling sequence consisted of sequential runs of 1 blank, 1 standard solution, between 1 and up to 10 samples, 1 standard solution and finally, 1 blank. For the calculation of LA concentration, the average of the peak areas of the first and the second runs of the standard solution was used.

2.3 Estimation of the sample purity

The amounts of impurities were determined using the area-percent (area%) method for the lactate peak. The area% method was not the appropriate quantification method due to the different UV properties of each peaks. However, when combined with the LA concentration, the method provides a reasonable estimation of the sample purity. In selected samples, the identified amino acids and PGA were also quantified using external standard solutions.

2.4 Sample preparation

LA was produced as described in detail by Laube *et al.* [4]. Briefly, the LA fermentation broth was prepared from a raw feed solution by mixing deionized water with tapioca starch and yeast extract. The temperature was set to 80 °C and the pH to 6.0 using NaOH. A hydrolysate was prepared by mixing the raw feed solution with α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens*, (Novozymes, Bagsværd, Denmark) and CaCl_2 for 20 min. The hydrolysate was thermally sterilized at 121 °C and 2 bar for 20 min. Afterwards, coarse particles were removed by microfiltration. After sterilization, the fermentation was carried out in continuous mode, and cell retention was established by pumping the fermentation broth over hollow fiber membranes. Finally, the fermentation broth was divided into 60-liter aliquots and frozen until use.

3 Results and Discussion

A method was developed to quantify the amount of LA and to detect a maximum amount of organic impurity peaks with overall good peak resolution. The use of indirect detection mode has been more commonly used, especially for the more sensitive detection of aliphatic organic acids. However, to detect other organic compounds with aromatic structures, direct UV detection mode was used. Therefore, a low wavelength at 200 nm, a UV-transparent borate electrolyte, and micellar electrolytes were tested. The EOF was not reversed, and therefore, a counter-electroosmotic separation was performed. This method was demonstrated for determining the purification performance of different filtration and dialysis steps.

3.1 Optimization of the electrolyte system

The application of the direct detection mode required the use of an electrolyte system with weak ultraviolet-absorbing activity. We investigated different borate electrolytes at pH 9.1 and at a low detection wavelength of 200 nm. In such a system without a modified EOF, the migration was superimposed by the EOF, leading to an inversion in the normal elution mode. Hence, early analytes had low ion mobility and analytes after the LA peak had higher ion mobility. To determine the optimal electrolyte composition, the borate and SDS concentrations were varied.

For the optimization experiments, an LA sample was chosen after the cleaning procedures of a fermentation broth. This sample contained a high amount of LA and some organic impurities.

The tested borate-SDS-electrolyte compositions are summarized in Table 1.

Table 1 Optimization of the electrolyte system and temperature. Abbreviations: peak width (W), migration time (t), sodium dodecyl sulfate (SDS).

no	electrolyte system	T [°C]	W [min]	t [min]
1	50 mM borate	30	0.26	9.9
2	25 mM borate	30	0.16	6.8
3	50 mM borate, 100 mM SDS	30	0.31	11.2
4	25 mM borate, 25 mM SDS	30	0.17	6.8
5	25 mM borate, 50 mM SDS	30	0.19	7.5
6	25 mM borate, 85 mM SDS	30	0.23	8.2
7	25 mM borate, 50 mM SDS	20	0.23	9.6
8	25 mM borate, 50 mM SDS	25	0.21	8.5
9	25 mM borate, 50 mM SDS	35	0.18	6.8
10	25 mM borate, 50 mM SDS	40	0.17	6.3

In the electropherograms shown in Figure S1 (see Supporting Information Figure S1), the EOFs at a high pH were strong enough for the simultaneous detection of LA and impurities.

Supporting Information Figure S1 Method development - Conditions: Electrolyte, see Figure, Capillary: fused silica, 50 μ m ID, enhanced detection cell (“bubble cell”), 56 cm, total 64.5 cm; Voltage: +30 kV, Temperature: 25°C; Injection: 10 s at 50 mbar, followed by electrolyte injection: 5 s at 50 mbar. Detection wavelength: 200 nm.

Furthermore, the LA peak was a “standalone peak”, i.e., no co-migration with impurities was detected. The best resolution for the organic impurities was obtained using a micellar SDS-electrolyte. Regarding the peak width and migration time for LA, the optimal electrolyte compositions used 25 mM borate and 50

mM SDS. With this composition, a good separation of two primary impurity peaks and a narrow LA peak were realized.

For a final optimization, the influence of temperatures between 20 °C and 40 °C on peak width, resolution and analysis time was investigated. In Table 1, the results according to peak width are summarized in lines 6 to 10. The electropherograms are given in Figure S1 (see Supporting Information Figure S1). Due to the decreasing viscosity at higher temperatures, the EOF became stronger, and thus, the analysis time was reduced, i.e., the migration time of the LA peak decreased from 9.6 min to 6.3 min. Additionally, the temperature also influenced the selectivity for impurities as illustrated in the electropherograms taken from the temperature optimization, Figure S2 (see Supporting Information Figure S2). At 35 °C, the resolution of the two impurity peaks was high enough to reveal a third minor peak between them. Additionally, the analysis time was reduced to 8 min. Hence, a temperature of 35 °C was selected for the validation experiments and the analyses of the real samples.

Supporting Information Figure S2 Influence of the temperature - Conditions: Electrolyte, 25 mM borate, 50 mM SDS, Capillary: fused silica, 50 μ m ID, enhanced detection cell ("bubble cell"), 56 cm, total 64.5 cm; Voltage: +30 kV, Temperature: see Figures; Injection: 10 s at 50 mbar, followed by electrolyte injection: 5 s at 50 mbar. Detection wavelength: 200 nm.

3.2 Peak identification

The metabolomics of LA production in *Bacillus coagulans* have been investigated in detail by process modeling [19]. The presence of a variety of amino acids and organic acids was predicted. Based on this investigation, a few selected organic acids and amino acids were assumed to comprise the unknown impurities found in the sample solutions. Using the standard addition method and by comparing the UV spectra of the unknown peaks with the UV spectra of selected substances, peak identification was successful for most of the impurities.

The migration time of LA, the ten organic acids and the 15 amino acids, as well as the relative migration time as the quotient of LA migration time by the respective substance migration time, can be found in Table 2 and Table 3, respectively.

Table 2 Migration time of LA, migration time of the selected organic acid, and the relative migration.

No	organic acids	Migration time		
		Relative [-]	Substance [min.]	LA [min.]
1	pyruvic acid	> 1	Peak deformation	-
2	acetic acid	> 1	Peak deformation	-
3	glutamic acid	0.932	6.297	6.757
4	glycolic acid	> 1	Peak deformation	-
5	glyoxalic acid	1.142	7.633	6.686
6	methane sulfonic acid	0.935	6.432	6.879
7	nicotinamide	0.493	3.373	6.836
8	phosphoric acid	1.0	Co migration	-
9	propionic acid	1.056	6.998	6.625
10	sorbic acid	0.863	6.030	6.989

Table 3 Migration time of LA, migration time of the selected amino acids, and the relative migration time.

No	amino acids	Migration time		
		Relative [-]	Substance [min.]	LA [min.]
1	alanine	< 1	Peak deformation	-
2	arginine	0.628	4.296	6.838
3	asparagine	0.978	6.754	6.905
4	cysteine	0.868	5.929	6.832
5	cystine	0.947	6.437	6.798
6	glycine	0.593	4.061	6.843
7	histidine	0.616	4.211	6.831
8	lysine	0.487	3.369	6.914
9	methionine	0.634	4.387	6.925
10	phenylalanine	0.641	4.472	6.972
11	taurine	0.761	5.338	7.012
12	tryptamine	1.443	9.972	6.909
13	tryptophan	0.626	4.342	6.934
14	tyrosine	0.624	4.305	6.902
15	valine	0.567	3.908	6.897

The electropherograms are given in Figure 1, Figure S5, and Figure S6 (see Supporting Information Figure S5 and Supporting Information Figure S6).

Figure 1 The electropherograms taken from the impurity peak identification by addition of amino acids

Supporting Information Figure S5 Electropherograms taken from the impurity peak identification by addition of organic acids

Supporting Information Figure S6 Electropherograms taken from the impurity peak identification by addition of amino acids

The two major peaks were tyrosine (Tyr) and phenylalanine (Phe), and the smaller peaks were glycine (Gly), tryptophan (Trp) and taurine (see Figure 2). A major unknown component before the LA peak was observed in a few samples. This component was successfully identified as pyroglutamic acid (PGA) using coupled CE/MS [18]. The presence of PGA was verified using standard addition tests. The method proved to be effective enough to detect 0.3 ppm of PGA in the presence of 718,400 ppm of LA.

Figure 2 Electropherograms of the blank, the standard solution and the sample solutions

Conditions: Electrolyte, 25 mM borate, 50 mM SDS at pH 9.1; Capillary: fused silica, 50 μ m ID, enhanced detection cell ("bubble cell"), 56 cm, total 64.5 cm; Voltage: +30 kV, Temperature: 35 $^{\circ}$ C; Injection: 10 s at 50 mbar, followed by electrolyte injection: 5 s at 50 mbar. Detection wavelength: 200 nm.

3.2 Method validation

Before using this method in routine analyses, various parameters, i.e., linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), relative standard deviation (RSD) and quantification type, were studied to validate the method.

The linearity of the optimized method was investigated using nine standard solutions of LA ranging from 20 ppm to 20,000 ppm and prepared from a stock solution of 20,000 ppm. Each concentration was measured in triplicate, and averages of the LA peak area were calculated. A calibration plot was linear for the whole concentration range (i.e., with a high R^2 correlation; Figure S3, see Supporting Information Figure S3) and had a slope $m = 0.50068$, intercept $n = -0.03468$ and correlation coefficient $R^2 = 0.99986$.

Peak areas:

concentration [g/l]:	0,02	0,2	1	2	3	5
1. Injection	9,41980E-03	1,02688E-01	4,89165E-01	1,00716E+00	1,45670E+00	2,42742E+00
2. Injection	9,47295E-03	1,05289E-01	4,71767E-01	9,80117E-01	1,45251E+00	2,48533E+00
3. Injection	1,04742E-02	1,00555E-01	4,64153E-01	9,75411E-01	1,45130E+00	2,40646E+00
average peak area	0,0098	0,1028	0,4750	0,9876	1,4535	2,4397
deviation:	6,07 %	2,31 %	2,70 %	1,73 %	0,19 %	1,67 %

	7,5	10	15	20
	3,68546E+00	4,90259E+00	7,49237E+00	1,00115E+01
	3,66871E+00	4,84441E+00	7,48092E+00	9,98865E+00
	3,63914E+00	4,97602E+00	7,47540E+00	1,00983E+01
	3,6644	4,9077	7,4829	10,0328
	0,64 %	1,34 %	0,12 %	0,58 %

Linearity:

Supporting Information Figure S3 Linearity of LA - Conditions: Electrolyte, 25 mM borate, 50 mM SDS, Capillary: fused silica, 50 μ m ID, enhanced detection cell ("bubble cell"), 56 cm, total 64.5 cm; Voltage: +30 kV, Temperature: 35°C; Injection: 10 s at 50 mbar, followed by electrolyte injection: 5 s at 50 mbar. Detection wavelength: 200 nm.

However, as shown in Figure S4 (see Supporting Information Figure S4), the shape of the LA peak indicated peak broadening for samples with high LA concentrations. This could result in the LA peak overlapping with neighboring peaks and thus prevent accurate quantification. Hence, samples should be diluted to a 10,000 ppm maximum concentration to prevent co-migration.

Supporting Information Figure S4 Linearity of LA – electropherograms - Conditions: Electrolyte, 25 mM borate, 50 mM SDS, Capillary: fused silica, 50 μ m ID, enhanced detection cell (“bubble cell”), 56 cm, total 64.5 cm; Voltage: +30 kV, Temperature: 35°C; Injection: 10 s at 50 mbar, followed by electrolyte injection: 5 s at 50 mbar. Detection wavelength: 200 nm.

The LOD and LOQ of the analytical technique were determined based on signal-to-noise (S/N) ratios according to quality guidelines reported in [20]. An LOD of 17 ppm and an LOQ of 57 ppm were sufficient for the determination of real samples because LA was the matrix peak in all samples of interest. Thus, the

working range for the determination of LA can be defined from the LOQ of 60 ppm to 10,000 ppm.

The injection precision for the peak area (expressed in terms of relative standard deviation, RSD) for six measurements of a sample solution and a 5,000 ppm standard solution was found to be beyond 1%. For the sample solution, an RSD of 0.51% was calculated; for the standard solution, the RSD was 0.45%.

Quantification complications could occur, for example, if the sample has a very different viscosity than the standard solution. The injected volumes of the sample and the standard would be different, and thus, an unreliable measurement would be reported. These types of failures can be prevented using the standard addition method, which ensures that the sample and standard solutions have the same viscosity and matrix.

To investigate the influence of the matrix on the quantification accuracy, two different methods of standardization, i.e., an external standard method and the standard addition method, were tested and compared. For the external standard method, a standard solution with 5,000 ppm LA was prepared. For the standard addition method, a final concentration of 2,500 ppm LA was added to the 1:20 diluted sample solution. The 1:20 diluted sample solution, the external standard solution and the standard addition solution were injected, and the LA content in the sample was calculated. Concentrations of 78,100 ppm and 79,700 ppm LA were obtained when using the external standard method and the standard addition method, respectively. Both methods generated similar results. The sample dilution step of the standard addition method may have had an annihilating effect on the viscosity difference. Due to the similar results of both methods, for routine tests, the simpler but time-consuming external standard method can be used.

Overall, the developed method proved to be suitable for the task of impurity monitoring. The method was also validated for PGA, the results can be found in Laube *et al.* [18].

3.3 Method application

In an additional experiment, the purification performances of six different nanofiltration membrane modules were tested. To evaluate the effectiveness of a purification process, it is necessary to consider the LA concentration and the amount of impurities. In general, filtration is a rough purification step that removes macromolecules and other large particles. The membranes were used for the filtration of the LA samples. The LA concentrations and corresponding peak area purities in the permeate streams were determined, and the results are shown in Figure 3.

Figure 3 Feed and permeate quality by means of LA concentration (circles) and peak area purity (squares) of six different nanofiltration membranes with.

The electropherograms are given in Figure S7 (see Supporting Information Figure S7).

Supporting Information Figure S7 Electropherograms taken from the nano-filtration of the process sample material

The two-way valve on the feed line was adjusted to the point, where the flow meter, for the membrane module indicated a cross-flow velocity of 300 L/h at 20 °C

and the feed pressure was set to 25 bar. The following membranes were investigated, from General Electric (GE Power & Water) the model DK73 (DK2540F1073) [21] and DL73 (DL2540F1073) [22], from Microdyn-Nadir the model NP30 (Nadir NP030P) [23], from Dow Chemical Company (Dow Water & Process Solutions) the TW30 (FILMTEC TW30-2549) [24], the SW30 (FILMTEC SW 30-2540) [25], and the NF45 (FILMTEC NF45-2540) [26]. All membranes were made of polyamide thin film composite material.

The selectivity of a membrane toward LA can be calculated from the LA concentration in the permeate stream and the LA peak area purity. All membranes showed a selectivity towards the impurities, which is not favorable. However, four of six membranes allowed for an enrichment of the LA above the feed concentration, ranging from 67,800 ppm LA (NP30) to 60,100 ppm of LA (NF45). The overproportional enrichment of impurities in the permeate of NP30, with a purity of 58,5% and the strong holdback of LA in the permeate of SW30 with a LA concentration of 4,400 ppm, disqualified these membranes.

Overall, a 50% increase in product concentration with a loss of 5% in purity, the NF45 was found the best nanofiltration membrane.

4 Concluding remarks

A method based on a borate-SDS electrolyte and direct UV detection was optimized for the rapid, robust and accurate analyses of LA concentrations in fermentatively-produced lactic acid. The micellar-based mechanism simultaneously detected LA and several organic impurities, such as tyrosine, phenylalanine, tryptophan and pyroglutamic acid. The presented analytical method was validated and proved to be a rapid and reliable method for downstream process control. This method will enable the rapid benchmarking of different cleaning procedures and improve methods for the production of pure LA from different fermentation solutions. In our related work this method was successfully applied to downstream processes for a broad variety of renewable feedstocks.

Acknowledgement

The authors would like to thank the Department of Bioengineering at the Leibniz-Institute for Agricultural Engineering (ATB) for the provision of sample material from the SynRg research project and the Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR)/Bundesministerium für Landwirtschaft, Ernährung und Verbraucherschutz (BMELV) for funding the SynRg (22023008) research project and the American Journal Experts (AJE) for language editing and manuscript revision. This research is supported by funds from the Bioenergy 2020 program allocated from the German Federal Ministry of Research and Education to Project Management Jülich (PtJ). The analytical part was supported by ICA, a company for chemical analysis located in Langen (Germany).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contributions

HL designed and coordinated the study, performed the data analysis and drafted the manuscript. JB performed the analysis on the CE-UV/Vis system and helped draft the manuscript. RS carried out the fermentation procedure. All authors read and approved the final manuscript.

References

- [1] Werpy, T., and G. Petersen, Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume 1: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas.
- [2] Vink, E. T. H., S. Davies, and J. J. Kolstad (2010) ORIGINAL RESEARCH: The eco-profile for current Ingeo® polylactide production. *Industrial Biotechnology*. 6: 212–224.
- [3] Norwood, D. L., F. Qiu, and J. O. Mullis (2006) Trace Level Impurity Analysis. pp. 3797–3813. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition*. Informa Healthcare, City.
- [4] Laube, H., and M. T. Reza (2016) Application of biosorbents for ion removal from sodium lactate fermentation broth. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 4: 10-19.
- [5] Romano, J. J., P; Jones, W.R; Jackson, P.E. (1991) Optimization of inorganic capillary electrophoresis for the analysis of anionic solutes in real samples. *J. Chromatogr*. 546: 10.
- [6] Kenney, B. F. (1991) Determination of organic acids in food samples by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 546: 423-430.
- [7] Jones, W. R., and P. Jandik (1992) Various approaches to analysis of difficult sample matrices of anions using capillary ion electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 608: 385-393.
- [8] Klampfl, C. W., W. Buchberger, and P. R. Haddad (2000) Determination of organic acids in food samples by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 881: 357-364.
- [9] Galli, V., A. García, L. Saavedra, and C. Barbas (2003) Capillary electrophoresis for short-chain organic acids and inorganic anions in different samples. *Electrophoresis*. 24: 1951-1981.
- [10] Lagoutte, D., G. Lombard, S. Nisseron, M. P. Papet, and Y. Saint-Jalm (1994) Determination of organic acids in cigarette smoke by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 684: 251-257.
- [11] Mainka, A., P. Ebert, M. Kibler, T. Prokop, B. Tenberken, and K. Bächmann (1997) Development of new methods for the analysis of carboxylic acids and carbonyl compounds in size classified raindrops by CE for application in modelling atmospheric processes. *Chromatographia*. 45: 158-162.
- [12] Volgger, D., A. J. Zemmann, G. K. Bonn, and M. J. Antal (1997) High-speed separation of carboxylic acids by co-electroosmotic capillary electrophoresis with direct and indirect UV detection. *Journal of Chromatography A*. 758: 263-276.
- [13] Sharman, D. C. (1997) Determination of lactic acid and poly(lactic acid)s in a dermatological formulation by capillary electrophoresis. *Analyst*. 122: 709-713.
- [14] Schober, T. J., S. R. Bean, and D. Wang (2009) Capillary Electrophoresis as a Tool for Evaluating Lactic Acid Production from Sorghum. *Cereal Chemistry*. 86: 117-121.
- [15] Pérez-Míguez, R., M. L. Marina, and M. Castro-Puyana (2016) Capillary electrophoresis determination of non-protein amino acids as quality markers in foods. *Journal of Chromatography A*. 1428: 97-114.
- [16] Poinot, V., V. Ong-Meang, P. Gavard, and F. Couderc (2016) Recent advances in amino acid analysis by capillary electromigration methods, 2013-2015. *Electrophoresis*. 37: 142-161.
- [17] Acunha, T., C. Ibáñez, V. García-Cañas, C. Simó, and A. Cifuentes (2016) Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics. *Electrophoresis*. 37: 111-141.

- [18] Laube, H., F.-M. Matysik, A. Schmidberger, K. Mehlmann, A. Tournel, and J. Boden (2016) CE-UV/VIS and CE-MS for monitoring organic impurities during the downstream processing of fermentative-produced lactic acid from second-generation renewable feedstocks. *Journal of Biological Engineering*. 10: 1-11.
- [19] Trenkamp, S. (2012) Entwicklung einer sensorbasierten Systemlösung für das Online-Monitoring von Bioprozessen in Fermenter.: Untersuchungen zur 3D-Sensorpositionierung und Entwicklung eines Prozessmodells als Basis für die Prozessoptimierung. In: Editor (ed.)^(eds.)|. *Book Title*|. Publisher|, City|.
- [20] EMEA, ICH Topic Q 2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.
- [21] Electric, G. (2014) DK Series. In: Editor (ed.)^(eds.)|. *Book Title*|. Publisher|, City|.
- [22] Electric, G. (2014) DL Series. In: Editor (ed.)^(eds.)|. *Book Title*|. Publisher|, City|.
- [23] Microdyn-Nadir (2014) Productcatalog. In: Editor (ed.)^(eds.)|. *Book Title*|. Publisher|, City|.
- [24] Dow, C. (2014) FILMTEC™ TW30-2540. In: Editor (ed.)^(eds.)|. *Book Title*|. Publisher|, City|.
- [25] Dow, C. (2014) FILMTEC™ SW30-2540. In: Editor (ed.)^(eds.)|. *Book Title*|. Publisher|, City|.
- [26] Dow, C. (2014) FILMTEC™ NF-4040 In: Editor (ed.)^(eds.)|. *Book Title*|. Publisher|, City|.

7.3 Application of biosorbents for ion removal from sodium lactate fermentation broth

Autoren:

Hendrik Laube¹, M. Toufiq Reza^{2,3}

zuzuordnende Forschungseinrichtungen:

¹ Department of Bioengineering, Leibniz-Institute for Agricultural Engineering (ATB), Max-Eyth-Allee 100, Potsdam 14469, Germany

² Department of Chemical and Materials Engineering, University of Nevada, Reno, NV 89557, USA

³ APECS Group, Leibniz-Institute for Agricultural Engineering (ATB), Max-Eyth-Allee 100, Potsdam 14469, Germany

wissenschaftliche Fachzeitschrift:

Journal of Environmental Chemical Engineering

ABSTRACT

The potential for applying renewable resources to a fermentative lactic acid purification process has been investigated. The adsorption behavior of lactate and 10 inorganic ions onto 12 different types of sorbents was investigated. The performance of six different renewable bio-based sorbents (willow, poplar, their hydrothermally carbonized forms (HTC-willow and HTC-poplar), alginate and chitosan) were studied and compared with five common fossil-based polymers and one charcoal sorbent. The ion adsorption capacities and breakthrough curves of the different sorbents were investigated in column experiments. Moreover, impacts of the presence of individual ions on the breakthrough curves were investigated by the application of an aqueous lactic acid solution and a sodium lactate fermentation broth. The lactate capacities of the biosorbents ($>140 \text{ mg g}^{-1}$) were at least threefold higher than those of the conventional sorbents ($<40 \text{ mg g}^{-1}$). Furthermore, the HTC conversion allowed for a 60% increase in the lactate adsorption capacity.

1 Introduction

The scarcity of fossil resources and their intensive use in the fields of energy, fuel and chemical production has encouraged mankind to search for alternatives based on renewable resources [1]. Many successful attempts have already been made and have found their way into industry. The latest example is a bioplastic that has transformed the wrapping industry, making 100% ecological and biodegradable products available to the environmentally conscious consumer [2]. As bioindustry starts growing at an accelerated pace, the need for integrated processes that allow the application of different renewable resources and their multiple uses along the value-added cascade becomes more critical.

Lactic acid (LA) is already being produced on a large industrial scale based on renewable resources [3]. The need for low-cost sorbents in the downstream processing of fermentation is necessary for its economical sustainability. Conventional petrochemical-derived polymer sorbents have limited regeneration capabilities, as they lose their functionality and efficiency. Moreover, these non-biodegradable sorbents require proper disposal, which inevitably leads to a high production cost. Several renewable resources have shown adsorption properties on numerous substances from aqueous solutions [4]. The adsorption properties of these biodegradable sorbents (biosorbents) can be further optimized through thermal processing. Hydrothermal carbonization (HTC) is a thermochemical treatment process in which biomass is treated with hot compressed water [5]. The ionic product of subcritical water is highest at a temperature range of 200–280 °C, which makes water similar to both a mild acid and a mild base simultaneously [6]. When biomass is treated with subcritical water at the stated temperature range, organic components such as lignin, cellulose, and hemicelluloses degrade to some extent and recondense into a carbon-rich hydrophobic solid, often called hydrochar or HTC biochar [7]. Although HTC biochar is primarily used as a solid fuel, a few attempts have been reported on HTC biochar usage as a sorbent. For instance, HTC biochar was reported to be successful for the adsorption of selective heavy metals (e.g., Cu, Cd, and U (VI)) and selective contaminants (e.g., nitrobenzene, methyl orange, etc.) with or without surface modification [8].

Most of the non-conventional bio-based sorbents are made from agricultural by-products [4]. Depending upon the adsorbed substances, further usage as a soil

improvement due to their biodegradability is possible. This allows for profitable resale and integration into the value-added biorefinery cascade concept.

In the last two decades, the adsorption potential of renewable resources has been intensively investigated. A wide variety of raw materials such as wood, sawdust [9,10], wheat shells [11], orange peels [12], banana peels [13], apple pomace [14], coconut material [15], degreased coffee beans [16], activated carbon [17,18], algae [19,20], chitin [21,22], bacterial cell walls [23] and hen feathers [24] were investigated. The interested reader is referred to the relevant reviews written by [25] and [26].

Unfortunately, the majority of the studies mentioned above dealt with the adsorption from model solutions consisting of dyes or phenols in an aqueous solution. Within these small-volume experiments, the temperature, pH, contact time, feed concentration and/or bed height were optimized, and the obtained data were fitted into a model following either the Langmuir or Freundlich isotherm [27,28]. To the best of our knowledge, no study was found in literature on the potential of bioadsorbents as a replacement for conventional adsorbents using real bioprocess sample materials and conditions. Mandi et al. [29] investigated the adsorption capacity of banana peels for phenol in water, which was obtained during the milling process of olives. Their study presents the first application of a biosorbent on a industrial high volume process sample found in literature.

The main goal of this study was to evaluate various biosorbents, including alginate, chitosan, raw wood materials, and hydrothermally treated woods. The performance of the biosorbents in the column experiments was compared to conventional sorbents. To understand the impact of the presence of ions on the adsorption performance, the experiments were carried out using aqueous LA solution and sodium lactate fermentation broth.

2 Materials and methods

2.1 Biorefinery setup and experimental procedure

The designed network for a potential biorefinery strategy is illustrated in Figure 1. The network consists of two production routes. The first route is the wood (Section 2.2) and biochar (Section 2.3) production. The portfolio of self-made biosorbents has been expanded through the acquisition of alginate and chitosan

capsules, activated carbon, and industrial polymer sorbents (Section 2.4). The second route is the production of the sodium lactate broth (Section 2.5). Each sorbent material was filled into column and brought into contact with deionized (DI) water, pure LA, and sodium lactate fermentation broth (Section 2.6). The conductivity breakthrough curves (BTC) were recorded online and samples for the measurement of the BTC and LA BTC ions were drawn (Section 2.7). The obtained data were analyzed to obtain the ion, LA and sodium lactate capacities (Section 2.8).

2.2 Willow and poplar production

Two types of wood were used for the biochar and wood sorbent production. Poplar (*Populus maximowiczii* x *Populus nigra*) and willow (*Salix viminalis*) were acquired from a local, short-rotation test site at the Leibniz Institute for Agricultural Engineering (ATB), Potsdam, Germany. The three-year-old trees were cut and processed in an automated crushing guillotine device (Les Ateliers Pierret S.P.R.L., Corbion, Belgique). The obtained chips were approximately 1–2 cm in length. The bark was sorted out manually, and the wood chips were dried for 24 h at 60 °C in a conventional dryer (Thermoscientific Heraeus, Langenselbold, Germany). The dried wood chips were processed in a cutting mill (Fritsch, Pulverisette 19, Idar-Oberstein, Germany) equipped with a sieve cassette with 1 mm of trapezoidal perforation, and a mixture of wood shavings and sawdust was obtained. Mass losses were recorded during the production process. The mixture was separated by a manually operated shaking screen (VEB Metallweberei, Neustadt/Orla, Germany) with mesh sizes of 800 µm, 630 µm and 200 µm.

The major fraction of the wood shavings was further processed in a filter bag (SFT Schwegemann Filtrations-Technik, Grafschaft-Gelsdorf, Germany) with a 600 µm pore size, and the remaining sawdust was washed with DI water. The cleaned, wet wood shavings were dried and divided into two fractions. The first fraction was used for the ion adsorption column experiments (Section 2.6), and the second fraction was processed in the HTC biochar production route (Section 2.3). The obtained mixture of biochar from the HTC biochar production route was processed in the same way as the wood shavings, as shown in Figure 2. Before each column experiment, the density of the material was recorded through a volume and weight measurement.

Figure 1.: Set-up of the biorefinery system.

2.3 Hydrothermal carbonization (HTC) of poplar and willow

An 18.6 L Parr stirred pressure reactor (model 4555) was used for the HTC experiments in this study. For the HTC experiments, approximately 1 kg of dry feedstock was weighed and transferred into the reactor. Approximately 8 L of DI water was measured (to maintain a 1:8 biomass:water ratio) and poured into the reactor. In this study, HTC of poplar and willow were performed at 230 °C, the heating rate of the reactor was maintained at 2 C min⁻¹, and the reactor content was stirred at 90 rpm throughout the HTC reaction. The HTC reaction temperature and stirring were controlled with SpecView 32.849 data acquisition software via a Parr controller (model 4848, IL, USA). The accuracy of the controller was set at 1 °C. Reaction times, pressure, heating jacket temperature, and cooling water temperature were recorded every 2 s throughout the reaction.

Figure 2.: Flowchart for the bioadsorber production.

Four thermocouples were used to monitor and control HTC reaction temperatures. One thermocouple was inserted into the heating jacket, and three others were inserted into the Parr reactor at different depths. The average of the three inside temperatures was reported and controlled as the reaction temperature throughout this study. For the completion of the HTC reaction in both solid and

liquid phases, the HTC reaction time was set for 6 h. The reported reaction time was measured from zero, considered the point when it reached the isotherm for the very first time. The total reaction times ranged from 1 h, 27 min and 30 s to 1 h, 57 min and 30 s. At the end of the HTC reaction, the heater was turned off, and the reactor was allowed to cool overnight. The next day, the slurry was drained, and solid HTC biochar was filtered by vacuum filtration using Whatman 42 filter paper. To remove the adherent compounds, the HTC biochar was washed with an excess amount of water until the washed water reached a constant pH. The wet HTC biochar was then stored in a refrigerator at 4 °C until the column study.

2.4 Chemicals, reagents and commercial resins

All chemicals for the determination of the LA and the ion concentration, which are listed in Table 1, were obtained from Sigma–Aldrich (Germany) or Carl Roth (Germany) at the highest purity available and were used without further purification. All solutions were prepared using DI water (19.5 mS cm⁻¹ resistance) with a Purelab Flex 3 (Veolia Water Technologies Deutschland, Celle, Germany). The impact of the ions' presence on the BTC was studied using an LA standard of 88% w/w (Corbion, Gorinchem, the Netherlands). The LA standard was diluted to the same LA concentration that was found in the broth. The industrial sorbents (A 103 S, MN 100, MN 105 and MN 150) were purchased from Purolite (Ratingen, Germany). The granular, pure, activated charcoal (AC) was purchased from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). The chitosan and the alginate capsules were purchased from Heppe Medical Chitosan GmbH (Halle, Germany).

2.5 Preparation of sodium lactate fermentation broth

The sodium lactate fermentation broth was prepared by following three steps:

i) The raw feed solution for fermentation was prepared by mixing 240 L of DI water with 75 kg of tapioca starch and 10.5 kg of yeast extract. The temperature was set to 80 °C and the pH level was set to pH 6.0 by the addition of 20% NaOH.

Table 1: Ion concentration of the feed solution for the column experiments and LA and various ion capacities using different sorbents in column studies with the concentration of the two feed solutions, sodium lactate fermentation broth (SLFB).

Name	$k_{ab} [\text{L mg}^{-1} \text{min}^{-1}]$		$N_o [\text{mg L}^{-1}]$		CoD [-]	
	Pure LA	Broth	Pure LA	Broth	Pure LA	Broth
Column	4.087		26		0.93	
A103S	0.14	1.83	43	23	0.90	0.98
MN100	0.19	0.21	33	27	0.98	0.88
MN 102	0.10	0.21	40	27	0.53	0.81
MN 150	0.27	0.70	37	23	0.87	1.00
MN 502	0.15	0.66	42	29	0.86	0.89
AC	0.18	0.83	37	20	0.92	0.93
Willow	0.20	1.01	36	26	0.79	0.91
Poplar	0.22	0.81	44	32	0.83	0.87
HTC-Willow	0.25	0.81	32	25	0.87	0.90
HTC-Poplar	0.11	2.33	59	13	0.63	0.99
Chitosan	0.49	0.64	30	29	0.86	0.76
Alginate	1.37	0.75	26	29	0.91	0.87

ii) The hydrolysate was prepared by mixing the raw feed solution with *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase (Novozymes, Bagsværd, Denmark) and 75 g of CaCl_2 for 20 min. A pitched blade impeller with 3 blades was used for the mixing process. The stirrer velocity was set to 137 rpm. The hydrolysate was thermally sterilized at 121 °C and 2 bar for 20 min. Afterward, coarse particles were removed by microfiltration. The filtered and sterilized hydrolysate was then fermented.

iii) The continuous fermentation was carried out in a 500L fermenter with cell recycle. The cell retention was established by pumping the fermentation broth over hollow fiber membranes. The hollow fiber membranes were purchased from TAMI (Thüringen, Germany). Two hollow fiber modules from TAMI CèRAM INSIDE (Thüringen, Germany) with a pore size of 0.2 mm and a total area of 6.65 m² were used (Cao et al., 2002). The membrane material was made out of ceramic

material containing ZrO_2 and TiO_2 . The LA bacteria (*Bacillus coagulans* – St. A59) were added and the temperature was set to 52 °C. The temperature was maintained with a cooling jacket for 69 h. An additional 468 L of DI water were added at the beginning of the fermentation process. During the fermentation process, 108 L of NaOH 20% were continuously added to maintain the pH of 6.0. The overall volume of the fermentation broth was 816 L. The fermentation broth was collected and sterilized at 121 °C and 2 bar for 20 min. The fermentation broth was pumped through a nanofiltration membrane, split into aliquots of 60 L and kept frozen prior to the column study.

2.6 Column experiments

The columns were made of transparent polyvinylchloride (Kwerk.de, Montabaur, Germany) with dimensions of 120 cm in length, an inner diameter of 4 cm, and a wall thickness of 1 cm. The column was filled with 1 L of sorbent material. Therefore, 1 L equals 1 BV and 1 L h^{-1} equals 1 BV h^{-1} . The solution left the column through an outlet into a plastic tube that was equipped with a flow-through cell (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Germany) for online conductivity and temperature measurement. Data recording and processing were established with a Microsoft Excel software plug in for online data exchange, which was provided by the WTW (Weilheim, Germany). After the flow-through cell, the solution was collected in 15 mL plastic tubes and analyzed according to Section 2.7 for pH, ion concentration and lactate concentration.

The column study of each sorbent was performed with three different solutions: DI water, pure LA, and sodium lactate fermentation broth. DI water was used to study the sorbent flow characteristics by means of flow resistance and bed expansion. Therefore, DI water was pumped through the column of the sorbent. The pumping capacity was adjusted from 10 to 100 rpm in 10 rpm intervals. Each flow rate was held until a constant bed height was established. The volumetric flow rate and the bed height expansion were measured throughout the experiment.

Commercially obtained, pure LA was diluted to the same concentration as the lactate concentration in the fermentation broth. Both solutions, in separate experiments, were pumped through the column to compare the impact of the presence of ions on the BTC. Between the LA and the sodium lactate solution experiments, a regeneration cycle of the sorbent was run.

The industrial sorbents (A103S, MN 100, MN 102, MN 150, MN 502 and granulated charcoal) were regenerated according to the following procedure:

Experiment with broth or solution at 4 bed volumes per h (BV h^{-1}), broth or solution displacement with DI water at 4 BV h^{-1} and 8 BV, backwash with DI water at 3 BV h^{-1} and 6 BV, sodium conversion with 2% NaOH at 2 BV h^{-1} and 2 BV, rinse with DI water at 3 BV h^{-1} and 3 BV, neutralize with 0.5% HCl at 2 BV h^{-1} and 2 BV, rinse with DI water at 2 BV h^{-1} and 2 BV, and final rinse with DI water at 4 BV h^{-1} and 4 BV. A recommended minimum bed depth of 800 mm was established by the application of 1 L of each sorbent.

The sorbents produced from natural resources, namely willow, poplar, HCT-willow, HTC-poplar, chitosan capsules and alginate capsules, were rinsed with DI water at 4 BV h^{-1} until the conductivity fell below 0.03 mS cm^{-1} .

2.7 Analytical procedures

Ion concentrations were measured with the Dionex ICS 1000 Ion Chromatography System (Dionex Softron GmbH, Germering, Germany) with a conductivity detector. The conductivity detector electronics were digital microprocessor-controlled by a signal processor. The flow cell had a cell drive of an 8 kHz square wave with a linearity of 1% and a resolution of $0.00238 \text{ mS cm}^{-1}$. The system was controlled by a computer equipped with Chromeleon Chromatography Management Software for data collection and analysis. The system was equipped with a suppressor for anions and carbonic acid removal and an ASRS 300 with a CRD 300 for carbonate effluents control. The system was further equipped with an AS40 auto sampler (Dionex Softron GmbH, Germering, Germany), and the injection volume was set to 25 mL.

Anion measurement was carried out with the Dionex IonPac AG9-HC Guard Column (4 50 mm, P/N 51.791) and the Dionex- IonPac AS9-HC Analytical Column (4 250 mm, P/N 51.786). The mobile phase was prepared daily and consisted of 9 mM Na_2CO_3 . The flow rate was set to 1.2 mL min^{-1} . The pressure control was set to 160 bar, and the temperature control was set to 30 °C.

Cations were measured by a Dionex IonPac CG-16 Guard Column (5 50 mm, P/N 57.574) and Dionex IonPac CS-16 Analytical Column (5 250 mm, P/N 57.573). The mobile phase consisted of 30 mM methanesulfonic acid (MSA) and was prepared

daily. The flow rate was set to 1.0 mL min⁻¹. The pressure control was set to 80bar, and the temperature control was set to 40 °C.

Lactate concentration was analyzed by HPLC (Dionex Ultimate 3000) with a Eurokat H column (Knauer 300 8 mm, 10 mm). The mobile phase consisted of 0.01 N H₂SO₄, with a flow rate of 0.8 mL min⁻¹ and a pressure set at 65 bar with a temperature of 40 °C. A refractive index detector (Shodex RI-101) was used with an auto sampler (Analytical WPS-3000TSL) and an injection volume of 10 mL.

2.8 Data processing of conductivity BTC and ion capacities

The recorded conductivity BTC values were mathematically analyzed for their deviation from the ideal S-shaped curve using the Adams–Bohart Model. Eq. (1) represents the mathematical expression of the Adams–Bohart Model [30].

$$\ln \frac{C_t}{C_0} = k_{AB} C_0 - k_{AB} N_0 \frac{Z}{F} \quad (1)$$

Within Eq. (1), C_0 and C_t (mg L⁻¹) are the inlet and outlet concentrations of the lactate and the inorganic ions, respectively; k_{AB} (L mg⁻¹ min⁻¹) is the kinetic constant; F (cm min⁻¹) is the linear velocity, which is obtained by dividing the flow rate by the column section area; Z (cm) is the bed depth of column; and N_0 (mg L⁻¹) is the saturation concentration. The values of N_0 and k_{AB} were obtained with a graphical solution using the intercept and slope of the linear plot of $\ln(C_t/C_0)$ against time (t). The corresponding coefficient of determination (R^2) (CoD) was calculated and compared with the ideal S-type curve. The lactate and ion adsorption capacities were obtained from the areas under the slope of C_t against time (t), which were calculated by numerical integration with the trapezoidal rule.

3 Results and discussion

3.1 Mass distribution on sieves and resin density

The obtained mass distribution through the sieving process is illustrated in Figure 3. It can be observed that willow and poplar have a similar mass distribution. The majority of the willow (60%) and poplar (69%) are found on the 800 mm sieve. The second-highest amounts of willow (23%) and polar (17%) were found on

the 200mm sieve, while the third-highest amounts of willow (13%) and poplar (11%) were on the 630 mm sieve.

The HTC process clearly shifted the mass distribution of the produced HTC-willow (43%) and HTC-poplar (47%) toward the 200 mm sieve. As the mass distribution on the 630 mm sieve stayed constant for HTC-willow (12%) and HTC-poplar (12%), the resulting decrease was on the 800 mm sieve with 12% for HTC-willow (48%) and 36% for HTC-poplar (33%). The option to alter the biosorbent mass distribution by HTC processing is therefore linked to a weight loss in the particle size range of 800mm of 20 – 30% toward the 200mm particle size range. This can be critical for large-scale production of HTC sorbents because a particle size of 800 mm is desired for reasons of sorbent handling in the column processes. However, granulation of the obtained HTC sorbent could eliminate this obstacle.

Figure 3.: Mass distribution obtained during the sieving of poplar, willow, HTC-poplar and HTC-willow.

The commercial AC had a very narrow mass distribution of 96% on the 800 mm sieve. This can be linked to the process of granulation, which generated dense and uniformly sized small pellets in comparison to the HTC sorbents.

The volume of 1 L of the wood and the HTC sorbents obtained from the 800 mm sieve were weighed and the densities were calculated. The densities are shown in Figure 4. The investigated sorbents can be separated into five groups according to their densities. HTC-willow and HTC-poplar have the lowest densities ($<0.09 \text{ g mL}^{-1}$) among the sorbents. Willow (0.164 g mL^{-1}) and poplar (0.131 g mL^{-1}) have slightly higher densities. The activated charcoal has a density of 0.43 g mL^{-1} and all the commercial sorbents have a narrow density range of $0.60 - 0.67 \text{ g mL}^{-1}$. Chitosan (0.973 g mL^{-1}) and alginate (0.998 g mL^{-1}) capsules have densities close to 1 g mL^{-1} , which is the density of pure water, as they are stored in aqueous salt solutions by the manufacturer, Heppe Medical Chitosan GmbH (Halle, Germany).

Figure 4.: Densities of the bio-and conventional sorbent materials.

As the density was measured at a fixed volume of 1 L, an increase of the density can only be achieved through an increase in weight. The increase in weight can only be generated through the presence of more sorbent material. However, adsorption is a process that takes place on the surface of the sorbent material. Therefore, a sorbent with a lower density at the same volume can be used so that there is a higher internal and external surface area for the adsorption process. For these reason, sorbents such as willow and poplar and their HTC products, which have a low density, should be favorable for adsorption.

3.2 Flow rate and bed expansion

As the sorbents were found to be of diverse densities, the process conditions had to be adjusted accordingly. The most important parameters for the column experiments were the flow rate, the flow-through resistance and the bed expansion. The selected pumping capacity over the measured flow rate followed a linear function for all investigated sorbents (see Supporting Information Figure S1).

Supporting Information Figure 1: Flow resistance, by means of the relationship of the selected pump capacity on the flow rate in the column packed with the different types of adsorbents.

No flow resistance as a sign of flow-rate decline was observed. Therefore, a pressuredrop or a blockage of the column by any of the sorbents being investigated was excluded.

Figure 5.: Bed expansions for different sorbents in various applied flow rates.

As a reference for the flow resistance of the sorbents, the flow rate of the empty column was recorded and the percentage deviation was calculated (see Supporting Information Table S1). With an increasing flow rate, the percentage deviation of the sorbents decreased. The percentage deviation of alginate and chitosan declined from 53% and 39% at 3 L h^{-1} to 19% and 14% at 7 L h^{-1} , respectively. This strong deviation may be due to the high density of the capsules. HTC-poplar also had a high deviation of 43%, whereas HTC-willow's deviation was only 8%. This could be explained by a change in hydrophobicity after the HTC process.

Supporting Information Table 1: Flow rate (FR) and the percentage deviation (PD) of the adsorbents at different selected pumping capacities.

rpm	20		30		40	
	FR	PD	FR	PD.	FR	PD
Name	[L h ⁻¹]	[%]	[L h ⁻¹]	[%]	[L h ⁻¹]	[%]
A 103 S	4.2	-1.4	6.1	-2.0	8.2	-1.1
MN 100	4.4	4.1	6.5	3.3	8.6	4.2
MN 102	4.3	1.4	6.4	2.1	8.6	3.8
MN 150	4.3	1.4	6.4	2.1	8.6	3.8
MN 502	3.6	-17.5	5.7	-10.1	7.9	-4.2
AC	4.1	-2.2	6.1	-2.5	8.3	0.4
Willow	4.0	-5.6	5.9	-6.1	7.8	-6.4
Poplar	4.5	5.1	6.2	-1.5	8.3	0.9
HTC-Willow	4.6	7.8	6.8	8.6	9.1	9.1
HTC-Poplar	3.0	-43.1	4.6	-34.6	6.3	-31.0
Chitosan	3.0	-39.6	4.9	-28.4	6.9	-19.6
Alginate	2.8	-53.3	5.3	-18.2	7.2	-14.6
Column	4.2	0.0	6.2	0.0	8.3	0.0

HTC biochar produced by HTC from various feed stocks has been reported as very hydrophobic in previous studies [31,7]. The conventional sorbent MN 502 also had a high deviation of 18%. The rest of the sorbents had deviations below 6%.

The bed expansion over the applied flow rate for every sorbent is shown in Figure 5. The sorbents show very different bed expansion behaviors at increasing flow rates. The sorbents can be divided into three groups according to their bed expansion behavior. The first group comprises sorbents that showed a strong bed expansion at low flow rates, which includes the majority of the conventional sorbents and HTC-poplar. For instance, MN 100, MN 102, MN 150 and HTC-poplar reached the maximum column height, represented by a bed expansion of 71%, at a flow rate of 5 BV h⁻¹. A 103 S and MN 502 were found at the end of the fast expanding sorbent materials and reached maximum bed expansion at a flow rate of 10 BV h⁻¹.

The second group comprises sorbents that require higher flow rates to induce bed expansion. These are willow, chitosan, and alginate. All of them showed a bed expansion of a maximum of 40% or less at a flow rate of 15 BV h⁻¹. The third group includes sorbents that showed only a limited relationship between bed expansion and flow rate. Poplar and granulated activated charcoal required 19 BV h⁻¹ to induce a bed expansion of only 7%. HTC-willow reduced its initial bed height by 7%. At an increasing flow rate, the sorbent material made pulsating movements, which lead to a rearrangement of the particles into a denser formation. A medium bed expansion (50%) is favorable for the adsorption process, as it indicates an evenly distributed flow over the entire cross section of the column. Furthermore, it ensures the ideal contact conditions of sorbent material and fluid, as the sorbent particles are perfectly surrounded and lifted by the flowing liquid phase, which ensures an overall good contact between the liquid and the adsorbing surface area of the sorbent particles. Based on the information gathered from Figure 5, the flow rate was set to 4 L h⁻¹ (the recommended service flow rates for the Macronet (MN) resins are 2 – 4 BV h⁻¹) for the rest of the column experiments.

3.3 Column experiments

Prior to the actual column experiments for the conductivity BTC and ion adsorption capacity, the reproducibility of the adsorption process and acid resistance of the biosorbents were tested. The possibility of acid deposition of the sorbent material due to acidification had to be excluded. Therefore, willow and HTC-willow sorbent material was tested. The willow sorbent material repeatedly adsorbed LA and was regenerated by DI water without any visible change in color or loss of mass. The same procedure was applied to HTC-willow with the same results for acid resistance (see Supporting Information Figure S2).

Supporting Information Figure 2: Repeated lactic acid column experiment with deionized water as washing solution

3.4 Conductivity BTC of the sorbents

The conductivity BTC for the sodium lactate broth and the aqueous LA solution are shown in Figure 6. The Adams–Bohart Model was applied to the BTC (Table 2). The CoD were investigated to find the sorbent with the most ideal S-shaped BTC.

The CoD obtained from the application of the sodium lactate broth are generally higher (1.0 – 0.8) than those obtained from the aqueous LA solution (0.9–0.5). Chitosan, alginate, and MN 100 exhibited a reduction of 10%, 4%, and 11% in the CoD, respectively, when the sodium lactate broth was applied. A 103 S, MN 150, and willow exhibited a surplus of 8%, 13%, and 12%, respectively, while MN 502, AC, poplar, and HTC-willow exhibited minor changes in the CoD, of approximately 2 – 5%. Among all of the sorbents, MN 102 and HTC-poplar had the strongest deviations, of 28% and 36%, respectively, when the fermentation broth was applied. In the pure solution, MN 100 had the most ideal curve, represented by a CoD of 0.98.

The most ideal curves for the applied broth were reached by MN 150, HTC-poplar, and A 103 S with 1.0, 0.99, and 0.98, respectively.

Table 2: Adams–Bohart model parameters of ion capacities for various biosorbents.

Name	Ion capacities [$\text{mg}_{\text{Ion}}/\text{g}_{\text{Sorbent}}$]							
Sorbents	LA	Na^+	NH_4^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	SO_4^{2-}
A 103 S	0.9	1.5	0.001	0.014	0.000	0.001	0.043	0.002
MN 100	31.4	7.8	0.011	0.096	0.004	0.014	1.219	0.030
MN 102	28.4	6.4	0.006	0.087	0.004	0.008	0.240	0.027
MN 150	27.8	6.5	0.005	0.068	0.002	0.006	0.017	0.024
MN 502	40.7	8.2	0.006	0.060	0.009	0.028	0.018	0.036
AC	37.7	9.4	0.013	0.112	0.001	0.004	1.091	0.039
Willow	330.0	67.2	0.076	0.942	0.134	0.819	0.064	0.269
Poplar	183.4	38.0	0.170	0.525	0.105	0.522	0.094	0.133
HTC-willow	534.3	111.2	0.221	1.521	0.075	0.138	0.172	0.448
HTC-poplar	332.3	56.3	0.116	0.782	0.020	0.039	0.127	0.192
Alginate	619.6	122.9	0.215	1.533	0.041	0.760	0.314	0.312
Chitosan	141.8	26.1	0.056	0.389	0.009	0.019	0.061	0.101
Feed solution concentration [ppm]								
SLFB	101,000	21,6050	39	298	10	22	39	76

It can be noted that none of the applied biosorbents showed exclusive behavior. A grouping across conventional sorbents and biosorbents, as described above, was observed. The sharpening of the BTC after switching from the pure LA solution to the fermentation broth can be explained by the presence of multiple ions of different sizes (valence radius) and polarizations (net charge).

Figure 6. Conductivity BTC for the aqueous LA and the sodium lactate fermentation broth applied on conventional sorbents and biosorbents.

This also affected the initial time and the end time (N_0) of the BTC. The end of the BTC is reached on average at 25 or 38 min, when the broth or aqueous LA solution was applied, respectively.

3.5 Ion adsorption capacities of the sorbents

The ion concentration was measured, and its capacities were calculated based on the ion concentration BTC. Table 1 illustrates the ion adsorption capacities of the sorbents. The sodium and the lactate made up the majority of the fermentation broth (Section 2.5 and Table 1) and were the dominating adsorbing ions. The concentrations of sodium and lactate had displaced the other ions in the competition for the adsorption sites on the surface of the sorbent material. The amount of adsorbed sodium was approximately one-fifth of the adsorbed lactate.

The biosorbents had greater capacities ($>141 \text{ mg g}^{-1}$) for sodium and lactate than did the conventional sorbents ($<40 \text{ mg g}^{-1}$). Alginate and HTC-willow had the highest capacities for lactate, at 619 mg g^{-1} and 534 mg g^{-1} , respectively. The alginate capsules were left overnight in their regenerated state in DI water and were completely dissolved the next day. The chitosan capsules withstood all of the physical and chemical stresses, as did the other sorbents tested throughout this research.

The relationship between the adsorption capacities of the woody materials and their HTC products is different from other materials. Willow (330 mg g^{-1}) had a 55% higher capacity than poplar (183 mg g^{-1}). With the HTC conversion, HTC-willow (534 mg g^{-1}) increased its adsorption capacity by 62% and HTC-poplar (332 mg g^{-1}) by 55%. Thus, they were similar to the capacity of the initial biosorbents, willow and poplar, with HTC-willow having a capacity of 62% higher than HTC-poplar. Therefore, with the right selection of wood material and the proper HTC conversion process, a threefold higher capacity can be reached.

The fermentation broth had minor concentrations of the other inorganic ions. The sorbents showed diverse adsorption capacities for these ions. Chloride was preferably adsorbed by MN 100 (1.219 mg g^{-1}) and AC (1.091 mg g^{-1}). All of the biosorbents had a tendency to adsorb positively charged ions. Calcium was preferably adsorbed by willow (0.819 mg g^{-1}), poplar (0.522 mg g^{-1}), and alginate (0.760 mg g^{-1}). Magnesium, which was the second divalent cation after calcium, was also adsorbed by willow (0.134 mg g^{-1}) and poplar (0.105 mg g^{-1}). Potassium and ammonium were adsorbed by HTC-willow (1.521 and 0.221 mg g^{-1}) and alginate (1.533 and 0.215 mg g^{-1}) as well.

The specific selectivity of the different sorbent materials, towards anions or cations might be explained by the difference in surface net charge of the sorbents, e.g.,

point of zero charge, which was not subject of this study. However, during the column studies with aqueous LA solution, it was observed that, when similar LA concentrations at the column outlet were compared, the conductivities changed according to the sorbent material applied (see Supporting Information Figure S3).

Supporting Information Figure 3: LA concentration and conductivity in the outlet stream of the column for the industrial sorbents

3.6 Soil amendment potential of spent biosorbents

One of the main advantages of biosorbents is the ease of disposal. All of the biosorbents are biodegradable and contain no or very low amounts of ecotoxic compounds. Moreover, they are most likely to contribute to soil amendment, as biological carbon is being returned to the soil with micro and macronutrients. For example, the ion capacities of spent willow and poplar and their corresponding HTC-willow and HTC-poplar are higher than those of MNs and A103S. As a result, they are more likely to behave as organic fertilizers. Very high LA adsorption makes the spent HTC-willow and HTC-poplar more amenable for root microorganism, e.g., arbuscular mycorrhiza (AM) fungi growth, as the HTC process has already been found to be beneficial for AM growth and to have a positive effect on crop production [32].

Many crop plants are able to achieve symbiosis with AM, which help supply minerals and water and guard against infections by root pathogens. Thus, mycorrhiza is a natural growth enhancer for many plants and the production of more mycorrhiza can be accompanied by increased plant growth. LA and lactic acid

bacteria (LAB) have also been found to be effective for plant growth and for inhibiting pathogens [33,34].

In fact, LA could be more effective than other sugar and sugar derivatives for plant root bacterial colonization [35,36]. It is very likely that spent HTC-willow and HTC-poplar with adsorbed LA could be very useful as soil amendments and possibly as organic fertilizers. However, more research on the plant microbiology of root bacterial colonization is necessary to determine optimal dosages of individual spent biosorbents for specific plants.

4 Conclusion

The majority of the biosorbents, except for alginate, were chemically resistant for a repeated adsorption process. While a change in feed solution from fermentation broth to LA solution equally shifted the average duration of the BTC to reach maximum from 25 to 38 min the biosorbents had greater capacities ($>141 \text{ mg g}^{-1}$) for sodium and lactate than the conventional sorbents ($<40 \text{ mg g}^{-1}$) did. Furthermore, the HTC-process can effectively enhance the capacity of biosorbents. While willow (330 mg g^{-1}) had a 55% higher capacity than poplar (183 mg g^{-1}), HTC-willow (534 mg g^{-1}) increased its adsorption capacity by 62% and HTC-poplar (332 mg g^{-1}) by 55%, with HTC-willow having a capacity of 62% higher than HTC-poplar. However, only HTC-poplar, amongst the biosorbents, reached a bed expansion of 71% at a flow rate of 5 BV h^{-1} as the conventional sorbents did.

Acknowledgments

This research is supported by funds from the Bioenergy 2020 program allocated from the German Federal Ministry of Research and Education to Project Management Jülich (PtJ). M. Toufiq Reza also acknowledges his financial support by the Western Sun Grant Initiative (grant no. C0432G-C), USA. Additionally, the authors would like to thank Laureen Herklotz for her support in analytical tasks and Roland Schneider for his support in the upstream process.

References

- [1] H. Quaak, Energy from Biomass, World Bank, Washington, D.C, 1999.
- [2] G.-Q. Chen, M.K. Patel, Plastics derived from biological sources: present and future: a technical and environmental review, *Chem. Rev.* 112 (2012) 2082–2099, doi:<http://dx.doi.org/10.1021/cr200162d>.
- [3] E.T.H.Vink, S.Davies, J.J.Kolstad, The eco-profile for current Ingeo¹ polylactide production, *Ind. Biotechnol.* 6 (2010) 212–224, doi:<http://dx.doi.org/10.1089/ind.2010.6.212>.
- [4] I. Ali, M. Asim, T.A. Khan, Low cost adsorbents for the removal of organic pollutants from wastewater, *J. Environ. Manage.* 113 (2012) 170–183, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.08.028>.
- [5] M.T. Reza, et al., Hydrothermal carbonization of biomass for energy and crop production, *Appl. Bioenerg.* 1 (2014) , doi:<http://dx.doi.org/10.2478/apbi-2014-0001>.
- [6] A. Bandura, A. Lvov, The ionization constant of water over wide range of temperature and density, *J. Phys. Chem. Ref. Data* (2006) 793–800, doi:<http://dx.doi.org/10.1063/1.1928231>.
- [7] M.T. Reza, et al., Hydrothermal carbonization of loblolly pine: reaction chemistry and water balance, *Biomass Convers. Biorefin.* 4 (2014) 311–321, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s13399-014-0115-9>.
- [8] S. Kumar, et al., An Assessment of U(VI) removal from groundwater using biochar produced from hydrothermal carbonization, *J. Environ. Manage.* 92 (2011) 2504–2512, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.05.013>.
- [9] R. Ansari, et al., Highly efficient adsorption of anionic dyes from aqueous solutions using sawdust modified by cationic surfactant of cetyltrimethylammonium bromide, *J. Surfactants Deterg.* 15 (2012) 557–565, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s11743-012-1334-3>.
- [10] S. Chakraborty, et al., Adsorption study for the removal of a basic dye: experimental and modeling, *Chemosphere* 58 (2005) 1079–1086, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.066>.

- [11] Y. Bulut, N. Gözübenli, H. Aydın, Equilibrium and kinetics studies for adsorption of direct blue 71 from aqueous solution by wheat shells, *J. Hazard. Mater.* 144 (2007) 300–306, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.10.027>.
- [12] C. Namasivayam, et al., Removal of dyes from aqueous solutions by cellulosic waste orange peel, *Bioresour. Technol.* 57 (1996) 37–43, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00044-2](http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524(96)00044-2).
- [13] C.R. Silva, et al., Banana peel as an adsorbent for removing atrazine and ametryne from waters, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 2358–2363, doi:<http://dx.doi.org/10.1021/jf304742h>.
- [14] T. Robinson, B. Chandran, P. Nigam, Removal of dyes from a synthetic textile dye effluent by biosorption on apple pomace and wheat straw, *Water Res.* 36 (2002) 2824–2830, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/s0043-1354\(01\)00521-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00521-8).
- [15] A. Bhatnagar, et al., Coconut-based biosorbents for water treatment—a review of the recent literature, *Adv. Colloid Interface* 160 (2010) 1–15, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2010.06.011>.
- [16] M.-H. Baek, et al., Removal of Malachite Green from aqueous solution using degreased coffee bean, *J. Hazard. Mater.* 176 (2010) 820–828, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.110>.
- [17] S.S. Bayazit, I. İnci, H. Uslu, Adsorption of lactic acid from model fermentation broth onto activated carbon and amberlite IRA-67, *J. Chem. Eng. Data* 56 (2011) 1751–1754, doi:<http://dx.doi.org/10.1021/je1006345>.
- [18] H. Kalavathy, B. Karthik, L.R. Miranda, Removal and recovery of Ni and Zn from aqueous solution using activated carbon from *Hevea brasiliensis*: batch and column studies, *Colloids Surf. B* 78 (2010) 291–302, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.014>.
- [19] Z. Aksu, S. Tezer, Biosorption of reactive dyes on the green alga *Chlorella vulgaris*, *Process. Biochem.* 40 (2005) 1347–1361, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.007>.
- [20] V.J. Vilar, C.M. Botelho, R.A. Boavenutra, Methylene blue adsorption by algal biomass based materials: biosorbents characterization and process

- behaviour, *J. Hazard. Mater.* 147 (2007) 120–132, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.12.055.
- [21] R. Dolphen, et al., Adsorption of Reactive Red 141 from wastewater onto modified chitin, *J. Hazard. Mater.* 145 (2007) 250–255, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.11.026.
- [22] T.K. Saha, Adsorption of methyl orange onto chitosan from aqueous solution, *J. Water Resour. Prot.* 02 (2010) 898–906, doi:http://dx.doi.org/10.4236/jwarp.2010.210107.
- [23] Z. Yu, X. Wen, Screening and identification of yeasts for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 56 (2005) 109–114, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2005.05.006.
- [24] A. Mittal, L. Kurup, J. Mittal, Freundlich and Langmuir adsorption isotherms and kinetics for the removal of tartrazine from aqueous solutions using hen feathers, *J. Hazard. Mater.* 146 (2007) 243–248, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.12.012.
- [25] G. Crini, Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review, *Bioresour. Technol.* 97 (2006) 1061–1085, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.001.
- [26] S. Patel, Potential of fruit and vegetable wastes as novel biosorbents: summarizing the recent studies, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 11 (2012) 365–380, doi:http://dx.doi.org/10.1007/s11157-012-9297-4.
- [27] L.S. Chan, W.H. Cheung, G. McKay, Adsorption of acid dyes by bamboo derived activated carbon, *Desalination* 218 (2008) 304–312, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2007.02.026.
- [28] H. Lata, V.K. Garg, R.K. Gupta, Adsorptive removal of basic dye by chemically activated *Parthenium* biomass: equilibrium and kinetic modeling, *Desalination* 219 (2008) 250–261, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2007.05.018.
- [29] L. Mandi, et al., Low cost bio-sorbent for the removal of phenolic compounds from olive mill wastewater, in: L. Mandi, I. Martín, A. Rabi, R. Rodríguez, G. Trisorio-Liuzzi, M. El Moujabber (Eds.), *Technological perspectives for*

- rational use of water resources in the Mediterranean region, CIHEAM, Bari, 2009, pp. 179–186.
- [30] K.Y. Foo, B.H. Hameed, Insights into the modeling of adsorption isotherm systems, *Chem. Eng. J.* 156 (2010) 2–10, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2009.09.013>.
 - [31] M.T. Reza, et al., Engineered pellets from dry torrefied and HTC biochar blends, *Biomass Bioenergy* 63 (2014) 229–238, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.01.038>.
 - [32] M.C. Rillig, et al., Material derived from hydrothermal carbonization: effects on plant growth and arbuscular mycorrhiza, *Appl. Soil Ecol.* 45 (2010) 238–242, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.04.011>.
 - [33] R. Datta, et al., Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives, *FEMS Microbiol. Rev.* 16 (1995) 221–231, doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.1995.tb00168.x>.
 - [34] K. Narasimha Murthy, et al., Lactic acid bacteria (LAB) as plant growth promoting bacteria (PGPB) for the control of wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*, *Pest Manage. Hortic. Ecosyst.* (2012) 60–65.
 - [35] A. Kinnersley, et al., Promotion of plant growth by polymers of lactic acid, *Plant Growth Regul.* 9 (1990) 137–146, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/BF00027441>.
 - [36] S.J. Pirt, A kinetic study of the mode of growth of surface colonies of bacteria and fungi, *J. Gen. Microbiol.* 47 (1967) 181–197, doi:<http://dx.doi.org/10.1099/00221287-47-2-181>.

7.4 Investigation of spiral-wound membrane modules for the cross-flow nanofiltration of fermentation broth obtained from a pilot plant fermentation reactor for the continuous production of lactic acid

Autoren:

Hendrik Laube¹, Roland Schneider¹, Joachim Venus¹

zuzuordnende Forschungseinrichtungen:

¹Department of Bioengineering, Leibniz-Institute for Agricultural Engineering
Potsdam-Bornim e.V., Potsdam, Brandenburg, Germany

wissenschaftliche Fachzeitschrift:

Bioresources and Bioprocessing

veröffentlicht unter [CC-BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Abstract

The separation performance of seven polymer membranes for the nanofiltration of sodium lactate in fermentation broth was investigated. Each module was introduced into the test stand, and the system curve was obtained by recording the permeate flow velocity at different pump head levels. Performance benchmarks were good permeate quality, as determined by high permeate flow velocity, high sodium lactic concentration, low ion impurity concentration, and low organic impurity concentration.

Market research has shown that three companies, DOW (TW30, SW30, NF45), General Electric (DK73, DL73), and Microdyn-Nadir (NP30), distributed spiral-wound membrane modules for cross-flow filtration in a 2.5 by 40-inch module size, suitable for operation in the filtration test stand.

The measured permeate flow velocity was found to vary widely between the membranes. At a pump head of 250 m, DK73, NP30, and DL73 generated more than 200%, 300%, and 400% higher permeate flow velocities, respectively, than TW30 and NF45. A key benchmark, lactate rejection, was also highly dependent upon membrane type. The NP30, NF45 and TW30 membranes showed a decrease in lactate permeate flow velocity of 117%, 83%, and 348% starting at 205 m, 250 m, and 300 m, respectively. The DL73 had the overall best performance.

1 Introduction

With the ongoing scarcity of fossil-based fuels and chemicals, mankind has been driven to find new substitutes for petrochemical-based polymers [1]. Lactic acid (LA) has been identified by the Department of Energy (USA) as one of the top five bio-based monomers for the production of bio-polymers [2]. The first large-scale production of LA by bioprocessing was first reported in 2005 [3].

Cross-flow membrane filtration is now a mature technology [4]. Applications include liquid processing to effect clarification, product isolation, concentration and/or separation [5]. Selective, consistent separation, and the increased product yield in combination with a low energy consumption have made cross-flow filtration a suitable technique for the downstream processing of high-volume chemicals obtained from petrochemicals and fermentation processes [6].

In conventional filtration, the feed flow is perpendicular to the membrane surface [7]. This causes a buildup of debris, which eventually reduces fluid permeation. When the flow of the feed stream is tangential to the membrane surface, as it is in cross-flow filtration, the kinetic force of the stream results in a continuous scouring action, which is strong enough to eliminate almost any formation of a membrane fouling layer produced by debris and macromolecules contained in the feed stream [8].

Pressure is the driving force of the filtration process [9]. The fraction of the feed stream that passes through the membrane is called the “permeate” or “filtrate” [10]. The fraction that does not pass through the membrane is called the “retentate” or the “concentrate” [11]. In the case of sodium lactate filtration for the production of LA, the feed stream is the fermentation broth from either a batch or a continuous fermentation process [8]. It has a medium sodium lactate and a medium macromolecule concentration. The permeate has a high sodium lactate and a low macromolecule concentration. The retentate has a low sodium lactate and a high macromolecule concentration. The retentate, in the case of the continuous process, is either recycled back to the fermenter, along with the LA bacteria, or forwarded to another membrane separator [4]. This procedure is repeated until a low lactate concentration is reached. The permeate is further processed and not recycled to the fermenter. As a consequence, the macromolecules contained in the fermenter are continuously concentrated [12].

There is a wide range of cross-flow filtration modules available on the market, and the appropriate module depends on the size and type of the macromolecules, particles and solutes contained in the feed [13]. Laboratory experiments, with just the membrane film, can yield only a little information on the membrane module performance, making pilot plant experiments under production conditions mandatory [14]. For separation technologists to choose the right membrane, they have to explore individually how each membrane best performs the clarification task in the given process[5].

Within this study, seven spiral-wound, cross-flow filtration modules were investigated for their performance on the filtration of sodium lactate from fermentation broth. The membrane performances were evaluated in terms of permeate flow velocity, high lactate permeability and low macromolecule permeability. The target was to determine the most efficient membrane with a reasonable number of experiments.

2 Materials and Methods

2.1 Instrumentation and analytical equipment

Lactate concentration was analyzed by HPLC (Dionex Ultimate 3000) with the column Eurokat H (Knauer 300 X 8 mm, 10 μ m). The mobile phase consisted of 0.01 N H₂SO₄, with a flow of 0.8 ml/min and a pressure of 65 bar, with a temperature of 40°C. A refractive index detector (Shodex RI-101) was used with an auto sampler (Analytical WPS-3000TSL) and an injection volume of 10 μ l.

Inorganic anion concentration was determined by ion chromatography (Dionex ICS 1000) with the suppressed conductivity ASRS-Ultra detector. For the anion measurement, the IonPac AG9-HC column (pre column 4X50 mm) and IonPac AS9-HC (separation column 4x250 mm) were used with the mobile phase consisting of 9 mmol Na₂CO₃ and a flow of 1.2 ml/min. The pressure was set to 160 bar at room temperature. The injection volume of 25 μ l and the AS40 (Dionex) auto sampler were applied.

Inorganic cation concentration was analyzed by ion chromatography (Dionex ICS 1000) with the suppressed conductivity ASRS-Ultra detector. For the cation measurement, the IonPac CG 16 column (pre column 5x50 mm) and IonPac CS 16 column (separation column 5x250 mm) were used. The mobile phase consisted of 30 mmol MSA and the permeate flux was set to 1.0 ml/min. The pressure was set to 80 bar with a temperature of 40°C.

Organic fractions in the complex sample matrix were measured by capillary electrophoresis (CE) (Agilent 7100 Capillary Electrophoresis System) with UV detection. The electrolyte consisted of two additives, 25 mM borate, and 50 mM sodium dodecyl sulfate (SDS). The capillary employed was a bare fused silica bubble cell with an inner diameter of 50 μ m and length of 64 cm. The injection was carried out under the following conditions. The injection time was set to 10 sec. The pressure was set to 50 mbar. The temperature was set to 25°C. The current was set to -30 kV. The direct detection mode micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was applied. The detection wavelength and bandwidth were each 200 nm [15].

2.2 Experimental apparatus and procedure

The filtration plant, shown in Figure S1 (see Supporting Information Figure S1), was constructed by the UFI-TEC company, Germany.

Supporting Information Figure S1 Schematic set up of the cross-flow filtration plant with (PI) for pressure indicator, (FI) for flow through indicator, and (TI) for temperature indicator

At the beginning of each experiment, deionized water was used to measure the water permeate flux. At each pressure level, the permeate flux was measured four times and the arithmetic average was calculated. The feed pump installed into the plant provided a maximum pump head of 500 m. The pump head was raised by 50 m steps, starting from an initial membrane pump head of 100 m, until the individual maximum flux level of each membrane was reached. Each pump head level was maintained for 30 min; then, a sample from the permeate was taken. The permeate was collected in a 5 L measuring cup and forwarded into a 60 L plastic tank. Then, an additional 5 L of feed was provided to the feed tank. The permeate flux velocity was measured every two min by using a 250 ml measuring cylinder and a stopwatch for 10 or 30 sec. After the experiment, a sample from the retentate

was taken. The maximum pressures for the individual membranes are listed in Table S1 (see Supporting Information Table S1).

Supporting Information Table S1 Membrane characteristics taken from the factsheets

Membrane	DK7	DL7	NP3	NF4	NF9	TW3	SW3
	3	3	0	5	0	0	0
NMWCO [g/mol]	150 - 300		n.s.	200	n.s.	n.s.	n.s.
Minimum pH [-]	n.s.	n.s.	0	3	2	2	2
Maximum pH [-]	n.s.	n.s.	14	10	11	11	11
Maximum temperature [°C]	50	50	95	45	40	45	45
Maximum pressure [bar]	41.4	41.5	40	41	41	41	69
Active area [m ²]	1.6	1.7	1.8	2.6	2.6	2.6	2.8
Feed spacer thickness [mm]	1.27	1.27	1.1	n.s.	n.s.	0.7	n.s.
Permeate flow rate [m ³ /d]	1.3	1.7	1.728	3.5	2.3	3.2	2.6
Salt rejection [%]	98	96	80-95	98	90	99.5	99.4

The temperature was set to 25°C. The feed tank was filled with 25 L of microfiltered fermentation broth. The feed was pumped through a preliminary Teflon fabric filter and then fed to the membrane module. The two-way valve on the feed line was adjusted such that the flow meter for the membrane module indicated a cross-flow velocity of 300 L/h at 20°C. The rejection was calculated according to equation (1).

Membranes with a low pressure loss have a flat curve and hence have a high permeate flow velocity at moderate pump head values. This is the desired performance, as it allows for the generation of great quantities of filtered permeate at low operational costs. The pressure built up on the feed side is generated by the hydraulic performance of the pump, which again is proportional to the axial rotation of the impeller, which requires the force of the electrical motor.

2.3 Mathematic and graphic analysis

Each module was introduced into the test stand and the system curve was obtained by recording the permeate volume flow ($\dot{V}$) in $[ml \cdot s^{-1}]$ at different feed pressure levels. The permeate flow was divided by the individual membrane area (A) in $[m^2]$ to yield the permeate flow velocity (ϑ) in $[m \cdot s^{-1}]$. The set feed pressure level (P) in $[bar]$ was converted into the pump head losses (H_{Jt}) in $[m]$, using the water density (ρ) in $[kg \cdot m^{-3}]$ at the experimental conditions of 30°C and the gravity constant (g) in $[m \cdot s^{-2}]$. The measured values of each membrane were plotted as the pump head losses as a function of the permeate flow velocity. Both parameters stand in a quadratic relation by equation (1) [16, 17].

$$H_{Jt} = \frac{\vartheta^2}{2 \cdot g} \cdot \left(\frac{\lambda \cdot L}{d_i} + \sum \xi \right) \quad (1)$$

Equation (1) has the cubic form of equation (2).

$$f(x) = a \cdot x^2 \quad (2)$$

The dimensionless friction losses (λ) in $[-]$ was calculated by equation (3) [18].

$$\lambda = \frac{0,309}{\left(\lg \frac{Re_d}{7} \right)^2} \quad (3)$$

The Reynolds number (Re_d) in $[-]$ was calculated by equation (4), using the internal flow velocity (ϑ_i) in $[m \cdot s^{-1}]$ within the membrane module; the characteristic diameter (d_i) in $[m]$ defined as the horizontal inlet area generated by the feed spacer height and the membrane depth (see Table 1); and the dynamic viscosity (ν) in $[kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}]$, or the kinematic viscosity (η) in $[m^2 \cdot s^{-1}]$ of water at 30°C [19, 20].

$$Re_d = \frac{\vartheta_i \cdot d_i}{\nu} = \frac{\vartheta_i \cdot d_i \cdot \rho}{\eta} = \frac{\dot{m} \cdot d_i}{A \cdot \eta} \quad (4)$$

With the cubic form of (2), a equals as in equation (5).

$$a = \frac{1}{2 \cdot g} \cdot \left(\frac{\lambda \cdot L}{d_i} + \sum \xi \right) \quad (5)$$

The parameter a can also be obtained through the gradient of the system curve, which intersects the measured values of the membranes at exactly one point. Hence, the dimensionless summary score of all pressure losses for shaped pieces and fittings in the system ($\sum \xi$) $[-]$, which is mainly dominated by the pressure loss of the membrane, can be obtained through equation (6).

$$\sum \xi = 2 \cdot g \cdot a - \frac{\lambda \cdot L}{d_i} \quad (6)$$

In equation (6), (L) in [m] is the nominal length of the module, given in Table 1.

The pressure losses as the function of the pump head over the generated permeate flow velocity for water, fermentation broth and sodium lactate for the feeds, water and fermentation broth are given in Figure 1.a), b), c), and Table S3 (see Supporting Information Table S3). This type of representation allows for convenient analysis of the membrane performance [21]. Membranes with a low pressure loss have a flat curve and hence have a high permeate flow velocity at moderate pump head values. The performance will be evaluated by the pressure loss taken from equation (6), which is directly proportional to the pump head and the permeate flow velocity through equation (1) [22]. The system curves are numbered in sequence as they appear in the figure from left to right. Each system curve has its own pressure loss. Membrane points located on the same system curve share the same pressure loss at different pump head values [16]. A maximum of six pump head levels were applied, 50 to 300 m, in 50 m steps, with 50 m being the first and 300 m the sixth level, or rather the six-fold pump head height.

Table 1 Membrane characteristics taken from the producers' factsheets and the calculated Reynolds numbers according to the flow-through velocity for each membrane

membrane	[-]	DK 73	DL 73	NP 30	NF 45	NF 90	TW 30	SW 30
area	[m ²]	1.6	1.7	1.8	2.6	2.6	2.6	2.8
width	[m]	1.57	1.67	1.77	2.56	2.56	2.56	2.76
feed spacer	[mm]	1.27	1.27	1.1	0.9	0.9	0.7	0.9
thickness								
	[m]	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
feed spacer	[m ²]	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
area								
circular	[m]	0.050	0.052	0.050	0.054	0.054	0.048	0.056
area diam-								
eter								
flow veloc-	[m/s]	0.042	0.039	0.043	0.036	0.036	0.047	0.034
ity								
reynolds	[-]	2624	2546	2659	2445	2445	2773	2357
number								
friction	[-]	0.0466	0.0471	0.0464	0.0478	0.0478	0.0458	0.0484
losses								
b	[-]	0.9391	0.9204	0.9472	0.8963	0.8963	0.9741	0.8747

For the sake of clarity within the discussion of the membrane performance, the membrane points will be characterized by pump head level and the individual membrane pressure loss in percentage variance, compared with the individual membrane pressure loss at 50 m pump head. Both values will be given in round brackets divided by a slash, e.g., (1/60%).

The recovery for ions and impurities were calculated by equation (7).

$$R(\%) = \left(1 - \frac{C_F}{C_P}\right) \cdot 100\% \quad (7)$$

In equation (7) (C_F) in [ppm] is the concentration of the individual substance in the feed-tank and (C_P) in [ppm] in the permeate stream.

Supporting Information Table S3 Membrane resistance coefficients for all system curves of water, media and LA

No	System Curve Coefficients		
	Water [10^{14}]	Media [10^{15}]	LA [10^{17}]
1	4.31	500.65	3530
2	1.77	8.48	28.3
3	1.27	4.94	21.2
4	0.989	3.39	8.12
5	0.706	2.47	6.71
6	0.480	1.62	5.30
7	0.283	1.27	4.03
8	0.247	0.918	3.60
9	0.212	0.848	2.83
10	0.170	0.777	1.98
11	0.134	0.671	1.70
12	0.106	0.586	1.48
13	0.0989	0.516	1.34
14	0.0918	0.318	1.13
15	0.0671	0.290	1.08
16	0.0424	0.240	0.657
17	0.0346	0.212	0.565
18	0.0233	0.173	0.311
19	0.0127	0.152	0.297
20	-	0.145	-
21	-	0.113	-
22	-	0.0784	-
23	-	0.0706	-
24	-	0.0671	-

2.4 Upstream processing of sodium lactate

The hydrolysate was prepared from 75 kg of tapioca starch and 10.5 kg of yeast extract. The temperature was set to 80°C, and the pH level was set to pH 6 by addition of 20% NaOH. Then, 75 ml of the enzyme BAN (*Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase) from the Novozymes company (Bagsværd, Denmark) and 75 g of CaCl₂ were added and stirred for 20 min, using a stirrer velocity of 137 rpm with a pitched 3-blade impeller. The hydrolysate was thermally sterilized and then filtered. The overall permeate volume was 240 L.

For the fermentation, LA bacteria *Bacillus coagulans* - St. A59 was added, and the temperature was set to 52°C for 69 h. The volume at the beginning of the fermentation process was 708 L. During the fermentation process, 108 L of 20% NaOH solution was continuously added to maintain a pH of 6.0. After the fermentation process, the fermentation broth was sterilized. The sterilization was carried out at 119°C for 45 min.

The inactivated fermentation broth was microfiltered using 2 x CèRAM INSIDE from TAMI, Germany. The membrane material was ZrO₂ - TiO₂ with a pore size of 0.2 μ m and a total area of 6.65 m² [23]. The batch was split into charges of 60 L each and frozen for further processing. The microfiltered fermentation broth was characterized by a total nitrogen concentration of 944 ppm, a total phosphate concentration of 99 ppm, a nitrite content of 0.5 ppm, a volume of 900 L, a conductivity of 30 mS/cm, a pH of 6, and a sodium lactate concentration of 6,000 ppm. The concentration profiles of the ions after the microfiltration are given in Table 2.

For a better understanding of the context, the inactivated and microfiltered fermentation broth will be referred to as “media” thorough the rest of the manuscript.

Table 2 Ion concentration of the microfiltered fermentation broth and the ion rejection of the membranes at 30 bar (NP30 at 25 bar)

ions	concentration	rejection [%]					
[-]	[ppm]	DK73	DL73	NP30	NF45	TW3	SW30
						0	
Mg ²⁺	23	89	96	76	90	44	75
Ca ²⁺	88	78	89	71	89	23	63
K ⁺	357	16	11	66	49	41	69
Na ⁺	18,220	18	3	65	49	43	69
NH ₄ ⁺	111	29	27	76	39	46	70
Cl ⁻	112	-4	9	55	-25	25	39
SO ₄ ²⁻	153	71	64	65	88	26	61
PO ₄ ³⁻	11	74	55	56	100	-82	26

2.5 Market investigation, membrane selection and properties

Market investigation for suitable membrane modules was carried out with the following criteria: The membrane had to be commercially available in Germany. The membranes had to fit into cartridges with dimension of 2.5 inches (6.35 cm) in diameter and 40 inches (101.6 cm) in length. This was necessary for installation into the pilot plant. Nanofiltration membranes for the explicit application of the filtration of small molecular compounds (e.g., organic acids) in the permeate were preferred. The following membranes were acquired: from General Electric (GE Power & Water), model DK73 (DK2540F1073) and DL73 (DL2540F1073); from Microdyn-Nadir, model NP30 (Nadir NP030P); from Dow Chemical Company (Dow Water & Process Solutions), model TW30 (FILMTEC TW30-2549), SW30 (FILMTEC SW 30-2540), and NF45 (FILMTEC NF45-2540). All membranes were made of polyamide thin film composite material. The membranes' characteristics, obtained from the producer's fact sheets, are listed in Table 1 and Table S1 (see Supporting Information Table S1). The testing conditions are listed in Table S2 (see Supporting Information Table S2).

Supporting Information Table S2 Testing conditions of the membrane according to the fact sheets (n.s.) for not specified

Mem- brane	DK73	DL73	NF45	NF90	TW30	SW30	NP30
Sub- stance	MgSO ₄	MgSO ₄	MgSO ₄	MgSO ₄	NaCl	NaCl	Na ₂ SO ₄
Con- cen- tra- tion	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	32.000	n.s.
Tem- pera- ture	25	25	25	25	25	25	20
Dura- tion	24	24	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Varia- tion	25	25	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Re- covery	15	15	15	15	15	8	n.s.
Pres- sure	7.6	7.6	8.9	5	15.5	55	40
Per- meate flux	1.3	1.7	3.5	2.3	3.2	2.6	1.728

The DL series membrane was designed for industrial high flow nanofiltration with a minimum rejection of 96%, and the DK series membrane for industrial high rejection nanofiltration with a minimum rejection of 98%. Both were designed for dye removal and concentration; sodium chloride diafiltration; and metals recovery [24]. The NP30 membrane was designed for the preparation of acid and caustic solutions [25]. The NF45 membrane was labeled as a desalting nanofiltration element for process streams, including applications such as the desalting of organic compounds, acid processing, metal recovery and antifreeze recovery [26]. The

NF90 membrane was designed for the removal of high salt and iron concentrations and normal pesticide, herbicide, and total organic carbon (TOC) levels [27]. The TW30 membrane was designed for the production of the highest quality water, and the SW30 membrane was designed for seawater reverse osmosis, specifically to obtain the highest flow rates for sea and land-based desalination [28].

3 Results and Discussion

3.1 Membrane pressure losses for water, media and sodium lactate

To determine the optimal operating point of the membranes, the system curves of the membranes are plotted with the pump head as the function of the permeate flow velocity. The pressure losses were calculated according to the procedure described in section 2.3 and compared by their percentage deviation starting with the first pump head level and then according to the rising pump head. This allows for a straightforward identification of the optimal operation point of each membrane by applied pump head and effective pressure loss.

Figure 1.a shows the system curves of the membranes, with the pump head as the function of the applied permeate flow velocity using deionized water as the feed. The membranes DL73, DK73, and NF45 have decreasing pressure losses for increasing pump head, resulting in a flat curve.

Figure 1.a System curves of the different membrane modules for water as feed

(black fill: DL73, square; NF45, rhombus; DK73, circle; NP30, triangle;
white fill: TW30, square; SW30, rhombus; NF90, circle)

DL73 has the least pressure loss, with a doubling of the pump head decreasing the pressure loss by one half (102 m / 55%) and the tripling of the pump head decreasing the pressure loss (153 m / 30%) to one third; see Figure 2.a.

Figure 2.a Change of system curve coefficient in percentage for each membrane and pump head increase for water as feed

The membranes NP30, TW30, and SW30 only show a limited effect of the pump head on the pressure loss, resulting in steep slope in their system curve. The pressure loss of membrane NP30 remains at 88% at a pump head of 102 m. The pressure loss decreases to 48% at 153 m, but increasing the pump head to 204 m, 255 m, and 306 m had little effect on the pressure loss, with pressure loss measurements of 38%, 35%, and 33%, respectively.

Figure 1.b shows the system curves of the membranes, as the function of the pump head over the applied permeate flow velocity, using fermentation broth as the feed.

Figure 1.b System curves of the different membrane modules for media as feed (black fill: DL73, square; NF45, rhombus; DK73, circle; NP30, triangle; white fill: TW30, square; SW30, rhombus; NF90, circle)

The impact of the pump head on the permeate volume flow rate is more noticeable when fermentation broth is used as the feed than when water is used as the feed. Hence, the system curves for almost all of the membranes are flat and the system curves are shifted towards higher head pressures. This means that no permeate flow was observed until the pressure valve was adjusted to 82 m and 102 m for the membranes DK73, NP30, DL73, and TW30, SW30.

Despite the different basic pressure levels, all membranes show a significant effect on the pump head within the first two pump head levels. The pressure losses from 82 m to 102 m for NP30 and DL73 are reduced to 56%, and 76%, respectively, see Figure 2.b. At higher pump head levels, all membranes share similar reductions in pressure losses, at 204 m, the pressure losses are 7%, 28%, 21%, 20%, and 15% for the membranes DK73, NP30, DL73, NF45, and TW30, respectively.

Figure 2.b Change of system curve coefficient in percentage for each membrane and pump head increase for media as feed

A further increase of the pump head leads did not lead to a significant reduction of the pressure loss. At a pump head level of 255 m, none of the membranes gained an additional pressure loss of more than 4%. It can therefore be concluded that the optimal operating pump head for the membranes DL73, TW30, and NF45 is the 184 m level, whereas the membranes NP30, and DK73 can be best operated at a pump head level of 153 m. The best performance was shown by the membrane DK73, where a shift from 82 m to 153 m in the pump head leads to a reduction to 20% in the pressure loss; see Figure 2.b.

3.2 Lactate permeability

The lactate permeability is the most important feature of the membrane, as high lactate permeability allows for the purification of a greatest quantity of lactate for a given membrane area. Figure 1.c shows the pump head as a function of the applied permeate flow velocity of sodium lactate using fermentation broth as the feed. As the LA is only a small part of the fermentation broth, the permeate flow velocity of the LA within the fermentation broth is also quite small, and therefore, the system curves are steep. In the case of SW30, the permeability of LA was limited. The pump head had no significant effect on the pressure loss. In three cases, increasing the pump head increased the pressure loss above the initial value. TW30 at 286 m had a 348% higher pressure loss than at 255 m.

Figure 1.c System curves of the different membrane modules for LA as feed

(black fill: DL73, square; NF45, rhombus; DK73, circle; NP30, triangle; white fill: TW30, square; SW30, rhombus; NF90, circle)

The pressure loss of NP30 shifted from 79% at 184 m to 117% at 204 m, and the pressure loss of NF45 shifted from 44% at 204 m to 83% at 255 m; see Figure 2.c. The optimum membrane and pump head for high LA permeate flow velocity would be the DL73 at 153 m, with a pressure loss of 29%, one third of the initial pressure loss at 82 m and the highest overall LA flow, or the DK73 membrane with a pressure loss of 19% at 102 m. At higher pump head, no significant additional pressure loss is achieved.

Figure 2.c Change of system curve coefficient in percentage for each membrane and pump head increase for LA as feed

The experiments demonstrated that the media, but not the sodium lactate permeate flow velocity are proportional to the pump head. Hence, the sodium lactate permeability had to be determined individually for each membrane. The sodium lactate permeability is equally important for the overall process performance of a membrane. Low lactate permeability leads to poor process performance. The strong influence of the pump head on the membranes' lactate permeability makes investigation under real process conditions mandatory.

However, from the seven membranes investigated, two of the three membranes with the best water permeate flow velocity were also the membranes with best lactate permeate flow velocity.

3.3 Ion rejection

The quality of the generated permeate was investigated. The transport of charged molecules through the membrane produced a polarization of the membrane surface. Charged ions could diffuse through negatively charged membranes, but they were repelled by the positively charged membranes. Each membrane had a different rejection characteristic, which was expressed through the ion rejection and the organic molecule rejection.

Table 2 shows the ion rejection of the membranes. The membranes showed very different ion rejection characteristics. They demonstrated the Donnan effect, which described the electric potential equilibrium across the cross-section of the membrane. Bivalent ions were more strongly retained than monovalent ions. Of the bivalent ions, the cations (magnesium, calcium) were more strongly retained than the anions (sulfate, phosphate). The anions were pushed through the membrane to maintain potential equilibrium [29]. This resulted in a negative rejection in the case of chloride (DK73, NF45) and phosphate (TW30). The Donnan effect was partly compensated by the processing of the negatively charged lactate through the membrane, which contributed to the potential equilibrium. The low rejection of sodium provided evidence to support this thesis. The lowest sodium and potassium rejection was produced by DL73 and DK73, the membranes with the highest sodium lactate permeability. Both membranes had similar rejection characteristics. Three membranes (DL73, DK73, and NF45) produced good rejections for magnesium and calcium. The best average ion rejection was achieved by the NP30, where all ions were rejected by a minimum of 55% or higher. The three reverse osmosis membranes (NF45, TW30, and SW30) did not produce equally desirable ion rejection as the membranes that were designed for acid processing (DL73, DK73, NP30).

3.4 Organic solute rejection

Figure S2 (see Supporting Information Figure S2) shows the electropherograms generated by the CE system of the media permeate for the membranes and the feed [15]. The electropherograms portray the rejection characteristic of the organic molecule fractions in the permeate. The impurity fractions were made up of unknown organic molecules, so their concentration cannot be determined; however, their peak areas were set into an equivalent percentage of the lactate peak. Based on this relationship, the peak area purity was calculated. The sum of all peak areas equals 100%. Furthermore, the peak fractions are proportional to the polarity of the lactate. Impurity fractions close to the lactate peak did have similar polarity. The lactate peak did migrate at seven min, while the organic impurities migrated between three and six min.

Figure S2 (see Supporting Information Figure S2) illustrates that the feed impurity fractions were made of two minor single peaks, at 3.5 and 4.1 min, and three medium double peaks at 3.9 min, 4.3 and 5.4 min. The feed purity, calculated according to the total mesh area, was 81%. By comparing the media permeate peaks of the membranes with the feed peaks, the following results became apparent. Membranes with a high purity either had a lactate peak much greater than the impurity peaks, such as DL73 (70.6%), or rejected an impurity double peak at approximately 5 min, such as DK73 (79.5%) and NF45 (78.8%). Membranes with a lower permeate purity did not reject this specific fraction, e.g., NP30 (72.2%), SW30 (71.6%) at 30 bar and TW30 (64.7%) at 30 bar).

Supporting Information Figure S2 Electropherograms generated by the CE system of the feed and the membranes media permeate at 30 bar (NP30 at 25 bar)

Conclusions

In this study, the optimal pump head of seven commercially available nanofiltration membranes (NF90, DL73, NF45, DK73, SW30, TW30, and NP30) for the purification of sodium lactate from fermentation broth was investigated. The experiments on fermentation broth permeability and sodium lactate permeability showed that DL73 and NP30 produced good results. When fermentation broth was used as the feed, DL73 and NP30 achieved pressure losses of 22% and 28% at a pump head of 184 m and 204 m, respectively. However, the DK73 had the overall best performance according to the measured fermentation broth permeability and LA permeability, with pressure losses of 20% and 8% at a pump head of 153 m and 184 m, respectively.

Acknowledgements

We would like to thank the following people for their effort in supporting our research: Mr. R. Schneider for his help on fermentation, Mrs. U. Knuth for her help with ion chromatography, Mrs. G. Rehde for support with the LA determination on the HPLC, and finally the American Journal Experts (AJE) for language editing and manuscript revision.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

HL designed and coordinated the study, performed the data analysis and drafted the manuscript. RS carried out the fermentation procedure. All authors read and approved the final manuscript.

References

- [1] J.W. Eerkens, *The Nuclear Imperative - A Critical Look at the Approaching Energy Crisis*, 2 ed., Springer Netherlands, 2010.
- [2] T. Werpy, G. Petersen, J.J. Bozell, J.E. Holladay, D. Johnson, J.F. White, *Top Value-Added Chemicals from Biomass*, in: U.S.D.o. Energy (Ed.), Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2007.
- [3] E.T.H. Vink, S. Davies, J.J. Kolstad, ORIGINAL RESEARCH: The eco-profile for current Ingeo® polylactide production, *Industrial Biotechnology*, 6 (2010) 212-224.
- [4] B. Kamm, P.R. Gruber, M. Kamm, *Biorefineries-Industrial Processes and Products*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008.
- [5] A. Gautam, T.J. Menkhaus, Performance evaluation and fouling analysis for reverse osmosis and nanofiltration membranes during processing of lignocellulosic biomass hydrolysate, *Journal of Membrane Science*, 451 (2014) 252-265.
- [6] C. Abels, F. Carstensen, M. Wessling, Membrane processes in biorefinery applications, *Journal of Membrane Science*, 444 (2013) 285-317.
- [7] M. Mänttari, B. van der Bruggen, M. Nyström, Nanofiltration, in: S. Ramaswamy, H.-J. Huang, B.V. Ramarao (Eds.) *Separation and Purification Technologies in Biorefineries*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester; UK, 2013, pp. 233-258.
- [8] H. Carrère, F. Blaszkow, H.R.d. Balmann, Modelling the clarification of lactic acid fermentation broths by cross-flow microfiltration, *Journal of Membrane Science*, 186 (2001) 219-230.
- [9] A.K. Pabby, S.S.H. Rizvi, A.M. Sastre Requena, *Handbook of membrane separations*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2009.
- [10] K. Scott, *Handbook of industrial membranes*, 2 ed., Elsevier Advanced Technology, Oxford, 1998.
- [11] J.G. Crespo, K.W. Böddeker, *Membrane processes in separation and purification*, Kulwer Academic Publishers, Dordrecht [The Netherlands]; Boston, 1994.
- [12] J. Sikder, S. Chakraborty, P. Pal, E. Drioli, C. Bhattacharjee, Purification of lactic acid from microfiltrate fermentation broth by cross-flow nanofiltration, *Biochemical Engineering Journal*, 69 (2012) 130-137.
- [13] M.C. Porter, *Handbook of industrial membrane technology*, Noyes Publications, Park Ridge, N.J.; U.S.A, 1990.
- [14] W. Koschuh, V.H. Thang, S. Krasteva, S. Novalin, K.D. Kulbe, Flux and retention behaviour of nanofiltration and fine ultrafiltration membranes in filtrating juice from a green biorefinery: A membrane screening, *Journal of Membrane Science*, 261 (2005) 121-128.
- [15] H. Laube, F.-M. Matysik, A. Schmidberger, K. Mehlmann, A. Toursel, J. Boden, CE-UV/VIS and CE-MS for monitoring organic impurities during the downstream processing of fermentative-produced lactic acid from second-generation renewable feedstocks, *Journal of Biological Engineering*, 10 (2016) 1-11.
- [16] I.J. Karassik, *Pump handbook*, 4th ed., McGraw-Hill, New York, 2008.
- [17] Gebrüder Sulzer Aktiengesellschaft. Sulzer Pumps Ltd., Books24x7 Inc., *Centrifugal pump handbook*, third edition, in, Elsevier ; Butterworth-Heinemann, Amsterdam ; Boston, Oxford, U.K. ; Burlington, Mass., 2010.
- [18] H.A. Rothbart, T.H. Brown, *Mechanical design handbook : measurement, analysis, and control of dynamic systems*, 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 2006.
- [19] O. Reynolds, *An Experimental Investigation of the Circumstances Which Determine Whether the Motion of Water Shall Be Direct or Sinuous, and of the Law of Resistance*

- in Parallel Channels, Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 174 (1883) 935-982.
- [20] L.W. Mays, Hydraulic design handbook, McGraw-Hill, New York, 1999.
 - [21] J.I. Marriott, E. Sørensen, I.D.L. Bogle, Detailed mathematical modelling of membrane modules, Computers & Chemical Engineering, 25 (2001) 693-700.
 - [22] G. Schock, A. Miquel, Mass transfer and pressure loss in spiral wound modules, Desalination, 64 (1987) 339-352.
 - [23] TAMI, INSIDECÉRAM, in: Ceramic Tubular Membranes.
 - [24] GE, DL Series, in: Industrial High Flow Nanofiltration Elements, 2014.
 - [25] Microdyn-Nadir, Productcatalog, in: The art to clean solutions.
 - [26] Dow, FILMTEC™ NF-4040, in: Desalting Nanofiltration Elements for Process Streams.
 - [27] Dow, FILMTEC™ NF90-2540, in: Nanofiltration Elements for Commercial Systems.
 - [28] Dow, FILMTEC™ TW30-2540, in: Industry standard for reliable operation and production of high quality water T5 - Form No. 609-09030-0914 U6 - http://www.dowwaterandprocess.com/en/products/f/filmtec-tw30_2540 M4 - Citavi.
 - [29] F.G. Donnan, Theory of Membrane Equilibria and Membrane-Potentials in the Presence of Non-Dialyzing Electrolytes-A Contribution to Physical-Chemical Physiology (Reprinted from Zeitschrift Fur Elektrochemie und Angewandte Physikalische Chemie, Vol 17, Pg 572, 1911), Journal of Membrane Science, 100 (1995) 45-55.

8 Supporting Information

8.1 Capillary electrophoresis method for the analysis of organic acids and amino acids in the presence of strongly alternating concentrations of aqueous lactic acid

Supporting Information

Hendrik Laube^{1*}, Jana Boden², Roland Schneider¹

¹Department of Bioengineering, Leibniz-Institute for Agricultural Engineering Potsdam-Bornim e.V., Potsdam, Brandenburg, Germany

²ICA Boden-Haumann-Mainka, Engineering society for chemical analysis, Langen, Hessen, Germany

Correspondence: Department of Bioengineering, Leibniz-Institute for Agricultural Engineering Potsdam-Bornim e.V., Max-Eyth-Allee 100, D-14469 Potsdam, Germany

Tel/Fax: +49-(0331)-5699-121, E-mail: hlaube@atb-potsdam.de

Descriptive legend

Supplementary Figure S1 Method development - Conditions: Electrolyte, see Figure, Capillary: fused silica, 50 μm ID, enhanced detection cell (“bubble cell”), 56 cm, total 64.5 cm; Voltage: +30 kV, Temperature: 25°C; Injection: 10 s at 50 mbar, followed by electrolyte injection: 5 s at 50 mbar. Detection wavelength: 200 nm.

Supplementary Figure S2 Influence of the temperature - Conditions: Electrolyte, 25 mM borate, 50 mM SDS, Capillary: fused silica, 50 μm ID, enhanced detection cell (“bubble cell”), 56 cm, total 64.5 cm; Voltage: +30 kV, Temperature: see Figures; Injection: 10 s at 50 mbar, followed by electrolyte injection: 5 s at 50 mbar. Detection wavelength: 200 nm.

Supplementary Figure S3 Linearity of LA - Conditions: Electrolyte, 25 mM borate, 50 mM SDS, Capillary: fused silica, 50 μm ID, enhanced detection cell (“bubble cell”), 56 cm, total 64.5 cm; Voltage: +30 kV, Temperature: 35°C; Injection: 10 s at 50 mbar, followed by electrolyte injection: 5 s at 50 mbar. Detection wavelength: 200 nm.

Supplementary Figure S4 Linearity of LA – electropherograms - Conditions: Electrolyte, 25 mM borate, 50 mM SDS, Capillary: fused silica, 50 μm ID, enhanced detection cell (“bubble cell”), 56 cm, total 64.5 cm; Voltage: +30 kV, Temperature: 35°C; Injection: 10 s at 50 mbar, followed by electrolyte injection: 5 s at 50 mbar. Detection wavelength: 200 nm.

Supplementary Figure S5 Electropherograms taken from the impurity peak identification by addition of organic acids

Supplementary Figure S6 Electropherograms taken from the impurity peak identification by addition of amino acids

Supplementary Figure S7 Electropherograms taken from the nanofiltration of the process sample material

Supplementary Figure S1

Supplementary Figure S2

Peak areas:

concentration [g/l]:	0,02	0,2	1	2	3	5
1. Injection	9,41980E-03	1,02688E-01	4,89165E-01	1,00716E+00	1,45670E+00	2,42742E+00
2. Injection	9,47295E-03	1,05289E-01	4,71767E-01	9,80117E-01	1,45251E+00	2,48533E+00
3. Injection	1,04742E-02	1,00555E-01	4,64153E-01	9,75411E-01	1,45130E+00	2,40646E+00
average peak area	0,0098	0,1028	0,4750	0,9876	1,4535	2,4397
deviation:	6,07 %	2,31 %	2,70 %	1,73 %	0,19 %	1,67 %

	7,5	10	15	20
	3,68546E+00	4,90259E+00	7,49237E+00	1,00115E+01
	3,66871E+00	4,84441E+00	7,48092E+00	9,98865E+00
	3,63914E+00	4,97602E+00	7,47540E+00	1,00983E+01
	3,6644	4,9077	7,4829	10,0328
	0,64 %	1,34 %	0,12 %	0,58 %

Linearity:

Supplementary Figure S3

Supplementary Figure S4

Supplementary Figure S5

Supplementary Figure S6

Supplementary Figure S7

8.2 CE-UV/VIS and IC-CE-MS for the monitoring of organic impurities during downstream processing of fermentative produced lactic acid from second generation renewable feedstocks

Supporting Information

Hendrik Laube^{1*}, Frank-Michael Matysik²

¹Department of Bioengineering, Leibniz-Institute for Agricultural Engineering (ATB), Max-Eyth-Allee 100, Potsdam 14469, Germany

²Institute of Analytical Chemistry, Chemo- and Biosensors, University of Regensburg, Regensburg, Germany

Corresponding author Tel.: +49 (0) 331 5699 121; fax: +49 (0) 331 5699 849

E-mail address: hlaube@atb-potsdam.de (H. Laube)

Tables and Figures Capitations

Supplementary Table 1 Possible molecular formulas for the unknown compound.

Supplementary Figure 1 Extracted ion electropherogram of the diluted sample No. 14 (1:5) based on CE-MS measurements. Black: unknown compound. Red: lactic acid. The separation voltage was 30 kV.

Supplementary Figure 2 Extracted mass spectrum of the separated impurity in the lactic acid sample No. 14.

Supplementary Figure 3 Isotopic pattern of unknown compound in the sample No. 14 (top) and the calculated isotopic pattern for the formula $C_5H_6NO_3$.

Supplementary Figure 4 Electropherograms of the impurity m/z 128.042 in the diluted sample No. 14 and of the 1 mM PG-standard solution (in lactic acid matrix). Black: PGA-standard 1 mM. Red: unknown compound. Separation voltage 25 kV.

Supplementary Figure 5 Mass spectrum of the PGA standard solution.

Supplementary Figure 6 Full view of the NMR-spectra of the sample # 14.

Supplementary Figure 7 Part of the spectrum where the signals of the unknown compound can be seen.

Supplementary Figure 8 Experimental NMR spectrum of pyroglutamic acid. (Source: scifinder.cas.org)

Supplementary Figure 9

a) Optical Activity (value linked to the amount of biomass in the fermenter) of PGA during a 3 L and 100 L continuous fermentation

b) Optical Activity (value linked to the amount of biomass in the fermenter) of glucose during a 3 L and 100 L continuous fermentation

For further information please consult the Metabolomics research project found at: <http://www.atb-potsdam.de/en/research-programs/project.html?q=273>

Supplementary Figure 10 EPG taken from the blank run (#1), sample from the DSP after the WBA (#14) (#2), sample from the DSP after the distillation (#15) (#3), same sample as (#15) after a storage of 4 weeks (#4) and the Purac industrial LA (#5)

Supplementary Figure 11 Identified impurities peaks from the spiking experiments

Supplementary Table 1

#	Formulae	Score	m/z	Error	Error	mSigma	rdb
[-]	[-]	[-]	[-]	[mDa]	[ppm]	[-]	[-]
1	C ₅ H ₆ NO ₃	1.98	128.03532	-6.9	-53.8	8.1	3.5
2	C ₄ H ₆ N ₃ O ₂	100.00	128.04655	4.3	33.9	9.6	3.5
3	CH ₂ N ₇ O	0.00	128.03263	-9.6	-74.6	19.5	4.5
4	C ₉ H ₆ N	0.03	128.05057	8.4	65.4	58.4	7.5
5	C ₇ H ₂ N ₃	0.00	128.02542	0.0	0.0	781.9	8.5

Supplementary Figure 1

Supplementary Figure 2

Supplementary Figure 3

Supplementary Figure 4

Supplementary Figure 5

Supplementary Figure 6

Supplementary Figure 7

Supplementary Figure 8

a)

b)

Supplementary Figure 9

Supplementary Figure 10

Supplementary Figure 11

8.3 Column experiments using low cost bio- and conventional sorbents for the removal of inorganic ions from a sodium lactate fermentation broth

Supporting Information

Hendrik Laube^{1*}, M. Toufiq Reza^{2,3}

¹Department of Bioengineering, Leibniz-Institute for Agricultural Engineering (ATB), Max-Eyth-Allee 100, Potsdam 14469, Germany

²Department of Chemical and Materials Engineering, University of Nevada Reno, 1664 North Virginia Street, Reno, NV-89557, USA.

³APECS Group, Leibniz-Institute for Agricultural Engineering (ATB), Max-Eyth-Allee 100, Potsdam 14469, Germany

Corresponding author Tel.: +49 (331) 5699 121; fax: +49 (331) 5699 849

E-mail address: hlaube@atb-potsdam.de (H. Laube)

Tables and Figures

Supplementary Table 1 Flow rate (FR) and the percentage deviation (PD) of the adsorbents at different selected pumping capacities.

Supplementary Figure 1 Flow resistance, by means of the relationship of the selected pump capacity on the flow rate in the column packed with the different types of adsorbents.

Supplementary Figure 2 Repeated lactic acid column experiment with deionized water as washing solution

Supplementary Figure 3 LA concentration and conductivity in the outlet stream of the column for the industrial sorbents

Supplementary Table 1

rpm	20		30		40	
	FR	PD	FR	PD.	FR	PD
Name	[L h ⁻¹]	[%]	[L h ⁻¹]	[%]	[L h ⁻¹]	[%]
A 103 S	4.2	-1.4	6.1	-2.0	8.2	-1.1
MN 100	4.4	4.1	6.5	3.3	8.6	4.2
MN 102	4.3	1.4	6.4	2.1	8.6	3.8
MN 150	4.3	1.4	6.4	2.1	8.6	3.8
MN 502	3.6	-17.5	5.7	-10.1	7.9	-4.2
AC	4.1	-2.2	6.1	-2.5	8.3	0.4
Willow	4.0	-5.6	5.9	-6.1	7.8	-6.4
Poplar	4.5	5.1	6.2	-1.5	8.3	0.9
HTC-Willow	4.6	7.8	6.8	8.6	9.1	9.1
HTC-Poplar	3.0	-43.1	4.6	-34.6	6.3	-31.0
Chitosan	3.0	-39.6	4.9	-28.4	6.9	-19.6
Alginate	2.8	-53.3	5.3	-18.2	7.2	-14.6
Column	4.2	0.0	6.2	0.0	8.3	0.0

Supplementary Figure 1

Supplementary Figure 2

Supplementary Figure 3

8.4 Selection of spiral wounded pilot plant sized cross-flow filtration membranes for the purification of fermentative produced sodium lactate

Supporting Information

Hendrik Laube^{1*}, Roland Schneider¹⁾, Joachim Venus¹⁾

¹⁾Department of Bioengineering, Leibniz-Institute for Agricultural Engineering Potsdam-Bornim e.V., Potsdam, Brandenburg, Germany

Correspondence: Department of Bioengineering, Leibniz-Institute for Agricultural Engineering Potsdam-Bornim e.V., Max-Eyth-Allee 100, D-14469 Potsdam, Germany

Tel/Fax: +49-(0331)-5699-121, E-mail: hlaube@atb-potsdam.de

Descriptive legend

Supplementary Table S1 Membrane resistance coefficients for all system curves of water, media and LA

Supplementary Table S2 Equations

Supplementary Figure S1 Schematic set up of the cross-flow filtration plant with (PI) for pressure indicator, (FI) for flow through indicator, and (TI) for temperature indicator

Supplementary Figure S2 Electropherograms generated by the CE system of the feed and the membranes media permeate at 30 bar (NP30 at 25 bar)

Supplementary Table S1

No	System Curve Coefficients		
	Water [10^{14}]	Media [10^{15}]	LA [10^{17}]
1	4.31	500.65	3530
2	1.77	8.48	28.3
3	1.27	4.94	21.2
4	0.989	3.39	8.12
5	0.706	2.47	6.71
6	0.480	1.62	5.30
7	0.283	1.27	4.03
8	0.247	0.918	3.60
9	0.212	0.848	2.83
10	0.170	0.777	1.98
11	0.134	0.671	1.70
12	0.106	0.586	1.48
13	0.0989	0.516	1.34
14	0.0918	0.318	1.13
15	0.0671	0.290	1.08
16	0.0424	0.240	0.657
17	0.0346	0.212	0.565
18	0.0233	0.173	0.311
19	0.0127	0.152	0.297
20	-	0.145	-
21	-	0.113	-
22	-	0.0784	-
23	-	0.0706	-
24	-	0.0671	-

Supplementary Table S2

$$H_{Jt} = \frac{\vartheta^2}{2 \cdot g} \cdot \left(\frac{\lambda \cdot L}{d_i} + \sum \xi \right) \quad (1)$$

$$f(x) = a \cdot x^2 \quad (2)$$

$$\lambda = \frac{0.309}{\left(\lg \frac{Re_d}{7} \right)^2} \quad (3)$$

$$Re_d = \frac{\vartheta_i \cdot d_i}{\nu} = \frac{\vartheta_i \cdot d_i \cdot \rho}{\eta} = \frac{\dot{m} \cdot d_i}{A \cdot \eta} \quad (4)$$

$$a = \frac{1}{2 \cdot g} \cdot \left(\frac{\lambda \cdot L}{d_i} + \sum \xi \right) \quad (5)$$

$$\sum \xi = 2 \cdot g \cdot a - \frac{\lambda \cdot L}{d_i} \quad (6)$$

$$R(\%) = \left(1 - \frac{C_F}{C_P} \right) \cdot 100\% \quad (7)$$

Supplementary Figure S1

Supplementary Figure S2