

Verfahrensentwicklung zur Produktion von Ethylacetat aus Molkenrückständen – Mikrobielle Ester-Synthese und innovative prozessintegrierte Produktabtrennung



Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle(n):	Technische Universität Dresden Institut für Naturstofftechnik Professur für Lebensmitteltechnik Prof. Dr. Harald Rohm/PD Dr. Doris Jaros/PD Dr. Christian Löser Fraunhofer-Institut für Keramische Technologien und Systeme (IKTS) Standort Hermsdorf Prof. Dr. Alexander Michaelis/Dr. Marcus Weyd/Dr. Hannes Richter
Industriegruppe(n):	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin
Projektkoordinator:	Dr. Hans Besner Müller Service GmbH, Freising
Laufzeit:	2018 – 2022
Zuwendungssumme:	€ 461.228,--

Ausgangssituation

Bei der Milchverarbeitung fallen in Deutschland jährlich ca. 12,6 Mio. Tonnen Molke an. Molke enthält je nach Typ 3-9 g/L Molkenproteine, etwa 50 g/L Lactose sowie Mineralstoffe und stellt somit einen wertvollen Rohstoff dar. Bei der Gewinnung von Molkeninhaltsstoffen ist die Abtrennung der Proteine durch Ultrafiltration deshalb häufig der erste Schritt. Aus dem Permeat kann nach Aufkonzentrierung ein großer Teil der Lactose kristallisiert werden. In diesem Fall verbleibt nach Abtrennung der Lactosekristalle die Mutterlauge, deren Weiterverwertung wegen ihres hohen Salzgehaltes als problematisch gilt.

Konzentriertes Molkenpermeat sowie die Mutterlauge sind jedoch interessante Rohstoffquellen für biotechnologische Stoffwandlungen. Untersucht wurde bereits die mikrobielle Produktion von Ethanol, 2,3-Butandiol, Essigsäure, Milchsäure, Buttersäure, Methan und β -Galactosidase; allerdings sind bisher nur die Produktion von Ethanol und β -Galactosidase im industriellen Maßstab umgesetzt.

Auch in Großanlagen hat das Verfahren zur Produktion von Bioethanol aus Nebenprodukten der Molke-eiweißgewinnung mehrere Nachteile: (a) die benötigte Hefe muss in einer vorgeschalteten aeroben Prozessstufe gezüchtet werden; (b) die anaerobe Vergärung der Lactose zu Ethanol ist wegen verschiedener Hemmeffekte (Salzfracht und akkumulierendes Ethanol) langwierig; (c) die Biomasse aus der Fermentation ist weitgehend inaktiv und kaum wiederverwendbar und (d) das Ethanol muss aus der Gärflüssigkeit durch energieaufwändige Rektifikation abgetrennt werden.

Alternativ kann Lactose mit Hefen aerob zu Ethylacetat (Essigsäureethylester) umgesetzt werden. Ethylacetat ist ein organisches Lösungsmittel, das z. B. bei chemischen Reaktionen (z.B. der Biodieselproduktion), zur Extraktion und chromatographischen Gewinnung von Naturstoffen und Pharmazieprodukten, zur Reinigung und Beschichtung von Oberflächen sowie in Klebstoffen, Druckfarben und Lacken eingesetzt wird (globale Produktion ca. 1,7 Mio. Tonnen p.a.). Der Bedarf an Ethylacetat wächst stetig, weil es wegen seiner mikrobiellen Abbaubarkeit als umweltfreundlich gilt und andere umweltschädliche Lösungsmittel zunehmend verdrängt.

Gegenwärtig wird Ethylacetat ausschließlich in petrochemischen Prozessen aus Erdgas und Erdölderivaten gewonnen, die Kosten sind somit von den Rohstoffpreisen abhängig. Mikrobiell hergestelltes Ethylacetat wäre hingegen ein nachhaltig erzeugtes Bioprodukt, aus dem mit entsprechenden Vermarktungsstrategien Waren mit gutem Image und hoher Wertschöpfung hergestellt werden könnten (z.B. haltbarer Bio-Kleber).

Ziel des Forschungsvorhabens war es, ein funktionstüchtiges und wirtschaftlich arbeitendes Verfahren zu entwickeln, das a) die in konzentriertem Molkenpermeat und Mutterlauge enthaltene Lactose mikrobiell zu Ethylacetat konvertiert und b) mit einer prozessintegrierten Produktgewinnung über ein innovatives Membranverfahren koppelt, um diese Molkenreststoffe (z. B. Mutterlauge nach der Lactosekristallisation) in ein marktfähiges Produkt zu überführen.

Forschungsergebnis

Eine besondere Herausforderung bei der Verwertung von Melasse-basierter Lactose zu Ethylacetat war die wachstumshemmende Salzfracht. Zunächst wurden deshalb Melassen und andere Molkenderivate verschiedener Molkereien hinsichtlich ihrer Zusammensetzung charakterisiert und eine Melasse mit moderater Salzfracht ausgewählt, von der erwartet wurde, dass diese ein Hefewachstum ermöglicht; diese Melasse enthielt 185 g/L Zucker, 58 g/L Mineralsalze, 20 g/L Zitrat, 11 g/L Lactat und 400 µg/L Eisen. Wegen eines erwarteten Nährstoffdefizits wurde die Melasse mit Harnstoff und notwendigen Spurenelementen außer Eisen supplementiert.

Die Pasteurisierung der Melasse für 30 s bei 90 °C konnte eine Dominanz der autochthonen Bakterien nicht verhindern. Autoklavierte Melasse wirkte stark hemmend auf die Hefen. Eine Verdünnung der Melasse im Verhältnis 1:1 mit Wasser (VF2-Medium) ermöglichte das Wachstum von *K. marxianus* DSM 5422 (μ maximal 0,60 h⁻¹, Biomassertrag 0,32 g g⁻¹ bei pH 5,1 und 40 °C als optimaler Temperatur).

Eisenmangel induziert die Bildung von Ethylacetat. Obwohl VF2-Medium relativ viel Eisen enthält, kam es zur Esterbildung. Es wurde angenommen, dass das Citrat in der Melasse Eisen komplexiert und somit die Eisenaufnahme behindert. Diese Komplexbildung ist pH-abhängig. Deshalb wurde die Esterbildung bei pH-Werten im Bereich von 4,5 bis 5,9 untersucht. Bei pH 5,1 wurden die besten Ergebnisse erzielt: die geringste Biomassebildung, eine maximale Ausbeute an Ester (61 %), eine hohe Esterbildungsrate (bis zu 1,12 g g⁻¹ h⁻¹), wenig Nebenprodukte (81 % aller Produkte und 99,2 % der gestrippten Produkte war Ethylacetat), eine hohe Produktivität, und die geringste Prozessdauer.

Kurz vor Erschöpfung des Zuckers war die Esterbildungsrate maximal, nahm dann aber wegen Nährstoffmangels rasch ab. Die Aktivität der Biomasse war jedoch zum Ende aller Batch-Prozesse hoch. Daher wurde der Prozess durch eine Fed-Batch-Kultivierung verlängert, wodurch sich die Produktivität stark erhöhte und die gebildete Estermenge verdoppelte. Vergleichbar positive Effekte wurden mit der Repeated-Batch-Kultivierung erzielt. Der Batch-Prozess ließ sich auch durch einen Feed mit unverdünnter Melasse fortführen, die autoklavierte Melasse wirkte jedoch deutlich hemmend. Die Batch-Kultivierung in unsterilem VF2-Medium war auch möglich, ein ausreichend großes Inokulum vorausgesetzt. Der Hemmeffekt in unsterilen Medien ist deutlich geringer.

Die hohe Flüchtigkeit des Ethylacetats ermöglicht die Produktabtrennung im laufenden Prozess. Der Ester wird mit der Abluft aus dem Reaktor ausgetragen und wirkt somit der Akkumulation des Esters entgegen und verhindert so eine Produkthemmung. Die effektive Abtrennung des Esters aus der Abluft des Bioreaktors ist

eine essentielle Komponente eines wirtschaftlich arbeitenden Gesamtverfahrens. Dafür wird eine selektive Membran benötigt, die Ethylacetat, aber keine Inertgase (N_2 , O_2 , CO_2) hindurchlässt.

Zur Membranentwicklung wurden zunächst verschiedene Adsorbentien (Aktivkohlen, Zeolithe) synthetisiert bzw. konditioniert und zusammen mit potentiellen Einbettungsmaterialien in Adsorptionsversuchen getestet. Insbesondere ZIF-8 und der aluminium-freie MFI/Silikalith zeigten eine starke Adsorption von Ethylacetat und eine geringe Affinität zu Wasserdampf, der auch im Abgas enthalten ist. Mit diesen Materialien wurden anschließend verschiedene Membranen entwickelt und getestet. Die Adsorbentien-Polymer-Komposite waren rein anorganischen Membranen klar überlegen. Anschließend wurden Flachmembranen aus einem Träger und einer aktiven Schicht aus PDMS-MFI- bzw. PDMS-ZIF8-Komposit oder Silicon als 0,3 m breite Bahnen gefertigt und mittels Ethylacetat-haltiger Gasströme umfangreich getestet. Hohe und reproduzierbare Trennleistungen wurden mit der PDMS-MFI-Kompositmembran erreicht.

Im realen Trennversuch wurde der Bioreaktor mit zwei in Reihe geschalteten Membranmodulen (mit jeweils $0,0172 \text{ m}^2$ Fläche) gekoppelt. Der Abtrenngrad der Einzelmodule betrug stabil je 75 %, der Abtrenngrad bei der zusammen 94 %. Der Ester reicherte sich im Permeat um den Faktor 7,5 bis 10 an. Es wurden 81 % des permeierten Esters mittels Kühlfalle vakuumseitig kondensiert (bei $-78 \text{ }^\circ\text{C}$), wobei das vereinigte Kondensat aus 97,4 % Ethylacetat, 2,35 % Wasser und 0,25 % Ethanol bestand. Somit wurde die Tragfähigkeit des Konzeptes der Estergewinnung mittels Membranverfahren nachgewiesen.

Wirtschaftliche Bedeutung

Das bei der Molkenverarbeitung anfallende Permeat und vor allem die bei der Lactosekristallisation aus konzentriertem Molkenpermeat anfallende Mutterlauge bieten bisher nur eingeschränkte Wertschöpfungsmöglichkeiten. Der hohe Mineralstoffgehalt schränkt die Verwendungsmöglichkeiten stark ein und die Entsorgung verursacht hohe Kosten. Die mikrobielle Konversion der noch enthaltenen Lactose zu Ethanol wird bereits im technischen Maßstab praktiziert, weist aber auch Nachteile auf. Mit der Entwicklung eines Gesamtverfahrens zur mikrobiellen Produktion von Ethylacetat wird ein innovativer Weg zur Verwertung dieser Molkenrückstände aufgezeigt. Die wirtschaftliche Bedeutung des Vorhabens liegt einerseits in der Generierung von Mehrwert aus Reststoffen und andererseits auch in der Reduzierung der Organikfracht der Mutterlauge (Senkung des löslichen CSB um ca. 95 %) und somit in einer essentiellen Senkung der Entsorgungskosten.

Die Entwicklung der Module und des Membranprozesses wird darüber hinaus weitere Anwendungsmöglichkeiten für die Membrantechnologie zur Abtrennung und Rückgewinnung von flüchtigen organischen Verbindungen aus Gasströmen eröffnen. Dies gilt insbesondere für Anwendungen, in denen feuchte Gasgemische vorliegen und die Organik selektiv entfernt werden soll. Membranhersteller werden, spezifisch für Gruppen von Lösungsmitteln, Membrantypen weiterentwickeln und anpassen können. Unternehmen des mittelständisch geprägten Maschinen- und Anlagenbaus können ihren Tätigkeitsbereich um die Gas- und Dampfbehandlung erweitern. Für auf Flüssigfiltration fokussierte Anlagenhersteller ergeben sich zudem neue Absatzmärkte für Membranmodule und -anlagen.

Publikationen (Auswahl)

1. FEI-Schlussbericht (2022).
2. Hoffmann, A., Kupsch, C., Walther, T. & Löser, C.: Synthesis of ethyl acetate from glucose by *Kluyveromyces marxianus*, *Cyberlindnera jadinii* and *Wickerhamomyces anomalus* depending on the induction mode. Eng. Life Sci. 21 (3-4), 154-168. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000048> (2021).
3. Löser, C., Kupsch, C., Walther, T. & Hoffmann, A.: A new approach for balancing the microbial synthesis of ethyl acetate and other volatile metabolites during aerobic bioreactor cultivations. Eng. Life Sci. 21 (3-4), 137-153. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000047> (2021).

4. Hoyer, T., Weyd, M., Löser, C., & Hoffmann, A.: Membrandurchlässigkeit neu gedacht. *Kautsch. Gummi Kunstst.* 75 (6), 22-24. (2022).
5. Weyd, M. & Hoyer, T.: Kompositmembran zur Gewinnung nachhaltiger Lösemittel aus Melasse. *Jahresbericht Fraunhofer IKTS 2021/2022*, 41. (2022).
6. Weyd, M.: Ethyl acetate from molasses for adhesives, inks and varnishes. *Pitture e vernici, European coatings* 99 (2), 76. (2023).
7. Hoffmann, A., Franz, A., Walther, T. & Löser, C.: Utilization of delactosed whey permeate for the synthesis of ethyl acetate with *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 107, 1635-1648. (2023).
8. Hoffmann, A., Franz, A., Löser, C., Hoyer, T., Weyd, M., & Walther, T.: In situ Product Recovery of Microbially Synthesized Ethyl Acetate from the Exhaust Gas of a Bioreactor by Membrane Technology. *Engineering in life sciences*, 24(12), e202400041, <https://doi.org/10.1002/elsc.202400041>, (2024).

Weiteres Informationsmaterial

Technische Universität Dresden
Institut für Naturstofftechnik
Professur für Lebensmitteltechnik
Bergstraße 120, 01069 Dresden
Tel.: +49 351463-39283
Fax: +49 351463-37761
E-Mail: doris.jaros@tu-dresden.de

Fraunhofer-Institut für Keramische Technologien und Systeme (IKTS)
Michael-Faraday-Str. 1, 07629 Hermsdorf
Tel.: +49 366019301-3937
Fax: +49 3512554-368
E-Mail: marcus.weyd@ikts.fraunhofer.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

Förderhinweis

... ein Projekt der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.