



Bachelorarbeit

Analyse von Olivenölmühlenabwasser als Substrat zur Biogasgewinnung

Betreuer: Prof. Dr.-Ing. Heralt Schöne

Dipl.-Ing Andreas Speetzen

Erstellungszeitraum: vom 21.12.2010 bis 21.02.2011

Durchgeführt von: Reiner Ihns

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis2010-0635-0

Abstract

By-products of the food industries are often high of biological load. The use of these organic components is a main target of a whole industry. Many studies were carried out for recovery and cleaning of food wastes. The olive oil production process ends with a waste that cannot be disposed in a commercial way. In this study, the olive oil mill waste water (OMWW) was analyzed and effort were done by fermentations in batch type reactors to gain biogas. The produced gas volumes of fermented glucose substrate, glucose – acetic acid substrate, OMWW and OMWW – glucose substrate were compared. For analyzing the OMWW density, pH, colour, chemical oxygen demand, dry matter, ash, raw fat, raw protein, and total phenols were measured.

Zusammenfassung

Die Verwendung von biologischen Produkten zur Biogasherstellung erfüllt zwei wichtige Aufgaben, zum einen die Gewinnung von energiereichen Produkten zur regenerativen Nutzung, zum anderen die Verwertung und Reinigung von Lebensmittelabfällen.

Für diese Bachelorarbeit wurde Olivenölmühlenabwasser (OMWW) untersucht und in Batch-Reaktoren anaerob fermentiert. Es wurden die Dichte, der pH-Wert, die Farbwerte, der chemische Sauerstoffbedarf, die Trockensubstanz, der Asche-, Rohfett-, Rohprotein- und Gesamtphenolgehalt bestimmt. Als Vergleichssubstrate für die Fermentation wurden Glucose, Glucose-Essigsäuregemisch und OMWW-Glucosegemisch verwendet, um die Gasausbeute der Versuche zu vergleichen. Gasvolumen am Ende der Versuche in absteigender Reinfeld: Glucose-Essigsäure-, Glucosesubstrat, OMWW, OMWW-Glucosesubstrat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Technologie der Olivenölmühlen	3
2.1	Effekte der eingesetzten Olivenölmühlentechnologie	4
3	Charakterisierung von Abfällen aus der Olivenölherstellung.....	7
4	Phenolische Verbindungen im OMWW	8
4.1	Methoden zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von Phenolen in OMWW.	10
5	Untersuchungen von OMWW	11
5.1	Dichtebestimmung.....	11
5.2	pH- Wert.....	12
5.3	Farbmessung.....	12
5.4	Sauerstoffbedarf.....	13
5.5	Gesamtphenolgehalt	14
5.6	Gesamtrohprotein (GT)	19
5.7	Aschegehalt	19
5.8	Organische Trockensubstanz (oTS).....	22
5.9	Wasseranteil.....	22
5.10	Rohprotein (RP).....	23
5.11	Rohfett (RFe).....	24
5.12	Rohfaser (RFa)	25
5.13	Stickstofffreie Extraktstoffe (NfE)	25
6	Biogasbildung	26
7	Gärversuche in Batch-Behältern	27
7.1	Fermentationsversuche	27
8	Resultate und Auswertung	28
9	Literaturverzeichnis	36

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigsten Phenolsäuren im OMWW (nach Balice & Cera, 1984)	8
Tabelle 2: Ergebnisse der Dichtebestimmung von OMWW mit Pyknometer	12
Tabelle 3: L* a* b* Farbmessung von OMWW	13
Tabelle 4: Standardlösung der Gallussäure	15
Tabelle 5: Extinktion der Standardlösungen	16
Tabelle 6: Ergebnisse der Extinktionsmessung der Proben bei 765 nm	18
Tabelle 7: Trockensubstanz von OMWW	20
Tabelle 8: Aschegehalt von OMWW	21
Tabelle 9: Wasseranteil von OMWW	22
Tabelle 10: Kjeldahl-N und Rohprotein gehalt von OMWW	24
Tabelle 11: Rohfettbestimmung von OMWW	25
Tabelle 12: Ergebnisse der OMWW Analysen	25
Tabelle 13: pH-Werte von fermentierten verdünnten OMWW und verdünnten OMWW-Glucosesubstrat	34
Tabelle 14: CSB und Gasvolumen Ergebnisse	35

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: „Mola Olearia“ (Quelle: http://members.fortunecity.es/guadalhorcete/guadalhorcete%202002/paneles/triada/mola_olearia.jpg)	3
Abbildung 2: Produktionssysteme für Olivenöl (nach Vlyssides A.G. et al., 1998)	6
Abbildung 3: 2-Phenyl-Chroman (http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/systematik/6_droge/gifs/flavan.gif)	9
Abbildung 4: Kalibriererde für Gallussäure	17
Abbildung 5: Die 4 Stufen des mikrobiellen anaeroben Abbaus (nach Bischofsberger & Dichtl (2005) und Bank M. (1995))	26
Abbildung 6: Biogasbildung - Glucosesubstrat	28
Abbildung 7: Methankonzentration - Glucosesubstrat	28
Abbildung 8: Biogasbildung - Glucose-Essigsäuresubstrat	30
Abbildung 9: Methankonzentration - Glucose-Essigsäuresubstrat	30
Abbildung 10: Biogasbildung - verdünntes OMWW	32
Abbildung 11: Methankonzentration - verdünntes OMWW	32
Abbildung 12: Biogasbildung - verdünntes OMWW-Glucosesubstrat	33
Abbildung 13: Methankonzentration - verdünntes OMWW-Glucosesubstrat	33

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
BSB ₅	Biochemischer Sauerstoffbedarf in 5 Tagen
CH ₄	(Bio-)Methan, „Erdgas“
CO ₂	Kohlen(stoff)dioxid
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
EU	Europäische Union
FAOSTAT	Statistiken der Welternährungsorganisation
GC	Gas-Chromatographie
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IOOC	International Olive Oil Council
NMR	Kernspinresonanz
MS	Massenspektroskopie
OMWW	„Olive mill waste water“ – Olivenmühelnabwasser
RPHPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
TLC	Thin Layer Chromatography
VDLUFA	Verband deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
UV	Ultraviolett
WZV	Wasserzweckverband

1 Einleitung

Der Olivenbaum gehört zur Familie der *Oleaceae*, die in 30 Spezies unterteilt wird. Die einzige Nutzpflanze der Familie, die essbare Früchte trägt wird *Olea europaea* L genannt. Sie wurde und wird aufgrund ihrer prallen, fleischigen und öligen Frucht kultiviert. Der Mittelmeerraum ist die weltgrößte Region der Olivenproduktion (99% der Weltproduktion), die Länder Spanien (4.556.000 t), Italien (3.149.830 t), Griechenland (2.300.000 t) und Türkei (1.800.000 t) sind weltweit die Erzeugerländer mit den meisten Ernteerträgen und größten Anbauflächen. Weitere nennenswerte Anbaugebiete auf anderen Teilen der Erde sind zu finden in Kalifornien (USA), Australien, Iran, Argentinien und Peru (FAOSTAT, 2004). Durch den riesigen Anbau von Oliven in den Ländern der Europäischen Union (EU), ist es nicht abwegig das diese Länder auch den maßgeblichen Anteil an Olivenöl herstellen (80,2%) (Erntejahren 1999/2000-2002/2003, IOOC Daten, Dezember 2004). Die Zahlen der Anbaumengen bedeuten für die Anbauregionen auch ein erhöhtes Aufkommen an Herstellern in dem Bereich. In der EU sind rund 2,5 Millionen Menschen im Olivenproduktionssektor beschäftigt, auf die Gesamtmenge der EU betrachtet wären es fast ein Drittel aller EU-Agrarwirte. Neben den Olivenlandwirten wird der Sektor der Olivenölherzeugung in den Bereichen der Genossenschaften, Mühlen/Mischer, Raffinerien, Extraktionsanlagen und Marketingfirmen eingeteilt (Niaounakis & Halvadakis, 2006). Wobei den Mühlen ein besonderes Aufmerksamkeit geschenkt werden muss, sie zählen im Bereich der EU über 12.000 Stück und sind größtenteils in Familienbesitz, mit weniger als 10 Angestellten. In Spanien wurden Olivenölmühlen in Genossenschaften zusammen geschlossen um einen größeren Durchsatz zu ermöglichen. Die Anzahl an Extraktionsanlagen, wo die Olivensamen und Olivenschalen einer Extraktion unterlaufen um den Restölgehalt aus ihnen zu gewinnen, ist deutlich kleiner als die der Mühlen. Sie zählen in Spanien, Italien und Griechenland zwischen 40 und 50 Stück in jedem Land (Niaounakis & Halvadakis, 2006).

Kultivierung von Olivenbäumen und die damit verbundenen Arbeitsprozesse des Anbaus, Pflege und der Ernte der Früchte wurden selten in großen Agrarverbänden durchgeführt. Daher sind sehr viel kleine Landgüter die sogar nur teilzeitlich bewirtschaftet werden anzutreffen. Eine Fläche von 4% wird von der möglichen zu bewirtschaftenden Gesamtfläche der EU von der Olivenlandwirtschaft eingenommen. Es wird laut der Europäischer Kommission eine Fläche von 5.163.000 ha für den Olivenanbau genutzt, wobei die drei größten Anbauländer Spanien (48%), Italien (22,5%) und Griechenland (20%) schon über

90% der Fläche aus machen (Generaldirektion Landwirtschaft und ländliche Entwicklung, 2000).

Oliven gehören zu den Steinfrüchten und diese werden in drei Hauptbereiche unterteilt, Epikarp, Mesokarp und Endokarp. Das Epikarp ist überzogen mit einer Wachsschicht und zeigt sich grün während der Wachstumsphase. In der Reifephase verändert das Epikarp seine Farbe und erscheint violett, braun oder schwarz. Der fleischige Teil, Mesokarp, ist der Sitz, der wertgebenden Substanz, der Öle. Der in der Mitte der Olive befindliche Stein, Endokarp, ist hart und aus faserigem Lignin aufgebaut. Er schließt den Samen ein, der Samen ist aufgrund seines Ölgehaltes von Bedeutung. Wichtig für die Olivenölherstellung ist ein hohes Mesokarp/Endokarp Verhältnis (Niaounakis & Halvadakis, 2006). Die Oliven setzen sich aus 50% Wasser, 22% Öl, 19,1% Kohlenhydrate, 5,8% Zellulose, 1,6% Proteine und 1,5% Mineralstoffe zusammen. Hydrophile und lipophile phenolische Verbindungen erreichen einen 3%igen Anteil vom Gewicht des Mesokarps. Die Phenolsäuren, Phenolalkohole, Flavonoide und Secoiridoide sind die Hauptvertreter der hydrophilen Gruppe. Das Oleuropein, ein Secoiridoidglucosid, ist für den bitteren Geschmack der Olivenfrucht verantwortlich. Die Kresole (C_7H_8O , Methylphenole) werden als wichtigster Bestandteil der lipophilen Gruppe gewertet.

Die Produktion von Olivenöl ist ein industrieller Prozess, dieser endet, mit einem Produkt von niedriger Entropie, dem Olivenöl. Auf der anderen Seite, entsteht ein Nebenprodukt, unerwünscht, mit hoher Entropie, dem Olivenölmühlenabwasser (engl.: olive-mill waste water – OMWW).

2 Technologie der Olivenölmühlen

Die Anfänge der Olivenölgewinnung reichen bis auf „Pliny the Elder“ (römischer Schriftsteller, 23-79 vor Christus) zurück. Der Handel und die Ausdehnung des Anbaus vergrößerten sich sehr schnell zu dieser Zeit. Berichte aus Palästina übermitteln Beweise für die Olivenölextraktionen aus der Zeit 4500 bis 3500 vor Christus (Niaounakis & Halvadakis, 2006).

Die drei wesentlichen Stufen der Olivenölproduktion sind zerkleinern, pressen und trennen der öligen Phase von der wässrigen Phase.

Die Zerkleinerungsarbeit wurde in den vergangenen Jahrhunderten auf ein kleinstmögliches Niveau an manueller Arbeit gesenkt. Wo früher mit den Füßen auf harten Untergrund oder mit zylindrischen Steinen in einer Schale viel körperliche Ertüchtigung verlangt wurde, waren Entwicklungen wie die „Mola Olearia“ (Abbildung 1) die von Maultieren angetrieben wurden nicht nur von der Ausbeute an Olivenöl auch vom Arbeitsaufwand von Vorteil.

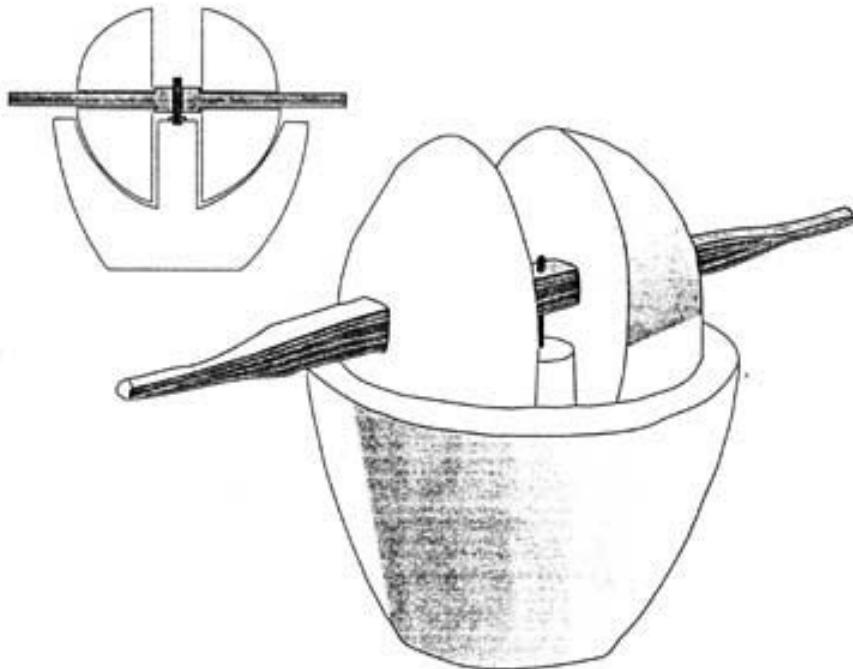


Abbildung 1: „Mola Olearia“ (Quelle: http://members.fortunecity.es/guadalhorcete/guadalhorcete%202002/paneles/triada/mola_olearia.jpg)

Die Nachfolgende Pressung basierte lange Zeit auf einfachster Technologie die mit der Hebel- und später Schraubenpresse deutlich verbessert wurde (Hadjisavvas, 1992). Der Übergang zu einer neuartigen Herstellungsmethode wurde in der zweiten Hälfte des achtzehnten Jahrhunderts erlangt. Es wurde eine höhere Qualität mit Verbesserten Eigenschaften

angestrebt, dadurch wurde die Haltbarkeit deutlich angehoben und der Genusswert maximiert. Da die Ernte der Oliven zu einem früheren Zeitpunkt gelegt wurde, wo die Frucht noch unreif ist, um den Säuregehalt im Öl zu mindern, brachte der höhere Arbeitsaufwand neue Kosten mit sich, die auf das Produkt übertragen werden mussten und dadurch ein gestiegenen Stellenwert auf dem Markt bekam (Mazzotti, 2004). Die unreife, nicht weiche Olive stellte neue Herausforderungen an die Presstechnologie. Die heute Verwendeten Nylonmatten, auf denen die Olivenpaste ausgestrichen wird, müssen hydraulisch belastbar sein. Abhängig von der Bauweise und der Größe der Anlage liegen die aufgebrachten Drücke bei 300- 500 kg/cm² (1bar = 1,0197 kg/cm²). Die Trennung von Öl und Wasser konnte durch das Prinzip der Gravitation erlangt werden, die Öl enthaltende Phase wurde abgeschöpft. Ebenso einfach war die Methode bei der das gefüllte Fass eine Auslaufmöglichkeit am Boden hatte (Niaounakis & Halvadakis, 2006).

2.1 Effekte der eingesetzten Olivenölmühlentechnologie

Die Olivenölproduktion wird derweilen in zwei Hauptabschnitte unterteilt, der Bereitung einer homogenen Paste und die Extraktion und Aufbereitung des Öls.

Im ersten Abschnitt werden die Oliven gemahlen und kräftig vermischt. Um die Zellen weiter auf zu brechen, wird mit Hilfe von Wärme so lange erhitzt bis sich große Öltropfen bilden. Der zweite Schritt beginnt mit der Pressung und dem anschließenden Dekantieren, Wasser und Öl werden dann durch Zentrifugieren getrennt. Das Öl wird durch verschiedene Verfahren, wie zum Beispiel Sedimentieren oder Filtrieren gereinigt (Caputo et al., 2003).

Die größte Bedeutung im Bezug auf die Abwassermenge und Zusammensetzung kommt dem angewandten Methoden des Zentrifugierens zu. Die zum Einsatz gebrachten Verfahren zur Trennung von Öl, Wasser und Feststoffe werden unterschieden in, die drei und zwei Phasen – Zentrifugations- Systeme und die traditionelle Technologie (Niaounakis & Halvadakis, 2006).

Ein sehr gutes Abscheiden von festen Bestandteilen, dem Öl und des Wassers wird mit der drei Phasen-Zentrifugationstechnologie erreicht. Die Ausnutzung der horizontalen Kräfte in der Zentrifuge und den physikalischen Dichteunterschied von Öl und Wasser führt zu einer hohen Olivenölausbeute. Die anfallende Menge an Abwasser ist im Vergleich zum traditionellen Verfahren höher. Durch den geringeren Einsatz an Arbeitskräften im Bezug auf das traditionelle System sind viele Olivenölmühlen mit diesem Verfahren ausgestattet. Das entstandene Abwasser ist von der Menge beeinflusst durch, das Einbringen von frischem Wasser beim reinigen der Filterplatten, dem Equipment und der Räume, so wie das waschen

der Oliven und das extrahierte Vegetationswasser der Olive (Niaounakis & Halvadakis, 2006).

Die Bestrebungen die Abwassermenge zu reduzieren brachte das 2 Phasen- Zentrifugation als Entwicklung hervor. Diese Technologie benötigt keine weitere Wasserzugaben beim Arbeitsvorgang, sie erzeugt auch kein OMWW, dafür aber ein sehr feuchten Presskuchen, der die unerwünschten Inhaltsstoffe in sich birgt und daher nicht weiter verarbeitet werden kann. In Gebieten mit limitierter Wasserversorgung findet dieses Verfahren ein gestiegenes Interesse. Der Presskuchen weist eine gülleähnliche Konsistenz auf, der Wassergehalt liegt bei 55-70%, im Vergleich mit dem Presskuchen des traditionellen Verfahrens ist dieser deutlich höher (20-25%). Das zwei und drei Phasensystem beinhaltet zweimaliges zentrifugieren des Öl-Wassergemisches. In der traditionellen Extraktion ist es nach dem mechanischen Pressen nur zu einer einmaligen Zentrifugation gekommen, da beim Pressen die meisten festen Anteile zurückgehalten wurden (Niaounakis & Halvadakis, 2006).

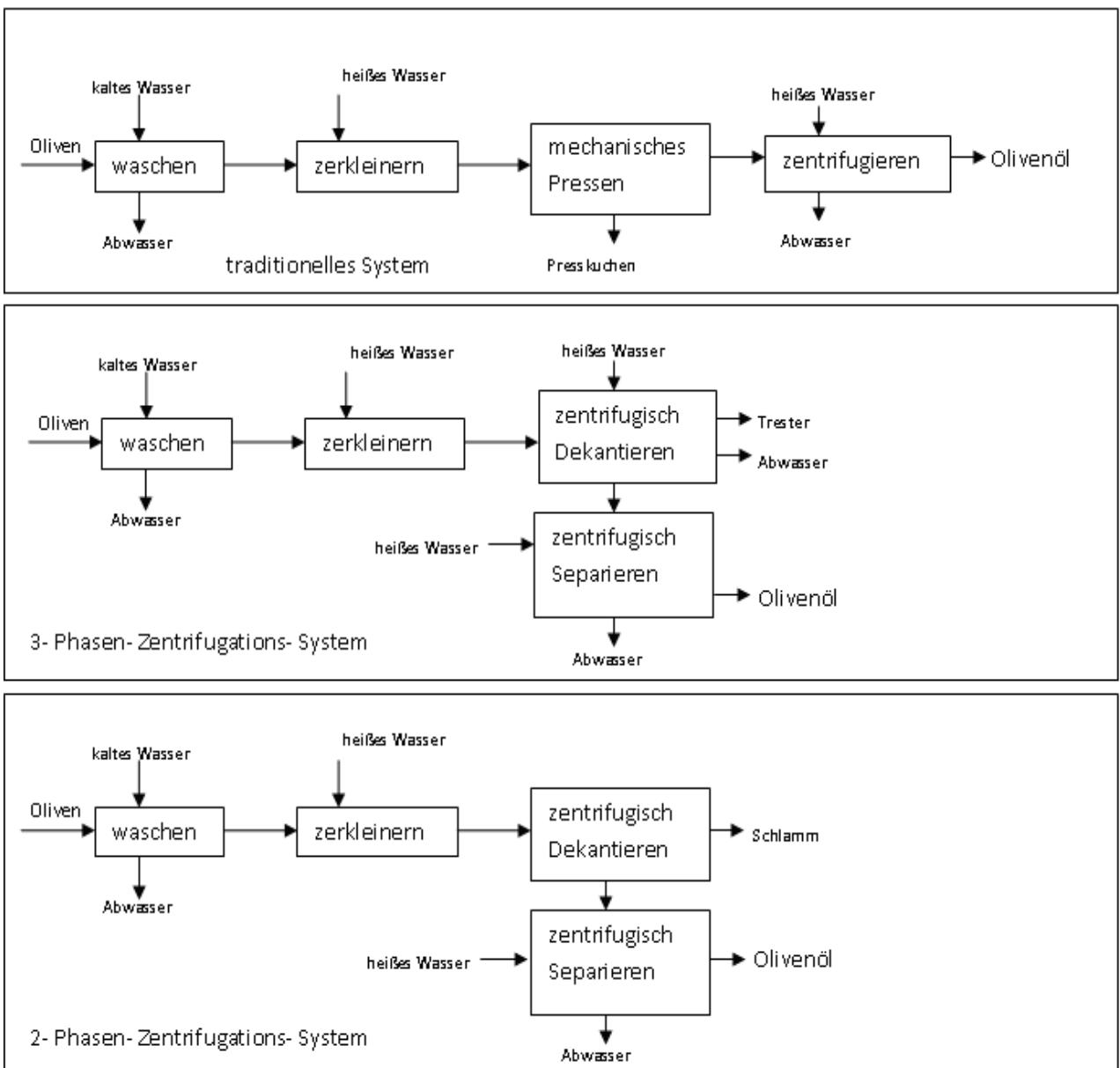


Abbildung 2: Produktionssysteme für Olivenoel (nach Vlyssides A.G. et al., 1998)

3 Charakterisierung von Abfällen aus der Olivenölherstellung

Die Olivenölherstellung ist eine saisonale Produktion, das bedeutet dass die Weiterverarbeitung der Rohfrucht Olive, nach der Ernte baldmöglichst erfolgen sollte. Die Verarbeitung der Olive erreicht eine Ölausbeute um die 20%, Feste- (Halb-Feste) Abfälle haben einen Anteil an 30% und die Menge an wässrigen Überschussflüssigkeiten beträgt 50%. Die Zusammensetzung der Olivenmühlenausscheidungen hängt stark von den eingesetzten Olivenmühlverfahren ab. Der sogenannte grobe Olivenkuchen (engl.: crude olive cake) - Feste- (Halb-Feste) Abfälle setzt sich aus den Schalenrückständen und den Olivenkernen zusammen. Diese werden nach einer Trocknung mit heißer Luft zur Restölextraktion mit Hexan weiter verarbeitet (Niaounakis & Halvadakis, 2006). Die wässrige Phase der Abfälle besteht zu einem aus dem Vegetationswasser und zum anderen aus dem wässrigen Anteil aus der Olivenfrucht. In den einzelnen Produktionsschritten wird Wasser eingesetzt, z.B. zum reinigen der Rohfrucht, Filterteilen, Räumen und Maschinen, welches mit dem flüssigen Nebenprodukt zusammengeführt wird, diese gesamte Wassermixtur nennt man „Olivenmühlenabwasser“. Das OMWW ist eine relativ stabile Emulsion, aus Öl, Pektin, Kohlenhydraten und phenolhaltigen Verbindungen, die sich durch eine dunkle, trübe Farbe mit sehr individuellem Geruch auszeichnet. Die Zusammensetzung des OMWW wird sehr stark von der Angewendeten Extraktionsmethode, der Art und der Reifegrad der Frucht, der Lagerdauer, die jeweiligen Gebietseigenen klimatischen Konditionen und spezifischen Bodeneigenschaften beeinflusst. Die Hauptfraktion des OMWW stellt das Wasser (80- 83%), die organischen Verbindungen haben Anteile von 15- 18% und die anorganischen Verbindungen tragen bis zu 2% bei (Niaounakis & Halvadakis, 2006).

Die Nutzung als Dünger in der Landwirtschaft, durch den hohen Gehalt an Proteinen, Polysacchariden, Mineralsalzen und anderen nützlichen Inhaltsstoffen (z.B. Huminsäure), würde mit wenig Kosten und wenig Aufwand verbunden sein, da dieses durch die enthaltenen Phyto- und Biotoxine nicht möglich ist müssen andere Möglichkeiten der Veräußerung gefunden werden. Der Anteil an phenolischen Verbindungen im OMWW birgt die phytotoxischen und antibakteriellen Eigenschaften in sich. Auch der niedrige pH Wert (4,5- 5), die dunkle Farbe und der starke ölige Geruch machen das OMWW nicht zu einem einsetzbaren Düngemittel.

Der Kohlenhydratanteil im OMWW beträgt in der Regel zwischen 1,6 bis 4%. Es wurden Fruktose, Mannose, Glukose, Saccharose und Spuren von Pentose gefunden (Fernández-Bolaños et al., 1983). Die phenolischen Bestandteile der Olivenfrucht sind bedeutend stärker

hydrophil als lipophil. Aufgrund der geringen Menge phenolischer Verbindungen mit lipophilen Charakter, sind nur wenige im Olivenöl wiederzufinden (1-2% der gesamt Phenol-Verbindungen der Olivenfrucht). Der größte Betrag an phenolischen Verbindungen geht mit dem OMWW und dem Olivenpresskuchen verloren. Die jährliche Erzeugung von OMWW beläuft sich auf eine Menge von 7 bis über 30 Millionen m³, die Schwankungen lassen sich durch die unterschiedlichen Ernteerträge und durch die Datenquellen erklären (Cabrera, 1996; Moktar Hamdi, 1992).

Die drei häufigsten genannten Auswirkungen auf die Umwelt sind, eine erhöhte organische Verunreinigungsgefahr des OMWW durch den sehr hohen chemischen und biologischen Sauerstoffbedarf, das Vorhandensein von Phytotoxine und die antimikrobielle Wirkung der Pholypheole zurück zu führen (S’habou et al., 2009).

4 Phenolische Verbindungen im OMWW

Hamdi M. (1992) klassifizierte die phenolischen Bestandteile des OMWW in zwei gröbere Gruppen, die einfachen phenolischen Verbindungen (nicht autoxierte Tannine mit niedrigem Molekulargewicht) und Flavonoide.

Die am häufigsten vorkommenden Phenolsäuren im OMWW sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Häufigsten Phenolsäuren im OMWW (nach Balice & Cera, 1984)

Name der Phenolsäuren	Synonym, chemische Bezeichnung
Syringasäure	4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoësäure
Vanillinsäure	4-Hydroxyphenyllessigsäure
Veratrumsäure	3,4-Dimethoxybenzoësäure
Kaffesäure	3,4-Dihydroxyzimtsäure
Protocatechusäure	3,4-Dihydroxybenzoësäure
p- Cumarsäure	4-Hydroxy-zimtsäure
Zimtsäure	3-Phenylacrylsäure

Zu den Flavonoiden, die sehr oft gefunden wurden, zählen die Anthocyane, Apigenin, Apigenin-7-glucoside, Cyanidin, Cyanidin-3-glucoside, Cyanidin-3-rutinoside, Flavones, Luteolin, Luteolin-7-glucoside, Quercetin und Rutin (Niaounakis & Halvadakis, 2006).

Zu den Polyphenolen gehören Gruppen von Farbstoffen (Flavone, Anthocyanidine), Geschmacksstoffe und Gerbstoffe (Catechine, Tannine), die aus mindestens zwei phenolischen Hydroxy-Gruppen im Molekül aufgebaut sind. Flavonoide weisen ein C₁₅-Grundgerüst als spezielles Merkmal auf, diese Farbstoffe können ebenso auch Derivate von Phenylpropan sein. Eine Reihe von verschiedenen Begriffen verbirgt sich hinter den Flavonoiden, es werden zum Beispiel die Anthocyanidine, Aurone, Chalkone, Desoxyanthocyanidine, Flavanole (Catechine), Flavandiole (Leukoanthocyanidine), Flavanone, Flavanonole, Flavone, Flavonole, Isoflavanone, Isoflavone sowie deren jeweiligen Glycoside genannt. Das Chroman, das als Grundgerüst bei den Tocopherolen und Rotenoiden vorkommt, bildet auch für das 2-Phenyl-Chroman (Flavan) den Grundkörper (Abbildung 3). Die Flavonoid-Typen werden nach den Oxidationsgrad an den Kohlenstoffatomen C-2,-3 und -4 unterschieden.

Die bekannten entzündungshemmenden Eigenschaften einiger Flavonoiden (hemmen und stimulieren der Prostaglandin-Synthese) werden hoch geschätzt. In ihrer Eigenschaft als Enzyminhibitor werden die pharmakologischen Wirkungen ausgenutzt; z.B. antihämoragisch, antiödematos, spasmolytisch, antiviral und antiallergisch. Das verbreitetste positive Beispiel für das die Flavonoide stehen ist das French Paradoxon. Dabei wird der Rotweinkonsum in Frankreich für ein niedrigeres Risiko für koronare Herzerkrankungen verantwortlich gemacht.

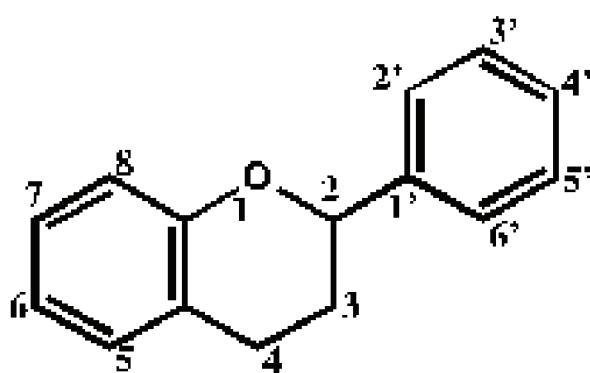


Abbildung 3: 2-Phenyl-Chroman (http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/systematik/6_droge/gifs/flavan.gif)

4.1 Methoden zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von Phenolen in OMWW

Die Menge der gesamten Phenole werden Traditionell mit einer spektro-photometrischen Methode nach Folin-Ciocaltaeu gemessen. Die angewandten chromatographischen Methoden zur Untersuchung von OMWW auf bestimmte Phenole und den Gesamtgehalt sind HPLC (High Performance Liquid Chromatographie), GC (Gaschromatographie), TLC (Thin Layer Chromatography) und RPHPLC (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography). Die Ultraviolete Radiation (UV), die Kernspinresonanz (NMR) und die Massenspektroskopie (MS) können als spektroskopische Methoden aufgeführt werden (Niaounakis & Halvadakis, 2006). Capasso R. (1999) beschreibt zwei weitere spektroskopische Methoden zum Analysieren von OMWW durch Elektronenionisation (EI) und Fast Atom Bombardment (FAB), jeweils gekoppelt mit MS. Verschiedene Techniken zur Ionisation können zum Einsatz gebracht werden, z.B. Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) und Electrospray Ionization (ESI). Die Kapillarzonenelektrophorese hat als größten Vorteil gegenüber den chromatographischen Methoden die Schnelligkeit, die Separation der Fraktionen dauert nur wenige Minuten.

5 Untersuchungen von OMWW

Der folgende Abschnitt beschreibt die einzelnen Bestimmungen der Weender Futtermittelanalyse (TS, Aschegehalt, oTS, RP, RFe, NfE), den Sauerstoffbedarf, pH-Wert, Dichte und Gesamtphenolgehalt und ihre Durchführung, sowie Auswertung für OMWW. Die OMWW-Probe wurde von einem italienischen OMWW-Aufbewahrung-Becken nach Deutschland (Hochschule Neubrandenburg) geliefert.

5.1 Dichtebestimmung

Die Dichte wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen Verfahren bestimmt. Die Verwendung eines Senkkörpers von bestimmten Volumen ($V = 10 \text{ cm}^3$) und eine spezielle Analysenwaage (Voyager, OHAUS, Switzerland) mit Vorrichtung zum einhängen des Körpers war die eine, das Pyknometer die andere.

Die Probe musste auf 20°C temperiert werden um ein genaueres Ergebnis zu erzielen, bei der Anwendung des Senkkörpers. Das Gewicht des Senkkörpers wurde in der Luft (A) gemessen (30,5078 g), im Anschluss wurde der Senkkörper in der Probe (B) gewogen. Die Differenz des Gewichtes des Senkkörpers in der Luft und in der Probe wurde durch das Volumen des Senkkörpers geteilt und ergab die Dichte in g/cm³.

$$Q = \frac{A - B}{V} = \frac{30,5078 \text{ g} - 20,5789 \text{ g}}{10 \text{ cm}^3} = 0,9928 \text{ g/cm}^3$$

Die trockenen Pyknometer wurden gewogen und dann mit Probe gefüllt. Die Pyknometer waren anschließen für 20 – 30 Minuten in einem 20 °C warmen Wasserbad. Nach sorgfältiger Trocknung der Pyknometer mit saugfähigen Tüchern wurden sie gewogen. Die Dichte ergibt sich aus dem Gewicht der gefüllten (A) minus des Leergewichts (B) der Pyknometer dividiert mit dem jeweiligen Volumen (V) der Pyknometer. Die Ergebnisse der Dichtebestimmung sind in Tabelle 2 aufgeführt.

$$Q = \frac{A - B}{V}$$

Tabelle 2: Ergebnisse der Dichtebestimmung von OMWW mit Pyknometer

Pyknometernummer	Leergewicht Pyknometer[g]	Pyknometer + Probe [g]	Pyknometer Volumen [cm ³]	Dichte [g/cm ³]
1	21,4933	46,2750	24,675	1,0043
2	20,9854	46,1267	25,313	0,9932
3	20,9220	46,1478	25,112	1,0045
Durchschnittliche Dichte:				1,0007

Da die Dichte sehr nahe an 1,0000 g/cm³ war, konnte auf eine Umrechnung von Gewichtseinheiten in Volumeneinheiten unter Einbezug der Dichte verzichtet werden. Die Masse von 1 Liter wurde dann mit einem Kilogramm angenommen.

5.2 pH- Wert

Unter dem pH- Wert einer Lösung versteht man den negativen dekadischen Logarithmus des Zahlenwertes der Wasserstoff- Ionenkonzentration. Die Messung wurde mit einem pH- Meter durchgeführt, sie ergab einen pH Wert von 5,3. Dieser Wert ist nach anderen Autoren an der oberen Spannweite für ein 3 Phasen –Zentrifugen System (pH 4,7 – 5,3) (Tsonis et al., 1989).

5.3 Farbmessung

Ein L* a* b* Farbmessgerät (Minolta, CR-A 70, Japan) wurde zur Farbmessung eingesetzt. Die L* - Achse steht für die Luminanz, beim Maximalwert von L* = 100 ist ein reines Weiß zu erwarten und bei dem Minimalwert von L* = 0 ein tiefes Schwarz. Die a* - Achse verweist auf die Farben Grün und Rot, wenn ein positiver Wert gemessen wird lässt sich auf die Farbe des Stoffes schließen das sie in einen rötlichen Ton hinein geht. Bei Messungen von negativen a* Werten kann daraus geschlossen werden dass die Farbe sich ins grünliche bewegt. Die Werte der a* - Achse sind von -150 bis + 100 skaliert. Die b* - Achse zeigt als negativen Wert die blauen Farbanteile und als positiven Wert die gelben Anteile an, sie können einen maximal Wert erlangen von +150 und einen minimal Wert von -100.

Nach zwei Blindwertmessungen mit Wasser zur Kalibrierung wurde die Probe 5-mal gemessen, die Ergebnisse der Farbmessung sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: L* a* b* Farbmessung von OMWW

Messung	L*	a*	b*
1	32,31	-1,61	4,11
2	32,30	-1,56	4,15
3	32,34	-1,7	4,15
4	32,47	-1,74	4,12
5	32,40	-1,7	4,12
Durchschnitt:	32,36	-1,66	4,13

Der L*- Wert zeigte das sich die Farbe im dunklen Bereich der Skala befand. Die Augenscheinliche wahrgenommene Farbe konnte als bräunlich erkannt werden. Durch den a* - Wert lässt sich ein Grünanteil nachweisen. Der gemessene b* -Wert stellt ein gelbliches Potential da.

5.4 Sauerstoffbedarf

Der Biologische Sauerstoffbedarf (BSB₅, biochemical oxygen demand- BOD) bestimmt die aerob Mikrobiel abbaubaren Stoffe. Ergibt die Menge an Sauerstoff die in 5 Tagen durch Mikroorganismen verzehrt wurde an, die Einheit mg/l oder g/l sind gebräuchlich. Dieser Test wurde nicht für das vorliegende OMWW durchgeführt. Aus den verschiedenen Quellen ist zu entnehmen das der BSB₅ in der Größenordnung 13 - 44 g/l vorliegen kann (Bradley & Baruchello, 1980; Tsonis & Grigoropoulos, 1983)

Der Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB, chemical oxygen demand- COD) wird als Maß für alle organischen oxidierenden Stoffe angegeben. Als chemisches Oxidationsmittel wird in der Regel Kaliumdichromat (K₂Cr₂O₇) verwendet, es kommt aber auch Kaliumpermanganat als Oxidationsmittel zum Einsatz. Die Angaben erfolgen auch hier in mg/l, aufgrund des sehr hohen CSB's von OMWW wird die Einheit g/l gewählt. Das OMWW aus dem 3- Phasensystem hat eine Spanne von 25 -78 g/l CSB bei den oben genannten Autoren hervorgebracht. Der CSB für das OMWW das durch die traditionelle Herstellung anfällt liegt noch weitaus höher, bis zu 200 g/l.

Der verwendete Küvettentest (LCK 21, Hach- Lange, Germany) ist einsetzbar für einen Arbeitsbereich von 0,1 mg/l CSB bis 2000 mg/l CSB. Der CSB wurde auf ein bestimmtes Maß geschätzt für das reine OMWW, um eine Verdünnung herzustellen. Die Verdünnung um das 100 fache, wurde mit 10 ml OMWW in einem 1000 ml Messkolben durchgeführt, das Volumen wurde so groß gewählt um eine möglichst aussagekräftige Probenmenge zu verwenden. Die Verwendung von 1 ml auf einen 100 ml Messkolben wäre dabei weniger repräsentativ gewesen. Es wurden 2 ml des verdünnten OMWW zu dem geschüttelten Inhalt der Küvette gegeben. Die Verwendung des Küvettentests sah vor Laborkittel, Schutzbrille und Handschuhe zu tragen, da eine sehr starke exotherme Reaktion nach der Aufgabe der Probe einsetzte. Nachdem die Küvette wieder verschlossen war wurde sie erneut geschüttelt und in einen Heizblock gestellt. Dieser wurde so eingestellt dass er sich auch 148°C für 120 Minuten erwärmt. Die Messung des CSB-Wertes geschah nach Abkühlung photometrisch in der automatisierten Vorrichtung. Der CSB erzielte einen Wert von 407 mg/l in der 100 fachen Verdünnung. Diesen Wert mit den Faktor 100 multipliziert ergibt 40700 mg/l, in g/l umgeformt 40,7 g/l. Dieser Wert liegt in der Spanne die aus der Literatur bekannt ist.

5.5 Gesamtphenolgehalt

Der gesamte Phenolgehalt (engl.: Total Phenolic Content – TPh) wurde durch eine photometrische Bestimmung gemessen. Es wurde sich dabei an die Verwendung von Chemikalien und Reagenzien nach der DIN ISO 14502-1 gehalten. Diese Methode wurde für Blatt-Tee und lösliche Tees genormt. Eine Extraktion bzw. eine Anreicherung von Phenolen wurde nicht durchgeführt. Zu den vorbereitenden Arbeiten gehört die Herstellung von verdünnten Folin- Ciocalteu – Phenolreagenz (10 % Volumenanteil), eine Natriumcarbonatlösung (7,5% Massenkonzentration) und die Stammlösung aus Gallussäure (etwa 1000 µg/ml wasserfreie Gallussäure). Nach Probenmenge und Länge der Standardreihe wurde die Menge der herzustellenden Lösungen bestimmt. Es wurden 20 ml Folin- Ciocalteu – Phenolreagenz (Merk, Darmstadt, Germany) verdünnt in einem 200 ml Messkolben, dieses reichte aus für 40 Reaktionen in Reagenzgläsern. Die Natriumcarbonatlösung (reinst, wasserfrei, Merk, Darmstadt, Germany) wurde in einer größeren Menge hergestellt. Eine Menge von 37,50 g ± 0,01 g wasserfreiem Natriumcarbonat (Na_2CO_3) wurde genau Eingewogen in einem 500 ml Messkolben. Das Wasser zum auffüllen wurde zu einem Teil warm dazugegeben bis das Natriumcarbonat sich gelöst hatte, dann konnte bis zur Marke des Kolbens aufgefüllt werden. Hierbei durfte die Gesamttemperatur des Wassers nicht zu hoch sein da sonst die Dichteunterschiede zu hoch sind und die Abmessung nicht genau sind, bei nicht Einhaltung der Temperatur, gegebenenfalls in einem Wasserbad temperieren und bis zur

Marke auffüllen wenn die Temperatur erreicht ist. Die Gallussäurestammlösung wurde durch die genaue Einwaage von $0,110\text{ g} \pm 0,001\text{ g}$ Gallussäuremonohydrat (HPLC-Grade, Fluka, Spanien) in einen 100 ml Messkolben und anschließendem Auffüllen mit Wasser hergestellt. Das Verwenden der Stammlösung sowie des verdünnten Folin- Ciocalteu – Phenolreagenz ist nur an einem Tag möglich, beide müssen täglich frisch hergestellt werden. Hingegen ist die Natriumcarbonatlösung bis zu einem Monat haltbar.

Für die Standardreihe wurden fünf 100 ml Messkolben mit Standardlösung unterschiedlicher Volumina und Wasser gefüllt. Die in Tabelle 4 angegebenen Volumina wurden verwendet.

Tabelle 4: Standardlösung der Gallussäure

Gallussäure – Standardlösung	Volumen der Gallussäure-Stammlösung [ml]	Nennkonzentration der Standardlösung [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
A	1,0	10
B	2,0	20
C	3,0	30
D	4,0	40
E	5,0	50

Für die Bestimmungen wurden Reagenzgläser mit Schraubverschluss bereit gestellt. Die hergestellten Standardlösungen, A, B, C, D und E wurden jeweils mit dem Volumen von 1 ml in ein Reagenzglas pipettiert. Um einen Blindwert zu erhalten wurde 1 ml Wasser ebenfalls in ein Reagenzglas pipettiert. Die Probe musste vorher verdünnt werden. Es wurden Verdünnungen von 1:20; 1:50; 1:100 und 1:200 hergestellt. Die verdünnten Proben wurden mit einer Pipette von einem Volumen von 1 ml in Reagenzgläser pipettiert, es wurden Doppelstimmungen durchgeführt. Zu der Standardlösung, dem Wasser und den Proben wurden nun 5 ml von dem verdünnten Folin - Ciocalteu – Phenolreagenz pipettiert und mit Glasstäbchen gut durchmischt. Die weitere Reaktion mit der Natriumcarbonatlösung wurde nach 5 – 8 Minuten eingeleitet, 4 ml Natriumcarbonatlösung wurden vorsichtig hinzugefügt. Wenn eine sehr heftige Reaktion auftritt kommt es zur Schaum- und Gasbildung, ein herausspritzen der Probe ist möglich. Es muss überprüft werden ob alle Verdünnungen, besonders die der Folin - Ciocalteu – Phenolreagenz, wie beschrieben erfolgt sind. Eine

Färbung ins bläuliche ist der charakteristische Effekt dieser Reaktion. Die Mischung aus Untersuchungsmaterial, Folin - Ciocalteu – Phenolreagenz und Natriumcarbonatlösung wurde nun 60 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Photometer (Spectronic 20 Genesys, Spectronic Instruments, USA) und die Küvetten wurden bereitgestellt um nach Ablauf der Zeit die Extinktion der Standardlösung, dem Wasser und den Proben bei 765 nm zu messen. Es wurde mit einer Küvette mit Wasser gefüllt das Photometer kalibriert. Für den Blindwert sollte eine Extinktion unter 0,01 erzielt werden, wenn dieses nicht der Fall sein sollte, lässt es sich auf Kontamination durch schlechte Wasserqualität, Reagenzien oder der verwendeten Glasgeräte schließen.

Die gemessenen Extinktionen der Standardlösungen A, B, C, D und E bei 765 nm sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: Extinktion der Standardlösungen

Gallussäure – Standardlösung	Volumen der Gallussäure-Stammlösung [ml]	Nennkonzentration der Standardlösung [µg/ml]	Extinktion bei 765 nm
0	0	0	0,010
A	1,0	10	0,142
B	2,0	20	0,261
C	3,0	30	0,382
D	4,0	40	0,492
E	5,0	50	0,647

Aus den Extinktionswerten (Y-Achse) und der bekannten Nennkonzentration der Standardlösung (X-Achse) wurde eine Kalibriergerade für Gallussäure erstellt, siehe Abbildung 4.

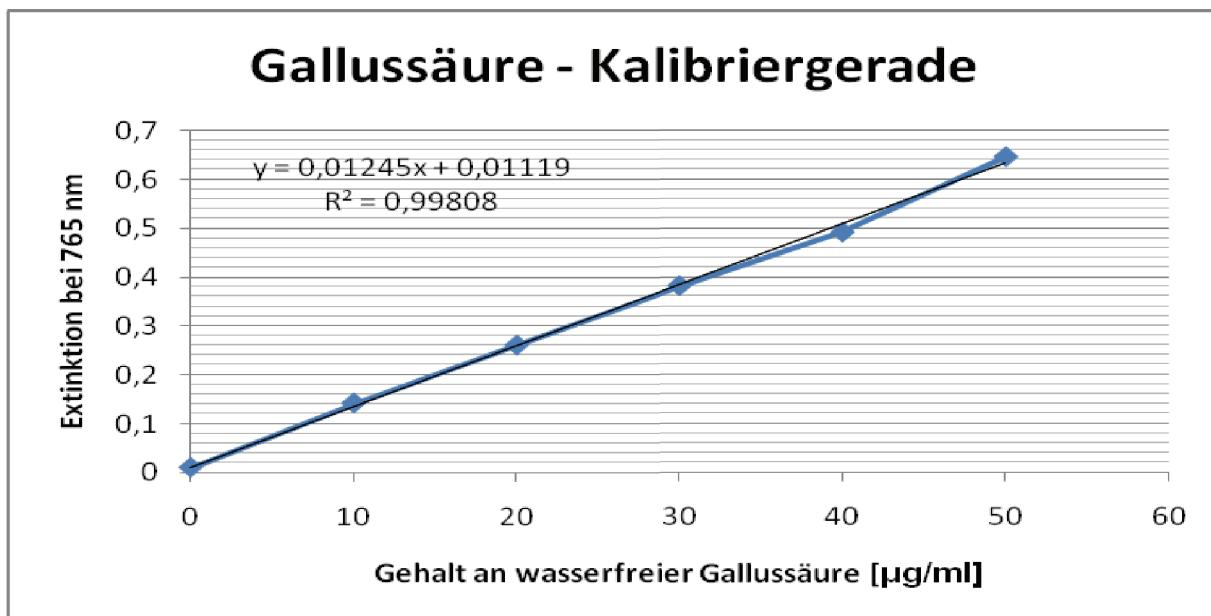


Abbildung 4: Kalibriergerade für Gallussäure

Die Regression der Werte ergab die Gleichung für die Gerade,

$$y = 0,0124x + 0,0112 \text{ mit einem } R^2 \text{ von } 0,9981.$$

Die Steigung der Kalibriergeraden beträgt = 0,0124 und der Wert des Schnittpunktes mit der Y-Achse beträgt = 0,0112.

In Tabelle 5 sind die erzielten Resultate der vier Verdünnungen der Proben bei der Extinktionsmessung (765 nm) angegeben. Die Geradengleichung wurde nach x umgestellt.

$$x = \frac{(y - 0,0112)}{0,0124}$$

Die Messergebnisse wurden für y- eingesetzt und der Äquivalentwert zur Gallussäure berechnet. Diese Werte waren mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor zu Multiplizieren (20, 50, 100 und 200). Um den Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren zu vereinfachen wurde die Gallussäure Äquivalenz in [g/l] angegeben.

In Bezug auf die Kalibriergerade wurde entschieden, dass die Verdünnungen 1:20 und 1:200 nicht weiter betrachtet werden, die Extinktionsergebnisse (Tabelle 6) liegen außerhalb der Resultate für die angefertigte Nennkonzentration der Gallussäurestandards. Der Mittelwert der vier Ergebnisse (zwei mal 1:50 und zwei mal 1:100) wurde gebildet, und ergab 1,8244 g/l Äquivalent Gallussäure.

Tabelle 6: Ergebnisse der Extinktionsmessung der Proben bei 765 nm

Proben-verdünnung	Extinktion der Probe bei 765 nm (Y)	Äquivalent Gallussäure [$\mu\text{g}/\text{ml}$] vor Einbeziehung des Verdünnungsfaktors	Äquivalent Gallussäure [$\mu\text{g}/\text{ml}$] nach Einbeziehung des Verdünnungsfaktors	Äquivalent Gallussäure [g/l]
1:20	1,095	87,403	1748,065	1,75
1:20	1,064	84,903	1754,839	1,75
1:50	0,468	36,839	1841,935	1,84
1:50	0,459	36,113	1805,645	1,81
1:100	0,235	18,048	1804,839	1,80
1:100	0,240	18,452	1845,161	1,85
1:200	0,120	8,774	1698,065	1,70
1:200	0,120	8,774	1754,839	1,75

Der ermittelte Gesamtphenolgehalt der untersuchten Proben ist im Vergleich zu anderen Literaturangaben geringer (Bradley & Baruchello, 1980; Tsonis & Grigoropoulos, 1983). Ein durchschnittlicher Wert für das 3 Phasen-Zentrifugations-System ist 2,7 g/l, wobei aber nicht angegeben ist auf welchen Standard (hier: Gallussäure) es sich bezieht. Vier unterschiedliche Standardlösungen kamen bei verschiedenen Autoren zur Anwendung, die Kaffeeinsäure, Tanninsäure, Tyrosol und Gallussäure wurden genannt. Diese einfache und sehr gebräuchliche Methode hat aber auch ihre Nachteile. Es kann zu Beeinträchtigungen der Ergebnisse kommen durch, Ascorbinsäure, Tocopherole (Vitamin E), Karotin, reduzierende Zucker und phenolischen Aminosäuren (Phenylalanin und Tyrosin), jede Substanz die zu Phosphorwolframsäure – Phosphormolybdänsäure-Komplex reduziert werden kann. Die Ergebnisse der photometrischen Bestimmung lassen sich nicht mit denen der chromatographischen Methoden korrelieren. Diese Methode ist für eine Überbewertung des Gesamtgehaltes an phenolischen Verbindungen bekannt.

5.6 Gesamtrockenrückstand (GT)

Der Gesamtrockenrückstand (GT) auch Trockensubstanz (TS) genannt, wurde grundsätzlich nach dem Verfahren DIN 38 409 –H1-1 für Abwässer durchgeführt. Durchführung wurde leicht abgewandelt. Eine geeignete Glasschale wurde bei 105 ± 2 °C in einem Trockenschrank (Function Line, Heraeus Instruments, Hanau, Germany) getrocknet, um das mögliche anhaftende Wasser zu entfernen. Nach dem abkühlen, in einem Exsikkator mit Trocknungsmittel, wurde die Probe eingefüllt, um eine hohe Genauigkeit zu erlangen sollte nach dem Abdampfen nicht weniger als 20 mg und nicht mehr als 1000 mg Trockenmasse verbleiben. Die Dauer der Trocknung bei 105 ± 2 °C sollte circa 1 Stunde betragen, danach wurde die Probe zum Erkalten in den Exsikkator gestellt und anschließend gewogen auf der gleichen Analysewaage (BP201S, Sartorius, Germany) wie beim Einwiegen. Die Gesamtdauer wurde erhöht, da die Probe die Gewichtskonstanz noch nicht erreicht hatte. Nach Erreichen der Gewichtskonstanz wurde die Probe zum erkalten in den Exsikkator gestellt und ausgewogen. Um die Sicherheit zu erhöhen das der Trocknungsprozess wirklich abgeschlossen war, wurde die Probe für eine Zeit von 30 Minuten wieder in den Trockenschrank platziert. Hinterher wurde sie wieder herunter gekühlt im Exsikkator und gewogen. Der Gewichtsverlust sollte und hatte zur vorherigen Messung 2 mg unterschied nicht überschritten. Die Resultate der Trockensubstanzbestimmung sind in Tabelle 7 angegeben.

Es ist davon auszugehen, dass auch niedrigsiedende Komponenten, wie z.B. Alkohole oder ätherische Öle, beim Trocknen ebenfalls verdampfen und einen, wenn auch hier zu erwartend kleinen, Fehler verursachen.

5.7 Aschegehalt

Die Probe wurde eingewogen und im Trockenschrank bei 105 ± 2 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Danach wurde die Schale im Muffelofen (thermicon P®, Heraeus Instruments, Hanau, Germany) bei 550° C platziert, verascht und nach Abkühlen im Exsikkator ausgewogen. Der Vorgang wurde wiederholt um sicher zu stellen das alles verascht worden war. Nach dem zweiten erkalten und auswiegen war der Gewichtsunterschied so gering und wurde hier nicht aufgeführt. Die Ergebnisse des Aschegehaltes sind in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 7: Trockensubstanz von OMWW

Proben- nummer	Masse der Glasschale und Spatel [g]	Masse der Glasschale, Spatel und Probe [g]	Einwaage Probe [g] [g]	Masse der Glasschale, Spatel und trockene Probe [g]	Trockensubstanz [g/100g]	Trockensubstanz [g/l]
1	139,0420	188,2247	49,1827	139,9928	1,933	19,33
2	154,3105	203,3669	49,0564	155,2662	1,948	19,48
3	167,6812	203,9130	36,2318	168,3738	1,912	19,12
4	135,4976	165,5779	30,0803	136,0697	1,902	19,02
5	147,7016	182,4318	34,7302	148,3624	1,903	19,03
6	26,7994	81,6689	54,8695	27,8749	1,960	19,60
7	27,2470	78,8220	51,5750	28,2571	1,959	19,59
Durchschnittliche Trockensubstanz:				1,931	19,31	

Tabelle 8: Aschegehalt von OMWW

Proben- nummer	Massen der Glasschale [g]	Massen der Glasschale und Probe [g]	Einwaage Probe [g]	Massen der Glasschale und veraschten Probe [g]	Aschegehalt [g/100g]	Aschegehalt [g/l]
1	24,8639	49,6123	24,7484	25,0187	0,625	6,25
2	28,8751	52,4619	23,5868	29,0217	0,621	6,21
3	30,2494	64,589	34,3396	30,486	0,689	6,89
4	36,2896	61,52	25,2304	36,4447	0,615	6,15
5	25,8924	52,3637	26,4713	26,0538	0,610	6,10
6	26,7994	81,6689	54,8695	27,2059	0,741	7,41
7	27,247	78,8220	51,5750	27,6222	0,727	7,27
Durchschnittlicher Aschegehalt:						6,61

Die Ergebnisse aus den Bestimmungen der TS und des Aschegehaltes finden Übereinstimmung mit denen anderer Autoren, eine TS in der Breite von 14- 37 g/l wurde bereits ermittelt (Bradley & Baruchello, 1980; Tsonis & Grigoropoulos, 1983, Fiestas Ros de Ursinos & Borja-Padilla, 1996). Ebenso sind für den Aschegehalt eines 3 Phasen-Zentrifugen-Systems die annähernde Menge (6,4 g/l) gefunden worden (Niaounakis & Halvadakis, 2006).

5.8 Organische Trockensubstanz (oTS)

Die Trockensubstanz minus den Aschegehalt ergibt die oTS.

$$TS (19,31 \text{ g/l}) - \text{Aschegehalt} (6,61 \text{ g/l}) = oTS (19,31 - 6,61 [\text{g/l}]) = \underline{\underline{12,7 \text{ g/l}}}$$

5.9 Wasseranteil

Die Einwaage der Probe minus das Gewicht der Trockensubstanz ergibt den Wasseranteil in g. Den Wasseranteil [g] bezogen auf die Einwaage [g] und mit 100 multipliziert ergibt den Wasseranteil in % (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Wasseranteil von OMWW

Probennummer	Einwaage der Probe [g]	Probengewicht nach Trocknung [g]	Wasseranteil [g]	Wasseranteil [%]
1	49,1827	0,9508	48,2319	98,07
2	49,0564	0,9557	48,1007	98,05
3	36,2318	0,6926	35,5392	98,09
4	30,0803	0,5721	29,5082	98,10
5	34,7302	0,6608	34,0694	98,10
6	54,8695	1,0755	53,794	98,04
7	51,575	1,0101	50,5649	98,04
Durchschnittlicher Wasseranteil:				98,07

5.10 Rohprotein (RP)

Die Rohproteine wurden nach dem Kjeldahl -Verfahren (Matissek et al., 1992) bestimmt. Der nasschemische Aufschluss dient zur Bestimmung des Ammoniumstickstoffs und organischen stickstoffhaltigen Verbindungen die sich in Ammonium umwandeln lassen. Es wird nicht zwischen Proteinstickstoff und anderem Stickstoff unterschieden.

Es wurden drei Aufschlusskolben ausgewogen und mit OMWW gefüllt (15,043 g; 15,139 g; 15,227 g). In den Anschlusskolben wurden 2 Kjeldahl- Tabletten (Merck, Darmstadt, Germany), 2 Glasperlen und 25 ml konzentrierte Schwefelsäure (98%, Carl Roth GmbH + Co. Kg, Karlsruhe, Germany) dazu gegeben. Die Proben waren nun in den Aufschlussblock (Kjeldaltherm, Fa. Gerhardt, Germany) gegeben worden und das Temperaturprogramm wurde gestartet:

20 Minuten bei 250°C, 45 Minuten bei 380°C und 45 Minuten bei 350°C.

Das Gemisch änderte während dieser Phasen seine Farbe und hatte am Ende des Ausschlusses eine helle-grüne Farbe angenommen.

Vor der Destillation wurden 3 Erlenmyerkolben bereitgestellt, in denen 50 ml Borsäure (Merck, Darmstadt, Germany) und 3 Tropfen Mischindikator 5 (Merck, Darmstadt, Germany) gefüllt wurden, diese dienten als Auffang für den destillierten Ammoniak. Der Aufschlusskolben wurde nun in die Destillationsvorrichtung (Vapodest 30, Fa. Gerhardt, Germany) eingespannt und mit Natronlauge (80 ml 32 %ige NaOH, Carl Roth GmbH + Co. Kg, Karlsruhe, Germany) und Wasserdampf gemischt, der entstandene Ammoniak wurde im Kühler abgekühlt und im Erlenmyerkolben aufgefangen. Die Destillation erfolgte Vollautomatisch in 6 Minuten. Die anschließende Titration wurde mit Salzsäure-Maßlösung (0,1 N, AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) durchgeführt. Die verbrauchte Salzsäure wurde abgelesen und der Wert zur Berechnung des Stickstoffgehaltes, sowie des Rohproteinangehaltes verwendet.

$$N \left(\frac{g}{l} \right) = \frac{(ml \ HCl \times 0,14)}{g \ Einwaage} \times \frac{100 \times 10}{1000}$$

Der Stickstoffgehalt multipliziert mit dem Faktor 6,25 ergab das Ergebnis für die Menge des Rohproteins.

$$RP \left(\frac{g}{l} \right) = N \left(\frac{g}{l} \right) \times 6,25$$

Die Ergebnisse der Bestimmung des Kjeldahl Stickstoffes und des Rohproteins sind in Tabelle 10 aufgeführt. Eine Übereinstimmung mit anderen Autoren (Bradley & Baruchello, 1980; Fiestas Ros de Ursinos & Borja-Padilla, 1996; Tsonis & Grigoropoulos, 1983) der Ergebnisse konnte gefunden werden. Die angegebenen Kjeldahl-Stickstoff Resultate reichen von 0,02 bis 0,64 g/l.

Tabelle 10: Kjeldahl-N und Rohproteininhalt von OMWW

Probe	Probeneinwaage [g]	Verbrauch HCl [ml]	Kjeldahl-N [g/l]	Rohprotein [g/l]
1	15,043	2,5	0,023	0,145
2	15,139	2,8	0,026	0,162
3	15,227	2,5	0,024	0,144
Durchschnittlich:			0,0243	0,1503

5.11 Rohfett (RFe)

Für die Rohfettanalyse wurde Probenmaterial im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet ($105 \pm 2^\circ\text{C}$), abgekühlt im Exsikkator und aus den Schalen entnommen. Die Einwaage in die Filterhülsen und Extraktionsglas wurde Protokolliert. Die Extraktion wurde in einer Soxhlet – Apparatur (Soxtherm 2000 automatic, Fa. Gebhardt, Germany) mit Petrolether durchgeführt, die Dauer betrug circa 4 Stunden. Das anschließende Destillieren des Lösungsmittels und Trocknen des Rückstandes im Trockenschrank zur Trennung, wurde nach abkühlen im Exsikkator gewogen. Die Resultate der Rohfettbestimmung sind in Tabelle 11 angegeben.

Tabelle 11: Rohfettbestimmung von OMWW

Probe	Extraktionsglas [g]	Extraktionsglas + Probeneinwaage [g]	Extraktionsglas + extrahierte und getrocknete Probe [g]	Rohfett bezogen auf TS [%]	Rohfett [g/l]
1	144,705	150,0505	2,5	2,563	0,495
2	147,081	151,1637	2,8	6,956	1,343
Durchschnittlich:				4,760	0,919

Der Rohfettanteil in dieser Probe ist gering. Aus den Abwässern des 3 -Phasen -Systems sind Gehalte von 5- 23 g/l bekannt, das OMWW aus dem traditionellen Verfahren weist Mengen von 0,2 – 10 g/l Rohfett auf (Bradley & Baruchello, 1980; Fiestas Ros de Ursinos & Borja-Padilla, 1996; Tsonis & Grigoropoulos, 1983).

5.12 Rohfaser (RFa)

Die Rohfaseruntersuchung wurde nicht durchgeführt, da ein zu geringer Anteil an organischen Bestandteilen nach Filtrierung von 50 ml OMWW zurück blieb.

5.13 Stickstofffreie Extraktstoffe (NfE)

Der Anteil an NfE errechnet sich durch dividieren von Rohfaser, Rohfett und Rohprotein von der organischen Trockensubstanz: oTS – RFa – RFe – RP = NfE

$$12,7 \text{ g/l} - 0 \text{ g/l} - 0,919 \text{ g/l} - 0,1503 \text{ g/l} = \underline{\underline{11,6307 \text{ g/l}}}$$

Tabelle 12: Ergebnisse der OMWW Analysen

Kjeldahl – N [g/l]	Rohprotein [g/l]	Rohfett [g/l]	TS [g/l]	Asche [g/l]	oTS [g/l]
0,0243	0,1503	0,919	19,31	6,61	12,7
Wassergehalt [%]	CSB [g/l]	NfE [g/l]	pH-Wert	Gesamt Phenole [g/l]	Dichte [g/cm³]
98,07	40,7	11,6307	5,3	1,824	1,0007

6 Biogasbildung

Die Methan-Gewinnung wird in der Literatur als ein Prozess mit 4 Unterteilungen beschrieben. Die Hydrolyse ist für die Aufspaltung von Polymeren, wie hochmolekulare Kohlenhydrate, Eiweiße und Fette, in gelöste Bruchstücke (Oligo-, Di- und Monomere) verantwortlich. Die Produkte der Hydrolyse stehen den Versäuernden (Acidogenen) Bakterien zu Verfügung um eine Reihe von Säuren (Essigsäure, organische Säuren), H₂, CO₂ und Alkohole herzustellen. Die Produkte der Versäuerungsphase können noch nicht direkt zu Methan abgebaut werden, es stehen den Methanogenen nur H₂, CO₂ und Essigsäure aus dieser Phase bereit. Eine weitere Phase, die Acetogenephase, muss einsetzen. In ihr werden die Vorhandenen organischen Säuren und Alkohole zu Essigsäure umgebaut (Bischofsberger & Dichtl, 2005).

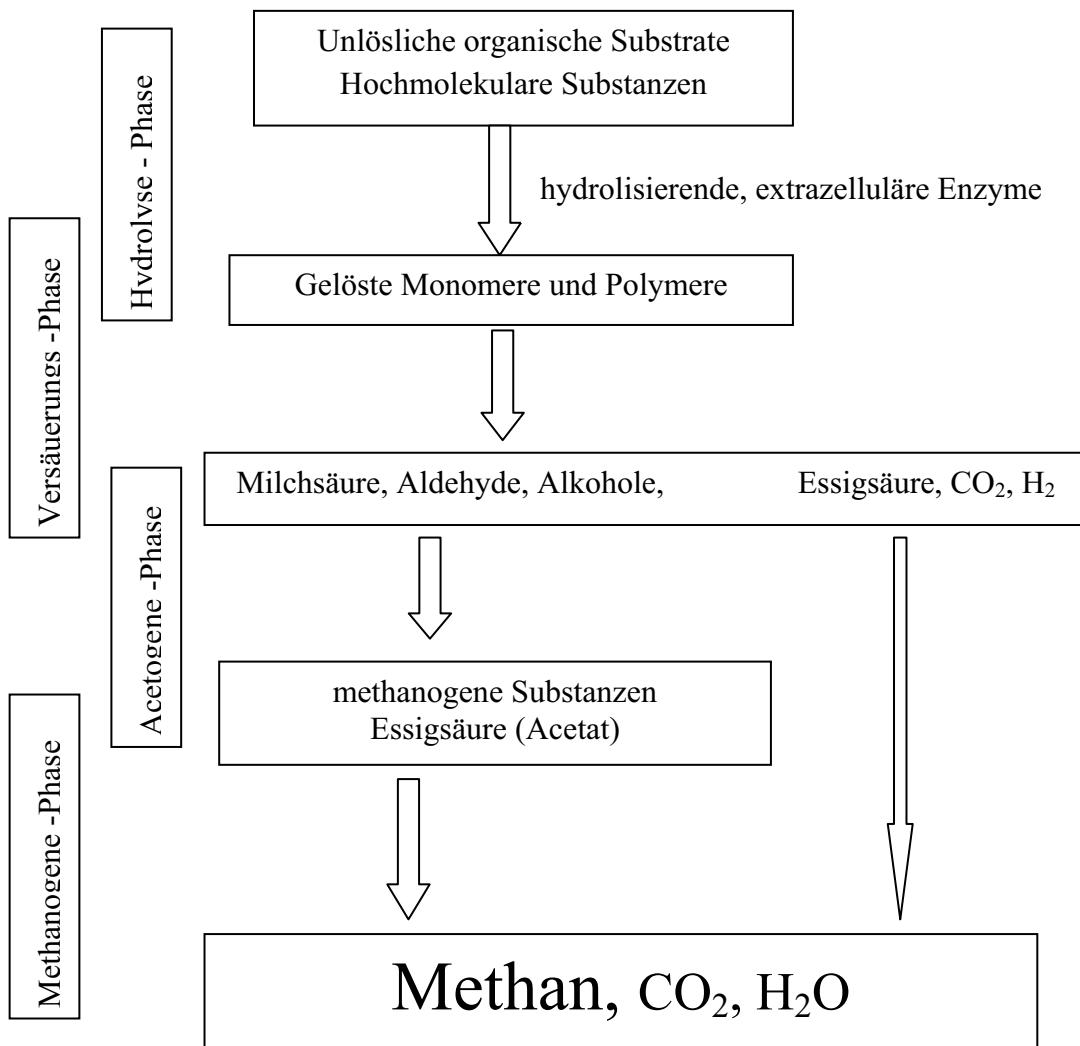


Abbildung 5: Die 4 Stufen des mikrobiellen anaeroben Abbaus (nach Bischofsberger & Dichtl (2005) und Bank M. (1995))

7 Gärversuche in Batch-Behältern

Als Batch – Reaktoren kamen Glasflaschen mit einem Volumen von 500 ml zum Einsatz. Es wurden circa 40g Mikroorganismenkultur (Wasserzweckverband Stavenhagen) und circa 400 ml Substrat gemischt. Die Flaschen wurden mit einem Infrarot-Messkopf verschlossen, welcher den Methangehalt des hindurch strömenden Gases bestimmte. Durch den Einsatz von Miligascountern (BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Germany) konnte das Gasvolumen gemessen werden und in einem dichten Beutel aufgefangen werden. Infrarot-Messkopf und Miligascountern wurden elektronisch aufgezeichnet (Personal Computer mit Software BACVis, BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Germany).

7.1 Fermentationsversuche

Es wurden 4 Batch –Versuche zur Biogasbildung durchgeführt.

Im 1. Versuch wurde als Substrat Glucose (wasserfrei, Carl Roth GmbH + Co. Kg, Karlsruhe, Germany) verwendet. Um den CSB von 6 g/l einzustellen wurde folgende Berechnung angestellt:

$$6 \text{ g CSB} / (1,07 \text{ g CSB} / 1 \text{ g Glucose}) = 5,61 \text{ g Glucose}$$

Die Einwaage von $5,61 \text{ g} \pm 0,005\text{g}$ Glucose wurde in ein 1 Liter Messkolben überführt. Der Messkolben wurde mit entionisierten Wasser bis zur Markierung aufgefüllt und gut geschüttelt, so dass die Glucose vollständig gelöst wurde. Die anschließende CSB Bestimmung ergab ein CSB von 6,52 g/l. Der Batch Behälter wurde mit $40 \text{ g} \pm 0,2\text{g}$ Mikroorganismenkultur (WZV Stavenhagen) gefüllt und mit ca. 400 ml Substrat aufgefüllt. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Für den 2. Versuch wurde ein Glucose- Essiggemisch als Substrat hergestellt. Ebenso wie im 1. Versuch sollte ein CSB von 6 g/l eingestellt werden. Hierfür wurde 2,816 g Glucose und 2,83 g Essigsäure (100%) in einem 1 Liter- Messkolben gemischt und auf neutralen pH-Wert eingestellt.

Im 3. Versuch wurde OMWW so verdünnt das ein CSB von 6 g/l erreicht werden sollte. Es wurden 150 ml OMWW mit Messkolben abgemessen, in einen 1 Liter- Messkolben überführt und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die CSB Messung ergab einen Gehalt von 5,44 g/l. Ein Gemisch aus Glucose und verdünnten OMWW wurde für den 4. Versuch verwendet. Hierzu wurden 2,8246 g Glucose in 500 ml Messkolben gelöst. In einem zweiten 500 ml Messkolben wurden 75 ml OMWW mit Wasser verdünnt. Beide 500 ml Messkolben wurden in einem 1 Liter- Messkolben zusammengeführt. Die CSB Messung ergab 6,39 g/l.

8 Resultate und Auswertung

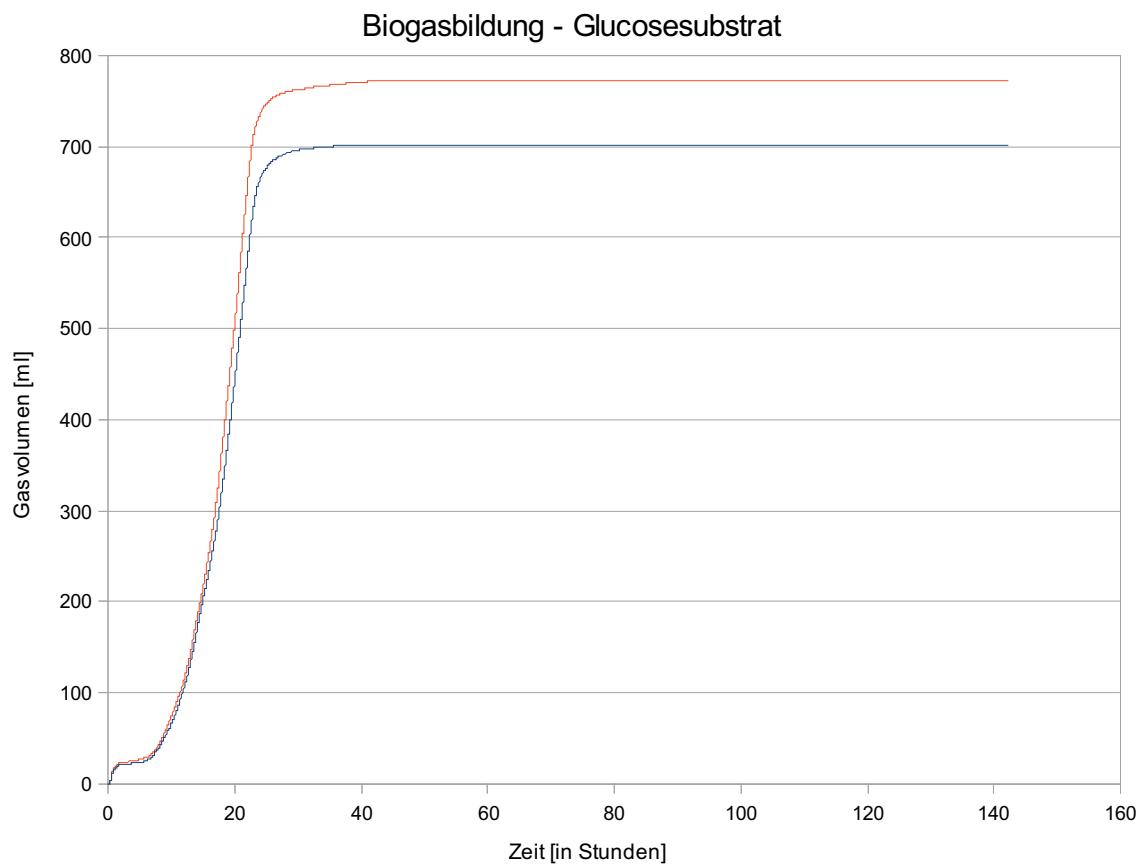


Abbildung 6: Biogasbildung - Glucosesubstrat

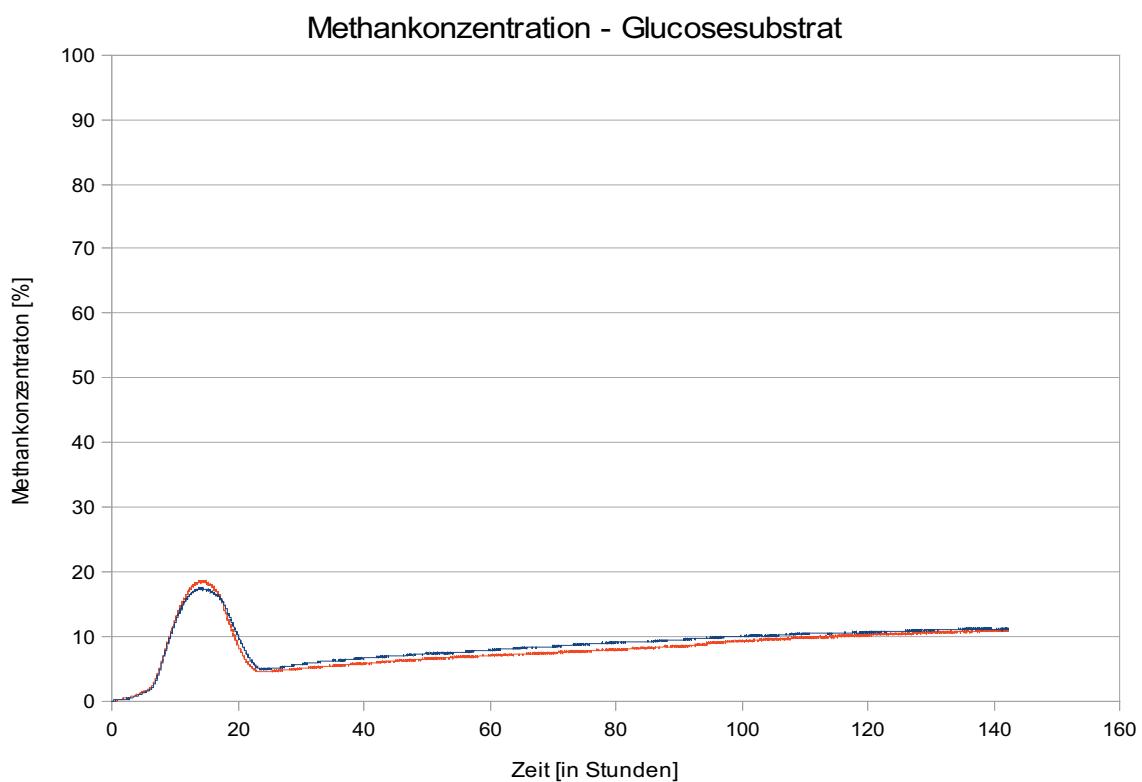


Abbildung 7: Methankonzentration - Glucosesubstrat

Der Gärversuch mit Glucosesubstrat wurde nach 142 Stunden beendet. Das Gasvolumen war für beide Batch-Reaktoren seit mehr als 60 Stunden auf gleichem Niveau. Die gesamte Gasausbeute belief sich auf 702 ml bzw. 772 ml (siehe Abbildung 6). Das Gasvolumen stieg in den ersten Stunden an und anschließend erfolgte eine Anpassungsphase wo sehr wenig bis kein Gas gebildet wurde. Im Anschluss wurde sehr schnell das End-Gasvolumen erreicht (circa von der 17. bis zur 24. Stunde). Der anfängliche CSB-Gehalt von 6520 mg/l wurde auf 2378 mg/l gesenkt. Ein CSB-Abbau von 63,5% wurde errechnet. Die gemessene Methankonzentration (Abbildung 7) war für beide Batch-Reaktoren in der Zeit von 14-18 Stunden am höchsten (15-18%). Die Methankonzentration fiel bis auf 5 % ab, nach 22 Stunden stieg sie bis zum Ende des Versuches wieder auf 10% an. Die Abbildungen der Biogasbildung und der Methankonzentration von Glucosesubstrat zeigen das sich in dem Zeitraum wo sich das meiste Gas gebildet hat die Methankonzentration auf den niedrigsten Wert sinkt. Erst nach Abnahme der Gasbildung stieg die Methankonzentration wieder an.

Bei dem Glucose-Essigsäuresubstrat war nach 310 Stunden das Gasvolumen für beide Batch-Reaktoren seit 70 Stunden gleichbleibend. Hier war die Gesamtgasausbeute 1256 ml bzw. 1407 ml (siehe Abbildung 8). Der CSB-Gehalt fiel von 6520 mg/l auf 150 mg/l, dass ergab einen CSB-Abbau von 97,7%. Ein sehr schneller Anstieg der Gasmenge war in den ersten 20 Stunden zu verzeichnen, danach knickte die Kurve ein und stieg deutlich langsamer. Nach insgesamt 100 Stunden war eine weitere Verlangsamung zu erkennen, bis nach 180 Stunden eine gleichbleibende Gasmenge erreicht war.

Die gemessene Methankonzentration (Abbildung 9) zeigte einen leichten Rückgang nach 20 Stunden Laufzeit, stieg danach aber sofort wieder an. Die maximale Konzentration lag bei 83 % nach 100 Stunden und blieb bis zur 250. Stunde konstant, bis sie zum Schluss leicht absank.

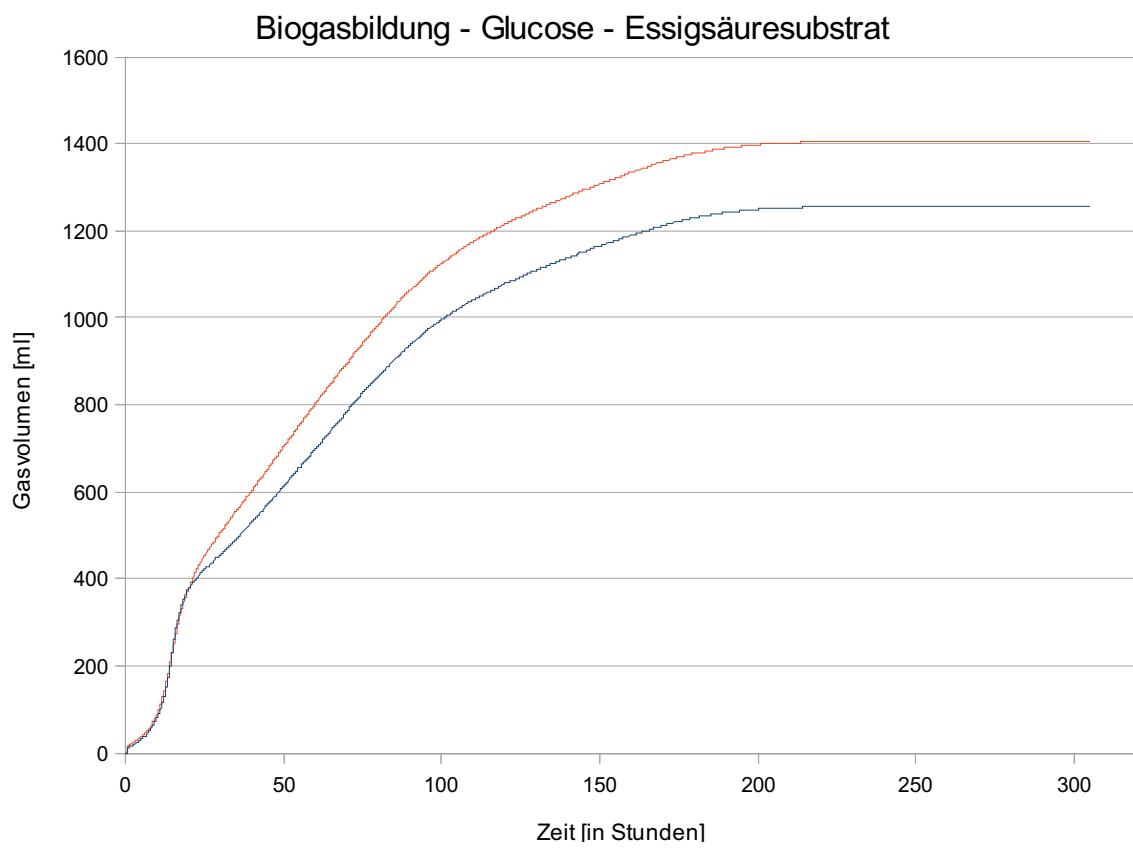


Abbildung 8: Biogasbildung - Glucose-Essigsäuresubstrat

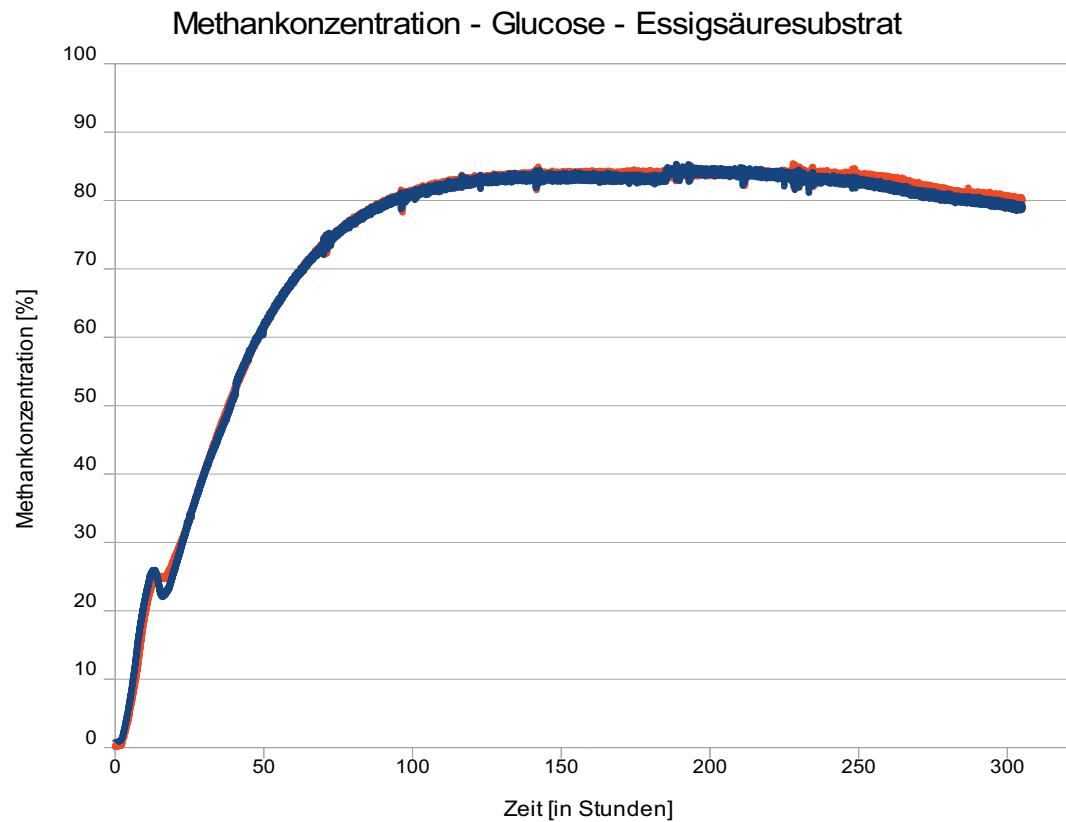


Abbildung 9: Methankonzentration - Glucose-Essigsäuresubstrat

Der Versuch mit verdünnten OMWW wurde nach 240 Stunden beendet. Das Gasvolumen war für beide Batch-Reaktoren noch nicht auf einem Niveau. 392 ml bzw. 459 ml (siehe Abbildung 10) war hier die Gesamtgasausbeute. Der CSB-Gehalt wurde von 5440 mg/l auf 1950 mg/l gesenkt, demzufolge wurde ein CSB-Abbau von 64,2 % erreicht.

In den beiden Fermentationen verhielt sich die Gasbildung übereinstimmend, mit der Ausnahme das der 2. Ansatz etwas mehr Gas produzierte. Eine deutliche Verringerung der Gaszunahme war nach 56 Stunden zu sehen. Der Anstieg des Biogasvolumens blieb bis zur Beendigung des Versuches. Die gemessene Methankonzentration (Abbildung 11) stieg bis auf 77% bzw. 72 % an.

Die Fermentation mit dem Substart aus verdünnten OMWW und Glucose wurde nach 161 Stunden abgeschlossen. Die Kurven, für das Gasvolumen, beider Batch-Reaktoren verliefen seit mehr als 80 Stunden gleich. Die Gesamtgasausbeute von 250 ml bzw. 256 ml ist in Abbildung 12 zu finden. Der CSB-Gehalt, am Anfang der Reaktion, wurde von 6390 mg/l auf 3720 mg/l gesenkt, dass ergab einen CSB-Abbau von 41,8%.

Für die beiden Batch-Reaktoren konnte eine anfängliche Beschleunigungsphase ausgemacht werden, die bis zu 24 Stunden andauerte. Die produzierte Gasmenge stieg bis zur 38. Stunde sehr schnell an. Es trat eine Verzögerung ein, die bis zum Zeitpunkt ab dem kein Biogas mehr gebildet wurde (63. Stunde) anhielt. Die gemessene Methankonzentration (Abbildung 13) zeigte einen sehr leichten Rückgang nach 32 Stunden Laufzeit. Die Konzentration stieg wieder an und erreichte eine maximale Konzentration von 30 bzw. 25 %.

Biogasbildung - verdünntes OMWW

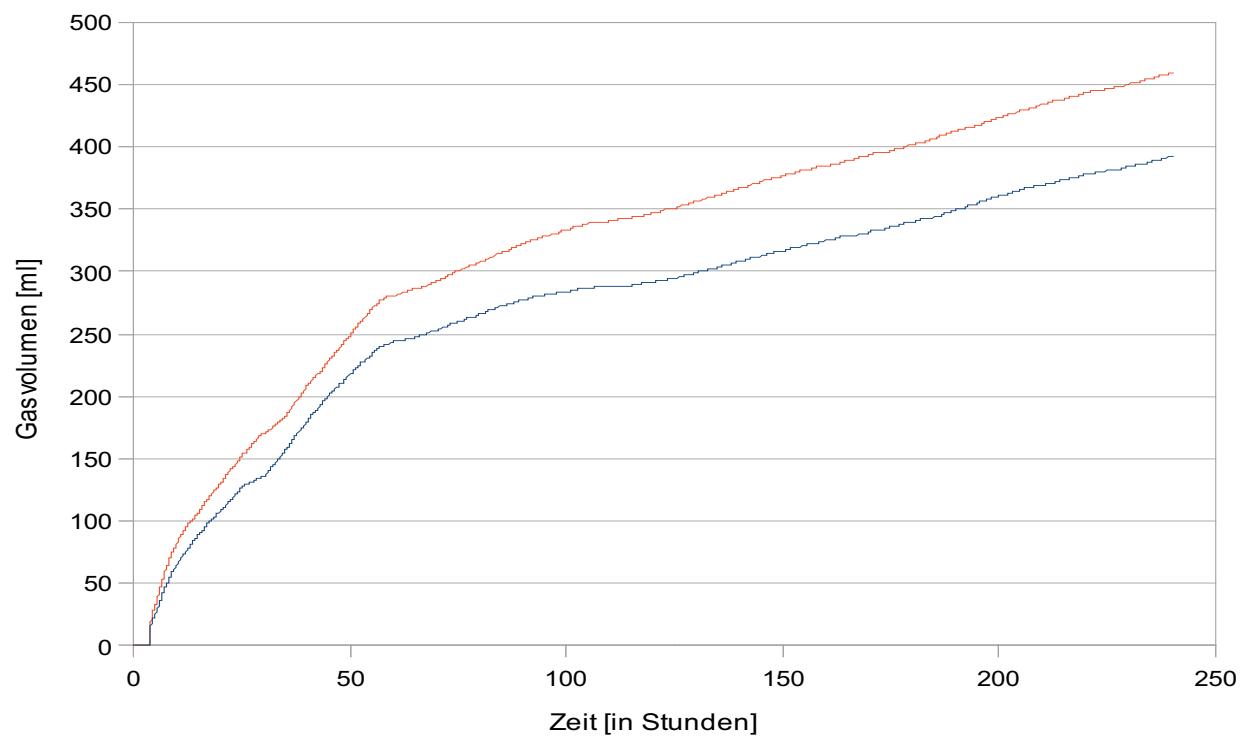


Abbildung 10: Biogasbildung - verdünntes OMWW

Methankonzentration - verdünntes OMWW

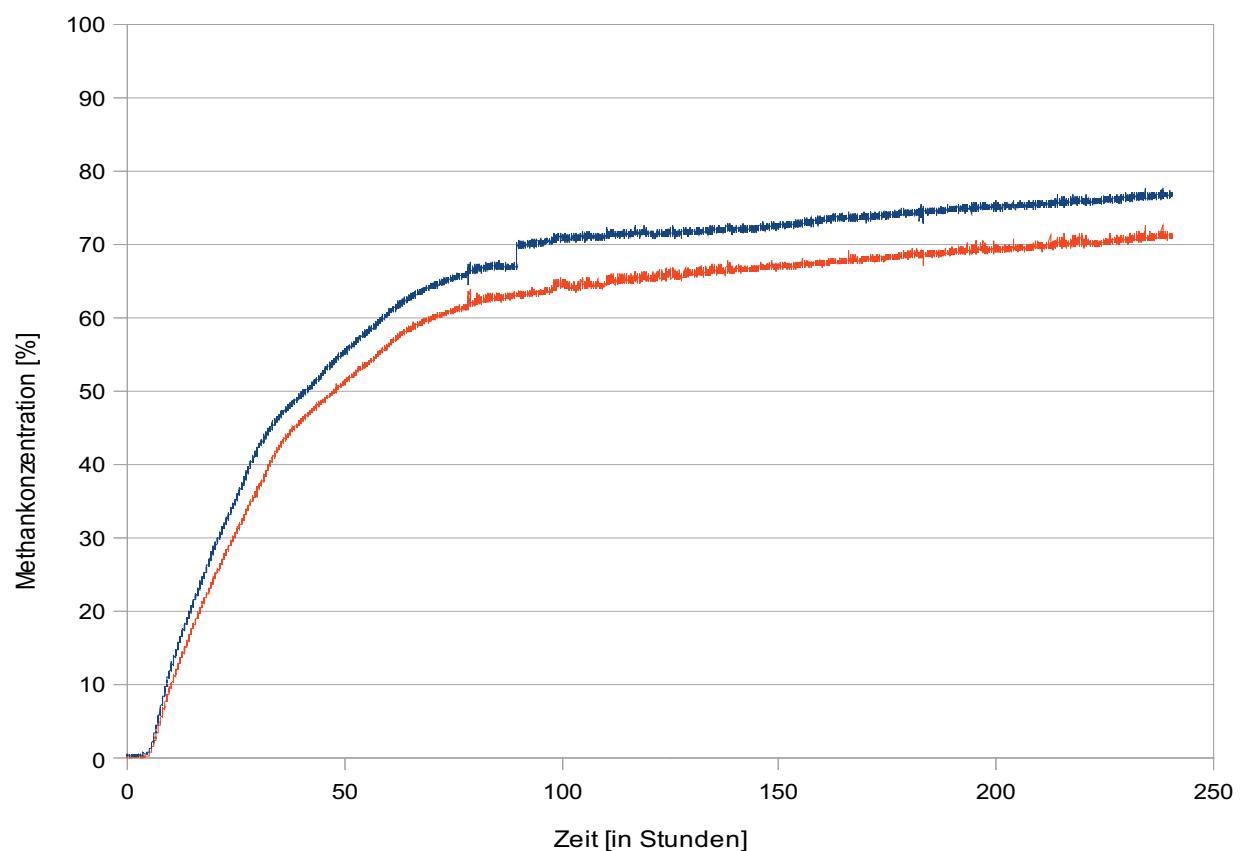


Abbildung 11: Methankonzentration - verdünntes OMWW

Biogasbildung - verdünntes OMWW - Glucosesubstrat

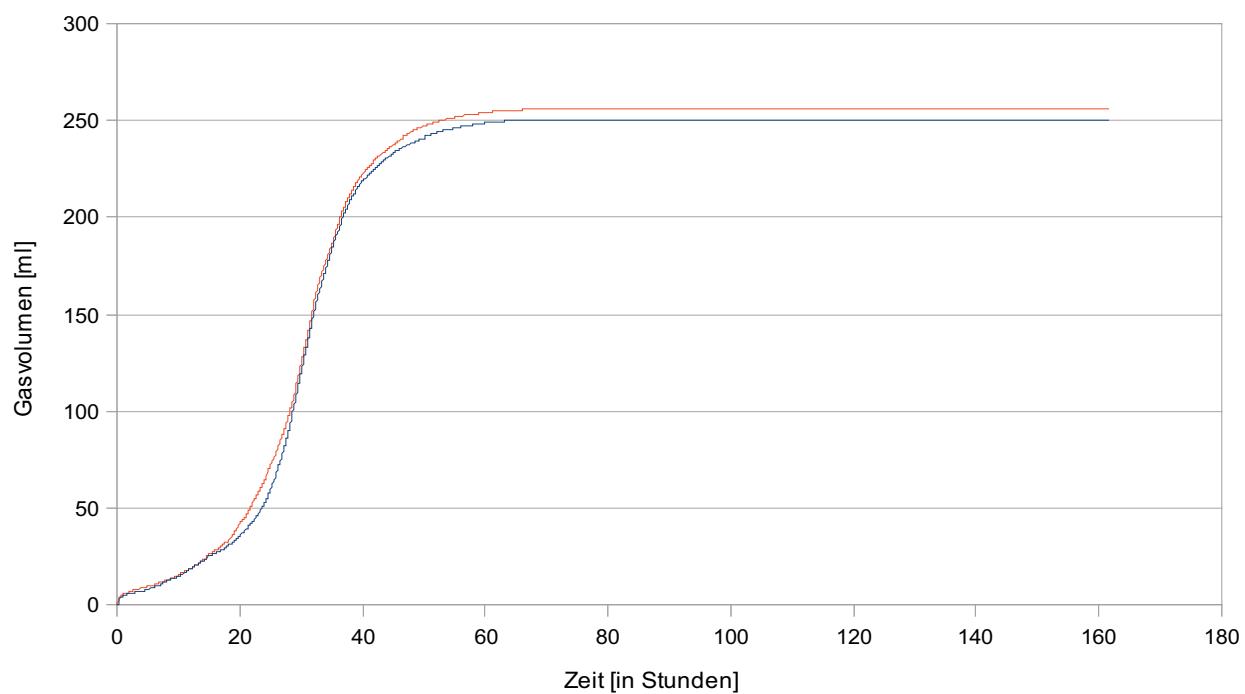


Abbildung 12: Biogasbildung - verdünntes OMWW-Glucosesubstrat

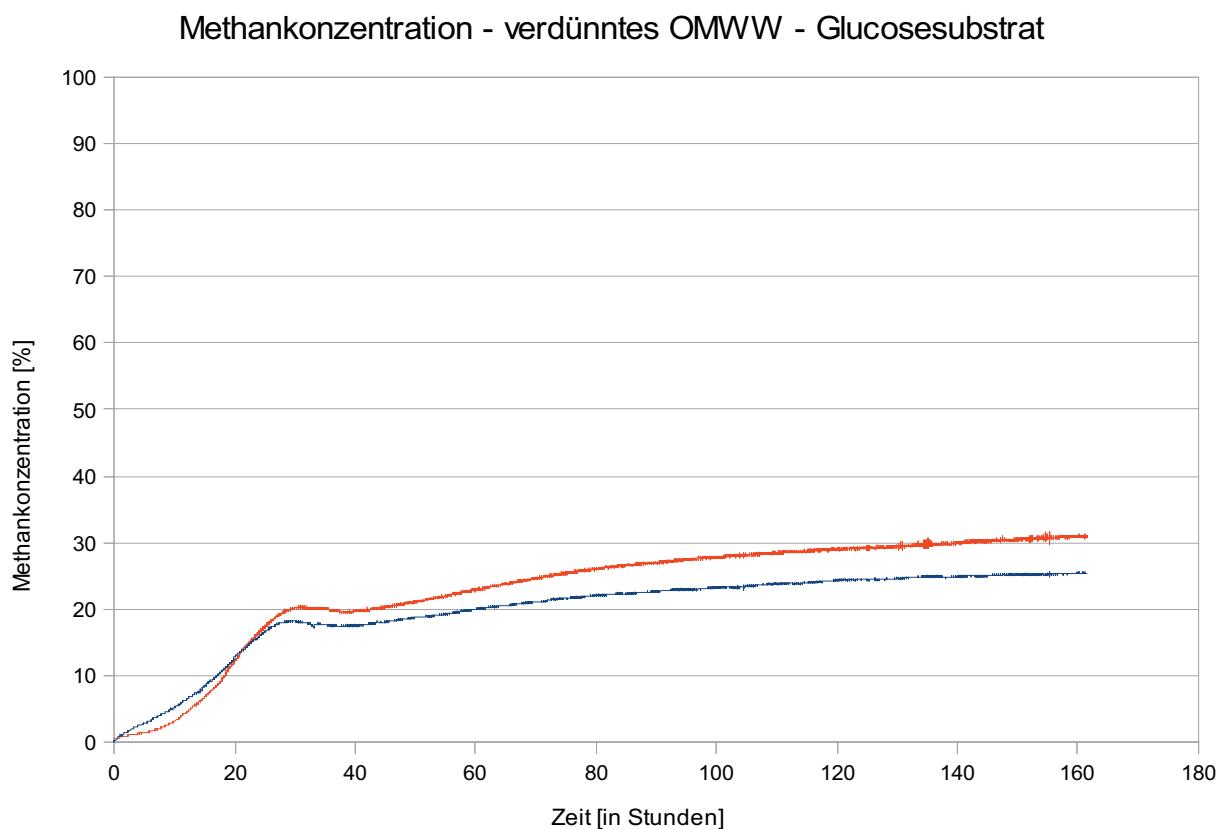


Abbildung 13: Methankonzentration - verdünntes OMWW-Glucosesubstrat

Für ein nahezu ungehindertes Wachstum benötigen Mikroorganismen außer bestimmte Nährstoffquellen (z.B. C-und N- Quellen) noch spezifische chemisch- physikalische Reaktionsbedingungen. Einige der wichtigsten Faktoren sind a_w -Wert, pH-Wert, Redoxpotential, Sauerstoffpartialdruck, Temperatur und osmotischer Druck.

Die pH- Werte vom verdünnten OMWW und vom verdünnten OMWW-Glucosesubstrat wurden nach der Fermentation gemessen (siehe Tabelle 13)

Tabelle 13: pH-Werte von fermentierten verdünnten OMWW und verdünnten OMWW-Glucosesubstrat

Substrat	pH-Wert Ansatz 1	pH-Wert Ansatz 2
Verdünntes OMWW-Glucosesubstrat	4,89	4,94
Verdünntes OMWW	6,57	6,64

Die pH-Werte des verdünnten OMWW-Glucosesubstrats lassen auf eine Hemmung der Acetogenese und der Methanogene schließen. Die optimalen pH – Werte lagen für diese bei $7 \pm 0,5$. Die Hydrolyse und die Acidogenese wurden durch den niedrigen pH-Wert nicht negativ beeinträchtigt, denn der optimale pH-Wert-Bereich liegt zwischen 4,5 – 5,5 (Bischofsberger & Dichtl, 2005). Die gemessenen pH-Werte für die noch nicht abgeschlossenen Fermentationen von verdünntem OMWW lassen auf den optimalen pH-Wert-Bereich für die Acetogenese und der Methanogene schließen. Aus Abbildung 10 kann nicht davon ausgegangen werden das der Prozess der Gasbildung abgeschlossen war, weil die Phase, in der das Gasvolumen nicht weiter Anstieg, nicht zu erkennen war. Die Temperatur konnte nicht auf 35°C über den gesamten Zeitraum der Fermentation, für verdünntes OMWW und verdünntes OMWW-Glucosesubstrat, gehalten werden, da die automatische Temperaturregelung ausfiel.

Der CSB – Abbau und das Gasvolumen war am höchsten für das Glucose-Essigsäuresubstratgemisch. Der pH – Werte wurde vor der Fermentation eingestellt so das die Methanogenese sofort einsetzen konnte. Für das Glucosesubstrat wurde eine deutlich kürzere Fermentationszeit gegenüber dem Glucose-Essigsäuresubstrat festgestellt. Eine geringere Gasausbeute wurde im Vergleich mit dem Glucose-Essigsäuregemisch erzielt. Die Fermentation des verdünnten OMWW-Glucosesubstrates erbrachte den niedrigsten CSB-Abbau der vier Versuche. Ein saurer pH-Wert (siehe Tabelle 13) wurde für dieses Substrat nach der Fermentation festgestellt, dieser beeinträchtigte die methanbildenden Bakterien in ihrer Lebenstätigkeit. Im Vermentationsversuch mit OMWW wurde bis zur Beendigung des

Versuches ein höherer CSB-Abbau verzeichnet als für das Glucosesubstrat und für das verdünnte OMWW-Glucosesubstrat. Da der Versuch aufgrund von Zeitmangel nicht bis zur Einstellung der Gasbildung durchgeführt werden konnte, kann weder von einem toxischen Verhalten noch von besonderer Hemmung durch das OMWW ausgegangen werden. Hierzu sind weitere Fermentationsversuche in unterschiedlichen Konzentrationen des OMWWs durchzuführen

Tabelle 14: CSB und Gasvolumen Ergebnisse

Substrat	Zeit [in Stunden]	Gasvolumen [ml]		CSB Start [g/l]	CSB Ende [g/l]	CSB Abbau [%]
		Ansatz 1	Ansatz 2			
Verdünntes OMWW- Glucosesubstrat	161	250	256	6,39	3,72	41,80
Verdünntes OMWW	240	392	459	5,44	1,95	64,20
Glucose	142	702	772	6,52	2,38	63,50
Essig	310	1256	1407	6,52	0,15	97,70

9 Literaturverzeichnis

- Bank, M. (1995). Basiswissen Umwelttechnik: Wasser, Luft, Abfall, Lärm, Umweltrecht (3 ed.). Würzburg: Vogel Buchverlag.
- Bischofsberger, W., & Dichtl, N. (2005). Anaerobtechnik (2 ed.). Berlin: Springer Verlag.
- Bradley, R. M., & Baruchello, L. (1980). Primary wastes in the olive oil industry. *Effluent and Water Treatment Journal*, 20, 176-177.
- Cabrera, F. (1996). The problem of the olive oil wastes in Spain: Treatment or recycling? *Proceedings of the 7th Mediterranean Conference on Organic Wastes Recycling in Soils*, 1, 1117-1125.
- Capasso, R. (1999). A review on the electron ionization and fast atom bombardment mass spectrometry of polyphenols naturally occurring in olive wastes and some of their synthetic derivatives. *Phytochemical Analysis*, 10, 299-306.
- Caputo, A. C., Scacchia, F., & Pelagagge, P. M. (2003). Disposal of by-products in olive oil industry: waste-to-energy solutions. *Applied Thermal Engineering*, 23, 197-214.
- Directorate-General for Environment, European Commission (2001). Survey of wastes spread on land - Final Report.
- Fernández-Bolaños, J., Fernández-Diez, M. J., Rivas, M., Gill Serrano, A., & Perez, T. (1983). A sucares y polioles en aceitunas verdes III. *Grasas Y Aceites*, 34, 168-171.
- Fiestas Ros de Ursinos, J. A., & Borja-Padilla, R. (1996). Biomethanization. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38, 145-153.
- Hadjisavvas, S. (1992). Olive oil processing in Cyprus: from the Bronze Age to the Byzantine period. Nicosia: Paul Aströms Förlag.
- Hamdi, M. (1992). Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 37, 155-163.
- Hamdi, M., & Garcia, J. L. (1993). Anaerobic digestion of olive mill wastewaters after detoxification by prior culture of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 28, 155-159.
- Matissek, R., Schnepel, F. M., & Steiner, G. (1992). Lebensmittelanalytik - Grundzüge, Methoden, Anwendungen (2 ed.). Heidelberg: Springer Verlag.
- Mazzotti, M. (2004). Enlightened Mills: Mechanizing Olive Oil Production in Mediterranean Europe. *Technology and Culture*, 45, 277-304.
- Niaounakis, M., & Halvadakis, C. P. (2006). Olive Processing Waste Management (2 ed.). Oxford: Elsevier Ltd.
- S'habou, R., Zairi, M., Kallel, A., Aydi, A., & Ben Dhia, H. (2009). Assessing the effect of an olive mill wastewater evaporation pond in Sousse, Tunisia. *Environmental Geology*, 58, 679-686.

Tsonis, S. P., & Grigoropoulos, S. G. (1983). Anaerobic treatment of wastewater from olive oil mills. In: Advances in modelling, planning, decision and control of energy, power and environmental systems. Anheim: Acta Press.

Tsonis, S. P., Tsola, V. P., & Grigoropoulos, S. G. (1989). Systematic characterization and chemical treatment of olive oil mill wastewater. Toxicological & Environmental Chemistry 20-21, 437-457.

Vlyssides, A. G., Loizidou, M., Gimouhopoulos, K., & Zorpas, A. (1998). Olive oil processing wastes production and their characteristics in relation to olive oil extraction methods. Fresenius Environmental Bulletin, 7, 308-313.

Internetquellen

<http://www.fao.org/>, 10.01.2011

<http://www.internationaloliveoil.org/>, 10.01.2011

http://members.fortunecity.es/guadalhorcete/guadalhorcete%202002/paneles/triada/mola_olearia.jpg, 15.02.2011

http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/systematik/6_droge/gifs/flavan.gif, 16.02.2011

Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ort, Datum

Unterschrift