Schlussbericht

zu den vom BMBF geförderten Teilprojekten
des ERA-IB-Verbundprojektes EIB.10.013

"Development of a process for the utilization both the carbohydrate and the lignin content from lignocellulosic materials of annual plants for the production of valuable products"

Teilprojekte der vom BMBF geförderten sächsischen Zuwendungsempfänger

(1)	SIAB/Universität Leipzig	Projektnummer:	0315927A
(2)	TU Bergakademie Freiberg	Projektnummer:	0315927B
(3)	TU Dresden	Projektnummer:	0315927C

Bewilligungszeitraum: 01.03.2011 – 28.02.2014

Autoren:

Dr. Swetlana König, Dipl.-Ing. (FH) Daniel Spindler, Dr. Gerhard Kerns (1)

Dipl.-Chem. Doreen Steffien, Prof. Dr. Martin Bertau (2)

Dr. Martina Bremer, Dipl.-Chem. Christine Roßberg, Dipl.-Ing. Holger Unbehaun (3)

Koordinator des ERA-IB-Verbundprojektes EIB.10.013:

Prof. Dr. Christian Wilhelm, Universität Leipzig

Stellv.: Dr. Gerhard Kerns, SIAB e.V.

Leipzig, den 31.08.2014

Inhalt:

Durchführung des Verbundprojektes

(1) Aufgabenstellung

Das Gesamtziel des Vorhabens betrifft die Prozessentwicklung zur stofflichen Nutzung sowohl des Kohlenhydrat- als auch des Ligninanteiles der Lignocellulose aus Einjahrespflanzen. Das Forschungsprojekt leistet dadurch einen Beitrag zur Diversifizierung der Rohstoffbasis und zur Substitution fossiler Rohstoffe mit nachwachsenden Rohstoffen.

Für das Gesamtprojekt des Forschungsverbundes ergaben sich die folgenden wissenschaftlichen und technischen Ziele:

I. Aufschluss von Lignocellulose-Substraten einjähriger Pflanzen

- Entwicklung eines Aufschlussverfahrens, das die Separation des Lignins für die nachfolgende stoffliche Nutzung ermöglicht
- Reinigung und analytische Charakterisierung des abgetrennten Lignins
- Abtrennung der Kohlenhydratfraktion für die nachfolgende Verwertung

II. Optimierung des Enzymkomplexes zur Verzuckerung des Kohlenhydratanteiles

- Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Zusammensetzung des Enzymkomplexes und der Effektivität der Verzuckerung
- Untersuchungen zur Inhibierung des Enzymkomplexes durch Substanzen aus dem Lignocellulose-Aufschluss
- Optimierung des Produktionsmediums zur Cellulase- / Hemicellulase-Gewinnung für den Einsatz im SSF-Prozess

III. Stoffliche Verwertung von Lignin aus Weizenstroh

- Enzymatische Modifikation des separierten (Stroh-) Lignins unter Einbeziehung von Ergebnissen des ERA-IB Projektes EIB.08.025
- Entwicklung von faserverstärkten Verbundwerkstoffen auf Basis des Lignins aus dem Strohaufschluss
- Untersuchungen zur Eignung von Weizenstrohlignin für die Herstellung von Bodenwasserspeichern

IV. Optimierung des SSF-Prozesses der Verzuckerung und Vergärung von Cellulose zu Ethanol

- Untersuchungen zur Verzuckerung des Kohlenhydratanteiles aus Weizenstroh mit *P. verruculosum*-Enzymkomplexen

- Einsatz von Modellhefen zur Ethanolgewinnung im SSF-Prozess auf Basis des Kohlenhydratanteiles aus Weizenstroh
- Untersuchungen zur Gewinnung weiterer Grundchemikalien aus dem SSF-Prozess

V. Scale-up des SSF-Prozesses am Beispiel der Ethanolgewinnung vom Labormaßstab bis zum Pilotmaßstab

- Scale-up des Aufschlusses am Beispiel von Weizenstroh
- Scale-up des SSF-Prozesses mit Zellstoff aus dem Aufschluss von Weizenstroh
- Verifizierung des Gesamtprozesses und Gewinnung von Prozessdaten

(2) Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Eine wesentliche Voraussetzung zur Durchführung des Projektes ist die finanzielle Förderung. Die Hauptrisiken für eine wirtschaftliche Umsetzung der mit dem Projektvorhaben zu erzielenden Ergebnisse werden durch folgende Kriterien bestimmt:

- Aufwand für den Aufschluss der Lignocellulose,
- Aufwand zur Entwicklung und Produktion des Enzymkomplexes für den SSF-Prozess,
- Stoffliche Verwertung der Ligninfraktion,
- Technische Realisierung des SSF-Prozesses.

Wegen des noch vorhandenen wirtschaftlichen Risikos war es nicht möglich, die Forschungsarbeiten ohne finanzielle Förderung durchzuführen.

Eine weitere Voraussetzung zur Durchführung des Projektes war die Bearbeitung im Rahmen des Verbundes aus den beteiligten Institutionen mit langjährigen Erfahrungen und Referenzen zu den jeweiligen Teilgebieten.

(3) Planung und Ablauf des Vorhabens

Bei den Untersuchungen zur stofflichen Verwertung sowohl des Lignin- als auch des Kohlenhydratanteiles aus Lignocellulose war aufgrund der Komplexität die Zusammenarbeit unterschiedlich profilierter Forschungsgruppen notwendig. Bei der Planung und dem Ablauf des Vorhabens wurde dies berücksichtigt, indem die drei sächsischen Projektpartner bei den methodischen und stofflichen Untersuchungen ihre Erfahrungen eingebracht und eng zusammengearbeitet haben.

Dies betrifft insbesondere den methodischen Vorlauf auf dem Gebiet der Herstellung und Charakterisierung von Verbundwerkstoffen im Institut für Holz- und Papiertechnik (IHPT) der TU Dresden sowie die Charakterisierung von Lignin und Kohlenhydraten und den Aufschluss von Lignocellulose für die stoffliche Nutzung der Ressource Holz im Institut für Pflanzen- und Holzchemie (IPHC). Die von der TU Bergakademie Freiberg in das Projekt eingebrachten Ergebnisse betreffen den enzymatischen Abbau von Cellulose sowie die Charakterisierung von Prozessen der simultanen Verzuckerung und Vergärung von Cellulose zu Ethanol und weiteren Produkten. Die vom SIAB eingebrachten Erfahrungen betreffen die Gewinnung und Charakterisierung von cellulolytischen Enzymkomplexen für den Einsatz im SSF-Prozess sowie das Scale-up von Fermentationsprozessen.

Die enge Zusammenarbeit bei den experimentellen Untersuchungen des vorliegenden Projektes betrifft den Austausch von Probematerialien sowie die laufenden methodischen und inhaltlichen Abstimmungen, auch in Arbeitsberatungen außerhalb der vier Projektmeetings des ERA-IB-Verbundvorhabens.

Eine separate Fassung des Schlussberichtes zu den jeweiligen sächsischen Teilprojekten wäre weniger verständlich und ein Zusammenhang der Ergebnisse nur schwer erkennbar. Aus diesem Grund wurde - wie schon bei den Zwischenberichten – ein gemeinsamer Schlussbericht zu den Teilprojekten der drei sächsischen Projektpartner angefertigt.

(4) Wissenschaftlicher Stand, an den angeknüpft wurde

Der Stand der Technik ist durch zahlreiche Forschungsaktivitäten zur stofflichen Nutzung von Lignocellulose gekennzeichnet. Verfahren zur stofflichen Verwertung aller Komponenten der Lignocellulose konnten wirtschaftlich bisher noch nicht umgesetzt werden. Die Ursachen für die mangelnde Wirtschaftlichkeit dieses Prozesses liegen in erster Linie in den noch zu hohen Enzymkosten, in einer nicht-optimalen Zusammensetzung der kommerziell verfügbaren Enzymkomplexe und im Aufwand für die Vorbehandlung der Lignocellulose.

So bestehen zahlreiche Forschungsaktivitäten zur Enzymentwicklung sowie zur Vorbehandlung von Lignocellulose. Diese werden im 7. Rahmenprogramm der EU sowie in Clustern der BMBF-Ausschreibung „Bioindustrie 2021" seit 2009 gefördert. Die Projektförderungen betreffen u.a. die Entwicklung von Enzymkomplexen, die gegenüber den derzeit kommerziell verfügbaren Präparaten besser für den enzymatischen Celluloseabbau geeignet sind.

Ein von Südchemie/Clariant entwickeltes Verfahren zur Gewinnung von Bioethanol der sog. 2. Generation auf Basis von Lignocellulose wurde bis zum Pilotmaßstab entwickelt und auf dem Kooperationsforum Biopolymere 2012 in Straubing vorgestellt. In diesem Verfahren wird das anfallende Lignin zur Energiegewinnung

verbrannt. Die enzymatische Hydrolyse der Cellulose erfolgt in einem separaten Schritt (SHF).

Die Konzeption des hier vorliegenden Verbundprojektes unterscheidet sich von den bekannten Konzeptionen. Ein wesentlicher Unterschied zu den bisherigen Konzepten besteht darin, dass sowohl der Kohlenhydratanteil in einem SSF-Prozess zur Gewinnung von Grundchemikalien als auch der Ligninanteil für die stoffliche Verwertung zur Herstellung von Biopolymeren, Bodenverbesserungsmitteln bzw. Lignin-Kopplungsprodukten genutzt werden. Im Vergleich mit der getrennten enzymatischen Hydrolyse (SHF) des Zellstoffs nach dem Aufschluss und anschließender Fermentation zu Ethanol erlaubt der SSF-Prozess höhere Ausbeuten, kürzere Verweilzeiten und niedrigere Enzymmengen.

Für den Prozess der simultanen Verzuckerung und Vergärung sind Enzymkomplexe notwendig, die eine – substratbezogene - optimale Zusammensetzung der Einzelkomponenten und eine möglichst hohe Resistenz gegenüber Ethanol aufweisen. Die derzeit verwendeten Enzyme für die enzymatische Hydrolyse von Kohlenhydraten zu freien Zuckern werden nahezu ausschließlich mit *Trichoderma reesei*-Produktionsstämmen gewonnen. Ein Nachteil der *T. reesei*-Enzymkomplexe besteht in einem zu geringen ß-Glucosidaseanteil, so dass in der Regel Fremd-ß-Glucosidase dem Komplex separat zugesetzt werden muss, um den Cellobioseanteil im Hydrolysat gering zu halten.

Der in eigenen Arbeiten entwickelte *P. verruculosum*-Cellulasekomplex weist gegenüber den weltweit untersuchten *T. reesei*-Cellulasekomplexen signifikante Vorteile auf. Diese zeigen sich in einer höheren Resistenz gegenüber Ethanol und in einer vorteilhafteren Zusammensetzung des Hydrolysates infolge eines höheren Anteiles an ß-Glucosidase im Enzymkomplex.

Die bisher untersuchten Vorbehandlungsmethoden von Lignocellulose sind vielfältig und reichen von mechanischen Behandlungen bis hin zu chemischen Aufschlüssen. Typischerweise kommen zum Einsatz: Steam explosion, CO_2-Explosion, Säureaufschluss, Basenaufschluss, Behandlung mit organischen Lösungsmitteln, mechanische Zerkleinerung (Mahlen, Zerfasern), Behandlung mit Wasserstoffperoxid, u.a. Die Effektivität einer Vorbehandlungsmethode wird anhand der Trennung der drei Hauptbestandteile der Lignocellulose beurteilt. Je effektiver die Trennung, desto besser können die einzelnen Bestandteile in folgenden Prozessen verwertet werden.

In gemeinsamen Vorarbeiten des Instituts für Technische Chemie an der TU Bergakademie Freiberg und des SIAB konnte anhand von Stroh gezeigt werden, dass ein Biomasseaufschluss mit Ameisensäure/Wasserstoffperoxid für den Lignocellulose-Aufschluss geeignet ist, um sowohl den Zellstoff als auch das Lignin abzutrennen, was die spätere Weiterverarbeitung dieser Komponenten ermöglicht.

Das Fraunhofer Institut für Chemische Technologie (ICT) und die Firma TECNARO GmbH haben ein Verfahren zur Herstellung eines Verbundwerkstoffes aus Ligninmaterial entwickelt. Das Material besteht aus Ligninresten (überwiegend Kraft-Lignin aus Holz) und Lignocellulose-Fasern. Die starke Emission von flüchtigen organischen Verbindungen (VOC), verbunden mit den nachteiligen Geruchseigenschaften, verhindert jedoch den Einsatz dieser Materialien für verschiedene höherwertige Produkte.

Für die hier geplanten Untersuchungen zur Nutzung von Weizenstroh-Lignin für die Herstellung von faserverstärkten Verbundwerkstoffen werden Erkenntnisse aus dem ERA-IB-Projekt EIB.08.025 einbezogen, in dem der Einsatz von Kraftlignin aus der Zellstoffindustrie für die Herstellung von faserverstärkten Verbundwerkstoffen untersucht wurde.

(5) Zusammenarbeit mit anderen Partnern

Die Ziele und Arbeitsvorhaben des komplexen Projektvorhabens erfordern umfangreiches Wissen und moderne Methoden auf verschiedenen Forschungsgebieten. Zur Gewährleistung einer erfolgreichen Bearbeitung wurde im Rahmen des ERA-IB-Verbundprojektes EIB.10.013 mit vier weiteren Institutionen mit langjährigen Erfahrungen und Referenzen auf den projektrelevanten Gebieten zusammengearbeitet:

- VTT, Technical research centre of Finland; 02044 VTT Espoo, Finnland
- LNEG- Laboratório Nacional de Energia e Geologia; Lissabon, Portugal
- WUR-Food and Biobased Research; 6708WG Wageningen, Niederlande (im Unterauftrag der TU Bergakademie Freiberg)
- Applied Biochemistry and Biotechnology Center- BIOTEHNOL; 011464 Bukarest, Rumänien

Die Aktivitäten dieser Partner sind im *Final Report* des ERA-IB-Projektes EIB.10.013 dargestellt.

Die Untersuchungen im technischen Maßstab zum alkalischen Aufschluss sowie zum SSF-Prozess wurden als Unterauftrag im CBP-Fraunhofer Center for Chemical-Biotechnological Processes (Leuna) durchgeführt. Der Aufschluss von Weizenstroh mit Ameisensäure/Wasserstoffperoxid wurde im technischen Maßstab als Unterauftrag bei Lanxess Deutschland GmbH, Group Function Innovation and Technology, Dormagen, durchgeführt.

Agrana Bioethanol GmbH, A-3435 Pischelsdorf, Österreich, ist als *Third Party* am ERA-IB-Projekt EIB.10.013 beteiligt und hat für die experimentellen Arbeiten Produktionshefe für die Untersuchungen zum SSF-Prozess sowie Weizenkleie und Amylasen bereitgestellt.

Ergebnisse

Gliederung

		Seite
1	Wissenschaftlich technische Ergebnisse	9
1.1	Ausgangsmaterial (TUD)	9
1.2	Aufschluss der Lignocellulose	9
1.2.1	NP-Aufschluss mit Ameisensäure/Wasserstoffperoxid (SIAB/UL)	11
1.2.2	Alkalischer Aufschluss (TUD)	16
1.2.3	Scale-up des Aufschlusses von Weizenstroh (TUD, SIAB/UL)	18
1.3	Gewinnung von *P. verruculosum* Cellulase (SIAB/UL)	23
1.4	Optimierung des SSF-Prozesses / Verzuckerung der Zellstoffe	27
1.4.1	Analytik (TU BAF, SIAB/UL)	27
1.4.2	Optimierung und Charakterisierung der enzymatischen Hydrolyse (TU BAF, SIAB/UL)	27
1.4.3	Einfluss der Prozessbedingungen beim alkalischen Biomasseaufschluss auf die enzymatische Verzuckerung (TU BAF)	45
1.4.4	Untersuchungen zur Fermentation von Lignocellulosehydrolysaten (TU BAF, SIAB/UL)	52
1.4.5	Optimierung der simultanen Verzuckerung und Fermentation (SSF) des Zellstoffs aus dem Aufschluss mit Ameisensäure/Wasserstoffperoxid (SIAB/UL)	59
1.4.6	Optimierung der simultanen Verzuckerung und Fermentation des Zellstoffs aus dem alkalischen Aufschluss (TU BAF)	66
1.4.7	Vergleich der verschiedenen Aufschlussverfahren hinsichtlich der Lignocellulosekonvertierung zu Ethanol (SIAB/UL)	75
1.4.8	Scale-up des SSF-Prozesses am Beispiel der Ethanolgewinnung (TU BAF, SIAB/UL)	79
1.4.9	Herstellung höherer Alkohole aus Lignocellulosehydrolysaten (TU BAF)	80
1.5	Charakterisierung und Modifikation von Lignin (TU BAF, TUD)	81
1.5.1	Chemische Charakterisierung (TUD, TU BAF)	81
1.5.2	Chemisch-enzymatische Modifikation von Lignin (TU BAF)	89
1.5.3	Einsatz des Lignins als Matrixmaterial in Bio-Compositen (TUD)	94
1.5.4	Vernetzung des Lignins – Hydrogele (TUD)	97
1.6	Untersuchungen zu Sekundärprodukten aus Fermentationsprodukten des SSF-Prozesses (TU BAF)	99
1.7	Wirtschaftliche Betrachtung des Gesamtprozesses (TU BAF)	102

2 Veröffentlichungen zum Projekt 103
3 Referenzen 105

Ergebnisse

1 Wissenschaftlich technische Ergebnisse

1.1 Ausgangsmaterial (TU Dresden)

Für die Untersuchungen der Projektpartner sollte Weizenstroh einer Charge verwendet werden. Dabei wurde auf Bestände des Lehrstuhles für Holz- und Faserwerkstofftechnik der TU Dresden zurückgegriffen. Hier stand ein Strohballen mit ca. 200 kg Weizenstroh aus der Agrargenossenschaft Ruppendorf zur Verfügung.

Das Stroh wurde mit unterschiedlichen Verfahren mechanisch vorzerkleinert. Ziel der Untersuchungen sollte es sein, den Einfluss der Vorzerkleinerung bzw. der Partikelgröße auf den nachfolgenden chemischen Aufschluss zu verifizieren.

Tab. 1.1.1: Vorzerkleinerung des Weizenstrohs

Bezeichnung	Vorbehandlung
gehäckselt	Hege Häcksler
gemahlen	Mühle Retsch SM100, Sieb 4 mm
TMP	TMP, Mahlspalt 0,15 mm

Die Herstellung des Weizenstroh-TMP (Thermo- Mechanical Pulp) erfolgte in einem 12" Andritz-Laborrefiner ohne Vordämpfen, mit einem Mahlspalt von 0,15 mm. Der Mahlenergieverbrauch lag dabei bei 677 kWh/t. Der Feinanteil betrug ca. 13 %. Die Faserlänge lag zwischen 0,1 und 2 mm.

Für die Scale-up-Versuche am Fraunhofer CBP (Leuna) in 2013 und bei Lanxess (Dormagen) in 2014 wurden Weizenstrohballen der Agrargenossenschaft Rossau eingesetzt.

1.2 Aufschluss der Lignocellulose

Zum Aufschluss von Lignocellulose sind zahlreiche Verfahren beschrieben. Neben den bekannten Verfahren zum Aufschluss von Holz für die Zellstoffgewinnung sind dies das sog. steam explosion, der Organosolv-Aufschluss sowie alkalische und saure Aufschlussverfahren, letztere beispielsweise mit Salz- bzw. Schwefelsäure. Diese Aufschlussverfahren haben zumeist nur die Nutzung des Celluloseanteiles der Lignocellulose zum Ziel. So wird in einem Verfahren der Clariant AG [1] zur Gewinnung von Ethanol der zweiten Generation auf Basis von Lignocellulose aus

Einjahrespflanzen das Lignin aus dem Aufschluss zur energetischen Absicherung des Prozesses verbrannt.

Das vorliegende Projekt betrifft die stoffliche Nutzung sowohl des Kohlenhydratanteiles als auch des Ligninanteiles der Lignocellulose aus Einjahrespflanzen. Unter dieser Zielstellung wurden verschiedene Aufschlussverfahren bearbeitet. Die Lignin- und die Kohlenhydratfraktion der jeweiligen Aufschlüsse wurden abgetrennt und für die analytischen und stofflichen Untersuchungen bei den Projektpartnern des Verbundvorhabens bereitgestellt.

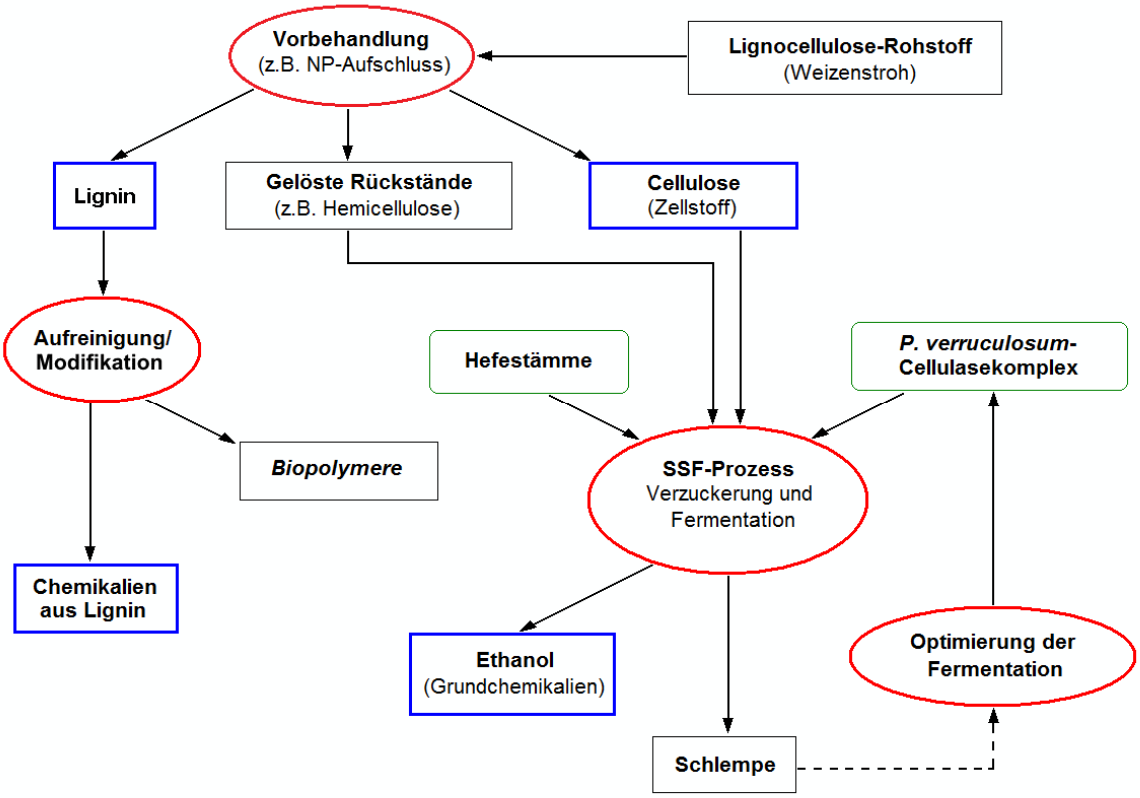


Abb. 1.2.1: Gesamtprozess der stofflichen Verwertung von Lignocellulose

Im Rahmen des Verbundprojektes wurden der Aufschluss mit Ameisensäure und Wasserstoffperoxid in Anlehnung an das sog. Natural-Pulping-Verfahren, der alkalische Aufschluss und die Autohydrolyse von Weizenstroh untersucht. Das Aufschlussverfahren mittels Autohydrolyse wurde beim Projektpartner LNEG, Lissabon, das Aufschlussverfahren mit überkritischem CO_2 beim Projektpartner BIOTEHNOL in Bukarest bearbeitet.

1.2.1 NP-Aufschluss mit Ameisensäure / Wasserstoffperoxid (SIAB / UL)

Die Bereitstellung von Zellstoff und Lignin aus dem Natural-Pulping-Verfahren erfolgte in Anlehnung an das von S. Siegle[2] beschriebene Verfahren des Lignocelluloseaufschlusses.

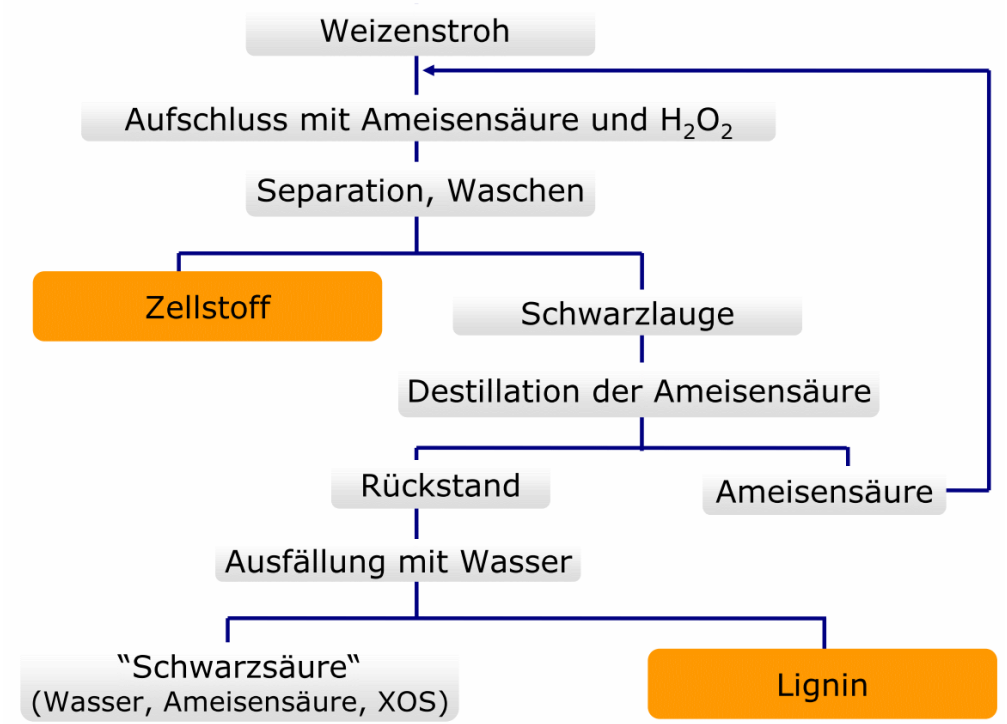


Abb.1.2.1.1: Schematische Darstellung des NP-Aufschlussverfahrens

Zu diesem Zweck wurden nach dem Basisprotokoll 65 g Stroh mit 1,6 L Ameisensäure (75 %) unter Zugabe von 42 mL Wasserstoffperoxid (30 %) 1 Stunde am Rückfluss gekocht (Abb. 1.2.1.2). Nach dem Abkühlen wurde der unlösliche Zellstoff per Sieb abgetrennt. Der entstandene Sud mit dem gelösten Lignin wurde bei 105 °C eingeengt. Die abdestillierte Ameisensäure konnte somit für weitere Aufschlüsse wieder verwendet werden. Zum abgekühlten Destillationsrückstand wurde Wasser zugegeben und das Lignin ausgefällt. Anschließend wurde das feuchte Lignin luftgetrocknet. Pro Ansatz konnten ca. 6 g Lignin sowie 28 g Zellstoff gewonnen werden.

Zur Optimierung des Aufschlussverfahrens wurden Untersuchungen durchgeführt, bei denen durch Variation der Aufschlussdauer, -temperatur und der eingesetzten Substratmenge eine möglichst hohe Zellstoffausbeute mit unverminderter Qualität erzielt werden sollte.

Abb. 1.2.1.2:
Laborapparatur zum Lignocellulose-Aufschluss mit Ameisensäure/Wasserstoffperoxid in Anlehnung an das Natural Pulping-Verfahren

Zunächst wurde der Einfluss der eingesetzten Ameisensäurekonzentration (30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % und 80 %) im Ansatz untersucht. Die erhaltenen Produkte Zellstoff und Lignin wurden zum einen nasschemisch analysiert. Zum anderen wurde der entstandene Zellstoff durch Verzuckerungsversuche bewertet.

In der Tabelle 1.2.1.1 sind beispielhaft für die Ameisensäurekonzentrationen 60 %, 70 % und 80 % die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefasst. Dabei konnten folgende Wechselbeziehungen beobachtet werden. Die Zellstoffausbeute nimmt mit steigender Säurekonzentration ab. Bei 30%iger Ameisensäure lag die Zellstoffausbeute bei 75 %. Der Cellulosegehalt des Zellstoffs nimmt mit steigender Ameisensäurekonzentration zu.

Der in der Ameisensäurefraktion gelöste Rückstand besteht zum größten Teil aus Lignin. Mit steigender Ameisensäurekonzentration beim Aufschluss nimmt sowohl die Gesamtausbeute an Rückstand als auch die Ligninkonzentration des Rückstands zu. Der Restligningehalt des gewonnenen Zellstoffes ist mit etwa 12 % relativ hoch, bleibt allerdings bei den Konzentrationen 60 %, 70 % und 80 % auf etwa gleichem Niveau.

Tab. 1.2.1.1: Ergebnisse der Untersuchungen zur Optimierung des NP-Aufschlusses durch Variation der eingesetzten Ameisensäurekonzentration (AS)
(Die Versuche wurden im Doppelansatz durchgeführt. Die Ausbeute ist prozentual auf die eingesetzte Substratmenge Weizenstroh berechnet. k.A. nicht analysiert)

Probe	*batch*, **AS 60 %**, 60 min Kochen: 20 min Vorkochen, 40 min mit H_2O_2		*batch*, **AS 70 %**, 60 min Kochen: 20 min Vorkochen, 40 min mit H_2O_2		*batch*, **AS 80 %**, 60 min Kochen: 20 min Vorkochen, 40 min mit H_2O_2	
Ausbeute Zellstoff [%]	**50,1**	**49,2**	**47,8**	**48,2**	**46,0**	**45,8**
Cellulose in Zellstoff [%]	83	k. A.	85,5	k. A.	88,3	k. A.
Polyosen in Zellstoff [%]	88,7	k. A.	90,1	k. A.	92,3	k. A.
Hemicellulose in Zellstoff [%]	5,7	k. A.	4,6	k. A.	4	k. A.
Extraktstoffe in Zellstoff [%]	1,7	1,7	1,5	1,7	1,3	1,7
Lignin in Zellstoff [%]	11	11	12,6	11,1	10,8	17,3
Reduzierender Zucker nach 168 h [g/L] *)	**35,9**	**33,9**	**31,0**	**29,8**	**24,6**	**23,8**
Ausbeute Rückstand [%]	9,4	9,6	10,2	10,8	11,1	10,9
Klason Lignin in Rückstand [%]	79,6	78	82,8	81,4	83,4	86,1
Ausbeute an Klason Lignin [%]	7,5	7,5	8,4	8,8	9,2	9,4

***)** enzymatische Hydrolyse von NP-Zellstoff

Die Qualität des Zellstoffes wurde mittels Verzuckerung mit der *P. verruculosum*-Cellulase bewertet. Dabei wurde der Zellstoff in Citratpuffer für 7 Tage bei 30 °C mit einer Cellulaseaktivität von 15 FPU (filter paper unit) pro Gramm Trockenmasse Zellstoff bewegt inkubiert. Pro Versuchsreihe wurden 10 Proben entnommen und hinsichtlich ihres Gehaltes an reduzierenden Zuckern untersucht.

Die Ergebnisse dieser Analysen sind in der Abbildung 1.2.1.3 zusammengeführt. Der am besten zu hydrolysierende Zellstoff stammte aus dem Aufschluss mit 60%iger Ameisensäure. Im Vergleich dazu wurden bei den Säurekonzentrationen

50 % und 70 % etwa 90 % des Hydrolysierungsgrades erreicht. Die übrigen Zellstoffchargen (30 %, 40 % und 80 %) konnten im Vergleich zum Aufschluss mit 60%iger Ameisensäure bis zu 71 % hydrolysiert werden.

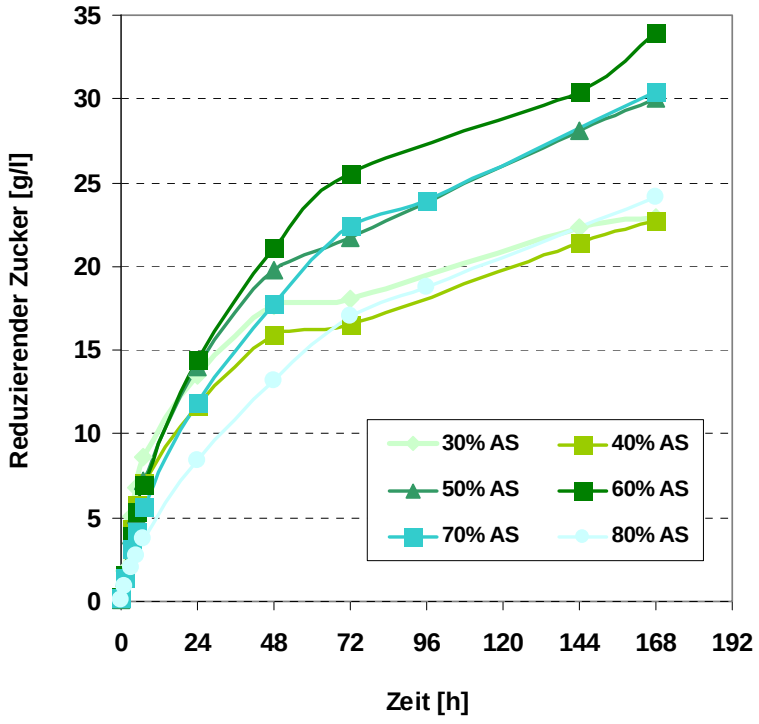


Abb. 1.2.1.3: Ergebnisse der Verzuckerung von NP-Zellstoff, gewonnen aus Aufschlüssen mit verschiedenen Ameisensäurekonzentrationen (AS)

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob das Flottenverhältnis durch eine zusätzliche Strohzugabe innerhalb des Prozesses verbessert werden kann. Die Versuche wurde nach dem Basisprotokoll mit 70%iger Ameisensäure durchgeführt. Bei diesem so genannten *„fed batch"*-Versuch wurde nach der regulären Kochzeit von 20 min noch einmal die gleiche Weizenstrohmenge (65 g) zugegeben und zusätzlich 20 min länger gekocht, sodass sich der Heizprozess von 60 min auf 80 min verlängerte. Das Flottenverhältnis (Anteil der Trockenmasse des Zellstoffs zu dem eingesetzten Lösungsmittel) konnte so von 1:29 auf 1:15 reduziert werden.

Die prozentuale Ausbeute an Zellstoff war gegenüber dem Standardansatz leicht erhöht (Tabelle 1.2.1.2). Der leicht angestiegene Rest-Ligningehalt des Zellstoffs deutet auf eine unvollständigere Trennung zwischen Zellstoff und Lignin hin.

Die Hydrolyse-Qualität des gewonnenen Zellstoffes, mittels Verzuckerung mit *P. verruculosum*-Cellulase ermittelt, war nahezu gleich. Der Gehalt an reduzierenden Zuckern nach 216 Stunden cellulolytischem Verdau lag um 3 % unter dem Vergleichsprozess ohne zusätzliche Strohzuführung.

Tab. 1.2.1.2: Ergebnisse der Untersuchungen zur Optimierung des NP-Verfahrens unter Variation der eingesetzten Substratmenge
(Die Versuche wurden im Doppelansatz durchgeführt.)

Probe	***fed batch***, AS 70 %, 80 min Aufschluss: 20 min Vorkochen, 2. Zugabe, 20 min Vorkochen, 40 min mit H_2O_2		***batch***, AS 70 %, 60 min Aufschluss: 20 min Vorkochen, 40 min mit H_2O_2	
Ausbeute Zellstoff [%]	**50,3**	**50,9**	**47,8**	**48,2**
Extraktstoffe in Zellstoff [%]	2,30	2,30	1,50	1,70
Lignin in Zellstoff [%]	17,6	18,6	12,6	11,1
Reduzierender Zucker nach 216h [g/L] *)	**27,6**	**25,8**	**28,1**	**27,0**
Ausbeute Rückstand [%]	12,4	12,7	10,2	10,8
Klason Lignin in Rückstand [%]	82,2	80,2	82,8	81,4
Ausbeute Klason Lignin[%]	10,2	10,2	8,45	8,78

*) enzymatische Hydrolyse von NP-Zellstoff

Anhand dieser Untersuchungen konnte zum einen gezeigt werden, dass die optimale Ameisensäurekonzentration beim Natural Pulping-Aufschluss für die anschließende Verzuckerung des Zellstoffanteils mit *P. verruculosum*-Cellulase bei 60 % liegt. Zum anderen kann eine Verbesserung des Flottenverhältnisses ohne große Qualitätsverluste des Zellstoffes durch einen so genannten *fed-batch*-Ansatz mit Nachführung von Weizenstroh erfolgen.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden alle weiteren Experimente unter folgenden gleichen Bedingungen durchgeführt: 100 g unbehandeltes Weizenstroh wird mit 1384 g 60%iger Ameisensäure unter Zugabe von 42 g Wasserstoffperoxid (30 %) 1 Stunde am Rückfluss gekocht.

1.2.2 Alkalischer Aufschluss (TUD)

Der alkalische Aufschluss des Weizenstrohs wurde mit Natronlauge in einem 2 L-Autoklaven durchgeführt. Hierbei wurden die Vorzerkleinerung des Weizenstrohs, sowie die Aufschlussparameter Temperatur, Aufschlussdauer sowie die Laugenkonzentration variiert.

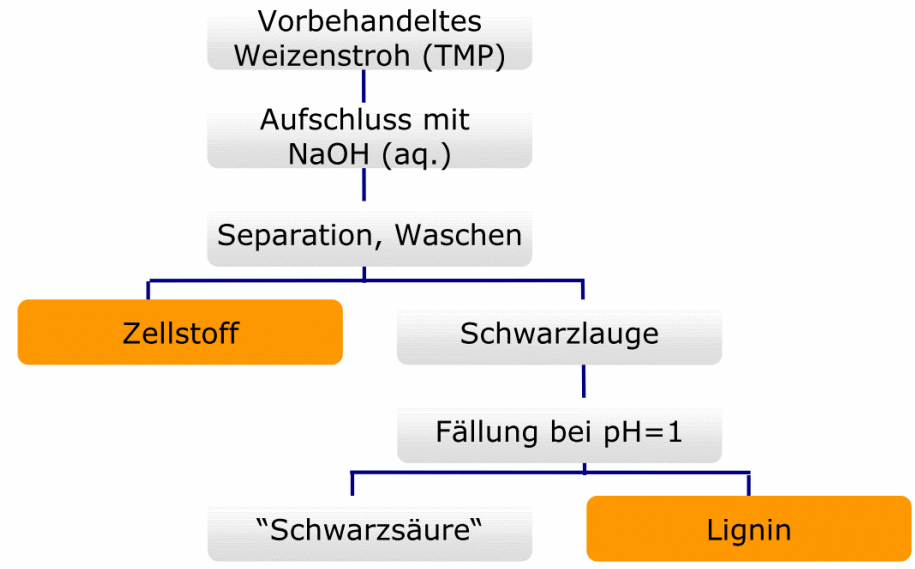


Abb. 1.2.2.1: Schematische Darstellung des alkalischen Aufschlusses

Vor dem Aufschluss wurde das Weizenstroh gehäckselt, gemahlen oder mittels TMP-Refiner vorbehandelt. Abbildung 1.2.2.2 zeigt den Einfluss dieser Vorbehandlungen auf den Ligningehalt im Zellstoff und die enzymatische Hydrolyse.

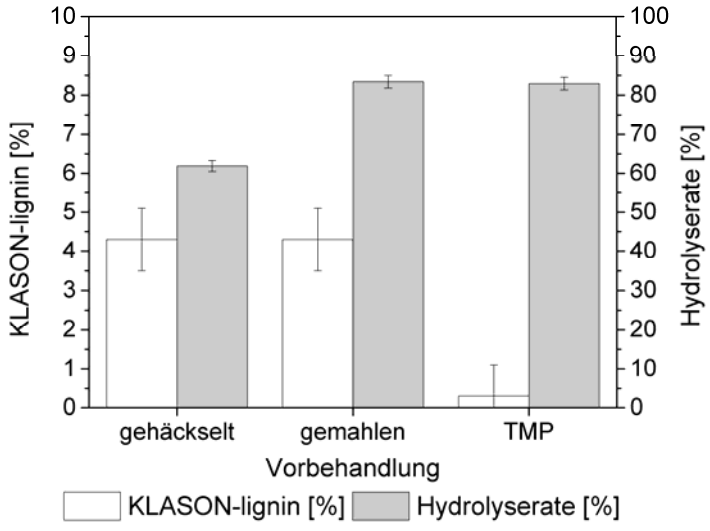


Abb.1.2.2.2:

Einfluss einer Weizenstroh-zerkleinerung vor dem alkalischen Aufschluss

Der Zellstoff aus dem TMP-Weizenstroh zeigt die beste enzymatische Hydrolyse bei sehr geringem Restligningehalt. Da diese Vorbehandlung jedoch recht energieintensiv ist, wäre die Mahlung als Vorbehandlung zu bevorzugen.

Die Aufschlussparameter wurden anhand der erreichten Ausbeute und Reinheit von Zellstoff und Lignin bewertet. Die Optimierung der Konzentration der Natriumhydroxidlösung, der Temperatur sowie der Aufschlussdauer sind in Abbildung 1.2.2.3 dargestellt. Die optimale Konzentration an Natriumhydroxid ist mit w_{NaOH} = 3 % relativ niedrig dosiert. Bei Einsatz einer weiter verdünnten Natriumhydroxidlösung steigt jedoch der Restligningehalt im Zellstoff signifikant an.

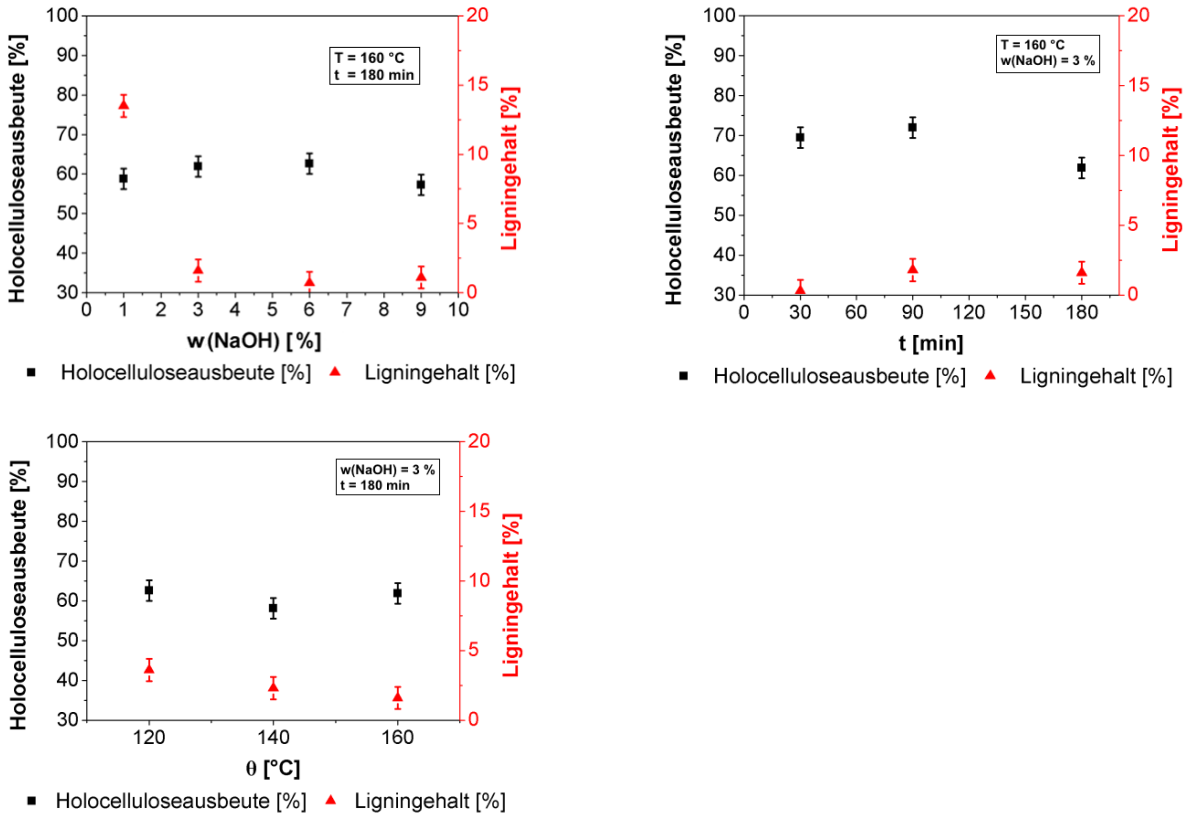


Abb. 1.2.2.3: Einfluss von Natriumhydroxidkonzentration, Aufschlusstemperatur und Aufschlussdauer auf die Holocelluloseausbeute und den Ligningehalt des Zellstoffs

Bei der Variierung der Aufschlusstemperatur zeigte sich, dass eine Erhöhung dieser zu einer besseren Delignifizierung des Zellstoffs führt. Die Holocelluloseausbeute wird hingegen nicht beeinflusst. Da bei einer Temperatur von 160 °C eine nahezu vollständige Separation der Lignocellulose möglich ist, wurde diese für weitere Versuche als Optimum angesehen. Auch die Aufschlussdauer wurde von 30 bis 180 min variiert. Es zeigte sich jedoch, dass lange Aufschlusszeiten zu einer

Verringerung der Holocelluloseausbeute führen, sodass eine kurze Aufschlusszeit von t = 30 min empfohlen wird. Aus den genannten optimierten Parametern ergibt sich ein Aufschluss mit einem H-Faktor von 320.

Anschließend an die Optimierungsversuche wurde eine Aufschlussreihe mit insgesamt sieben Aufschlüssen durchgeführt (w_{NaOH}= 3 %, T= 160 °C, t= 30 min). Die erhaltenen Lignine und Zellstoffe wurden jeweils vereint, um eine Mischprobe für größere Folgeversuche, wie die Verarbeitung des Lignins für die Composite-Fertigung, bereitzustellen.

1.2.3 Scale-up des Aufschlusses von Weizenstroh

Natural Pulping-Aufschluss

Das Ziel der Vorbehandlung des Weizenstrohs im Natural Pulping-Verfahren betraf die Bereitstellung einer möglichst reinen Cellulosefraktion bei hoher Zellstoff-ausbeute. Unter Laborbedingungen erwies sich dabei für den Aufschluss eine fed-batch-Variante mit einmaliger Substratnachführung als optimal. Die Aufschlussparameter wurden im analogen Flottenverhältnis (1:15) auf einen 600 L-Emaillereaktor (Abb. 1.2.3.1) einer Pilotanlage der Fa. Lanxess für die Vorbehandlung von 23 kg Weizenstroh mit dem Faktor 1:190 übertragen.

Abb. 1.2.3.1:
Pilotreaktor
(Lanxess Deutschland GmbH, Group Function Innovation and Technology, Dormagen)

Der technische Aufschluss erwies sich unter den gewählten Betriebsbedingungen (30 min Vorkochzeit und 40 min Hauptkochzeit unter Peroxidzugabe bei 102 °C – 105 °C am Rückfluss) als praktikabel und führte zu den in Tabelle 1.2.3.1 zusammengefassten Kennwerten. Im Vergleich zur optimierten Zellstoffausbeute von bis zu 55 % unter Laborbedingungen konnten 51 % (=11,7 kg) Zellstoff mit gleichwertigem Cellulosegehalt von annähernd 75 % erzielt und das NP-Verfahren somit erfolgreich im Pilotreaktor abgebildet werden.

Tab. 1.2.3.1: Vergleich von Zellstoffausbeute und -zusammensetzung nach Scale-up des Natural Pulping Aufschlusses

Reaktor	Ausbeute[1] [%]	Zusammensetzung in [%]				
		Extrakt-stoffe	Cellulose	Hemi-cellulose	Lignin	Asche
5 L (Glas)	50 - 55	2,3 – 2,5	78,6 – 79,0	10,7 – 10,8	13,3 – 15,7	4,0 – 4,2
600 L (Emaille)	51	2,7	73,7	4,0	24,2	-

[1] Zellstoff bezogen auf Weizenstroh

Unter näherer Betrachtung der Ligninkomponente in den Tabellen 1.2.3.1 und 1.2.3.2 ergibt sich eine moderate Abweichung zum Labormaßstab, die erwartungsgemäß auf ein eingeschränktes Aufarbeitungsverfahren bzw. Equipment nach erfolgtem Aufschluss im Technikum zurückzuführen ist, bei dem die Zellstoffnachwäsche mit Ameisensäure für eine maßgebliche Ligninreduktion nicht durchgeführt werden konnte.
Die Weiterbehandlung der sauren Zellstoffkomponente (pH=3,0) zur Entfernung der Formiatrückstände erfolgte durch Suspendierung in Leitungswasser im gerührten Neutralisationstank.

Tab. 1.2.3.2: Vergleich von Ligninausbeute und –zusammensetzung nach Scale-up des Natural-Pulping-Aufschlusses

Reaktor	Aus-beute[1] [%]	Zusammen-setzung in [%]		funktionelle Gruppen in [mmol/g]				
		Lignin	Asche	$OH_{aliphat}$	OH_{phenol}	COOH	CO	OCH_3
5 L	11,8	79,6	3,0	4,5	1,1	1,2	2,0	2,8
600 L	4,6	84,8	4,9	5,0	1,4	1,5	2,2	2,6

[1] Fällprodukt bezogen auf Weizenstroh

Gemäß Abbildung 1.2.3.2 bildete sich der Wasserverbrauch als Funktion der Zellstoffbeladung in Bezug auf das Arbeitsvolumen und die Anzahl der Waschschritte (unter Einhaltung der Mindestwassermenge zur Realisierung einer umwälzbaren Suspension) ab. Dabei erwies sich eine hohe Trockenmasse-Beladung im Mindestvolumen in Verbindung mit einer größeren Anzahl an Waschschritten als deutlich geeigneter im Vergleich zur niedrigen Einwaage unter reduzierter Schrittfolge. Für den Neutralisationsbereich (pH > 6,0) war ein Verbrauchswert von 90 kg Wasser/kg Zellstoff abzuleiten. Die technische NP-Zellstoffcharge wurde trotz erhöhtem Restligningehalt unter üblichen Ethanol-erträgen erfolgreich im SSF-Laborprozess eingesetzt.

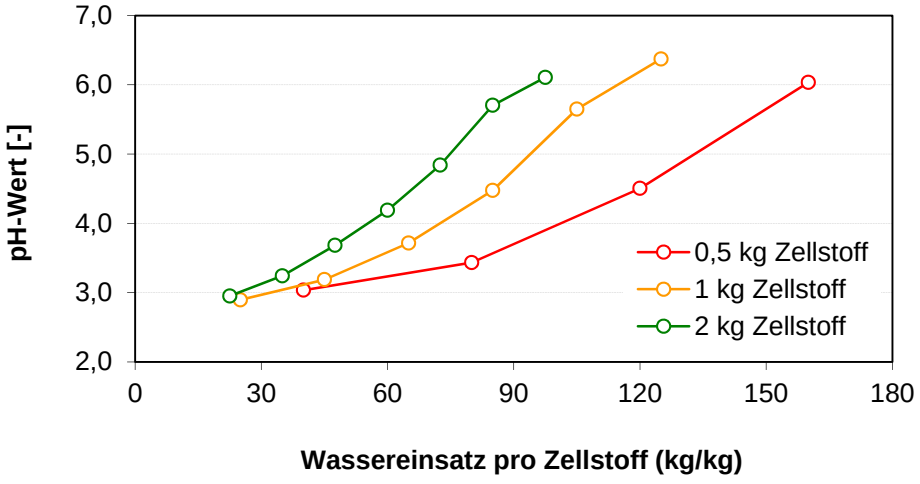


Abb. 1.2.3.2: Zellstoff-spezifischer Wassereinsatz für den pH-Neutralisationsbereich

Für die Bereitstellung des Lignin-haltigen Rückstandes und zur Rückgewinnung der eingesetzten Ameisensäure wurde der Aufschlusssud destilliert und um Faktor 7 auf 42 kg eingeengt. Die Isolierung des Ligninanteils (1,05 kg) erfolgte durch Ausfällung in Leitungswasser und zentrifugaler Abtrennung.

Bezüglich der Ligninqualität ergab sich unter Berücksichtigung der Tabelle 1.2.3.2 eine geringfügig höhere Reinheit der technischen Charge, während die funktionellen Gruppen im Vergleich zum Lignin aus den Laboruntersuchungen keinen signifikanten Unterschied aufwiesen.

Alkalischer Aufschluss

Unter den beschriebenen optimalen Parametern zur alkalischen Auftrennung von Lignocellulose wurden am Fraunhofer CBP zwei Aufschlüsse im 400 L-Festbettreaktor durchgeführt. Dabei konnten je Aufschluss 25 kg Weizenstroh umgesetzt werden. Es wurden insgesamt 22,3 kg Zellstoff gewonnen, welche teilweise für den anschließenden SSF-Prozess (siehe Abschnitt 1.4.8) genutzt

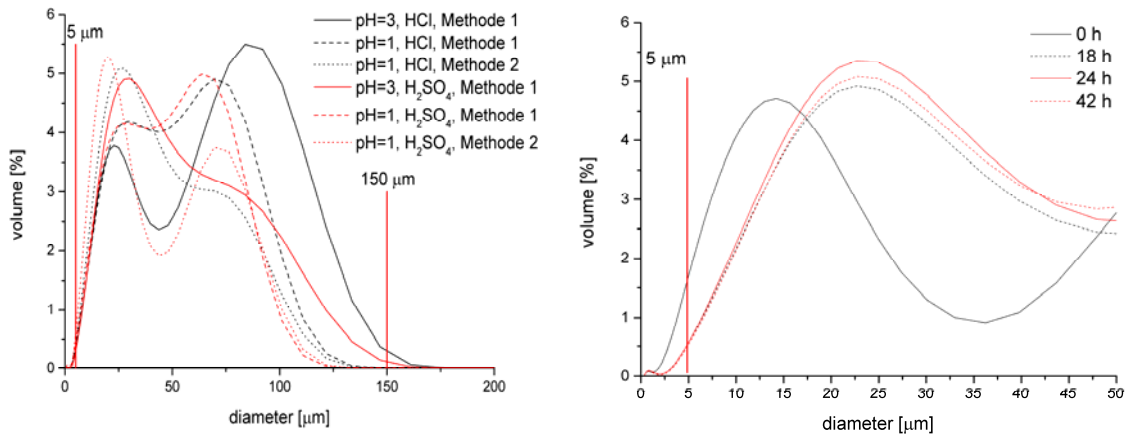
wurden. Die Ausbeute und Zusammensetzung im Vergleich zum Labormaßstab sind in Tabelle 1.2.3.3 zusammengefasst. Die Zellstoffausbeute ist etwas geringer als nach dem Aufschluss im 2 L-Autoklaven. Dies zeigt, dass im Pilotmaßstab noch Optimierungen nötig sind, die Maßstabsvergrößerung dennoch als gelungen anzusehen ist.

Tab. 1.2.3.3: Vergleich von Zellstoffausbeute und -zusammensetzung nach Scale-up des alkalischen Aufschlusses

Reaktor	Ausbeute[1] [%]	Zusammensetzung in [%]				
		Extraktstoffe	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	Asche
2 L	55	1,7	76,5	12,3	4,3	2,6
400 L	46	0,5	75,2	18,0	6,5	5,2

[1] Zellstoff bezogen auf Weizenstroh

Neben dem Zellstoff wurden 10 kg Lignin als Produkt gewonnen, von welchem jedoch aufgrund der schwierigen Abtrennung vor Ort nur 7,5 kg aufgearbeitet werden konnten. Grund hierfür ist die geringe Partikelgröße des Lignins, welche auch nicht durch verschiedene Fällverfahren beeinflusst werden konnte. Die Partikelgrößenverteilung ist in Abbildung 1.2.3.3 dargestellt. In Teil (b) ist zudem ersichtlich, dass eine Lagerung von über 18 h nach der Fällung zur Agglomeration der Partikel führt, welche die Abtrennbarkeit positiv beeinflusst.



(a) (b)

Abb. 1.2.3.3: Partikelgrößenverteilung des Lignins in Abhängigkeit von (a) verschiedenen Fällmethoden und (b) der Fälldauer

Daher wurde auch im Großversuch das gefällte Produkt über Nacht im Fälltank belassen, bevor es abgetrennt wurde. Durch die Größe von über 5 und unter 150 µm ist das Lignin durch Zentrifugation, jedoch nicht durch Filtration abtrennbar. Daher konnte die Abtrennung des Lignins nicht mit der Kammerfilterpresse erfolgen, sondern musste nach Aufkonzentrierung mittels Tellerseparator durch Zentrifugation manuell durchgeführt werden.

Von dem separierten Lignin wurden Ausbeute und Zusammensetzung von Labor- und Pilotmaßstab gegenübergestellt (Tab. 1.2.3.4). Besonders auffallend ist der hohe Gehalt an aliphatischen Hydroxylgruppen, welcher durch die starke Verunreinigung des Lignins durch Polysaccharide zu erklären ist. Die Verunreinigung durch Asche ist vernachlässigbar gering.

Tab. 1.2.3.4: Vergleich von Ligninausbeute und –zusammensetzung nach Scale-up des alkalischen Aufschlusses

Reak-tor	Aus-beute[1] [%]	Zusammen-setzung in [%]		funktionelle Gruppen in [mmol/g]				
		Lignin	Asche	$OH_{aliphat}$	OH_{phenol}	COOH	CO	OCH_3
2L	22	65,3	2,4	5,4	1,3	1,4	1,0	3,0
400L	25	61,7	0,0	7,8	1,1	1,5	0,8	3,5

[1] Fällprodukt bezogen auf Weizenstroh

Nach der Ligninfällung und –abtrennung erhält man zudem einen sauren Überstand. Die Zusammensetzung dieses Zentrifugats wurde am Fraunhofer CBP im Rahmen des Scale-up untersucht und ist in Tab. **1.2.3.5** aufgeführt.

Tab. 1.2.3.5: Zusammensetzung der Schwarzsäure (S.Sr.)

	Zusammensetzung in [g/L]					
	Cellobiose	Glucose	Xylose	Arabinose	Rhamnose	Essigsäure
S.Sr.	0,20	0,67	0,23	0,18	0,13	1,63

Es kann somit festgestellt werden, dass die Übertragung des alkalischen Aufschlusses von Weizenstroh in den Pilotmaßstab gelungen ist. Dadurch war es möglich, genügend Zellstoff und Lignin für weitere Versuche des Konsortiums zur Verfügung zu stellen. Für eine großtechnische Anwendung sind jedoch weitere

Untersuchungen unumgänglich, insbesondere hinsichtlich der Ligninabtrennung, der Schwarzsäurenverwertung und des Chemikalienverbrauches.

1.3 Gewinnung von *P. verruculosum*-Cellulase (SIAB/UL)

Die Optimierung der Fermentationsführung für die Gewinnung von *P. verruculosum* -Cellulase erfolgte im kleintechnischen Maßstab auf der Grundlage eines bereits etablierten Prozesses.

Dabei wurden eine Prozesstemperatur von 30 °C und ein pH-Wert von 4 – 5 aus batch-Ansätzen auf Versuche unter Nachführung induzierender Substanzen übertragen. Das eingesetzte Grundmedium enthielt neben den erforderlichen anorganischen Komponenten mikrokristalline Cellulose (20 g/L) und Weizenkleie (20 g/L) als wesentliche C-Quellen und Induktoren. Eine maßgebliche Steigerung der Filterpapieraktivität von 2 IU/ml (batch) auf 5 IU/ml konnte durch eine halbkontinuierliche Dosierung mikrokristalliner Cellulose erzielt werden.

Entsprechend Abb. 1.3.1 erbringen die Zugaben im Intervall von 8 h und 12 h ein gleichwertiges Resultat von 3,5 IU/ml bei Versuchsende nach 165 h. Eine weitere deutliche Steigerung auf > 5 IU/ml Cellulaseaktivität wurde im Rahmen einer Nachführung im 15 h-Intervall nach Abschluss der batch-Phase erreicht.

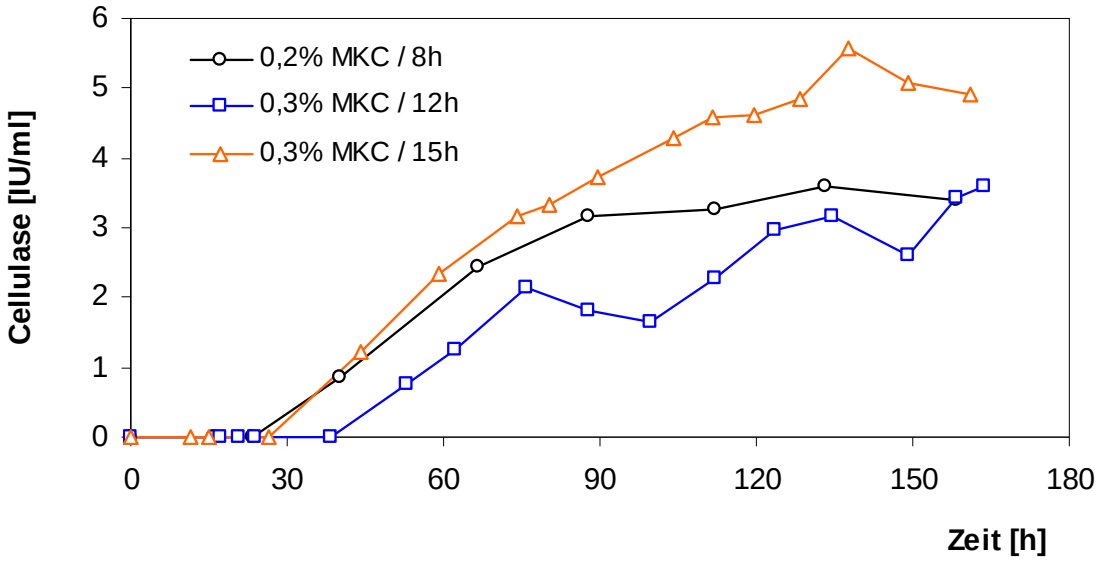


Abb. 1.3.1: Variation der Cellulosenachführung im 42 L-Reaktor

Als weitere technische Induktoren kamen NP-Zellstoff (Weizenstrohcellulose) und DIP-Stoff (Altpapiercellulose) in Betracht. Deren Anwendbarkeit wurde im kleintechnischen Reaktor (batch-Prozess) getestet. Gemäß Abb. 1.3.2 fielen die

betrachteten Aktivitäten erwartungsgemäß unter die Vergleichswerte der reinen mikrokristallinen Cellulose als Mediumsbestandteil. Im direkten Vergleich erwies sich DIP-Stoff als weniger gut geeignet, so dass in Bezug auf die Cellulaseaktivität nur 40 % der MKC-Aktivität erreicht wurden. Eine deutlich bessere Induktionswirkung auf den Enzymkomplex ging von NP-Zellstoff aus, der bezüglich Cellulase- und Endoglucanaseaktivität etwa 60 % des MKC-Wertes erreichte.

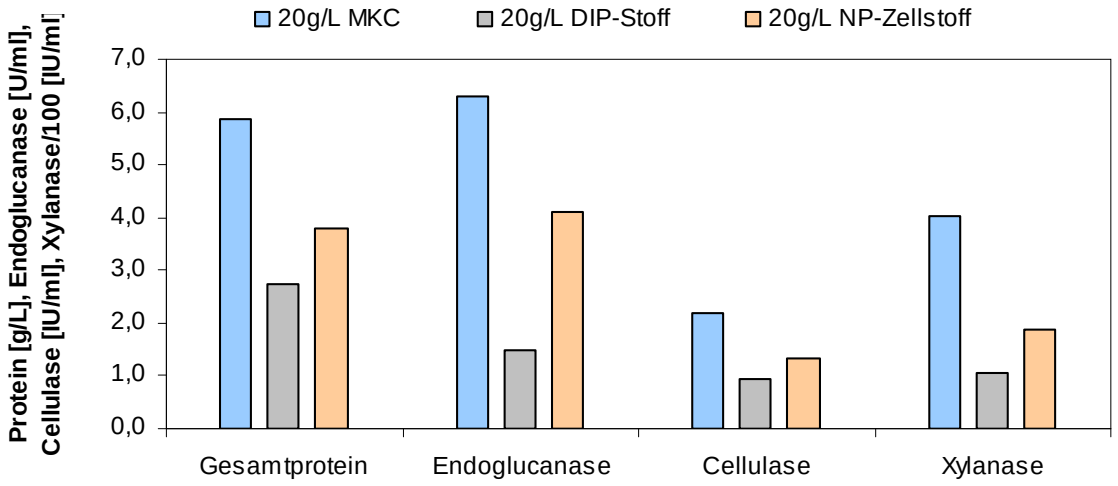


Abb. 1.3.2: Variation der eingesetzten Cellulose im batch-Prozess (42 L-Reaktor)
DIP-Stoff = Deinked Pulp,
NP-Zellstoff = Cellulosefraktion aus Weizenstroh nach dem Natural Pulping-Aufschluss,
MKC = Mikrokristalline Cellulose

Für die Realisierung des SSF-Prozesses in einer Pilotanlage ist die Gewinnung des Cellulasekomplexes im technischen Maßstab zu etablieren. Auf Basis der im 42 L-Reaktor gewonnenen Daten wurden die maßgebenden Prozessparameter wie die Belüftungsrate (0,5 vvm) und die maximale Rührerumfangsgeschwindigkeit (3,7 m/s) zur Gewährleistung eines Gelöstsauerstoffgehaltes von 25 % - bezogen auf Luftsättigung in der batch-Phase – übertragen.

In der Abb. 1.3.3 ist der Verlauf der relevanten Enzymaktivitäten in Abhängigkeit der Fermentationszeit für eine jeweilige Fermentation auf Standardmedium (20 g/L MKC und 20 g/L Weizenkleie + Salze) unter MKC-Nachführung im 42 L-, 150 L-, und 600 L-Bioreaktor dargestellt. Es wird deutlich, dass die Xylanase-, Endoglucanase- und vor allem die Cellulaseaktivitäten im Zuge der Maßstabsvergrößerung vergleichbare Anstiege aufweisen und somit die Übertragung des Prozesses auf den technischen Maßstab erfolgreich umgesetzt wurde. Trotz

technischer Einschränkungen des Reaktordesigns, die eine suboptimale Cellulosenachführung nach sich zogen, konnte im 600 L-Reaktor des Helmholtz Zentrums für Umweltforschung-UFZ/UbZ eine Cellulaseaktivität des *P. verruculosum*-Stammes von 3,1 IU/ml erzielt werden, die bei einer optimalen Prozessführung noch erhöht werden kann.

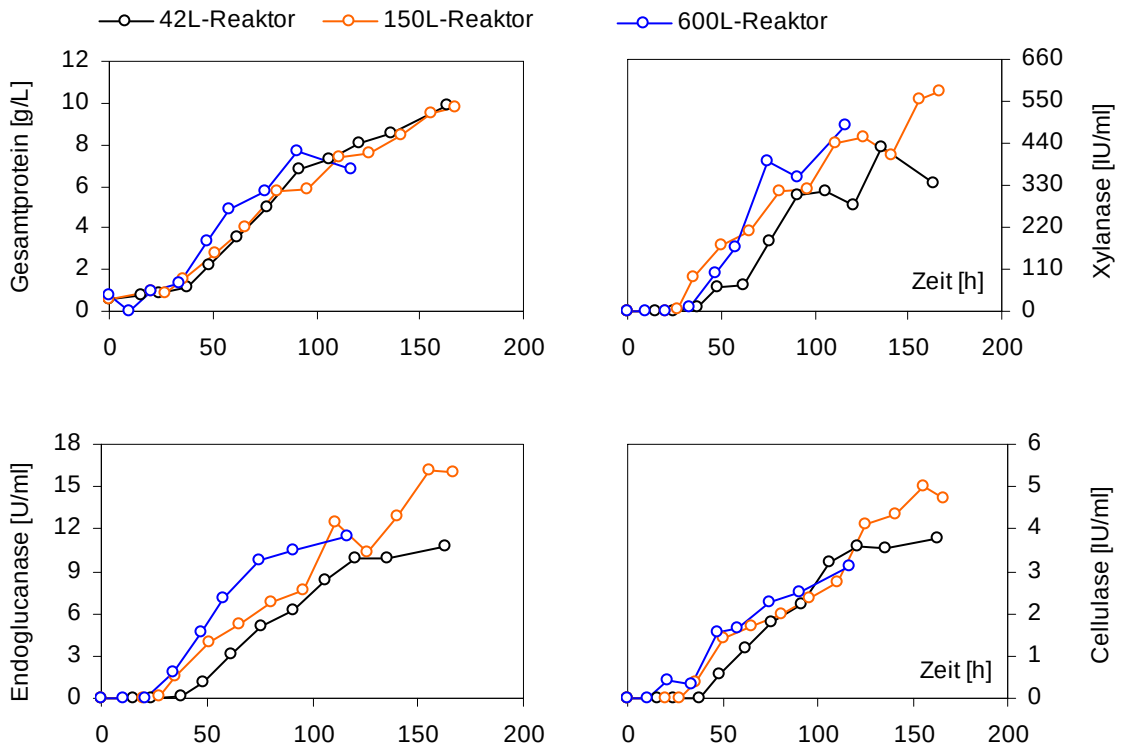
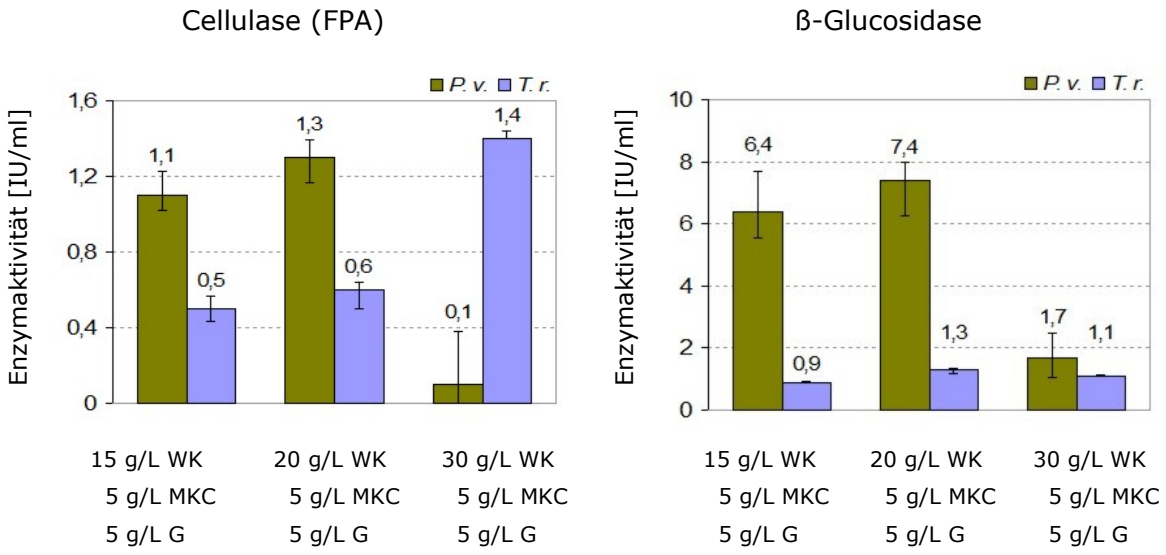


Abb. 1.3.3: Scale-up der Cellulasefermentation bis zum technischen Maßstab im 600 L Bioreaktor

Neben den Untersuchungen zum Scale-up der Cellulasefermentation auf Basis des Standardsubstrates wurden Untersuchungen zur Gewinnung des *P. verruculosum*-Cellulasekomplexes auf Basis von Weizenkleie (WK) als Hauptsubstrat durchgeführt. Dies steht im Zusammenhang mit Untersuchungen zum Einsatz von Weizenkleie als Substrat für den SSF-Prozess zur Ethanolgewinnung. Für die Weizenkleie aus einer Stärkefabrik wurde ein Gehalt von ca. 20 % Cellulose und 10 bis 20 % Stärke angegeben. Dieser Kohlenhydratanteil von 30 bis 40 % ist für den Einsatz als Substrat zur Ethanolgewinnung wirtschaftlich interessant. Weizenkleie fällt in großen Mengen als Nebenprodukt in Stärkefabriken an und hat den Vorteil, dass für den Einsatz im SSF-Prozess – im Gegensatz zu Lignocellulose – kein Aufschluss erforderlich ist.

Mit den Untersuchungen zum Einsatz von Weizenkleie als Substrat/Induktor für die Cellulasegewinnung galt es zu prüfen, inwieweit die Cellulaseproduktion auf Basis von Weizenkleie als Hauptsubstrat möglich ist. Dazu wurden verschiedene Medienzusammensetzungen hinsichtlich ihrer Eignung zur Cellulasebildung mit den Produktionsstämmen *Penicillium verruculosum*-M28-10b (*P. v.*) und *Trichoderma reesei*-M18.2b (*T. r.*) im Schüttelkolben- und kleintechnischen Maßstab getestet. Bei der Verwendung von WK ohne Zusatz weiterer C-Quellen konnten weder mit *P. v.* noch mit *T. r.* signifikante Cellulaseaktivitäten erzielt werden. In der Abbildung 1.3.5 ist ein Vergleich der Cellulasebildung mit unterschiedlichen WK-Konzentrationen und Zusatz von Glucose und Cellulose als weitere C-Quelle/Induktor dargestellt. Dabei zeichnet sich die Tendenz ab, dass WK-Konzentrationen im Bereich > 15 g/L und < 30 g/L WK geeignet sind.

Anstelle nativer Weizenkleie wurde auch der Einsatz von wässrigem Weizenkleie-Extrakt (WK-E) als Induktor untersucht. Für die Herstellung des Extraktes wurde die WK 10 Minuten in Wasser gekocht und im Anschluss abgeseiht. Bei einem WK-E aus bis zu 30 g/L WK war ein stetiger Anstieg der FPA-Werte zu erkennen, offenbar bedingt durch den Anstieg induzierender Substanzen.



Legende: WK=Weizenkleie, MKC= mikrokristalline Cellulose, G=Glucose

Abb. 1.3.5: Bildung des Cellulasekomplexes auf Basis von Weizenkleie als Hauptsubstrat im Schüttelkolbenmaßstab:

Vergleich zwischen *Trichoderma reesei* und *Penicillium verruculosum*

Insgesamt konnte mit *P. v.* eine höhere Cellulaseaktivität erzielt werden. Auch die Werte der ß-Glucosidase fielen im Vergleich zu *Trichoderma* unter gleichen

Versuchsbedingungen höher aus, was einen wesentlichen Vorteil für den Einsatz im SSF-Prozess darstellt. Die Cellulasegewinnung konnte durch die Übertragung der im Schüttelkolben optimierten Medienzusammensetzung erfolgreich im 42 L-Bioreaktor umgesetzt werden.

Generell kann eingeschätzt werden, dass WK als „Hauptsubstrat" prinzipiell für die Cellulaseproduktion geeignet ist. Die im batch-Verfahren erzielten Aktivitäten sind jedoch ohne Konzentrierung für den direkten Einsatz im SSF-Prozess zu gering. Zur Umsetzung in den Produktionsmaßstab ist deshalb eine Optimierung der Prozessführung noch erforderlich.

1.4 Optimierung des SSF-Prozesses / Verzuckerung der Zellstoffe (TU BAF, SIAB/UL)

1.4.1 Analytik (TU BAF, UL)

Zur quantitativen Analyse der bei der enzymatischen Hydrolyse freigesetzten Di- und Monosaccharide sowie der Fermentationsprodukte wurden verschiedene Analysenmethoden entwickelt und etabliert. Die Bestimmung der reduzierenden Zucker, welche bei der Hydrolyse freigesetzt wurden, erfolgte photometrisch bei 540 nm nach der Methode von Ghose et al.[3] Auf dessen Grundlage basierte auch die Bestimmung der Enzymaktivitäten von Cellulasen und Xylanasen. Ebenfalls photometrisch erfolgte die Quantifizierung der Aktivität der β-Glucosidasen, wozu die Hydrolyse von *p*-Nitrophenyl-*β*-D-glucopyranosid (PNPG) bei 400 nm gemessen wurde.

Zur Diskriminierung der bei der Verzuckerung freigesetzten Saccharide wurde die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) herangezogen. Mit Hilfe von Standards wurde eine Methode entwickelt, welche es ermöglichte, Cellobiose, Glucose, Galactose, Arabinose, Mannose und Xylose simultan zu analysieren. Die Analytik der Fermentationsprodukte erfolgte sowohl gaschromatographisch (GC) als auch per HPLC. Insbesondere letzteres hatte den Vorteil, dass in einem Analyseschritt sowohl die Abnahme der Saccharid-Konzentration als auch die Zunahme der Ethanol-Konzentration während der Fermentation untersucht werden konnte.

1.4.2 Optimierung und Charakterisierung der enzymatischen Hydrolyse (TU BAF)

Die Optimierung der enzymatischen Hydrolyse der lignocellulosehaltigen Biomassen wurde mit dem Enzymkomplex aus *Penicillium verruculosum*, welcher vom Projektpartner SIAB/UL zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt. Am Beispiel des alkalisch vorbehandelten Weizenstrohs (bereitgestellt durch TUD) wurde eine Optimierung hinsichtlich pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke durchgeführt. Dabei wurde das Optimum für den pH-Wert bei 5,0 und für die

Temperatur bei 50 °C ermittelt. Um Prozesskosten so gering wie möglich halten zu können, ist es wichtig, ein möglichst kostengünstiges Reaktionsmedium zu wählen. Aus diesem Grund wurden vier verschiedene Medien getestet (Abb. 1.4.2.1).

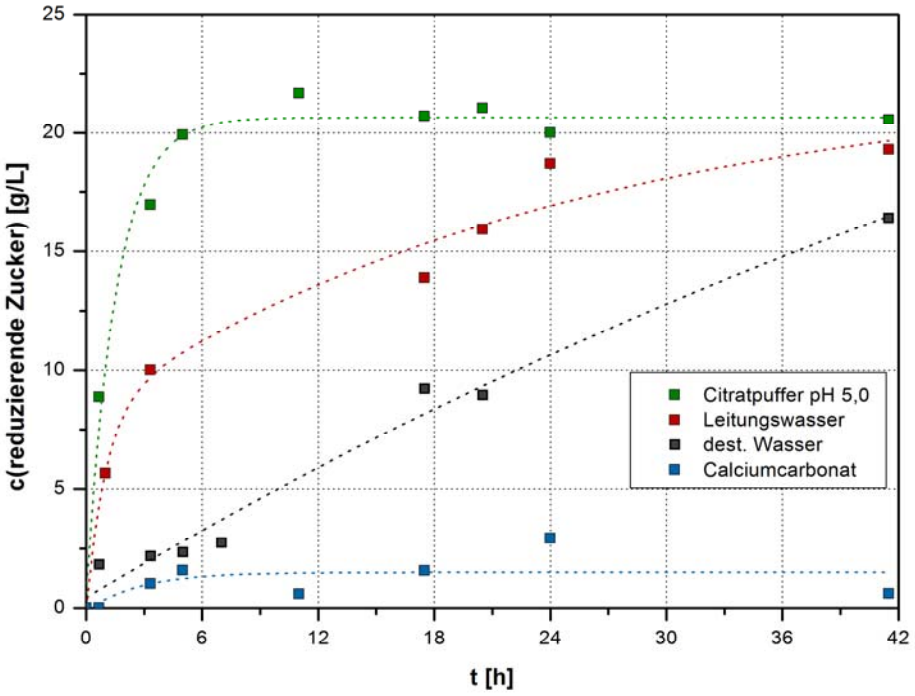


Abb. 1.4.2.1: Einfluss des Reaktionsmediums auf die enzymatische Hydrolyse von alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh (3%ige NaOH, 30 min, 160 °C) bei 50 °C, 2 % Feststoffgehalt und 100 FPU/g *P. verruculosum*-Cellulase

Von den ausgewählten Medien konnte mit Citratpuffer bei pH 5,0 das beste Hydrolyseergebnis erreicht werden. Nach etwa fünf Stunden Hydrolysezeit wurde ein vollständiger Umsatz des Zellstoffes erreicht. Alle anderen Reaktionsmedien wiesen einen negativen Einfluss auf die Kinetik der Verzuckerung auf. Von den ausgewählten Medien ist Leitungswasser das ökonomischste, verringert jedoch die Geschwindigkeit der Hydrolyse. Leitungswasser ist mit einem pH-Wert von ca. 7 im Gegensatz zu destilliertem Wasser mit pH 5,5 weiter vom pH-Optimum entfernt, liefert aber höhere Hydrolyseraten. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass mit Leitungswasser unter pH-Einstellung auf pH 5,0 vergleichbare Ergebnisse wie mit dem Citratpuffer erreicht werden können.

Calciumcarbonat wurde in die Untersuchungen einbezogen, da es ggf. zur Pufferung des pH-Wertes bei sauren Aufschlüssen Verwendung finden könnte. Der

Einsatz von Calciumcarbonat verschlechterte jedoch die Hydrolyseergebnisse. Aus diesem Grund wurde auf die Verwendung von Calciumcarbonat im Weiteren verzichtet. Neben dem pH-Wert und der Temperatur hat die Ionenstärke einen großen Einfluss auf die Enzymaktivität und somit auf die Hydrolyseeffizienz. Aus diesem Grund wurden enzymatische Hydrolysen von alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh in Citratpuffer mit verschiedenen Ionenstärken durchgeführt (Abb. 1.4.2.2).

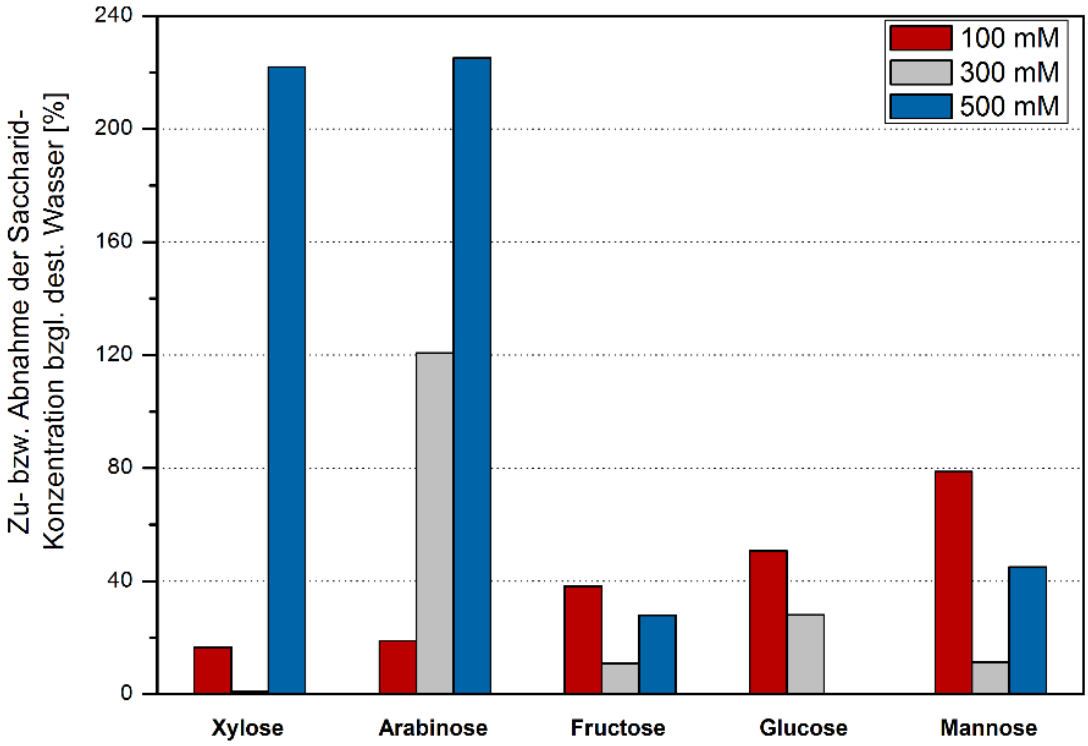


Abb. 1.4.2.2: Einfluss der Ionenstärke auf die Zusammensetzung der Hydrolysate

Dabei stellte sich heraus, dass bei einer Ionenstärke von 500 mM die höchste Saccharid-Konzentration gebildet wird. Interessanterweise scheint die Ionenstärke unterschiedlichen Einfluss auf die Einzelenzyme im Cellulasekomplex zu nehmen. So wird die Freisetzung der Pentosen Arabinose und Xylose bei zunehmender Ionenstärke begünstigt, wohingegen Hexosen bei geringeren Ionenstärken bevorzugt freigesetzt werden. Dies lässt darauf schließen, dass eine höhere Ionenstärke keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der im Enzymkomplex enthaltenen Hemicellulasen hat. Für den SSF-Prozess zur Herstellung von Bioethanol ist die Freisetzung von Hexosen, insbesondere Glucose, entscheidend. Daher wurde im Folgenden nur mit Ionenstärken von 50 mM gearbeitet.
Die enzymatische Hydrolyse von Lignocellulose ist einer der kostenintensivsten Schritte im SSF-Prozess, weshalb es notwendig ist, die eingesetzte Enzymmenge zu optimieren. Untersuchungen sowohl mit Zellstoff aus dem Natural Pulping-

Aufschluss als auch mit alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh haben gezeigt, dass es möglich ist, die Enzymmenge von 100 FPU/g auf 50 FPU/g zu reduzieren, ohne die freigesetzte Glucose-Konzentration negativ zu beeinflussen. Außerdem konnte festgestellt werden, dass es aufgrund einer hohen β-Glucosidase-Konzentration nicht zur Akkumulation von Cellobiose kommt (Abb. 1.4.2.3).

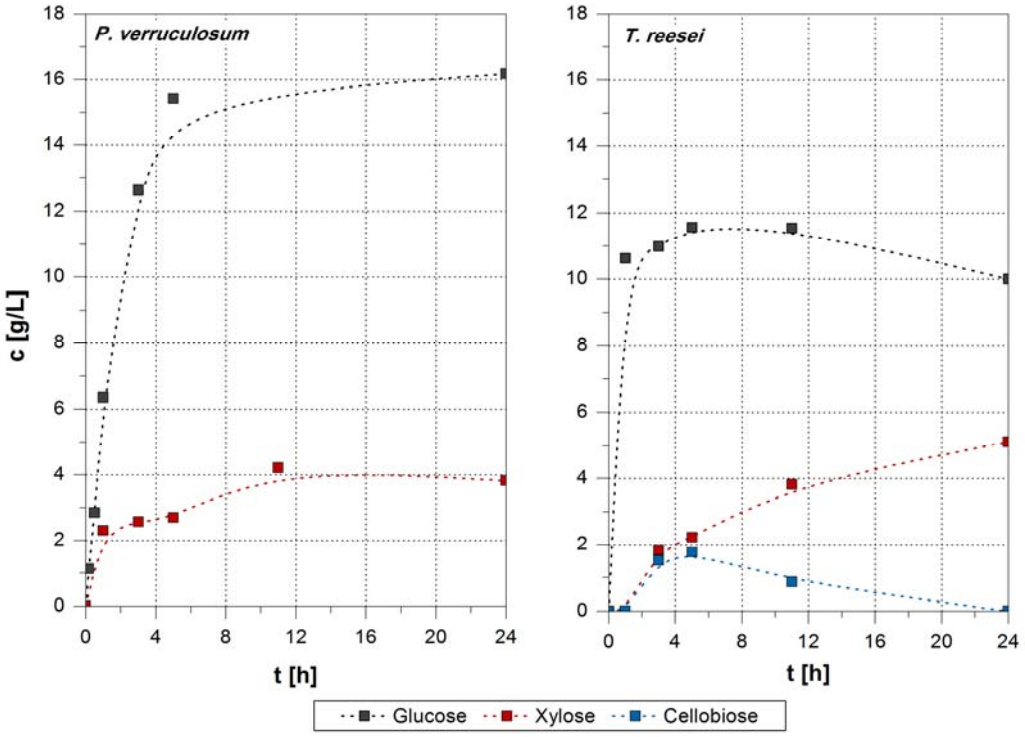


Abb. 1.4.2.3: Vergleich der Konzentration-Zeit-Diagramme der Verzuckerung von alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh (3%ige NaOH, 160 °C, 30 min) mit *P. verruculosum*- (links) und *T. reesei*–Cellulase (rechts). Hydrolysebedingungen: 50 °C, 24 h, 100 FPU/g TM, Feststoffgehalt 2 %

Inhibierungsstudien

Cellobiose ist neben Lignin, Ethanol und hohen Glucosekonzentrationen dafür bekannt, Cellulasen zu inhibieren. Im Gegensatz zu dem herkömmlich genutzten Enzymkomplex aus *Trichoderma reesei* muss für eine ausreichende Konzentration β-Glucosidase im Enzymkomplex kein Zusatz erfolgen, wodurch Prozesskosten erheblich minimiert werden können. Außerdem haben Untersuchungen gezeigt, dass der Enzymkomplex aus *P. verruculosum* im Vergleich zu dem aus *T.* reesei höhere Resistenzen gegenüber Ethanol und Lignin aufweist (Abb. 1.4.2.4). Dies

wiederum ermöglicht die Reduktion der Enzymmenge und dadurch die Senkung der Prozesskosten.

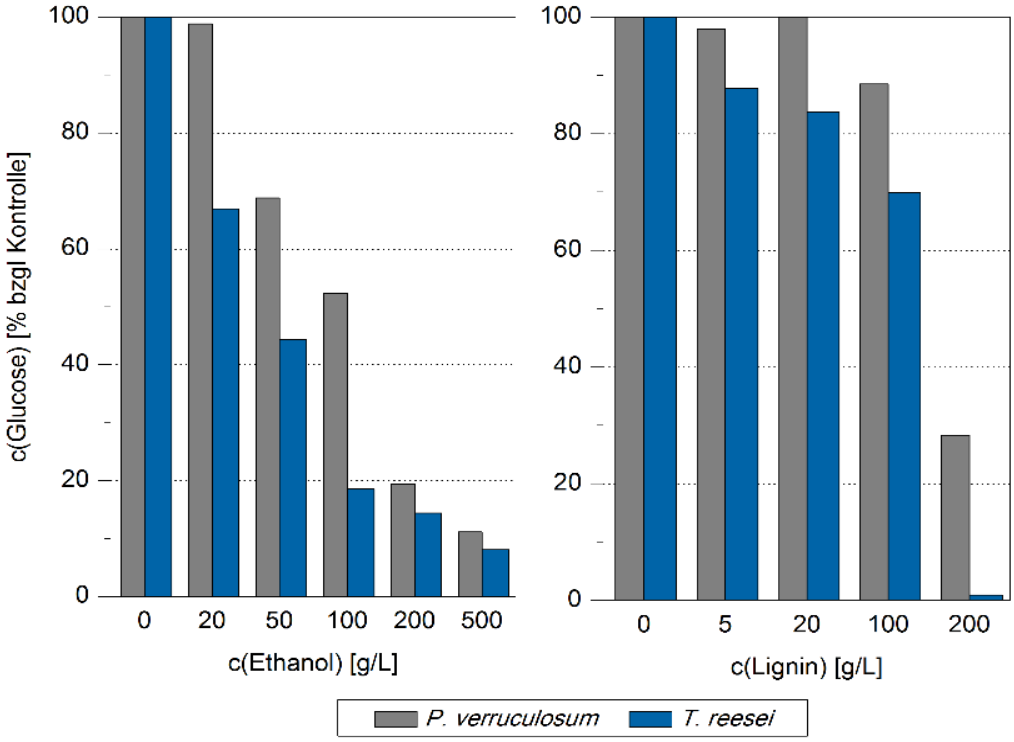


Abb. 1.4.2.4: Gegenüberstellung des Einflusses von Ethanol sowie Lignin auf die Verzuckerung von alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh (3%ige NaOH, 160 °C, 30 min) mit *P. verruculosum* (grau) und *T. reesei* (blau) Cellulase.

Hydrolysebedingungen: 50 °C, 24 h, 100 FPU/g TM, 2 % Feststoffgehalt.

Der Vergleich der Enzymkomplexe aus *P. verruculosum* und *T. reesei* zeigt, dass bei gleichen Versuchsbedingungen eine höhere Produktivität und eine höhere initiale Reaktionsgeschwindigkeit mit den Cellulasen aus *T. reesei* erreicht werden kann, aber geringere Umsätze erzielt werden (Abb. 1.4.2.3). Dies beruht wahrscheinlich auf der Akkumulation der Cellobiose, was zur Inhibierung des Enzymkomplexes führt, wodurch wiederum die Verzuckerung des Zellstoffes gehemmt wird. In der Literatur wird der Einfluss von Cellobiose auf die Enzymaktivität vielfach diskutiert. Je nach Substrat und Reaktionsbedingungen werden für Cellulasen von *T. reesei* Inhibierungskonstanten K_i im Bereich von 0,01 bis 6 g/L aufgeführt.[4]

Der Inhibierungsmechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Je nach Studie werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert. Am wahrscheinlichsten scheint jedoch die kompetitive Hemmung. Dabei kommt es zur reversiblen Anlagerung der

Cellobiose an der Substratbindungsstelle der Cellulasen (Endo- und Exo-glucanasen), wodurch die Hydrolyse der Cellulose bzw. Celluloseoligomere unterdrückt wird. Somit sinkt, im Vergleich zur ungehemmten Reaktion, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max}. Im Rahmen einer Bachelorarbeit wurden Inhibierungsstudien zum Enzymkomplex aus *P. verruculosum* durchgeführt (Abb. 1.4.2.5). Zur Vereinfachung des Systems wurde als Substrat Filterpapier gewählt. Dadurch können Einflüsse durch Strukturveränderungen (z.B. Kristallinität, Morphologie) und Störsubstanzen (Lignin, Phenole, Salze) ausgeschlossen werden. Alle Inhibierungsstudien wurden bei 50 °C und pH 5,0 über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt.

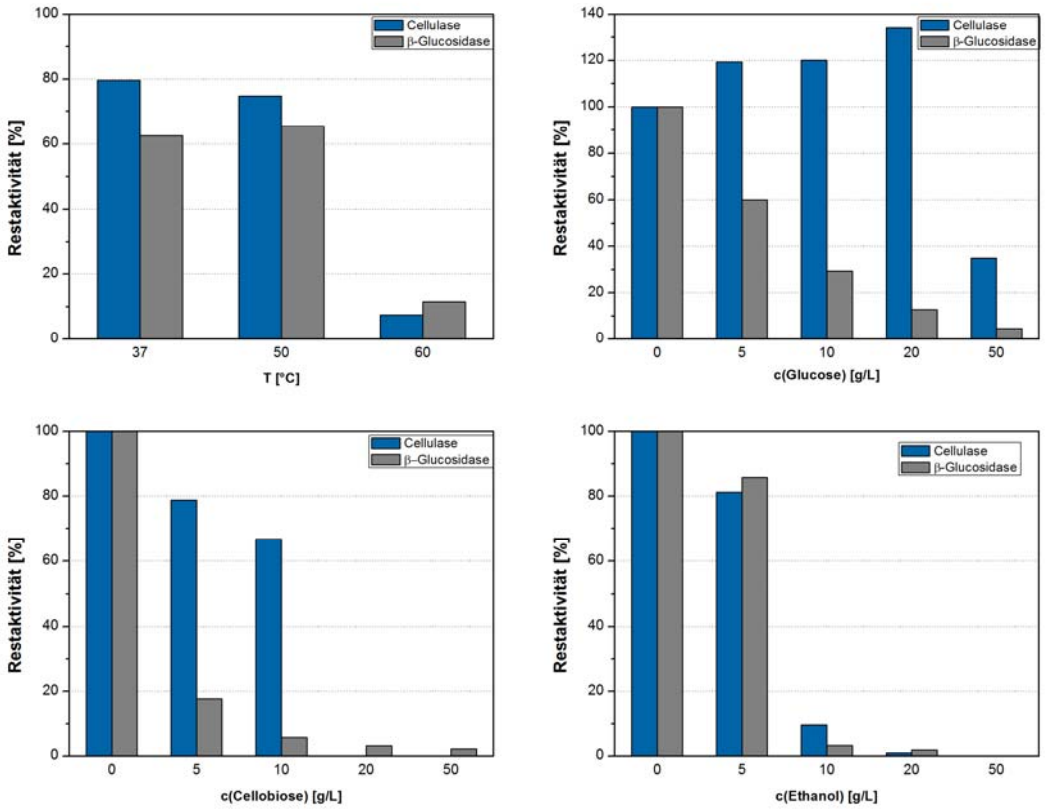


Abb. 1.4.2.5: Untersuchungen zum Einfluss von Glucose, Cellobiose und Ethanol sowie der Temperatur auf die enzymatische Verzuckerung (24 h) von Filterpapier durch den Enzymkomplex von *P. verruculosum*.

Für Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Temperatur auf die Enzymaktivität wurden 37 °C, 50 °C und 60 °C gewählt. 37 °C wird in der Literatur als Kompromisstemperatur zwischen dem Optimum der Hydrolyse und der Fermentation angegeben. 50 °C wurde als Optimum für die Verzuckerung von

alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh bestimmt. 60 °C wurden gewählt, um den Einfluss höherer Temperaturen zu untersuchen. Des Weiteren wurde in der Literatur berichtet, dass das Temperaturoptimum der β-Glucosidase bei 60 °C liegt.[5] Die Ergebnisse zeigen, dass es bei 24-stündiger Inkubation bei 37 °C, 50 °C sowie 60 °C zum Aktivitätsverlust der Cellulase wie auch der β-Glucosidase kommt. Bei 37 °C sowie 50 °C beträgt der Aktivitätsverlust für die Cellulase ca. 20 % und für die β-Glucosidase 40 %. Somit scheint die β-Glucosidase im Vergleich zur Cellulase eine geringere Temperaturstabilität aufzuweisen. Allerdings ist die Restaktivität der β-Glucosidase bei 60 °C höher als die der Cellulasen. Mit zunehmender Temperatur sinken alle Aktivitäten. Die Ergebnisse zeigen, dass die Kompromisstemperatur von 37 °C im Falle des Enzymkomplexes aus *P. verruculosum* eine sehr geeignete Temperatur ist, um einen effizienten SSF-Prozess durchführen zu können. Das in der Literatur genannte Temperaturoptimum der β-Glucosidase von 60 °C konnte nicht bestätigt werden. Bereits nach einer Stunde Inkubation kommt es zum Aktivitätsverlust von bis zu 52 %. Interessant ist, dass trotz der Aktivitätsverluste bei 50 °C die höchsten Hydrolyseraten erzielt werden konnten. Dieses könnte daran liegen, dass in den durchgeführten Versuchen eine vergleichsweise hohe Enzymkonzentration verwendet wurde, sodass ein Überschuss vorlag, wodurch die Inhibierung kompensiert wurde. Eine andere Möglichkeit ist, dass durch das komplexe Substrat Lignocellulose eine Stabilisierung der Enzyme erfolgt.

Ein unerwartetes Ergebnis ergaben die Untersuchungen zur Inhibierung des Enzymkomplexes durch Glucose. Entgegen den Erwartungen tritt bis zu einer Konzentration von 20 g/L eine Steigerung der Cellulaseaktivität auf. Von Prasertsan et al. durchgeführte Studien mit Endoglucanasen aus *Cellulomonas* species haben gezeigt, dass es bei geringen Glucose-Konzentrationen (bis zu 20 g/L Glucose) zur Steigerung der Endoglucanseaktivität kommt.[6] Ein ähnliches Phänomen könnte hier auch vorliegen. Die Aktivität der β-Glucosidase sinkt hingegen erwartungsgemäß mit steigender Glucosekonzentration. Dieser Aktivitätsverlust könnte im Prozess zu einer Akkumulation von Cellobiose führen, was wiederum zur Inhibierung der Endoglucanasen führt. Der Enzymkomplex aus *P. verruculosum* zeichnet sich im Vergleich zu *T. reesei* durch eine sehr hohe β-Glucosidasekonzentration aus, wodurch sich im Gesamtprozess diese Inhibierung eventuell nicht bemerkbar macht.

In der Literatur wird neben Glucose Cellobiose als starker Inhibitor für Cellulasen, insbesondere Endoglucanasen, beschrieben. Dies konnte durch die erzielten Ergebnisse bestätigt werden. Eine Erhöhung der Cellobiosekonzentration sorgt für einen signifikanten Abfall der Enzymaktivitäten. So kann bereits bei einer Cellobiosekonzentration von 5 g/L ein Aktivitätsverlust der β-Glucosidase von etwa 80 % beobachtet werden. Dies zeigt deutlich, wie wichtig es ist, eine Akkumulation

von Cellobiose zu vermeiden. Ab einer Cellobiosekonzentration von 20 g/L kann keine Cellulaseaktivität mehr beobachtet werden.

Als weiterer möglicher Inhibitor wurde Ethanol untersucht. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass Ethanol einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivitäten hat. Ab Ethanol-Konzentrationen größer 5 g/L kommt es zum Absinken der Aktivität. Sowohl Cellulasen als auch β-Glucosidasen werden nahezu gleich beeinflusst. Viele Studien zur Wirtschaftlichkeit der Produktion von Bioethanol der Zweiten Generation haben gezeigt, dass für eine wirtschaftliche Aufarbeitung eine Volumenkonzentration des Ethanols von mindestens 4 % (32 g/L) notwendig sind. Bei der Durchführung der Produktion nach dem SSF-Prozess würde es somit zur starken Inhibierung des Enzymkomplexes kommen. Dies könnte dadurch umgangen werden, dass kontinuierlich Ethanol aus dem System ausgetrieben wird oder kontinuierlich frisches Enzym hinzugegeben wird. Insbesondere letzteres würde den Prozess verteuern. In Abb. 1.4.2.4 konnte jedoch gezeigt werden, dass der Enzymkomplex aus *P. verruculosum* eine vergleichsweise hohe Resistenz gegenüber Ethanol hat, wenn Lignocellulose als Substrat gewählt wird. Ähnlich wie beim Einfluss der Temperatur scheint es zur Stabilisierung des Enzymkomplexes durch das Substrat zu kommen. Es ist denkbar, dass es durch die Adsorption der Enzyme auf der Substratoberfläche zur Ausbildung stabilisierender Bindungen kommt. Dies würde einer Art Immobilisierung der Enzyme entsprechen. Ein Vergleich der erzielten Ergebnisse mit Literaturwerten ist sehr schwierig. Je nach verwendetem Organismus und verwendeten Versuchsbedingungen (Substrat, Inkubationsdauer, pH-Wert, Temperatur) unterscheiden sich die Ergebnisse sehr stark. So werden für die Inhibierung von Cellulasen aus *T. reesei* durch Ethanol Konzentrationen von 10 bis 100 g/L angegeben.[7]

Zusatz von Einzelenzymen

Von dem herkömmlich eingesetzten Enzymkomplex aus *T. reesei* ist bekannt, dass die Zusammensetzung der Einzelenzyme (Cellulasen, Hemicellulasen und β-Glucosidasen) einen großen Einfluss auf die Verzuckerung hat. Wie bereits erwähnt, ist die β-Glucosidase-Konzentration im Enzymkomplex aus *P. verruculosum* so hoch, dass keine Limitierungen bezüglich des Cellobioseabbaus entstehen. Um Limitierungen durch ggf. zu geringe Konzentrationen an Hemicellulasen und Cellulasen feststellen zu können, wurden kinetische Untersuchungen der Verzuckerung mit Zusatz von Cellulasen und Hemicellulasen aus *Aspergillus niger* durchgeführt (Abb. 1.4.2.6).

Sowohl durch den Zusatz von Cellulasen als auch Hemicellulasen konnte eine Steigerung des Umsatzes beobachtet werden. Durch den Zusatz von Cellulasen kann ein vollständiger Umsatz des Kohlenhydratanteils erreicht werden.

Dieser kann aber auch durch Erhöhung der Konzentration des Enzymkomplexes erreicht werden. Der Zusatz von Hemicellulasen sorgt für eine Steigerung des Umsatzes, jedoch nicht im gleichen Maß wie die Cellulasen. Dies macht deutlich, dass der Abbau der Hemicellulosen, trotz des geringen Anteils von ca. 20 %, sehr wichtig ist. Durch die Optimierung des Anzuchtmediums bei der Cellulase-produktion kann die Hemicellulasebildung erhöht werden, wodurch der Zusatz von weiteren Enzymen nicht notwendig ist. Dabei sollte auf Abfallströme, die hohe Konzentrationen an Cellulose und Hemicellulose enthalten, zurückgegriffen werden. Dies würde die Kosten für die Enzymproduktion und somit für den Gesamtprozess erheblich senken.

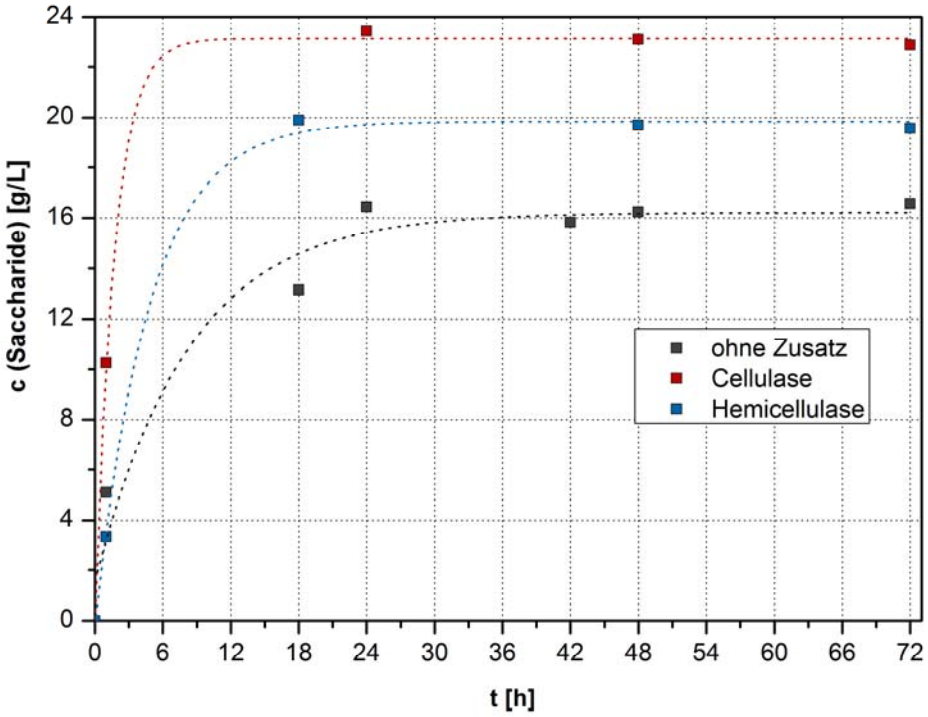


Abb. 1.4.2.6: Einfluss von zusätzlichen Cellulasen und Hemicellulasen auf die enzymatische Hydrolyse von alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh (3%ige NaOH, 30 min, 160 °C). Hydrolysebedingungen: 100 FPU *P. verruculosum*-Cellulase pro g Zellstoff;

2 % Feststoffgehalt, 50 mM Citratpuffer pH 5,0; je 200 IU/g Cellulase oder Hemicellulase aus *Aspergillus niger*.

Adsorptionsisothermen

Um die eingesetzte Enzymmenge reduzieren zu können, ist es wichtig, Kenntnisse über das Adsorptionsverhalten der Cellulasen zu haben. Es sollten möglichst viele

Enzyme an der Oberfläche des Substrates adsorbieren, um dieses hydrolysieren zu können. Ab einer bestimmten Enzymkonzentration ist die Oberfläche mit Enzym gesättigt, sodass eine Erhöhung der Enzymkonzentration zu keiner Verbesserung der Hydrolyseeffizienz führt. Dieses Phänomen konnte bereits in Studien zur Enzymmenge beobachtet werden. Am Beispiel verschiedener Substrate wurden mit Hilfe des Modells nach Langmuir die Adsorptionskonstanten bestimmt und interpretiert. Dieses Modell wird vielfach dafür verwendet, um Beziehungen zwischen Enzymmenge und Substrat zu beschreiben.[8] Dabei geht man davon aus, dass die Bindung des Enzyms am Substrat reversibel in Form einer Monoschicht erfolgt und dass es zwischen den adsorbierten Teilchen zu keinerlei Wechselwirkungen untereinander kommt. Diese Voraussetzungen sind zwar nur eingeschränkt erfüllt, da es insbesondere aufgrund von Lignin zu irreversiblen Bindungen kommen kann[9], aber eine Aussage über die Affinität der Cellulasen gegenüber den Substraten kann trotzdem getroffen werden. Die Langmuir-Adsorptionsisotherme basiert auf einem nichtlinearen Modell, welches nach folgender Gleichung ausgewertet werden kann.

$$E_{max} = \frac{E_{max} \cdot K \cdot E_{frei}}{1 + K \cdot E_{frei}}$$

E_{ads} ist die Konzentration an adsorbiertem Enzym, welche aus der Differenz von maximal vorhandener Enzymkonzentration E_{max} und freier Enzymkonzentration E_{frei} berechnet werden kann. Die Langmuir-Konstante K ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat. Als Maß für die freie Enzymkonzentration wurde der Proteingehalt im Überstand mittels Bradford-Methode photometrisch bestimmt.

Die Adsorption der Cellulasen an der Substratoberfläche ist der erste Schritt der enzymatischen Hydrolyse.[10] Es wird davon ausgegangen, dass die Anlagerung der Enzyme auf Cellulose reversibel und auf Lignin irreversibel erfolgt. Während der enzymatischen Hydrolyse von Lignocellulose kommt es zur Veränderung des Cellulose-Lignin-Verhältnisses, sodass es zunehmend zur Adsorption der Enzyme auf Lignin kommt. Durch die daraus resultierenden irreversiblen Bindungen und der damit sinkenden Enzymaktivität kommt es zur Verlangsamung der Hydrolyse, woraus eine unvollständige Umsetzung des Substrates folgt.[11]

Für die Adsorptionsstudien wurden Substrate mit unterschiedlichen Ligningehalten bzw. Kristallinitäten untersucht. In Abb. 1.4.2.7 sind die erhaltenen Adsorptions-isothermen graphisch dargestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass die Art des Substrates einen großen Einfluss auf die enzymatische Hydrolyse hat. Die ermittelten Adsorptionskonstanten können aus Tab. 1.4.2.1 entnommen werden. Für einen besseren Vergleich lässt sich eine relative Gleichgewichtskonstante K_{rel} berechnen.

$$K_{rel} = E_{max} \cdot K$$

Aus den Gleichgewichtskonstanten K_{rel} lässt sich schlussfolgern, dass die Affinität der Cellulasen zum alkalisch vorbehandelten Weizenstroh größer ist, als zum Stroh aus dem NP-Prozess.

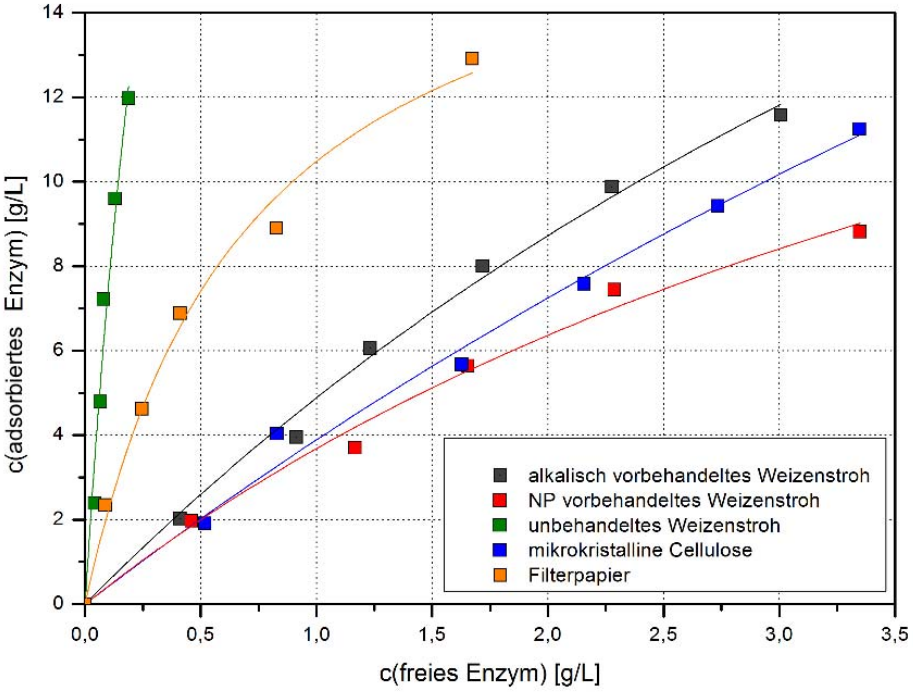


Abb. 1.4.2.7: Adsorptionsisothermen nach Langmuir. Enzymatische Hydrolyse von verschiedenen Substraten (2 % Feststoffgehalt) mit dem Enzymkomplex aus *P. verruculosum* bei 50 °C für 30 min.

Tab. 1.4.2.1: Übersicht der ermittelten Adsorptionskonstanten für verschiedene Substrate

Substrat	E_{max} [g/L]	E_{max} [mg/g Substrat]	K [L/g]	K_{rel} [L/g]	Lignin [%]	Kristal-linität [%]
Alk. Zellst.	40,59	2030	0,1369	0,2778	6	72
NP-Zellstoff	23,53	1177	0,1855	0,2182	11	58
Stroh	44,56	2228	2,0187	4,4977	22	44 [12]
Filterpapier	17,89	894,5	1,4146	1,2654	0	78,2 [13]
MKC	52,77	2639	0,0796	0,2100	0	83 [12]

Dies könnte mit dem geringeren Ligningehalt im Alkali-Stroh zusammenhängen. Ähnliche Tendenzen konnten auch durch Kumar et al.[14] festgestellt werden.

Unerwarteter Weise ist die Gleichgewichtskonstante für natives Weizenstroh sehr groß. Dies würde eine große Affinität der Cellulasen gegenüber Stroh bedeuten. Da die Umsätze jedoch sehr gering (ca. 2 %) sind, bedeutet dies, dass die Bindung der Cellulasen sehr unselektiv erfolgt, sodass es zu nicht-produktiven Bindungen am Lignin kommt. Dadurch wird die freie Enzymmenge reduziert, aber kaum Substrat umgesetzt. Filterpapier und mikrokristalline Cellulose (MKC) enthalten kein Lignin, zeigen aber unterschiedliche Gleichgewichtskonstanten auf. Dies könnte am Kristallinitätsgrad liegen. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass es verschiedene Einflüsse auf das Adsorptionsverhalten der Enzyme gibt.

In der Literatur wird vielfach diskutiert, dass es durch Einsatz von Additiven wie Polymeren (Polyethylenglycol (PEG), Tween) und Proteinen (Rinderserumalbumin) zur Steigerung der Hydrolyseraten kommt. Eine Rechtfertigung der zusätzlichen Kosten kann nur durch eine signifikante Verbesserung der Hydrolyse erfolgen. Durch den Einsatz der Additive soll die nicht-produktive Bindung der Enzyme am Lignin verhindert werden, sodass die Enzymkonzentration gesenkt werden kann. Außerdem haben Studien gezeigt, dass ein Zusatz von z.B. PEG die Verzuckerungszeit von 72 auf 48 Stunden verkürzt hat. Durch den Zusatz von Tensiden wie zum Beispiel Tween können des Weiteren die eingesetzten Enzyme stabilisiert werden, sodass die Enzymkonzentration wiederum gesenkt werden kann.[15] Dieser positive Effekt wird bereits zur Konservierung des Enzymkomplexes ausgenutzt, so dass der Einfluss von Tensiden auf die Hydrolyse nicht weiter untersucht wurde. Auch beim Einsatz von PEG wurden stabilisierende Wirkungen festgestellt. Nach intensiver Literaturrecherche stellte sich Polyethylenglycol als das vielversprechendste Additiv dar. In den Studien von Kristensen et al.[16] konnte gezeigt werden, dass der positive Einfluss von PEG auf die Verzuckerung mit deren Molekülmasse zunimmt. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchungen ein Polyethylenglycol mit einer Molekülmasse von 4.000 Da ausgewählt.

Unabhängig von der verwendeten Zellstoffkonzentration konnte keine Verbesserung der Umsätze beobachtet werden (Abb. 1.4.2.8). Nur bei der sehr geringen Feststoffkonzentration von 2 % konnte kein Einfluss beobachtet werden.

Bei allen anderen untersuchten Konzentrationen wurde, entgegen den Erwartungen, eine Abnahme des Umsatzes durch den Zusatz von PEG4000 beobachtet. Mit Zunahme der Zellstoffkonzentration steigt zwar der Umsatz der Hydrolyse durch den Zusatz von PEG4000, ist aber in allen Fällen (außer bei 2 % Feststoffkonzentration) geringer als ohne Additiv. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Untersuchungen in dieser Richtung durchgeführt und auf den Zusatz von PEG verzichtet. In der Literatur wurde kein ähnlicher Effekt gefunden, sodass eine Erklärung des Phänomens nur schwer möglich ist. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass es zur Adsorption des PEG an der Zellstoffoberfläche gekommen ist, sodass eine produktive Bindung der Cellulasen erschwert worden ist.

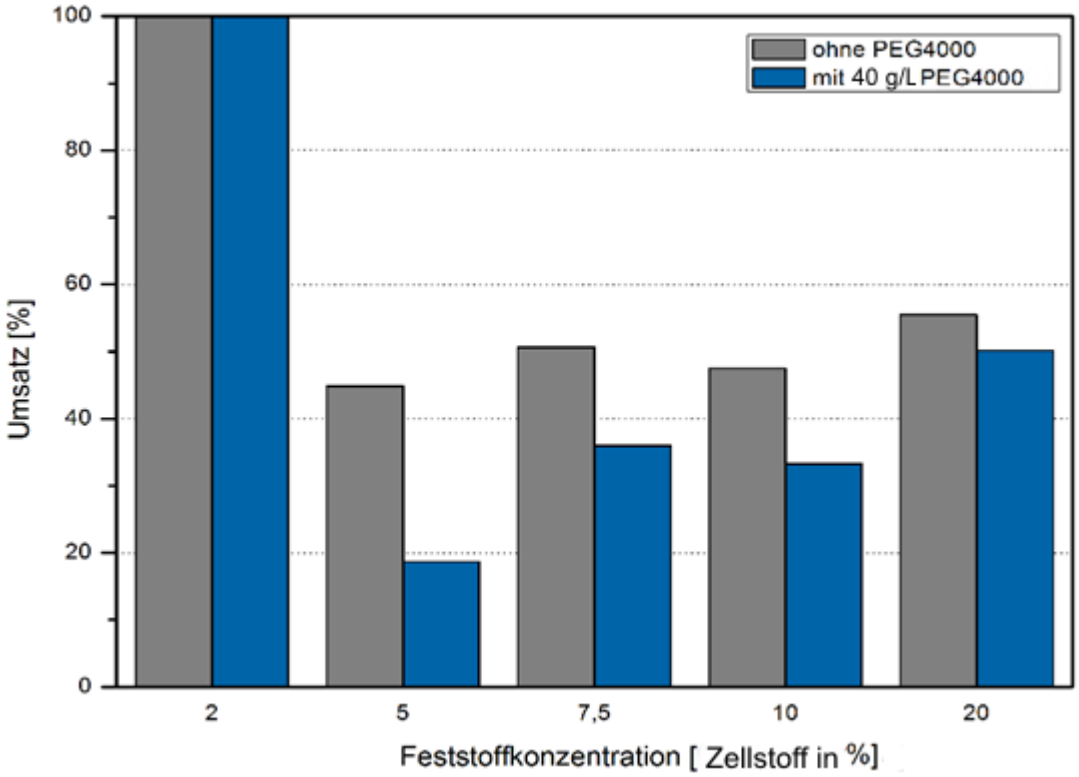


Abb. 1.4.2.8: Einfluss von PEG4000 auf die enzymatische Hydrolyse von alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh (3%ige NaOH, 30 min, 160 °C). Hydrolysebedingungen: 50 FPU/g Biomasse mit *P. verruculosum*-Cellulase, 50 mM Citratpuffer, pH 5,0, 50 °C, 24 h.

Einfluss der Feststoffkonzentration

Die ermittelten Optima für die enzymatische Hydrolyse mit dem Enzymkomplex aus *P. verruculosum* liegen bei 50 °C, pH 5,0, 50 mM Citratpuffer und 50 FPU/g Biomasse. Für die Entwicklung eines ökonomischen Gesamtprozesses ist es notwendig, die initiale Biomassekonzentration so hoch wie möglich zu wählen. Um einen Volumenanteil von 4 % Ethanol im SSF-Prozess zu gewährleisten, ist auf Grundlage des vollständigen Umsatzes des Celluloseanteiles eine Zellstoff-konzentration von 8 % notwendig. Mit Zunahme der Feststoffkonzentration steigt auch die Konzentration der Inhibitoren im System. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Feststoffkonzentration auf den Umsatz der Verzuckerung untersucht (Abb. 1.4.2.9).

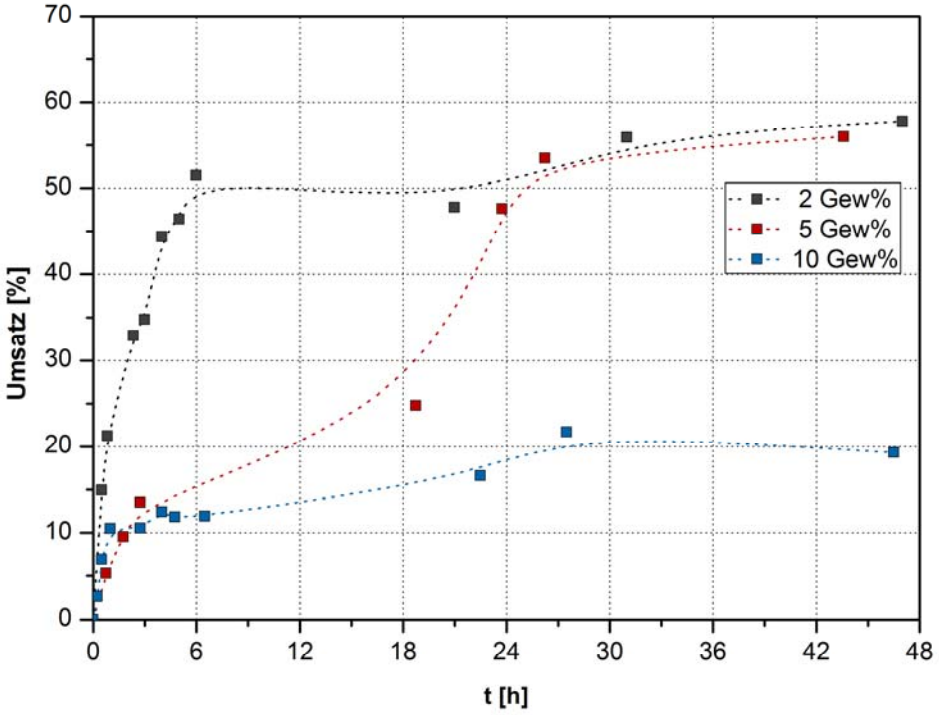


Abb. 1.4.2.9: Einfluss der Feststoffkonzentration von alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh (3%ige NaOH, 160 °C, 30 min) auf den Umsatz der enzymatischen Hydrolyse mit dem *P. verruculosum*-Enzymkomplex (15 FPU/g Zellstoff bei 50 °C).

Der größte Umsatz wird mit 2 % bzw. 5 % Feststoffkonzentration erreicht. Zudem ist deutlich erkennbar, dass die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Feststoffkonzentration sinkt, wodurch es zur erheblichen Erhöhung der Reaktionszeit kommt. Bei einer Feststoffkonzentration von 10 % konnte nur ein Umsatz von 20 % erreicht werden. Je weniger Substrat umgesetzt wird, desto schwieriger wird die Aufarbeitung, da eine Fest-Flüssig-Separation notwendig wird. Bei einem vollständigen Umsatz des Celluloseanteils liegen zum Ende der Reaktion nur wenige Feststoffpartikel vor (Abb. 1.4.2.10), sodass die Lösung ohne Probleme gepumpt werden kann. Je höher der Feststoffanteil ist, desto höher ist die Viskosität der Suspension, wodurch die Handhabung erschwert wird.

Das Phänomen, dass die Glucose-Konzentration nicht linear mit der Feststoffkonzentration steigt, ist in der Literatur mehrfach erwähnt. Insbesondere durch den hohen Ligninanteil zum Ende der Reaktion kommt es zur Inhibierung der Cellulasen. Des Weiteren fehlt Wasser für den Stoff- und Wärmetransport. Wird die Verzuckerung separat betrachtet, muss die Inhibierung der Cellulasen durch Glucose beachtet werden.[17,18]

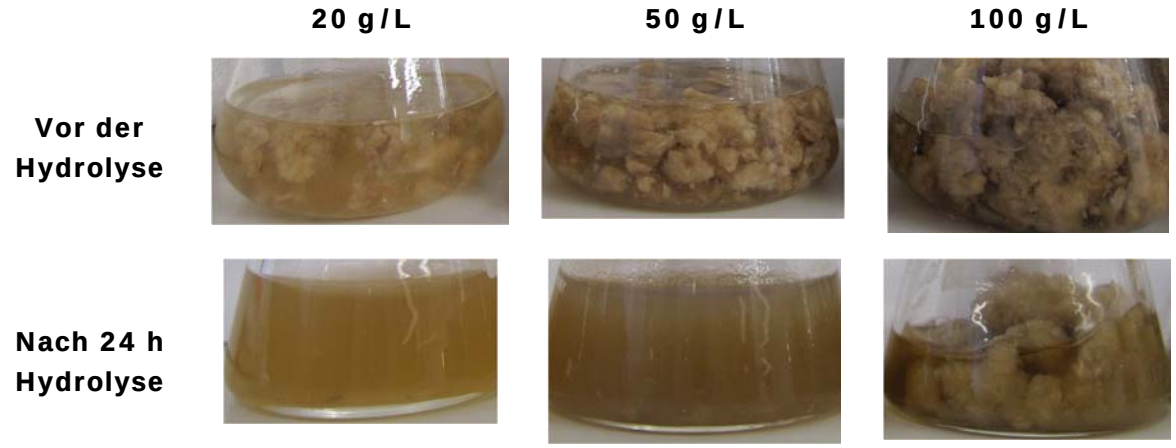


Abb. 1.4.2.10: Veränderung der Viskosität während der enzymatischen Hydrolyse von alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh (3%ige NaOH, 160 °C, 30 min) mit dem Enzymkomplex aus *P. verruculosum* (15 FPU/g Zellst.)

Wird wie in diesem Projekt die simultane Verzuckerung und Fermentation (SSF-Prozess) zur Herstellung von Bioethanol genutzt, so entfällt dieser Einfluss, da die freigesetzte Glucose sofort von den Hefen zu Ethanol umgesetzt wird. Aus diesem Grund ist es durchaus denkbar, dass im SSF-Prozess höhere Zellstoff-konzentrationen eingesetzt werden können, ohne Umsatzverluste in Kauf zu nehmen. Die geringen Umsätze bei hohen Feststoffkonzentrationen können ferner mit einer schlechten Durchmischung der Suspension erklärt werden. Der Stoff-transport wird durch die hohe Viskosität der Lösung erschwert, wodurch die Kinetik erheblich gehemmt wird. Ab einer Feststoffkonzentration von 10 % kann eine homogene Vermischung im klassischen Bioreaktor (Rührkessel) mit Scheiben-rührer nicht mehr garantiert werden.

Eine Alternative zum Batch-Verfahren ist die fed batch-Methode. Dabei wird nach einer definierten Zeit erneut Substrat zugegeben, um so die Gesamtfeststoff-konzentration zu steigern. Der Vorteil dabei ist, dass die Suspension leichter zu homogenisieren ist und somit der Stofftransport verbessert wird. Um eine Endkonzentration des Feststoffes von 10 % erreichen zu können, wurde eine initiale Konzentration von 5 % gewählt und nach 24 Stunden enzymatischer Verzuckerung, was einem vollständigen Umsatz des Zellstoffes entspricht, erneut 5 % Zellstoff zugegeben. Durch Erhöhung des Feststoffgehaltes konnte keine Erhöhung des Umsatzes beobachtet werden (Abb. 1.4.2.11).

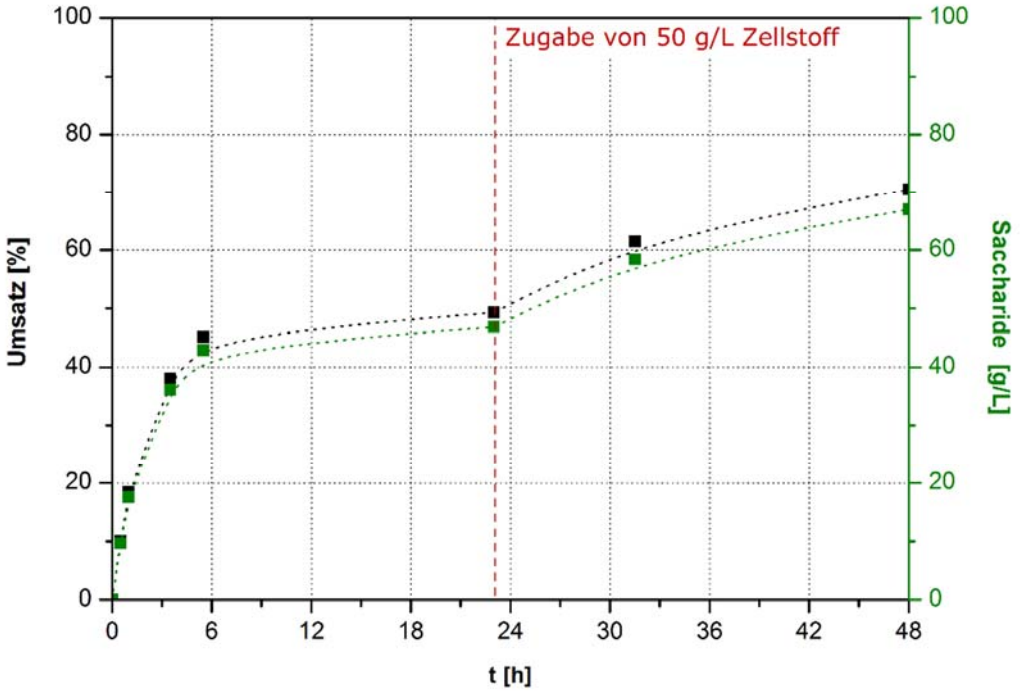


Abb. 1.4.2.11: Enzymatische Hydrolyse von 10 % alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh (3 %ige NaOH, 30 min, 160 °C) nach dem fed batch-Verfahren.

Die initiale Zellstoffkonzentration betrug 5 %. Nach 24 h wurden erneut 5 % Zellstoff zugegeben. Hydroylsebedingungen: 50 °C, pH 5,0; 50 mM Citratpuffer, 50 FPU/g mit *P. verr.*-Cellulase.

Nach erneuten 24 Stunden enzymatischer Hydrolyse wurden nur etwa 20 g/L Saccharide zusätzlich freigesetzt. Das entspricht etwa 51 % der zugesetzten Cellulose. Dieser Effekt wurde auch durch die Arbeitsgruppe von Rosgaard et al.[19] beobachtet. Für die Hydrolyse scheint das Enzym-Cellulose-Verhältnis entscheidend zu sein, sodass eine Erhöhung der Enzymkonzentration mit der Substratzugabe erfolgen müsste. Das ist jedoch mit einer Erhöhung der Produktionskosten verbunden, sodass dieses Konzept nicht zielbringend erscheint.

Eine weitere Alternative zum batch-Verfahren im Rührkessel ist die Verwendung von Freifallmischsystemen, welche insbesondere für hochviskose Medien geeignet sind. Diese Systeme können eine homogene Vermischung garantieren und werden in der Technik bereits zur Herstellung hochviskoser Stoffe, wie zum Beispiel Ketchup, Erdnussbutter und Klebstoffe eingesetzt. Im Gegensatz zu Rührkessel-reaktoren wird bei einer hohen Viskosität im Freifallmischer weniger Energie für die Durchmischung benötigt, wodurch die Prozessökonomie verbessert wird.[20,21]

Für die Entwicklung eines ökonomischen Prozesses ist es essentiell, die Zellstoffkonzentrationen so hoch wie möglich und die Enzymkonzentrationen so gering wie möglich zu gestalten. Für vergleichende Studien, wie zum Beispiel die Untersuchungen zur Optimierung der Vorbehandlungsmethode, wurde aus methodischen Gründen auf eine Zellstoffkonzentration von 2 % und eine Enzymkonzentration von 100 FPU/g Biomasse zurückgegriffen.

***Einfluss des Lignins auf den Verzuckerungsprozess* (SIAB/UL)**

Eine weitere Untersuchung betraf die Inhibierung der Cellulase von *P. verruculosum* durch das im Zellstoff enthaltene Restlignin. Zu Vergleichszwecken wurde die Cellulase von *T. reesei* in die Untersuchungen mit aufgenommen.

Die Verzuckerung durch die Cellulase in Anwesenheit von Lignin erfolgte mithilfe mikrokristalliner Cellulose (MKC), um den Einfluss möglicher Chargenschwankungen des NP-Zellstoffes zu vermeiden. Untersucht wurden Lignine aus verschiedenen Aufschlussverfahren: das *Indulin AT* aus dem Kraftprozess, Lignin aus dem alkalischen Aufschluss des Projektpartners TU Dresden und Lignin aus dem NP-Verfahren. In die Untersuchungen wurde außerdem Lignin einbezogen, welches aus dem Zellstoff des NP-Verfahrens mit einem Restligninanteil von ca. 11 % enzymatisch[22] isoliert wurde.

In Abb. 1.4.2.12 sind beispielhaft die Ergebnisse für den Einfluss von Indulin AT auf die Hydrolyse aufgeführt. Die eingesetzten Lignine aus den oben genannten Prozessen inhibierten insbesondere die *P. verruculosum* Cellulase. Dies war jedoch erst im späten Abschnitt des Hydrolyseverlaufes (nach 24 Stunden) feststellbar.

Trotz dieser Inhibierung war zugunsten der *P. verruculosum*-Cellulase eine höhere Hydrolyseausbeute (reduzierende Zucker) gegenüber den Vergleichswerten des *T. reesei*-Enzymsystems zu verzeichnen.

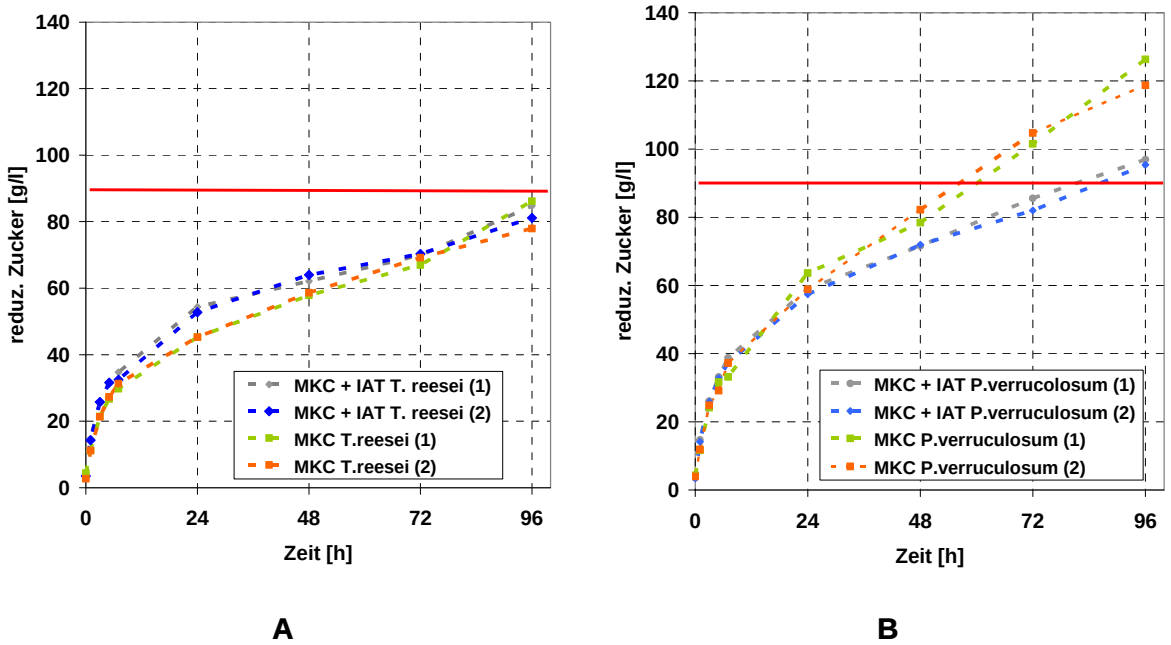


Abb. 1.4.2.12: Ergebnisse der Verzuckerung von mikrokristalliner Cellulose (MKC) durch Cellulasen von *T. reesei* (**A**) und *P. verruculosum* (**B**) mit sowie ohne Zugabe von Indulin AT (IAT, 10 g/L). Die Versuche wurden im Doppelansatz durchgeführt. Enzymbeladung: 15 FPU/g_{MKC}, 200 g/L MKC, T=40 °C, Citratpuffer pH 4,8.

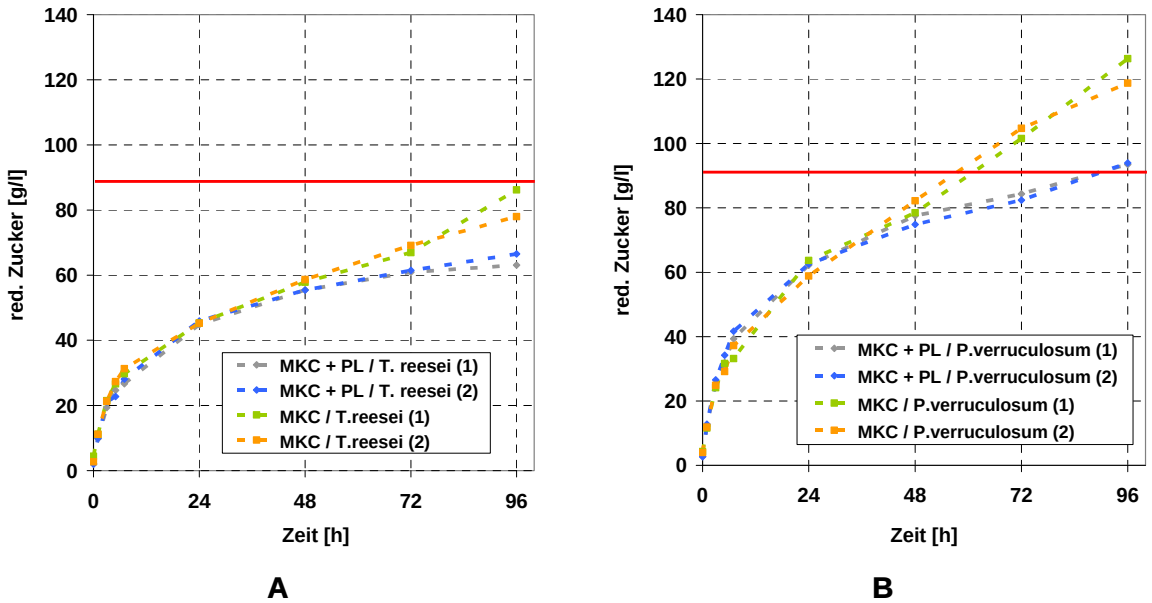


Abb. 1.4.2.13: Ergebnisse der Verzuckerung von mikrokristalliner Cellulose (MKC) durch Cellulasen von *T. reesei* (**A**) und *P. verruculosum* (**B**) mit sowie ohne Zugabe von aus Zellstoff isoliertem Ligninrückstand (PL, 10 g/L %); Der Klason-Ligninanteil des Rückstands betrug 58 % Die Versuche wurden im Doppelansatz durchgeführt. Enzymbeladung: 15 FPU/g_{MKC}, 200 g/L MKC, T=40 °C, Citratpuffer pH 4,8.

Im Vergleich dazu inhibierte das aus dem Zellstoff isolierte Lignin beide cellulolytischen Systeme (Abb. 1.4.2.13). Nach 24 Stunden lag der Abbaugrad mit dem Cellulasesystem von *P. verruculosum* im Vergleich zu *T. reesei* bei 137 %, nach 96 Stunden bei 144 %.

In allen Fällen der Ligninzugabe lag die Abbaurate des Cellulasekomplexes von *P. verruculosum* über der vom *T. reesei*-Enzymsystem.

1.4.3 Einfluss der Prozessbedingungen beim alkalischen Biomasseaufschluss auf die enzymatische Verzuckerung (TU BAF, TUD)

Für einen effizienten Prozess ist die Vorbehandlung der Biomasse essentiell. Ziel dabei ist die Abtrennung von Lignin und somit die Verbesserung der Zugänglichkeit der Cellulose für die Cellulasen. Zudem soll die Kristallinität verringert und die innere Oberfläche vergrößert werden. Im Rahmen dieses Projektes wurden verschiedene chemische Methoden auf ihre Anwendbarkeit getestet. An dieser Stelle wird insbesondere die alkalische Vorbehandlung mit Natronlauge diskutiert. Bei der Vorbehandlung mit Natronlauge werden die Esterbindungen zwischen Lignin und Hemicellulosen bzw. Cellulose gespalten, wodurch die Löslichkeit des Lignins erhöht wird und somit selektiv abgetrennt werden kann. Als Resultat erhält man einen ligninarmen Zellstoff. Der Vorteil dieser Methode ist, dass es nur zum geringen Abbau der Cellulose kommt und nur wenige Nebenprodukte, welche als Inhibitoren wirken können, gebildet werden. Außerdem wird der Zugang der Cellulasen zur Cellulose durch Quellen und durch die Abspaltung der Hemicellulosen verbessert.[23] Allerdings fällt beim Ausfällen des Lignins eine große Salzfracht an, wodurch die Entsorgung der Aufschlusslösungen erschwert wird. Außerdem ist die Wiedergewinnung der Base mit einem hohen Energieaufwand verbunden.

Durch alkalische Vorbehandlung kann ein Restligningehalt von nur 5 % erreicht werden. Dieses liegt unterhalb der in der Literatur beschriebenen Werte. Nach dem Natural Pulping-Verfahren kann ein Zellstoff mit bis zu 11 Prozent Lignin gewonnen werden. Die Kinetik der enzymatischen Hydrolyse der beiden Zellstoffe unterscheidet sich stark (Abb. 1.4.3.1).

Bei alkalisch vorbehandeltem Zellstoff wird bereits nach 5 Stunden Verzuckerung ein nahezu vollständiger Umsatz erreicht. Beim NP-Stroh erst nach 48 Stunden. Im Vergleich zum nativen Weizenstroh ist aber deutlich zu erkennen, dass eine Vorbehandlung des Weizenstrohs essentiell ist, um hohe Hydrolyseraten erzielen zu können. Die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten für natives Weizenstroh liegt nur bei $1{,}3 \cdot 10^{-3}$ $mol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$. Für alkalisch vorbehandeltes Stroh konnte die zwölffache ($16{,}3 \cdot 10^{-3}$ $mol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$) und für NP-Stroh die vierfache ($5{,}6 \cdot 10^{-3}$ $mol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$) initiale Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt werden. Grund dafür können die unterschiedlichen Ligningehalte sein. Je höher der Ligninanteil ist,

desto geringer werden die Produktivität und die Reaktionsgeschwindigkeit. Ebenso führt der unter Druck erfolgte alkalische Aufschluss zu einer höheren Zerfaserung des Zellstoffs, was wiederum die Zugänglichkeit für die Enzyme erleichtert.

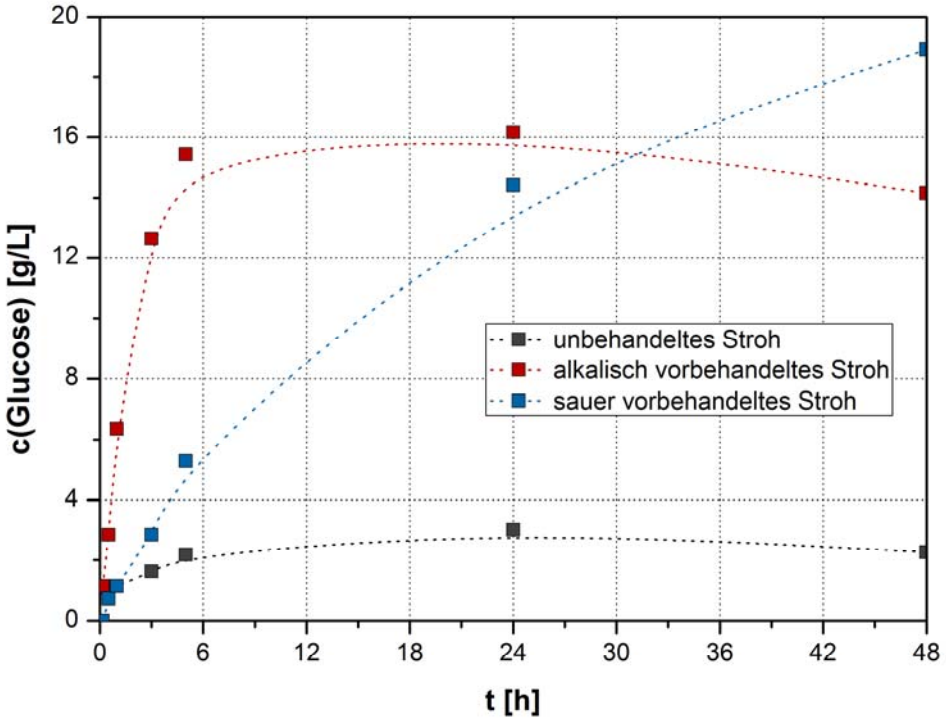


Abb. 1.4.3.1: Einfluss der chemischen Vorbehandlung auf die enzymatische Hydrolyse mit dem Enzymkomplex aus *P. verruculosum* (100 FPU/g Biomasse).

Vergleich von alkalischer (3%ige NaOH, 30 min, 160 °C) und NP-Vorbehandlung (60%ige Ameisensäure und Wasserstoffperoxid, 60 min, 105 °C) von Weizenstroh.

Physikalische Konditionierung

Zu Beginn der Versuche wurde untersucht, inwieweit eine physikalische Konditionierung des Strohs einen Einfluss auf die Qualität des Zellstoffes hat. Dieser zusätzliche Energieeintrag kann aber nur durch einen erheblichen Nutzen gerechtfertigt werden. Am Beispiel des alkalischen Aufschlusses mit 3%iger NaOH bei 160 °C für 30 min wurde der Einfluss von Mahlen (< 4 mm), Schneiden (4-10 cm) und thermomechanische Behandlung untersucht.

Die thermomechanische Vorbehandlung (TMP) ist eine etablierte Methode in der Papier- und Zellstoffindustrie, bei der das Holz bei ca. 140 °C in einem Refiner mechanisch zerfasert wird.[24] Der Hydrolyseumsatz ist für das gemahlene und das

TMP vorbehandelte Weizenstroh größer 83 %. Mit dem geschnittenen Weizenstroh konnten nur Umsätze von 62 % erreicht werden. Dieses liegt wahrscheinlich an der kleineren inneren Oberfläche des Substrates. Sowohl beim Mahlen als auch beim TMP werden die Zellwandstrukturen aufgebrochen, sodass die Enzyme leichter an der Cellulose angreifen können. Der zusätzliche Energieeintrag beim Mahlen bzw. TMP sorgt zwar für eine Verbesserung der Hydrolyseraten, jedoch wird die Wirtschaftlichkeit durch die Mehrkosten erheblich verschlechtert, sodass im großtechnischen Prozess auf die Vorkonditionierung möglichst verzichtet werden sollte. Ein Schneiden des Strohs durch Strohhäcksler ist für das Erreichen von ökonomisch relevanten Flottenverhältnissen unumgänglich.

Lagerung

Nach der Vorbehandlung wird der resultierende Zellstoff zunächst gewaschen und dann zur Weiterverarbeitung gelagert. Auf der einen Seite bedeutet ein ökonomischer Prozess möglichst wenig energieintensive Trocknungsschritte. Auf der anderen Seite werden beim Trocknungsprozess mögliche Keime abgetötet, sodass bei der nachfolgenden Verarbeitung eine Kontamination verhindert werden kann und die Nebenproduktbildung gesenkt wird. Aus diesem Grund wurde die Auswirkung der Lagerung des alkalischen Zellstoffes bis zur Verzuckerung auf die Hydrolyse untersucht. Dazu wurde der Zellstoff bei 7 °C bzw. -18 °C gelagert sowie bei 105 °C getrocknet (Abb. 1.4.3.2). Als Referenz diente Zellstoff, der direkt nach dem Waschen verzuckert wurde (im Weiteren als frischer Zellstoff bezeichnet).

Durch die Trocknung des Zellstoffes kommt es zur signifikanten Steigerung der enzymatischen Hydrolyse. Mit dem frischen Zellstoff konnte nur ein Umsatz von 30,5 % erzielt werden. Durch eine Lagerung im Kühlschrank (7 °C) bzw. Tiefkühler (-18 °C) konnte eine Steigerung des Umsatzes auf 40 bzw. 51 % erreicht werden.

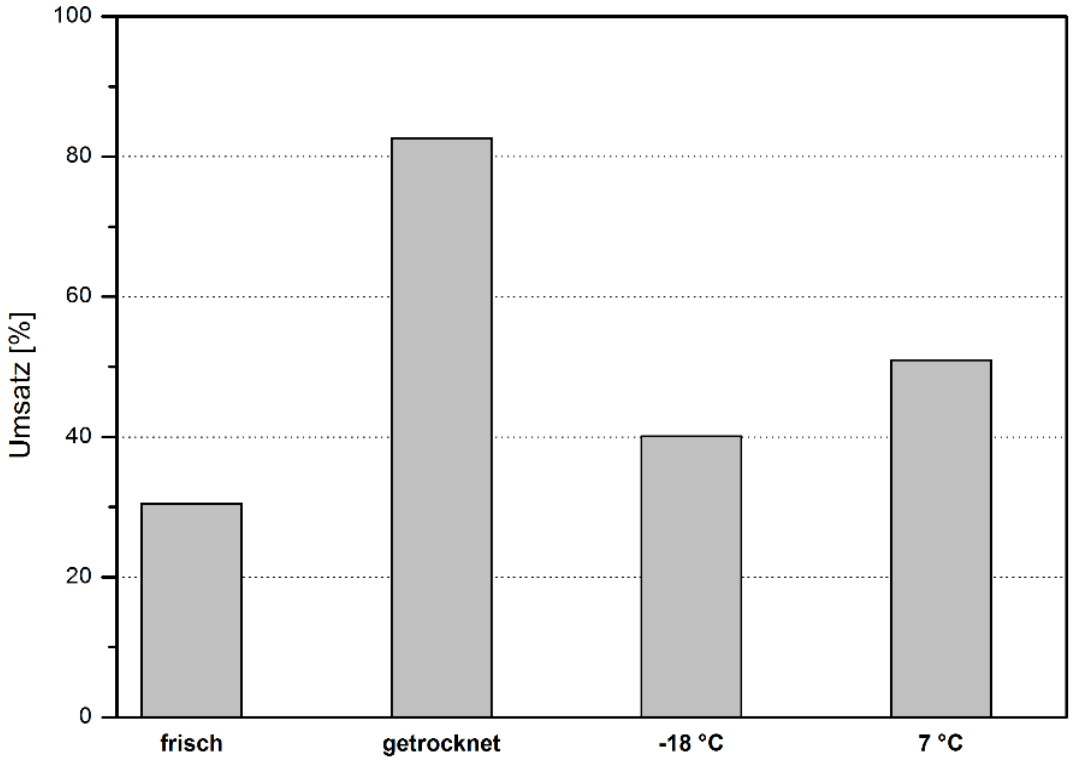


Abb. 1.4.3.2: Einfluss der Lagerung des Zellstoffes auf den Umsatz der enzymatischen Hydrolyse von alkalisch vorbehandelten Weizenstroh (3%ige NaOH, 90 min, 160 °C) mit *P. verruculosum*-Cellulase (100 FPU/g, 24 h, 50°C, 2 % Feststoffgehalt) Die Trocknung erfolgte bei 105 °C

Beim Trocknungsprozess kann es zur Zerstörung der Zellwandstrukturen kommen, wodurch die Oberfläche der Fasern verändert wird. Dies erleichtert die Zugänglichkeit der Cellulose für die Cellulasen, wodurch die Hydrolyse verbessert wird. Vielfach wird im Zuge der Trocknung eine Verhornung der Oberfläche beobachtet, wodurch es zur Zerstörung von Poren in der Faser kommt. Durch Suspendierung des Zellstoffes in Wasser kommt es jedoch nur zur eingeschränkten Öffnung der Poren, wodurch die Zugänglichkeit für die Cellulasen verschlechtert wird und die Hydrolyseeffizienz sinkt.[25] In den durchgeführten Untersuchungen scheint die Zerstörung der Zellwand zu einer Vergrößerung der Oberfläche zu führen, wodurch es zur Steigerung des Umsatzes kommt. Eine Verhornung scheint also nicht eingetroffen zu sein. Offensichtlich sind die Waschschritte bei der geringen Laugenkonzentration des Aufschlusses ausreichend um eine Verhornung zu verhindern.

Durch den Auftauprozess kann es ebenfalls zur Zerstörung der Zellwandstruktur kommen, was eine Steigerung des Umsatzes mit sich bringen würde. Im Vergleich zum frischen Zellstoff kann zwar eine Verbesserung der Verzuckerung festgestellt werden, diese fällt aber im Vergleich zum getrockneten Zellstoff geringer aus. Bei

der Lagerung des Zellstoffes im Kühlschrank bei 7 °C kann es zum mikrobiellen Abbau kommen, wodurch der eingesetzte Celluloseanteil sinkt. Dieses Problem kann jedoch durch Sterilisierung des Substrates, was wiederum mit einem energetischen Mehraufwand verbunden ist, verhindert werden. Für die großtechnische Umsetzung wäre es am günstigsten, wenn der Zellstoff möglichst gleich weiterverarbeitet wird. Dieses Vorgehen verringert auch den Lageraufwand und somit weitere Kosten. Da in diesem Fall der Umsatz aber am geringsten ist muss über eine Kosten-Nutzen-Rechnung die ökonomischste Variante ermittelt werden.

Um einen mikrobiellen Abbau zu vermeiden, wurde der Zellstoff für die Untersuchungen im Labor bei 105 °C getrocknet. Außerdem konnte so vermieden werden, dass sich die Zellstoffzusammensetzung während der Lagerung verändert.

Optimierung der Aufschlussparameter

Für den alkalischen Einfluss wurden die Aufschlussbedingungen optimiert und der Ligningehalt sowie die enzymatische Hydrolyse als Qualitätsmaß genutzt (Abb. 1.4.3.3).

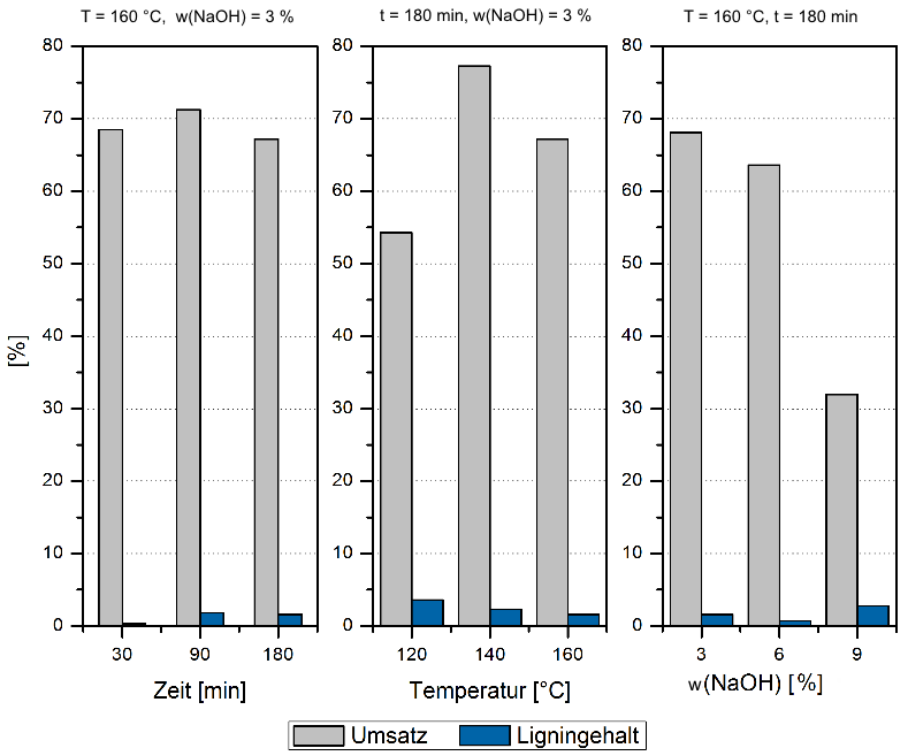


Abb. 1.4.3.3: Einfluss der Aufschlussdauer, Aufschlusstemperatur und Laugenkonzentration auf den Ligningehalt und den Umsatz der enzymatischen Hydrolyse mit *P. verruculosum*–Cellulase (100 FPU/g, 2 %, 50 mM Citratpuffer pH 5,0, 50 °C, 24 h).

Auffällig ist, dass bei allen Aufschlussbedingungen Ligningehalte unter 5 % erreicht werden können. Die Variation der Aufschlusszeit ergab keinen signifikanten Einfluss auf Ligningehalt oder Hydrolyseumsatz. Daher kann eine kurze Aufschlusszeit von nur 30 min gewählt werden, wodurch die Ökonomie des Prozesses gesteigert wird.

Mit Zunahme der Aufschlusstemperatur sinkt der Ligningehalt. Allerdings geht die Abnahme der Ligninkonzentration nicht einher mit einer Zunahme der Hydrolyseumsätze. Da aber bei 160 °C das beste Kohlenhydrat-Lignin-Verhältnis erreicht werden konnte, wurden für nachfolgende Untersuchungen 160 °C für 30 Minuten ausgewählt. Mit Zunahme der Natronlauge-Konzentration konnte eine Abnahme des Ligningehaltes beobachtet werden, jedoch keine Steigerung der Hydrolyserate. Als für die enzymatische Hydrolyse optimale Vorbehandlungsbedingungen haben sich somit 3%ige NaOH, 30 min Aufschlussdauer bei 160 °C ergeben.

Einfluss Substrate

Nach erfolgreicher Optimierung der enzymatischen Hydrolyse sowie der alkalischen Vorbehandlung konnte die Verzuckerung verschiedener lignocellulosehaltiger Substrate mittels des Enzymkomplexes aus *P. verruculosum* durchgeführt werden. Sowohl für Weizenstroh, Miscanthus und Luzerne konnte deutlich gezeigt werden, dass eine alkalische Vorbehandlung der Biomasse essentiell ist (Abb. 1.4.3.4).

Durch die Behandlung der Biomasse mit Natronlauge steigt die Hydrolyseeffizienz um ein Vielfaches an. Außerdem wurde deutlich, dass nach ca. sieben Stunden Verzuckerungszeit die vorbehandelte Biomasse nahezu vollständig umgesetzt wurde. Auffällig ist zudem, dass natives Weizenstroh den geringsten und Weizenstroh nach der alkalischen Vorbehandlung den höchsten Umsatz aufweisen. Bei allen verwendeten Biomassen konnten unter gleichen Aufschlussbedingungen Ligningehalte unterhalb 6 % (Tab. 1.4.3.1) erreicht werden. Dies zeigt, dass der alkalische Aufschluss für verschiedene Einjahrespflanzen geeignet ist und bei gleichen Aufschlussparametern zu ähnlichen Zellstoffqualitäten führt.

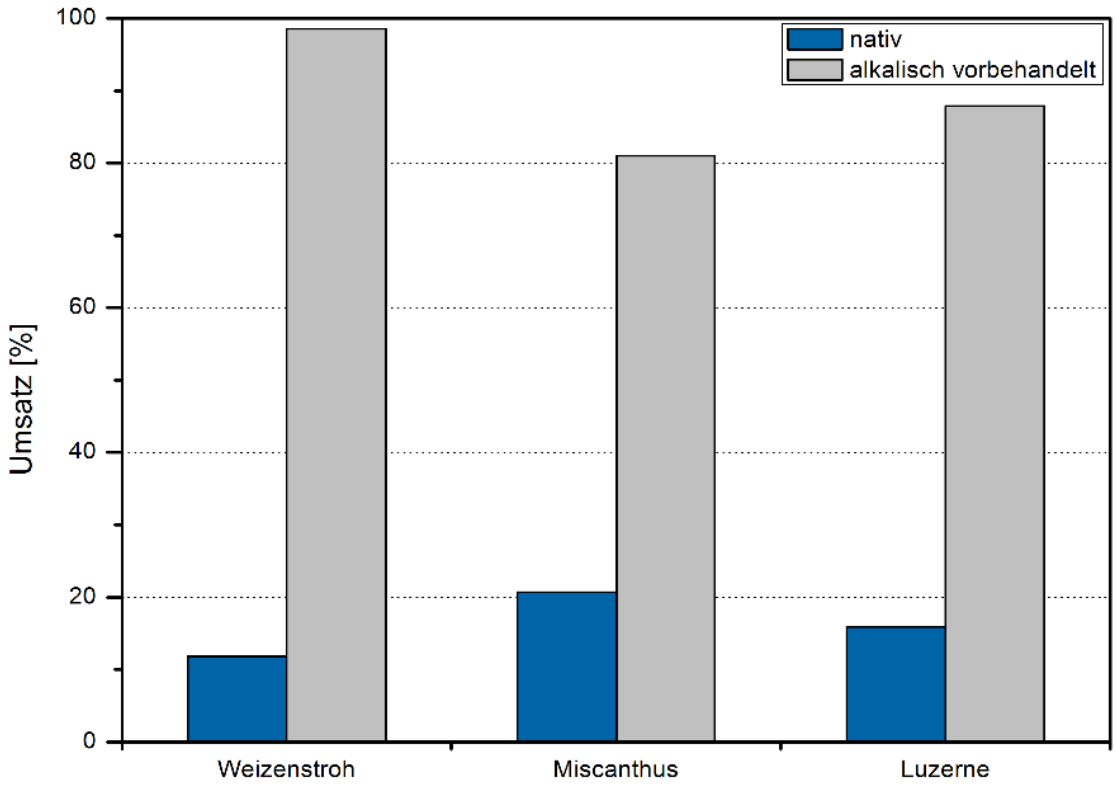


Abb. 1.4.3.4: Einfluss der alkalischen Vorbehandlung (3 % NaOH, 160 °C, 30 min) auf die Hydrolyseeffizienz nach 7 h enzymatischer Verzuckerung unter folgenden Bedingungen: 2 % Feststoffgehalt, 50 mM Citratpuffer, pH 5,0, 100 FPU/g Biomasse, Enzymkomplex von *P. verruculosum.*

Tab. 1.4.3.1: Einfluss der alkalischen Vorbehandlung auf die Zusammensetzung der Zellstoffe

		Extrakt	**Lignin**	**Cellulose**	**Hemicellulose**
Weizenstroh	nativ	4,0 %	21,7 %	41,9 %	31,7 %
	alkalisch	1,2 %	5,8 %	72,6 %	19,4 %
Miscanthus	nativ	2,5 %	24,5 %	57,3 %	21,3 %
	alkalisch	0,8 %	0,8 %	79 %	12,5 %
Luzerne	nativ	10,9 %	12,6 %	39,2 %	23,7 %
	alkalisch	4,3 %	5,5 %	73,7 %	15,8 %

1.4.4 Untersuchungen zur Fermentation von Lignocellulosehydrolysaten (TU BAF, SIAB/UL)

Nach Optimierung der enzymatischen Hydrolyse wurde die Fermentation der Lignocellulosehydrolysate vorgenommen. Alle dazu notwendigen Untersuchungen wurden mit der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* L13 durchgeführt. Dieser Mikroorganismus wird nach international bekannten Herstellungsverfahren für Bäckerhefe produziert und weist keine Genmanipulation auf.

Wachstumsuntersuchungen

Eine sehr wichtige Frage für die Durchführbarkeit der Versuche war, ob eine Sterilisation der Hydrolysate notwendig ist. Um dieses klären zu können, wurden Wachstumsversuche auf sterilen und unsterilen Hydrolysaten sowie auf einem YPD-Medium (yeast extract, Pepton, Glucose) durchgeführt.

Als Maß für die Zunahme der Biomasse und somit für das Wachstum wurde mittels Lichtstreuung bei 600 nm die Trübung gemessen, welche als scheinbare optische Dichte (OD) ausgedrückt wird. Aus Abb. 1.4.4.1 geht deutlich hervor, dass das Wachstum der Hefen auf den Hydrolysaten im Vergleich zum YPD-Medium, was einer optimalen Nährstoffzusammensetzung entspricht, erwartungsgemäß geringer aber trotzdem ausgeprägt ist. Zu sehen ist auch, dass das Wachstum auf sterilem und unsterilem Hydrolysat gleich verläuft. Somit haben Luftkeime keinen Einfluss, wodurch eine Sterilisation des Hydrolysates bzw. des Zellstoffes nicht notwendig ist.

Die Unterschiede im Wachstum zwischen YPD-Medium und Hydrolysat sind vor allem in einem Nährstoffmangel im Hydrolysat begründet. Insbesondere Stickstoff ist für das Wachstum und die Produktivität der Hefen essentiell. Lignocellulose-hydrolysate zeichnen sich insbesondere durch einen Stickstoffmangel aus. Vorbehandeltes Weizenstroh enthält in der Regel 0,4 % Stickstoff bezogen auf die Trockenmasse.[26] In dem aus alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh erhaltenen Hydrolysat wurden 44 mg/L Stickstoff gefunden. Untersuchungen mit der Bäckerhefe *S. cerevisiae* haben gezeigt, dass das Optimum der Stickstoff-konzentration bei 200 mg/L liegt.

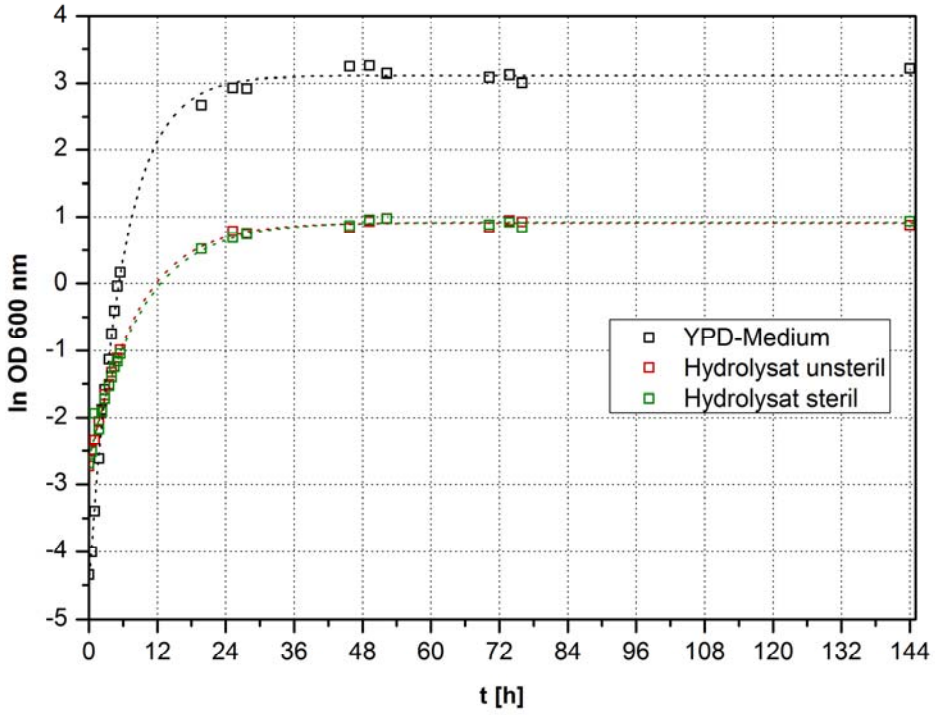


Abb. 1.4.4.1: Wachstumsuntersuchungen von *S. cerevisiae* auf YPD-Medium und Lignocellulosehydrolysat.

Im SSF-Prozess kann mitunter ein Stickstoffmangel limitierend wirken. Infolge dessen kann es zum proteolytischen Abbau der Enzyme durch Hefen kommen, wodurch wiederum die Hydrolyse des Zellstoffes zum Stillstand kommen kann. In der Literatur wird vielfach die Zugabe einer externen Stickstoffquelle, wie Proteine und freie Aminosäuren, diskutiert. Allerdings sorgen diese Additive wiederum für eine Reduktion der Wirtschaftlichkeit des Prozesses. Aus diesem Grund sollten preisgünstige Stickstoffquellen gefunden werden, welche die Ethanolausbeute verbessern können. Im Rahmen einer Diplomarbeit wurden verschiedene Stickstoffquellen auf ihren Einfluss auf die Fermentation untersucht. Neben Pepton und Caseinhydrolysat, welche in der Mikrobiologie als Bestandteile von Nährböden oder Nährlösungen zur Kultivierung von Mikroorganismen verwendet werden, wurden die Aminosäuren Arginin, Natriumglutamat und Glutamin sowie die N-Verbindungen Harnstoff und Ammoniumsulfat getestet. Außerdem wurden zwei Schlempen, die Rückstände aus der Ethanoldestillation, auf ihre Eignung untersucht.

Aus den Ergebnissen geht deutlich hervor, dass der Umsatz für die Fermentation nach 3 Stunden unabhängig von der Stickstoffquelle im Bereich von 48 % und 55 % liegt und somit leicht höher als bei Fermentationen ohne zusätzliche

Stickstoffzugabe (46 %) ist. Auch die Konzentration der nicht umgesetzten Glucose liegt bei allen Versuchen unterhalb von 1 %. Des Weiteren wurde für alle Versuche eine Zellvitalität > 98 % bestimmt, was bedeutet, dass nahezu alle Zellen zu Fermentationsende noch lebensfähig sind. Unterschiede konnten im Reststickstoffgehalt sowie in der gemessenen OD festgestellt werden. Harnstoff ist eine vergleichsweise günstige Stickstoffquelle wird aber von der verwendeten Hefe *S. cerevisiae* L13 nur zu 25 % umgesetzt. Die Verwertbarkeit von Stickstoff kann durch den Zusatz anderer Stickstoffquellen, wie zum Beispiel Aminosäuren und Ammoniumsulfat, verbessert werden, liefert aber trotzdem keine signifikanten Umsatzerhöhungen in der Fermentation.

Alle getesteten Aminosäuren liefern ähnlich gute Ergebnisse. Aufgrund der hohen Produktkosten sollte man aber davon absehen, Aminosäuren zu verwenden. Der Einsatz von Schlempen ermöglicht die Verwertung von Abfallströmen und somit die Reduzierung der Prozesskosten. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die im SSF-Prozess erzeugte Schlempe auch als N-Quelle genutzt werden kann. Somit ist eine Kreislaufführung der Abfallströme möglich. Die geringste OD und somit das geringste Wachstum wurde bei Ammoniumsulfat festgestellt. Mit einer Mischung aus Schlempe und Ammoniumsulfat konnte eine Verbesserung des Umsatzes der Fermentation erzielt werden. Eine Mischung dieser beiden Stickstoffquellen ermöglicht eine Steigerung des Umsatzes um bis zu 10 %. Als bestes Mischungsverhältnis hat sich eine Mischung von 1:1 erwiesen. Somit kann das für die Hefe leicht verfügbare Ammoniumsulfat mit der preisgünstigen Stickstoffquelle Schlempe erfolgreich kombiniert werden.

Optimierung von Temperatur und pH-Wert

Neben Versuchen zur Stickstoffquelle wurden Optimierungsversuche bezüglich der Temperatur und des pH-Wertes vorgenommen. Für die enzymatische Hydrolyse wurden Optima von 50 °C und pH 5,0 ermittelt. Da das Projektziel die Entwicklung eines SSF-Prozesses ist, bei dem die enzymatische Hydrolyse und die Fermentation in einem Reaktor und somit bei gleichen Reaktionsbedingungen stattfindet, sollte das Optimum der Verzuckerung und der Fermentation möglichst nahe beieinander liegen. Aufgrund von Ergebnissen aus der Literatur wurde ein Optimum der Fermentation bei 30 °C erwartet. Nach 4 Stunden Fermentation wurden diese Erwartungen auch bestätigt (Abb. 1.4.4.2).

Allerdings wurde mit zunehmender Reaktionszeit eine Abnahme des Umsatzes festgestellt. Über den gesamten Reaktionsverlauf blieb die Viabilität bei ca. 75 % relativ konstant. Daher ist ein größeres Zellsterben auszuschließen. Denkbar ist, dass unter den gewählten Kultivierungsbedingungen ein Nährstoffmangel im Medium vorlag, so dass kein vollständiger Umsatz erzielt werden konnte.

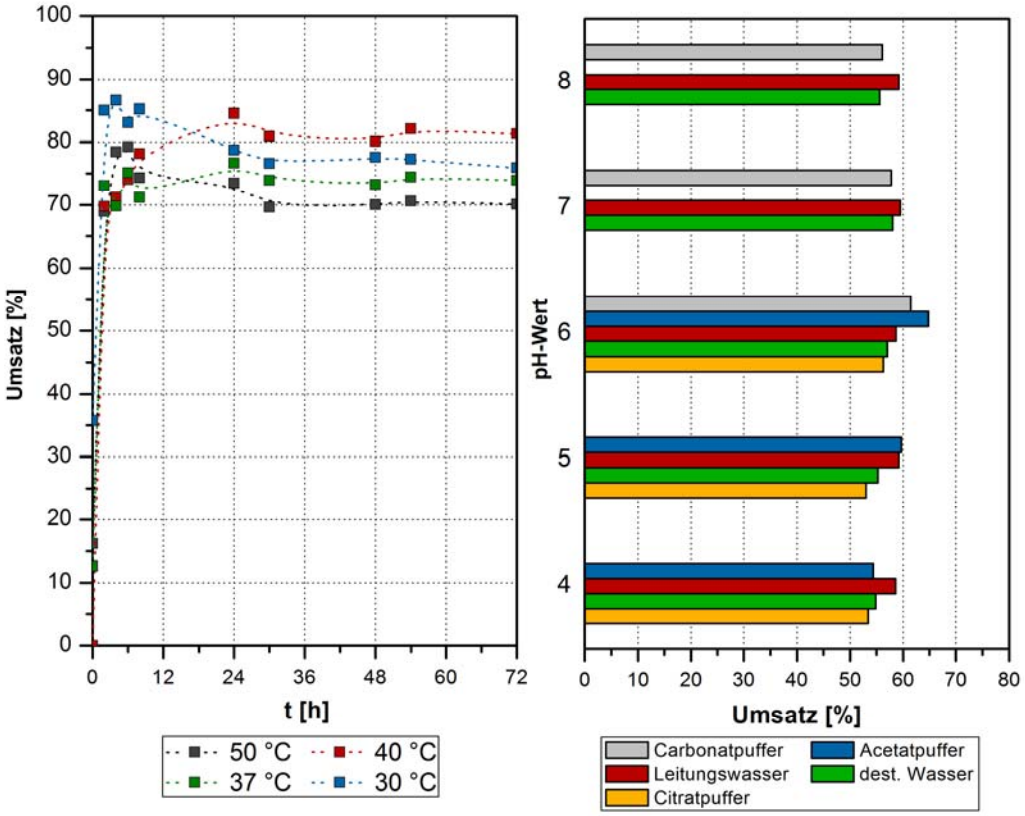


Abb. 1.4.4.2: Einfluss der Temperatur (links) und des pH-Wertes (rechts) auf den Umsatz der Fermentation.

Links: Fermentation von 20 g/L Glucose in Acetatpuffer mit 100 mg/L Stickstoff (Ammoniumsulfat; Schlempe 1 : 1) und 3 % *S. cerevisiae*.

Rechts: Fermentation von 20 g/L Glucose-Lösung mit 5 % *S. cerevisiae* für 3 h bei 37 °C.

Durch eine Erhöhung der Temperatur auf 40 °C konnte eine geringfügige Steigerung des Umsatzes erzielt werden, allerdings mit einer Viabilität von nur 64 %. Für einen großtechnischen Prozess bedeutet dies, dass eine höhere Hefemenge eingesetzt werden muss. Außerdem werden durch die Verwendung von Biomasse als Substrat zusätzliche Inhibitoren eingetragen, wodurch die Viabilität weiter sinkt. Bei einer Temperatur von 50 °C konnte trotz der hohen Temperatur noch ein Umsatz von 70 % erreicht werden. Dies geht einher mit einer sehr geringen Viabilität der Hefezellen (33 %), was darauf schließen lässt, dass die Mehrheit der Zellen aufgrund der Temperatur bereits denaturiert worden sind. In der Literatur wird vielfach von 37 °C als Kompromisstemperatur gesprochen. Bei dieser Temperatur konnte nach 72 h ein Umsatz von 74 % erzielt werden. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem der Fermentation bei 30 °C nach 72 h. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Untersuchungen 37 °C als Reaktionstemperatur gewählt.

Für die Untersuchungen zum optimalen pH-Wert wurden, analog der Untersuchungen zur Verzuckerung, unterschiedliche Puffersysteme getestet. Nach 3 Stunden Fermentation bei 37 °C wurde der höchste Umsatz (65 %) bei pH 6,0 mit Acetatpuffer festgestellt. Das schlechteste Ergebnis wurde mit Citratpuffer, dem für die Verzuckerung geeignetsten Puffersystem, erreicht. Citronensäure ist dafür bekannt, das Wachstum der Hefen negativ zu beeinflussen. Mit zunehmenden pH-Wert wird die Ethanolproduktion gehemmt, wohingegen die Bildung von Glycerol erhöht und somit weniger ATP freigesetzt wird.[27] Kalk kann aufgrund seines basischen Charakters einer beginnenden Versäuerung während des Prozesses entgegenwirken. Im Gegensatz zum Citrat- und Acetatpuffer liegt hier aber nur eine eingeschränkte Pufferfähigkeit vor. Bei der Bildung von organischen Säuren während der Fermentation kommt es zur Zersetzung des Kalks, wodurch der pH-Wert der Lösung erhöht wird. Dieses erschwert die Einstellung des pH-Wertes während des Prozesses erheblich.

Leitungswasser ist das preiswerteste der getesteten Reaktionsmedien. Die damit erreichten Umsätze liegen im Mittelfeld der getesteten Medien. Die Umsätze mit destilliertem Wasser sind vergleichsweise gering, was auf fehlende Metalle und Spurenelemente zurückzuführen ist. Insbesondere Eisen, Zink, Magnesium und Mangan haben einen positiven Effekt auf die Fermentation.[28] Bei allen verwendeten Puffersystemen hat sich erwartungsgemäß pH 6 als das pH-Optimum herausgestellt. Auch wenn mit Acetatpuffer bei pH 6 der beste Umsatz erreicht wurde, ist aufgrund einer vermehrten Nebenproduktbildung von der Nutzung abzuraten. Die geringste Nebenproduktbildung konnte bei Leitungswasser beobachtet werden. Daher wurde in späteren Versuchen im Bioreaktor mit Leitungswasser gearbeitet.

Hefekonzentration

Zum Abschluss der Optimierungsversuche wurde der Einfluss der Hefekonzentration auf die Fermentation untersucht. Aus Sicht der Wirtschaftlichkeit sollte die Konzentration optimal gehalten werden. Mit Zunahme der Ethanolkonzentration ist ein Absterben der Hefezellen zu erwarten. Dies hat bei einer zu geringen initialen Hefekonzentration einen erheblichen Einfluss, so dass eine Nachdosierung notwendig wird. Die Untersuchungen zeigen deutlich, dass bei einer geringen Substratmenge eine Hefekonzentration von 3 % optimal ist. Eine Erhöhung der Hefekonzentration führt zu keiner Steigerung des Ethanolumsatzes. Wird mit höheren Substratkonzentrationen (> 20 %) gearbeitet, steigt die Konzentration von inhibierenden Substanzen im Zellstoff und ebenso der osmotische Stress für die Hefezellen. Daher müssen höhere initiale Hefekonzentrationen eingesetzt werden. Als optimal hat sich eine Konzentration von 8 % Hefe erwiesen.

Die umfassenden Untersuchungen haben gezeigt, dass die optimalen Versuchsbedingungen für die Fermentation wie folgt sind: 37 °C, pH 6, Acetatpuffer, 3 % *S. cerevisiae* L13, 200 mg/L Stickstoffgehalt (Ammoniumsulfat : Schlempe 1 : 1).

Da sich diese Bedingungen zum Teil stark vom Optimum der enzymatischen Hydrolyse unterscheiden (Tab. 1.4.4.1), mussten Optimierungen zum SSF-Prozess durchgeführt werden.

Tab. 1.4.4.1: Vergleich der Optima von pH-Wert und Temperatur der enzymatischen Hydrolyse mit *P. verruculosum* und Fermentation mit *S. cerevisiae* L13

Parameter des Optimums	Enzym. Hydrolyse	Fermentation
pH-Wert:	5	6
Reaktionsmedium:	Citratpuffer	Leitungswasser
Temperatur:	50 °C	37 °C

Studien zu Ethanoltoleranz der Hefen

Bevor mit weiterführenden Untersuchungen zur simultanen Verzuckerung und Fermentation begonnen werden konnte, mussten noch Informationen über die Ethanoltoleranz der verwendeten Hefe ermittelt werden. Eine hohe Konzentration an Ethanol inhibiert das Zellwachstum, die Zellviabilität und somit die Fermentation.[29] Ab einer kritischen Konzentration kann es zur Denaturierung und somit zur irreversiblen Zerstörung der Zellen kommen.[30]

Je nach verwendetem Hefestamm und untersuchten Reaktionsbedingungen kann die Ethanoltoleranz stark variieren, sodass keine allgemeingültige Aussage getätigt werden kann. Für die Untersuchungen zur Ethanoltoleranz wurden definierte Mengen Ethanol zur Fermentation zugegeben und die zusätzlich gebildete Menge Ethanol ermittelt.

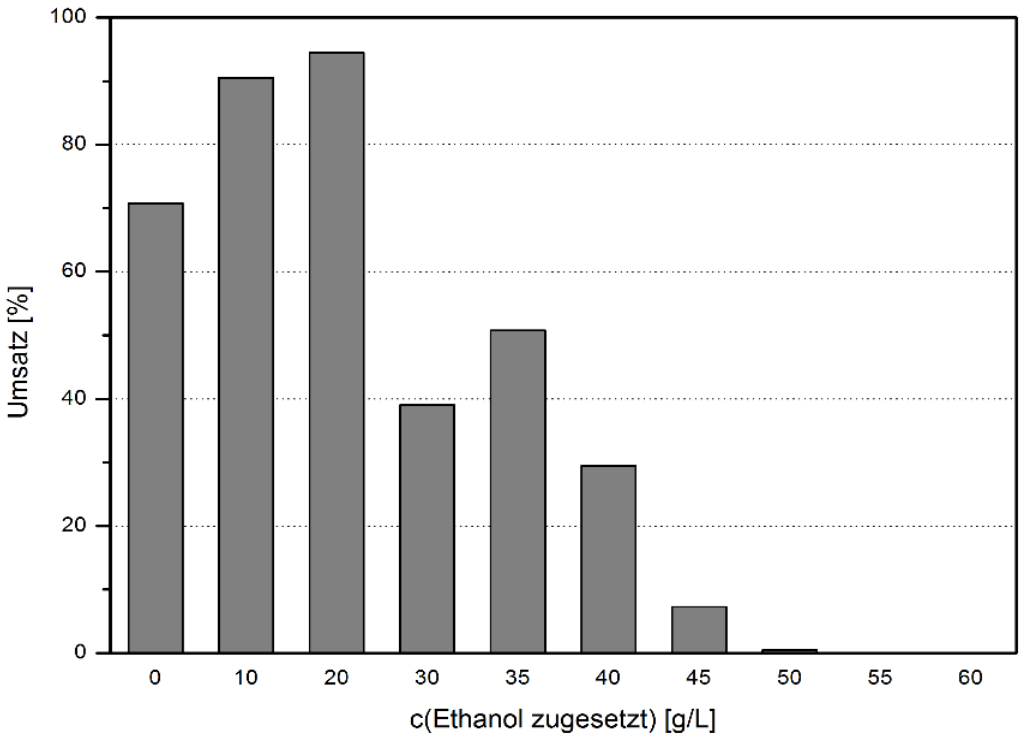


Abb. 1.4.4.3: Einfluss der Ethanol-Konzentration auf den Umsatz der Fermentation nach 3 Stunden bei 37 °C und pH 7.

Aus Abb. 1.4.4.3 geht hervor, dass durch Zugabe von bis zu 20 g/L Ethanol der Umsatz der Fermentation gesteigert wird. Ab einer Konzentration von 30 g/L kommt es zum signifikanten Absinken der Ethanolbildung. Allerdings wird erst ab einer Konzentration von 45 g/L die Viabilität deutlich beeinflusst. Bei Ethanolkonzentrationen größer als 45 g/L konnten in diesen Modelluntersuchungen nach 3 Stunden Fermentation keine lebenden Zellen der hier verwendeten Hefe mehr beobachtet werden. Zusätzlich wurde ein Absinken des zugegebenen Ethanols detektiert, was auf eine Utilisation des Ethanols hindeutet.

Um einer Inhibierung der Hefen durch Ethanol entgegenzuwirken, könnte eine *in situ* Produktentfernung durch z.B. Strippen des Ethanols mit gesättigtem Stickstoff oder mit Luft in Betracht kommen.

1.4.5 Optimierung der simultanen Verzuckerung und Fermentation (SSF) des Zellstoffs aus dem Aufschluss mit Ameisensäure / Wasserstoffperoxid (SIAB / UL)

Einfluss von Ameisensäure auf S. cerevisae

Die nach dem NP-Aufschlussverfahren im Zellstoff enthaltenen Formiatrückstände können die Stoffwechselaktivität der Hefe im SSF-Prozess potentiell beeinflussen. Aus diesem Grund wurde die Produktionshefe (*S. cerevisae*) in einem Glucose-basierten Vollmedium unter variierenden Ameisensäurekonzentrationen im Schüttelkolbenmaßstab (35 °C, pH=5,0) inkubiert.
Die Bemessung des inhibitorischen Effektes der Säure erfolgte über die Veränderung der Glucoseverbrauchsrate der Zellen, die ohne Inhibitorzusatz den höchsten Wert annahm.

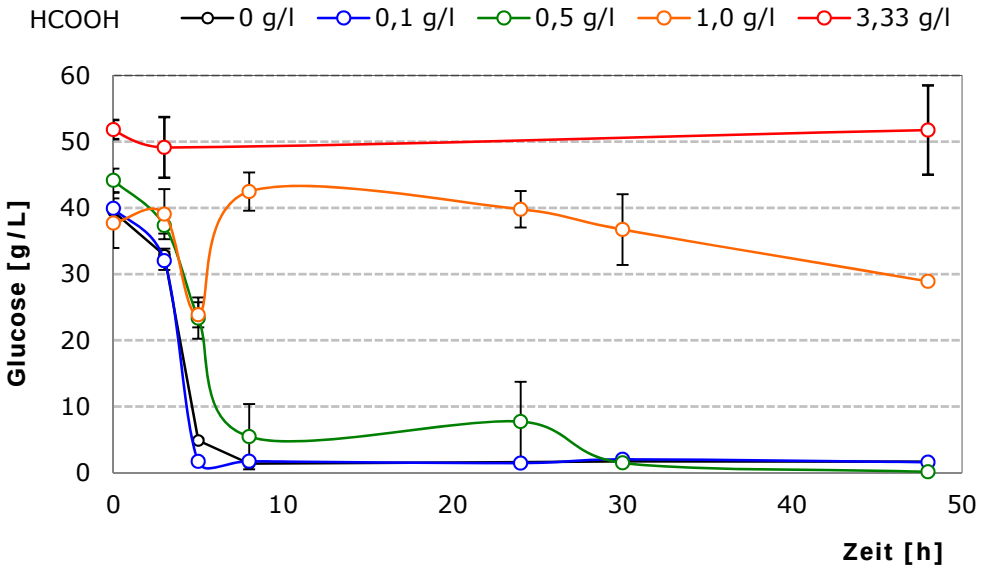


Abb. 1.4.5.1: Inhibierung der Glucoseabbaurate durch Ameisensäure unter aeroben Bedingungen (Schüttelkolbenansatz, 35 °C, 120 rpm)

Gemäß Abb. 1.4.5.1 war unter Abnahme der Verbrauchsrate ein geringfügiger Effekt bei einer HCOOH-Konzentration von 0,5 g/L zu verzeichnen. Bei einem Anteil von 1,0 g/L ist bereits von einer signifikant negativen Beeinflussung der Zellen auszugehen. Im Zuge der SSF-Fermentation ist ein Wert von mehr als 0,5 g/L Formiatrückstand im Medium zu vermeiden.

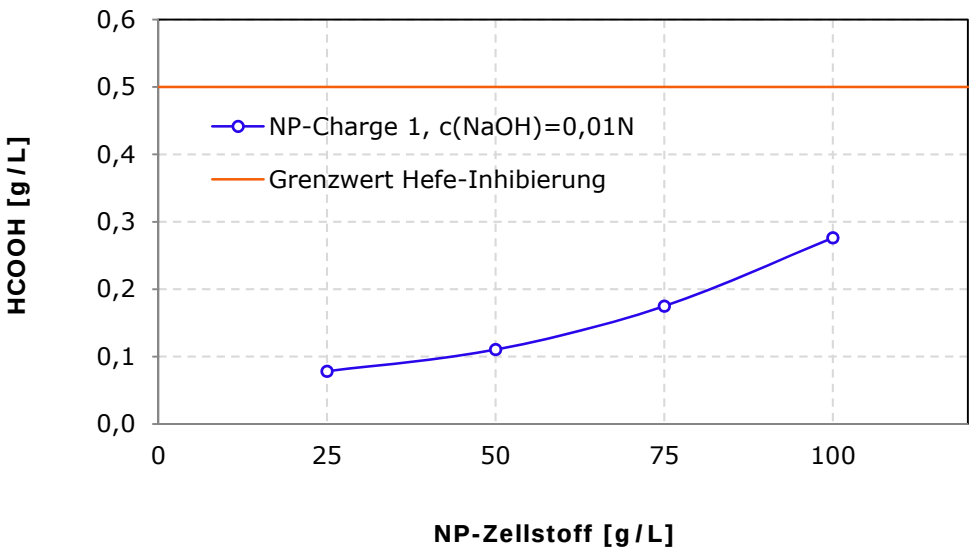


Abb. 1.4.5.2: Ameisensäurerücklösung bei NP-Zellstoffsuspendierung (Aufschlämmung), Bestimmung mittels Titration gegen NaOH, 0,01 N

Trotz einer Zellstoffwäsche bis zur annähernden pH-Neutralisation (pH > 6,0), ist davon auszugehen, dass sich weiterhin geringfügige HCOOH-Rückstände im Rohstoff befinden. In der Abb. 1.4.5.2 ist die Formiatrücklösung in Abhängigkeit der TS-Vorlage dargestellt. Unter Verwendung einer 0,1 N Natronlauge wurde zunächst 0,42 g/L Ameisensäure (grafisch nicht dargestellt) unter Suspendierung von 100 g/L NP-Zellstoff nachgewiesen, die sich jedoch nach Anpassung der Titration auf Basis einer 0,01 N Natronlauge unter analoger Beladung auf 0,28 g/L relativierte. Im Rahmen der Verdopplung der Zellstoffeinwaage bewegt sich der Ameisensäuregehalt für den eingesetzten Hefestamm bereits im inhibitorischen Bereich.
Die Resultate zeigen, dass bezüglich der Aufarbeitungsstrecke des vorbehandelten NP-Zellstoffes ein entsprechendes Optimierungspotential für die effiziente Formiat-entfernung besteht. Dabei sind sehr vielversprechende Ansätze, die sich hinsichtlich der Art des Waschverfahrens (Form der Zellstoffsuspendierung, Rührorgane, Reaktorgeometrie, ggf. Zusatzbelüftung zur Unterstützung der chemischen Formiatzersetzung in Wasser und Kohlendioxid) unterscheiden, zu eruieren.

Einfluss von NP-Lignin auf S. cerevisae

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Stoffwechselaktivität der Hefe im SSF-Prozess besteht – wie hinreichend in der Literatur beschrieben – in der Konzentration wasserunlöslicher nichtcellulosischer Medienbestandteile. Die zunehmende Beladung dieser Zellstofffraktion, beispielsweise in Form von Restlignin, resultiert

in rückläufigen Ethanolausbeuten und sollte grundsätzlich den Wert von 10 % im Kulturmedium nicht übersteigen[31].

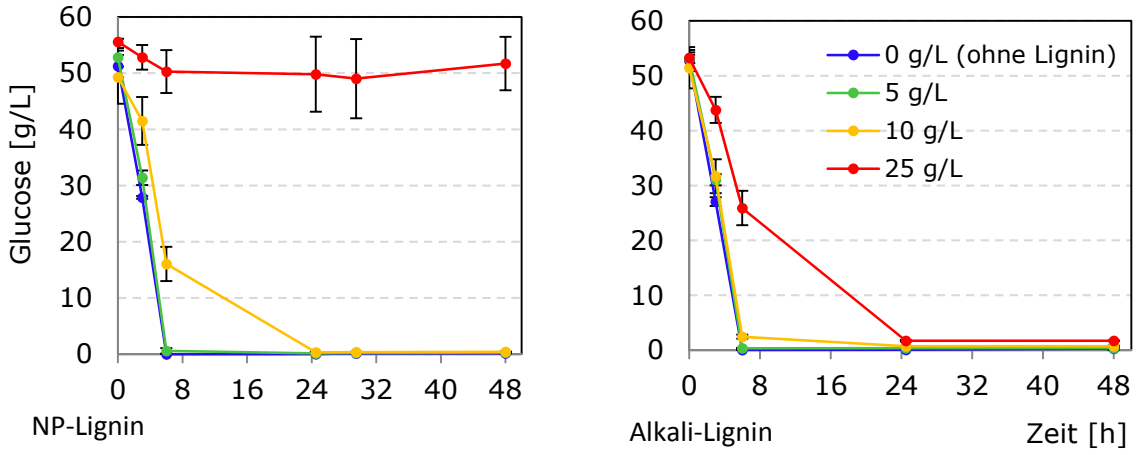


Abb. 1.4.5.3: Inhibierung der Glucose-Abbaurate durch Lignin aus dem NP- und dem Alkali-Aufschluss unter aeroben Bedingungen (Schüttelkolben, 35 °C, 120 rpm)

Die Abb. 1.4.5.3 zeigt den Einfluss von Lignin aus dem NP- und alkalischen Aufschluss hinsichtlich der Glucoseverwertung von *S. cerevisae* unter aeroben Bedingungen. Die Kultivierung der Produktionshefe erfolgte in einem Vollmedium unter variierenden Ligninarten und -konzentrationen bei 35 °C und pH=5,0. Das Maß der Inhibierung wurde über den zeitabhängigen Glucoseverbrauch ermittelt, der im Fall der ligninfreien Kontrolle am größten ausfiel.

Im direkten Vergleich zur Kontrolle, ergaben sich keine Abweichungen bei einer Vorlage von 5 g/L Lignin. Während 10 g/L NP-Lignin im Ansatz zu einem leicht veränderten Glucoseabbau führte, folgte der Glucoseverbrauch in Gegenwart des Alkali-Lignins bei gleicher Einwaage unverändert der Kontrolle. Erst bei 25 g/L Alkali-Ligninvorlage war eine deutlich inhibierende Wirkung auf die Stoffwechselaktivität der Hefen zu verzeichnen, während es im Vergleichsfall zu einer annähernd vollständigen Inhibierung der Zellen kam. Es ist zu erwähnen, dass aufgereinigtes NP-Lignin (Nachwäsche mit destilliertem Wasser) im direkten Vergleich zur analogen Vorlage von 10 g/L unbehandeltem NP-Lignin keinerlei Beeinträchtigung der Hefe zur Folge hatte. Die Grenzkonzentration der Inhibierung ist von der Art des Lignins abhängig und bewegt sich im Bereich von 10 – 25 g/L.

Im Zuge der SSF-Prozessführung auf Basis von NP-Zellstoff ist daher eine Ligninkonzentration von 10 g/L präventiv einzuhalten, die nach Tabelle 1.2.3.1 mit einer Vorlage von 64 – 75 g/L Zellstoff aus dem Laborprozess Auswirkungen auf den Fermentationsverlauf haben könnte. Für die Steigerung der bisher erzielten

Ethanoltiter und –erträge ist das Aufarbeitungsverfahren des NP-Zellstoffes hinsichtlich Formiat- und Ligninreduktion weiter zu optimieren.

Untersuchungen zum SSF-Prozess im 5-L-Bioreaktor

Die Verzuckerung des Zellstoffs aus dem NP-Aufschluss wurde mit dem *P. verruculosum*-Enzymkomplex vorgenommen, die Fermentation der Zucker zu Ethanol erfolgte mit dem Hefestamm *S. cerevisiae* H155. Vor den Fermentationsversuchen wurde die Hefe in einem Vorkulturmedium über 19 Stunden kultiviert und dem Versuchsansatz zugeführt. Der SSF-Prozess fand bei einer Temperatur von 35 °C sowie einem pH-Wert von 5 statt. Pro eingesetztes Gramm Zellstoff wurden 45 IU Filterpapieraktivität (FPU) des Enzymkomplexes von *P. verruculosum* zugeführt. Der Stickstoffbedarf der Hefe wurde durch Zugabe von Ammoniumchlorid gedeckt. Aufgrund der hohen Viskosität der Suspension konnte nur mit einer Zellstoffkonzentration von 50 g/L gearbeitet werden.

Die Ethanolkonzentration betrug nach ca. 2 Tagen Fermentationszeit 17,4 g/L. Dies entspricht, bei Beachtung des Celluloseanteils im Zellstoff einer maximal möglichen Ethanolausbeute von 76 % (siehe Fermentation A der Abbildung 1.4.5.4). Zum Ende der Fermentation wurden mit 19,3 g/L Ethanol etwa 83 % des theoretischen Maximalwertes erreicht.

Da eine Destillation bei Ethanolgehalten kleiner als w = 4 % unwirtschaftlich ist[32], sollte so viel Zellstoff eingesetzt werden, dass bei einer Verzuckerung ein Glucosegehalt von w = 8 % entsteht. Dies ist erst erreichbar, wenn die entsprechende Menge Zellstoff dem Fermentationsprozess zugegeben wird. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Fermentation A müssen mindestens 120 g/L Zellstoff aus dem NP-Aufschluss eingesetzt werden.

Wegen der hohen Viskosität der Zellstoffsuspension ist eine sofortige Zugabe dieser Menge nicht möglich. Aus diesem Grund wurde damit begonnen, einen zweiten Prozessschritt, die Vorhydrolyse, einzuführen. Auf diese Weise soll eine Verflüssigung der Suspension erreicht werden, damit zusätzlicher Zellstoff nachgeführt werden kann. Erste Ergebnisse dieser Untersuchungen sind als Fermentation B in der Abbildung 1.4.5.4 dargestellt. Nach der Vorhydrolyse (24h) konnten 35 g/L reduzierende Zucker nachgewiesen werden. Nach der Hefezugabe wurde die entstandene Glukose in einem nahezu gleichen Prozessverlauf wie bei Fermentation A zu Ethanol verstoffwechselt. Nach 2 Tagen konnte eine Ethanolkonzentration von 16,6 g/L gemessen werden. Die Vorhydrolyse in diesen Versuchen hat keinen Einfluss auf den Umsatz und verdeutlicht, dass eine Vorhydrolyse bei niedrigen Zellstoffkonzentrationen nicht sinnvoll ist.

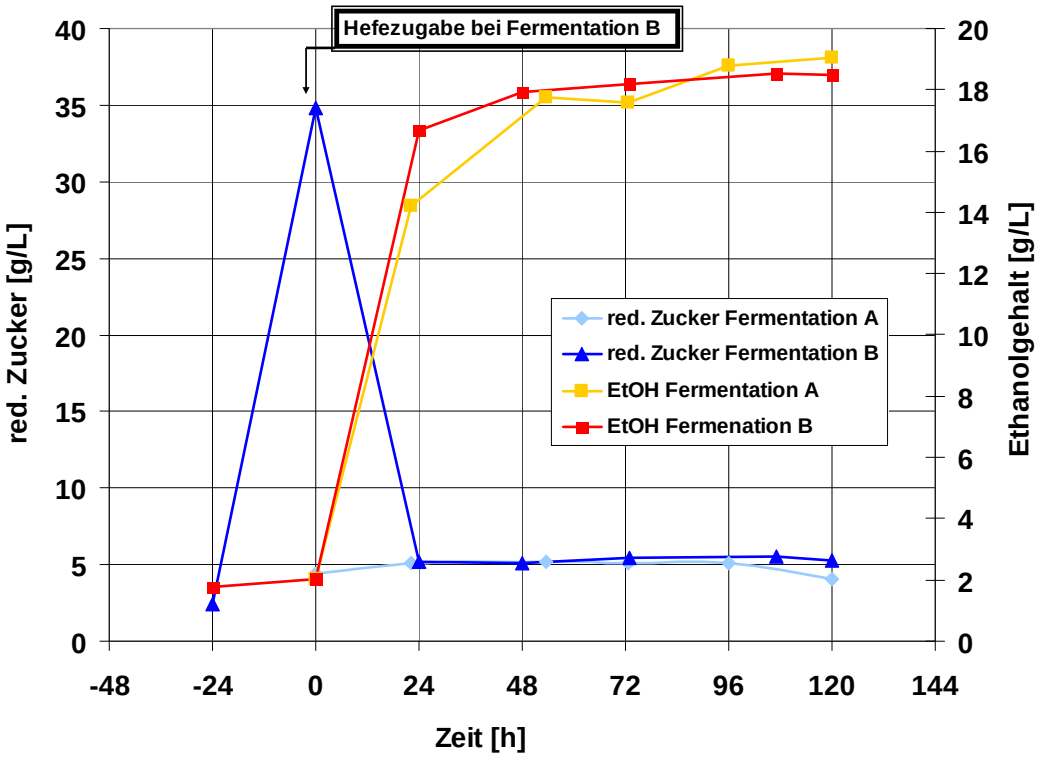


Abb. 1.4.5.4: Ergebnisse des SSF-Prozesses mit 5 % des mit NP-Aufschluss erhaltenen Zellstoffs
Bedingungen: 35 °C, pH 5, *P. verruculosum*-Cellulase, 45 IU/g TS;
Fermentation A - gleichzeitige Zugabe von Hefe und Enzym
Fermentation B - Hefezugabe nach 24-stündiger Vorhydrolyse

In nachfolgenden Versuchen soll geklärt werden, ob bei höheren Zellstoffkonzentrationen und nach der Zellstoffzugabe nach Vorhydrolyse höhere Ethanolkonzentrationen erreicht werden können (siehe nächsten Abschnitt und Abschnitt 1.4.7, Ethanolerträge unter variierter Zellstoffart).

Eine weitere Frage betraf die Wiederverwertbarkeit der in dem Prozess befindlichen Enzyme. Es wurde die Stabilität des Cellulasekomplexes bestimmt, indem die eingesetzte Enzymaktivität mit der verbliebenen Aktivität verglichen wurde. Um den Einfluss der im Zellstoff befindlichen Stoffe wie Lignin, Hemicellulosen und Extraktstoffe abzuschätzen, wurden die Aktivitäten einer Fermentation mit Zellstoff und mit mikrokristalliner Cellulose (MKC) miteinander verglichen.

In Abbildung 1.4.5.5 ist ein minimaler Aktivitätsverlust in beiden Versuchen erkennbar. Ein Recycling der Enzyme, beispielsweise mittels Filtrationstechniken oder nach Abtrennung des Ethanols mittels Adsorptionstechniken, erscheint sinnvoll.

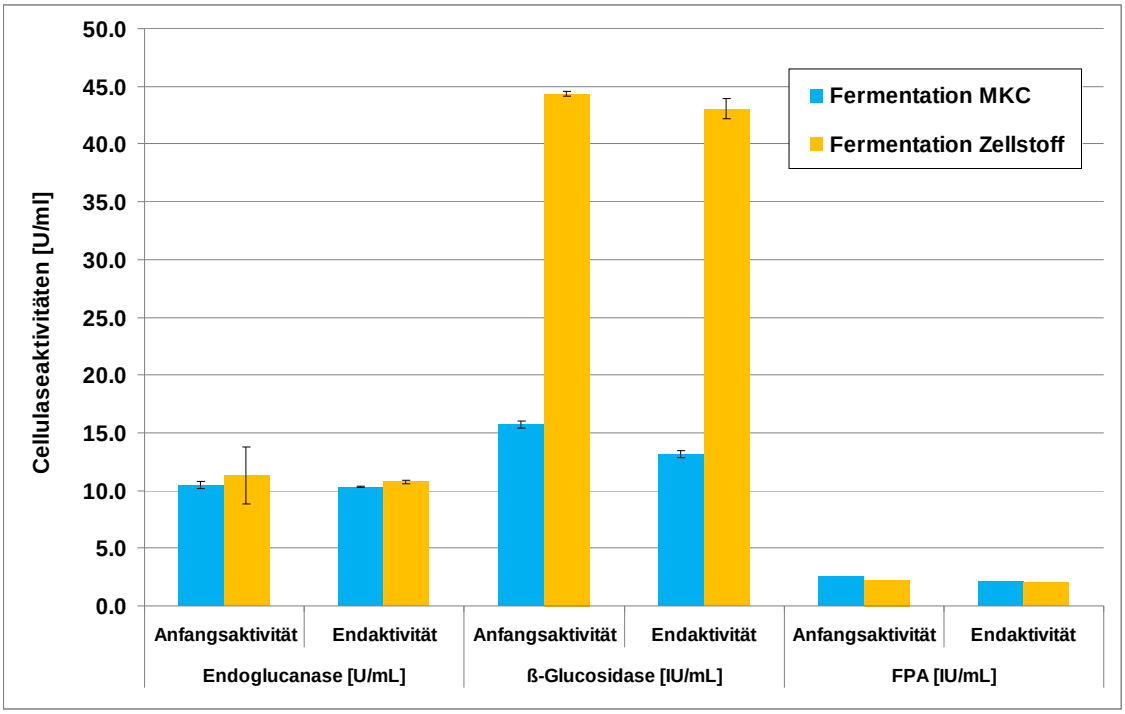


Abb. 1.4.5.5: Cellulaseaktivitäten zum Start und Ende der SSF-Prozesse mit 5 % Trockenmasse

Bedingungen: 35 °C, pH 5, *P. verruculosum*-Cellulase 45 IU/g TS;

Fermentation MKC - 5 % mikrokristalline Cellulose (reinst)

Fermentation Zellstoff - 5 % Zellstoff aus NP-Aufschluss

(~ 85% Celluloseanteil im Zellstoff)

Ethanolertrag unter gesteigerter NP-Zellstoffvorlage im SSF-Prozess

Das SSF-Verfahren im einfachen 5 L-Rührreaktor schloss mit einer Ethanolkonzentration von 25 g/L bei einem Zellstoffgehalt von 100 g/L ab, deren Vorlage maßgeblich durch das Reaktordesign limitiert wurde. Durch Anwendung eines Spiralrührwerkes konnten im Rahmen einer zweimaligen Zellstoffnachführung während einer Vorhydrolyse (7 h, 45 °C) insgesamt 200 g/L Substrat vorgelegt und unter geeigneter Nachführung von Trockenhefe (mit steigender Tendenz zu Versuchsende) in 40 g/L Ethanol konvertiert werden, wobei sich der Cellulose-bezogene Ethanolertrag mit 45 %, im Vergleich zu TS-Vorlagen < 200 g/L, rückläufig verhielt. Dieses Ergebnis entspricht den bekannten Literaturdaten.[31,33]

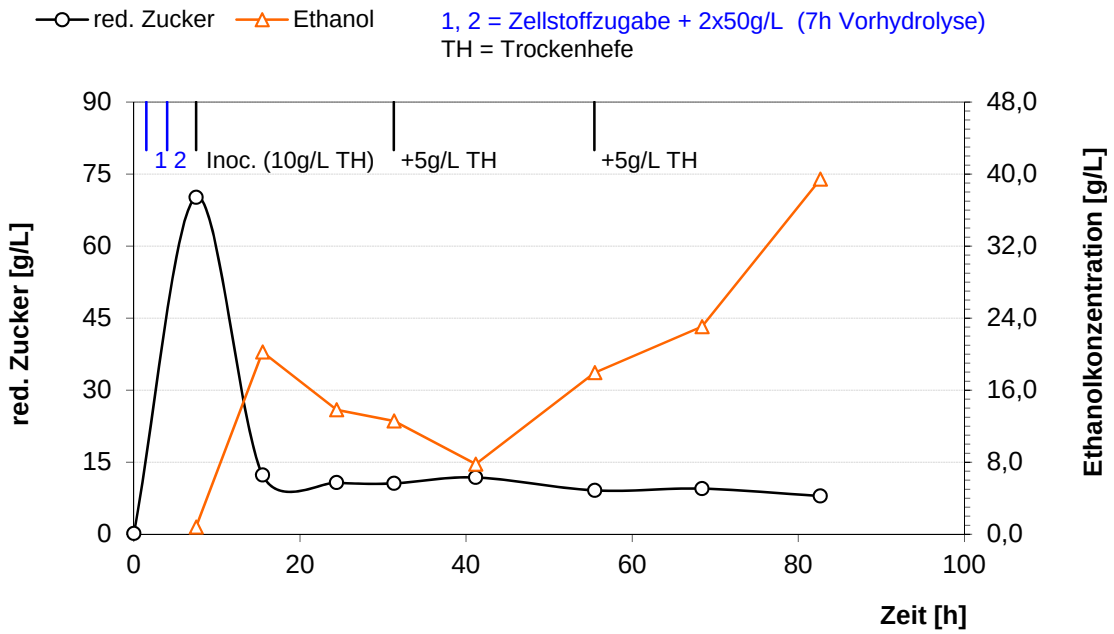


Abb. 1.4.5.6: SSF-Laborprozess mit Spiralrührwerk (200 g/L NP-Zellstoff, 25 FPU/g TS)

Eine fallende Ethanolausbeute unter steigender Feststoffvorlage ist im SSF-Prozess hinlänglich bekannt und unterliegt vielfältigen Ursachen. Neben der inhibierenden Wirkung rückgelöster Ameisensäure, beeinflussen wasserunlösliche Bestandteile des Zellstoffes (z.B. Lignin) ab einer Konzentration von 10 % im Kulturmedium die Vitalität und Produktivität der Hefezellen nachweislich.[34, 35] Darüber hinaus wirkt sich eine hohe Substratbeladung negativ auf die enzymatische Hydrolyse aus, die vermutlich auf eine Zunahme unwirksamer Enzym-Feststoffbindungen (z.B. Adsorption) in Folge des limitierten Stofftransportes im viskosen Medium zurückzuführen ist.[36,37]

Der Einfluss von Störkomponenten ist nach Abb. 1.4.5.6 zunächst mit einer Verlängerung der Fermentationszeit (> 48 Stunden) teilweise kompensierbar, wie der fortwährende Anstieg der Ethanolkonzentration zum Versuchsende nach ca. 80 Stunden zeigt.

Die Annäherung an vergleichbare Titer der Ethanolgewinnung auf Stärkebasis erfordert entsprechend hohe Zellstoffkonzentrationen oberhalb der untersuchten 200 g/L. Zur Gewährleistung des erforderlichen Stofftransportes unter hoher Substratvorlage und für die Absenkung eines Kontaminationsrisikos durch Vermeidung einer Zellstoffnachführung im Gärprozesses, ist das SSF-Verfahren nach bisherigem Kenntnisstand in geeigneten Feststoffreaktoren durchzuführen.

1.4.6 Optimierung der simultanen Verzuckerung und Fermentation des Zellstoffs aus dem alkalischen Aufschluss (TU BAF)

Werden Hydrolyse und Fermentation simultan in einem Reaktor durchgeführt, spricht man vom SSF-Prozess. Hierbei müssen Kompromisse bei den Reaktionsbedingungen eingegangen werden, denn es wird nur ein Reaktor benötigt. Durch die kontinuierliche Umsetzung der Hydrolyseprodukte in Ethanol wird eine Inhibierung der Cellulase durch Glucose vermieden. Jedoch ist zu bedenken, dass es zur Inhibierung der Mikroorganismen durch Ethanol und andere Fermentationsprodukte kommen kann. Die simultane Verzuckerung und Fermentation hat des Weiteren den Vorteil, dass eine geringere initiale Enzymkonzentration benötigt wird. Aufgrund der fehlenden Produktinhibierung der Cellulasen durch Glucose wird in der Regel auch eine Erhöhung der Hydrolyseraten im Vergleich zum SHF-Prozess beobachtet. Auch die Fermentationszeiten können durch diese Verfahrensweise reduziert werden.[38]

Optimierung SSF-Prozess

Die Optimierungen des SSF-Prozesses wurde in einem Tischbioreaktor der Fa. Infors durchgeführt. Als Modellsubstrat wurde dazu das alkalisch vorbehandelte Weizenstroh verwendet, welches einen Cellulosegehalt von 73,1 % aufwies. Der Umsatz der Hydrolyse wie auch der Fermentationsumsatz wurden immer auf den Cellulosegehalt bezogen. Im Gegensatz zu den Vorversuchen wurde bei pH 5 eine höhere Ethanolkonzentration erreicht als bei pH 6. Durch den geringeren pH-Wert konnte der Umsatz fast verdoppelt und eine geringere Konzentration an freier Glucose bestimmt werden. Dieses lässt darauf schließen, dass die enzymatische Hydrolyse die Schlüsselreaktion im SSF-Prozess ist. Wie bereits beschrieben, liegt das pH-Optimum für die Cellulasen des Enzymkomplexes aus *P. verruculosum* bei pH 5,0. Die Hefezellen bilden bei diesem pH-Wert Ethanol. Es wurde ein Umsatz von maximal 63 % erreicht. Auffällig ist außerdem, dass bereits nach ca. 6 Stunden Reaktionszeit ein Konzentrationsplateau erreicht wird. Diese sehr kurze Reaktionszeit hat aber einen unvollständigen Umsatz des Substrates zur Folge. Eventuell kann der Umsatz durch Zugabe von weiteren Hefezellen oder frischem Enzym noch gesteigert werden.

Untersuchungen zum Temperatureinfluss auf den SSF-Prozess haben ergeben, dass noch bei 50 °C innerhalb der ersten 6 Stunden Fermentation ein ähnlicher Verlauf der Ethanolbildung und Glucosefreisetzung zu beobachten ist. Danach kommt es zum abrupten Absinken der Ethanolkonzentration, was mit einer vermehrten Produktion von Nebenprodukten (Essigsäure, Milchsäure, Glycerol) einhergeht. Es wird ein Plateau der Ethanolkonzentration erreicht. Weiterhin fällt auf, dass trotz Glucoseabbau der Ethanolgehalt nicht signifikant steigt. Bei pH 5 kommt es sogar zum Absinken der Konzentration. Dies kann wiederum mit der

vermehrten Produktion von Nebenprodukten zusammenhängen. Bei allen durchgeführten Versuchen konnte beobachtet werden, dass die Nebenproduktbildung nach 24 Stunden Fermentation einsetzt. Da dies in der Regel auch mit dem Erreichen des Konzentrationsplateaus verbunden ist, sollte die Fermentation nach dieser Zeit beendet werden. Aus den Untersuchungen geht somit hervor, dass die Fermentationen bei pH 5,0 und 37 °C ablaufen sollten.

Prozessführung

Um den Umsatz bzw. die Ethanolkonzentration zu steigern, wurde untersucht, inwiefern eine Vorhydrolyse bei 50 °C bzw. eine zweistufige Substratzuführung zielbringend ist (Abb. 1.4.6.2). Mittels Erhöhung der Substratkonzentration durch eine zweistufige Dosierung konnte die Ethanolkonzentration von 13 auf 16 g/L gesteigert werden. Allerdings beträgt der Umsatz nur 40 %. Scheinbar wird das zugegebene Substrat nur geringfügig umgesetzt, was auf ein Herabsinken der Enzymaktivität hindeutet.

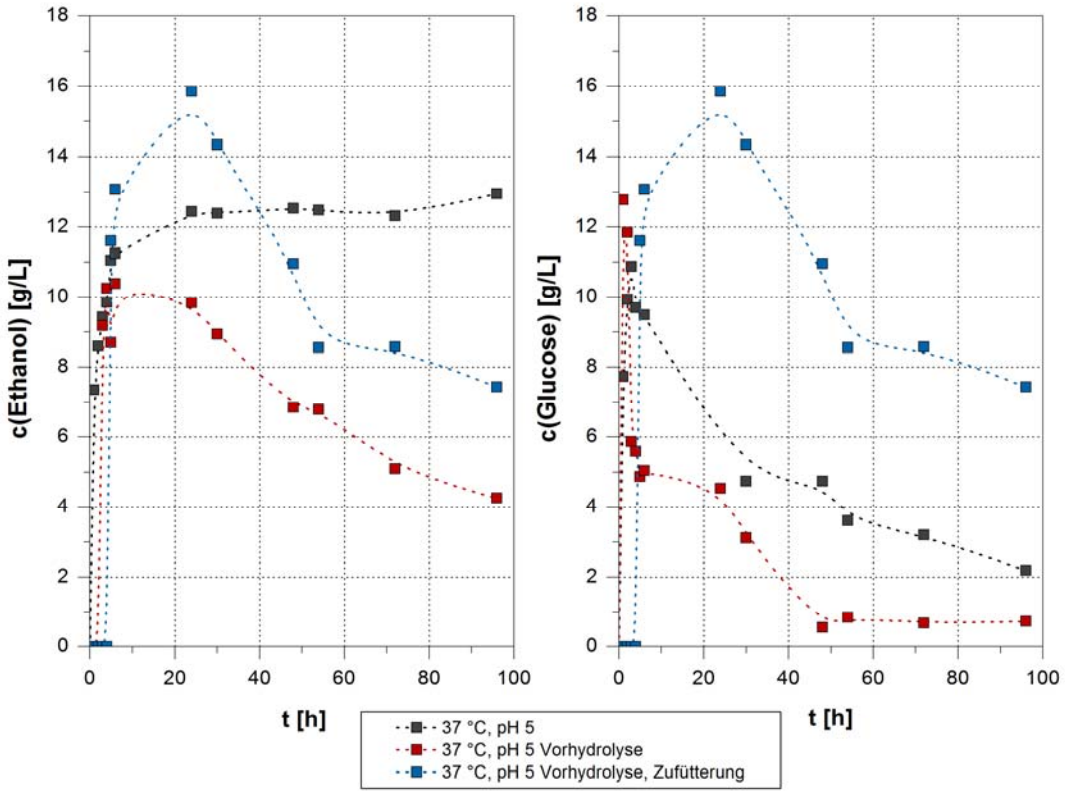


Abb. 1.4.6.2: Einfluss der Vorhydrolyse (2 h bei 50 °C) und einer zweistufigen Dosierung der Substratkonzentration (2 h Vorhydrolyse bei 50 °C, nach 4 h erneute Zugabe von 5 % alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh) auf die Fermentation von 5 % Zellstoff aus dem alkalischem Aufschluss mit 3 % *S. cerevisiae* L13 bei 37 °C und pH 5 (Leitungswasser)

Eine zweistufige Vorhydrolyse bei 50 °C erleichtert zwar die Handhabung, da die Viskosität so schneller sinkt, bringt aber nur geringfügige Verbesserungen. Es ist zu bedenken, dass die Vorhydrolyse bei 50 °C mit dem Abkühlen der viskosen Lösung einhergeht, was einen vergleichsweise hohen Energiebedarf mit sich bringt. Aus ökonomischen Gründen ist somit auf eine Vorhydrolyse zu verzichten. Im Laufe des Prozesses steigt die Ethanol-Konzentration stetig, was inhibierend auf die Cellulasen und die Hefen wirkt. Dadurch kommt es zur Abnahme der Enzymaktivität und zum Absterben der Hefezellen. Durch erneute Zugabe von Enzym bzw. Hefe könnte dieses Problem für einen kurzen Zeitraum gelöst werden. Allerdings ist dieser Zusatz mit erheblichen Mehrkosten verbunden, sodass eine signifikante Steigerung des Umsatzes notwendig ist, um dieses Verfahren zu rechtfertigen. Bei den dazu durchgeführten Untersuchungen wurde nach 5 Stunden Fermentation erneut Enzym oder Hefe bzw. eine Mischung aus Enzym und Hefe zugegeben (Abb. 1.4.6.3).

Durch den Zusatz von Hefe konnte eine fast vollständige Umsetzung des Substrates in Ethanol erreicht werden. Ein Zusatz von dem Enzymkomplex aus *P. verruculosum* konnte nur eine Steigerung des Umsatzes von etwa 15 % erzielen.

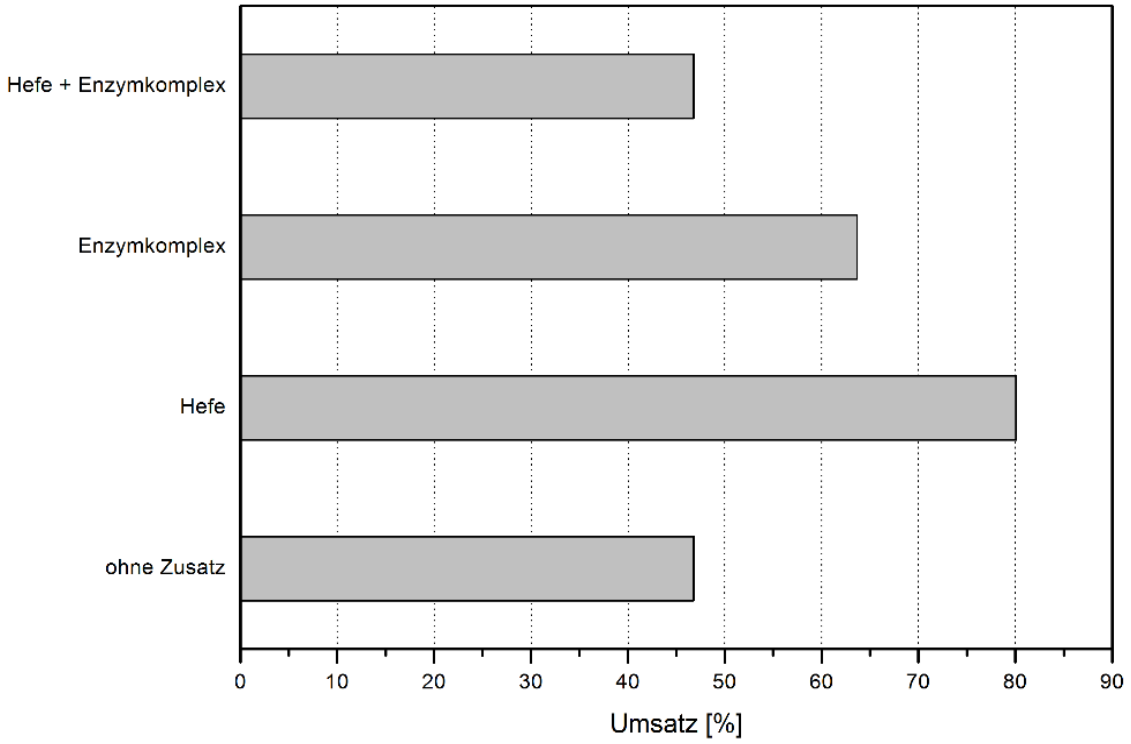


Abb. 1.4.6.3: Einfluss eines Zusatzes von Hefe und von *P. verruculosum*-Cellulase auf die Fermentation nach 72 Stunden bei 37 °C und pH 7.
Die Zugaben erfolgten nach 5 Stunden.

Interessanter Weise kann durch die Zufütterung von Enzym und Hefe keine Steigerung des Umsatzes beobachtet werden. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass infolge eines Nährstoffmangels im Medium die zugesetzten Enzyme utilisiert werden. Dadurch kann es wiederum zum vermehrten Wachstum der Hefezellen kommen, wodurch die Ethanolproduktion gehemmt wird. Die Ergebnisse zeigen somit deutlich, dass hierzu weitergehende Untersuchungen erforderlich sind, um die Stabilität der Enzyme in Verbindung mit der Nachführung von Hefe zu klären.

Einfluss der Substratkonzentration

Zur Verbesserung der Prozessökonomie ist es essentiell eine möglichst hohe Ethanolkonzentration zu erreichen. Um dieses Ziel zu erreichen, muss eine möglichst hohe initiale Feststoffkonzentration gewählt werden. Mit steigender Feststoffkonzentration steigt auch die Konzentration möglicher Inhibitoren, was wiederum einen negativen Einfluss auf den Umsatz haben kann.
Dazu wurden Untersuchungen im Rührkessel (2-7,5 %) und im Feststofffermenter (10-50 %) durchgeführt. Durch Erhöhung der Zellstoffvorlage konnte die erzeugte Ethanolkonzentration auf 103 g/L gesteigert werden (Abb. 1.4.6.4).

Dies geht jedoch mit einer Senkung des Umsatzes sowohl der Fermentation als auch der Hydrolyse einher. Durch die Zunahme der Ethanolkonzentration kommt es zur Inhibierung der Cellulasen und somit zur Beeinträchtigung der enzymatischen Verzuckerung. Außerdem kommt es während des SSF-Prozesses zur Veränderung des Cellulose-Lignin-Verhältnisses von 12,65 zu 0,3.

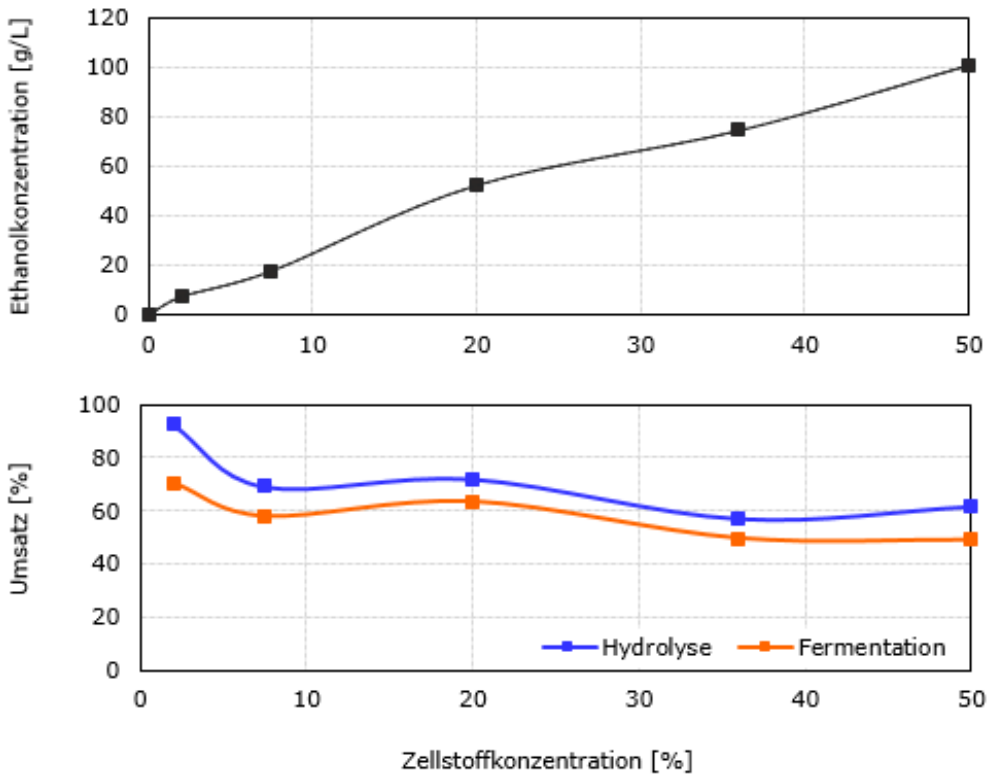


Abb. 1.4.6.4: Einfluss der Zellstoffkonzentration auf die gebildete Ethanolkonzentration (oben) und den Umsatz der Fermentation sowie die Hydrolyse (unten), alle Ethanolkonzentrationen einheitlich nach jeweils 96 h auf Basis von 15 FPU/g bestimmt.

Versuchsbedingungen: 2-50 % alkalisch vorbehandeltes Weizenstroh (30 min, 3 %ige NaOH, 160 °C), 50 mM Citratpuffer pH 5,0;

10 g/L *S. cerevisea*, 15 FPU/g *P. verruculosum*-Cellulase,

1 g/L $MgSO_4 \times 7H_2O$, 1 g/L KH_2PO_4, 2 g/L $(NH_4)_2SO_4$

Eigene Untersuchungen haben gezeigt, dass es ab einem Cellulose-Lignin-Verhältnis von 1 zur Senkung der Hydrolyseffizienz von 50 % kommt. Des Weiteren kommt es zunehmend zur Ausbildung unproduktiver Cellulasen-Lignin-Bindungen, wodurch die zur Verfügung stehende Enzymkonzentration gesenkt wird. Wie bereits erwähnt wurde, geht die Zunahme der Ethanolkonzentration einher mit der Denaturierung der Hefezellen. Vielfach konnte zudem gezeigt werden, dass es mit Zunahme der Zellstoffkonzentration zur Zunahme des osmotischen Stresses der Hefezellen kommt.[39] Trotz dieser negativen Einflüsse konnten 103 g/L Ethanol erzielt werden. Dieses entspricht 0,2 g Ethanol je g Substrat bzw. 0,28 g Ethanol je g Cellulose. Aus der Literatur sind lediglich Maximalwerte von 0,15 g Ethanol je g Substrat bekannt.[40] Höhere Ethanolkonzentrationen konnten nur mit zucker- bzw. stärkehaltigen Substraten erzielt werden.[41,42] Durch eine weitere Optimierung der Prozessparameter ist es denkbar, dass die Hydrolyse- und Fermentationsumsätze gesteigert werden können. Es ist

zum Beispiel denkbar, dass eine *in situ* Produktentfernung durch z.B. Stripping eine Steigerung der Umsätze bewirkt.
Bei allen durchgeführten Fermentationen war ab 24 Stunden Reaktionszeit eine vermehrte Nebenproduktbildung zu beobachten. Insbesondere Glycerol und Essigsäure konnten detektiert werden. Glycerol ist ein Stoffwechselprodukt, welches zur Regeneration von NAD^+ zur Erzeugung von Biomasse gebildet wird. Außerdem dient es zur Senkung des osmotischen Stresses in der Hefezelle.[43] Mit Zunahme der Zellstoffkonzentration konnte eine Zunahme der Glycerol-Konzentration beobachtet werden (Abb. 1.4.6.5). Ähnliche Konzentrationsbereiche wurden auch von Devantier et al.[37] beobachtet. Die freigesetzte Essigsäure-konzentration steigt nur minimal an. Die Bildung von Essigsäure kann aus der Freisetzung der Acetatgruppen der Hemicellulose herrühren. Eine Oxidation von Ethanol zu Essigsäure kann unter den aeroben Versuchsbedingungen nahezu ausgeschlossen werden.

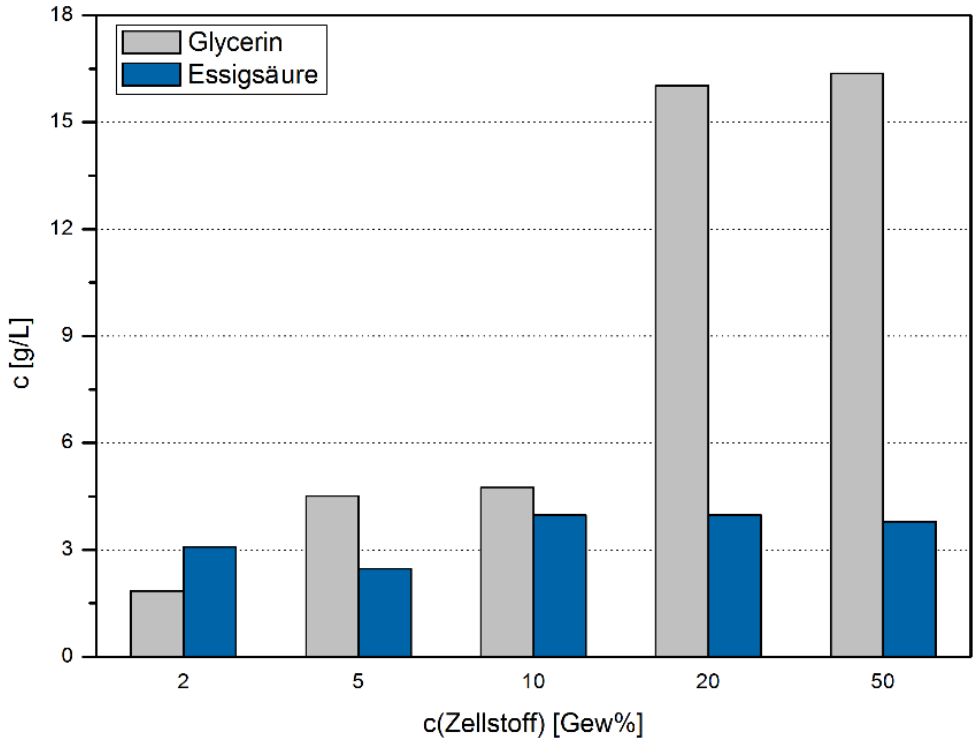


Abb. 1.4.6.5: Abhängigkeit der Nebenproduktbildung von der Zellstoffkonzentration (alkalisch vorbehandeltes Weizenstroh 3%ige NaOH, 160 °C, 30 min)

Nutzung alternativer Stickstoffquellen

In den obenstehenden Untersuchungen wurde Ammoniumsulfat als Stickstoff-quelle eingesetzt. Da Vorversuche gezeigt haben, dass Schlempe eine alternative Stickstoffquelle darstellt, wurde untersucht, inwieweit die selbst erzeugte

Schlempe als Stickstoffquelle geeignet ist. Abb. 1.4.6.6 zeigt, dass keine Veränderung der erzeugten Ethanolkonzentration durch die Verwendung von Schlempe erfolgt.

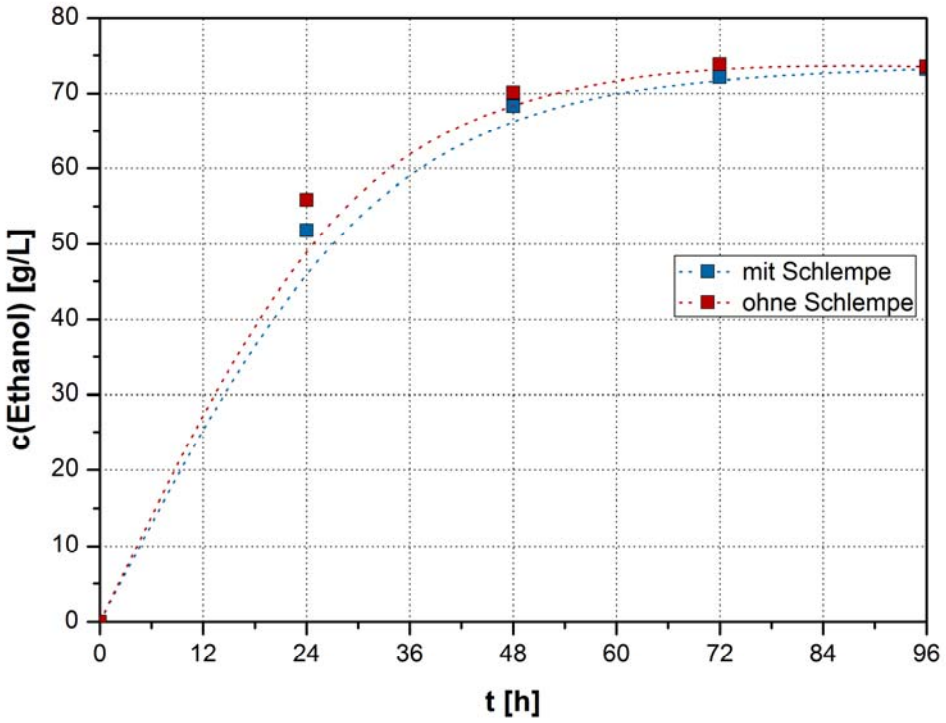


Abb. 1.4.6.6: Fermentation von 36 % alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh (3%ige NaOH, 160 °C, 30 min) mit und ohne Schlempe als Stickstoffquelle bei 37 °C und pH 5,0.

Somit wird deutlich, dass Schlempe als Stickstoffquelle sehr gut geeignet ist. Auf diesem Weg können zum einen Abfallströme vermieden werden („zero-waste-Konzept") und zum anderen Kosten für zusätzliche Chemikalien sowie Wasser gespart werden. Somit ergibt sich ein ökonomischer wie auch ökologischer Vorteil durch diese Verfahrensweise.

Nutzung weiterer Substrate

Analog zu den Untersuchungen zur enzymatischen Hydrolyse wurde neben alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh auch Miscanthus und Luzerne auf ihre Anwendbarkeit im SSF-Prozess untersucht (Abb. 1.4.6.7). Bei allen untersuchten Einjahrespflanzen wird deutlich, dass eine alkalische Vorbehandlung unersetzlich ist. Von den drei unbehandelten Biomassen konnte mit Luzerne der höchste Umsatz erzielt werden. Dieses könnte an dem mit 12,6 % vergleichsweise

geringem Ligningehalt (Weizenstroh 21,7 %; Miscanthus 24,5 %) liegen. Miscanthus weist, wahrscheinlich aufgrund des hohen Ligninanteils, die schlechtesten Umsätze auf. Durch die Vorbehandlung mit Natronlauge konnte der Ligningehalt des Miscanthus auf 0,8 % gesenkt werden, was durch eine deutliche Steigerung der Umsätze widergespiegelt wird. Die vorbehandelten Biomassen Luzerne und Weizenstroh ähneln sich mit in den erzielten Ligningehalten von 5,5 % und 5,8 %.

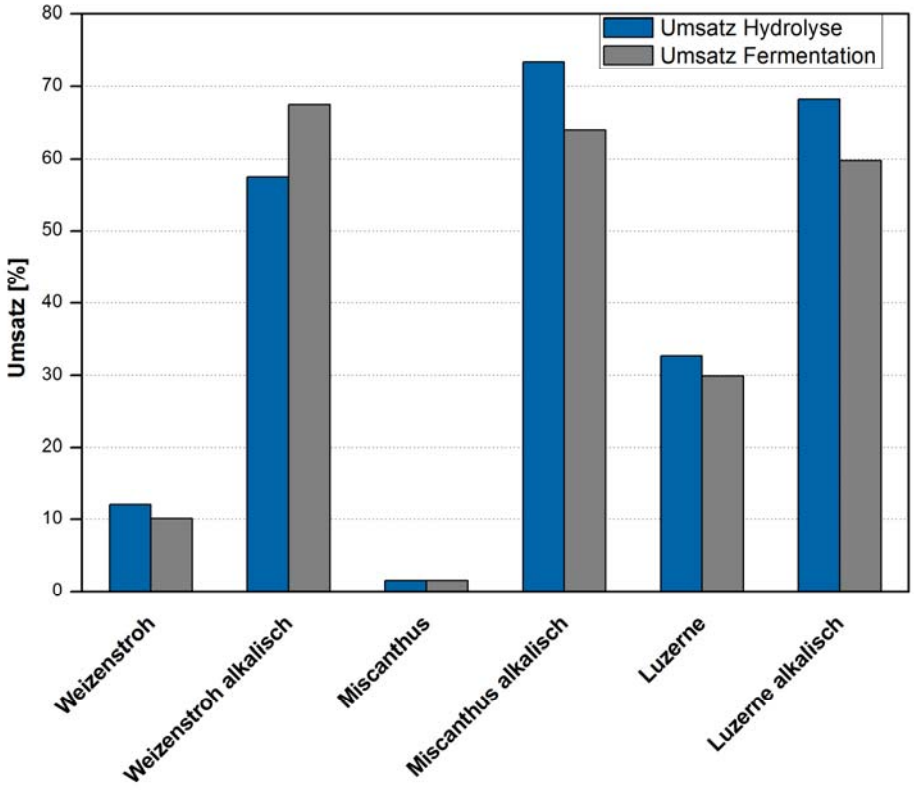


Abb. 1.4.6.7: Gegenüberstellung der Umsätze für Fermentation und Hydrolyse von Einjahrespflanzen

Die durch Fermentation erzielten Ethanol-Konzentrationen liegen zwischen 12 und 15 g/L und unterscheiden sich somit nur geringfügig. Dieses lässt darauf schließen, dass auch Mischsubstrate eingesetzt werden könnten. Dazu sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die jedoch nicht Teil dieses Projektes waren.

Vergleichende Untersuchungen zum SHF-Prozess

In der Literatur werden verschiedene Methoden zur Kombination der Hydrolyse und der Fermentation diskutiert. Um beide Teilprozesse bei den jeweiligen Optima durchführen zu können, bietet sich die separate Hydrolyse und Fermentation (SHF – separate hydrolysis and fermentation) an. Nachteilig am SHF-Prozess ist

jedoch, dass mehrere Reaktoren benötigt werden und es zur Inhibierung der Cellulasen durch Akkumulationen von Glucose und Cellobiose kommen kann.[44]

Untersuchungen zum SHF-Prozess (Abb. 1.4.6.1) haben gezeigt, dass aus 2 % alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh bis zu 8 g/L Ethanol, was einem Umsatz von 95 % entspricht, erreicht werden konnten. Allerdings waren dazu vergleichsweise lange Reaktionszeiten notwendig.

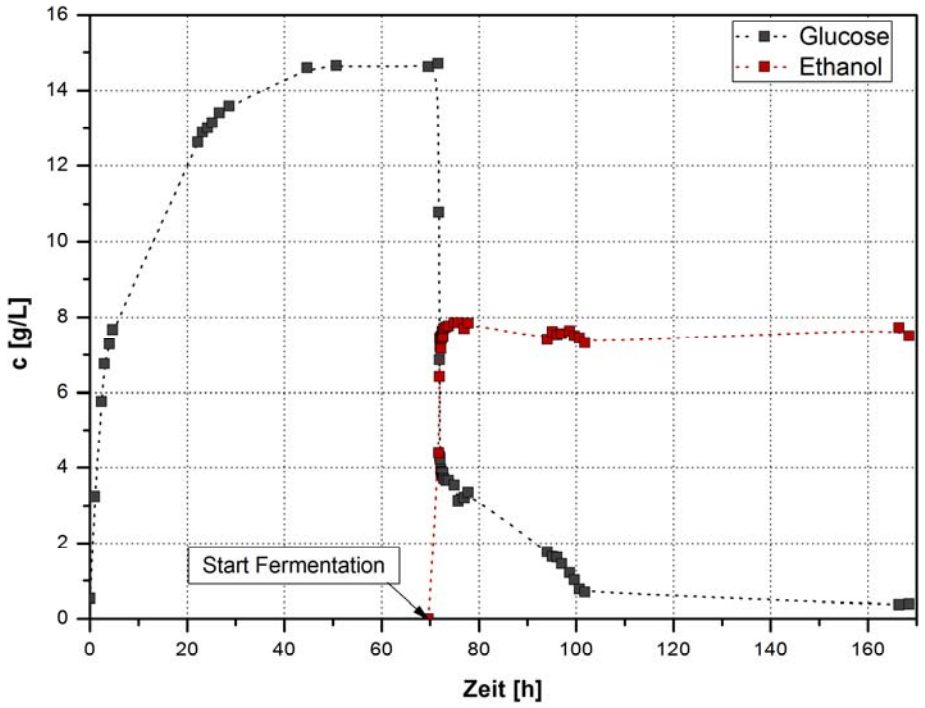


Abb. 1.4.6.8: Konzentrations-Zeit-Diagramm einer separaten Hydrolyse und Fermentation (SHF).

Die enzymatische Hydrolyse erfolgte mit 2 % alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh bei 50 °C, 50 mM Citratpuffer (pH 5,0) mit dem Enzymkomplex aus *P. verruculosum* (15 FPU/g).

Nach 72 Stunden Verzuckerung wurde, nach Abkühlung des Systems auf 37 °C, die Fermentation durch Zugabe von 10 % *S. cerevisiae* gestartet.

Durch die relativ geringe Enzymkonzentration konnte eine nahezu vollständige Verzuckerung erst nach 72 Stunden erreicht werden. Nach Zugabe der Hefezellen konnte innerhalb von 3 Stunden die maximale Ethanolkonzentration erreicht werden. Der nahezu vollständige Verbrauch der Glucosekonzentration konnte erst

nach 28 Stunden Fermentation (100 Stunden Gesamtreaktionszeit) erreicht werden.

Für die Durchführung eines SHF-Prozesses unter den getesteten Bedingungen muss somit eine Reaktionszeit von mindestens 75 Stunden eingeplant werden. Dieses verschlechtert, trotz guten Umsatzes des Substrates, die Wirtschaftlichkeit des Prozesses. Außerdem werden für einen großtechnischen Prozess zwei Reaktoren benötigt werden.

1.4.7 Vergleich der verschiedenen Aufschlussverfahren hinsichtlich der Lignocellulosekonvertierung zu Ethanol (SIAB/UL)

Ethanolerträge unter variierter Zellstoffart im SSF-Prozess

In einer Serie von Fermentationen wurde im Labormaßstab die Hydrolyse der Zellstoffe aus zwei Aufschlussverfahren sowie deren Umsetzung zu Ethanol untersucht. Aus Voruntersuchungen konnte bereits eine geeignete Cellulasebeladung abgeleitet werden, die sich auf 50 IU/gTS belief und in der Versuchsreihe eingesetzt wurde.

Die simultane Verzuckerung und Fermentation der Zellstoffe wurde unter ansonsten gleichen Bedingungen in einem 2 L-Rührreaktor getestet (Tab. 1.4.7.1).

Tab. 1.4.7.1: Parameter der Versuche im Labormaßstab zur Verzuckerung und Vergärung der Zellstoffe aus alkalischem und NP-Aufschluss

Arbeitsvolumen	1 700 ml
Enzymbeladung (FPA/g Trockenmasse)	50
Hefekonzentration (g/L Trockenhefe)	5
Zellstoffmenge (g/L)	50, 75, 100 (nur alkalischer Zellstoff.)
NH_4 Cl (g/L)	2
KH_2PO_4 (g/L)	1
pH	5
Temperatur	35 °C
Versuchszeit	~ 72 h
Vorhydrolyse (45 °C)	6 h; 8 h bei 100 g/L Zellstoff

Variiert wurde die Menge der eingesetzten Zellstoffe (50, 75 und 100 g/L). Weiterhin wurde überprüft, ob ein Vorhydrolyseschritt neben prozesstechnischen Vorteilen auch einen positiven Einfluss auf die Ethanolausbeute hat.

Abbildung 1.4.7.1 dokumentiert die Ethanolbildung der Fermentationen mit 50 g/L Substratvorlage, die sich nach 4 bis 5 Stunden Kultivierungsdauer auf 9,8 g/L unter Verwendung des alkalischen Zellstoffes und auf 3,6 g/L für den NP-Zellstoff belief. Der maximale Ethanolgehalt im Falle des alkalischen Zellstoffes wird mit einem Wert von 11,4 g/L nach 30h Fermentationsdauer erreicht, wobei zeitgleich für die NP-Charge 15 g/L und zu Versuchsende nach 72 Stunden 17,7 g/L erzielt werden konnten. Die Geschwindigkeit der Ethanolbildung auf der Basis des Zellstoffs aus dem NP-Aufschluss wird unter diesen Bedingungen von der langsamen Zellstoff-hydrolyse bestimmt (siehe Ergebnisse in Abb. 1.4.3.1).

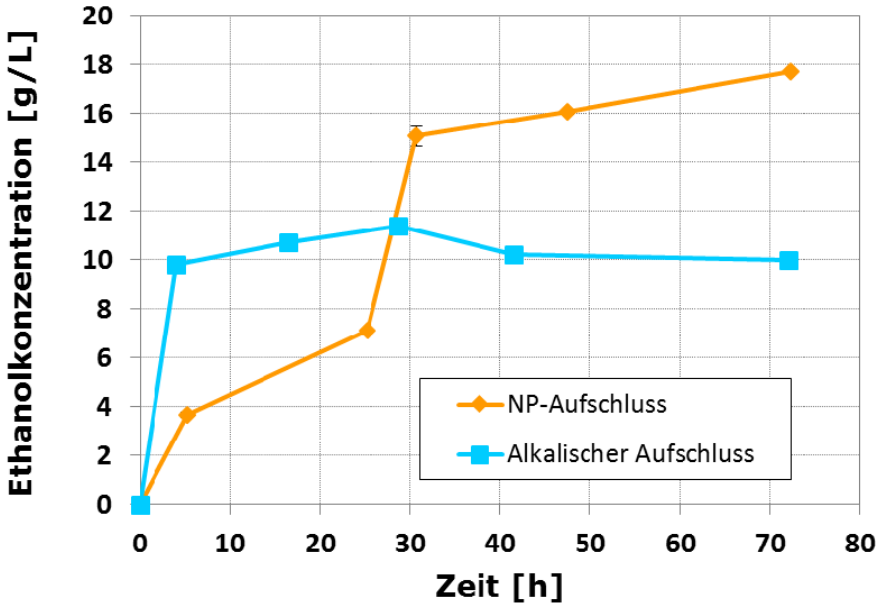


Abb. 1.4.7.1: Ethanolbildung im SSF-Prozess bei Einsatz von 50 g/L Zellstoff aus NP und alkalischem Aufschluss

Eine Erhöhung des Feststoffanteils auf 75 bzw. 100 g/L konnte durch die Einführung eines Vorhydrolyseschrittes realisiert werden.

Praktisch wurde der Versuch so aufgebaut, dass nach einer Vorhydrolyse von 6 bzw. 8 Stunden bei 45 °C die Temperatur auf 35 °C abgesenkt und Trockenhefe dem Reaktor zugeführt wurde.

Der Vergleich der Kurven der Abbildungen 1.4.7.1 und 1.4.7.2 verdeutlicht, dass die Vorhydrolyse einen besonders starken Einfluss auf die Fermentationsphase des Zellstoffes aus dem NP-Prozess hatte. Die Ethanolkonzentrationen beider Zellstoffarten liegen nach einer Vorhydrolyse in den ersten Stunden der Fermentationsphase praktisch übereinander.

Da das Glucosebildungspotential des NP-Zellstoffes größer ist (vgl. Ergebnisse in 1.4.3) und die Vorhydrolyse die verzögerte Verzuckerung kompensieren konnte, wurde mit diesem Hydrolysat nach 14 Stunden ca. 27 % mehr Ethanol pro eingesetztem Zellstoff gebildet als beim vergleichbaren Versuch mit alkalisch vorbehandeltem Rohstoff.

Bei Betrachtung der Ethanolausbeute der verschiedenen Versuche kann festgestellt werden, dass die maximal erreichbaren Erträge beim Zellstoff aus dem NP-Aufschluss durch die vorangestellte Vorhydrolyse nicht beeinflusst werden (Abb. 1.4.7.3). Die Ausbeute pro eingesetzten Zellstoff liegt bei beiden Versuchen bei ca. 65 %. Gemessen an der enthaltenen Cellulose beträgt der Wert über 80 %.

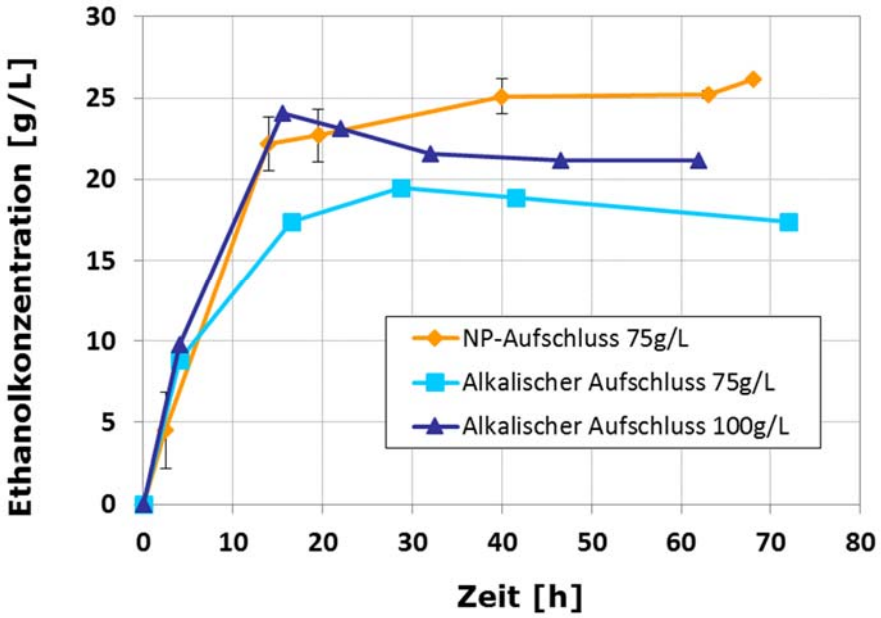
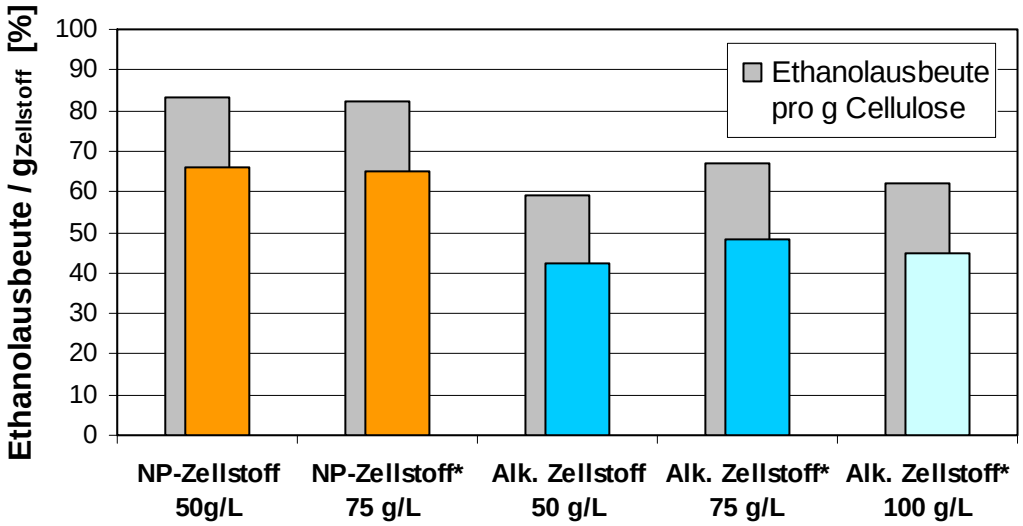


Abb. 1.4.7.2: Ethanolbildung im SSF-Prozess mit vorangestellter Vorhydrolyse bei Einsatz von 75 und 100 g/L Zellstoff aus NP und alkalischem Aufschluss (6 h Vorhydrolyse bei 75 g/L Zellstoff; 8h Vorhydrolyse bei 100 g/L Zellstoff)

Der substratbezogene Ethanolertrag des Zellstoffes aus dem alkalischen Aufschluss steigt durch die vorangesetzte Hydrolyse von 42 % auf 48 % pro eingesetzten Zellstoff sowie von 59 % bis 67 % bezüglich der Cellulosekonzentration. Die Stagnation der Ethanolausbeute bei der Substratvorlage von 100 g/L kann einerseits durch die sehr stark angestiegene Viskosität im Reaktor und damit verbundene schlechtere Durchmischbarkeit und anderserseits durch den steigenden Einfluss von Störkomponenten auf die Stoffwechselaktivität der Hefen erklärt werden.

Die Einführung einer Vorhydrolysestufe löst das Problem der Durchmischbarkeit während des SSF-Prozesses bis zu einer Zellstoffvorlage von 100 g/L. Ab dieser Substratkonzentration ist eine andere Rührergeometrie notwendig, um eine hinreichende Durchmischung und eine damit verbundenene gute Hydrolyse zu erreichen.



* mit Vorhydrolyse

Abb. 1.4.7.3: Ethanolausbeute im SSF-Prozess mit Zellstoff aus alkalischem und NP-Aufschluss

Im direkten Vergleich beider Zellstoffvarianten ergibt sich im SSF-Prozess ein insgesamt höherer Ethanolertrag beim NP-Zellstoff. Ohne Vorhydrolyse werden ökonomisch relevante Ethanolkonzentration mit Zellstoff aus dem NP-Verfahren erst nach 30 bis 50 Stunden Fermentationszeit erreicht, während eine vorgeschaltete Hydrolyse bereits nach 15 bis 20 Stunden zu einem deutlich gesteigerten Ethanoltiter führt. Der Zellstoff aus dem alkalischen Aufschluss weist auch ohne Vorhydrolyse eine schnelle Umsetzung auf. Die maximal erreichbaren Ethanolgehalte sind aber geringer als beim NP-Zellstoff.

1.4.8 Scale-up des SSF-Prozesses am Beispiel der Ethanolgewinnung (TU BAF, SIAB/UL)

In einem 220 L Edelstahl Rührkessel mit Ankerrührer wurde am Fraunhofer-Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse (CBP) in Leuna ein SSF-Prozess durchgeführt. Als Substrat wurde 100 g/L Zellstoff aus dem Scale-up des alkalischen Aufschlusses eingesetzt. Aufgrund der hohen Viskosität und der damit verbundenen schlechten Mischbarkeit wurde das Substrat zweistufig zugeführt. Aus diesem Grund erfolgte zunächst eine Vorhydrolyse des Zellstoffes mit dem Enzymkomplex aus *P. verruculosum* (50 FPU/g) bei 45 °C. Danach folgte eine Zugabe des restlichen Substrates und mit Zugabe der Hefe (7,5 g/L *S. cerevisiae*) wurde die Fermentation gestartet. Die Fermentation wurde bei 37 °C und pH 4,5-5,5 durchgeführt. Aufgrund der hohen Viskosität der Reaktionslösung war eine Regelung der Temperatur und des pH-Wertes sehr schwierig. Es ist nicht auszuschließen, dass es lokal zur starken Übersteuerung der Reaktionsparameter gekommen ist, was zu einer Inaktivierung der Cellulasen sowie Hefen geführt haben kann.

Trotz dessen konnte eine Ethanolkonzentration von 30 g/L erreicht werden, die unterhalb des theoretisch möglichen Ethanolgehaltes von w = 4 % verblieb und vermutlich auf die relativ schlechte Umwälzung der Suspension zurückzuführen war. Insbesondere zu Beginn der Reaktion konnte die Lösung nur sehr schlecht gerührt werden. Durch andere Reaktor- und Rührergeometrien kann das Problem wahrscheinlich behoben werden. Außerdem muss beachtet werden, dass eine Übertragung der Laborversuche in den Technikumsmaßstab zu Beginn von Untersuchungen zum Scale-up in der Regel mit Einbußen im Umsatz verbunden sind. Durch den SSF-Prozess im Technikumsmaßstab konnten somit 74 % des Celluloseanteils des Zellstoffes in Ethanol umgesetzt werden. In Abb. 1.4.8.1 wird deutlich, dass bereits nach 24 Stunden Reaktionszeit die maximale Ethanolkonzentration erreicht wurde. Wie bereits in Laborversuchen beobachtet, beginnt ab 24 Stunden vermehrt die Bildung von Nebenprodukten wie Essigsäure und Glycerin. Die Glycerinkonzentration belief sich während des gesamten Prozesses auf 4 - 5 g/L und war somit geringer als in den Laborversuchen. Während des Versuchs kam es innerhalb der ersten 5 Stunden zur rapiden Abnahme der Enzymaktivtäten. Danach blieben die Aktivitäten auf einem konstanten Niveau. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der SSF-Prozess nach 24 Stunden abgebrochen werden kann. So kann zum einen die maximale Ethanolkonzentration erzielt werden und zum anderen liegt nur eine geringe Konzentration an Nebenprodukten vor.

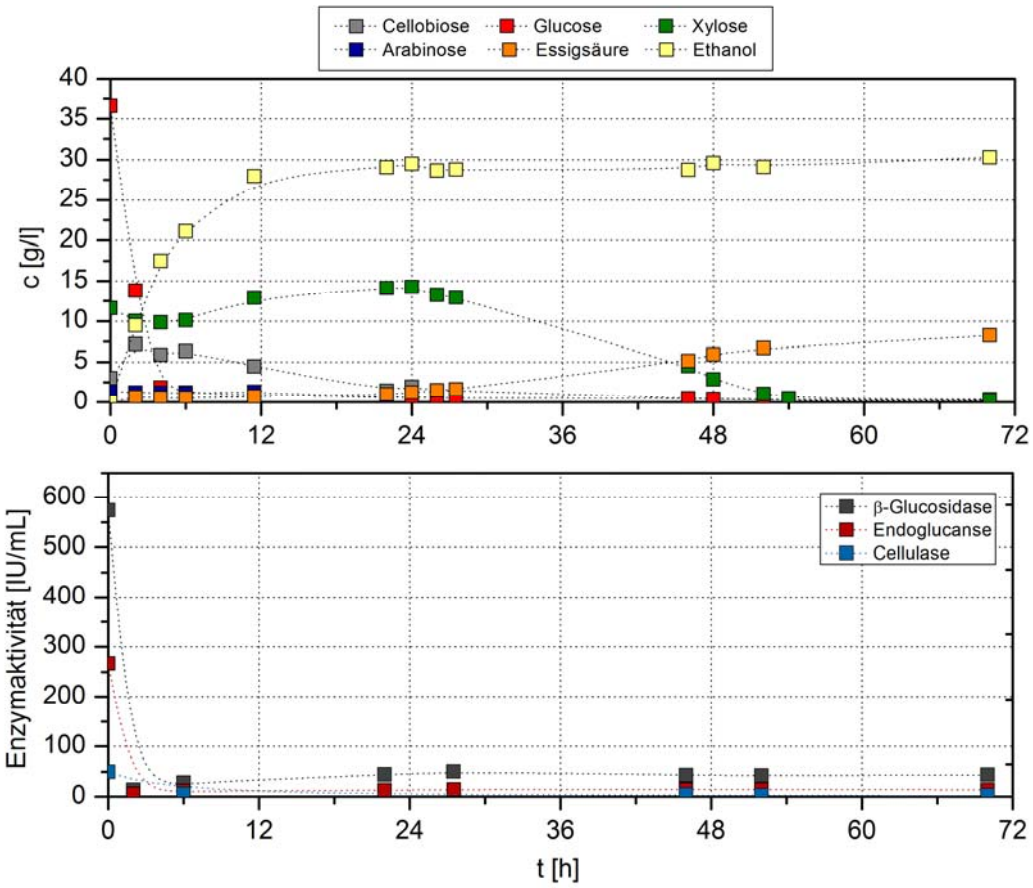


Abb. 1.4.8.1: Ergebnis der Fermentation von 100 g/L alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh im 220 L Reaktor.

Oben: Stoffkonzentrationen in Abhängigkeit der Zeit im Versuchsverlauf.
Unten: Veränderung der Enzymaktivtäten im technischen SSF-Prozess

1.4.9 Herstellung höherer Alkohole aus Lignocellulosehydrolysaten (TU BAF)

Neben Ethanol können aus den in den Lignocellulosehydrolysaten enthaltenen Zuckern noch weitere Alkohole produziert werden. Insbesondere durch gentechnisch veränderten Hefen ist es in der Vergangenheit gelungen höhere Alkohole wie Butanole und Pentanole zu synthetisieren. In diese Richtung wurden bereits umfassende Untersuchungen durch verschiedene Arbeitskreise getätigt, die zum Teil bereits patentiert worden sind. Aus diesem Grund wurden in diese Richtung keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Wesentlich vielversprechender erschien die Synthese von 2-Phenylethanol. Dieser Alkohol weist einen rosenartigen Geruch auf, weshalb er vielfach in der Kosmetik- und Parfümindustrie als Duftstoff eingesetzt wird. Daneben findet 2-Phenylethanol Einsatz in der Lebensmittelindustrie. Jährlich werden bis zu 7.000 Tonnen

2-Phenylethanol aus den fossilen Rohstoffen Benzen und Ethylenoxid hergestellt.[45] Nachteilig an dieser chemischen Synthese sind zum einen der Verbrauch fossiler Rohstoffe und zum anderen die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten, was die Aufarbeitung des Produktes erschwert und die Produktionskosten erhöht. Aus diesem Grund sind alternative Synthesewege gefragt. Eine Möglichkeit ist die biotechnologische Produktion aus der Aminosäure Phenylalanin. In einer Vielzahl von Veröffentlichungen wurde beschrieben, dass Hefen in der Lage sind via Ehrlich-Weg aus L-Phenylalanin 2-Phenylethanol herzustellen. Als für diese Reaktion notwendige C-Quelle können dazu Lignocellulosehydroylsate dienen. Im Rahmen des Projektes wurde untersucht, inwieweit die Hydroylsate aus alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh zur Produktion von 2-Phenylethanol geeignet sind.

Im Vergleich zu bekannten Veröffentlichungen wurde nicht L-Phenylalanin sondern das racemische Gemisch DL-Phenylalanin eingesetzt. Auf diesem Weg konnten bis zu 5 g/L 2-Phenylethanol produziert werden. 2-Phenylethanol ist ein vergleichsweise starker Inhibitor gegenüber *S. cerevisiae*. Aus der Literatur ist bekannt, dass ab einer Konzentration von 5 g/L sowohl eine Hemmung des Wachstums der Hefen als auch eine Senkung der 2-Phenylethanolproduktion eintritt.[46] Somit ist die auf den ersten Blick gering erscheinende 2-Phenylethanol-konzentration von 5 g/L als sehr positiv zu bewerten. Eine Steigerung der 2-Phenylethanol-Konzentration kann durch eine Verbesserung der Reaktionsführung erreicht werden. Da die Löslichkeit von 2-Phenylethanol in wässrigen Lösungen nur sehr gering ist, kann durch ein Zweiphasensystem 2-Phenylethanol aus der Lösung entfernt werden. Allerdings sind Hefen nur eingeschränkt stabil gegenüber organischen Lösungsmitteln. Daher müssten hier noch weiterreichende Untersuchungen durchgeführt werden, die aber nicht Teil des Projektes waren.

1.5 Charakterisierung und Modifikation von Lignin (TU BAF, TUD)

1.5.1 Chemische Charakterisierung (TU Dresden, TU BAF-WUR)

Um die Reinheit der gefällten Lignine zu untersuchen, wurde der Klason-Lignin Gehalt bestimmt. Das Lignin aus dem Natural Pulping-Prozess weist eine höhere Reinheit (80 % Klason-Lignin) auf als das aus dem alkalischen Aufschluss (70 % Klason-Lignin, siehe Tab. 1.5.1.1).

Die aus beiden Aufschlüssen erhaltenen Lignine wurden zunächst chemisch charakterisiert. Dabei wurde der Gehalt an funktionellen Gruppen (aliphatische und phenolische OH-Gruppen, Carbonylgruppen, Methoxylgruppen und Carboxyl-gruppen) nasschemisch und spektroskopisch ermittelt. Die Gehalte der funktionellen Gruppen im alkalischen sowie im NP-Lignin sind in der Tab. **1.5.1.1** zusammengefasst.

Die Spannweite der Werte kommt durch die unterschiedlichen Aufschlussparameter zustande. Diese haben einen nicht unerheblichen Einfluss auf die funktionellen Gruppen. Dies zeigt sich insbesondere bei Variation der Konzentration des eingesetzten Natriumhydroxids beim alkalischen Aufschluss (AP) und der Ameisensäure beim Natural Pulping (NP). Die Abb. **1.5.1.1** soll diesen Einfluss verdeutlichen.

Tab. 1.5.1.1: Ausbeute, Zusammensetzung und Gehalt an funktionellen Gruppen der NP- und AP-Lignine

Auf-schluss	Aus-beute[1] [%]	Zusammen-setzung in [%]		funktionelle Gruppen in [mmol/g]				
		Lignin	Asche	$OH_{aliphat}$	OH_{phenol}	COOH	CO	OCH_3
NP	ca. 10	76-86	0-5	3,4-5,5	0,7-1,4	1,0-1,6	1,1-2,5	1,7-3,4
AP	ca. 20	57-73	0-6	3,2-6,7	1,1-2,8	1,3-2,1	0,6-1,3	3,0-4,3

[1] Fällprodukt bezogen auf Weizenstroh

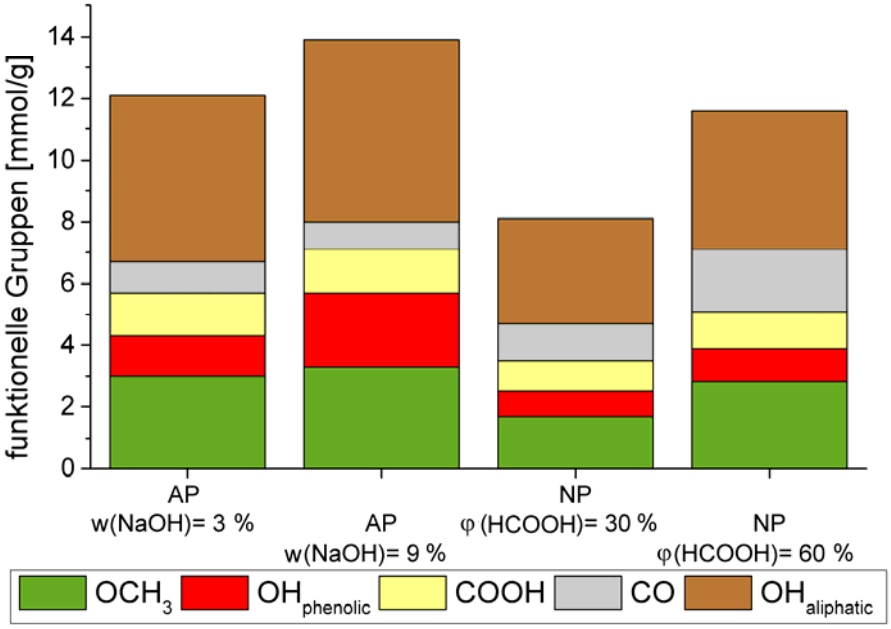


Abb. 1.5.1.1: Gehalt an funktionellen Gruppen der NP- und AP-Lignine bei unterschiedlichen Konzentrationen des Aufschlussmediums

Das Alkalilignin ist im Vergleich zum NP-Lignin reich an phenolischen Hydroxylgruppen. Dies ist durch die Spaltung der β-O-4-Bindung erklärbar, welche durch eine Erhöhung der Konzentration an Natriumhydroxid noch weiter verstärkt

wird. Es handelt sich somit um ein relativ reaktives Lignin, dessen Testung für Vernetzungsreaktionen interessant ist.

Ein weiterer Unterschied zwischen den untersuchten Ligninen wird anhand des Gehaltes an Carbonylgruppen deutlich. Auch wenn eine alkalische Behandlung die Bildung von Carbonylgruppen fördert, ist der oxidierende Effekt des beim NP-Aufschluss eingesetzten Wasserstoffperoxids ausgeprägter. Daher wurden bei den NP-Ligninen höhere Carbonylgehalte bestimmt. Da das NP-Lignin einen geringen Gehalt an phenolischen Hydroxyl- und an Methoxygruppen aufweist, ist anzunehmen, dass es zudem stärker kondensiert ist, als das alkalische Lignin. In dem hohen Gehalt an aliphatischen Hydroxylgruppen beim AP-Lignin spiegelt sich die stärkere Verunreinigung durch Polysaccharide wider.

Neben dem Einfluss der Aufschlussparameter auf die funktionellen Gruppen der erhaltenen Lignine wurde auch der Einfluss verschiedener Fällmethoden untersucht. Abb. 1.5.1.2: zeigt die Gehalte an funktionellen Gruppen der Lignine nach Fällung bei pH = 1 oder pH = 3. Es ist ersichtlich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Ligninen vorliegt. Die molare Masse bleibt ebenfalls unbeeinflusst. Vorteil einer Fällung bei niedrigem pH-Wert ist jedoch, dass eine höhere Ausbeute erzielt werden kann.

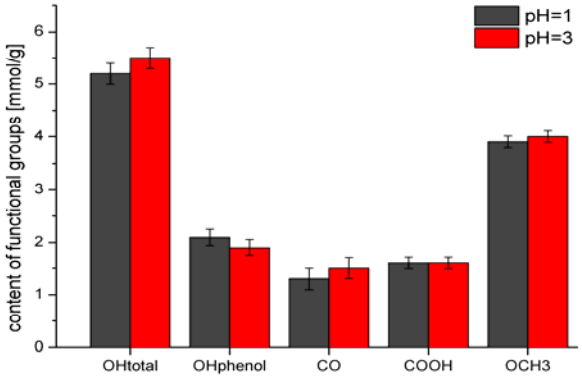


Abb. 1.5.1.2: Gehalt an funktionellen Gruppen nach Fällung bei pH= 1 und pH= 3

Neben den diskutierten Analysemethoden wurde an der Universität Wageningen mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) die von den Projektpartnern SIAB/UL und TU Dresden isolierten Lignine auf ihre Molmassen hin untersucht. Erwartungsgemäß wurden große Unterschiede zwischen den mittleren Molmassen der mit verschiedenen Vorbehandlungsmethoden hergestellten Lignine festgestellt. Die mittleren Molmassen des alkalisch vorbehandelten Weizenstroh-lignins variieren von 3.300 bis 6.100 g/mol. Bereits kleine Veränderungen der Parameter der Vorbehandlung haben demnach große Auswirkungen auf die

Molmassen. Auch hier ist die Konzentration der eingesetzten Natriumhydroxidlösung maßgeblich. Die Erhöhung der Konzentration der eingesetzten Natronlauge von 3 % auf 9 % führt zu einer Abnahme der molaren Masse von 5.900 auf 3.700 g/mol.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Lignine aus dem Natural Pulping-Prozess größere Molmassen aufweisen. Auch die Methode zur Isolierung des Lignins hat einen großen Einfluss auf die molare Masse und somit auf die Qualität des Lignins.

Mittels FT-IR und ^{31}P-NMR-Spektroskopie erfolgte eine chemische Charakterisierung der gewonnenen Lignine. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich das Guaiacyl-Syringyl-Verhältnis bei allen Proben zwischen 1 und 1,2 befand. Somit weisen die gewonnenen Lignine eine relativ homogene Struktur auf. Das Verhältnis von aliphatischen OH-Gruppen zu Syringyl-Einheiten variiert jedoch stark.

Für weitere Untersuchungen war es essentiell, ein Lösungsmittelsystem zu etablieren, in dem sich die Lignine ohne große strukturelle Veränderungen lösen. Ein Gemisch aus Aceton-Wasser im Verhältnis 1:1 (v/v) hat sich für diese Zwecke als sehr geeignet erwiesen und wurde für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

Im Rahmen des Projektes wurden insgesamt 56 Ligninproben, welche aus Weizenstroh auf verschiedenen Wegen isoliert wurden, charakterisiert. Die Lignine wurden extrahiert durch (i) Vorbehandlung von Weizenstroh mit 3%iger NaOH für 3 h bei 160 °C und 6 bar und anschließende Fällung bei pH ~ 1 mit HCl (TU Dresden; im Folgenden als LAW bezeichnet), (ii) Natural Pulping Prozess (Universität Leipzig; im Folgenden als NPL bezeichnet) und (iii) Lösungsmittelextraktion (LNEG Portugal). Die Proben wurden mittels Größenausschlusschromatographie und verschiedener spektroskopischer Methoden hinsichtlich ihrer Molekülmassenverteilungen sowie struktureller und chemischer Eigenschaften umfangreich charakterisiert.

Molmassenverteilungen

Zur Bestimmung der Molmassenverteilung wurden die Ligninproben (1 g/L) in 0,5 M NaOH gelöst und anschließend per Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) vermessen. Als stationäre Phase diente Ethylenglycolmethacrylat Copolymer TSK Gel Toyopearl HW-55F und als mobile Phase wurde 0,5 M NaOH mit einem Fluss von 1 mL/min verwand. Die Detektion erfolgte mittels UV- (280 nm) sowie RI-Detektor. Eine Kalibrierung wurde mittels Polystyren-Standards im Bereich von 891 bis 1,02 x 10^6 Da durchgeführt.
Alle LAW-Proben waren vollständig in 0,5 M NaOH löslich, wohingegen die NPL-Proben nur teilweise löslich waren. Die ermittelten Molekülmassen sowie

Polydispersitäten entsprechen somit nur dem gelösten Anteil, was etwa 25 % des Materials entspricht. Die ermittelten Molekülmassen und der daraus resultierende Polydispersitätsindex (M_w/M_n) sind in der Abb. 1.5.1.3 dargestellt. Signifikante Unterschiede bei der mittleren Molmassenverteilung konnten insbesondere bei dem Lignin, welches durch alkalische Vorbehandlung gewonnen wurde, festgestellt werden. Das Massenmittel (M_w) variiert von 3.300 Da bis zu 10.600 Da. Somit wird deutlich, dass bereits kleine Veränderungen der Aufschlussparameter einen erheblichen Einfluss auf die Molmassenverteilung der isolierten Lignine haben.

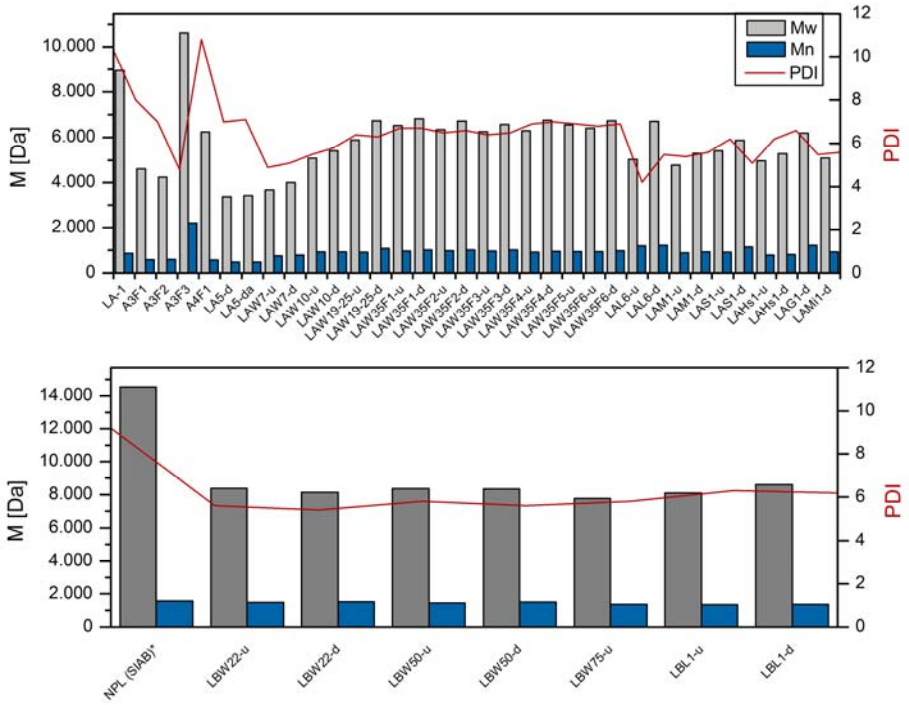


Abb. 1.5.1.3: Einfluss der Vorbehandlung auf die Molekülmassenverteilung sowie auf den Polydisperistätsindex (PDI). Oben: alkalische Vorbehandlung; Unten: Natural Pulping Prozess

Das in NaOH lösliche NP-Lignin zeigt ein wesentlich höheres Massenmittel (M_w) sowie Zahlenmittel (M_n) als das Alkali-Lignin auf. Das deutet darauf hin, dass der NaOH-unlösliche Teil, was bis zu 75 % des Materials ausmacht, eine höhere Molekülmasse und eventuell eine andere Zusammensetzung und Struktur aufweist. Auffällig ist zudem, dass bei den meisten Proben vergleichsweise hohe Polydispersitäten vorliegen.

Charakterisierung mittels FT-IR-Spektroskopie

Alle untersuchten Lignine zeigen ein breites Signal im Bereich von 3.300 cm^{-1} bis 3.460 cm^{-1}, was sowohl für phenolische als auch aliphatische OH-Gruppen spricht.

Des Weiteren konnten Banden im Bereich von 2.928 bis 2.850 cm^{-1} detektiert werden, die durch C-H-Streckschwingungen in aromatischen Methoxy-Gruppen sowie in Methyl- und Methylen-Seitenketten hervorgerufen werden. In der Carbonyl-/Carboxylregion (1.709 cm^{-1}) konnten nur schwache bis mittlere Banden detektiert werden. Diese stammen von unkonjugierten Carbonyl- und Carboxyl-Streckschwingungen. Bei allen Proben wurden aromatische Gerüstschwingungen bei 1.600, 1.512 und 1.424 cm^{-1} sowie C-H-Deformationsschwingungen kombiniert mit Schwingungen des aromatischen Rings bei 1.454 cm^{-1} detektiert. Die Intensität der Banden variiert jedoch von Probe zu Probe. Die Auswertung der Banden unter 1.400 cm^{-1} ist aufgrund der Komplexität der Ligninstruktur sehr schwierig. Es konnten jedoch charakteristische Banden für Monolingol-Einheiten wiedergefunden werden. So konnten zum Beispiel in allen Spektren die charakteristischen Banden der Guaiacyl-Einheit (1.265 cm^{-1}: G-Ring und C=O Streckschwingung; 1.115 cm^{-1}: CH-Deformationsschwingung (in-plane); 826 und 916 cm^{-1}: C–H-Schwingung (out-of-plane) in 2., 5. und 6. Position der Guaiacyl-Einheit) detektiert werden, jedoch mit unterschiedlichen Intensitäten. Neben Guaiacyl- wurden auch Syringyl-Einheiten identifiziert und ferner auch Polysaccharide (1.000-1.300 cm^{-1}) neben den aromatischen Strukturen.

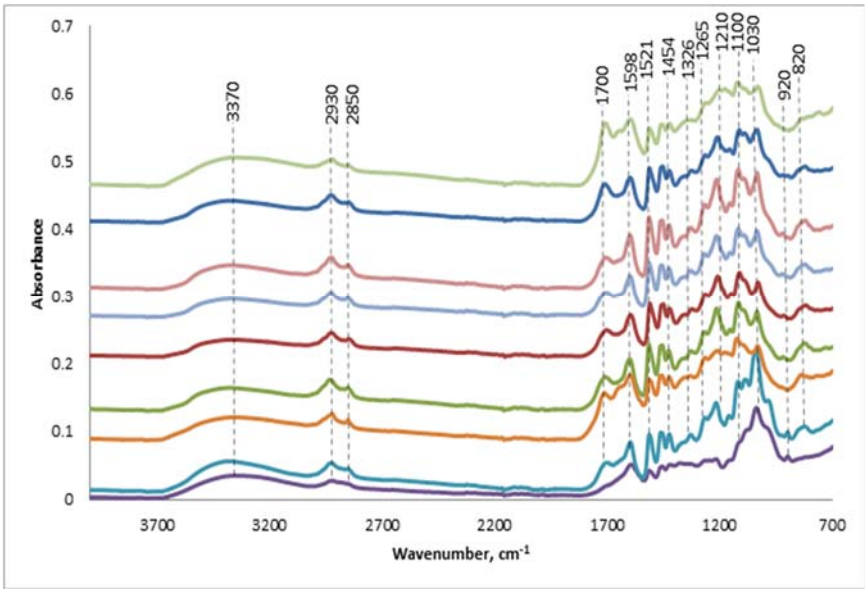


Abb. 1.5.1.4: FT-IR-Spektren der Lignine aus alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh

Mittels der FT-IR-Spektren kann neben einer Qualifizierung auch eine Quantifizierung der Proben erfolgen. Dazu wurde das Verhältnis der Intensitäten der Peaks bei 1.598 cm^{-1} (Syringyl), 1.512 cm^{-1} (Guaiacyl), 1.030 cm^{-1} (Guaiacyl und Kohlenhydrate) und 1.706 cm^{-1} (Carboxyl) wie folgt berechnet:

Guaiacyl/Syringyl (G/S): I_{1512}/I_{1598}

Guaiacyl + Kohlenhydrat, primär OH ((G+Carb, P-OH)/S): I_{1030}/I_{1598}

Carboxyl/Syringyl (Carboxyl/S): I_{1706}/I_{1598}

Die dadurch erzielten Ergebnisse können der Tab. 1.5.1.2 entnommen werden. Alle Alkali-Lignin-Proben (außer A3F3) zeigen eine G/S-Verhältnis von größer 1 (1,1-1,2) auf. Probe A3F3 und alle NP-Lignine haben ein G/S-Verhältnis von 0,82 bis 0,94. Dies sind typische Werte für Lignine aus Gräsern und Stroh.[47]

Tab. 1.5.1.2: Chemische Zusammensetzung von Weizenstrohlignin ermittelt aus FT-IR-Spektren. Grau: Alkali-Lignine; weiß: NP-Lignine

Lignin-Probe	G/S	Carboxyl/S	(G +Kohlenhydrat, P-OH)/S	Kohlenhydrat, P-OH/S
LA-1	1,17	0,87	1,92	0,75
A3F1	1,22	0,70	1,68	0,46
A3F2	1,23	0,69	1,80	0,57
A3F3	0,82	0,39	2,58	1,76
A4F1	1,13	0,65	2,59	1,46
LA5-d	1,17	0,65	1,94	0,77
LA5-da	1,11	0,64	1,98	0,87
NPL-d	0,94	0,74	1,42	0,48
NPL (SIAB)	0,89	0,51	1,44	0,55

Das Carboxyl/S-Verhältnis variiert in einem breiten Bereich von 0,39 bis 0,87. Zu beachten ist dabei, dass sich die Carboxyl-Komponente (Peak 1.706 cm^{-1}) aus verschiedenen funktionellen Gruppen wie Carboxyl- und Esterbindungen zusammensetzt. Auch das Kohlenhydrat, primär-OH/S-Verhältnis variiert stark.

^{31}P-NMR-Analysen

Zur ^{31}P-NMR-Analyse war zunächst eine Derivatisierung der Ligninproben mit 2-Chlor-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholan notwendig. Durch diese Methode können aromatische wie auch aliphatische OH-Gruppen identifiziert werden. In allen Lignin-Proben konnten aliphatische und aromatische OH-Gruppen sowie Carboxylgruppen identifiziert werden. Aliphatische OH-Gruppen zeigen ein breites Signal bei 145,5-149 ppm, was darauf hindeutet, dass sich die aliphatischen OH-Gruppen an Seitenketten befinden. Außerdem kann dies für verbleibende Kohlenhydrate sprechen. Die NMR-Analysen zeigen, dass es sich hauptsächlich um Lignin handelt, das mit geringen Mengen an Kohlenhydraten und Carbonsäuren verunreinigt ist. Aus den NMR-Spektren konnte die in Tab. 1.5.1.3 dargestellte chemische Zusammensetzung errechnet werden. Die ermittelten

Werte stimmen sehr gut mit denen der FT-IR-Messungen überein. Auffällig ist, dass das Lignin mehr aliphatische OH-Gruppen als aromatische aufweist. Diese Zusammensetzung spricht für einen vergleichsweise hohen Kondensationsgrad.

Tab. 1.5.1.3: Quantitative Analyse von Alkali-Lignin mittels ^{31}P-NMR

OH Gehalt [mmol/g]						
Aliphatisch	kondensierte phenolische Einheiten	Syringyl	Guaiacyl	Unsubstituiertes p-Hydroxyphenyl	Carboxyl, gebunden	Carboxyl, frei
1,070	0,761	0,582	0,720	0.281	0.912	0.061

Verhältnisse				
G/S	Kondensiert phenolisch OH/S	Carboxyl/S	Total OH_{Ar}/OH_{Alk}	Aliphatisch OH/S
1,24(NMR)/1,17(IR)	1,31	1,56(NMR)/ 0,87(IR)	2,2	1.83(NMR)/1.92(IR)

Verhältnis freie phenolische OH-Gruppen [%]			
Kondensierte Phenol-Einheiten	Syringyl (S)	Guaiacyl (G)	p-Hydroxyphenyl
32,4	24,8	30,7	11,9

Untersuchungen zur Löslichkeit

Die Untersuchungen zur Löslichkeit des Lignins in verschiedenen Lösungsmitteln wurden zum einen durchgeführt, um das beste Lösungsmittel für enzymatische Reaktionen zu finden und zum anderen um physiko-chemische Eigenschaften des Lignins zu untersuchen. Für diese Studien wurden verschiedene Lignine mit Lösungsmitteln mit steigender Polarität extrahiert.

Alle untersuchten Lignine zeigten die beste Löslichkeit in Aceton-Wasser-Mischungen mit mindestens 50 % Volumenanteil Aceton. Dabei konnten bis zu 80 % des Lignins in Lösung gebracht werden. Durch die Extraktion mit Aceton kommt es zur Fraktionierung des Lignins. Die gelösten Fragmente weisen eine engere Molmassenverteilung und einen geringeren Polydispersionsindex auf. Die unlöslichen Fragmente hingegen bestehen hauptsächlich aus höhermolekularen Anteilen und sind stärker kondensiert. Die gelösten Fragmente wurden umfangreich mittels FT-IR und ^{31}P-NMR untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die gelösten Fragmente im Vergleich zum Ausgangslignin weniger kondensiert vorliegen. Da bei einem Aceton-Wasser-Gemisch von 1:1 die geringsten Veränderungen der Struktur festgestellt werden konnten, wurde dieses Lösungsmittel für alle weiteren Untersuchungen genutzt.

1.5.2 Chemisch-enzymatische Modifikation von Lignin (TU BAF-WUR)

Durch die Modifizierung von Lignin mittels Laccasen können neue Werkstoffe mit interessanten Eigenschaften und Funktionalitäten hergestellt werden. Dazu wurden die in Wasser-Aceton (1:1) löslichen Fragmente (niedermolekularer Anteil) der Lignine mit Laccasen umgesetzt und mittels GPC und FT-IR die strukturellen Veränderungen der Lignine untersucht.

Oxidative Polymerisation von Lignin durch Laccase in Wasser-Aceton

Fünf technische Lignine, welche aus unterschiedlichen Biomassen (Nadelholz, Laubholz und Gräser) durch unterschiedliche Isolationsmethoden (Organosolv, Kraft und Soda) hergestellt worden sind, wurden auf ihre strukturellen Unterschiede hin untersucht. Die Lignine wurden mit Wasser-Aceton (1:1) fraktioniert und bezüglich der löslichen Fragmente anschließend mit Laccasen oxidiert. Für alle untersuchten Lignine konnten hohe Umsetzungsraten bestimmt werden. Der erzielte Oxidationsgrad nimmt wie folgt ab: Organosolv Laubholz Lignin (OHL) > Kraft Nadelholz Lignin (KSL) > Alkali Weizenstroh Lignin (AWL) > Soda Weizenstroh Lignin (SWL) > Soda Gras/Weizenstroh Lignin (SGWL). Bei allen Ligninen außer dem Kraft-Lignin sind während der Reaktion Niederschläge entstanden, die mittels GPC (Tab. 1.5.2.1) und FT-IR untersucht wurden.

Tab. 1.5.2.1: Molmassen der fraktionierten Lignine vor und nach der Behandlung mit Laccase

#	Probe		Mw [g mol^{-1}]	Mn [g mol^{-1}]	Mw/Mn	Massen-zuwachs
1	OHL-50		2.010	437	4,6	
2	OHL-Lcc	löslich	5.708	714	8,0	2,8
3		unlöslich	7.219	1.063	6,8	3,6
4	SGWL-50		3.325	1.007	3,3	
5	SGWL-Lcc	löslich	12.780	989	12,9	3,8
6		unlöslich *	14.130	1.496	9,4	4,2
7	SWL-50		3.777	590	6,4	
8	SWL-Lcc	löslich	15.118	1.060	14,3	4,0
9		unlöslich	18.647	1.758	10,6	4,9
10	AWL-50		3.123	651	4,8	
11	AWL-Lcc	löslich	17.359	1.303	13,3	5,6
12		unlöslich	16.017	1.930	8,3	5,1
13	KSL-50		4.279	1.223	3,5	
14	KSL-Lcc	löslich	3.580	534	6,7	0,8

Die Ergebnisse zeigen, dass die Produkte nichtlösliche hochmolekulare Polymere sind, die einen hohen Kondensationsgrad aufweisen. Diese Niederschläge entsprechen etwa 10 % des Ausgangslignins. Bei allen Proben, Kraft-Lignin ausgeschlossen, konnte eine signifikante Zunahme der Molmasse festgestellt werden. Der höchste Polymerisationsgrad konnte durch die Oxidation des Alkali-Weizenstroh-Lignins (AWL) erzielt werden. Sowohl die lösliche als auch die unlösliche Fraktion weisen eine Steigerung der Molmasse um das Vier- bis Fünffache des Ausgangslignins auf.

Die Veränderung der funktionellen Gruppen wurde mittels ^{31}P-NMR untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass es sowohl zur Oxidation der Seitenketten als auch zu oxidativen Kupplungsreaktionen kommt. So konnte zum Beispiel eine Abnahme der aliphatischen OH-Gruppen in den Seitenketten beobachtet werden. Des Weiteren konnte eine Abnahme der aromatischen OH-Gruppen verzeichnet werden, was auf stattfindende Kondensationsreaktionen hindeutet. Dies erklärt auch die Zunahme der Molmassen durch die Oxidation. Außerdem konnte eine Abnahme der Syringyl-Einheiten sowie des Syringyl-Guajacol-Verhältnisses beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass die Cα-Cβ-Bindung der Syringyl-Einheiten leichter oxidierbar ist, als die der Guajacol-Einheiten. Auf der anderen Seite konnte eine Zunahme der p-Hydroxyphenyl-Einheiten durch die enzymatische Oxidation beobachtet werden.

Tab. 1.5.2.2: Ergebnisse der ^{31}P-NMR-Analysen der Lignine vor und nach der Behandlung mit Laccasen

Lignin	Aliph OH [mmol g^{-1}]	Kond. OH [mmol g^{-1}]	COOH [mmol g^{-1}]	Aryl-OH [mmol g^{-1}]	S/G
OHL-50	1.12	0.90 / 27	0.37	3.23	1.51
OHL-Lcc	0.98	0.74 / 40	0.33	1.85	1.27
SGWL-50	1.56	0.90 / 28	1.19	3.11	0.79
SGWL-Lcc	0.92	0.37 / 35	0.66	1.04	0.71
SWL-50	1.60	0.86 / 32	0.91	2.70	0.79
SWL-Lcc	1.16	0.60 / 36	0.79	1.64	0.66
AWL-50	1.15	0.89 / 31	1.07	2.90	0.79
AWL-Lcc	0.98	0.36 / 41	0.60	0.88	0.66
KSL-50	2.12	1.03 / 31	0.49	3.37	0.20
KSL-Lcc*	NA	NA	NA	NA	NA

* Nur gering löslich im NMR-Lösungsmittel; NA: nicht analysiert

Der höchste Wert konnte für die Weizenstroh-Lignine AWL, SGWL und SWL ermittelt werden. Dieses spricht dafür, dass die Guaiacyl/Syringyl-Einheiten des Lignins leicht unter den gegebenen Bedingungen gebrochen werden, die p-Hydroxyphenyl-Einheiten hingegen nicht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Ligninstruktur einen erheblichen Einfluss auf die Reaktivität der Laccase aus *Trametes versicolor* hat. Die effektivste Polymerisation konnte bei Weizenstroh-Lignin beobachtet werden. Die erzielten Ergebnisse wurden bereits erfolgreich im Journal Acta Biochimica Polonica (2013) veröffentlicht und auf dem „5th Central European Congress of Life Science" in Krakau präsentiert.

Enzymatische Kupplung von Lignin und Chitosan

Glucosamine ($GluNH_2$) sind reaktive Kohlenhydrate, welche mittels Laccasen an Lignine gekoppelt werden können (Schema der Reaktion siehe Abb. 1.5.2.2). $GluNH_2$ ist die bindende Einheit im Chitosan, ein natürliches Polymer mit außergewöhnlichen physikalischen Eigenschaften und biologischer Aktivität, weshalb es als vielversprechende Kupplungskomponente erschien. Da diese Reaktion in der Literatur noch nicht beschrieben worden ist, wurde sowohl die Kupplung mit dem Monomer $GluNH_2$ wie auch mit Chitosan untersucht.

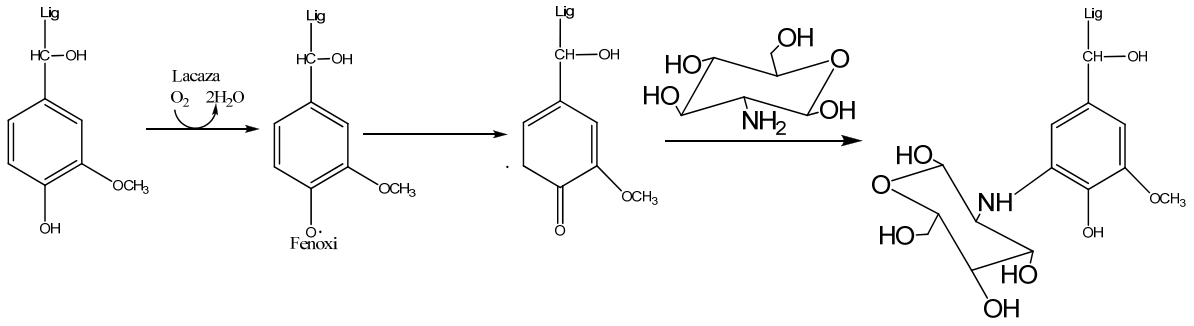


Abb. 1.5.2.2: Schema der Kupplung von Lignin mit Chitosan

Lignin-Glucosamin-Addukte

Die enzymatische Kupplung des Glucosamins mit Lignin wurde in Wasser-Aceton-Mischungen (1:1) unter Verwendung von Laccase untersucht. Die dabei erhaltenen Produkte wurden umfangreich mittels GPC, FT-IR und ^{31}P-NMR charakterisiert. Der Einfluss der Co-Substrate wie Glucosamin wurde mittels Cyclovoltammetrie und der online-Verfolgung des Sauerstoffverbrauchs während der Reaktion untersucht. Da Glucosamin eine hohe Anzahl an aliphatischen OH-Gruppen aufweist, war zu erwarten, dass durch die Kupplung mit Lignin deren Anteil im Produkt steigt. Dies konnte sowohl mit ^{31}P-NMR als auch mit FT-IR-Messungen nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigen des Weiteren, dass nur der in Wasser-Aceton lösliche, niedermolekulare Teil von AWL und OHL erfolgreich gekoppelt werden kann. Dieses konnte sowohl durch Zunahme der Molmasse, als auch durch die Zunahme des Verhältnisses der aliphatischen und aromatischen OH-Gruppen nachgewiesen werden.

Tab. 1.5.2.3: Ergebnisse der Kopplung von Lignin mit Glucosamin

Probe	**Mw [g/mol]**	**Mw/Mn**	**OH-Alk/OH-Ar (NMR/IR)**
OHL-50	2.010	4,6	0,35/0,30
OHL-50/GluNH$_2$	2.045	4,8	0,36/0,30
OHL-50/laccase	5.708	8,0	0,42/0,53
OHL-50/ laccase /GluNH$_2$	2.450	8,4	0,43/0,45
SGWL-50	3.325	3,3	0,51/0,40
SGWL-50/GluNH$_2$	3.490	3,5	0,63/0,55
SGWL-50/ laccase	12.780	12,9	0,89/0,75
SGWL-50/ laccase /GluNH$_2$	3.470	10,3	0,56/0,50
SWL-50	4.300	6,4	0,63/0,53
SWL-50/GluNH$_2$	4.461	6,8	0,64/0,50
SWL-50/ laccase	15.118	14,3	0,70/0,61
SWL-50/ laccase /GluNH$_2$	4.398	8,5	0,66/0,51
AWL-50	3.123	4,8	0,39/0,35
AWL-50/GluNH$_2$	2.980	4,8	0,30/0,25
AWL-50/ laccase	17.359	13,3	1,11/0,95
AWL- 50/ laccase /GluNH$_2$	3.137	3,1	0,40/0,36
KSL-50	4.279	3,5	0,63/0,54
KSL-50/GluNH$_2$	3.950	3,7	0,63/0,55
KSL-50/ laccase *	3.580	6,7	NA/0,75
KSL-50/ laccase /GluNH$_2$*	NA	NA	NA/0,90

* Nur gering löslich in 0,5 M NaOH und im NMR-Lösungsmittel; NA: nicht analysiert

Lignin-Chitosan-Konjugate

Da mit Organosolv-Laubholz-Lignin (OHL) die höchsten Reaktivitäten mit Glucosamin erzielt werden konnten, wurde dieses genutzt, um Lignin-Chitosan-Konjugate herzustellen. In FT-IR-Messungen (Abb. 1.5.2.3) der modifizierten Lignine konnte ein neuer Peak bei 1.122 cm^{-1} und eine Intensitätsvergrößerung der Peaks bei 1.500 und 1.585 cm^{-1} beobachtet werden. Diese neuen Signale können mit der Bildung von C-N-Bindungen assoziiert werden, was für eine erfolgreiche Kupplung des Lignins an Chitosan spricht. Des Weiteren konnte während der Modifizierung eine Braunfärbung des Chitosans beobachtet werden, was auch für eine Kupplung spricht. Somit konnte erstmals eine erfolgreiche Verbindung von Lignin mit Chitosan beobachtet werden.

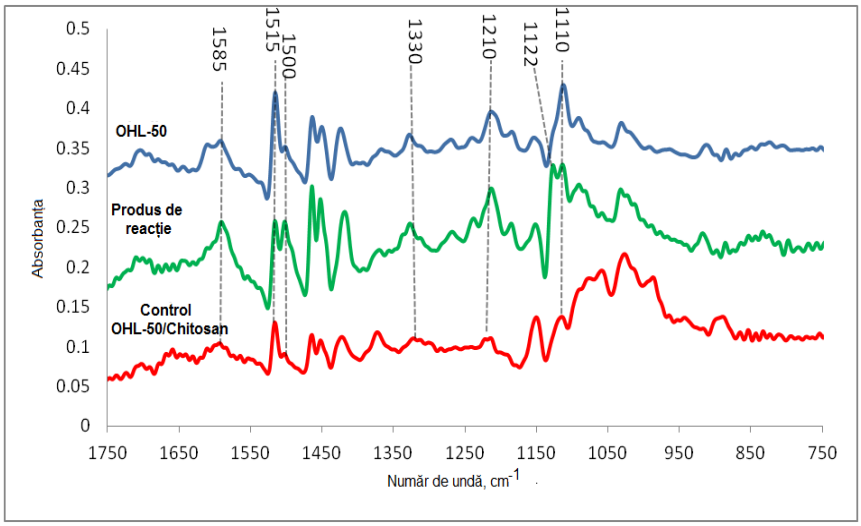


Abb. 1.5.2.3: FT-IR-Spektrum (dekonvolutet) des Lignin-Chitosan-Konjugats (grün) im Vergleich zum Ausgangslignin (blau) und der Kontrolle ohne Laccase (rot)

Enzymatische Kupplung von Lignin mit Glycil-Tryrosyl-Glycin (GYG)

Das Tripeptid Glycil-Tryosyl-Glycin (GYG) ist eine bestimmende Einheit von Proteinen, wie zum Beispiel α-Lactalbumin, und konnte als gutes Substrat für Laccasen identifiziert werden.

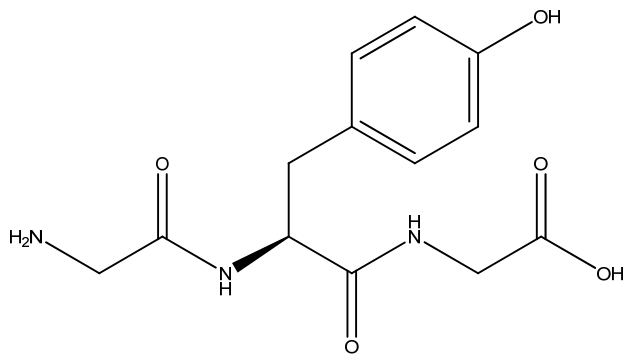


Abb. 1.5.2.4:

Struktur des Tripeptids Glycil-Tyrosyl-Glycin (GYG)

Die Umsetzung wurde sowohl mit Organosolv-Laubholz-Lignin (OHL) als auch mit Alkali-Weizenstroh-Lignin untersucht. Die isolierten Produkte wurden umfangreich mittels FT-IR und ^{31}P-NMR-Analysen charakterisiert. Dabei konnte das Auftreten eines neuen Peaks bei 1.660 cm^{-1} beobachtet werden, welcher der Peptidbande des GYGs zugeordnet werden kann. Des Weiteren war eine Zunahme des Verhältnisses der Intensität der Peptidbande zur Guaiacylbande zu verzeichnen. Mittels ^{31}P-NMR-Analysen konnte zudem eine Zunahme der aromatischen OH-Gruppen beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine kovalente Bindung zwischen Tripeptid und Lignin gebildet wurde. Bislang sind vergleichbare Beobachtungen in der Literatur nicht erwähnt, so dass es sich hier um eine Neuheit handelt.

1.5.3 Einsatz des Lignins als Matrixmaterial in Bio-Compositen (TUD)

Für die Untersuchungen wurden von den Projektpartnern sowohl NP-Lignine (NPL) als auch alkalisch gewonnene Strohlignine (APL) zur Verfügung gestellt. Als Vergleichsprodukte wurden außerdem die beiden kommerziellen Lignine Protobind 1000 der Fa. ALM India (Sodaaufschluss landwirtschaftlicher Reststoffe) und Indulin AT der Fa. Mead Westvaco Corporation (Kraftlignin aus Nadelholz) mit untersucht.

Mit den verschiedenen Ligninen sollten kurzfaserverstärkte Composites hergestellt werden. Als Faserstoffkomponente wurden verschiedene Hanfkurzfasern und Zellstofffasern eingesetzt. In diesem Bericht werden hauptsächlich die Ergebnisse unter Einsatz von Arbocell 400 (Zellulosegehalt 99,5 %) der Fa. Rettenmaier & Co. KG aufgeführt. Bei den Versuchsvarianten wurde eine Mischung aus 55 % Lignin und 45 % Faserstoff hergestellt. Die Compoundierung erfolgte manuell durch Mischen der Komponenten.

Für die Untersuchung der Verarbeitungseigenschaften der Lignine wurde das Pressmolding-Verfahren gewählt. Mit den Ausgangsstoffen wurden in einer Heißpresse unter Verwendung eines Pressformwerkzeuges Platten mit einer Kantenlänge von 100 x 100 mm und 3 mm Dicke gefertigt. Dazu wurde das

Material mit einer Entlüftungsstufe bis auf die Solltemperatur erwärmt und bei einem Pressdruck von 2 MPa verdichtet. Durch die Variation der Presstemperatur wurde zunächst die optimale Plastifizierungstemperatur der verschiedenen Lignine ermittelt. Nach diesem Schritt erfolgte jeweils eine Rückkühlung und Entformung. Es wurden Untersuchungen zur Verarbeitung der Proben im Spritzguss durchgeführt. Aufgrund der schlechten Entformbarkeit der Prüfkörper mit dem vorhandenen Werkzeug erfolgten keine weiteren Versuche im Spritzgussverfahren.

Die gefertigten Ligninplatten wurden in Prüfkörper aufgetrennt und deren Eigenschaften bestimmt. Die Bestimmung der Eigenschaften erfolgte anhand der Zugfestigkeit nach EN ISO 527-4 und der Wasseraufnahme über 24 h nach EN ISO 62. Zunächst wurden die Lignine bei unterschiedlichen Presstemperaturen verarbeitet, da in Voruntersuchen zur DSC-Bestimmung keine eindeutigen Schmelzpunkte ermittelt werden konnten.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz von Ligninen mit der verwendeten Compound-Zusammensetzung in einem Presstemperaturbereich von 188 °C bis 190 °C zu den höchsten Zugfestigkeiten der Prüfkörper führt. Abb. 1.5.3.1 zeigt das beispielhaft für Indulin AT (IAT). Die Dichten der Prüfkörper lagen dabei im Bereich von 1,25 bis 1,30 g/cm³.

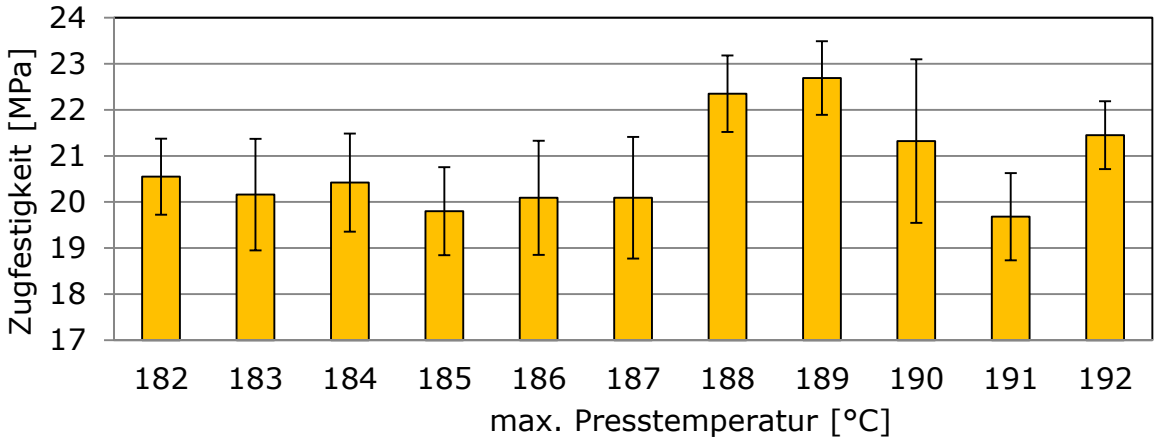


Abb. 1.5.3.1: Zugfestigkeit in Abhängigkeit von der Presstemperatur bei Verarbeitung von Indulin AT

Mit dieser Presstemperatur von 189 °C erfolgte dann die Werkstoffherstellung und Prüfung unter Einsatz der unterschiedlichen Lignine (Abb. 1.5.3.2).

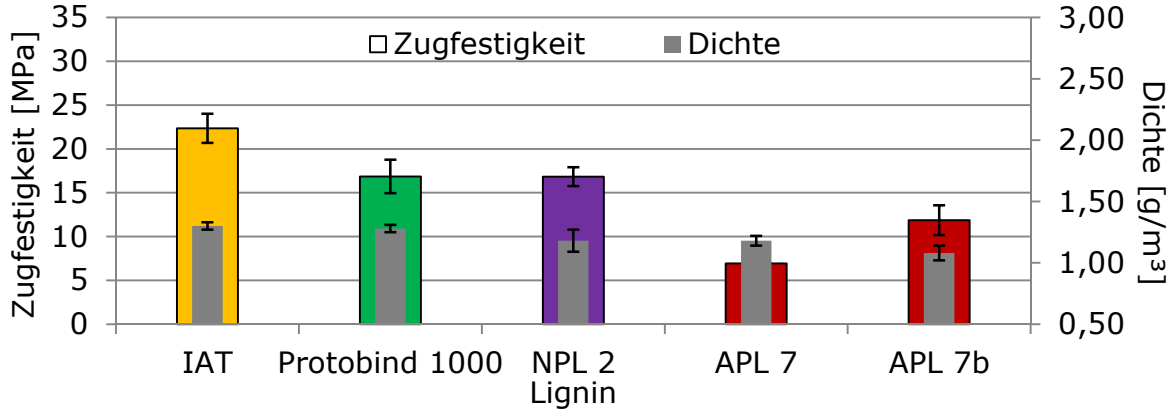


Abb. 1.5.3.2: Zugfestigkeit von Prüfkörpern bei Verarbeitung unterschiedlicher Lignine

Die Ergebnisse der Zugfestigkeiten zeigen, dass mit dem gewählten Verarbeitungsverfahren Prüfkörper aus Indulin AT die höchsten Zugfestigkeiten aufweisen. Die Zugfestigkeiten aller anderen Varianten sind niedriger. Mit NPL lassen sich ähnliche Festigkeitswerte wie mit Protobind 1000 erzielen. APL zeigt zunächst aufgrund hoher Salzgehalte eine geringe Festigkeit. Nach einem weiteren Waschprozess kann die Zugfestigkeit aber deutlich gesteigert werden (Abb. 1.5.3.2, APL 7b). Einen zusätzlichen Einfluss kann auch die Korngröße der verarbeiteten Lignine haben, diese wurde aber im Rahmen der Arbeit zunächst nicht weiter berücksichtigt.

Die hygroskopischen Eigenschaften, die hier als 24 h Wasseraufnahme ermittelt wurden, zeigen insbesondere bei Verarbeitung von NPL und APL positive Werte. Auch hier kann ein Waschprozess die Eigenschaften von APL 7 positiv beeinflussen. Im Vergleich zur Wasseraufnahme von Composites aus thermoplastischen Polymeren sind die Werte jedoch insgesamt noch sehr hoch (Abb. 1.5.3.3).

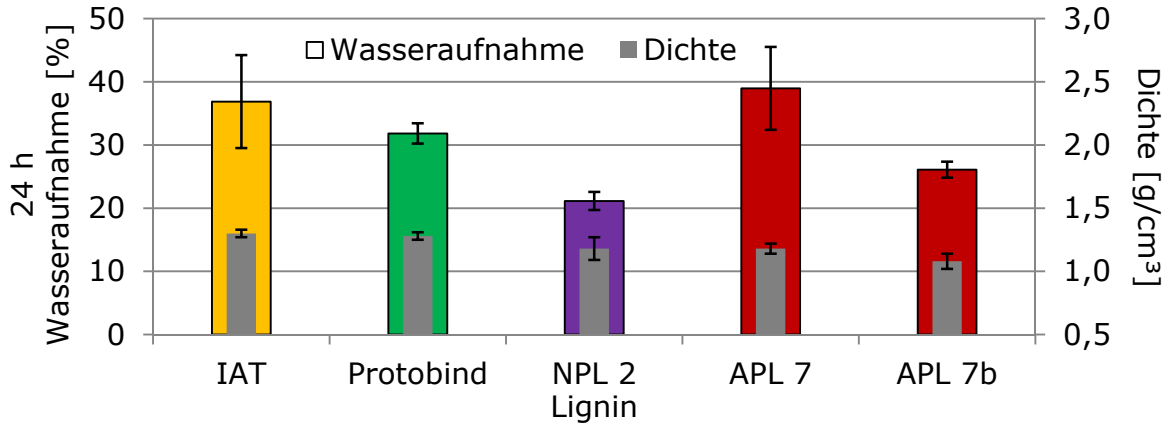


Abb. 1.5.3.3: Wasseraufnahme von Prüfkörpern bei Verarbeitung unterschiedlicher Lignine

Die Emissionen von VOC und der damit verbundene Geruch werden bei der Verwendung von Lignincompositen oft als nachteilig empfunden. Daher wurden bei ausgewählten Versuchsvarianten auch die VOC-Emissionen gaschromatographisch mittels Festphasenmikroadsorption qualitativ untersucht.

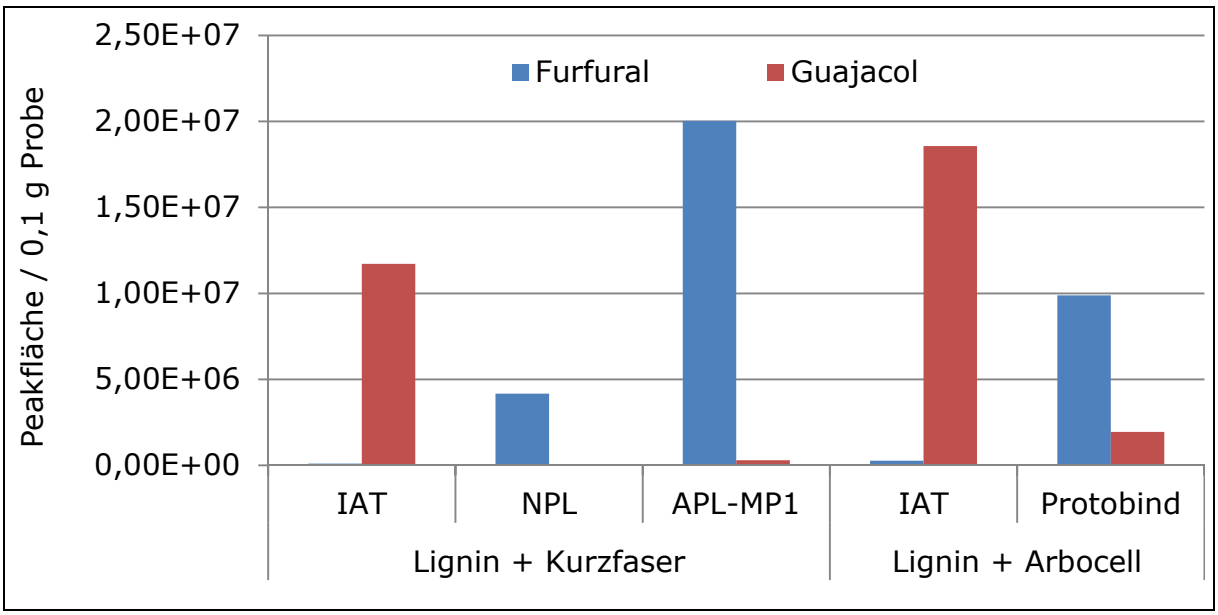


Abb. 1.5.3.4: VOC-Emission von Prüfkörpern aus Lignin und unterschiedlichen Faserstoffen

Die Lignine bewirken aufgrund ihrer Herkunft unterschiedliche VOC-Emissionen der Composite. Während das holzbasierte IAT hohe Guajacol-Emissionen aufweist, führt der Einsatz der drei anderen Lignine, die vorwiegend aus Einjahrespflanzen gewonnen wurden, zu einer verstärkten Emission von Furfural (Abb. 1.5.3.4).

1.5.4 Vernetzung des Lignins (Hydrogele) / (TU Dresden)

Das im alkalischen Aufschluss gewonnene Weizenstrohlignin wurde hinsichtlich seiner Eignung zur Bildung von Hydrogelen untersucht. Solche Substanzen können als Bodenwasserspeicher genutzt werden und sind dadurch gekennzeichnet, dass sie durch eine Ausdehnung des polymeren Netzwerkes in der Lage sind, Wasser reversibel aufzunehmen. Die Ausbildung der Hydrogele erfolgt durch Vernetzung der Ausgangslignine mit Poly-(ethylenglycol)-diglycidylether. Diese Untersuchungen erfolgten im Vergleich zu technischen Ligninen wie ein Kiefer-Kraft-Lignin, ein Buchen-Organosolv-Lignin und verschiedene Fichten-Organocell-Lignine. Auch das untersuchte Weizenstrohlignin ist prinzipiell zur Bildung von Hydrogelen geeignet. Es zeigte sich aber eine Abhängigkeit des Quellvermögens von der

mittleren Molmasse der Lignine. So gibt es offensichtlich einen optimalen Molmassenbereich für die Bildung sehr quellfähiger Hydrogele.

Ferner spielt auch hier der Anteil an insbesondere phenolischen Hydroxylgruppen eine entscheidende Rolle, da die Vernetzungsreaktionen vorrangig dort erfolgt, wie mit verschiedenen spektroskopischen Methoden nachgewiesen werden konnte. Der Vernetzungsgrad wiederum beeinflusst ebenfalls das Quellvermögen der Hydrogele.

Auch der Anteil an aliphatischen Hydroxylgruppen, der beim alkalischen Weizenstrohlignin maßgeblich durch den Gehalt an Polysacchariden verursacht wird, beeinflusst die Quellkapazität. So ist diese umso höher, je höher der aliphatische Hydroxylgehalt der Ausgangslignine ist. Im Gegensatz dazu konnte ein Einfluss des Gehaltes an Carbonyl- und Carboxylgruppen auf die Quellfähigkeit ausgeschlossen werden.

1.6 Untersuchungen zu Sekundärprodukten aus Fermentationsprodukten des SSF-Prozesses (TU BAF)

Ethen ist eines der wichtigsten Primärprodukte der Petrochemie, insbesondere für die Polymerisation werden jährlich weltweit bis zu 100 Mio. Tonnen hergestellt. Der Hauptanteil des erzeugten Ethens stammt dabei aus Steamcracking von Naphtha.[48] Durch immer schlechter werdende Erdölqualitäten und die damit verbundenen steigenden Preise müssen alternative Syntheserouten gefunden werden. Die Herstellung von Ethen aus Ethanol durch katalytische Dehydratisierung ist bereits seit den 1930er Jahren bekannt, ist aber in den letzten Jahrzehnten in Vergessenheit geraten.
Im Rahmen des Projektes wurde die Dehydratisierung von Bioethanol mittels Zeolithen untersucht. Dazu wurde zunächst eine geeignete Versuchsanlage geplant und gebaut (Abb. 1.6.1).

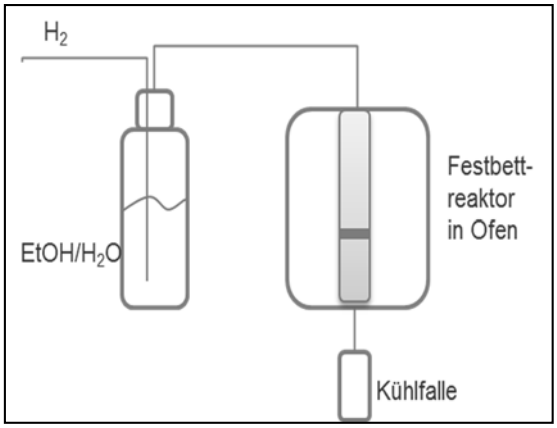


Abb. 1.6.1: Versuchsanlage zur Dehydratisierung von Ethanol

Optimierung

Mit Hilfe ethanolischer Modelllösungen wurde zunächst eine Optimierung der Prozessparameter durchgeführt. Alle Untersuchungen erfolgten mit Hilfe des sauren Zeoliths ZSM-5, welcher vor der Reaktion granuliert wurde. Die Analytik der erzeugten Gas- und Flüssigproben erfolgte gaschromatographisch. Die Analyse der Flüssigproben erfolgte zudem mittels DHA (Detailed Hydrocarbon Analysis), einer bewährten Methode um petrochemische Produkte zu identifizieren.
Für unterschiedliche Katalysatorbelastungen wurde der Einfluss der Temperatur auf den Umsatz, die Ausbeute sowie die Selektivität untersucht. Die Katalysator-belastung ergibt sich aus der initialen Ethanolkonzentration und wird wie folgt berechnet:

$$whsv = \frac{p^* \cdot x_n \cdot M_{Ethanol} \cdot \dot{V}_{Wasserstoff}}{m_{Kat} \cdot T_n \cdot R}$$

p^*	Dampfdruck von reinem Ethanol bei der Thermostattemperatur
x_n	Molenbruch von Ethanol im Sättiger
$M_{Ethanol}$	Molare Masse von Ethanol
$\dot{V}_{Wasserstoff}$	Strömungsgeschwindigkeit von Wasserstoff
m_{Kat}	Masse des Katalysators im Ofen
T_n	Normtemperatur
R	universelle Gaskonstante

Unabhängig von der Katalysatorbelastung konnten nahezu vollständige Umsätze erzielt werden. Der niedrigste erreichte Umsatz liegt bei 99,75 % bei einer Katalysatorbelastung von 0,24 h^{-1} und einer Ofentemperatur von 240 °C. Die erzielten Umsätze liegen im Bereich der Literatur bzw. übertreffen diese. Je nach Versuchsbedingungen werden zum Teil nur Umsätze von 22 % beschrieben.[49] In Abb. 1.6.2 ist der Einfluss der Reaktionstemperatur sowie der Katalysatorbelastung auf die Selektivität und Ausbeute dargestellt.
Die höchsten Selektivitäten und Ausbeuten konnten bei einer niedrigen Katalysatorbelastung von 0,11 h^{-1} und einer Reaktionstemperatur von 240 °C erreicht werden. Die maximal erreichten Selektivitäten und Ausbeuten liegen bei 32,3 %. Sowohl mit steigender Reaktionstemperatur als auch mit steigender Katalysatorbelastung sinken Selektivität und Ausbeute drastisch. Damit einher gehen die vermehrte Bildung von Nebenprodukten und die Verkokung des Katalysators. Während der Reaktion kommt es zur Verkleinerung der spezifischen Oberfläche von 386 auf 54 m²/g, wodurch die Umsetzung des Ethanols erschwert wird. In der Literatur sind Ausbeuten von bis zu 90 % und Selektivitäten von 60 % bis 100 % beschrieben.[50] Die im Projekt erreichten Ergebnisse liegen deutlich unter den Literaturwerten.

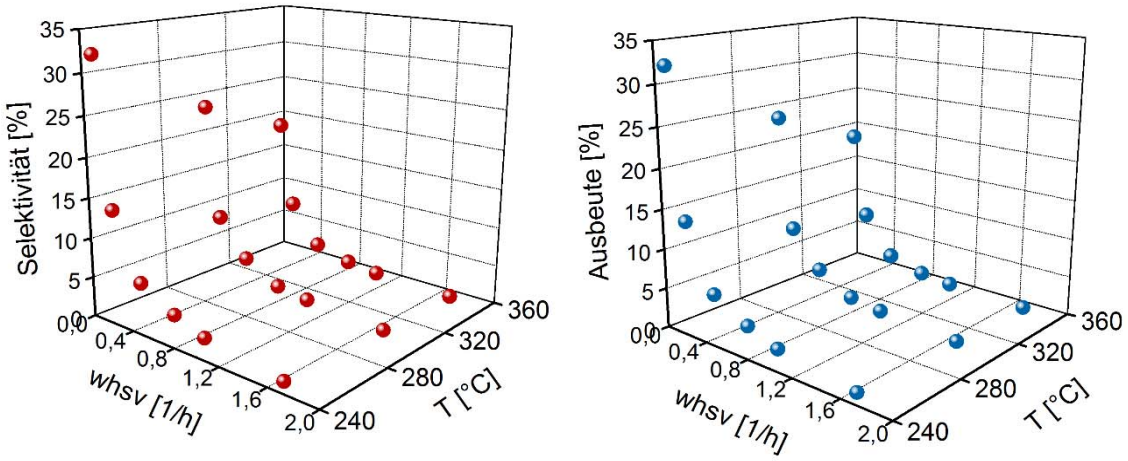


Abb. 1.6.2: Einfluss der Reaktionstemperatur (T) und Katalysatorbelastung (whsv) auf die Selektivität (links) und Ausbeute (rechts) der Dehydratisierung von Ethanol

Durch weitere Optimierungen, insbesondere durch Modifikation des Katalysators, können Steigerungen der Selektivitäten und Ausbeuten erwartet werden. Die vergleichsweise niedrigen Selektivitäten sind durch die Bildung von Nebenprodukten verursacht. Als Hauptprodukt konnte Ethen identifiziert werden. Als Nebenprodukte konnten insbesondere Ethan und Isobutan detektiert werden. Ethan kann durch die Hydratisierung des gebildeten Ethens entstehen, Isobutan entsteht

durch Insertierung eines Ethenmoleküls in ein anderes. Des Weiteren konnten Propen, n-Butan und weitere C4-Species identifiziert werden.

Dehydratisierung von Bioethanol

Nach erfolgreich durchgeführter Optimierung wurde die Dehydratisierung von Bioethanol untersucht. Aus einer Fermentationsbrühe mit einer Ethanol-konzentration von 70 g/L konnte bei einer Katalysatorbelastung von 0,16 h^{-1} ein Ethenanteil von w = 77 % erreicht werden. Dies entspricht einem Umsatz von 100 %. Bei dieser Umsetzung beträgt die Selektivität und Ausbeute 25 %. Es konnte somit gezeigt werden, dass es möglich ist, direkt aus der Fermentations-brühe Ethen zu produzieren. Auf diesem Weg kann ein erheblicher Energie-verbrauch für die Entwässerung von Ethanol zur Nutzung als Biokraftstoff eingespart werden. Eine vollständige Substitution der Ethenproduktion kann jedoch auf diesem Weg nicht geschaffen werden, da für den weltweit großen Bedarf die nachwachsenden Rohstoffe nicht in entsprechender Menge zur Verfügung stehen.

1.7 Wirtschaftliche Betrachtung des Gesamtprozesses (TU BAF)

Basierend auf den Ergebnissen aus der Fermentation im Technikumsmaßstab (1.4.8) wurde eine Wirtschaftlichkeitsbetrachtung durchgeführt. Nach ersten Berechnungen konnten Produktionskosten von 1,1 € pro Liter Bioethanol ermittelt werden. Dies liegt im Bereich von Literaturwerten. Eine Verbesserung der Produktionskosten kann z.B. durch Recycling von Abwasser bzw. durch Rückgewinnung von Cellulasen erfolgen. Insbesondere ersteres ist im Großmaßstab sehr leicht umsetzbar und sehr erfolgsversprechend.

Charakteristika der verschiedenen Aufschlussverfahren

Tab. 1.4.7.1: Vergleich der Vorbehandlungsverfahren

Vorbehandlung	Vorteile	Nachteile
NP-Aufschluss Flottenverhältnis 1:14	• Rückgewinnung der Ameisensäure • Hohe Reinheit des Lignins • Druckloser Prozess • Geringere Viskosität der Pulpe	• Hoher Ligninanteil im Zellstoff • Geringer Feststoffanteil im Aufschlussmedium • Korrosionsschutz (emaillierter Stahl !)
Alkalischer Aufschluss Flottenverhältnis 1:6	• Geringer Ligninanteil im Zellstoff • Hoher Feststoffanteil im Aufschlussmedium • Ein Großteil des Lignins kann gewonnen werden • Hoher technologischer Standard	• Chemikalien-rückgewinnung ist energetisch aufwendig • Druckverfahren mit 6 bar
Autohydrolyse Flottenverhältnis 1:8	• Keine Chemikalien benötigt • Fast vollständige Abtrennung der Hemicellulose	• Hoher Energiebedarf • Druckverfahren mit 20-25 bar

2 Veröffentlichungen zum Bericht

Orginalbeiträge

Steffien, D., Aubel, I., Bertau, M, (2014) Enzymyatic: *Enzymatic hydrolysis of pre-treated lignocellulose with Penicillium verruclosum cellulases*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 103, 29-35 Doi: 10.1016/j.molcatb.2013.11.004

Rossberg, C., Steffien D., Bremer M., Koenig S., Carvalheiro F., Duarte L.C., Moniz P., Hoernicke M., Bertau M., Fischer S. (2014): *Pulp properties resulting from different pretreatments of wheat straw and their influence on enzymatic hydrolysis rate*, Bioresource Technology (angenommen, in press)

Im Unterauftrag der TU Bergakademie Freiberg:

Fiţigău, F.I., Peter, F., Boeriu, C.G. (2014) *Oxidative polymerization of lignins by laccase in water-acetone mixture*, Acta Biochimica Polonica, In press. (Accepted 17.12.2013)

Boeriu, C.G., Fiţigău, F.I., Frissen, A.E., Stoutjesdijk, J., Peter, F., Gosselink, R.J.A. (2014) *Fractionation of five technical lignins by selective extraction in green solvents and characterisation of the isolated fractions.* Ind. Crops Products. Submitted

Fiţigău, F.I., Peter, F., Boeriu, C.G. (2014) *Enzymatic Modification of Different Lignins Through Oxidative Coupling with Hydrophilic Compounds.* Macromolecules. Submitted.

Poster

G. Kerns: "Utilization of lignocellulosic materials for valuable products - research activities in Saxon Institutes" Posterpräsentation im Rahmen der Sonderschau "Industrielle Biotechnologie" zur BIOTECHNICA 2011

D. Steffien, M. Katzberg, M. Bertau: *Charakterisierung der Hydrolyse vorbehandelter Lignocellulose durch den Enzymkomplex aus Penicillium verruculosum*; Poster zur ProcessNet-Jahrestagung und 30. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen; 10.-13.9.2012; Karlsruhe

D. Steffien, M. Bertau: *Charakterisierung der Hydrolyse von Lignocellulose durch den Enzymkomplex aus Penicillium verruculosum*; Poster zur Frühjahrstagung der Biotechnologen (DECHEMA); 4.-5. März 2013; Frankfurt

D. Steffien, M. Bertau: *Charakterisierung der Hydrolyse von Lignocellulose durch den Enzymkomplex aus Penicillium verruculosum*; Poster zur Veranstaltung Biotechnologie mit der wir leben; 25. März 2013; Dresden

Vorträge

G. Kerns (2014): *The SSF-process for Ethanol production on pulp from wheat straw*. 10th European Bioethanol and Bioconversion Technology Meeting. 08th April, 2014 Detmold

D. Steffien, M. Bertau: *Kinetic studies of enzymatic lignocellulose hydrolysis* 21st European Biomass Conference and Exhibition; 3.-7. Juni 2013; Kopenhagen

Im Unterauftrag der TU Bergakademie Freiberg:

Fiţigău, F.I., Peter, F., Boeriu, C.G. (2013) Oxidative polymerization of lignin by laccase in water-acetone mixture, *5th Central European Congress of Life Sciences, Eurobiotech, 2013, White and Green Biotechnology.* 8.-11. Oktober 2013, Krakau, Polen.

Fiţigău, F.I., Peter, F., Boeriu, C.G. (2014) Enzymatic Modification of Different Lignins Through Oxidative Coupling with Hydrophilic Compounds. 15th IUPAC International Conference *"Polymer and Organic Chemistry"* POC2014, 10.-13. Juni 2014, Timisoara, Rumänien.

Proceedings

D. Steffien, M. Katzberg, M. Bertau: *Charakterisierung der Hydrolyse vorbehandelter Lignocellulose durch den Enzymkomplex aus Penicillium verruculosum* (2012); Beitrag in Chemie Ingenieur Technik (84); S. 1387, Doi: 10.1002/cite.201250313

D. Steffien, M. Bertau: *Kinetic studies of enzymatic lignocellulose hydrolysis*: Beitrag in Proceedings zu 21st European Biomass Conference and Exhibition; 3.-7.Juni 2013; Kopenhagen

3 Referenzen:

[1] Dr. Ulrich Kettling, Clariant AG: Präsentation der Pilotanlage zum Sunliquid-Verfahren; Kooperationsforum "Biopolymere", November **2012** in Straubing

[2] Siegle Sven, Verfahren zur Herstellung einer Pulpe aus zellulosehaltigem Material, die Pulpe selbst und deren Verwendung, DE19516151, **1996**-11-07

[3] Ghose, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem* **1987,** *59* (2), 257–268

[4] Andrić, P.; Meyer, A. S.; Jensen, P. A.; Dam-Johansen, K. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnology Advances* **2010,** *28* (3), 308–324

[5] Korotkova, O. G.; Semenova, M. V.; Morozova, V. V.; Zorov, I. N.; Sokolova, L. M.; Bubnova, T. M.; Okunev, O. N.; Sinitsyn, A. P. Isolation and properties of fungal β-glucosidases. *Biochemistry Moscow* **2009,** *74* (5), 569–577

[6] Prasertsan, P.; Doelle, H. W. Separation and characterization of endoglucanases from culture filtrates of Cellulomonas sp. *Appl Biochem Microbiol* **1986,** *24*, 326–333

[7] Qi, B.; Chen, X.; Yi, S.; Wan, Y. Inhibition of cellulase, β-glucosidase, and xylanase activities and enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated wheat straw by acetone-butanol-ethanol fermentation products. *Environ. Prog. Sustainable Energy* **2013**, 1–7

[8] Du, R.; Su, R.; Li, X.; Tantai, X.; Liu, Z.; Yang, J.; Qi, W.; He, Z. Controlled adsorption of cellulase onto pretreated corncob by pH adjustment. *Cellulose* **2012,** *19* (2), 371–380

[9] Qi, B.; Chen, X.; Su, Y.; Wan, Y. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Bioresource Technology* **2011,** *102* (3), 2881–2889

[10] Kristensen, J. B.; Börjesson, J.; Bruun, M. H.; Tjerneld, F.; Jørgensen, H. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology* **2007,** *40* (4), 888–895

[11] Du, R.; Su, R.; Li, X.; Tantai, X.; Liu, Z.; Yang, J.; Qi, W.; He, Z. Controlled adsorption of cellulase onto pretreated corncob by pH adjustment. *Cellulose* **2012,** *19* (2), 371–380

[12] Ruigang Liu, Hui Yu, Yong Huang. Structure and morphology of cellulose in wheat straw. *Cellulose* **2005,** *12*, 25–34

[13] Jasiukaitytė-Grojzdek, E.; Kunaver, M.; Poljanšek, I. Influence of cellulose polymerization degree and crystallinity on kinetics of cellulose degradation. *BioResources* **2012,** *7* (3), 3008–3027

[14] Kumar, R.; Wyman, C. E. Cellulase adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments. *Biotechnol. Bioeng* **2009,** *103* (2), 252–267

[15] Eriksson, T.; Börjesson, J.; Tjerneld, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology* **2002,** *31* (3), 353–364

[16] Kristensen, J. B.; Börjesson, J.; Bruun, M. H.; Tjerneld, F.; Jørgensen, H. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology* **2007,** *40* (4), 888–895

[17] Modenbach, A. A.; Nokes, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review. *Biomass and Bioenergy* **2013,** *56*, 526–544

[18] Kristensen, J. B.; Felby, C.; Jørgensen, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol Biofuels* **2009,** *2* (1), 11

[19] Rosgaard, L.; Andric, P.; Dam-Johansen, K.; Pedersen, S.; Meyer, A. S. Effects of Substrate Loading on Enzymatic Hydrolysis and Viscosity of Pretreated Barley Straw. *Appl Biochem Biotechnol* **2007,** *143* (1), 27–40

[20] Modenbach, A. A.; Nokes, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review. *Biomass and Bioenergy* **2013,** *56*, 526–544

[21] Szijártó, N.; Siikaaho, M.; Sontag-Strohm, T.; Viikari, L. Liquefaction of hydrothermally pretreated wheat straw at high-solids content by purified Trichoderma enzymes. *Bioresource Technology* **2011,** *102* (2), 1968–1974

[22] A. Berlin, N. Gilkes, A. Kurabi, R.Bura, M. Tu, D. Kilburn, J. Saddler, Weak Lignin-Binding Enzymes, Humana Press Inc., **2005**

[23] McIntosh, S.; Vancov, T. Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw. *Biomass and Bioenergy* **2011,** *35* (7), 3094–3103

[24] Gonzalez, R.; Jameel, H.; Chang, H.-m.; Treasure, T.; Pirraglia, A.; Saloni, D. Thermo-mechnical pulping as a pretreatment for agricultural biomass for biochemical conversion. *Bioresource Technology* **2011,** *6* (2), 1599–1614

[25] Luo, X.; Zhu, J. Y. Effects of drying-induced fiber hornification on enzymatic saccharification of lignocelluloses. *Enzyme and Microbial Technology* **2011,** *48* (1), 92–99

[26] Jørgensen, H. Effect of Nutrients on Fermentation of Pretreated Wheat Straw at very High Dry Matter Content by Saccharomyces cerevisiae. *Appl Biochem Biotechnol* **2009,** *153* (1-3), 44–57

[27] Nielsen, M. K.; Arneborg, N. The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic Saccharomyces cerevisiae and Zygosaccharomyces bailii cultures. *Food Microbiology* **2007,** *24* (1), 101–105

[28] Deesuth, O.; Laopaiboon, P.; Jaisil, P.; Laopaiboon, L. Optimization of Nitrogen and Metal Ions Supplementation for Very High Gravity Bioethanol Fermentation from Sweet Sorghum Juice Using an Orthogonal Array Design. *Energies* **2012,** *5* (12), 3178–3197

[29] D'Amore, T.; Stewart, G. G. Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme and Microbial Technology* **1987**, *9* (6), 322–330

[30] Ma, M.; Liu, Z. L. Mechanisms of ethanol tolerance in Saccharomyces cerevisiae. *Appl Microbiol Biotechnol* **2010,** *87* (3), 829–845

[31] Olofsson K., Bertilsson M. and Lidén G.: A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. Biotechnology for Biofuels, **2008**

[32] Larsen, J., Østergaard Petersen, M., Thirup, L., Wen Li, H. and Krogh Iversen, F. (**2008**), The IBUS Process – Lignocellulosic Bioethanol Close to a Commercial Reality. Chem. Eng. Technol., 31: 765–772

[33] Koppram R., Olsson L.Combined substrate, enzyme and yeast feed in simultaneous saccharification and fermentation allow bioethanol production from pretreated spruce biomass at high solids loadings, Biotechnology for Biofuels **2014**

[34] Palmqvist E. et al, Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. Biotechnology and Bioengineering, **1999**

[35] Larsson S. et al, Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by Saccharomyces cerevisiae. Applied Biochemistry and Biotechnology, **2000**

[36] Jing XY. et al, Inhibition performance of lignocellulose products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. Applied Biochemistry and Biotechnology, **2009**

[37] Deqiang C. et al. Simultaneous Saccharification and Ethanol Fermentation of Corn Stover at High Temperature and High Solids Loading by a thermotolerant Strain Saccharomyces cerevisiae DQ1, Bioenergy Research, **2012**

[38] Sun, Y.; Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* **2002,** *83* (1), 1–11

[39] Jørgensen, H.; Vibe-Pedersen, J.; Larsen, J.; Felby, C. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* **2007,** *96* (5), 862–870

[40] Lu, Y.; Wang, Y.; Xu, G.; Chu, J.; Zhuang, Y.; Zhang, S. Influence of High Solid Concentration on Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Steam-Exploded Corn Stover Biomass. *Appl Biochem Biotechnol* **2010,** *160* (2), 360–369

[41] Pereira, F. B.; Guimarães, P. M.; Teixeira, J. A.; Domingues, L. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by Saccharomyces cerevisiae using statistical experimental designs. *Bioresource Technology* **2010,** *101* (20), 7856–7863

[42] Wang, F.-Q.; Gao, C.-J.; Yang, C.-Y.; Xu, P. Optimization of an ethanol production medium in very high gravity fermentation. *Biotechnol Lett* **2007,** *29* (2), 233–236

[43] Devantier, R.; Scheithauer, B.; Villas-Bôas, S. G.; Pedersen, S.; Olsson, L. Metabolite profiling for analysis of yeast stress response during very high gravity ethanol fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **2005,** *90* (6), 703–714

[44] Balat, M., Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management* **2011,** *52* (2), 858–875

[45] Eshkol, N.; Sendovski, M.; Bahalul, M.; Katz-Ezov, T.; Kashi, Y.; Fishman, A. Production of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by a stress tolerant Saccharomyces cerevisiae strain. *Journal of Applied Microbiology* **2009,** *106* (2), 534–542

[46] Mei, J.; Min, H.; Lü, Z. Enhanced biotransformation of l-phenylalanine to 2-phenylethanol using an in situ product adsorption technique. *Process Biochemistry* **2009,** *44* (8), 886–890

[47] Sammons, R. J.; Harper, D. P.; Labbé, N.; Bozell, J. J.; Elder, T.; Rials, T. G. Charcterization of Organosolv Lignins using Thermal and FT-IR Spectroscopic Analysis. *BioResources* **2013,** *8* (2), 2752–2767

[48] Behr, A.; Kleyensteiber, A.; Hartge, U. Alternative Synthesewege zum Ethylen. *Chemie Ingenieur Technik* **2010,** *82* (3), 201–213

[49] Phillips, C. B.; Datta, R. Production of Ethylene from Hydrous Ethanol on H-ZSM-5 under Mild Conditions. *Ind. Eng. Chem. Res* **1997,** No. 36, 4466–4475

[50] Zhang, X.; Wang, R.; Yang, X.; Zhang, F. Comparison of four catalysts in the catalytic dehydration of ethanol to ethylene. *Microporous and Mesoporous Materials* **2008,** *116* (1-3), 210–215