Fraunhofer
IGB

FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR GRENZFLÄCHEN- UND BIOVERFAHRENSTECHNIK IGB

BERICHTE AUS FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG NR. 058

Daniel Ludwig

Entwicklung von Verfahren und Prozessmodellen zur Fraktionierung von Lignocellulose

FRAUNHOFER VERLAG

Fraunhofer-Institut für
Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB

Berichte aus Forschung und Entwicklung Nr. 058

Entwicklung von Verfahren und Prozessmodellen zur Fraktionierung von Lignocellulose

Daniel Ludwig

FRAUNHOFER VERLAG

Kontaktadresse:
Fraunhofer-Institut für
Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB
Nobelstraße 12
70569 Stuttgart
Telefon 07 11 9 70-40 00
Telefax 07 11 9 70-42 00
E-Mail info@igb.fraunhofer.de
URL www.igb.fraunhofer.de

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar.
ISBN (Print): 978-3-8396-0696-4

D 93

Zugl.: Stuttgart, Univ., Diss., 2013

Druck: Mediendienstleistungen des
Fraunhofer-Informationszentrum Raum und Bau IRB, Stuttgart

Für den Druck des Buches wurde chlor- und säurefreies Papier verwendet.

© by FRAUNHOFER VERLAG, 2014
Fraunhofer-Informationszentrum Raum und Bau IRB
Postfach 80 04 69, 70504 Stuttgart
Nobelstraße 12, 70569 Stuttgart
Telefon 07 11 9 70-25 00
Telefax 07 11 9 70-25 08
E-Mail verlag@fraunhofer.de
URL http://verlag.fraunhofer.de

Alle Rechte vorbehalten

Dieses Werk ist einschließlich aller seiner Teile urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die über die engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes hinausgeht, ist ohne schriftliche Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Dies gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen sowie die Speicherung in elektronischen Systemen.
Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen und Handelsnamen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass solche Bezeichnungen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und deshalb von jedermann benutzt werden dürften. Soweit in diesem Werk direkt oder indirekt auf Gesetze, Vorschriften oder Richtlinien (z.B. DIN, VDI) Bezug genommen oder aus ihnen zitiert worden ist, kann der Verlag keine Gewähr für Richtigkeit, Vollständigkeit oder Aktualität übernehmen.

Entwicklung von Verfahren und Prozessmodellen zur Fraktionierung von Lignocellulose

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik
der Universität Stuttgart zur Erlangung
der Würde eines Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Daniel Ludwig
aus Nürnberg

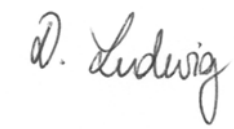
Hauptberichter:	Prof. Thomas Hirth, Universität Stuttgart
Mitberichter:	Prof. Roland Ulber, Universität Kaiserslautern

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2013

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie der Universität Stuttgart,
2014

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst, lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.



_____

Daniel Ludwig

Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Hirth, meinem Doktorvater, der mir die Durchführung dieser Arbeit am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie (IGVP) in Kooperation mit dem Fraunhofer IGB ermöglicht hat. Ich bin dankbar für sein stetiges Engagement und das entgegengebrachte Vertrauen. Dies hat im Wesentlichen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Darüber hinaus möchte ich Herrn Prof. Dr. Ulber für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Frau Susanne Zibek möchte ich ganz herzlich für ihre dauerhafte Unterstützung und ihr Vertrauen danken. Als meine Gruppenleiterin unterstützte sie mich ganz wesentlich bei der Durchführung dieser Arbeit. Herrn PD Dr. Steffen Rupp möchte ich auch ganz herzlich für seine Unterstützung danken. Der gesamten Abteilung Molekulare Biotechnologie (MBT) des Fraunhofer IGB möchte ich ganz herzlich für die außergewöhnlich freundliche Arbeitsatmosphäre danken. Besonderer Dank gilt hierbei der Arbeitsgruppe Weiße Biotechnologie (WBT), deren Kollegialität und Unterstützung sehr hilfreich waren. Insbesondere meiner Zimmerkollegin und Freundin Angela Gronen gilt mein besonderer Dank für ihre Unterstützung und fachliche Diskussion.

Herrn Tino Elter möchte ich herzlich für die unterstützende Einführung bei der Modellierung in MATLAB danken. Frau Monika Riedl danke ich für die kooperative Durchführung der REM-Aufnahmen. Herrn Christopher Hänel danke ich für die Unterstützung bei den rheologischen Messungen.

Besonderen Dank gilt auch meinen Kollegen am Fraunhofer CBP Herrn Gerd Unkelbach und Fraunhofer ICT Frau Sarah Endisch und Herrn Dr. Detlef Schmiedl für die Zusammenarbeit. Insbesondere Herrn Gerd Unkelbach möchte ich für die wertvollen fachlichen Diskussionen danken.

Meinen Studenten Sina Rapp, Patrick Westermann, Jonathan Siegert, Fabian Haitz, Stefanie Weisser, Julia Stolarow und Eva Bahret möchte ich für die hervorragende Laborarbeit danken.

Meinen Eltern und meinem Bruder möchte ich für die Unterstützung und Motivation ganz herzlich danken. Meinen Freunden möchte ich vor allem für das Verständnis danken, dass durch die Doktorarbeit unsere gemeinsame Zeit zwangsläufig reduziert wurde.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Lebensgefährtin Andrea Seibert danken. Sie war mit ihrer fortwährenden Unterstützung und Motivation immer für mich da.

In Erinnerung

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS I

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS VI

SYMBOLVERZEICHNIS IX

ABBILDUNGSVERZEICHNIS XI

TABELLENVERZEICHNIS XXI

ZUSAMMENFASSUNG 1

ABSTRACT 4

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG 7

1.1 EINLEITUNG UND MOTIVATION 7

1.2 ZIELSETZUNG 9

2 GRUNDLAGEN UND STAND DER WISSENSCHAFT 11

2.1 AUFBAU VON LIGNOCELLULOSE 11

2.2 DAS KONZEPT DER BIORAFFINERIE 15

2.3 ROHSTOFFPOTENTIALE AUSGEWÄHLTER LIGNOCELLULOSEROHSTOFFE 19

2.4 VORBEHANDLUNG VON LIGNOCELLULOSE 21

2.4.1 Systematische Einteilung der Vorbehandlungsverfahren 22

2.4.2 Vorbehandlungsmethoden für Weizenstroh 26

2.4.3 Vorbehandlungsmethoden für Miscanthus 30

2.4.4 Vorbehandlungsmethoden für Pappelholz 33

2.4.5 Zusammenfassung 36

2.5 ENZYMATISCHE HYDROLYSE 37

2.5.1 Grundlagen der enzymatischen Hydrolyse 38

2.5.2 Verfahren zur enzymatische Hydrolyse von Hemicellulose und Cellulose 40

2.5.2.1 Enzymatische Hydrolyse des Xylananteils in der Faser 40

2.5.2.2 Enzymatische Hydrolyse des Celluloseanteils in der Faser 42

2.5.3 Zusammenfassung 45

2.6 ABTRENNUNG VON ABBAUPRODUKTEN AUS ZUCKERHALTIGEN AUFSCHLUSSLÖSUNGEN 46

2.6.1 Entstehung von Abbauprodukten und deren Wirkungsweise 47

2.6.2 Übersicht über die eingesetzten Detoxifikationsverfahren 49

2.6.3 Laccase-katalysierte Detoxifikationsverfahren 51

2.6.4 Adsorptive Detoxifikationsverfahren ... 53
2.6.5 Zusammenfassung ... 55

3 VERWENDETE MATERIALIEN UND METHODEN ... 57

3.1 VERWENDETE MATERIALIEN ... 57
3.1.1 Verwendete lignocellulosehaltige Rohstoffe ... 57
3.1.2 Enzyme ... 57
3.1.3 Träger zur Immobilisierung ... 58
3.1.4 Adsorber ... 59
3.1.5 Mikroorganismen ... 60
3.1.6 Kultivierungsmedien ... 60
3.2 VORBEHANDLUNG VON LIGNOCELLULOSE ... 61
3.2.1 Verwendete Reaktoren zur Vorbehandlung von Lignocellulose ... 61
3.2.2 Charakterisierung verschiedener Vorbehandlungsverfahren ... 62
3.2.2.1 Solubiliserung der Hauptfraktionern Lignin, Xylan und Glukan ... 62
3.2.2.2 Hydrolysierbarkeit der Cellulosefraktion in der Faser ... 63
3.2.2.3 Hydrolysierbarkeit der Xylanfraktion in der Faser ... 63
3.2.2.4 Berechnung weiterer aufschlussrelevanter Kenngrößen ... 64
3.2.3 Vorauswahl geeigneter Vorbehandlungsmethoden ... 65
3.2.4 Optimierung der ausgewählten Vorbehandlungsmethode ... 67
3.2.5 Vorhersagemodelle für die Vorbehandlungsverfahren ... 68
3.2.5.1 Quadratische Modelle zur Beschreibung der Vorbehandlung ... 68
3.2.5.2 Modified Severity-Faktor Modell (MSFM) ... 69
3.3 ENZYMATISCHE HYDROLYSE DES HEMICELLULOSE- UND CELLULOSE-ANTEILS DER FASERFRAKTION ... 71
3.3.1 Auswahl von geeigneten Hydrolasen ... 71
3.3.1.1 Auswahl von geeigneten Xylanasen ... 71
3.3.1.2 Auswahl von geeigneten Cellulasen ... 72
3.3.2 Verfahrensentwicklung zur Hochfeststoff-Hydrolyse HFH ... 73
3.3.2.1 Verwendetes Rührreaktorsystem und verwendete Rührorgane ... 73
3.3.2.2 Dichtebestimmung der Fluide ... 75
3.3.2.3 Rheologische Untersuchungen ... 75
3.3.2.4 Bestimmung der Leistungs- und Mischzeitcharakteristik ... 75
3.3.2.5 Hydrolyse der Faserfraktionen bei hohen Feststoffdichten ... 77
3.3.3 Reaktionskinetik der enzymatischen Hydrolyse im Rührkesselreaktor ... 77
3.4 DETOXIFIKATION VON ZUCKERHALTIGEN AUFSCHLUSSLÖSUNGEN ... 80
3.4.1 Verwendete Aufschlusslösungen ... 80
3.4.2 Immobilisierung der Laccase und Charakterisierung der Immobilisate ... 81
3.4.3 Laccase-katalysierte Detoxifikation mit freier oder immobilisierter Laccase ... 82
3.4.4 Modellierung der Laccase-katalysierten Detoxifikation ... 83
3.4.5 Adsorptive Detoxifikation ... 84

3.4.6 Untersuchung der Fermentierbarkeit von Aufschlusslösungen ... 87
3.4.7 Modellierung der adsorptiven Detoxifikation ... 88
3.5 ANALYTISCHE METHODEN ... 90
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION ... 91
4.1 VORBEHANDLUNG VON LIGNOCELLULOSEHALTIGEN ROHSTOFFEN ... 93
4.1.1 Auswahl von geeigneten Vorbehandlungsverfahren ... 93
4.1.1.1 Auswahl eines geeigneten Vorbehandlungsverfahrens für Weizenstroh ... 94
4.1.1.2 Auswahl eines geeigneten Vorbehandlungsverfahrens für Miscanthus ... 101
4.1.1.3 Auswahl eines geeigneten Vorbehandlungsverfahrens für Pappelholz ... 106
4.1.1.4 Vergleich der Rohstoffe und zusammenfassende Bewertung ... 112
4.1.2 Optimierung der ausgewählten physikalisch-chemischen Vorbehandlungs-methoden ... 113
4.1.2.1 Optimierung des alkalischen Aufschlusses von Weizenstroh mit NaOH ... 113
4.1.2.2 Optimierung des säurekatalysierten EtOH-Organosolv-Aufschlusses von Miscanthus ... 122
4.1.2.3 Optimierung des säurekatalysierten EtOH-Organosolv-Aufschlusses von Pappel-holz ... 128
4.1.3 Maßstabsübertragung anhand des Modified Severity Faktors log M_0 ... 135
4.1.4 Bilanzierung und Zusammenfassung der Vorbehandlungsverfahren ... 140
4.2 ENZYMATISCHE HYDROLYSE DER FASERFRAKTION MIT XYLANASEN UND CELLULASEN ... 143
4.2.1 Enzymatische Hydrolyse des Xylananteils mit Xylanasen ... 144
4.2.1.1 Charakterisierung und Auswahl von Xylanasen ... 144
4.2.1.2 Limitierende Faktoren der Xylanhydrolyse ... 149
4.2.2 Enzymatische Hydrolyse des Celluloseanteils mit Cellulasen ... 155
4.2.2.1 Auswahl von Cellulasen ... 156
4.2.2.2 Hochfeststoffhydrolyse im Schüttelkolben ... 160
4.2.2.3 Rheologie von Fasersuspensionen am Beispiel von Weizenstroh ... 164
4.2.2.4 Auswahl eines Rührorgans anhand der Mischzeit- und Leistungscharakteristik ... 166
4.2.2.5 Hochfeststoffhydrolyse (HFH) im Rührreaktor ... 169
4.2.2.6 Reaktionskinetik der Hochfeststoffhydrolyse ... 173
4.2.2.7 Zusammenfassende Bemerkungen zum entwickelten Hochfeststoffhydrolyse-Verfahrens (HFH) ... 174
4.3 ABTRENNUNG VON ABBAUPRODUKTEN AUS ZUCKERHALTIGEN PROZESSSTRÖMEN ... 176
4.3.1 Laccase-katalysierte Detoxifikation von phenolischen Komponenten ... 176
4.3.1.1 Vorversuche zur Laccase-katalysierten Polymerisation von phenolischen Komponenten mit freier Laccase ... 177
4.3.1.2 Immobilisierung der Laccase und Charakterisierung der Immobilisate ... 181
4.3.1.3 Charakterisierung der Reaktionsprodukte nach Oxidation mit immobilisierter Laccase ... 187
4.3.1.4 Optimierung der Detoxifikation mit freier und immobilisierter Laccase ... 189
4.3.1.5 Beschreibung der Reaktionskinetik ... 191
4.3.1.6 Entwicklung einer In-Situ-Produkt-Rückgewinnung (ISPR) von polymerisierten Ligninen ... 193
4.3.2 Adsorptive Detoxifikation ... 199
4.3.2.1 Auswahl geeigneter Adsorber ... 199

4.3.2.2 Thermodynamische Charakterisierung der isothermen stationären Adsorption 203
4.3.2.3 Entfernung von phenolischen Komponenten mit hydrophoben Adsorbern im Festbettadsorber 206
4.3.2.4 Entfernung von organischen Säuren mit Anionenaustauschern im Festbettadsorber 211
4.3.3 Evaluierung der entwickelten Detoxifikationsverfahren anhand von Modellkultivierungen 216

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK 221

5.1 ZUSAMMENFASSUNG 221

5.2 AUSBLICK 225

6 LITERATURVERZEICHNIS 226

7 ANHANG 250

7.1 CHEMIKALIEN 250

7.2 ANALYTISCHE METHODEN 251

7.2.1 Feststoffbestimmung 251
7.2.2 Analyse der Zusammensetzung von Lignocellulosesubstraten 251
7.2.3 Analyse der Zusammensetzung von Aufschlusslösungen 252
7.2.4 Bestimmung von Monosacchariden, Lignocelluloseabbauprodukten, Alkoholen und organischen Säuren mittels HPLC-RI 252
7.2.5 Bestimmung der phenolischen Komponenten 252
7.2.6 Messung der Hydrolaseaktivitäten 253
7.2.6.1 Messung der Xylanaseaktivität 253
7.2.6.2 Messung der Filterpaperaktivität FPU (Cellulaseaktivität) 253
7.2.6.3 Messung der Arabinasektivität mit Red-Debranched Arabinan (RDA) 254
7.2.6.4 Messung der ß-Glukosidase, ß-Xylosidase und α-Arabinofuranosidaseaktivität 254
7.2.7 Messung der Laccaseaktivitäten 254
7.2.7.1 Messung der Laccaseaktivität des freien Enzyms 254
7.2.7.2 Messung der Laccaseaktivität der immobiliserten Laccase 255
7.2.8 Größenauschlusschromatographie von niedermolekularen Ligninen 255

7.3 STATISTISCHE VERSUCHSPLANUNG, RESPONSE SURFACE PLÄNE UND OPTIMIERUNG 256

7.4 OPTIMIERUNG DER VORBEHANDLUNGSVERFAHREN MITTELS STATISTISCHER VERSUCHSPLANUNG 258

7.4.1 Optimierung des NaOH-alklischen Aufschlusses von Weizenstroh 258
7.4.2 Optimierung des säurekatalysierten EtOH-Aufschlusses von Miscanthus 259
7.4.3 Optimierung des säurekatalysierten EtOH-Aufschlusses von Pappelholz 260

7.5 MODIFIED SEVERITY MODELLE 261

7.5.1 Modified Severity Modell für den NaOH-alkalischen Aufschluss von Weizenstroh 261
7.5.2 Modellgleichungen für Miscanthus 261
7.5.3 Modellgleichungen für Pappelholz 262

7.6 LACCASE KATALYSIERTE DETOXIFIKATION VON PHENOLISCHEN KOMPONENTEN 264

7.7 ADSORPTIVE DETOXIFIKATION 265

7.7.1 Auswahl von geeigneten Adsorbern 265

7.7.2 Thermodynamische Charakterisierung der ausgewählten Adsorber 266

7.8 ZUSATZ 269

8 WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE 270

9 LEBENSLAUF 272

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
µ	Mikro
a	Jahr
ABTS	2,2-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure
AFEX	Ammonia Fibre Expansion
AIEX	Anionenaustauscher
ARP	Ammonia Recycle Percolation
atro	Pro Trockenmasse
C	Kohlenstoff
C5	Zucker mit 5 Kohlenstoffatomen
C6	Zucker mit 6 Kohlenstoffatomen
$Ca(OH)_2$	Kalziumhydroxid
CBH	Cellobiohydrolyse
CIEX	Kationenaustauscher
CMC	Carboxymethylcellulose
DuoRaff	Doppelkammerautoklaven
DVB	Divinylbenzen
EC-EA	Aminofunktionalisierter Träger
EC-EP	Epoxyfunktionalisierter Träger
EG	Endoglukanase
et al.	und Mitarbeiter
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FPU	Filter Paper Units
GDA	Glutardialdehyd
h	Stunde
H^+	säurekatalysiert
H_20	Wasser
H_2SO_4	Schwefelsäure
ha	Hektar

HCl	Salzsäure
HFH	Hochfeststoffhydrolyse
HGS	p-Hydroxyphenyl-, Guaiacyl-, Syringylalkohol
HMF	Hydroxymethylfurfural
HPLC	High performance liquid chromatography
IEX	Ionenaustauscher
KOH	Kaliumhydroxid
KUP	Kurzumtriebsplantage
kWh	Kilowattstunde
L	Liter
LCB	Lignocellulose-Bioraffinerie
m	milli
m	Meter
max	maximal
MeOH	Methanol
min	minimal
Mio	Millionen
MJ	Megajoule
mod	modifiziert
mol	Molanzahl
MSM	Modified Sevrity Modell
N	Normal
Na_2CO_3	Natriumcarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NH_3	Ammoniak
O_2	Sauerstoff
OH-	basenkatalysiert
OS	Organosolv
pNP	para-Nitrophenol
$Q_{Residual}$	Summe der quadratischen Abweichungen
REM	Rasterelektronenmikroskop
RI	Brechungsindex
rpm	Drehzahl (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur

s	Sekunde
$scCO_2$	Überkritisches Kohlenstoffdioxid
SHF	Separate Hydrolysis Fermentation
SO_2	Schwefeldioxid
SSF	Simultaneous Saccharification Fermentation
t	Tonnen
T_R	Referenztemperatur
TS	Trockensubstanz
U	Units
w/v	Masse pro Gesamtvolumen
w/w	Masse pro Gesamtmasse
WL	Weizenlignin
XU	Xylanase Units
YM	Yeast Media (Hefe Medium)

Symbolverzeichnis

η	Kinematische Viskosität	Pa s
$\log R_0$	Severity-Faktor	
ζ_{liquid}	Solubilisierung in flüssige Phase	%
A	Extinktion	
c	Konzentration	g/L
D	Durchmesser	m
ρ	Dichte	kg/m^3
DO	Gelöstsauerstoff	mg/mL
E	Enzymkonzentration	g/g
ε	Extinktionkoeffizient	L/(mol cm)
EA	Aktivierungsenergie	J/ mol
ε_{tot}	Porosität der Adsorberschüttung	
ϕ	Feuchtegehalt	
F	Anteil Monomer zu Gesamtzucker	g/g
γ	Scherrate	1 /s
G	Freie Gibbs-Energie	J/mol
H	Füllhöhe	m
H_{ads}	Adsorptionsenthalpie	J/mol
k	Geschwindigkeitskonstante	1/s
K_m	Michaelis Menten Konstante	L/mol
k_{MO}	Metzner Otto Proporiotnalitätskonstante	
K_{MP}	Michaelis Menten Konstante Produkt	L/mol
K_{pI}	Konsistenzindex	
λ	Wellenlänge	nm
$\log M_0$	modifizierter Severity Faktor	
$\log R_0$	Severity-Faktor	
$\log R''_0$	erweiterter Severity Faktor	
m	Masse	kg
M	Drehmoment	Nm
n	Drehzahl	1/s
Ne	Newtonzahl	

$n\theta$	Dimensionslose Mischzeit	
P	Produktivität	g/(L h)
p	Druck	bar
P	Leistung	W
pH	pH-Wert	
q	Beladung des Adsorbers	mmol/g
Q_P	Ethanolproduktivität	g/(L h)
r	Reaktionsrate	mol/s
R	Allgemeine Gaskonstate	J/(mol K)
Re	Reynoldszahl	
R_{xylan}	Xylanwiederfindung	%
S	Selektivität	g/g
S	Entropie	J/(mol K)
T	Temperatur	°C
$t_{0,1}$	Durchbruchszeit	min
v	Enzymproduktbildungsgeschwindigkeit	g/(L s)
$V_{0,1}$	Durchbruchsvolumen	mL
V_{ads}	Adsorbervolumen	mL
V_{BV}	Schüttungsvolumen (Bedvolume)	mL
ω	Masseanteil	kg/kg_{Gesamt}
X	Umsatz	
Y	Ausbeute / Hydrolysierbarkeit	%

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ziel der Arbeit 9
Abbildung 2: Schematischer Aufbau und Struktur von Lignocellulose in der sekundären Zellwand von Pflanzenzellen (modifiziert nach [1]). 11
Abbildung 3: Struktur eines Cellulosemoleküls 12
Abbildung 4: Struktur von Xylan. 13
Abbildung 5: Struktureller Aufbau von Lignin (HGS Lingin) aus den monomeren C9 Bausteinen Coumaryl (H) Coniferyl (G) und Sinapylalkohol (S). Modifiziert nach [1]. 14
Abbildung 6: Vergleich einer Erdölraffinerie mit einer Bioraffinerie (modifiziert nach [9]).. 15
Abbildung 7: Prozessschema der LCB zur Nutzung aller anfallenden Stoffströme mit der Einordnung der vorliegenden Arbeit 16
Abbildung 8: Mögliche Produkte und Plattformchemikalien einer Lignocellulose-Bioraffinerie (LCB) (modifiziert nach [36, 37]) 17
Abbildung 9: Einteilung der vorhandenen Vorbehandlungsverfahren (modifiziert nach [51])22
Abbildung 10: Schematische Darstellung der enzymatischen Hydrolyse von Cellulose mit Endo- und Exoglukanasen sowie mit ß-Glukosidase nach [102]. 39
Abbildung 11: Schematische Darstellung der enzymatischen Hydrolyse von Arabinoxylan (Hemicellulose) mit Hilfe von Xylanasen (Endoxylanase und ß-Xylosidase) und Esterasen nach [24] 40
Abbildung 12: (A) Horizontaler Liquefaction Reaktor nach [53, 124, 125] mit fünf Reaktorkammern. (B) Reaktorsystem mit PEG-Mixer nach [127]. 44
Abbildung 13: Abbaureaktionen während der Vorbehandlung von Lignocellulose modifiziert nach [140]. 47
Abbildung 14: Einteilung der Detoxifikationsverfahren 50
Abbildung 15: (A) 13 L Batch-Autoklav mit Doppelmantel zur Wasserkühlung. (B) DuoRaff System bestehend aus zwei Druckreaktoren, die über ein Keramikscheibenventil miteinander verbunden sind. Quelle Fraunhofer ICT 61
Abbildung 16: Abmessungen des Doppelwandglasreaktionsgefäßes 74
Abbildung 17: Abmessungen (A) des Segmentwendel- und des Schrägblattrührers (B). 74

Abbildung 18: Reaktionsschema der enzymatischen Hydrolyse nach [209, 210]. Beteilige Enzyme bei den Reaktionsschritten r_1: Endo-ß-1,4-glucanase (E.C. 3.2.1.4) und Exo-ß-1,4-Cellobiohydrolyse (E.C.3.2.1.91). Bei r_2: Exo-ß-1,4-Cellobiohydrolyse (E.C.3.2.1.91) und Exo-ß-1,4-glycohydrolyase (E.C. 3.2.1.74). Bei r_3: ß- Glukosidase (E.C.3.2.1.21). 78
Abbildung 19: Fließbild der Adsorberanlage zur Detoxifikation von Aufschlusslösungen 86
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Durchbruchskurve mit markiertem Durchbruchsvolumen $V_{0,1}$ und Durchbruchszeit $t_{0,1}$. 86
Abbildung 21: Grundverfahrensfließbild des entwickelten Verfahrens zur selektiven Fraktionierung von Lignocellulose in Glukose-, Xylose- und Ligninproduktströme. . 91
Abbildung 22: Delignifizierung von Weizenstroh in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 18). 95
Abbildung 23: Xylansolubilisierung in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 18). 96
Abbildung 24: Xyloseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandelten Weizenstrohfasern mit Accellerase XY / Cellic HTec in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungs-versuch (siehe Tabelle 18). 98
Abbildung 25: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandelten Weizenstrohfasern mit Celluclast 1.5 L / Novozym 188 in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungs-versuch (siehe Tabelle 18). 99
Abbildung 26: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandelten Weizenstrohfasern in Abhängigkeit der Delignifizierung der Faserfraktion. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 18). 100
Abbildung 27: Delignifizierung von Miscanthus in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 19). 102
Abbildung 28: Xylansolubilisierung in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 19). 103

Abbildung 29: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandelten Miscanthusfasern in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. (siehe Tabelle 19). 104
Abbildung 30: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandelten Miscanthusfasern in Abhängigkeit der Delignifizierung der Faserfraktion. 105
Abbildung 31: Delignifizierung von Pappelholz in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuche (siehe Tabelle 20). 107
Abbildung 32: Xylansolubilisierung in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 20). 108
Abbildung 33: Xyloseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandeltem Pappelholz mit Accellerase XY / Cellic HTec in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 20). 110
Abbildung 34: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandeltem Pappelholz mit Celluclast 1.5 L / Novozym 188 in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0 110
Abbildung 35: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandeltem Pappelholz in Abhängigkeit der Delignifizierung von Papppelholz. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 20). 111
Abbildung 36: Delignifizierung von Weizenstroh in Abhängigkeit der Temperatur und der NaOH-Konzentration für eine Haltezeit von 30 min. 114
Abbildung 37: Xylansolubilisierung von Weizenstroh in Abhängigkeit der Temperatur und der NaOH-Konzentration für eine Haltezeit von 30 min. 115
Abbildung 38 Xylanausbeute in der Weizenstroh-Aufschlusslösung in Abhängigkeit der Temperatur und der NaOH-Konzentration für eine Haltezeit von 30 min. 116
Abbildung 39 Selektivität S (Xylose zu Gesamtzucker) in der Weizenstroh-Aufschlusslösung in Abhängigkeit der Temperatur und der NaOH-Konzentration für eine Haltezeit von 30 min. 117
Abbildung 40: Xyloseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandeltem Weizentroh mit Xylanasen in Abhängigkeit der Temperatur und der NaOH-Konzentration für eine Haltezeit von 30 min. 118

Abbildung 41: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandeltem Weizentroh mit Cellulasen in Abhängigkeit der Temperatur und der NaOH-Konzentration für eine Haltezeit von 30 min. 119
Abbildung 42: Delignifizierung von Miscanthus in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 60 min. 122
Abbildung 43: Xylansolubilisierung von Micanthus in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 60 min. 123
Abbildung 44: Xylanausbeute in der Miscanthus-Aufschlusslösung in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 60 min. 124
Abbildung 45: Selektivität von Xylose in der Miscanthus-Aufschlusslösung in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 60 min. 125
Abbildung 46: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandeltem Miscanthus mit Cellulasen in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 60 min. 126
Abbildung 47: Delignifizierung von Pappelholz in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 48 min. 129
Abbildung 48: Xylansolubilisierung von Pappelholz in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 48 min. 130
Abbildung 49: Xylanausbeute in der Pappelholz-Aufschlusslösung in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 48 min. 131
Abbildung 50: Selektivität von Xylose in der Pappelholz-Aufschlusslösung in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 48 min. 132
Abbildung 51: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandeltem Pappelholz mit Cellulasen in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 48 min. 132
Abbildung 52: (A) Xylansolubilisierung von Weizenstroh in Abhängigkeit von log $R''_{0.}$ (B) Xylansolubilisierung von Weizenstroh in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0 (R^2 = 0,92)..... 136
Abbildung 53: (A) Delignifizierung der Weizenstrohfaser in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0. (B) Xylanausbeute in der Aufschlusslösung in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0. (C) Xylanausbeute und (D) Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandelten Weizenstrohfasern mit Xylanasen bzw. Cellulasen in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0..... 137

Abbildung 54: Bilanzierung der Fraktionierung von Weizenstroh mit Hilfe des optimierten NaOH-Vorbehandlungsverfahrens gefolgt von der enzymatischen Hydrolyse der Faserfraktion mit Hilfe von Xylanasen und Cellulasen. 141
Abbildung 55: Bilanzierung der Fraktionierung von Miscanthus mit Hilfe des optimierten H^+-EtOH-Organosolv-Aufschlusses gefolgt von der enzymatischen Hydrolyse der Faserfraktion mit Hilfe von Cellulasen. 141
Abbildung 56: Bilanzierung der Fraktionierung von Pappelholz mit Hilfe des optimierten H^+-EtOH-Organosolv-Aufschlusses gefolgt von der enzymatischen Hydrolyse der Faserfraktion mit Hilfe von Cellulasen. 142
Abbildung 57: Ausbeute Y von Xylose und Xylooligosacchariden nach der enzymatischen Hydrolyse der LZ10 Faser (50 g/L) mit 600 XU/gTS bis 1500 XU/gTS Xylanasen nach 48 h Reaktionszeit. 146
Abbildung 58: Selektivität S und F-Faktor (Verhältnis Xylose zu Xylose und Xylosoligosacchariden) nach 48 h in Abhängigkeit der eingesetzten Xylanasen bei 1200 XU/gTS 147
Abbildung 59: (A) Ausbeute Y von Xylose, Selektivität S und F-Faktor (Verhältnis Xylose zu Xylose und Xylosoligosacchariden) nach 48 h in Abhängigkeit der eingesetzten Xylanasekombinationen. 148
Abbildung 60: Lineweaver Burk Auftragung der reziproken Anfangsreaktions-geschwindigkeit $1/v_0$ gegen 1/S 150
Abbildung 61: Ausbeute Y von Xylose in Abhängigkeit der Prozesszeit nach der enzymatischen Hydrolyse der LZ10 Faser (50 g/L) mit 1200 XU/gTS Accellerase XY (Acc XY) bzw. Cellic HTec (HTec) und der Kombination der beiden Präparate (jeweils 1200 XU/gTS). Bei einem Teil der Proben wurde nach 24 h das Hydrolysat entfernt und frische Enzymlösung dazugegeben (Hydrolysatentfernung). 151
Abbildung 62: Ausbeute Y von Xylose in Abhängigkeit der Prozesszeit nach der enzymatischen Hydrolyse unterschiedlich mechanisch vorbehandelter LZ10 Fasern (50 g/L) mit 1200 XU/gTS Accellerase XY und 1200 XU/gTS Cellic HTec. 152
Abbildung 63: Xyloseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse (t = 48 h) in Abhängigkeit des Feststoffgehalts (NaOH-alkalisch vorbehandelte Weizenstrohfaser, 180 °C, 30 min, 1,45 % NaOH) und der Accellerase XY-Dosierung bei einer Cellic HTec Dosierung von 1200 XU/gTS. 154
Abbildung 64: Ausbeute Y in Abhängigkeit der Prozesszeit nach der enzymatischen Hydrolyse der LZ10 Faser (50 g/L) mit 30 FPU/gTS Celluclast 1.5L (Celluclast),

Cellic CTec (CTec), Accellerase 1500 (Acc 1500) sowie 50 CBU/gTS Novozym 188 (Novo188)..... 158
Abbildung 65: Selektivität S und F-Faktor (Verhältnis Glukose zu Glukose und Glukooligosacchariden) nach 48 h in Abhängigkeit der eingesetzten Cellulasekombinationen. 158
Abbildung 66: Glukoseausbeute Y in Abhängigkeit der Prozesszeit nach der enzymatischen Hydrolyse der LZ16 Faser (50 g/L) mit 30 FPU/gTS Celluclast 1.5L (Celluclast) und Cellc CTec (CTec) sowie 50 CBU/gTS Novozym 188 (Novo188). 159
Abbildung 67: Glukoseausbeute in Abhängigkeit der Cellulasedosierung (Cellic CTec 2) und der Feststoffkonzentration nach 48 h enzymatischer Hydrolyse von NaOH-vorbehandeltem Weizenstroh (1,45 % NaOH, 180 °C, 30 min). 160
Abbildung 68: Glukoseausbeute in Abhängigkeit der Cellulasedosierung (Cellic CTec 2) und der Feststoffkonzentration nach 48 h enzymatischer Hydrolyse von H^+-EtOH-OS-vorbehandeltem Miscanthus (0,16 % H_2SO_4, 185 °C, 60 min, 50 % EtOH) 161
Abbildung 69: Glukoseausbeute in Abhängigkeit der Cellulasedosierung (Cellic CTec 2) und der Feststoffkonzentration nach 48 h enzymatischer Hydrolyse von H^+-EtOH-OS-vorbehandeltem Pappelholz (0,19 % H_2SO_4, 182 °C, 48 min, 50 % EtOH)..... 161
Abbildung 70: Zusammenhang zwischen dynamischer Viskosität η und der Feststoffkonzentration bei einer Scherrate von γ = 60 /s für NaOH-vorbehandeltes Weizenstroh..... 164
Abbildung 71: Dimensionslose Mischzeit in Abhängigkeit der Re-Zahl für den Schrägblattrührer und den Segmentwendelrührer. Als Analysemethode wurde eine Farbstoffschlierenmethode eingesetzt. 167
Abbildung 72: Abbildung des Homogenisierungszustandes von RBB nach 1 min für (A) den doppelstufigen Schrägblattrührer und (B) den Segmentwendelrührer bei 1,5 % CMC Lösung mit n = 80 rpm 168
Abbildung 73: Gemessene Leistungscharakteristik (Ne vs. Re) für den Schrägblattrührer und den Segmentwendelrührer. 169
Abbildung 74: Glukosekonzentration nach der enzymatischen Hydrolyse von mit NaOH behandelten Weizenstrohfasern Cellic CTec2 in Abhängigkeit des Feststoffgehalts für verschiedene Reaktionszeiten im 1 L-Reaktor mit dem Segmentwendelrührer (80 rpm, pH 5,0, 50 °C)..... 171
Abbildung 75: Gemessene Glukosekonzentration nach enzymatischer Hydrolyse von mit NaOH behandeltem Weizenstrohfasern mit 20 FPU/g_{TS} Cellic CTec2 und berechnetes

Multireaktionsmodell in Abhängigkeit der Reaktionszeit für verschiedene Feststoffkonzentrationen. 174
Abbildung 76: Reaktionsumsatz X nach 60 min für die Laccase- und Laccase-Mediator-katalysierte Oxidation (0,32 U/mL) verschiedener Modellsubstrate (1 mM) und der Aufschlusslösung LZ10 (20 mM phenolische Komponenten) in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,75) bei 45 °C. 178
Abbildung 77: Gelöstsauerstoffkonzentration (DO) in Abhängigkeit der Reaktionszeit für die Laccase-katalysierte Oxidation verschiedener Modellsubstrate und der Aufschlusslösung LZ10. 179
Abbildung 78: Chromatogramm der SEC-Analyse für die Laccase und Laccase-Mediator katalysierte Oxidation von Vanillinsäure (A) und der Aufschlusslösung LZ10 (B). . 180
Abbildung 79: Aktivität der Träger in Abhängigkeit der Laccasebeladung von epoxyfunktionalisierten Trägern EC-EP und aminofunktionalisierten Träger EC-EA. 182
Abbildung 80: Reaktionsumsatz X nach 60 min für die Laccase-katalysierte Oxidation verschiedener Modellsubstrate (4 mM) und der Aufschlusslösung LZ10 (20 mM phenolische Komponenten) in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,75) bei 45 °C mit freier und immobilsierter Laccase (0,32 U/mL) 183
Abbildung 81: Umsatz X nach wiederholter Laccase-katalysierter Oxidation von Acetosyringon mit den Immobilisaten EC-EP und EC-EA. Beide Träger wurden nach der Immobilisierung ebenfalls mit Glutardialdehyd quervernetzt (EC-EP mod und EC-EA mod). Ein Reaktionszyklus bestand aus einer Laccase-katalysierte Oxidation von 4 mM Acetosyringon für 60 min in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,75) bei 45 °C mit immobilisierter Laccase (0,32 U/mL). 184
Abbildung 82: Umsatz X nach wiederholter Laccase-katalysierter Oxidation von phenolischen Komponenten aus LZ10 bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen (5 mM -25 mM phenolische Komponenten). Ein Reaktionszyklus bestand aus einer Laccase-katalysierten Oxidation für 60 min in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,75) bei 45 °C mit immobilisierter Laccase EC-EA (0,32 U/mL). 185
Abbildung 83: REM-Aufnahme eines EC-EA-Trägerpartikels nach einer Laccase-katalysierten Umsetzung einer Organosolv-Aufschlusslösung mit 20 mM phenolischen Komponenten. 188

Abbildung 84: (A) Reaktionsumsatz in Abhängigkeit der Konzentration an phenolischen Komponenten und der Laccasedosierung für die freie Laccase (A) und die immobilisierte Laccase EC-EA (B). 190
Abbildung 85: Gemessene Konzentrationen an phenolischen Komponenten in Abhängigkeit der Reaktionszeit für die freie (A) und immobilisierte Laccase (B) und die berechneten Konzentrationsverläufe 192
Abbildung 86: Extinktion E_{230nm} der gelösten polymerisierten phenolischen Komponenten in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration und der Inkubationstemperatur bei 15 min Inkubationszeit. 194
Abbildung 87: Extinktion E_{230nm} der gelösten polymerisierten phenolischen Komponenten in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration und der Inkubationstemperatur bei 30 min Inkubationszeit. 195
Abbildung 88: Reaktionsumsatz X nach 60 min nach der Ethanol-Waschung der Immobilisate mit den angegebenen Ethanolkonzentrationen und Temperaturen für eine Inkubationsdauer von 15 min (A) und 30 min (B). 196
Abbildung 89: Umsatz von 25 mM phenolischen Komponenten in Abhängigkeit der Reaktionszyklen für die EtOH-gewaschenem bzw. nicht EtOH-gewaschenen Immobilisate. 197
Abbildung 90: REM-Aufnahmen vor und nach der EtOH-Waschung der Immobilisate. (Anzahl der Reaktionszyklen n = 2). 198
Abbildung 91: Abtrennung von phenolischen Komponenten bei der Verwendung der hydrophoben Adsorber MN105 bzw. MN202 und den Anionenaustauschern A860, Dowex 1x4, A103S und A500MBOH für unterschiedliche pH-Werte. 200
Abbildung 92: Abtrennung von Ameisensäure bei der Verwendung der hydrophoben Adsorber MN105 bzw. MN202 und den Anionenaustauschern A860, Dowex 1x4, A103S und A500MBOH für unterschiedliche pH-Werte. 201
Abbildung 93: Gleichgewichtsbeladung der phenolischen Komponenten auf MN202 in Abhängigkeit der Gleichgewichtskonzentration c für unterschiedliche Adsorptions-temperaturen. 204
Abbildung 94: Linearisierte Arrhenuiskurven für unterschiedliche Beladungen q. 204
Abbildung 95: Durchbruchsvolumen $V_{0,1}$ in Abhängigkeit der Konzentration an phenolischen Komponenten am Adsorbereingang c0 und des Durchflusses. 208
Abbildung 96: Durchbruchszeit $t_{0,1}$ in Abhängigkeit der Konzentration von phenolischen Komponenten am Adsorbereingang und in des Durchflusses. 208

Abbildung 97: Messwerte zum Durchbruchsverhalten eines MN202-Festbettadsorbers bei optimalen Betriebsbedingungen (c_0 = 20 mM und 1,6 mL/min) sowie das entsprechende kinetische Modell nach Thomas. 209
Abbildung 98: Durchbruchsvolumen $V_{0,1}$ in Abhängigkeit der Konzentration an Ameisensäure am Adsorbereingang und der Durchflussrate bei einer Essigsäurekonzentration von 5,5 g/L. 212
Abbildung 99: Durchbruchszeit $t_{0,1}$ in Abhängigkeit der Konzentration an Ameisensäure am Adsorbereingang und der Durchflussrate bei einer Essigsäurekonzentration von 5,5 g/L..... 212
Abbildung 100: Vergleich der kinetischen Modelle von Bohart-Adams, Clark, Thomas, Wolborska und Yoon Nelson zur Beschreibung der Durchbruchskurve von Ameisensäure (c_0 = 3,0 g/L) bei 2,7 mL/min und einer Essigsäurekonzentration von 5,5 g/L..... 213
Abbildung 101: Gemessene Messpunkte und die mit dem Thomas-Modell vorhergesagte Durchbruchskurve für Ameisensäure (c_0 = 3,0 g/L) bei verschiedenen Durchflussraten. Die Essigsäurekonzentration betrug in allen Fällen 5,5 g/L..... 214
Abbildung 102: Überblick über die durchgeführten Verfahrensvarianten zur Detoxifikation der Weizenstroh-Organosolv-Aufschlusslösung LZ16. 216
Abbildung 103: Ethanolproduktivität von *P. stipitis* im Referenzmedium (Mineralmedium 50 g/L Xylose) und in den nicht detoxifizierten und detoxifizierten Kultivierungsmedien mit Xylose 50 g/L als einzige C-Quelle. 219
Abbildung 104: Zusammenhang zwischen Einflussgrößen, Störgrößen und Zielgrößen bei einem allgemeinen Prozessschema..... 256
Abbildung 105: Schematische Darstellung des Versuchsraums eines Response Surface Plans am Beispiel des alkalischen Aufschlusses von Weizenstroh [306]..... 257
Abbildung 106: (A) Xylansolubilisierung in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0. (B) Delignifizierung der Miscanthusfaser in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0..... 261
Abbildung 107: (A) Xylanausbeute in der Aufschlusslösung in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0. (B) Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse der vorbehandelten Miscanthusfaser mit Cellulasen in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0..... 262
Abbildung 108: (A) Xylansolubilisierung. (B) Delignifizierung und. (C) Xylanausbeute in der Aufschlusslösung in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0. (D)

Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse der vorbehandelten Miscanthusfaser mit Cellulasen in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors $M_{0.}$..... 263
Abbildung 109: Chromatogramm der SEC-Analyse für die Laccase und Laccase-Mediator katalysierte Oxidation von Vanillin (A) und Acetosyringon (B). 264
Abbildung 110: (A) Abtrennung von (A) HMF (B) Furfural, (C) Lävulinsäure und (D) Essigsäure aus der Modellmischung in Abhängigkeit des pH-Werts für die jeweiligen Adsorber bzw. Anionentauscher bei 30 °C und 16 h Inkubationszeit..... 265
Abbildung 111: Adsorptionsisothermen und Arrheniuskurven von HMF (A+B), Furfural (C+D), Ameisensäure (E+F) und Essigsäure (G+H). Für Furfural und HMF wurde die Isotherme nach Langmuir und für Essigsäure die Isotherme nach Redlich verwendet. 266

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung über existierende oder geplante Lignocellulose-Bioraffinerien in Europa. [12] 18
Tabelle 2: Derzeitige Biomasseproduktion (Mio. t/ha), Ertragsniveau (t/ha/a), Brennwert (kWh/kg) sowie Ernteintervalle bzw. Erntezeit für Weizenstroh, Miscanthus und Pappel. 20
Tabelle 3: Überblick zu den eingesetzten Vorbehandlungsverfahren zum Aufschluss von Lignocellulose. 25
Tabelle 4: Überblick zu den eingesetzten Vorbehandlungsverfahren zum Aufschluss von Weizenstroh 27
Tabelle 5: Überblick zu den eingesetzten Vorbehandlungsverfahren zum Aufschluss von Miscanthus 31
Tabelle 6: Überblick zu den eingesetzten Vorbehandlungsverfahren zum Aufschluss von Pappelholz 34
Tabelle 7: Verwendete Enzyme, deren Hauptaktivitäten und optimale Betriebsbedingungen 58
Tabelle 8: Chemische und physikalische Eigenschaften der verwendeten Träger zur Immobilisierung der Laccase. 58
Tabelle 9: Eigenschaften der verwendeten Adsorber 59
Tabelle 10: Spezifikation der eingesetzten Festbettadsorber 59
Tabelle 11: Zusammensetzung der verwedeten Kultivierungsmedien 60
Tabelle 12: Übersicht Vorbehandlungsversuche von Weizenstroh 66
Tabelle 13: Übersicht über Vorbehandlungsversuche von Miscanthus und Pappelholz 67
Tabelle 14: Haupteinflussfaktoren und deren Wertebereiche für die Erstellung der statistischen Versuchspläne mit Design Expert V 8.0 68
Tabelle 15: Geometrische Verhältnisse der eingesetzten Rührreaktorsysteme 75
Tabelle 16: Zusammensetzung der ethanolfreien Aufschlusslösungen (Aufkonzentrierungsfaktor 2), die für die Detoxifikationsexperimente (siehe Kapitel 4.3.2) eingesetzt wurden 81
Tabelle 17: Einfache dynamische Modelle zur Vorhersage des Durchbruchsverhaltens 89
Tabelle 18: Übersicht über die Betriebsbedingungen der durchgeführten Versuche zur Vorbehandlung von Aceton-extrahiertem Weizenstroh. Hierbei ist $\log R''_0 = \log R_0 + |pH-7|$ und $\log R_0 = t*\exp(T-100°C/14{,}75)$. 94

Tabelle 19: Übersicht über die Betriebsbedingungen der durchgeführten Vorbehandlungsversuche zur Vorbehandlung von Miscanthus. Hierbei ist log R''_0 = log R_0 + |pH-7| und log R_0 = t*exp (T-100°C/14,75). 101

Tabelle 20: Übersicht über die Betriebsbedingungen der durchgeführten Vorbehandlungsversuche zur Vorbehandlung von Pappelholz. Hierbei ist log R''_0 = log R_0 + |pH-7| und log R_0 = t*exp (T-100°C/14,75). 106

Tabelle 21: Vergleich der vorhergesagten Modellwerte und experimentellen Daten für den Aufschluss von Weizenstroh mit 1,45 % NaOH bei 180 °C und 30 min. STABW entspricht der Standardabweichung für n = 2. Die relative Abweichung ergab sich aus der Abweichung von Modell und Experiment bezogen auf den experimentellen Wert. 121

Tabelle 22: Vergleich der vorhergesagten Modellwerte und experimentellen Daten des H^+ EtOH-Organosolv-Aufschlusses von Miscanthus bei 50 % EtOH, 0,16 % H_2SO_4, 185 °C und 60 min. STABW entspricht der Standardabweichung für n=2. Die relative Abweichung ergab sich aus der Abweichung von Modell und Experiment bezogen auf den experimentellen Wert..... 127

Tabelle 23: Vergleich der vorhergesagten Modellwerte und experimentellen Daten des H^+ EtOH-Organosolv-Aufschlusses von Pappelholz bei 50 % EtOH, 0,19 % H_2SO_4, 182 °C und 48 min. STABW entspricht der Standardabweichung für n=2. Die relative Abweichung ergab sich aus der Abweichung von Modell und Experiment bezogen auf den experimentellen Wert..... 133

Tabelle 24: Vergleich der vorhergesagten Zielgrößen (MSM Modell) mit den gemessenen Zielgrößen nach Aufschluss von Weizenstroh im 13 L-Autoklaven. Die relative Abweichung ergab sich aus der Abweichung von Modell und Experiment bezogen auf den experimentellen Wert..... 140

Tabelle 25: Übersicht über die gemessenen Enzymaktivitäten der untersuchten Xylanasepräparate 145

Tabelle 26: Literaturvergleich der erzielten Xyloseausbeute Y, Selektivität S und dem Anteil an Xylose an der gesamten Menge an löslichen Xylosacchariden (F-Faktor) nach enzymatischer Hydrolyse von vorbehandeltem Weizenstroh. 155

Tabelle 27: Übersicht über die gemessen Enzymaktivitäten der untersuchten Cellulasepräparate 157

Tabelle 28: Vergleich der Hochfeststoffhydrolyse im Schüttelkolben mit 15 % TS. 162

Tabelle 29: Benötigte Cellulasedosierung Cellic CTec 2 zum Erreichen einer Glukoseausbeute von 70 % innerhalb von 48 h. Neben der Enzymdosierung sind die einzusetzende Feststoffkonzentration und die erzielbare Glukosekonzentration aufgelistet. 163
Tabelle 30: Konsistenzindex K und Fließindex m des Ostwald de Waele-Potenzgesetzes für die Fasersuspensionen von NaOH-vorbehandeltem Weizen bei unterschiedlichen Feststoffkonzetrationen 165
Tabelle 31: Vergleich der Glukoseausbeute und der Zeit der Verflüssigung des Reaktionsansatzes zwischen Schüttelkolben und 1 L-Rührreaktorsystem für die mit NaOH vorbehandelten Weizenstrohfasern (20 % TS). Die enzymatische Hydrolyse wurde bei 50 °C mit 20 FPU/g_{TS} Cellic CTec 2 bei pH 5 durchgeführt. 170
Tabelle 32: Vergleich der erzielten Glukoseausbeuten bei der Hochfeststoffhydrolyse mit unterschiedlichen Reaktorsystemen. 172
Tabelle 33: Ermittelte Adsorptionsisothermen und die jeweiligen Bestimmtheitsmaßen R^2 205
Tabelle 34: Kinetische Parameter für die Modelle nach Bohart-Adams, Clark und Thomas zur Vorhersage der Durchbruchskurve von phenolischen Komponenten (20 mM) bei 1,6 ml/min..... 210
Tabelle 35: Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten Detoxifikationsverfahren mit Daten aus der Literatur..... 218
Tabelle 36: Verwendete Chemikalien 250
Tabelle 37: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Optimierung des NaOH-alkalischen Aufschlusses von Weizenstroh..... 258
Tabelle 38: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Optimierung des H+ EtOH-Organosolv-Aufschlusses von Miscanthus..... 259
Tabelle 39: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Optimierung des H^+-EtOH-Organosolv-Aufschlusses von Pappelholz 260
Tabelle 40: Berechnete kinetische Konstanten für die Laccase-katalysierte Oxidation von phenolischen Komponenten in der Aufschlusslösung LZ10 mit freier und immobilsierter Laccase (Träger EC-EA)..... 265
Tabelle 41: Thermodynamische Daten zur Adsorption der phenolischen Komponenten auf MN202..... 267
Tabelle 42: Thermodynamische Daten zur Adsorption der HMF auf MN202. 267
Tabelle 43: Thermodynamische Daten zur Adsorption der Furfural auf MN202..... 267

Tabelle 44: Thermodynamische Daten zur Adsorption der Essigsäure auf A103S. 268
Tabelle 45: Thermodynamische Daten zur Adsorption der Formiat auf A103S. 268

Zusammenfassung

Aufgrund der unausweichlichen Verknappung der fossilen Rohstoffe und den zunehmenden klimatischen Auswirkungen von Treibhausgasen wird in Zukunft die nachhaltige Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen immer bedeutender werden. Ein Ansatzpunkt wird hierbei die stoffliche und energetische Nutzung von Lignocellulose darstellen, denn mit ihrer weltweiten Produktionsrate von 150 Milliarden Tonnen / a bietet Lignocellulose das größte Rohstoffpotential der Erde dar, das bisher nur unzureichend stofflich und energetisch genutzt wird [1].

Ziel dieser Arbeit war demnach die Entwicklung von Verfahren und Prozessmodellen zur Gewinnung von getrennten Glukose-, Xylose- und Ligninproduktströmen aus ausgewählten lignocellulosehaltigen Rohstoffen. Die entwickelten Verfahren sollten dabei die Grundlage für eine Lignocellulose-Bioraffinerie darstellen. Die gewonnenen Glukose-, Xylose- und Ligninfraktionen sollten zudem hohe Reinheitsgrade aufweisen, damit in den Folgeprozessschritten, wie beispielsweise der chemischen Konversion von Xylose zu Xylitol, keine Nebenprodukte aufgrund von Verunreinigungen auftreten.

Zur Realisierung dieser Zielsetzung mussten folgende Einzelprozesse entwickelt, optimiert und zu einem Gesamtverfahren verknüpft werden

- die Vorbehandlung der lignocellulosehaltigen Rohstoffe Weizenstroh, Miscanthus und Pappelholz,
- die enzymatische Hydrolyse der Cellulose in der vorbehandelten Faserfraktion bei möglichst hohen Feststoffkonzentrationen und
- die Abtrennung von Lignocellulose-Abbauprodukten aus den hemicellulosehaltigen Aufschlusslösungen.

Ein Vergleich verschiedener Vorbehandlungsverfahren zu Beginn der Untersuchungen zeigte, dass die Wirkungsweise eines Vorbehandlungsverfahrens vom eingesetzten Rohstoff abhing. Während für Weizenstroh ein NaOH-Aufschluss zu einer effizienten Fraktionierung führte, konnten Miscanthus und Pappelholz mittels eines säurekatalysierten Ethanol-Organosolv-Prozesses effektiv aufgeschlossen werden. Der alkalische Aufschluss von Weizenstroh führte zu keiner vollständigen Xylansolubilisierung, so dass in einem zweiten Vorbehandlungsschritt

die Xylanfraktion selektiv mit Xylanasen entfernt wurde. Hierzu wurden die Enzyme Cellic HTec und Accellerase XY ausgewählt. Diese konnten die Xylanfraktion in der Weizenstrohfaser selektiv zu Xylose hydrolysieren.
Die Optimierung der Aufschlussmethoden erfolgte anschließend mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung. Um die relevanten Zielgrößen wie beispielsweise die Delignifizierung oder Glukoseausbeute vorhersagen zu können, wurde das sogenannten Modified Severity Modell MSM entwickelt. Mit Hilfe dieses Modells wurde der alkalische Aufschluss von Weizenstroh von einem 1 L-Reaktor auf einen 13 L-Reaktor übertragen.

Nachdem die Vorbehandlung der Rohstoffe Weizenstroh, Miscanthus und Pappelholz optimiert und entsprechende Prozessmodelle erstellt wurden, wurde die enzymatische Hydrolyse der vorbehandelten Cellulosefaser bei hohen Feststoffkonzetrationen betrachtet. Die kommerzielle Cellulase Cellic CTec konnte als geeignetes Präparat identifiziert werden, um innerhalb von 48 h eine Glukoseausbeute von 70 % bei einer Feststoffkonzentration > 10 % TS zu erreichen.
Versuche im Schüttelkolben zeigten, dass mit steigendem Feststoffgehalt die Ausbeuten aufgrund der höheren Viskositäten sanken. Somit musste für die Prozessentwicklung eine Intensivierung des Stofftransportes realisiert werden. Aus diesem Grund wurde das Reaktionssystem von einem Schüttelkolben auf ein skalierbares Rührreaktorsystem übertragen. Hierfür wurden ein doppelstufiger Schrägblattrührer und ein Segmentwendelrührer eingesetzt, die speziell für die Hochfeststoffhydrolyse konzipiert wurden. Mit Hilfe von grundlegenden Untersuchungen zum Leistungseintrag und zur Mischzeitcharakteristik konnte festgestellt werden, dass der Segmentwendelrührer bei hohen Viskositäten ein besseres Homogenisierungsverhalten zeigte als der Schrägblattrührer.
Die Hydrolyse von Lignocellulose-Substraten im Hochfeststoffhydrolysereaktor wurde anschließend am Beispiel von alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh durchgeführt. Das in dieser Arbeit entwickelte Reaktorkonzept konnte im Vergleich zu Reaktorsystemen aus der Literatur sehr effizient lignocellulosehaltige Substrate bei hohen Feststoffgehalten > 10 % TS innerhalb von 48 h hydrolysieren. Die anschließende Beschreibung der Reaktionskinetik wurde mit dem sogenannten Multireaktionsmodell beschrieben. Das Modell wurde dabei modifiziert, um Reaktionen, die unter Stofftransportlimitation ablaufen, ebenfalls beschreiben zu können.

Zur Abtrennung von inhibierenden Lignocellulose-Abbauprodukten, wie beispielsweise Furfural, HMF, organischen Säuren oder phenolischen Komponenten, wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl Laccase-katalysierte als auch adsorptive Detoxifikationsverfahren entwickelt und angewendet.

Bei Verwendung der immobilisierten Laccase konnten die phenolischen Komponenten durch Polymerisation auf der Trägeroberfläche adsorbiert werden. Die unlöslichen Reaktionsprodukte konnten mit einer Ethanol-Wasser-Mischung resolubilisiert werden, ohne dass es zu einer zusätzlichen Inaktivierung der Laccase kam. Der hydrophobe Adsorber MN202 konnte selektiv die hydrophoben Abbauprodukte mit steigender Hydrophobizität (HMF < phenolische Komponenten < Furfural) aus wässrigen Aufschlusslösungen entfernen. Organische Säuren wurden jedoch weder bei der Verwendung der Laccase noch bei dem Einsatz von MN202 entfernt. Mit Hilfe des Anionenaustauschers A103S konnte in einem zweiten Schritt zusätzlich Ameisensäure effektiv abgetrennt werden, so dass als Verfahrensvarianten einstufige und zweistufige Detoxifikationsverfahren zur Auswahl standen. Die Detoxifikationswirkung der entwickelten Verfahren wurde abschließend anhand der Kultivierung von *P. stipitis* in einer Organosolv-Aufschlusslösung untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass alle Detoxifikationsverfahren die Ethanolproduktivität von 0,13 g/(L*h) auf 0,18 - 0,22 g/(L*h) in der Reihenfolge Laccase < Laccase+A103S, MN202+A103S < MN202 steigern konnten.

Abstract

In future the sustainable utilisation of renewable feedstocks will become more important due to the unavoidable shortage of the fossile resources and the increasing climate changes caused by release of the greenhouse gases. With its three main fraction, cellulose, hemimcellulose and lignin, lignocellulose provides a huge potential as renewable industrial feedstock. In contrast to sugar and starch plants, its usage is not competing with food and feed industry.
Therefore the aim of the work was to establish new processes and processs models for the effiecient and selective fractionation of selected ligncellulose feedstocks to pure product streams of glucose, xylose and lignin. Consequently, consecutive unit operations like chemical conversion or fermentation of bio-based products would be more selective.

For this purpose following single unit operations had to be developed, optimized and combined to a whole process conversion process:

- pretreatment of the lignocellulosic feedstock wheat straw, Miscanthus and poplar wood
- enzymatic hydrolysis of the pretreated fibres at high solid content
- separation of the lignocellulosic degradation products from the pretreatment hydrolysates

By comparing several pretreatment methods it could be stated out, that the pre-treatment step was depending on the type of lignocellulosehaltige Substrate. Wheat straw could be successfully pretreated by a NaOH method, whereas the accessibility of miscanthus and poplar wood was significantly increased by an acid catzalyzed ethanol organosolv process. The alkaline treatment of wheat straw did not fully solubulize the Xylane fraction, consequently a selective xylanase mixture consisting of Accellerase XY and Cellic HTec, was used to further hydrolyze the Xylane fraction in the residual fibre.
The preatment methods were then optimized by a response surface plan. Additionally, the relevant pretreatment parameters like delignification or hydrolysis yield were described by a modified severity factor, which combined the influence of temperature, reaction time or OH^- resp. H^+ concentration to a single characterstic process number. To demonstrate the

applicability of the modified severity factor for a model prediction, the alkaline pretreatment of wheat straw was exemplarily transfered from a 1 L to an 13 L autoclave.

After the pretreatment of whet straw, Miscanthus and poplar wood the enzymatic hydrolysis of the fibre at a igh solid content was investigated. The enzyme Cellic CTec was able to hydrolyse the fibres within 48 h to give a yield of > 70 % at solid content of > 10 % dry matter. Shaking flask experiments revealed a decrease of glucose yield with increasing solid content, because the slurry viscosities increased. Consequently, an appropriate reaction system had to intensify the mass transport within the slurry. For this reason a scalable stirred tank reactor was chosen. A helical segemented and a diagonal flat blade stirrer were investigated as possible stirring geometries for high solid hydrolysis. The helical stirrer showed a better mixing behavoir when homogenizing high viscous fluids. Therefore it was chosen for the enzymatic hydrolysis.

The hydrolysis at high solid content was exemplarily demonstrated with NaOH pretreated wheat straw fibres. In comparison to literature, the devoleped reaction system could effectively hydrolyse the pretreated wheat straw within 48 h at solid contents > 10 % dry matter. The reaction kinetics were described by a multi reaction model to predict the time curve of the glucose. For reactions at high solid content, the multi reaction model was modified to include mass transport limitations.

Immobilized Laccase and different adsorbers were for the separation of ligncellulose degradation products like furfural, HMF, orgaic acids or phenilic compounds within the pretreatment hydrolysates.

The imobilized Laccase could selectively oxidize the phenolic compound to give insoluble products that were precipited onto the carrier surface. By using an ethanol water mixture these insoluble reaction products could be reversible removed from thesurface without any further inactivation of the Laccase. The hydrophobic adsorber MN202 could remove hydrophobic substances, whearas organic acids could not be removed efficiently. Therefore the anion exchanger A103S was selected to further remove the organic acids, mainly formic acid, in a second process step. The cultivation of *P. stipitis* in detoxified pretreatment hydrolysate was susbsequently investigated to evaluate the detoxification potential of the different methods. It could be pointed out that all methods were able to restore the fermentability of the pretreatment hydrolysate. The ethanol productivities increased in the order of laccase <

laccase+A103S< MN202 < MN202+A103S and were in the rage of known productivities from literature.

1 Einleitung und Zielsetzung

In diesem Kapitel soll ein Überblick über das Thema gegeben werden. Anschließend soll die Zielstellung der Arbeit dargelegt werden.

1.1 Einleitung und Motivation

Traditionell wurden nachwachsende Rohstoffe wie Zucker, Stärke oder Cellulose aus Holz bis zum Anfang des 20. Jahrhunderts genutzt. So wurde beispielsweise Holz eingesetzt, um Kohle, Gas bzw. Chemikalien wie Essigsäure oder Methanol durch Verkohlung herzustellen [2]. Mit der Nutzung von Kohle zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde die Verwertung nachwachsender Rohstoffe immer unbedeutender, bis schließlich Mitte des 20. Jahrhunderts das Erdöl und Erdgas zu der bedeutendsten Energie- und Rohstoffquelle wurde. Die fossilen Ressourcen werden heutzutage im Energiesektor und als Rohstoffquelle für die Produktion von Chemikalien genutzt. Hierbei ist der Anteil der energetischen Nutzung (Kraftstoffe und Energie) mit 96 % weitaus größer als der Anteil der stofflichen Nutzung mit 4 % [3].

Die Endlichkeit der fossilen Rohstoffe ist seit mehreren Jahren bekannt. So wird vermutet, dass das Fördermaximum von Rohöl etwa in den Jahren zwischen 2020 und 2050 erreicht sein wird [4]. Aufgrund der unausweichlichen Verknappung sowie der steigenden Nachfrage nach Rohöl sind die Kosten der fossilen Energie- und Rohstoffressourcen in den letzten Jahren enorm gestiegen. Neben aufkommenden wirtschaftlichen Problemen bewirkt die Nutzung fossiler Rohstoffe eine Freisetzung von klimarelevanten Gasen wie beispielsweise CO_2. Dies führte in den letzten Jahrzehnten zu Veränderungen des Weltklimas. Seit dem Kyoto-Protokoll existieren daher Verpflichtungen, die Mengen an klimarelevanten Gasen deutlich zu reduzieren. Für Deutschland wurde beispielsweise eine Reduktion der klimarelevanten Gase von 21 % festgeschrieben. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren die nachhaltige Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen immer wichtiger [5-7].

Als nachwachsende Rohstoffe werden derzeit sowohl ölhaltige als auch zuckerhaltige Pflanzen wie beispielsweise Raps, Getreide, Zuckerrüben oder Mais für energetische und stoffliche Zwecke genutzt. Die Anbauflächen dieser Nutzpflanzen stiegen daher in den letzten Jahren in Deutschland deutlich von 0,5 Mio. ha auf 2,2 Mio. ha an [3]. Mit fortschreitender Nutzung dieser nachwachsenden Rohstoffe wird zukünftig jedoch ein Konflikt zwischen der stofflichen und nahrungsmitteltechnischen Nutzung unvermeidbar. Nachdem die landwirtschaftlichen Anbauflächen ebenfalls begrenzt sind, wird auch ein Konflikt bei der

Nutzung der Anbauflächen auftreten. Daher ist die Entwicklung von Prozessen, die nachwachsende Rohstoffe einsetzen, welche nicht in Konkurrenz zur Lebensmittel- und Futtermittelindustrie stehen, eine Vorraussetzung zur Schaffung einer nachhaltigen Energie- und Rohstoffversorgung.

Aus diesem Grund wird als Rohstoffalternative in der Forschung und Entwicklung die Nutzung von Lignocellulose untersucht. Lignocellulose ist der Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand und besteht aus den Zuckerpolymeren Hemicellulose und Cellulose sowie dem aromatischen Polymer Lignin. Somit bietet Lignocellulose theoretisch eine nachwachsende Rohstoffquelle für zuckerbasierte und phenolbasierte Plattformchemikalien und Werkstoffe. Neben der stofflichen Nutzung kann Lignocellulose ebenfalls zur energetischen Nutzung eingesetzt werden.

Die jährliche Produktionsrate von Lignocellulose beträgt etwa 150 Milliarden Tonnen [8]. Demzufolge ist Lignocellulose ein nachwachsender Rohstoff mit dem größten Biomassepotential. Dennoch werden derzeit nur 3 % der gesamten Biomasse, vor allem im Bereich der Holz- und Zellstoffindustrie, stofflich genutzt [9]. Als mögliche Quellen von lignocellulosehaltigen Substraten kommen landwirtschaftliche Abfälle (beispielsweise Getreidestroh), holzwirtschaftliche Abfälle (Sägespäne, Holzverschnitt), kommunale oder industrielle Abfälle (Kartonagen, Restpapier), aber auch spezielle Biomassepflanzen wie Miscanthus (Riesen-Chinaschilf) in Frage. Darüber hinaus besteht ein beträchtliches Potential in der Nutzung von Waldbeständen. So besteht in Deutschland ein jährliches Biomassepotential von Buchenholz von 12 Mio.t atro [10]. Aber auch Anbaukonzepte der Agroforstwirtschaft wie Kurzumtriebsplantagen können genutzt werden, um weitere Rohstoffpotentiale nachhaltig zu erschließen [11].

In der Forschung wurde in den letzten Jahren das Konzept der Lignocellulose-Bioraffinerie (LCB) entwickelt. Analog zu einer erdölbasierten Raffinerie sollen die eingehenden Rohstoffe selektiv aufgetrennt, modifiziert und durch Konversionsverfahren zu lagerfähigen Zwischenprodukten umgewandelt werden. Anschließend können die Stoffströme sowohl stofflich als auch energetisch genutzt werden [9, 12-14]. Eine LCB würde somit aufgrund der Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen einen wesentlichen Beitrag zur Reduzierung von CO_2-Emissionen leisten. Zudem stellt die LCB eine echte Alternative zu den petrochemischen Raffinerien dar, nachdem sowohl Energieträger als auch biobasierte Produkte gewonnen werden könnten.

1.2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von Verfahren und Prozessmodellen zur Gewinnung von Glukose-, Xylose- und Ligninproduktströmen aus lignocellulosehaltigen Rohstoffen. Als Rohstoffe wurden Weizenstroh, Miscanthus und Pappelholz eingesetzt. Die gewonnenen Glukose-, Xylose- und Ligninfraktionen sollten hohe Reinheitsgrade aufweisen, damit in den Folgeprozessschritten einer zukünftigen LCB keine Nebenprodukte aufgrund von Verunreinigungen auftreten.

Zur Umsetzung der Zielvorgabe mussten Einzelverfahren entwickelt, optimiert und zu einem Gesamtprozess verknüpft werden. Die grundlegenden Einzelverfahren bestanden aus (1) der Entfernung von Lignin und Hemicellulose durch Vorbehandlung der Lignocellulose, (2) der enzymatischen Hydrolyse der vorbehandelten cellulosereichen Faserfraktion bei möglichst hohen Feststoffkonzentrationen und (3) der Abtrennung von Lignocellulose-Abbauprodukten aus der hemicellulosehaltigen Aufschlusslösung (Detoxifikation) zur Steigerung der Fermentierbarkeit (siehe Abbildung 1).

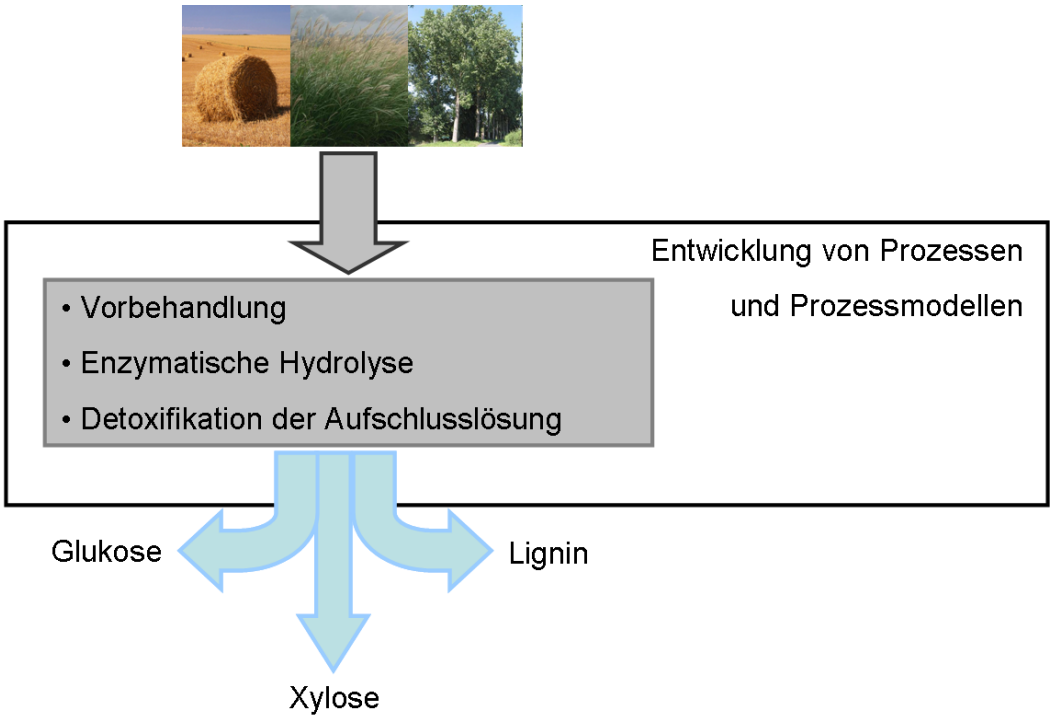


Abbildung 1: Ziel der Arbeit

Zum Erreichen des Gesamtziels wurden folgende Unterziele formuliert:

- Entwicklung einer Vorbehandlungsmethode zur selektiven Fraktionierung von Weizenstroh, Miscanthus und Pappelholz in die Produktströme Cellulose, Xylan und Lignin. Die zu erzielende Selektivitäten der Zuckerströme sollten hierbei > 0,9 $g/g_{Gesamtzucker}$ mit Ausbeuten von Glukose > 70 % und Xylose > 60 % betragen. Während des Prozesses sollte darüber hinaus Lignin mit einer Reinheit von > 95 % isoliert werden. Alle Vorgaben lagen über den erzielten Werten, die bisher in der Literatur erreicht wurden [15-17].
- Erstellung mathematischer Modelle zur systematischen Optimierung der Vorbehandlungsbedingungen und zur Vorhersage prozessrelevanter Zielgrößen wie Delignifizierung, Xylansolubilisierung, Cellulosesolubilisierung, Xyloseausbeute, Glukoseausbeute und Xyloseselektivität.
- Identifikation von geeigneten Hydrolasen, die selektiv die Polysaccharide Xylan und Cellulose innerhalb der vorbehandelten Faser zu Xylose und Glukose umsetzen können. Die Selektivität sollte hierbei im Bereich ≥ 0,9 $g/g_{Gesamtzucker}$ liegen und mehr als 90 % der löslichen Zucker sollten Monomere darstellen.
- Entwicklung eines enzymatischen Hydrolyseverfahrens für die vorbehandelte Lignocellulose bei Feststoffgehalten ≥ 10 % zur Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute.
- Beschreibung der Reaktionskinetik der enzymatischen Hydrolyse mit mathematischen Modellen bei Feststoffkonzentrationen ≥ 10 %.
- Entwicklung von Verfahren und Prozessmodellen zur Abtrennung von Lignocellulose-Abbauprodukten aus hemicellulosereichen Aufschlussüberständen und Verbesserung der Fermentierbarkeit dieser Produktströme.

2 Grundlagen und Stand der Wissenschaft

Im folgenden Kapitel sollen die theoretischen Grundlagen zum Aufbau von Lignocellulose und zum Konzept der Lignocellulose-Bioraffinerie gegeben werden. Zudem soll das Rohstoffpotential der ausgewählten lignocellulosehaltigen Substrate Weizenstroh, Miscanthus und Pappel genauer dargelegt werden. Anschließend soll der Stand der Wissenschaft im Bereich der Vorbehandlung, der enzymatischen Hydrolyse und der Detoxifikation von Aufschlusslösungen dargestellt werden.

2.1 Aufbau von Lignocellulose

In der Natur ist Lignocellulose Bestandteil der primären sowie sekundären Zellwand und besteht aus den drei Hauptkomponenten Cellulose, Hemicellulose und Lignin [18]. Cellulose sorgt mit seiner linearen Struktur für die nötige Faserstärke und -stabilität. Lignin ist aus hydrophoben C9-Phenolderivaten aufgebaut und ist für die chemische Resistenz sowie die Hydrophobizität verantwortlich. Die Hemicellulose verknüpft Cellulose und Lignin und sorgt für die Flexibiltät des Biopolymers. [19]. Eine schematische Abbildung der räumlichen Struktur von Lignocellulose ist in Abbildung 2 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass Lignocellulose geordnet aufgebaut ist. So werden die sogenannten Makrofibrillen (∅ 100-200 nm) aus mehreren Mikrofibrillen (∅ 10-20 nm) aufgebaut. Diese wiederum setzten sich aus Micellen (Elementarfaser) zusammen [1, 20].

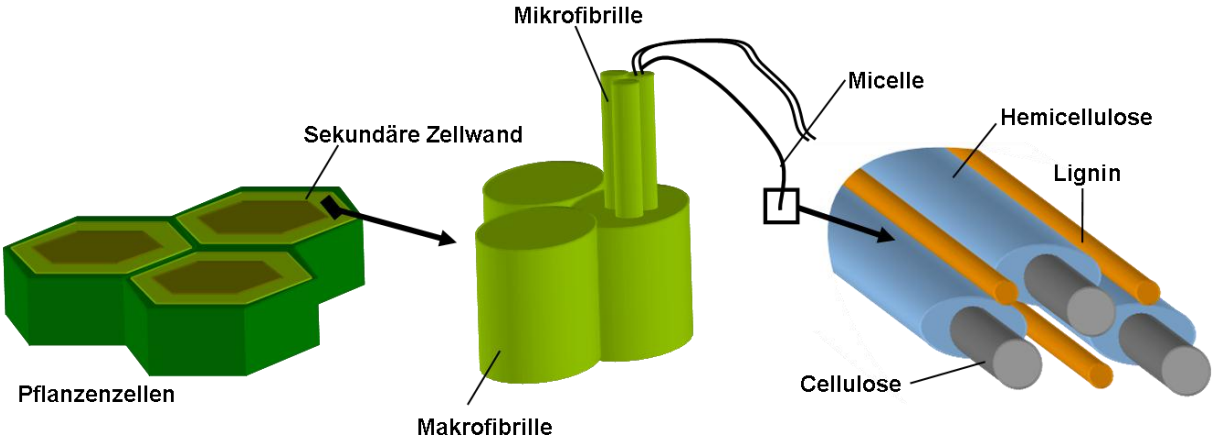


Abbildung 2: Schematischer Aufbau und Struktur von Lignocellulose in der sekundären Zellwand von Pflanzenzellen (modifiziert nach [1]).

Im Zentrum der Struktur steht die lineare Cellulosefaser. Cellulose ist ein homogenes Glukanpolymer aus ß-1-4 verbundenen Glukosemolekülen (chemische Untereinheit) mit

einem Polymerisationsgrad von etwa 7000 bis 15000 Einheiten. Aus diesem Grund wird Celluose oftmals als Glukan bezeichnet. Eine Darstellung der Struktur von Cellulose ist in Abbildung 3 dargestellt. Die strukturgebende Untereinheit zum Aufbau der Micelle und Mikrofibrille ist ein ß-Cellobiosemolekül. Innerhalb der Cellulosekette kann weiterhin zwischen einem reduzierenden C1-Ende und einem nicht reduzierenden C4-Ende unterschieden werden. Die Elementarfasern untereinander werden durch Wasserstoffbrückenbindungen und Van der Waals-Kräfte zusammengehalten [21]. Auf Grund der räumlichen Struktur können unterschiedliche Regionen innerhalb der Mikrofibrille unterschieden werden. Kristalline Regionen zeichnen sich durch eine homogene Anordnung der Elementarfasern aus, während amorphe Regionen aus ungeordneten Elementarfasern bestehen. Mit Hilfe von Wasserstoffbrückenbindungen ist die Cellulosefaser mit der Hemicellulose verknüpft. Hemicellulose ist wiederum über Feruoyl- oder Coumarylderivate mit der Phenolmatrix des Lignins verestert [22, 23].

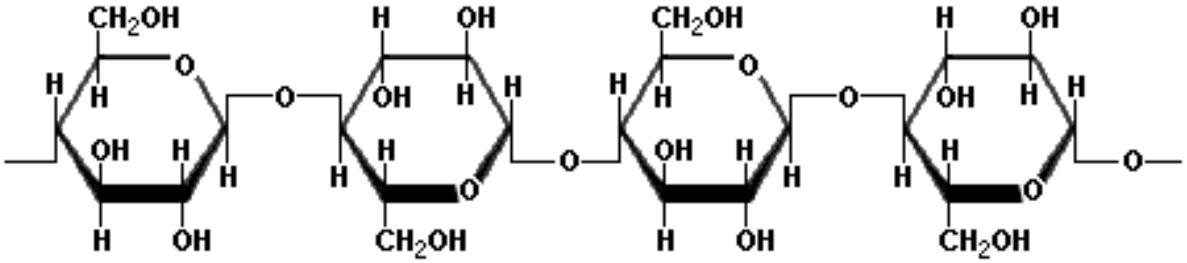


Abbildung 3: Struktur eines Cellulosemoleküls.

Im Gegensatz zu Cellulose ist Hemicellulose ein Heteropolymer bestehend aus den Zuckern D-Xylose, L-Arabinose, D-Mannose, D-Glukose, D-Galaktose, L-Rhamnose, 4-O-Methyl-D-Glukuronsäure, D- Glukuronsäure und D-Galakturosäure. Neben Cellulose ist Hemicellulose das zweithäufigste Biopolymer mit einem Anteil von 15 - 35 % der Pflanzenbiomasse und einem Polymerisierungsgrad von 70 - 200 Einheiten. Im Allgemeinen ist Hemicellulose aus einem linearen Zuckerpolymer im Zentrum und sich verzweigenden Seitengruppen, bestehend aus Oligomeren oder Monomeren, aufgebaut [24].

Eine Eingruppierung und Nomenklatur von Hemicellulose erfolgt üblicherweise auf Basis der Hauptkomponente der linearen Zuckerkette im Zentrum. Während Harthölzer und Jahrespflanzen (Gräser, Getreide) hauptsächlich aus Xylan (15 - 30 %) mit einem Xylosegrundgerüst bestehen, finden sich bei Weichhölzern vor allem Galakto- bzw. Glukomannane (15 - 20 %) in der Hemicellulosefraktion wieder [25]. Für die Nomenklatur

der Hemicellulosefraktion kann dementsprechend Xylan oder Glukomannan verwendet werden. Eine Darstellung der Xylanstruktur ist in Abbildung 4 gezeigt.

Aufgrund der verzweigten und heterogenen Struktur lässt sich die Hemicellulosefraktion im Gegensatz zur Cellulosefraktion durch thermische oder chemische Methoden leicht extrahieren. Diese Eigenschaft ist entscheidend bei der Vorbehandlung und Fraktionierung von lignocellulosehaltiger Biomasse. Während sich Cellulose in einem wässrigen System ab einer Temperatur von 240°C aus dem Faserverband löst, geht die Hemicellulose bereits ab 160°C in Form von Oligomeren in Lösung. Durch die Temperaturerhöhung wird die Dissoziation von Wasser erhöht, so dass der pKs-Wert von Wasser herabgesetzt wird. Die Steigerung der Protonenkonzentration führt schließlich dazu, dass die glykosidischen Bindungen der Hemicellulose hydrolysiert werden und lösliche Oligosaccharide mit Molmassen 500 - 2000 g/mol entstehen [26]. Dieser Temperatureffekt kann durch Zugabe von Säuren als Katalysator zusätzlich verstärkt werden [27]. In neutralen und sauren Systemen können neben löslichen Oligosacchariden bereits Monomere mit einem Anteil von bis zu 50 % der Gesamtzucker isoliert werden [28]. Neben der sauren Hydrolyse kann Hemicellulose ebenfalls mit unterschiedlichen wässrigen Laugen extrahiert werden. In diesem Fall werden vor allem Oligosaccharide mit Molekülmassen zwischen 20000 - 50000 g/mol extrahiert [29, 30].

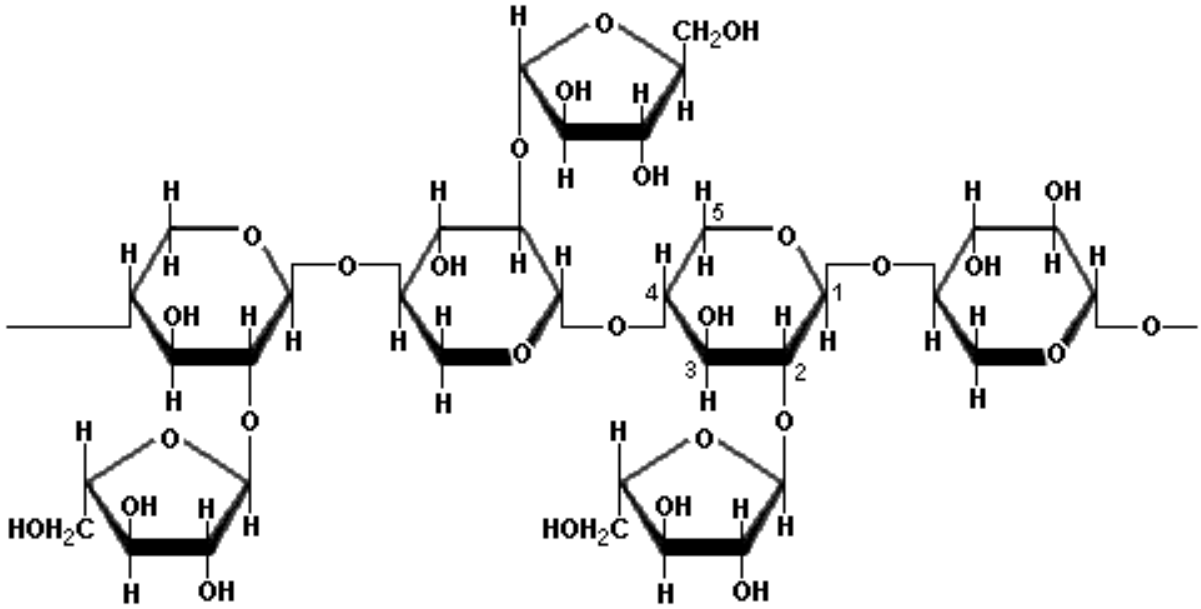


Abbildung 4: Struktur von Xylan.

Als dritte Komponente von Lignocellulose ist Lignin das häufigste aromatische Polymer auf der Erde. Der Anteil von Lignin in der lignocellulosehaltigen Biomasse erstreckt sich je nach Herkunft zwischen 27 % - 33 % bei Laubhölzern, 18 % - 25 % bei Nadelhölzern und 17 - 24 % bei Einjahrespflanzen (z. B Gräser, Getreidestroh) [31].

Lignin ist ein hydrophobes aromatisches Polymer, das durch die Polymerization der drei Cinnamylalkohole p-Coumarylalkohol (4-Hydroxycinnamyl), Coniferylalkohol (4-hydroxy-3-methoxycinnamyl) und Sinapylalkohol (4-Hydroxy-3,5-Dimethoxy-cinnamyl) gebildet wird. Die Monolignole sind die Ausgangsverbindungen (Precursor) der Ligninhaupteinheiten p-Hydroxyphenyl- (H), Guaiacyl- (G) und Syringylalkohol (S). Je nach Verholzungsgrad lassen sich G-Lignine (v.a Nadelhölzer), GS- Lignine (Laubhölzer) und HGS-Lignine (Einjahrespflanzen beispielsweise Weizenstroh oder Miscanthus) unterteilen [32]. Der schematische Aufbau eines HGS-Lignins ist in Abbildung 5 gezeigt.

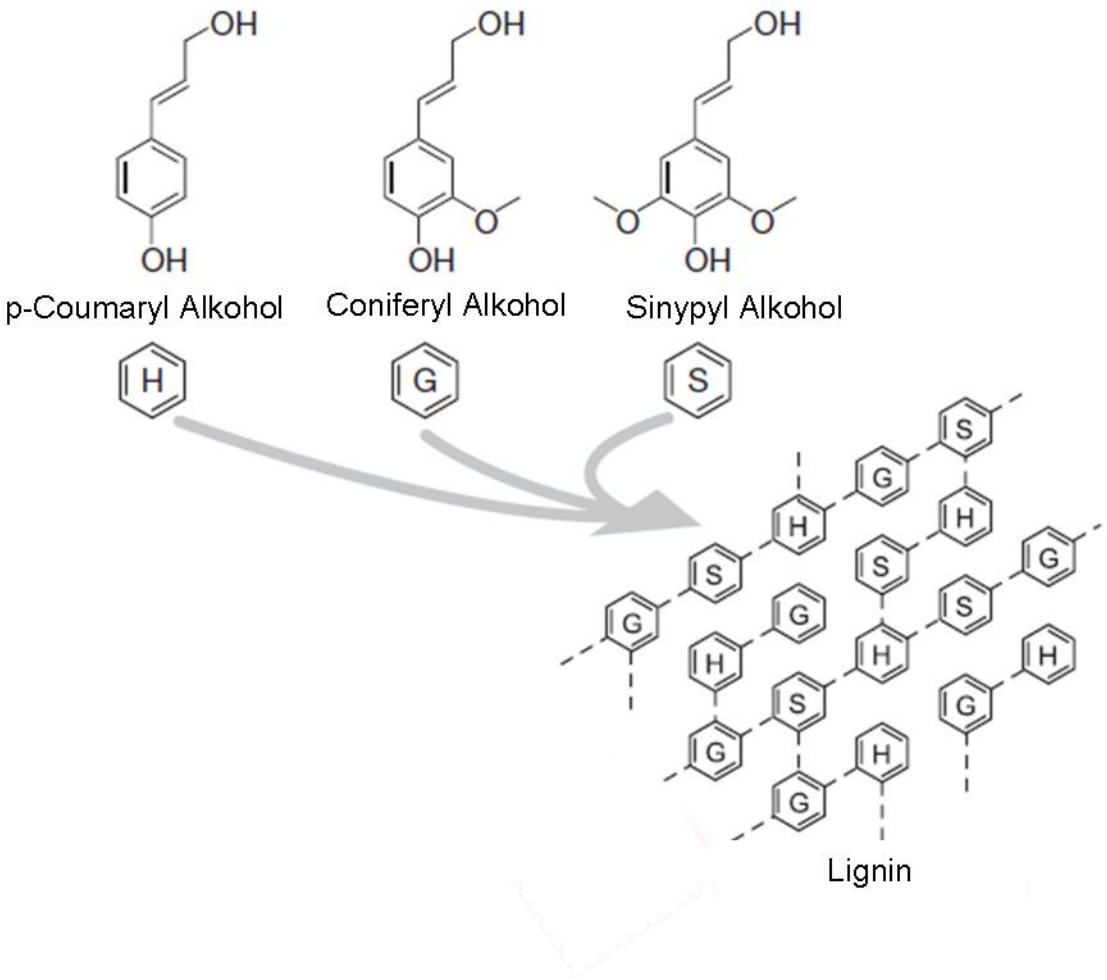


Abbildung 5: Struktureller Aufbau von Lignin (HGS Lingin) aus den monomeren C9 Bausteinen Coumaryl (H) Coniferyl (G) und Sinapylalkohol (S). Modifiziert nach [1].

Obwohl die Biosynthese durch Enzyme wie beispielsweise Phenylalanine Ammoniaklyase, Cinnamate 4-Hydroxylase, Coumarate 3-Hydroxylase, katalysiert wird, entstehen die kovalenten Verbindungen durch unspezifische radikalische Kondensationsreaktionen, so dass eine unregelmäßige Struktur des Lignins entsteht [33]. Die häufigsten intramolekularen Verknüpfungungen, die dabei geknüpft werden, sind vor allem ß-Arylether (ß-O-4), Biphenyl (5-5'), Diphenylether (4-O-5), α-Arylether (α-O-4) sowie ß-1-Verbindungen.

2.2 Das Konzept der Bioraffinerie

Eine Bioraffinerie nutzt nachhaltig alle anfallenden Stoffströme zur Erzeugung von definierten chemischen Produkten (Bulk-, Fein- oder Plattformchemikalien) sowie primären und sekundären Energieträgern (siehe Abbildung 6). Analog zu einer erdölbasierten Raffinerie werden die eingehenden Rohstoffe selektiv aufgetrennt, modifiziert und durch Konversionsverfahren in lagerfähige Zwischenprodukte umgewandelt [9, 12-14].

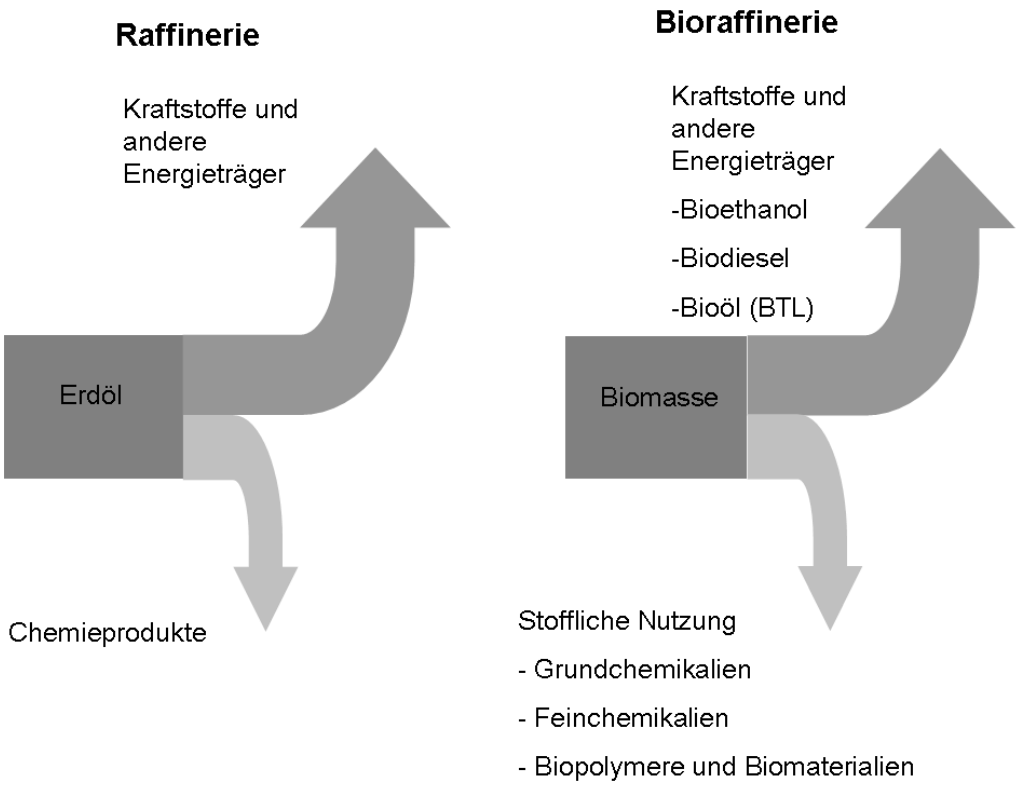


Abbildung 6: Vergleich einer Erdölraffinerie mit einer Bioraffinerie (modifiziert nach [9]).

Abhängig von den eingehenden Rohstoffen kann eine Unterteilung verschiedener Bioraffinerie-Konzepte erfolgen. Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen Getreide bzw.

Stärkebioraffinerien, Ölsaaten-Bioraffinerien, grüner Bioraffinerie mit Gras und Silage als Rohmaterial [34], Syngas-Bioraffinerien, die biobasiertes Synthesegas produzieren und der Lignocellulose-Bioraffinerie (LCB). Die Rohstoffe der LCB können sowohl Abfallströme aus der Forstwirtschaft und dem landwirtschaftlichen Anbau, der Papierindustrie, als auch Nutzhölzer aus der Forstindustrie (beispielsweise Buche, Fichte) sein. Darüber hinaus können speziell kultivierte Energie- oder Biomassepflanzen (Miscanthus, Switchgrass, Pappel) ebenfalls als Rohstoffquelle eingesetzt werden [12, 35]

Für alle Konzepte gelten gemeinsame Grundvoraussetzungen für eine nachhaltige und effiziente Konversion von nachwachsenden Rohstoffen [9, 13]. Eine Bioraffinerie sollte neben niedrigpreisigen Bulk- und Massenprodukten mindestens ein hochpreisiges Produkt beinhalten. Die Rohstoffe sollten möglichst vollständig genutzt werden, so dass eine große Wertschöpfung garantiert ist. Darüber hinaus sollte ein Energieträger anfallen, der sowohl intern verwendet werden kann als auch als Produkt verkauft werden kann. Ein weiteres Hauptkriterium einer nachhaltigen Bioraffinerie ist die Nutzung aller anfallenden Stoffströme. Dies beinhaltet, dass Verfahren entwickelt werden müssen, um alle Fraktionen der Ausgangsbiomasse effektiv nutzen zu können. Im Falle der LCB bedeutet dies, dass die drei Hauptfraktionen Cellulose, Hemicellulose und Lignin in die Wertschöpfungskette miteinbezogen werden müssen. Dies setzt voraus, dass Verfahren eingesetzt werden müssen, um die Lignocellulose zunächst aufschließen und fraktionieren zu können. Ein generelles Prozessschema einer LCB ist in Abbildung 7 dargestellt.

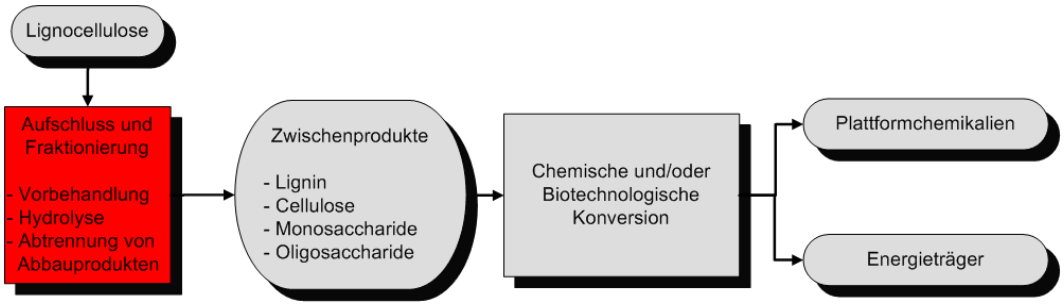


Abbildung 7: Prozessschema der LCB zur Nutzung aller anfallenden Stoffströme mit der Einordnung der vorliegenden Arbeit

Der Aufschluss und die Fraktionierung der Lignocellulose stehen am Anfang der Prozesskette und können in folgende drei Teilschritte unterteilt werden:

- Vorbehandlung der Lignocellulose (Kapitel 2.4)
- Hydrolyse der Zuckerpolymere zu Zuckermonomeren (Kapitel 2.5)
- Abtrennung der auftretenden Lignocellulose-Abbauprodukte aus den hemicellulose-reichen Aufschlusslösungen (Kapitel 2.6)

Anschließend können mit Hilfe von biotechnologischen und/oder chemischen Konversions-prozessen Plattformchemikalien sowie Energie produziert werden. Eine Auswahl an möglichen Produkten oder Plattformchemikalien ist in Abbildung 8 gegeben. Es wird deutlich, dass sich bei der Bioraffinerie, analog zu einer erdölbasierten Raffinerie, ebenfalls Plattformchemikalien mit unterschiedlichen Kohlenstoffatomen im Grundgerüst (C1-C6) synthetisieren lassen [36, 37].

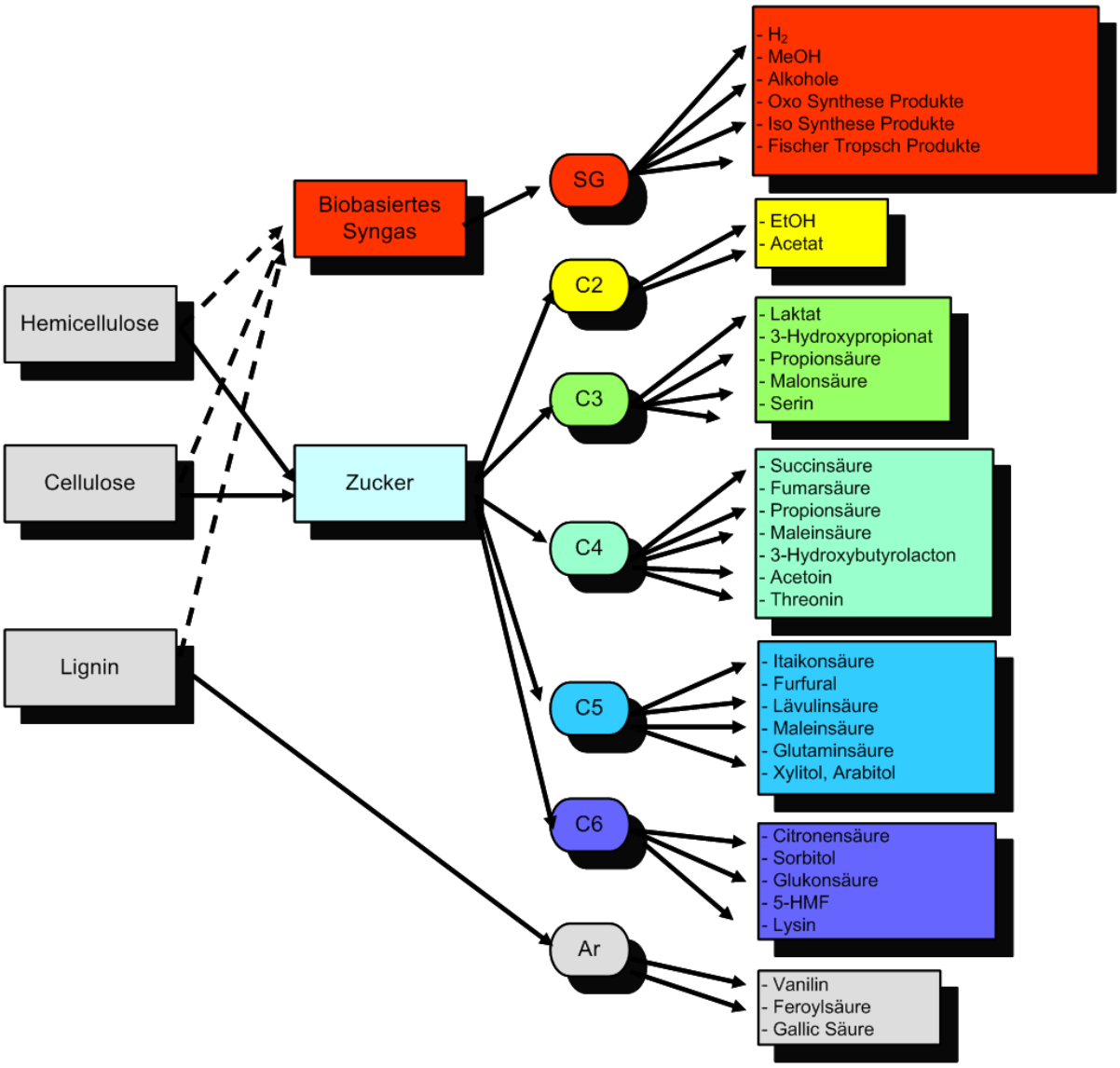


Abbildung 8: Mögliche Produkte und Plattformchemikalien einer Lignocellulose-Bioraffinerie (LCB) (modifiziert nach [36, 37])

Während auf Basis von stärkehaltigen und zuckerhaltigen nachwachsenden Rohstoffen bereits eine Vielzahl an Produkten wie beispielsweise Ethanol, Polylaktat oder 1,2 Propandiol im industriellen Maßstab produziert werden, existieren derzeit kaum Produkte basierend lignocellulosehaltigen Rohstoffen. Lediglich Ethanol aus C6-Zuckern wird derzeit im Maßstab von $< 10^3$ kg/d produziert [38]. Eine vollständige Verwertung aller Lignocellulose-Fraktionen ist derzeit aber nicht realisiert. In Tabelle 1 sind Beispiele für existierende oder geplante LCB in Europa aufgelistet.

Tabelle 1: Auflistung über existierende oder geplante Lignocellulose-Bioraffinerien in Europa. [12]

Land	Anlagentyp	Firma Ort	Verwertung von	Produkte	Maßstab /Status
Dänemark	Bioethanol LCB	BornBiofuel Aakirkeby	Cellulose	Ethanol	Pilot Bauphase
Dänemark	Bioethanol LCB	IBUS Fynsvaerke	Cellulose	Ethanol	Pilot In Betrieb
Dänemark	Bioethanol LCB	BIOCentrum DTU Lyngby	Cellulose	Ethanol	Technikum In Betrieb
Deutschland	Integrierte Bioraffinerie	Fraunhofer CBP Leuna	Lignin Hemicellulose Cellulose Öle, Fette	Alkohole Dicarbonsäuren Epoxide Lignin	Pilot In Betreib
Deutschland	Bioethanol LCB	Clariant AG Straubing	Cellulose Hemicellulose	Ethanol	Pilot In Betrieb
Finnland	Integrierte Bioraffinerie	VTT Espoo	Cellulose Hemicellulose Lignin	Bioethanol Lignine Öle	Technikum In Betrieb
Island	LCB	Icelandic Biomass Company	k.A.	k.A.	Labor In Betrieb
Spanien	LCB	ABENGOA	Salamanca	k.A.	Pilot Bauphase

Die Auflistung verdeutlicht, dass derzeit keine Bioraffinerien betrieben werden, die die Lignocellulose vollständig nutzen. Die derzeitig betriebenen Bioraffinerien verwenden Cellulose zur Produktion von Ethanol. Auch Konzepte der integrierten Bioraffinerie sind derzeit noch in der Forschungs- und Planungsphase (beispielsweise das Fraunhofer CBP in Leuna). In diesen Vorhaben sollen sowohl ölhaltige als auch lignocellulosehaltige Substrate zu Plattformchemikalien und Energieträgern umgewandelt werden.
In Nordamerika sind ebenfalls eine Vielzahl an Pilotanlagen in Planung. Der Fokus der Verfahren richtet sich jedoch auf die Produktion von Bioethanol aus Cellulose. Einige Beispiele von Pilotprojekten können aus Amidon [39] und Solomon [40] entnommen werden. Der Marktführer für Cellulose-Ethanol in Nordamerika ist die Fa. Iogen [41], deren Anlage in Ottawa (Kanada) eine Kapazität von $9.0*10^2$ kg/d aufweist. Als Rohstoffe werden hierbei Holzschnitzel und Weizenstroh eingesetzt [42]. In einem Hochdruckreaktor werden die Fasern mit 200 - 250°C heißem Dampf mit 0,5 - 1 % Schwefelsäure vorbehandelt. Anschließend wird der Reaktor schlagartig entspannt und die Struktur der Fasern somit zerstört. Die vorbehandelten Fasern (15 - 20 %) werden anschließend mit Cellulasen von *Trichoderma* hydrolysiert, um Glukose zu erhalten. Die Hydrolysedauer beträgt 5 - 7 Tage bei einem Umsatz von 80 %. Die anschließende Ethanolfermentation wird mit genetisch modifizierten *Saccharomyces*-, *Pichia*- oder *Zymomonas*-Stämmen durchgeführt.

2.3 Rohstoffpotentiale ausgewählter Lignocelluloserohstoffe

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Konversion von Weizenstroh, Miscanthus und Pappelholz für eine Lignocellulose-Bioraffinerie untersucht. Deshalb sollen die Gründe für die Auswahl im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

Mit einer Biomasseproduktion von 4,5 Mio. t/a (in Deutschland) ist Weizenstroh, das am häufigsten verfügbare Nebenprodukt der Agroindustrie [43]. Sowohl Anbau- als auch Erntetechniken sind etabliert, so dass Weizenstroh für eine stoffliche Nutzung direkt zur Verfügung steht.
Als Vertreter einer schnell wachsenden, anspruchslosen Energiepflanze wurde darüber hinaus Miscanthus ausgewählt. Miscanthus ist ein Vertreter der sogenannten C4-Pflanzen. Die Kohlenstoffdioxid-Fixierung und der Calvin-Zyklus erfolgen in C4-Pflanzen räumlich voneinander getrennt. Folglich tendieren die C4-Pflanzen, im Gegensatz zu den häufiger verbreiteten C3 Pflanzen, zu höheren Biomasseproduktionsraten, höheren Lichteffizienzen,

höheren Stickstoff- und Wasserassimilationsraten. Mit ihren schnellen Wachstumsraten, hohen Ertragsniveau (t/ha/a) und den niedrigen Nährstoff- und Wasserbedarf sind sie ideal für die Erschließung marginaler Landflächen. [1, 44]

Als möglicher Rohstoff einer Kurzumtriebsplantage wurde darüber hinaus Pappelholz in die Arbeit mit einbezogen. Pappelholz ist wie Eukalyptus eine C3-Pflanze, die zur Gewinnung von Biomasse und Energie eingesetzt werden kann. Pappelholz lässt sich in kurzen Wachstumszeiten von 3 - 5 Jahren in sogenannten Kurzumtriebsplantagen (KUP) anbauen, so dass die Biomasseproduktivität pro Jahr und Hektar im Vergleich zu anderen Holzarten wie Buche, Fichte oder Kiefer größer ist. Mit dem steigenden Bedarf an Biomasse wird somit das Pappelholz an Bedeutung gewinnen. Durch Ökobilanzierung der KUP konnte festgestellt werden, dass der Anbau ein geringes Treibhauspotential und eine geringe Umweltbelastung durch Eutrophierung und Versauerung zeigt. Für die Erzeugung von 1 MJ Energie in Form von Pappelhackschnitzel müssen 0,1 bis 0,2 MJ fossile Energie eingesetzt werden. So lässt sich mit der KUP das Rohstoffpotential von Pappel nachhaltig erschließen. [11, 45, 46]

Ein Vergleich von Biomasseproduktion (Mio. t/a), Ertragsniveau (t/ha/a), Brennwert (kWh/kg) sowie Ernteintervallen bzw. Erntezeit für Weizenstroh, Miscanthus, Pappel und Buche ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Derzeitige Biomasseproduktion (Mio. t/ha), Ertragsniveau (t/ha/a), Brennwert (kWh/kg) sowie Ernteintervalle bzw. Erntezeit für Weizenstroh, Miscanthus und Pappel.

	Weizenstroh	Miscanthus	Pappel
Biomasseproduktion[1] / (Mio.*t/a)	4,5 [43]	0,0065 [44, 47]	0,8 [3, 45]
Ertragsniveau / (t/ha/a)	4-8 [43]	15-25	10-15 [48]
Brennwert / (kWh/kg)	4,8 [49]	5,9 [50]	4,1 [49]
Ernteintervall	Jährlich Neuaussaat erforderlich	Jährlich Standzeit 20 Jahre	3-5 Jahre Standzeit 24 Jahre
Erntezeit	Juli bis September	Dezember bis April	unabhängig

[1] Biomasseproduktion in Deutschland

Die derzeitig größte Biomasseproduktivität zeigt Buche mit 12 Mio t/a, gefolgt von dem Nebenprodukt Weizenstroh mit 4,5 Mio. t/a. Sowohl Miscanthus als auch Pappelholz werden derzeitig nur vereinzelt angebaut und vorwiegend energetisch genutzt. Betrachtet man jedoch das Ertragsniveau, so kann festgestellt werden, dass sowohl Miscanthus als auch Pappel die größten Produktionsraten pro Jahr aufweisen (12 - 25 t/ha/a und 10-15 t/ha/a). Positiv zu bewerten sind für Miscanthus und Pappel auch die Ernteintervalle (jährlich bzw. alle 3-5 Jahre) und die langen Standzeiten von 24 und 20 Jahren ohne Neuanpflanzung. Vorteilhaft für die Nutzung von Weizenstroh ist die bestehende Verbindung zur Weizenproduktion. Demnach ist Weizenstroh eine bereits verfügbare Rohstoffquelle für eine Lignocellulose-Bioraffinerie. Alle vier betrachteten Rohstoffquellen können aufgrund ihrer Erntezeiten für eine gleichmäßige Auslastung ohne größere Lagerkosten und Lagerflächen eingesetzt werden. Im Zeitraum Ende August bis April können Weizenstroh und Miscanthus prozessiert werden, während Pappel und Buche im verbleibenden Zeitraum und zur Kompensation von Ertragsschwankungen eingesetzt werden könnten.

2.4 Vorbehandlung von Lignocellulose

Aufgrund der widerstandsfähigen Struktur von Lignocellulose können die Zuckerpolymere nicht direkt zu Monomeren umgesetzt werden. Im Gegensatz zu zuckerbasierten und stärkebasierten Rohstoffen wie Zuckerrüben und Kartoffeln müssen lignocellulosehaltige Rohstoffe vor der eigentlichen Nutzung intensiv vorbehandelt werden, damit die dichte und robuste Struktur aufgebrochen wird [51, 52]. Erst nach einer Vorbehandlung können Hemicellulose und Cellulose mit Hilfe von Enzymen effektiv hydrolysiert werden [53]. Die Vorbehandlung ist ein zentraler Verfahrensschritt, der eine direkte Auswirkung auf die Fraktionierung und auf die Selektivität der gesamten Prozesskette (Hydrolyse, Fermentation Aufreinigung) hat [54].

Mit Hilfe der Vorbehandlung von Lignocellulose soll einerseits die Lignin- und die Hemicellulosefraktion entfernt werden. Dies führt dazu, dass mehr freie Cellulose-Adsorptionsstellen für Cellulasen gebildet werden und somit die Cellulosefaser besser hydrolysiert werden kann. Andererseits soll die spezifische Oberfläche der Faserpartikel durch Aufbrechen der Lignocellulose-Struktur erhöht werden, um die sterische Hinderung für die Enzyme zu minimieren. Neben der Verbesserung der enzymatischen Hydrolysierbarkeit, soll eine geeignete Vorbehandlung ebenfalls zu einer Minimierung der Zucker und Ligninabbauprodukte führen, um die Fermentierbarkeit der anfallenden Zuckerströme zu

gewährleisten und den Ausbeuteverlust der Zucker zu minimieren [53, 54]. Ein geeignetes Vorbehandlungsverfahren soll darüber hinaus das entfernte Lignin und die gelöste Hemicellulose nutzbar machen, um Folgeprodukte wie Xylitol aus Xylose oder Ligninpolymere herstellen zu können [13, 55].

2.4.1 Systematische Einteilung der Vorbehandlungsverfahren

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Vorbehandlungsmethoden für Lignocellulose eingesetzt, die sich anhand der Aufschlussprinzipien in physikalische, physikalisch-chemische, chemische und biologische Verfahren einteilen lassen (siehe Abbildung 9).

Oftmals werden mechanische Vorbehandlungsmethoden wie Häckseln und Schneiden als erster Prozessschritt allen weiteren Vorbehandlungsverfahren vorgeschaltet. Mahlung und Feinmahlung werden aber auch als eigenständiges physikalisches Vorbehandlungsverfahren eingesetzt. Jedoch sind Zerkleinerungen bis weit unter 2 mm Faserlänge sehr energieintensiv [56], so dass die Wirtschaftlichkeit der Verfahren negativ beeinflusst wird [57].

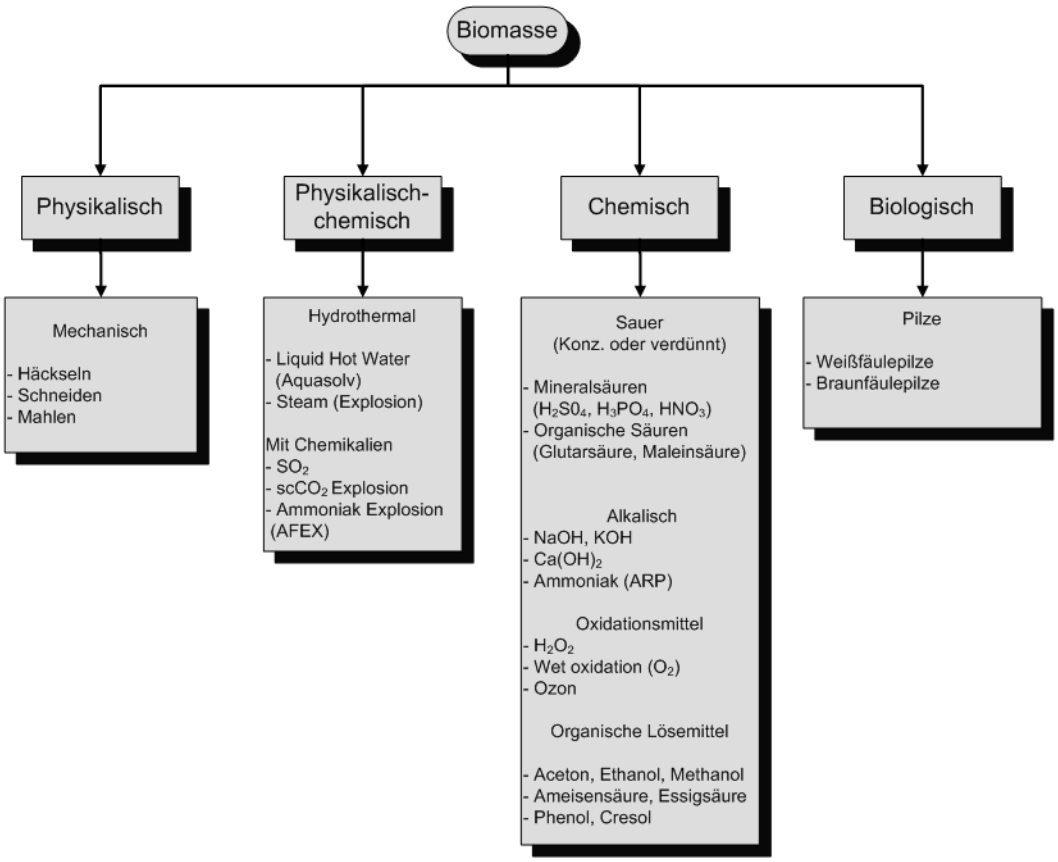


Abbildung 9: Einteilung der vorhandenen Vorbehandlungsverfahren (modifiziert nach [51])

Physikalisch-chemische Verfahren kombinieren Druck- und Temperaturänderungen mit chemischen Reaktionen wie beispielsweise die säurekatalysierte Hydrolyse von

glykosidischen Verbindungen. So wird beispielsweise beim Steam Explosion Verfahren der dampfgesättigte Reaktorraum schlagartig druckentspannt. Dies führt zu einer Zerfaserung der Biomasse. Beim Aquasolv-Prozess wird selektiv die Hemicellulosefraktion gelöst, in dem in einem Druckbehälter Wasser erhitzt wird. Auf Grund der verzweigten heterogenen Struktur der Hemicellulose kann diese anschließend ab Temperaturen von 160 °C durch Absenkung des pKs-Werts von Wasser aus dem Faserverbund gelöst werden, während Cellulose im Faserverbund verbleibt. Erst ab Temperaturen von über 220 °C kann Cellulose solubilisiert werden. Als Katalysator kann zur weiteren Ansäuerung des Lösemittels ebenfalls SO_2 eingesetzt werden.
Beim Ammonia Fibre Explosion Prozess (AFEX) wird eine Zerfaserung der Biomasse durch Entspannung des Reaktionssystems angestrebt. Durch den Druckabfall kann das eingesetzte Ammoniak fast vollständig rezykliert werden [58]. Die Lignin, Glukose- und Hemicellulosesolubilisierung ist bei diesem Prozess sehr gering. Lediglich die Faserstruktur wird durch Quellung so modifiziert, dass eine verbesserte Hydrolysierbarkeit resultiert. Nach der enzymatischen Hydrolyse liegt demnach in der flüssigen Phase eine Mischung von C5- und C6-Zuckern vor. Das verbleibende Restlignin in der nicht hydrolysierten Faser zeigt jedoch einen hohem Zuckergehalt ≥ 50 % [59].

Bei den chemischen Verfahren werden Prozesse mit Säuren (konzentriert oder verdünnt), Laugen, Oxidationsmitteln und organischen Lösemitteln (Alkohole, organische Säuren, oder Aromaten) eingesetzt.
Während mit sauren Prozessen gezielt glykosidische Bindungen vor allem der Hemicellulose hydrolysiert werden, kommt es bei alkalischen Prozessen vorwiegend zu einer Depolymerisation und Solubilisierung von Lignin durch Spaltung von Etherbindungen. Darüber hinaus wird ein Teil der Hemicellulose zu Oligomeren gespalten und teilweise deacetyliert [60]. Aus den Aufschlusslösungen kann durch pH-Senkung anschließend Lignin ausgefällt werden [61, 62]. Ein Nachteil der sauren Aufschlüsse ist die Tendenz, dass die gebildeten löslichen Zucker während des Aufschlusses weiter zu Zuckerabbauprodukten wie Furfural, HMF, Ameisensäure oder Lävulinsäure reagieren können [54]. Im Gegensatz zum AFEX-Prozess wird beim alkalischen Ammonia Recycle Percolation Prozess (ARP) die Faser mit Ammoniak-Lösungen (10 - 15 % w/w Ammoniak) delignifiziert. Die Aufschlusslösung wird hierbei bei Temperaturen von 150 - 170 °C im Kreislauf durch einen Lignocellulose-Festbettreaktor gefahren [63, 64].

Chemische Vorbehandlungsprozesse mit Oxidationsmittel (Wet Oxidation Prozesse) wie Wasserstoffperoxid, Peroxyessigsäure, komprimiertem Sauerstoff oder Ozon greifen direkt die Ligninstruktur an und können auch Hemicellulose lösen. Während der Oxidation können eine elektrophile Substitution, Abspaltung von Seitengruppen, Spaltung von Alkyl-Aryl Etherbrücken und Spaltung des Aromaten auftreten [65]. In den meisten Fällen sind die oxidativen Verfahren nicht selektiv und ein hoher Anteil an Cellulose wird ebenfall gelöst. Darüber hinaus entsteht eine Vielzahl an toxischen Abbauprodukten, insbesondere lösliche Aromate [57].

Die sogenannten Organosolv-Aufschlüsse umfassen eine Vielzahl an Verfahren die entweder organische Säuren (Ameisensäure, Essigsäure), Alkohole (Methanol, Ethanol, Ketone) oder Aromaten wie Phenol oder Cresol als Lösemittel in Kombination mit Wasser verwenden. Alkohole, vor allem niedermolekulare Alkohole wie Methanol und Ethanol, sind die am häufigsten verwendeten organischen Lösemittel, die bei Organosolv-Prozessen verwendet werden. Die Delignifizierung mit primären Alkoholen ist hierbei besser als die von sekundären oder tertiären Alkohole. Des Weiteren zeigen Alkohole mit niedrigen Siedepunkten (MeOH, EtOH) eine energetisch günstigere Rückgewinnung [66]. Während des Organosolv-Prozesses wird das Lignin aus der Faser gelöst und kann durch Abtrennung des Lösemittels (Evaporation oder Rektifikation) wieder aus der Aufschlusslösung durch Ausfällung gewonnen werden [67]. Bei entsprechend hohen Temperaturen (> 180 °C) wird bei Organosolv-Prozessen auch die Hemicellulosefraktion aus der Faser gelöst. Durch Zugaben von geringen Mengen einer mineralischen Säure (vor allem H_2SO_4) kann hierbei die benötigte Prozesstemperatur weiter gesenkt werden (< 180 °C), da durch die H^+-Ionen die Spaltung der glykosidischen Bindungen katalysiert wird [66].

Organische Säuren, vor allem Ameisensäure und Essigsäure, können ebenfalls für Organosolv-Prozesse eingesetzt werden. Dennoch gibt es nur sehr wenige Veröffentlichungen in diesem Bereich. Ein Grund hierfür ist die hohe Korrosivität, die bei der Realisierung technischer Prozesse ein Problem darstellt. Dennoch sind die organischen Säuren ein gutes Lösemittel zur Solubilisierung der Lignin- und Hemicellulosefraktion [66].

Bei biologischen Methoden wird vorwiegend das Biodegradationspotential von ligninabbauenden Pilzen wie beispielsweise den Weißfäulnispilzen ausgenutzt. Hierbei spielen vorwiegend extrazelluläre Oxidoreduktasen wie Peroxidasen und Laccasen eine entscheidende Rolle [68-70]. Biologische Methoden besitzen aufgrund ihrer milderen

Prozessbedingungen und der geringen Chemikalienkosten geringe Betriebs- und Investmentkosten. Ein großer Nachteil bei den biologischen Prozessen sind jedoch die langen Verweildauern von mehreren Wochen (4-8 Wochen) [51].

Zum Abschluss dieses Kapitels soll ein Überblick der einzelnen Vorbehandlungsverfahren anhand einer Übersicht in Tabelle 3 gegeben werden. Es ist zu erkennen, dass jedes Verfahren seine Vor- und Nachteile besitzt. Somit müssen im Frühstadium der Prozessentwicklung vergleichende Untersuchungen durchgeführt werden, deren Daten als Grundlage für eine Verfahrensauswahl herangezogen werden können.

Tabelle 3: Überblick zu den eingesetzten Vorbehandlungsverfahren zum Aufschluss von Lignocellulose.

Kriterium	Verdünnte Säure	Steam Explosion	Aquasolv	Organosolv	Alkalisch	Wet Oxidation
Hohe Hemicellulose-solubilisierung	++	++	++	+	+	+
Hohe Monosaccharid-Produktion aus Hemicellulose	++	0	-	+	- / 0	+
Hohe Cellulose Wiederfindung	++	++	++	++	+	+
Hohe Hydrolysierbarkeit der Cellulose	++	+	+	+	++	++
Hohe Ligninqualität	-	0	+	++	+	0
Recycling von Chemikalien	-	0	n. r.	+	-	-

Kriterium	Verdünnte Säure	Steam Explosion	Aquasolv	Organosolv	Alkalisch	Wet Oxidation
Geringe Bildung von Abbauprodukten	- -	0	0	+	-	-
Geringe Korrosionsprobleme	-	0	0	0	-	-
Geringer Chemikalieneinsatz	-	0	++	-	-	-
Niedrige Investmentkosten	+	-	+	0	0 / +	-
Niedrige Betriebskosten	-	++	+	0	- / 0	-
Niedriger Energieverbrauch	0	0	0	0	+	0

+ positiv, - negativ, 0 neutral, n. r. nicht relevant

2.4.2 Vorbehandlungsmethoden für Weizenstroh

Im folgenden Kapitel sollen die existierenden Vorbehandlungsverfahren für Weizenstroh anhand der eingesetzten Verfahren, der Prozessbedingungen, der erzielten Delignifizierung (Anteil an entferntem Lignin), Hemicellulosesolubilisierung (Anteil an entfernter Hemicellulose) und der Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse vorgestellt werden. Dabei sollen die grundlegenden Erkenntnisse der Vorbehandlungsverfahren anhand von wesentlichen Literaturdaten vorgestellt werden.

In Tabelle 4 ist ein Überblick zu den Vorbehandlungsverfahren dargestellt, mit der Zusatzinformation, ob Modellbetrachtungen durchgeführt wurden, die einen Zusammenhang zwischen Betriebsparameter und Zielgrößen beschreiben. Generell wurden Aquasolv-, Steam Explosion-, Wet Oxidation -, Organossolv-, alkalische und saure Verfahren eingesetzt, um Weizenstroh vorzubehandeln. Vor allem Wet Oxidation, Organosolv- und alkalische Verfahren führten zu einer hohen Delignifizierung, Hemicellulosesolubilisierung und

Glukoseausbeute. Aquasolv-Verfahren können zwar auch die Hydrolysierbarkeit von Weizenstroh erhöhen, jedoch sind die Delignifizierung und Hemicellulosesolubilisierung niedriger, so dass keine ausreichende Fraktionierung stattfand. Aus Tabelle 4 wird ebenfalls deutlich, dass im Bereich der Aquasolv-Verfahren eine Vielzahl an Modellbeschreibungen durchgeführt worden sind, die im Wesentlichen auf dem sogenannten Severity-Faktor basieren [71-73]. Dieser berechnet sich aus der Haltezeit t und der Temperaturüberhöhung über T_R = 100 °C ($\log R_0 = t*\exp(T-T_R/14{,}75)$).

Tabelle 4: Überblick zu den eingesetzten Vorbehandlungsverfahren zum Aufschluss von Weizenstroh

Verfahren	Betriebs-bedingungen	Delignifizierung / %	Hemicellulose-solubilisierung / %	Glukose-ausbeute / %	Modell-beschreibung	Literatur
Aquasolv	200 °C 40 min	12	20	95	ja	[72]
Aqusolv (Perkolation)	200 - 220 °C 10 min	-	-	75	-	[74]
Aquasolv	150 - 240 °C 20 - 60 min	15	64	-	ja	[75]
Aquasolv (Kontinuierlich)	185 - 205 °C 6- 12 min	10	40	89	ja	[73]
Steam Explosion	190 - 200 -°C 10 min 0,2 -1 % H_2SO_4	-	-	85		[76]
Steam-Explosion	15 bar 4,5 min	80	80	-	-	[78]
Wet Oxidation	185 °C 15 min 6,5 g/L $NaCO_3$ 12 bar O_2	60	96	-	-	[77]

Verfahren	Betriebs-bedingungen	Delignifizierung / %	Hemicellulose-solubilisierung / %	Glukose-ausbeute / %	Modell-beschreibung	Literatur
Organosolv-Aufschluss mit Methanol (Perkolation)	210 - 230 °C 10 min	-	-	75	-	[74]
Organosolv-Aufschluss mit Aceton	200 -220 °C 60 -120 min 50 % EtOH	79	82	80	ja	[15, 79]
Organosolv-Aufschluss mit Säuren	240 min 85 °C 30/60/10 % Ameisensäure Essigsäure H_2O	77	76	-	-	[80, 81]
NaOH-Aufschluss	140 °C 10 min	68	-	85		[82]
$Ca(OH)_2$-Aufschluss	50 - 65 °C 1 -3 h 0,2 g/g $Ca(OH)_2$	14	0	60	-	[83]
Aufschluss mit Schwefelsäure	170 °C 30 min 1,5 % H_2SO_4	-	65	80	-	[84]
Aufschluss mit Schwefelsäure	180 - 200 °C 10 - 30 min 1 - 1,5 % H_2SO_4	0	80	-	ja	[85]

Im Folgenden werden die wichtigsten Verfahren und Ergebnisse aus Tabelle 4 näher erläutert.

Zur detaillierten Untersuchung eines Aquasolv-Verfahrens führten Perez et al. 2007 eine Variation der Prozessvariablen Temperatur (170 - 200 °C), Zeit und Feststoffkonzentration durch [72]. Es zeigte sich, dass die Hemicelluloseausbeute in der Aufschlusslösung stark von

den Faktoren Aufschlusszeit und Temperatur abhängig war. Somit variierte die Hemicelluloseausbeute im Bereich zwischen 15 - 45 %. Die optimalen Parameter der enzymatischen Hydrolyse, die mit den empirischen Regressionsmodellen ermittelt wurden, betrugen hierbei 200 °C und 40 min. In diesen Fall wurde eine Glukoseausbeute von 95 % erreicht.

Zur Beschreibung von Aquasolv-Prozessen kann ebenfalls eine charakteristische Prozessgröße, der sogenannten Severity-Faktor log R_0 verwendet werden. Dieser berechnet sich aus der Haltezeit t und der Temperaturüberhöhung über T_R = 100 °C (log R_0 = t*exp(T-T_R/14,75)). Carvalhiero et al. berechneten den Severity-Faktor, um einen Aquasolv-Aufschluss von Weizenstroh zu beschreiben [75]. Hierbei wurde die Xylan-, Lignin- und Cellulosesolubilisierung, die Ausbeute an gelöster Xylose (Oligomere und Monomere) sowie die enzymatische Hydrolysierbarkeit der Faserfraktion in Abhängigkeit der unterschiedlichen Severity-Faktoren für Temperaturen im Bereich von 150 - 240 °C (log R_0 von 2,25 - 4,75) betrachtet. Anhand der detaillierten Analytik der Faserfraktionen und der Aufschlussüberstände konnten die komplexen Beziehungen zwischen den unterschiedlichen Zielwerten dargestellt werden. Mit steigendem log R_0 der Vorbehandlung stiegen die Konzentration der Abbauprodukte und die Delignifizierungen an, während die Xyloseausbeute reduziert wurde. Als optimaler Betriebsbereich wurde ein log R_0 von 3,96 identifiziert, bei dem die Hemicelluloseausbeute in der Aufschlusslösung zu 64 % und die Delignifizierung zu 15 % maximiert wurden. Die Cellulosesolubilisierung betrug in diesem Fall jedoch 16 %. Diese hohe Solubilisierung von Glukose reduziert die Selektivität der Fraktionierung erheblich.

Petersen et al. übertrug parallel zu den Untersuchungen von Carvailheiro dieses Severity-Modell auf einen kontinuierliche Aquasolv-Prozess (Schneckenpumpe als Reaktor) mit Verweilzeiten zwischen 6 - 12 min bei Temperaturen von 185 - 205 °C (log R_0 von 3,2 bis 3,9) [73]. Die Hauptzielgröße der Untersuchungen war die Ethanolausbeute bei der anschließenden Fermentation von Glukose zu Ethanol. Die Hemicelluloseausbeute in der Aufschlusslösung betrugen mit aufsteigendem Severity-Faktor zwischen 20 - 40 %. Die Delignifizierung lag in Bereichen von 5 - 10 %.

Sowohl Jimenez et al. [79] als auch Huijgen et al. [15] konnten für den Aceton-Organosolv-Prozess darlegen, dass eine effektive Vorbehandlung erst in Temperaturbereichen von 200 - 220 °C und Haltezeiten von 60 - 120 min bei Lösemittelgehalten von 40 - 60 % durchgeführt

werden kann. Dies hat zur Folge, dass der Severity-Faktor der Vorbehandlung im Vergleich zu anderen Prozessen größer wird. Während Jimenez ein empirisches Modell basierend auf einen zentral zusammengesetzten Versuchsplan erstellt hat, wurden die Experimente von Huijgen keiner Modellbetrachtung unterzogen. Dennoch konnte durch die detaillierte Analytik von Faser und Aufschlussüberständen alle relevanten Zielgrößen einer selektiven Vorbehandlung ermittelt werden. Der optimierte Aceton-Organosolv-Prozess zeigte bei 60 min und 205 °C (50 / 50 % w/w) eine Delignifizierung von 79 %, eine Hemicellulosesolubilisierung von 82 %, eine Cellulosesolubilisierung von 7 %, eine Hemicelluloseausbeute in der Aufschlusslösung von 20 % und eine Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse von 80 % [15].

Den Zusammenhang zwischen Vorbehandlungseffizienz, pH-Wert der Aufschlusslösung und Katalysatortyp wurde parallel zu der vorliegenden Arbeit 2010 von der Arbeitsgruppe Pedersen untersucht [82]. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche alkalische (NaOH, Na_2CO_3) und saure (H_2SO_4, HCl, Essigsäure) Aufschlussmethoden miteinander verglichen (Reaktionszeit 10 min, Reaktionstemperatur 140 °C und Feststoffgehalt 5 % w/w). Die sauren Aufschlüsse lieferten im Vergleich zu den alkalischen Aufschlüssen höhere Zuckerkonzentrationen in der Aufschlusslösung (bis 200 g/kg), während die Delignifizierung der Faser nur durch die Behandlung mit NaOH bei hohen pH-Werten (pH 13) stattfand. Daher wurde anschließend ein zweistufiger Prozess durchgeführt, der aus einem sauren Aufschluss mit H_2SO_4 bei pH 1 für 10 min bei 140°C gefolgt von einem alkalischen Aufschluss mit NaOH bei pH 13 für 10 min bei 140 °C bestand. Diese Prozessvariante vereinte die Vorteile der Einzelprozesse und es konnte insgesamt 71 % Lignin aus der Faser entfernt werden. Die Zuckerausbeuten an Glukose und Xylose nach Aufschluss und Hydrolyse der Faserfraktionen betrugen in diesem Fall 68 und 85 %.

2.4.3 Vorbehandlungsmethoden für Miscanthus

Tabelle 5 zeigt eine Übersicht der Vorbehandlungsverfahren von Miscanthus. Die Daten aus der Literatur zeigen, dass vor allem das Organosolv-Verfahren und alkalische Verfahren zu einer hohen Delignifizierung, Hemicellulosesolubilisierung und Glukoseausbeute führten. Aus Tabelle 5 ist ebenfalls zu erkennen, dass für Miscanthus bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Modellbetrachtungen angestellt wurden, die den Zusammenhang zwischen Betriebsparameter und Zielgrößen beschreiben.

Tabelle 5: Überblick zu den eingesetzten Vorbehandlungsverfahren zum Aufschluss von Miscanthus

Verfahren	Betriebs-bedingungen	Delignifizierung / %	Hemicellulose-solubilisierung / %	Glukose-ausbeute / %	Modell-beschreibung	Literatur
Extrusion mit NaOH	70 °C 12 % NaOH	77	44	95	-	[86]
NaOH Aufschluss	121 °C 30 min	-	-	59	-	[87]
NaOH Aufschluss	90°C 90 min 7,5 % (w/w) NaOH	75	-	-	-	[88]
Wet Explosion	80 - 100 °C 3 -25 h 0,5 % H_2SO_4	-	62	63	-	[89]
AFEX	160 °C 5 min 2 $g/g_{Miscanthus}$ NH_3	0	0	96	-	[59]
Organosolv-Aufschluss mit Ethanol	180 °C 90 min 60 % (w/w) Ethanol	75	-	-	-	[88]
Organosolv-Aufschluss mit Ethanol	170 - 190 °C 60 min 0,5 - 1,2 % H_2SO_4	45	60	80	-	[16]

Im Folgenden sollen die wesentlichen Erkenntnisse der unterschiedlichen Vorbehandlungsverfahren aus Tabelle 5 näher erläutert werden.

Im Jahre 2002 hat die Arbeitsgruppe um de Vrije et al. ein Extrusionsverfahren mit 12 % NaOH bei 70 °C als mögliche Vorbehandlung von Miscanthus untersucht [86]. Mit diesem

Verfahren konnte eine Delignifizierung von 77 %, eine Xylansolubilisierung von 44 % und eine Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse der Faserfraktion von 95 % erreicht werden.

Vintila et al. konnten durch Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 121 °C für 30 min eine Reduktion der NaOH-Konzentration auf 2 % realisieren. Hierbei wurde eine Glukoseausbeute von 59 % erreicht [87].

Sörensen et al. kombinierten eine saure Vorimprägnierung von Miscanthus mit anschließender Wet Explosion in einem Batchreaktor [89]. Hierbei wurden die Säurekonzentration (0,5 - 1,5 % H_2SO_4), die Inkubationszeit (3 - 25 h) und die Temperatur (80 - 100 °C) der Vorimprägnierung mittels Parametervariation optimiert. Die saure Vorbehandlung (0,75 % H_2SO_4, 100°C, 14 h) führte zu einer Xylanausbeute von 62 %. Der anschließende oxidative Wet Explosion Prozess wurde entweder mit Luft oder mit Wasserstoffperoxid als Sauerstoffdonor durchgeführt. Hierzu wurde das System bei Erreichen der Prozesstemperatur (170 °C) von 200 bar auf 18 bar entspannt. Mit diesem Verfahren konnten bei der anschließenden enzymatischen Hydrolyse Glukoseausbeuten von 61 % bis 63 % erzielt werden.

Eine Optimierung der AFEX-Vorbehandlung von Miscanthus wurde erstmals 2007 von der Gruppe von Murnen et al. durchgeführt [59]. In dieser Arbeit wurde mittels Parametervariation der AFEX-Prozess in einem Batch-Autoklaven optimiert. Die optimale Prozessbedingungen betrugen 160 °C, 2:1 (w/w %) Ammoniak zu Miscanthus, Feuchtegehalt der Faser 23,3 % und 5 min Reaktionszeit. Bei diesem AFEX-Prozess verblieben sowohl Hemicellulose, Lignin als auch Cellulose in der Faser, so dass nach der enzymatischen Hydrolyse ein Gemisch aus C5- und C6-Zuckern entstand. Der verbliebene Reststoff war größtenteils eine kohlenhydratreiche Ligninfraktion. Mit dieser speziellen Technik konnte eine Glukose- und Xyloseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von 96 % und 81 % erreicht werden.

Ein Vergleich von NaOH-, Organosolv- und alkalischen Organosolv-Vorbehandlungs-verfahren von Miscanthus wurde von Serrano durchgeführt [88]. Der NaOH- sowie der Organosolv-Prozess führten zu einer besseren Delignifizierung der Faser, so dass der Holocelluloseanteil der Faser (Anteil Hemicellulose + Cellulose) im Bereich von 72 - 75 % lag. Der alkalische Organosolv-Prozess hingegen zeigte eine geringere Delignifizierung der Faser, so dass in diesem Fall ein Holocelluloseanteil von 61 % erreicht wurde.

In mehreren Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe Brosse und El Hage wurden sowohl säurekatalysierte EtOH-Organosolv-Prozesse [90, 91], als auch Verfahrenskombinationen von Autohydrolyse (mit und ohne Naphtol) gefolgt von einem säurekatalysierten EtOH-Organosolv-Prozess [92] oder saure Vorimprägnierung mit 2 M H_2S0_4 (100°C für 17 h) gefolgt von einem säurekatalysierten EtOH-Organosolv-Prozess durchgeführt [16].

Im Jahre 2009 charakterisierten El Hage und Brosse die Ligninstruktur von Miscanthus und stellten fest, dass es sich bei Miscanthus-Lignin um H / G / S Lignin handelte (4 % / 52 % / 44 %). Zusätzlich wurden in Abhängigkeit der Aufschlussbedingungen die Molekulargewichte, die FT-IR Spektren und der Anteil an Hydroxylgruppen (mit ^{31}P NMR) der isolierten Lignine ermittelt [91].

Die Ergebnisse einer umfassenden Parametervariation eines säurekatalysierten EtOH-Organosolv-Prozesses (170 - 190 °C, 0,5 - 1,2 % H_2SO_4 bei t = 60 min) wurden 2009 zeitgleich von Brosse veröffentlicht [16]. In Abhängigkeit der Betriebsbedingungen konnten eine Delignifizierung von 30 - 60 % und eine Hemicellulosesolubilisierung von 10 - 93 % erreicht werden. Bei optimalen Betriebsbereichen wurden in etwa 40 - 47 % Xylanausbeute in der Aufschlusslösung erzielt, bei einer Delignifizierung von 40 - 45 % und einer Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von 80 %. Die Messdaten zeigten, dass mit steigender Hemicellulosesolubilisierung die Delignifizierung der Faser zurückging. Somit existierte kein Betriebsbereich, bei dem beide Zielwerte gleichzeitig maximiert werden konnten. Beide Parameter sind stark abhängig von der Temperatur, der Haltezeit und der Säurekonzentration. Eine Erweiterung des säurekatalysierten EtOH-Organosolv-Verfahrens durch eine zusätz-lichen Vorimprägnierung mit 2 M H_2SO_4 für 17 h am Siedepunkt der Lösung wurde ebenfalls betrachtet [16]. Diese Vorbehandlungsmethode führte zu einer weiteren Steigerung der Xylanausbeute in der flüssigen Phase auf 59 %. Die Delignifizierung betrug hierbei insgesamt 70 % und die Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse der Cellulosefaser nahezu 100 %.

2.4.4 Vorbehandlungsmethoden für Pappelholz

In Tabelle 6 ist ein Überblick zu den Vorbehandlungsverfahren von Pappelholz aufgezeigt. Generell wurden Aquasolv-, Steam Explosion-, AFEX-, Organosolv-, saure oder alkalische Verfahren eingesetzt, um Pappelholz vorzubehandeln. Vor allem alkalische Verfahren und Organosolv-Prozesse führten zu einer hohen Delignifizierung, hohen Hemicellulose-solubilisierung und zu hohen Glukoseausbeuten.

Tabelle 6: Überblick zu den eingesetzten Vorbehandlungsverfahren zum Aufschluss von Pappelholz

Verfahren	Betriebs-bedingungen	Delignifizierung / %	Hemicellulose-solubilisierung / %	Glukose-ausbeute / %	Modell-beschreibung	Literatur
Dampf-Behandlung im Extruder	180 -220 °C 7 -40 min	-	60	60	-	[93]
Aquasolv	180 - 240 °C 48 - 66 min	-	62	60	-	[94]
Aquasolv	205 °C 10 min	-	59	64	-	[95]
Aquasolv	180 °C 10 min	-	60	45	-	[96]
Steam Explosion	190 - 210 °C 4 - 8 min	-	50	60	-	[94]
SO_2 - Steam Explosion	190 °C 5 min 3,0 % SO_2	-	70	70	-	[96]
Aufschluss mit Säure im Rohrreaktor	200 °C 9,1 s 0,55 % H_2SO_4	-	86	90	-	[97]
NaOH Aufschluss	125 °C 2-4 h 2,5 % NaOH	70	30	90	-	[97]
AFEX	185 °C 10 min cc NH_3	-	0	40	-	[96]
$Ca(OH)_2$ Aufschluss	160 °C 120 min 20 % $Ca(OH)_2$	-	0	70	-	[96]
Organosolv-Aufschluss mit Methanol	165 - 170°C 1 - 2,5 h 70 % MeOH 0,05 M H_2SO_4	76 - 99	80	77 -88	ja	[98]
Organosolv-Aufschluss mit Ethanol	165 - 185 °C 40 - 80 min 50 % EtOH 1,5 % H_2SO_4	72	81	98	ja	[17, 99]

Die wesentlichen Verfahren aus Tabelle 6 sollen im Folgenden näher erläutert werden:

Für die Vorbehandlung von Pappelholz wurde bereits im Jahre 1991 eine kontinuierliche Dampfvorbehandlung (die sogenannten STAKE-Technologie) von Pappelholz von der Arbeitsgruppe Heitz vorgestellt [93]. Zentrales Element war eine Hochdruckschneckenpumpe (Digester) mit mehreren Injektionsstellen für den Wasserdampf. Im Bereich von 210 - 220 °C und Verweilzeiten von 20 min konnten optimalerweise 55 - 60 % der Hemicellulose (vorwiegend Xylose) wieder gewonnen werden. Eine anschließende zusätzliche alkalische Waschung der Fasern mit 5 % NaOH bei 100 °C und 30 min führte zu einer Wiedergewinnung von 50 - 55 % Lignin. Die Ausbeute an Glukose nach enzymatischer Hydrolyse der Faserfraktion betrug 55 - 60 %.

Ein Aquasolv-Verfahren zum Aufschluss einer Hybridpappel wurde von Kim et al. im Jahre 2009 mit Hilfe einer Parametervariation ausführlich untersucht [95]. Als Reaktorsystem wurde ein rohrförmiger Batchautoklav mit einem Volumen von 45 mL eingesetzt, um sehr kurze Aufheizzeiten und Abkühlzeiten (Quenchen mit Eis) zu gewährleisten. Hier lagen die optimalen Prozessbedingungen bei 205 °C und 10 min. Mit diesen Bedingungen konnte eine Xylanausbeute in der Lösung von 59 % erreicht werden. Die Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse betrug 64 %. Die Restfaser nach enzymatischer Hydrolyse bestand aus 65 % Lignin und 33 % Cellulose.
Für den Aufschluss von Pappelholz wurde erstmals im Jahre 2009 ein systematischer Vergleich von einem sauren Aufschluss (2 % H_2SO_4, 190 °C, 1.1 min), einer SO_2-Steam Explosion- (3,0 % SO_2, 190 °C, 5 min), einem Aquasolv- (pH 7, 180°C, 10 min), einem ARP- (15 % Ammoniak, 185 °C, 27,5 min), einem AFEX- (185 °C, 10 min) sowie einem $Ca(OH)_2$-Aufschluss (20 % $Ca(OH)_2$, 160 °C, 120 min) durchgeführt [96].
Es konnte festgestellt werden, dass das SO_2-Steam Explosion-Verfahren mit 70 % die größte Xylanausbeute in der Aufschlusslösung zeigte, gefolgt vom Diluted Acid Verfahren mit 60 %, Aquasolv-Aufschluss mit 60 % und ARP-Aufschluss mit 50 %. Das AFEX- und das $Ca(OH)_2$-Verfahren konnten den Hemicelluloseanteil der Faser nicht reduzieren. Trotz der hohen Xylansolubilisierung der SO_3-Steam Explosion Methode wurden auch bis zu 17 % der Glukose in der Aufschlusslösung wiedergefunden, so dass eine signifikante Cellulosesolubilisierung stattfand. Bei der enzymatischen Hydrolyse der Faserfraktion zeigte wiederum der SO_2- Steam Explosion-Prozess mit 70 % Glukoseausbeute die beste

Hydrolysierbarkeit der Faserfraktion. Ähnliche Ausbeuten wurden vom $Ca(OH)_2$-Verfahren erzielt. Die anderen Prozesse zeigten in den Vergleichsexperimenten eine Glukoseausbeute in Bereichen von 40 % bis 46 %. Zusammenfassend stellten die Autoren fest, dass sehr harsche Reaktions-bedingungen nötig waren, um effektiv Pappel aufschließen zu können. Die Verfahren mit SO_3-Steam Explosion und $Ca(OH)_2$ wurden auf Grund der hohen Zuckerausbeuten als die besten Verfahren zum Aufschluss von Pappelholz identifiziert. Jedoch konnte mit diesen Verfahren kein reines Lignin isoliert werden.

Die Arbeitsgruppe um Chum führte detaillierte Untersuchungen zum MeOH-Organosolv-Aufschluss von unterschiedlichen Pappelhölzern (*P. tremuloides* und *P. trichocarpa*) durch [98]. Hierbei konnte bei optimalen Betriebsbedingungen für *P. tremuloides* (70 % MeOH, 0,05 M H_2SO_4, 165 °C, 2,5 h) eine Delignifizierung von 76 % und eine Hemicellulosesolubilisierung von 100 % beobachtet werden, während für *P. trichocarpa* (70 % MeOH, 0,05 M H_2SO_4, 170 °C, 1 h) eine Delignifizierung von 99 % und eine Hemicellulosesolubilisierung von 80 % ermittelt wurde. Die enzymatische Hydrolysierbarkeit der Fasern betrug 77 % bzw. 88 % nach 100 h mit einer Feststoffkonzentration von 10 g/L bei der enzymatischen Hydrolyse.

Im Gegensatz zu MeOH-Organosolv-Prozessen bieten EtOH-Organosolv-Prozesse. Aufgrund des geringeren Gefährdungspotentials sind die Betriebs- und Investitionskosten durch die Verwendung von Ethanol als Lösemittel deutlich geringer [66]. Detaillierte Untersuchungen von säurekatalysierten EtOH-Organosolv-Verfahren wurden von der Arbeitsgruppe Pan 2006 durchgeführt [17, 99]. Mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung wurde der Einfluss der Betriebsparameter Temperatur (165 - 185 °C), Haltezeit (40 - 80 min), Säurekonzentration (1,0 - 1,5 % H_2SO_4) sowie Ethanolkonzentration (35 - 65 % v/v) untersucht. Die optimalen Parameter zur Maximierung der Zuckerausbeute, der Cellulosewiederfindung in der Faser und der Delignifizierung waren 180 °C, 60 min, 1,25 % H_2SO_4 und 50 % (v/v) EtOH. Die Xylanausbeute in der Aufschlusslösung betrug 52 % bei einer Xylansolubilisierung 81 %. Die Delignifizierung lag bei 72 %. Die Glukoseausbeute der vorbehandelten Faser mit Cellulasen betrug 98 % nach 48 h.

2.4.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel soll der Stand der Wissenschaft im Bereich der Vorbehandlung von Weizenstroh, Miscanthus und Pappelholz zusammengefasst werden, um darum die Ziele für diese Arbeit abzuleiten.

Am Anfang der Prozessentwicklung stehen der Vergleich und die Auswahl eines geeigneten Vorbehandlungsverfahrens. Vergleicht man den Stand der Wissenschaft, so ist zusammenfassend ersichtlich, dass nur wenige vergleichende Untersuchungen in der Literatur durchgeführt wurden. Für Weizenstroh sind hierbei vor allem die Arbeiten von Xu et al. [80, 81] (Organosolv-Prozesse mit org. Säuren und Alkoholen) und Pedersen et al. [100] (alkalisch und saure Prozesse) zu nennen. Bei Miscanthus sind derartige vergleichende Experimente bisher nicht veröffentlicht worden. Ein Vergleich verschiedener Vorbehandlungsverfahren für Pappelholz wurde ebenfalls erst vor kurzer Zeit für die Verfahren Diluted Acid, SO_3-Steam Explosion, Aquasolv, ARP, AFEX und $Ca(OH)_2$ durchgeführt [96].

Aufgrund der oftmals verschiedenen Prozessbedingungen (pH, Temperatur und Zeit) ist ein Vergleich im Frühstadium einer Prozessentwicklung sehr schwierig. Durch die Einführung eines sogenannten erweiterten Severity-Faktors log R''_0 (Severity Faktor) kann jedoch der Einfluss von pH, Temperatur und Reaktionszeit zu einer charakteristischen Größe zusammengefasst werden [98, 101]. In dieser Arbeit sollten daher für die Rohstoffe Weizenstroh, Miscanthus und Pappelholz ein Vergleich und die Auswahl des besten Vorbehandlungsverfahrens auf Basis des erweiterten Severity-Faktors log R''_0 durchgeführt werden.

Während der Optimierung von Vorbehandlungsverfahren befassten sich einige Arbeitsgruppen zwar mit der genauen Beschreibung der funktionellen Zusammenhänge zwischen Betriebsparametern und Zielgrößen wie Delignifizierung, Xylansolubilisierung und Glukoseausbeute [15, 17, 71, 79, 85, 98, 99]. In dieser Arbeit sollte jedoch die Delignifizierung, die Xylansolubilisierung, die Cellulosesolubilisierung, die Xyloseausbeute, die Glukoseausbeute, die Xyloseselektivität und die Bildung von Lignocellulose-Abbauprodukten betrachtet werden (siehe Kapitel 1.2), um eine vollständige Fraktionierung bei maximalen Ausbeuten zu realisieren. Hierzu sind detaillierte Analysen sowohl der Faserfraktion als auch der Aufschlussüberstände nötig. Darüber hinaus sollten die ausgewählten Vorbehandlungsverfahren auf Basis einer charakteristischen Prozessgröße beschrieben werden.

2.5 Enzymatische Hydrolyse

Wie in Kapitel 2.2 bereits erwähnt, besteht der Aufschluss und die Fraktionierung von Lignocellulose aus den Prozessschritten Vorbehandlung der Lignocellulose, Hydrolyse der Zuckerpolymere und Abtrennung der Lignocellulose-Abbauprodukte aus der Aufschluss-

lösung. In diesem Kapitel soll die Hydrolyse der Zuckerpolymere Cellulose und Hemicellulose erläutert werden.

2.5.1 Grundlagen der enzymatischen Hydrolyse

Für die enzymatische Hydrolyse der Cellulose- bzw. Hemicellulosefraktion werden mehrere Enzyme benötigt, die synergistisch zusammenwirken, um von einem Zuckerpolymer zu einem Monomer zu gelangen. Die Enzymgemische werden dann anhand des umgesetzten Substrats als Cellulasen und Hemicellulasen bezeichnet. Im folgenden Kapitel soll auf die Grundlagen von Cellulasen und Hemicellulasen, insbesondere der Xylanasen, eingegangen werden, da diese Enzyme eine wesentliche Rolle bei der Konversion von Lignocellulose spielen [24, 102].
Die Einteilung der Cellulasen erfolgte ursprünglich über den zu katalysierten Reaktionsschritt [103]. Hierbei gibt es drei wesentliche Arten von enzymatischen Aktivitäten:

- Endoglukanasen (EG) oder 1,4-ß-D-Glukan-4-Glucanohydrolasen (EC.3.2.1.4)
- Exoglukanasen wie 1,4-ß-D-Glukan-Glukanohydrolyasen (EC.3.2.1.74) und 1,4-ß-D-Glukan-Cellobiohydrolysen (CBH) (EC 3.2.1.91)
- ß-Glukosidasen (EC.3.2.1.21)

Eine schematische Darstellung der enzymatischen Hydrolyse von Cellulose mittels Cellulasen ist in Abbildung 10 dargestellt. Endoglukanasen schneiden aus der amorphen Cellulosekette an beliebigen Stellen Oligosaccharide verschiedener Längen aus und generieren somit weitere freie Zuckerenden (reduzierendes C1-Ende oder nicht reduzierendes C4-Ende, siehe Kapitel 2.1). Exoglukanasen wiederum können vom nicht reduzierenden oder vom reduzierenden Ende eines Cellulose-Polysaccharids oder -Oligossacharids ein Glukosemonomer oder ein Dimer (Cellobiose) freisetzen. Dabei können Exoglukanasen, im Gegensatz zu Endoglukanasen, sowohl auf amorphen als auch auf kristallinen Regionen der Cellulosematrix adsorbieren. Dies führt dazu, dass freie Enden von der kristallinen Region abgelöst werden [104]. ß-Glukosidasen spalten schließlich lösliche Cellooligosaccharide und Cellobiose zu Glukose. Während der Spaltung der ß-1,4 glykosidischen Bindung kann entweder eine Inversion oder Beibehaltung der anomerischen Konfiguration des C1-Atoms (reduzierendes Ende) auftreten [105].

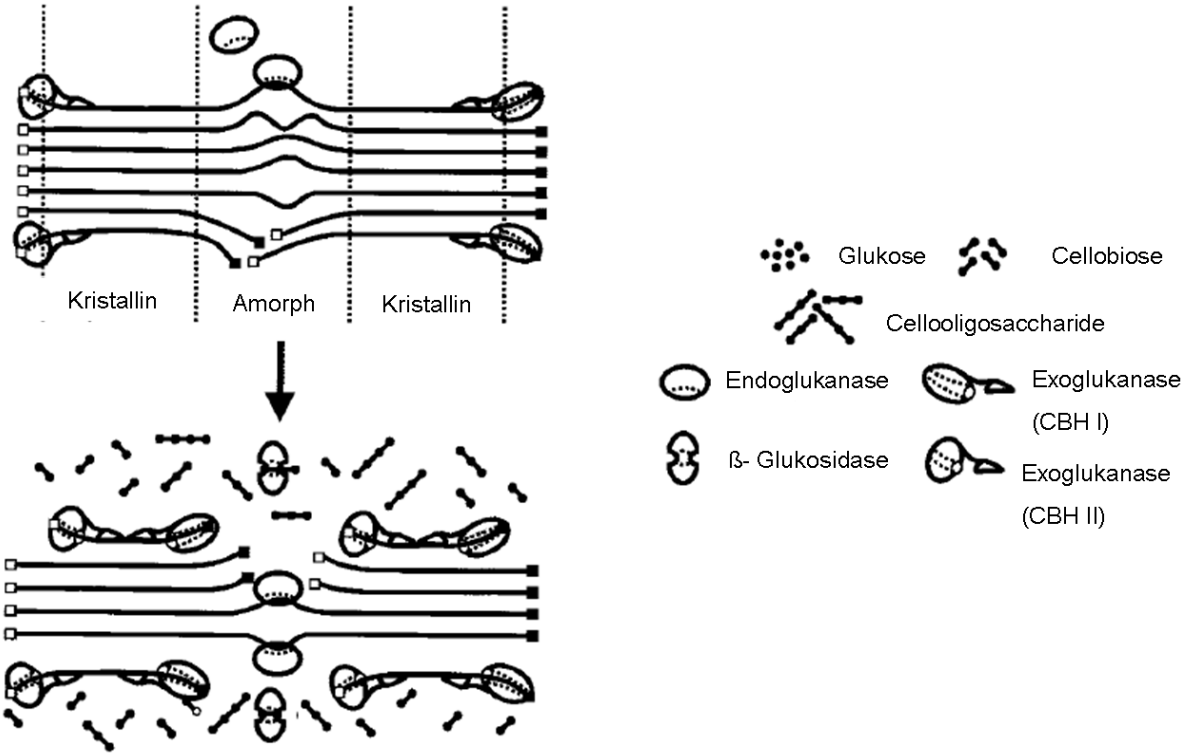


Abbildung 10: Schematische Darstellung der enzymatischen Hydrolyse von Cellulose mit Endo- und Exoglukanasen sowie mit ß-Glukosidase nach [102].

Hemicellulasen hydrolysieren die zweite Hauptkomponente von Lignocellulose, die sogenannte Hemicellulose. Die Hemicellulose ist ein hetorogen aufgebautes Polymer aus den Monozuckern Xylose, Arabinose, Mannose, Galaktosen, Rhamnose und Glukuronsäure. Aufgrund der vielfältigen Struktur der Hemicellulose existiert eine große Anzahl an unterschiedlichen Enzymen. Der Großteil der publizierten Arbeiten beschäftigt sich vor allem mit den Xylanasen, die vorwiegend Xylane spalten. Eine Schema zur Spaltung von Xylan ist in Abbildung 11 aufgezeigt. Die sogenannte Endoxylanase schneidet zufällig eine Xylankette während die ß-Xylosidase ein Xylosemonomer freisetzt. Die Abspaltung von Seitengruppen beispielsweise der Arabinose wird durch α-Arabinofuranosidasen katalysiert. Zusätzlich kann die Spaltung der Esterbindung zwischen Lignin und der Hemicellulose-Seitenkette durch Feroryl- oder Coumarylesterasen katalysiert werden [24].

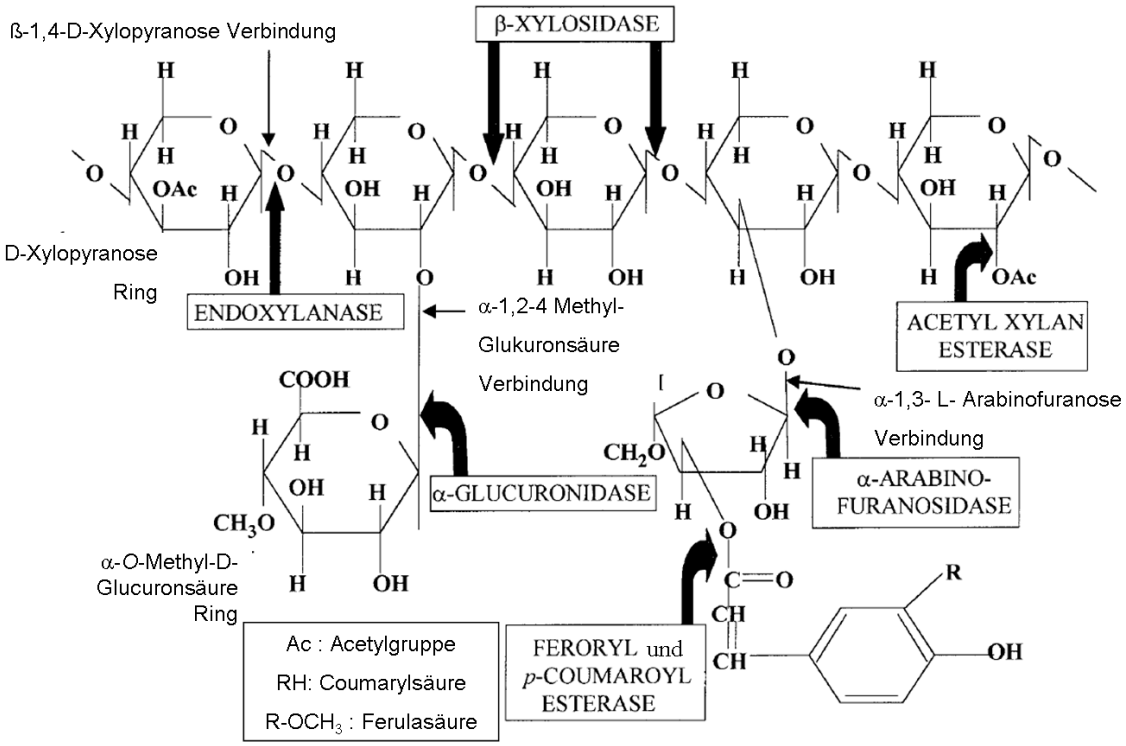


Abbildung 11: Schematische Darstellung der enzymatischen Hydrolyse von Arabinoxylan (Hemicellulose) mit Hilfe von Xylanasen (Endoxylanase und ß-Xylosidase) und Esterasen nach [24].

2.5.2 Verfahren zur enzymatische Hydrolyse von Hemicellulose und Cellulose

Im folgenden Kapitel soll ein Überblick über die enzymatische Hydrolyse von Hemicellulose und Cellulose gegeben werden.

2.5.2.1 Enzymatische Hydrolyse des Xylananteils in der Faser

Im folgenden Kapitel sollen Verfahren vorgestellt werden, die sich mit der enzymatischen Hydrolyse des Xylananteils in der Faser beschäftigen. Diese Verfahren wurden eingesetzt, sobald die Vorbehandlung zu keiner vollständigen Entfernung des Xylans aus der Faser führte.

Erste Daten zur enzymatischen Hydrolyse der Xylanfraktion aus unbehandeltem Weizenstroh wurden von den Arbeitsgruppen Ziliox et al. [106] und Lequart et al. [107] in den Jahren 1998 und 1999 veröffentlicht. In den Arbeiten wurden vor allem Endoxylanasen von *Bacillus* XE und *Bacillus* I-1018 eingesetzt, so dass im Wesentlichen lösliche Oligosaccharide aus der Faser freigesetzt wurden. Aufgrund der fehlenden Vorbehandlung waren die Xylanausbeuten mit < 10 % sehr gering.

Parallel zu diesen Arbeiten wurde von der Gruppe Gokhale [108] die enzymatische Hydrolyse mit alkalisch vorbehandelten Rohstoffen (0,1 N NaOH, 16 h, 28 °C - 30 °C) wie Bagasse, Maiskolben und Jutefasern betrachtet. Hierbei wurde ein xylanasehaltiger Kulturüberstand von einer Hefe eingesetzt, die aus abgestorbenem Sandelholz isoliert wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass die alkalische Vorbehandlung der Rohstoffe zu einer signifikanten Erhöhung (> Faktor 9) der Xylanausbeuten führte. Die Analyse der löslichen Zucker zeigte, dass im Wesentlichen Xylooligosaccharide und Xylose freigesetzt wurden. Insgesamt konnten mit dem Verfahren jedoch nur Xylanausbeuten von 5 % bis 20 % erreicht werden. Die Xyloseausbeute war hier im Wesentlichen abhängig vom eingesetzten Rohstoff.

Die Arbeitsgruppe Yang hat 2006 Daten für die enzymatische Behandlung der Xylanfraktion von Maiskolben mit *Penicillium corylophilum* Xylanasen veröffentlicht [109]. In diesem Fall wurden die Maiskolben vor der Xylanhydrolyse bei 130 - 150°C dampfbehandelt (Vorimprägnierung mit 1 g/L H_2SO_4 für 12 h bei 60°C), um bereits einen Teil der Xylanfraktion des Feststoffs zu solubilsieren. Die gesamte Xylanausbeute der beiden Prozessschritte (Dampfbehandlung + Xylanasebehandlung) betrug hierbei 67 %. Genaue Angaben zur der Ausbeute der enzymatischen Hydrolyse sind jedoch nicht dargestellt. Die Analyse der Produktzusammensetzung ergab, dass vor allem Xylotriose und Xylotetraosen produziert wurden. Eine selektive Freisetzung von Xylose als Monomer konnte somit nicht erreicht werden.

Liavoga berichtete 2007 von der Xyloseproduktion aus Weizenstroh [110]. Hierfür wurden ebenfalls Verfahren, bestehend aus einer Vorbehandlung und einer anschließenden enzymatischen Hydrolyse, mit der kommerziellen Xylanase Multifect Xylanase™ untersucht. Das Präparat Multifect Xylanase™ wurde aus einer Reihe von Xylanasepräparaten, wie X2753 (Fa. Novozyme), Xylanase M6 (Fa. Megazyme) oder Natugrain wheat L (BASF), aufgrund der höchsten Xyloseausbeute ausgewählt Als Vorbehandlungsmethoden wurden sowohl saure Vorbehandlungen (0,3 M H_2SO_4 bei 123°C für 28 min sowie 1,25 M H_2SO_4, bei 100°C für 2,5 h) als auch Aquasolv-Verfahren (160°C, 1 h) eingesetzt. Die Xylanausbeuten betrugen hierbei 19 % (0,3 M H_2SO_4), 18 % (1,25 M H_2SO_4) sowie 16 % (Aquasolv). Bei der hydrothermalen Vorbehandlung wurde im Gegensatz zu der sauren Vorbehandlung lediglich lösliche Xylooligosaccharide und keine Xylose freigesetzt. Die anschließende Xylanasebehandlung mit der kommerziell erhältlichen Xylanasemixtur Multifect Xylanase™ konnte weitere 6 % Xylose für alle vorbehandelten Fasertypen freisetzen. Die Selektivität von Xylose zu Glukose war hierbei jedoch < 90 %.

Parallel zu der eigenen Arbeit wurde von der Arbeitsgruppe Remond ein sequentielles Verfahren zur Vorbehandlung von Weizenstroh mit einer Ammoniakbehandlung (30 % v/v Ammoniak, 50 °C, 72 h) gefolgt von einer enzymatischen Hydrolyse der Xylanfraktion mittels einer Endoxylanase Tx-Xyl11 von *T. xylanilyticus* vorgestellt [111]. Im ersten Schritt konnten durch die Ammoniakbehandlung 12 % Xylan aus der Faser gelöst werden. Durch die Xylanasebehandlung konnten weitere 20 % aus der Fasermatrix gelöst werden, so dass die gesamte Solubilisierung der Xylanfraktion nach den beiden Verfahrensschritten 54 % betrug. In beiden Fällen wurden vorwiegend Xylooligosaccharide produziert.

2.5.2.2 Enzymatische Hydrolyse des Celluloseanteils in der Faser

In diesem Abschnitt sollen Verfahren zur enzymatischen Hydrolyse des Celluloseanteils in der Faser vorgestellt werden. Hierbei soll vor allem auf Hochfeststoffhydrolyse-Verfahren eingegangen werden, bei denen zu Beginn der Hydrolysereaktion keine kontinuierliche freie Fluidphase vorhanden ist [112]. Dies ist im Wesentlichen bei Feststoffkonzentrationen > 10 % der Fall. In dem die Feststoffkonzentration erhöht wird, erhöht sich auch die Produktkonzentration und damit die Produktionskapazität des Reaktorsystems. Beispielsweise ist für die fermentative Herstellung von Bioethanol bekannt, dass Ethanolkonzentrationen von 5 % bis 8 % angestrebt werden müssen, um den Gesamtprozess inkl. Rektifikation wirtschaftlich zu realisieren [113-115]. Im Allgemeinen verringern sich bei hohen Feststoffkonzentrationen ebenfalls die Investitionskosten (beispielsweise durch kleinere Apparatedimensionen) und die Produktionskosten. Der Energieverbrauch für Heiz- und Kühlsysteme wird ebenfalls reduziert und es fallen geringere Mengen an Abwasser an. Aus diesem Grund sind bei Bioethanolprozessen mit stärke- oder zuckerbasierten Rohstoffen wie beispielsweise Mais oder Zuckerrübe Feststoffgehalte >> 10 % Stand der Technik [116].
Durch die Erhöhung der Feststoffkonzentration entstehen aber auch Probleme bei der Durchführung der Hydrolyse. So entstehen durch die hohen Viskositäten und der fehlenden freien Fluidphase zu Beginn der Hydrolysereaktion Stofftransportlimitierungen. Die Homogenisierung des Systems wird erschwert und der Energieaufwand zum Homogenisieren des Systems ist erhöht [117, 118].

Im Labormaßstab werden zur allgemeinen Untersuchung der Hydrolysierbarkeit vorwiegend Schüttelkolben eingesetzt. Vlasenko et al. hat beispielsweise vorbehandeltes Reisstroh (AFEX und saure Vorbehandlung) mit mehreren Cellulasepräparaten (Cellulase 100L Fa. Iogen, Spezyme CP Fa. Genencor, and A1 Fa. Fermtech) in Schüttelkolben mit Feststoffgehalten bis

15 % TS hydrolysiert [119]. Die Cellulase 100L zeigte hierbei die größten Ausbeuten (37 - 53 %) und Glukosekonzentrationen (30 - 42 g/L).

Bei der Hydrolyse von Olivenbaumhölzern, die mit dem Aquasolv-Verfahren vorbehandelt wurden, konnte Cara et al. 2007 Glukoseausbeuten von 50 % bei 30 %TS und 67 % bei 20 % TS nach 72 h in Schüttelkolben erreichen [120]. Dies entsprach Glukosekonzentrationen von 50 g/L- 60 g/L.

Hodge et al. betrachtete die enzymatische Hydrolyse von vorbehandeltem Maisstroh (Diluted Acid) bis 30 % Feststoffgehalt mit der Cellulase Spezyme CP (Genencor-Danisco). Für Feststoffgehalte von 20 % TS und 30 % TS betrugen die Ausbeuten nach 72 h 70 % und 60 % [121].

Georgieva et al. führte ebenfalls Hydrolyseexperimente mit vorbehandelten Weizenstoh (Wet-Explosion) im Schüttelkolben bis 14 % TS durch. Die Ausbeuten lagen hierbei bei 65 % nach 72 h für 14 % TS [122]. In diesem Fall wurden Celluclast 1.5L and Novozym188 (Novozymes A/S) als Enzyme eingesetzt.

Für den Labormaßstab wurden ebenfalls gerollte Glasflaschen für Feststoffgehalte (Maisstroh mit saurer Vorbehandlung) von 15 - 30 % eingesetzt [123]. Als Cellulase wurde in diesem Fall GC 220 (Genencor-Danisco) eingesetzt. Im Vergleich zu den Schüttelkolbenversuchen zeigten diese einen höheren Umsatz an Cellulose. Dennoch sanken die Ausbeuten an Glukose (72 h) von 80 % bei 15 % TS auf 50 % bei 30 % TS ab. Die Glukosekonzentrationen waren hierbei im Bereich von 100 - 160 g/L.

Im Vergleich zu den oben genannten Verfahren im Labormaßstab sind bisher weitaus weniger Literaturdaten in skalierbaren Reaktorsystemen vorhanden. In diesem Fall verläuft die Hydrolyse bei hohen Feststoffgehalten in vertikalen oder horizontalen Rührbehältern.

Das am besten entwickelte Reaktorkonzept bei der Hochfeststoffhydrolyse ist der von Felby und Larsen 2009 patentierte horizontale Trommelreaktor mit fünf unabhängigen Reaktionskammern [53, 124, 125] (siehe Abbildung 12 (A)). Die Durchmischung dieser Kammern wird durch Paddelrührorgane (drei pro Kammer) realisiert. Das System wurde sowohl für die Betriebsweisen Separate-Hydrolysis-Fermenation (SHF) als auch für Simultaneous Saccharification Fermentation (SSF) eingesetzt. Mit diesem Reaktor konnten nach längerer Entwicklungszeit Feststoffkonzentrationen von bis zu 40 % (w/w) eingesetzt werden. Als Enzyme wurden die Cellulasen Celluclast 1.5L and Novozym188 (Novozymes A/S) verwendet. Die Ausbeuten nach 96 h sanken jedoch mit steigendem TS-Gehalt von 80 %

bei 10 % TS auf 35 % bei 40 % TS ab. Beim SSF Prozess konnten die Ausbeuten an Glukose bei TS-Gehalten von 15 - 40 % TS um 5 - 10 % erhöht werden.

Die Reaktortechnologie von Felby und Larson ist Teil des IBUS-Prozesses, in dem mittels einer Dampfbehandlung in einer Schneckenpumpe Weizenstroh vorbehandelt wird, um anschließend im oben genannten vertikalen Trommelhydrolysereaktor verzuckert zu werden [126]. Während der Fermentation der freigesetzten Glukose mit *S. cerevisiae* wurde in diesen IBUS-Prozess aus 1 Tonne 143 kg Ethanol produziert. Die nicht umgesetzte C5-Fraktion in der flüssigen Phase wurde als Futtermittel-Molasse eingesetzt und der nicht hydrolysierte Reststoff wurde verbrannt.

Qin veröffentlichte 2010 parallel zur vorliegenden Arbeit Daten zur Hydrolyse von Nadel- und Laubhölzern in einem horizontalen Reaktor mit einen PEG-Mixer (Stabförmige Rührorgane, siehe Abbildung 12 (B)) [127]. Es wurden hierbei Feststoffgehalte bis zu 20 % TS untersucht. Als Enzyme wurden die Cellulasen Celluclast 1.5L und Novozym188 (Novozymes A/S) verwendet. Die Ausbeute bei 20 % TS betrug 60 % bei einer Glukosekonzentration von 120 g/L.

(A) (B)

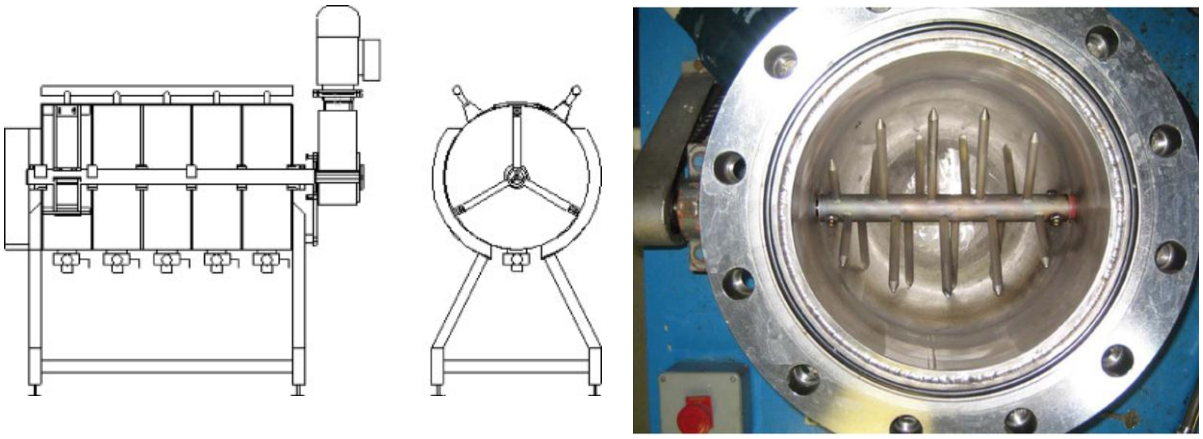


Abbildung 12: (A) Horizontaler Liquefaction Reaktor nach [53, 124, 125] mit fünf Reaktorkammern. (B) Reaktorsystem mit PEG-Mixer nach [127].

Die Arbeitsgruppe von Tengborg führte Hydrolyseexperimente von SO_2-dampfbehandeltem Fichtenholz in einem vertikalen Rührkesselreaktor mit Impellerrührer bei 10 % TS durch [128]. Die Ausbeute betrug hierbei 55 % nach 72 h. Dies entsprach einer Glukosekonzentration von 45 g/L.

Eine Erhöhung der Feststoffkonzentration auf 15 %TS in einem vertikalen Rührkessel mit Impellerrührer konnte von Rosgaard erzielt werden [129]. Als Substrat wurde

dampfbehandeltes Gerstenstroh eingesetzt. Celluclast 1.5L and Novozym188 (Novozymes A/S) wurden ebenfalls als Cellulasen eingesetzt. Hierbei konnten Glukosekonzentrationen von 78 g/L bei einer Ausbeute von 80 % erreicht werden.

2.5.3 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt soll der Stand der Wissenschaft im Bereich der enzymatischen Hydrolyse zusammengefasst werden, um daran die Ziele für diese Arbeit abzuleiten.

Enzymatische Hydrolyse des Xylananteils in der Faser

Die enzymatische Hydrolyse der Xylanfraktion wurde nach Literaturangaben immer dann eingesetzt, sobald die Vorbehandlung der Lignocellulose zu keiner ausreichenden Xylansolubilisierung führte. Die durchgeführten Arbeiten zeigten auf, dass die Verfahren Umsätze < 20 % aufwiesen und dass teilweise Xylooligosaccharide entstanden [108-111].

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war demnach die Identifizierung geeigneter Xylanasepräparate, die Reaktionsumsätze > 20 % erreichen konnten und die Xylanfraktion vollständig zu Xylose umsetzten. Grundvoraussetzung hierfür war die Verwendung von selektiven Xylanasepräparaten mit einer hohen ß-Xylosidaseaktivität. Nachdem in der Literatur Enzyme untersucht wurden, die bisher nicht im technischen Maßstab verfügbar sind [107, 111], sollten vor allem kommerziell erhältliche Xylanasen aus der Papierindustrie untersucht werden, um eine zeitnahe Realisierung des entwickelten Teilprozesses gewährleisten zu können.

Im Gegensatz zur Literatur sollte anschließend die Einbindung der Xylanhydrolyse in die Prozesskette erfolgen, um so erstmals ein geschlossenes Verfahren aus Vorbehandlung, Xylanhydrolyse und Cellulosehydrolyse zu beschreiben.

Enzymatische Hydrolyse des Celluloseanteils in der Faser

Im Bereich der Cellulosehydrolyse sind eine Vielzahl an Daten veröffentlicht worden [130]. Bisher wurde für die Entwicklung geeigneter Vorbehandlungsverfahren vorwiegend die Hydrolysierbarkeit bei Feststoffdichten < 10 % TS betrachtet [131-134]. Die Wirtschaftlichkeit von Hydrolyseprozessen ist jedoch nur bei hohen Feststoffkonzentrationen gegeben [113-115]. Somit stehen wesentliche Verbesserungen des Hydrolyseprozesses im Bereich der Hochfeststoffhydrolyse noch aus [135, 136]. Die vorliegende Arbeit sollte sich daher vorwiegend mit Hydrolse der Fasern bei Feststoffkonzentrationen > 10 % TS beschäftigen. Hierbei sollte bereits frühzeitig der Einfluss von Feststoffkonzentration und Enzymdosierung

auf die Glukoseausbeute und die Glukosekonzentration ermittelt werden. Analog zu der Entwicklung eines Xylanhydrolyseverfahrens sollten bei der Cellulosehydrolyse ebenfalls kommerziell erhältliche Enzympräparate ausgewählt werden, die in der Lage sind hohe Glukoseausbeuten bei hohen Feststoffdichten zu erzielen.

Die Untersuchungen aus der Literatur zeigten, dass bei hohen Feststoffgehalten teilweise Reaktionszeiten von >> 48 h nötig waren, um Glukoseausbeuten von > 70 % zu erreichen [127-129, 135, 137]. Zur Intensivierung der Hydrolysereaktionen musste diese dementsprechend auf technisch skalierbare Reaktionssysteme übertragen werden, um die Limitierungen im Bereich des Wärmeübergangs und des Stofftransports minimieren zu können. Nur sehr wenige Arbeitsgruppen entwickelten Reaktorkonzepte mit denen eine Hochfeststoff-Hydrolyse durchführbar ist. Vorwiegend wurden horizontale Reaktoren eingesetzt, die teilweise durch Patente geschützt sind. Konventionelle vertikale Rührkesselreaktoren wurden im Gegensatz dazu nur vereinzelt betrachtet, bieten jedoch durch die Entwicklung geeigneter Rührorgane großes Entwicklungspotential [127-129, 135, 137].

In der vorliegenden Arbeit sollte daher ein speziell konzipierter Segmentwendelrührer und ein mehrstufiger Schrägblattrührer für die Homogenisierung hochviskoser Fasersuspensionen eingesetzt werden. Zu Beginn erfolgte daher die Charakterisierung der Rührorgane mittels einer Leistungs- und Mischzeitcharakteristik. Auf Basis dieser Daten wurde ein geeignetes Rührorgan ausgewählt, das das Reaktionssystem auch bei hohen Fluidviskositäten homogenisieren konnte.

2.6 Abtrennung von Abbauprodukten aus zuckerhaltigen Aufschlusslösungen

In dem vorliegenden Kapitel soll zunächst auf die möglichen Reaktionswege zur Entstehung von Lignocellulose-Abbauprodukten und deren Wirkungsweise auf Mikroorganismen und Enzyme eingegangen werden. Danach erfolgt eine Übersicht der derzeit angewandten Detoxifikationsverfahren. Nachdem im Rahmen dieser Arbeit Laccase-katalysierte und adsorptive Detoxifikationsverfahren weiterentwickelt wurden, soll der Stand der Wissenschaft dieser Verfahren näher betrachtet werden. Abschließend erfolgt eine zusammenfassende Beurteilung, um den angestrebten Fortschritt in der vorliegenden Arbeit vorzustellen.

2.6.1 Entstehung von Abbauprodukten und deren Wirkungsweise

Wie bereits in Kapitel 2.4 erläutert, müssen physikalische, chemische oder physikalisch-chemische Vorbehandlungsverfahren eingesetzt werden, um die Zugänglichkeit der Faser für Cellulasen zu verbessern. Hierbei entstehen aus der Hemicellulose- und Cellulosefraktion sowohl lösliche Oligosaccharide als auch Zuckermonomere wie Xylose, Mannose, Galaktose sowie Glukose (siehe Abbildung 13). Diese Zuckermonomere können bei hohen Drücken und Temperaturen im Falle der Xylose zu Furfural und im Falle von Glukose, Galaktose und Mannose zu Hydroxymethyl-furfural (HMF) weiter reagieren. Bei sehr harschen Reaktionsbedingungen können diese Furanderivate weiter gespalten werden. Aus Furfural ensteht somit Ameisensäure und aus HMF wird Ameisensäure und Lävulinsäure gebildet. Die Abbaureaktionen werden von H^+-Ionen katalysiert, so dass generell mehr Abbauprodukte bei sauren Vorbehandlungsverfahren entstehen. Durch Deacetylierung der Hemicellulose entsteht auch Essigsäure [138-141].

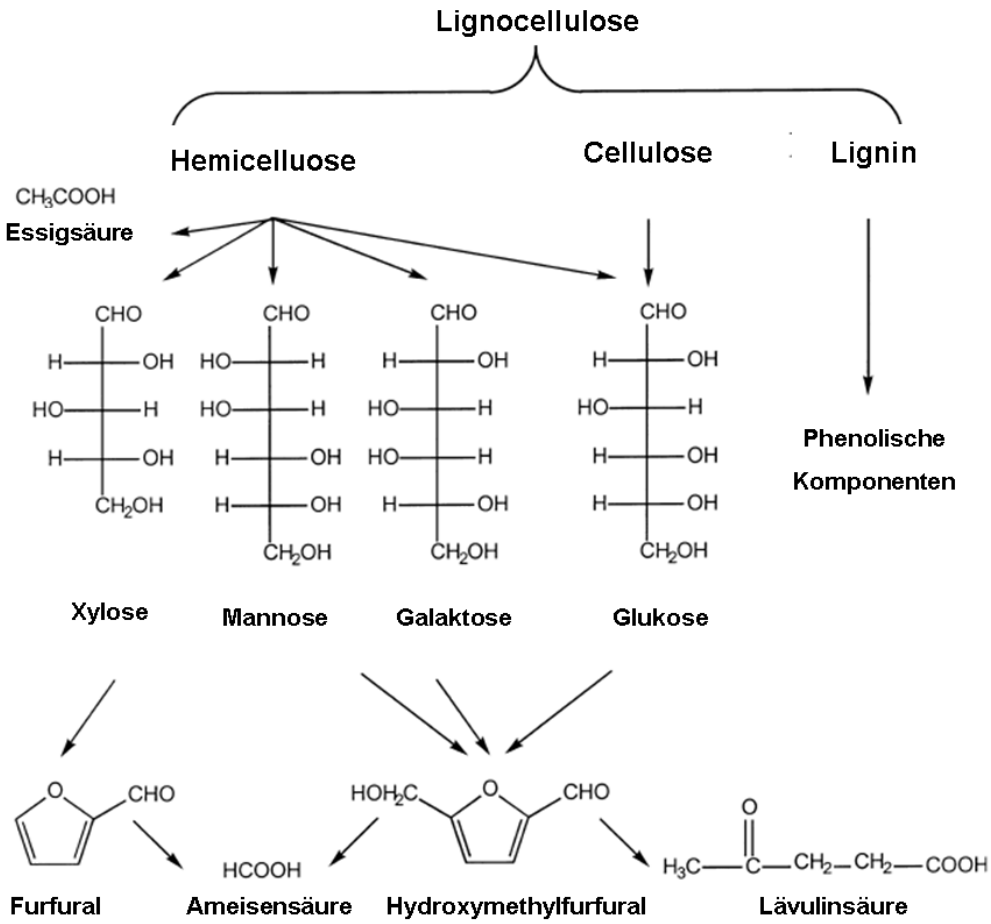


Abbildung 13: Abbaureaktionen während der Vorbehandlung von Lignocellulose modifiziert nach [140].

Neben den Hemicellulose- und Cellulosezuckern kann auch Lignin zu löslichen Ligninabbauprodukten, den sogenannten phenolischen Komponenten, abgebaut werden. Hierbei entstehen eine Vielzahl an Komponenten wie Aromaten, Polyaromaten, Phenolaldehyden, Phenolsäuren oder Phenolketonen. Die häufigsten Vertreter sind 4-Hydroxybenzoesäure (p-Hydroxypropaneinheit); Vanillin und Vanillinsäure (Guaiacyl-propaneinheit) sowie Syringealdehyd, Acetosyringon und Syringylsäure (Syringy-l-propaneinheit). [140, 142-145]

Nachdem die Abbauprodukte sehr viele unterschiedliche Substanzklassen umfassen, ist die Identifizierung aller toxischen Substanzen erheblich erschwert [146, 147]. Untersuchungen, in denen einzelne Modellsubstrate verwendet werden, können grundlegende Wirkungsweisen aufdecken. Es ist jedoch bekannt, dass Synergismen zwischen den einzelnen Abbauprodukten bestehen. Mitunter ist die Toxizität von Substanzmischungen deutlich höher als diejenige der Einzelkomponenten. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung ist es somit schwer, genaue Wirkungsweisen einzelner Komponenten aus den Aufschlussüberständen herauszufinden. Trotz dieser Probleme können dennoch generelle Wirkungsmechanismen auf Mikroorganismen wie folgt definiert werden [141]:

- Furfural und HMF inhibieren die Glykolyse, in dem die Aktivität der Dehydrogenasen gestört wird. Dies führt zu einer Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit und der Biomasseausbeute [148].
- Phenolische Komponenten lagern sich in die Zellmembran ein und stören somit die Integrität und den Stofftransport der Zellwand. Hierbei werden sowohl das Zellwachstum als auch die Zuckeraufnahme reduziert [149].
- Organische Säuren stören den interzellulären pH-Gradienten, so dass die ATP-Produktion der Zelle gestört wird. Diese Wirkung ist im Wesentlichen auch pH-Wert abhängig. Generell ist der Einfluss auf den pH-Gradienten bei kleinen pH-Werten deutlicher größer. Die Toxizität der organischen Säure hängt auch wesentlich von der Hydrophobizität ab. Hydrophobere Säuren können besser in die Zelle penetrieren und wirken somit stärker inhibierend [150].
- Aldehyde stören, ähnlich wie die organischen Säuren, den interzellularen pH-Gradienten der Zelle. Die Penetration in die Zelle hängt ebenfalls von der Hydrophobizität ab [151].

- Alkohole können ebenfalls inhibierend auf die Zelle wirken. Die Wirkungsweise ist jedoch im Vergleich zu Säuren und Aldehyden nicht abhängig von der Hydrophobizität. Alkohole führen zu einem Zusammenbruch der Zellmembran und somit zu einer Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit [152].

Neben einer Inhibierung von Mikroorganismen wurde ebenfalls über die Inhibierungen von Enzymen, insbesondere Glykosidasen, berichtet [153-157]. In diesem Fall liegt jedoch noch keine genaue Erkenntnis über die Wirkungsweisen vor [155]. Generell werden ß-Glukosidasen stärker inhibiert als CBHs oder Endocellulasen. Jing et al. berichtete von einer Abstufung der Inhibitionswirkung. So wirken vor allem Ligninabbauprodukte inhibierend auf die Glykosidasen, gefolgt von den Furanderivaten und organischen Säuren [153]. Es wurde festgestellt, dass Ameisensäure stark inhibierend auf Glykosidasen wirken kann. Bereits ab Konzentrationen von > 5 g/L wird die Enzymaktivität um 20 % herabgesenkt [154, 156].

2.6.2 Übersicht über die eingesetzten Detoxifikationsverfahren

Generell lassen sich, wie in Abbildung 14 dargestellt, biologische, physikalische und chemische Detoxifikationsverfahren unterscheiden.

Biologische Verfahren umfassen Methoden, bei denen entweder Enzyme wie Oxidoreduktasen [143] (Laccase, Peroxidase) oder Mikroorganismen wie beispielsweise Bakterien [158] und Pilze [159] eingesetzt werden, um die Abbauprodukte zu entfernen. Oxidoreduktasen können gezielt Seitengruppen (vor allem Hydroxy-, Carboxy- oder Aldehydgruppen) von phenolischen Komponenten oxidieren [141]. Die durch die Oxidoreduktasen gebildeten Oxidationsprodukte polymerisieren schließlich zu nicht-toxischen Reaktionsprodukten [160]. Mikroorganismen wie beispielsweise *Cupriavidus basilensis* oder *Amorphotheca resinae* ZN1 [158, 159] können im Gegensatz dazu neben phenolischen Komponenten auch Furanderivate und organische Säuren aus den Aufschlusslösungen abtrennen, in dem sie diese gezielt verstoffwechseln [161]. Die gelösten Zucker werden hierbei nicht verbraucht. Ein großer Nachteil der Detoxifikation mit Mikroorganismen sind die sehr langen Detoxifikationszeiten von 10 h bis 72 h [158, 159].

Physikalische Verfahren umfassen die Abtrennung von leichtflüchtigen Substanzen wie Furfural, Essigsäure oder Vanillin durch Verdampfung [162]. Durch die Eindickung der Aufschlusslösung werden jedoch die nicht flüchtigen Komponenten (phenolische Komponeten, HMF, Lävulinsäure) aufkonzentriert, so dass oftmals die toxische Wirkung nicht aufgehoben werden kann [163, 164].

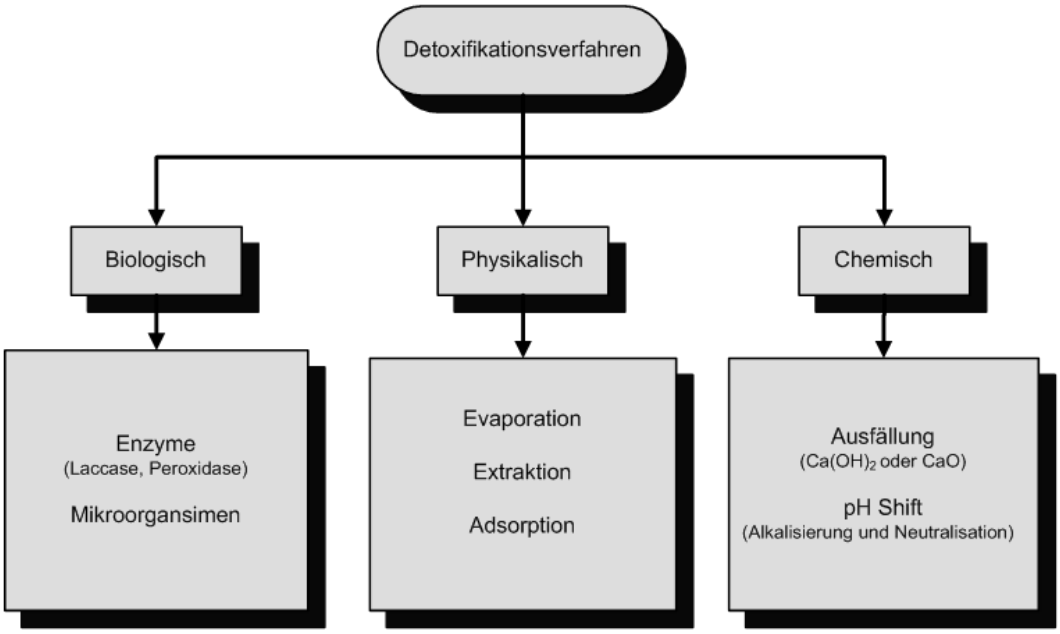


Abbildung 14: Einteilung der Detoxifikationsverfahren

Neben der Verdampfung können Abbauprodukte auch durch Flüssig-Flüssig-Extraktion entfernt werden. Als Lösemittel wurden beispielsweise Ethylacetat [154], Methyl-tert-butylether MTBE [165] oder auch $scCO_2$ [166] eingesetzt. Hierbei werden bei allen Lösemitteln größtenteils hydrophobe Substanzen wie phenolische Komponenten, Furfural und HMF abgetrennt.

Abbauprodukte können aber auch durch Adsorption auf Aktivkohle, hydrophoben Absorbern oder Ionenaustauschern entfernt werden. Die Detoxifikation mit Aktivkohle ist die am häufigsten verwendete Adsorptionsmethode. Die Abtrennung der einzelnen Komponenten wie organische Säuren, Furanderivate oder phenolische Komponenten hängt hierbei von pH-Wert, Temperatur und Kontaktzeit ab. So werden beispielsweise schwache Säuren (Phenolsäuren oder organische Säuren) nur in der protonierten Form, also bei niedrigen pH-Werten, effektiv adsorbiert. Mit steigender Temperatur (teilweise bis 80 °C) erhöht sich ebenfalls die Adsorption, da sich die Diffusionsrate innerhalb der Partikel erhöht [138]. Neben Aktivkohle können auch hydrophobe Adsorber sowie Anionenaustauscher AIEX eingesetzt werden. Hierbei lassen sich die organischen Säuren vor allem durch die Anionenaustauscher entfernen [141]. Ein Vorteil der hydrophoben Adsorbern und AIEX ist die reversible Desorption der adsorbierten Moleküle. Im Falle der Aktivkohle ist die Regeneration aufgrund der großen Bindungsaffinität oftmals sehr aufwendig. Hierbei muss die Aktivkohle auf mehrere Hundert Grad erhitzt werden, so dass die adsorbierden Stoffe

entweder verdampft oder verkokt werden. Im letzteren Fall muss dann wieder die Aktivkohle mit Wasserdampf aktiviert werden [167].

In dieser Arbeit wurden sowohl Laccase-katalysierte als auch adsorptive Verfahren entwickelt und optimiert, um eine gezielte Abtrennung der Lignocellulose-Abbauprodukte zu erzielen. Die Laccase-katalysierte Detoxifikation kann selektiv phenolischen Komponenten oxidieren und zu nicht toxischen Substanzen polymerisieren [160]. Durch Immobilisierung der Laccase kann die enzymatische Detoxifikation mehrfach durchgeführt werden. Ein hoher Verbrauch an Chemikalien und Korrekturmitteln wie bei chemischen Detoxifikationsverfahren mit $Ca(OH)_2$ entfällt hierbei.
Der Vorteil der adsorptiven Verfahren liegt in der Möglichkeit, die Adsorber zu regenerieren und diese somit mehrmalig einzusetzen [139, 140, 168, 169]. Hydrophobe Adsorber haben den Vorteil, dass sie alle Substanzklassen der Lignocellulose-Abbauprodukte (Furfurale, phenolische Komponenten und organische Säuren) entfernen [138, 170]. Anionenaustauscher sind in der Lage, gezielt organische Säuren zu entfernen, binden aber auch phenolische Komponenten [169, 171].

2.6.3 Laccase-katalysierte Detoxifikationsverfahren

Die Machbarkeit der Laccase-katalysierten Detoxifikation wurde von einigen Autoren in der Literatur gezeigt [143, 163, 172, 173]. Hierbei konnten Ausbeuten von 65 - 80 % erreicht werden. In den Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Laccasen spezifisch phenolische Komponenten wie z. B. Guaiacol, Catechol, Vanillin, Phenol oder o-Cresol umsetzen. Die oxidativen Reaktionsprodukte besitzen dabei durch Polymerisationsfolgereaktionen eine größere Molmassenverteilung und fallen teilweise als unlösliche Feststoffe aus [143, 160, 163].
Jurado et al. [160] zeigte 2009 parallel zu der vorliegenden Arbeit erste Optimierungs-experimente, in dem er Aufschlussüberstände von steam-exploded Weizenstroh mit verschiedenen Laccasen von *Trametes villosa* und *Coriolopsis Rigida* bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 3, 4 und 5) detoxifizierte. Hierbei zeigte sich, dass der pH-Wert keinen Einfluss auf die Konversion von phenolischen Komponenten zeigte. Die Laccase von *C. Rigida* zeigte bei gleicher Inkubationszeit mit 75 % höhere Umsätze X als die Laccase von *T. villosa* mit X = 70 %. Eine Reaktionszeit von mehr als 2 h brachte keinen weiteren Umsatz an phenolischen Komponenten. Aus dem Reaktionsverhalten wurde darüber hinaus ersichtlich, dass kein vollständiger Umsatz an phenolischen Komponenten erreicht werden konnte. Die

Enzymdosierung wurde anschließend mit der Laccase von *C. Rigida* bei ansonsten konstanten Versuchsbedingungen in einem separaten Versuch durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass eine Steigerung der Enzymmenge über 0,5 U/L zu keiner weiteren Steigerung der Reaktionsumsätze führt. Demnach konnte auch durch Variation der Enzymdosierung kein vollständiger Reaktionsumsatz erreicht werden. [174].
Neben der Detoxifikation von Aufschlussüberständen konnte die Laccase auch eingesetzt werden, um phenolhaltige zytotoxische Abfallströme aus einer Olivenmühle zu detoxifizieren [175-177]. Dabei konnten unvollständige Reaktionsumsätze an phenolischen Komponenten zwischen 65 - 76 % festgestellt werden.

Beim technischen Einsatz von Enzymen spielt aufgrund der hohen Katalysatorkosten vor allem die Wiederverwendbarkeit der Enzyme eine wichtige Rolle. Methoden zur Immobilisierung der Enzyme auf inerten Trägeroberflächen oder in inerten Trägermatrizen können dabei eingesetzt werden, um Biokatalysatoren mit geringem Aufwand aus den Reaktionslösungen abzutrennen und wieder einzusetzen [178].
Im Bereich der Detoxifikation von Aufschlussüberständen mit Oxidoreduktasen sind solche Ansätze bisher noch nicht beschrieben und optimiert worden. In einigen Arbeiten wurden Laccasen auf unterschiedlichen Trägermaterialien immobilisiert, um beispielsweise eine Entfärbung von Abwasserströmen durchzuführen [179] oder eine biochemische Elektrode für die Bioanalytik zu etablieren [180]. Ansonsten wurden Reaktionen mit reinen Modellsubstanzen als Vertreter von möglichen Lignocellulose-Abbauprodukten wie beispielsweise Cresole, Chlorphenole, Methoxyphenole, Guaiacol, Vanillinsäure oder Syringinsäure, die durch immobilisierte Laccase katalysiert wurden, betrachtet [181-183]. Hierbei wurden keine Untersuchungen zum Einfluss der Einflussparameter wie Enzymdosierung oder Substratkonzentration auf den Reaktionsumsatz durchgeführt.
Als Trägermaterialien zur Immobilisierung von Laccasen wurden beispielsweise poröse Glasskugeln (aktiviert durch 3-Aminopropyltriethoxysilan) [184], aktivierter Agarose [185], Eupergitpartikel [183], Epoxy - funktionalisierte Divinylbenzolpartikel [179], mesoporöse Silicapartikel (aktiviert durch 3-Aminopropyltriethoxysilan) [186], magnetischen Partikel [187] oder eine Polyethersulfonmembran [182] eingesetzt.
Ein wichtiger Faktor bei der Herstellung von immobilisierten Enzymen ist der Substratsumsatz in Abhängigkeit der durchgeführten Reaktionszyklen (= Langzeitstabilität der Immobilisate). Leonowicz et al. konnten mit reinen Modellsubstraten zeigen, dass die

Aktivitätsverminderung (Rückgang des Reaktionsumsatzes) der immobilisierten Laccase von *Trametes versicolor* abhängig vom Molekültyp ist. So wurde mit Koffeinsäure ein Rückgang der Aktivität bzw. des Umsatzes von 30 % innerhalb von sechs Zyklen festgestellt, während bei Feroylsäure nach sechs Zyklen eine Restaktivität von nur noch 5 % detektierbar war [184]. Bei der Verwendung von in Alginat immobilisierter Laccase konnte bei der Oxidation von Anisaldehyd bereits ein Rückgang des Umsatzes von 60 % innerhalb von drei Zyklen beobachtet werden [188].

Andere Autoren wie Kunamneni et al. [179] oder Zhu et al. [187] ermittelten die Standzeit der Immobilisate mit Hilfe der Umsetzung von ABTS (2,2-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) als Modellsubstrat. Hierbei bildet sich ein stabiles Radikal aus, das bei 439 nm spektrometrisch ohne großen analytischen Aufwand detektiert werden kann (siehe Kapitel 7.2.7). Die Langzeitstabilitätsmessung mit ABTS zeigen generell deutlich längere Standzeiten mit Aktivitätsrückgängen von 20 % innerhalb von 17 Zyklen mit Laccase auf Epoxyträger [179] oder 30 % innerhalb von 10 Zyklen mit Laccase auf magnetischen Partikeln [187]. Nachdem die Aktivität bei den Langzeitmessungen jedoch stark von dem Substrat abhängig ist, muss für eine technische Anwendung somit die Langzeitstabilität für die tatsächliche Aufschlusslösung getestet werden.

2.6.4 Adsorptive Detoxifikationsverfahren

Die Detoxifikation von Aufschlusslösungen mit Adsorbern wurde bereits im Jahre 1985 von Tran und Chambers untersucht [189]. Hierbei wurde ein Mischbett-Ionenstauscher AG-501-X8 und ein Molekularsieb Typ S-115 eingesetzt, um eine saure Aufschlusslösung von Roteiche zu detoxifizieren. Das Molekularsieb reduzierte die Essigsäurekonzentration um 40 % und die Furfuralkonzentration um 72 %. Jedoch wurden 11 % der Xylose ebenfalls aus der Lösung entfernt. Der Mischbedadsorber reduzierte die Essigsäurekonzentration um lediglich 21 % und die Furfuralkonzentration um 20 %. Die Entfernung der Xylose war in diesem Fall mit 8 % aber geringer als beim Molekularsieb.

Die Machbarkeit der Detoxifikation mittels Anionen- und Kationenaustauschern (Amberlite IRA-45 und Dowex-50W) wurde von van Zyl et al. 1991 dargestellt [171]. Als inhibitorische Substanz für den Produktionsorganismus *P. stipitis* wurde Essigsäure identifiziert. Der Anionenaustauscher Amberlite IRA-45 konnte die Essigsäurekonzentration um 84 % reduzieren, während der Kationenaustauscher Dowex-50W lediglich eine Reduktion von Essigsäure um 27 % zur Folge hatte.

Nilvebrant et al. untersuchten die Detoxifikation von Aufschlussüberständen aus einer Vorbehandlung von Fichte mit einem sauren Steam Explosion-Prozess [170]. Hierbei wurde ein ungeladener hydrophober Adsorber XAD-8, ein Anionenaustauscher AG 1-X8 und ein Kationenaustauscher AG 50W-X8 eingesetzt. Der hydrophobe Adsorber XAD-8 entfernte 66 % der Phenole, 59 % Furfural und 20 % HMF. Die organischen Säuren, nur angegeben als Summe aus Essigsäure, Ameisensäure, Lävulinsäure und Oxalsäure, wurden in diesem Fall nicht entfernt. Dies bedeutet, dass mit steigender Polarität die Entfernung mit hydrophoben Adsorbern geringer ausfällt. Der Anionenaustauscher entfernte im Gegensatz dazu 96 % der organischen Säuren. Die Furanderivate HMF und Furfural wurden hingegen um 30 % sowie 25 % und die phenolischen Komponenten um 62 % reduziert. Mit dem Kationen-austauscher konnte keine signifikante Reduzierung der Abbauprodukte erreicht werden. Die Experimente zeigten, dass sowohl die Adsorption auf XAD-8 als auch auf dem Anionenaustauscher stark pH-Wert abhängig waren. So wurden insgesamt mehr Substanzen bei pH 5,5 adsorbiert als bei pH 10.

Aufbauend auf den Ergebnissen von Nilvebrant et al. untersuchte de Mancilha et al. weitere Anionen- und Kationenaustauscher der Firmen FINEX und Purolite in Festbettadorbern [169]. Die Detoxifikation wurde anhand eines Aufschlussüberstands einer sauren Vorbehandlung von Maisstroh durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass bei allen Ionenaustauschern die unerwünschte Adsorption von Xylose < 8 % war. Generell konnte festgestellt werden, dass die Entfernung der Analyte HMF, Furfural und Essigsäure mit den Anionenaustauschern besser war als bei den Kationenaustauschern. Hierbei konnte der Anionenaustauscher A103S (Fa. Purolite) als einziger Adsorber Essigsäure, Furfural und HMF fast vollständig entfernen.

Der Einfluss des pH-Werts während der Detoxifikation mit Ionenaustauschern wurde ebenfalls von Carvalheiro et al untersucht [168]. Als Adsorber wurde der Anionenaustauscher Dowex - MWA1 und der Kationenaustauscher IRN- 77 bei den pH-Werten von 0,77 und 5,5 sowie von 5,5 und 10,0 untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass im stark sauren pH-Wertebereich (pH 0,77) die Abtrennung von HMF, Furfural, Essigsäure und Ameisensäure mit dem Anionenaustauscher größer war als bei pH 5,5. Die Abtrennung der organischen Säuren mit dem Kationenaustauscher war bei pH 5,5 besser als bei pH 10,0. Die Entfernung der Furanderivate mit dem Kationenaustauscher war hingegen bei pH 10,0 effizienter als bei

pH 5,5. Insgesamt war der Anionenaustauscher zur Abtrennung der Abbauprodukte besser geeignet als der Kationenaustauscher. Bei einem pH-Wert von 0,77 konnten bis zu 48 % Essigsäure, 58 % Ameisensäure, 100 % Lävulinsäure, 74 % Furfural und 46 % HMF abgetrennt werden. Es ist ersichtlich, dass neben organischen Säuren auch hydrophobe Substanzen wie Furfural und HMF ebenfalls mit Anionenaustauschern abgetrennt werden können. Dies liegt im Wesentlichen an der hydrophoben Grundmatrix der Träger, die ebenfalls Adsorptionsstellen für hydrophobe Wechselwirkungen aufweist.

Einige Autoren [190-192] untersuchten Detoxifikationsverfahren mit bis zu vier unterschiedlichen Adsorbern (hydrophobe Adsorber und Ionenaustauscher), die hintereinander geschaltet wurden. Trotz der guten Detoxifikation der Aufschlussüberstände, ließ sich aus diesen Daten nicht die Wirkungsweise der einzelnen Trägermaterialien herauslesen.

2.6.5 Zusammenfassung

Aus den vorangegangen Kapiteln ist deutlich geworden, dass bereits die Machbarkeit der Detoxifikation mit Laccase oder mit Adsorbern (hydrophobe Adsorber und Ionenaustauscher) untersucht wurde [143, 160, 168-173]. Die Zusammenhänge zwischen den relevanten Betriebsparametern und der Entfernung von Abbauprodukten sowie die Optimierung der Betriebsbedingungen wurden noch nicht eingehend untersucht, um die Prozesse auf größere Maßstäbe übertragen zu können.

Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit im Bereich der adsorptiven Detoxifikationsverfahren ausgehend von statischen Adsorptionsexperimenten, in denen die Adsorber thermodynamisch charakterisiert werden sollten, ein kontinuierliches Detoxifikationsverfahren mit einem hydrophoben Adsorber und einem Anionenaustauscher in einem Festbettadsorber entwickelt werden. Hierbei sollten zu Beginn mehrere Adsorber miteinander verglichen werden, um geeignete Adsorber anhand ihrer Abtrennleistung auszuwählen. Anschließend sollte die statistische Versuchsplanung eingesetzt werden, um die optimalen Betriebsbedingungen identifizieren zu können und eine Maßstabsübertragung zu ermöglichen.

Eine wichtige verfahrenstechnische Entwicklung bei Laccase-katalysierten Detoxifikationsverfahren ist die effiziente Rückgewinnung des Enzyms, um den wiederholten Einsatz des Katalysators gewährleisten zu können. Derzeit existieren jedoch keine Anwendungsbeispiele für die Detoxifikation von Aufschlusslösungen mit immobilisierten Laccasen. Die

vorliegende Arbeit soll daher ein Verfahren zur Detoxifikation mittels immobilisierter Laccase entwickeln. Dabei sollen die wesentlichen Zusammenhänge zwischen Reaktionsumsatz und den Betriebsbedingungen wie Reaktionszeit, Enzymdosierung und Substratkonzentration dargelegt werden.

3 Verwendete Materialien und Methoden

Im folgenden Kapitel soll kurz auf die verwendeten Materialien und Methoden eingegangen werden.

3.1 Verwendete Materialien

In diesem Abschnitt soll eine Auflistung der verwendeten Rohstoffe, der Enzyme, der Träger zur Immobilisierung der Laccase, der Adsorber sowie die verwendeten Mikroorganismen und deren Kultivierungsmedien dargestellt werden.

3.1.1 Verwendete lignocellulosehaltige Rohstoffe

Als Rohstoffe wurden Weizenstroh (*T. aestivum L.*), Miscanthus (*Miscanthus x giganteus*) und Pappelholz (*Populus* × *canescens*) eingesetzt. Das Weizenstroh wurde im Herbst 2009 in der Nähe von Straubing geerntet und vom Lehrstuhl für Rohstoff- und Energietechnologie der Technischen Universität München freundlicherweise zurr Verfügung gestellt. Miscanthus wurde von der Firma Herbasch aus Sachsen bezogen. Die Ernte fand im Frühjar 2010 statt. Pappelholz wurde freundlicherweise vom Fraunhofer ICT bereitgestellt.
Alle Rohstoffe wurden mittels einer Schneidmühle SM 100 der Fa. Retsch vorzerkleinert (Siebeinsatz 2 cm). Im Falle von Weizenstroh wurden im Vorfeld der Vorbehandlung die Fasern mit Aceton extrahiert. Die Extraktion der Strohfasern (8 % (w/w)) mit Aceton wurde bei 60 °C für 60 min durchgeführt.

Zur Entwicklung einer Verfahrensstrategie zur Hochfeststoff-Hydrolyse (HFH) wurden Organsolv-Buchenholzfasern (180 min, 180 °C, Flotte 1:4, EtOH:H_20 = 50:50) eingesetzt. Diese wurden vom Institut für Holztechnologie der Universität Hamburg und vom Fraunhofer ICT bereitgestellt.

3.1.2 Enzyme

In Tabelle 7 sind die verwendeten Enzyme, deren Hauptaktivitäten und deren optimale Betriebsbedingungen aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Enzyme, deren Hauptaktivitäten und optimale Betriebsbedingungen

Enzym	Hersteller	Hauptaktivität	Topt / °C	pHopt
Celluclast 1.5 L	Novozymes A/S	Cellulase	50-60[193]	4,5-6,0[193]
Cellic CTec	Novozymes A/S	Cellulase	45-55	4,0-5,0*
Cellic CTec2	Novozymes A/S	Cellulase	45-55	4,0-5,0*
Accellerase 1500	Genencore Int.	Cellulase	45-55[194]	4,6-5,0[194]
Accellerase BG	Genencore Int.	ß-Glukosidase	45-55[194]	5,0-6,0[194]
Novozym 188	Novozymes A/S	ß-Glukosidase	50-65[195]	4,5-5,5[195]
Accellerase XY	Genencore Int.	Xylanase	45-55[194]	4,0-5,5[194]
Cellic HTec	Novozymes A/S	Endo-Xylanase	45-55	4,0-6,0*
Cellic HTec2	Novozymes A/S	Endo-Xylanase	45-55	4,0-6,0*
Pulpzyme HC	Novozymes A/S	Endo-Xylanase	50-60[196]	6,0-8,0[196]
Ecopulp TX200A	AB Enzymes GmbH	Xylanase	50-85[197]	5,0-8,0[197]
Rohament GE	AB Enzymes GmbH	Xylanase	60-75[197]	5,5-6,8[197]
Laccase T. viridae	Wacker	Oxidoreduktase	45-55	4,5 -5,5

1 eigene Messung

3.1.3 Träger zur Immobilisierung

In Tabelle 8 sind die chemischen und physikalischen Eigenschaften der verwendeten Träger zur Immobilisierung der Laccase aufgelistet

Tabelle 8: Chemische und physikalische Eigenschaften der verwendeten Träger zur Immobilisierung der Laccase.

Eigenschaft	Sepabeads EC-EP	Sepabeads EC-EA
Matrix	Polymethacrylat	Polymethacrylat
Aktive Gruppe	Epoxid	Ethylendiamino
Partikelgröße / µm	150-300	150-300
Schüttdichte / g/mL	>1,1	> 1,1
Wasserrückhalt / %	55-65	55-65
Porosität / %	> 25	25
Porenradius	>30 nm	>30 nm
pH Stabilität	5-8	0-14

3.1.4 Adsorber

In Tabelle 9 sind die Eigenschaften der verwendeten Adsorber zur Detoxifikation dargestellt.

Tabelle 9: Eigenschaften der verwendeten Adsorber

Adsorber	Funktionelle Gruppe	Polymerstruktur	Feuchte / %	d_{mittel} / µm	Wechselwirkung
MN105	Tertiäre Amine	Makroporöses Polystyrol verknüpft mit DVB	50-58	535	Sorption Anionenaustausch
MN200	Keine	Makroporöses Polystyrol verknüpft mit DVB	50-60	535	Sorption
A860	Quaternäres Ammomium	Makroporöses Polyacryl verknüpft mit DVB	66-72	725	Stark basischer Anionenaustauscher
Dionex 1x4-100	Quaternäres Ammomium	Polystrene verknüpft mit DVB	50	20-50 mesh	Starker Anionenaustauscher
A103S	Tertiäre Amine	Makroporöses Polystyrol verknüpft mit DVB	40-45 (OH- Form) 48-55 (Cl- Form)	775	Schwach basischer Anionenaustauscher
A500 MBOH	Quaternäres Ammomium	Makroporöses Polystyrol verknüpft mit DVB	50-82 (OH- Form) 53-58 (Cl- Form)	775	Stark basischer Anionenaustauscher

Tabelle 10: Spezifikation der eingesetzten Festbettadsorber

Adsorbermaterial	MN202	A103S
Säulenvolumen / mL	9,8	9,8
Bettvolumen / mL	7,4	7,4
$m_{Adsorber}$ / g	5,8 (feucht)	6,0 (feucht)
	2,61 (trocken)	3,45 (trocken)
Porosität Gesamt	0,66	0,55
Porosität intern	0,52	-
Porosität extern	0,41	0,55
Adsorbervolumen / mL ($V_{Ads}=V_{BV}*\varepsilon_{tot}$)	4,9	4,1
Ausschlussvolumen / mL ($V_{Void}=V_{Säule}-V_{Ads}$)	4,9	5,7

3.1.5 Mikroorganismen

Die Hefe *Pichia stipitis* DSM 3651 wurde für die Kultivierungsexperimente in Aufschlussüberständen (detoxifiziert und nicht detoxifiziert) eingesetzt. Der Stamm wurde als Schrägagarkultur von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen.

3.1.6 Kultivierungsmedien

Tabelle 14 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Kultivierungsmedien. Für Kultvierungsversuche mit detoxifizierten Aufschlusslösungen wurde das entsprechende Salzmedium in zweifacher Konzentration angesetzt. Der Aufschlussüberstand (detoxifiziert oder nicht detoxifiziert) wurde mit Xylose (2-fach) supplementiert und sterilfiltriert.

Tabelle 11: Zusammensetzung der verwedeten Kultivierungsmedien

Medium	Konzentration / g/L	Komponente
YM-Medium	3	Hefeextrakt
(Vorkultur, Stammhaltung)	3	Malzextrakt
	5	Pepton
	20	Xylose
	pH 5,0 ± 0,1	
Salzmedium	1	Hefeextrakt
	4	KH_2PO_4
	2	$(NH_4)_2HPO_4$
	0,5	$MgSO_4$ x 7 H_2O
	50	Xylose
	1	Spurenelemente (mL/L)
	pH 5,0 ± 0,1	
Spurenelemente	2,5	$CuSO_4$ x 5 H_2O
	1,62	$FeCl_3$
	1,69	$MnSO_4$ x H_2O
	2,42	Na_2MoO_4 x 2 H_2O
	2,87	$ZnSO_4$ x 7 H_2O
	2,38	$CoCl_2$ x 6 H_2O

3.2 Vorbehandlung von Lignocellulose

Im folgenden Kapitel sollen die verwendeten Aufschlussreaktoren, die Berechnungsgleichungen zur Charakterisierung der Vorbehandlungsverfahren, die Methoden zur Vorauswahl eines geeigneten Vorbehandlungsverfahrens sowie die Optimierung der Vorbehandlungsverfahren und die verwendeten Vorhersagemodelle beschrieben werden.

3.2.1 Verwendete Reaktoren zur Vorbehandlung von Lignocellulose

Zur Auswahl einer geeigneten Vorbehandlung von Weizenstroh wurden mehrere physikalisch-chemische und thermische Aufschlüsse sowohl in einem 13 L-Autoklaven als auch in einem Doppelkammerautoklaven (DuoRaff) durchgeführt (siehe Abbildung 15).

(A) (B)



Abbildung 15: (A) 13 L Batch-Autoklav mit Doppelmantel zur Wasserkühlung. (B) DuoRaff System bestehend aus zwei Druckreaktoren, die über ein Keramikscheibenventil miteinander verbunden sind. Quelle Fraunhofer ICT.

Beide Systeme verfügten über eine PID-Temperaturregelung. Das DuoRaff-System bestand aus zwei unabhängigen temperierbaren Druckreaktoren, die einzeln, parallel und in Reihe gefahren werden konnten. Durch spezielle Keramikscheibenschieber lies sich der Inhalt des ersten Reaktors in den zweiten Reaktor schlagartig entspannen. Zusätzlich war es in diesem System möglich, den ersten Reaktor mit Inertgas zu beaufschlagen, um den gesamten

Reaktorinhalt in den zweiten Reaktor zu befördern. Im Gegensatz zum 13 L Batch-Autoklaven konnte die DuoRaff Anlage nicht aktiv mit Kühlwasser über einen Kühlmantel gekühlt werden.
Weiterführende Experimente mit Weizenstroh und die kompletten Versuchreihen der Optimierung von Miscanthus- und Pappelholzaufschlüsse wurden in einem 1 L-Autoklaven Typ Versoclave der Fa. Büchi durchgeführt.

3.2.2 Charakterisierung verschiedener Vorbehandlungsverfahren

Zur Beurteilung der Aufschlusseffizienz wurden neben der Analyse der Zusammensetzung der Faserfraktion (siehe Kapitel 7.2.2) sowie der Messung der Abbauprodukte und Zucker in den Aufschlusslösungen (siehe Kapitel 7.2.3) ebenfalls die Solubilisierung der Hauptfraktionen Lignin, Xylan und Cellulose ermittelt. Darüber hinaus wurde die enzymatische Hydrolysierbarkeit der Faserfraktion mit ausgewählten Cellulasen und Xylanasen durchgeführt. Als weitere Kenngrößen der Aufschlusseffizienz wurde die Xylose- und Xylanausbeute in der Aufschlusslösung ermittelt. Im Folgenden sollen die Grundlagen der einzelnen Kenngrößen näher erläutert werden

3.2.2.1 Solubiliserung der Hauptfraktionern Lignin, Xylan und Glukan

Die Solubilsierung der Hauptkomponenten Lignin, Xylan und Glukan wurde auf Basis der Zusammensetzungsanalyse von Eingangsfaser und aufgeschlossener Produktfaser ermittelt. Mit Hilfe der Angaben zum Feuchtegehalt ϕ (siehe Kapitel 7.2.1), Ein- und Auswaage der Eingangsfaser $m_{E,ges}$ und aufgeschlossener Produktfaser $m_{P,ges}$, sowie des Masseanteils in Eingangs- und Produktfaser $\omega_{E,ges}$ und $\omega_{P,ges}$ konnte für jede Komponente eine Faserbilanz aufgestellt werden. Die Masse der Komponente i in der Eingangsfaser $m_{E,i}$ errechnete sich wie folgt:

$$m_{E,i} = \omega_{E,i} \cdot m_{E,ges} \cdot (1 - \phi_E) \qquad 3\text{-}1$$

Ebenso errechnete sich die Masse der Komponente in der Produktfaser:

$$m_{P,i} = \omega_{E,i} \cdot m_{P,ges} \cdot (1 - \phi_P) \qquad 3\text{-}2$$

Die Solubilisierung ζ_{liquid} der Komponente i errechnete sich dementsprechend aus der Differenz der Eingangs- und Produktkomponentenmassen $m_{E,i}$ und $m_{P,i}$ bezogen auf die

Eingangsmasse der Komponente und entspricht dem Anteil $m_{liquid,i}$, der sich in der flüssigen Phase gelöst hat:

$$\zeta_{liquid,i} = \frac{m_{E,i} - m_{P,i}}{m_{E,i}} = \frac{m_{liquid,i}}{m_{E,i}} \qquad 3\text{-}3$$

3.2.2.2 Hydrolysierbarkeit der Cellulosefraktion in der Faser

Zur Bestimmung der enzymatischen Hydrolysierbarkeit der Cellulosefraktionen wurden 0,25 g_{TS} Fasern mit den kommerziellen Cellulasen Celluclast 1.5 L (10 FPU/g_{TS}) und Novozym 188 (10 U/g_{TS}) in einem Gesamtvolumen von 10 mL 50 mM Natrium-Citrat-Puffer (pH 5) in Falcon-Tubes (15 mL) enzymatisch hydrolysiert. Vor dem enzymatischen Aufschluss wurden die trockenen Fasern jeweils durch ein Sieb mit einem Lochdurchmesser von 1 mm gemahlen. Die Reaktionslösung wurde für 24 h bei 50 °C in einem Schüttelinkubator (160 rpm, Amplitude 1,9 cm) inkubiert. Nach 24 h wurde jeweils 1 mL Probe entnommen und die Suspension 10 min bei 95 °C gekocht, um die Cellulasen zu inaktivieren. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Analyse bei 4 °C gelagert. Die Zuckeranalytik erfolgte nach den Methoden, die in Kapitel 7.2.4 beschrieben sind. Die Hydrolysierbarkeit der Cellulosefraktion wurde anhand der Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse bewertet. Die Glukoseausbeute ergibt sich wie folgt:

$$Y_{Glukose,enzym.} = \frac{m_{Glukose,enym.}}{m_{E,Glukan}} \cdot \frac{162,2}{180,2} \qquad 3\text{-}4$$

Hierbei ist $m_{Glukose,enzym.}$ die Masse an Glukose nach der enzymatischen Hydrolyse und $m_{E,Glukan}$ die Menge an Glukan in der Eingangsfaser.

3.2.2.3 Hydrolysierbarkeit der Xylanfraktion in der Faser

Zur Bestimmung der enzymatischen Hydrolysierbarkeit der Xylanfraktionen der Faser wurden 1 g_{TS} Fasern mit den kommerziellen Xylanasen Accellerase XY (1200 XU/g_{TS}) und Cellic HTec (1200 XU/g_{TS}) in einem Gesamtvolumen von 20 mL 50 mM Natrium-Citrat-Puffer (pH 5) im 100 mL Schüttelkolben (mit Schikane) enzymatisch hydrolysiert. Vor dem enzymatischen Aufschluss wurde die Faser jeweils durch ein Sieb mit einem

Lochdurchmesser von 1 mm gemahlen. Die Reaktionslösung wurde für 24 h und 48 h bei 50 °C in einem Schüttelinkubator (160 rpm, Amplitude 1,9 cm) inkubiert. Nach 24 h und 48 h wurde jeweils eine 1 mL Probe entnommen und die Suspension 10 min bei 95 °C gekocht, um die Xylanasen zu inaktivieren. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 10000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt und bis zur weiteren Analyse bei 4 °C gelagert. Die Zuckeranalytik erfolgte nach den in Kapitel 7.2.4 beschriebenen Methoden. Die Hydrolysierbarkeit der Xylanfraktion wurde anhand der Xyloseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse bewertet.

$$Y_{Xylose,enzym.} = \frac{m_{Xylsoe,enym.}}{m_{E,Xylan}} \cdot \frac{132{,}1}{150{,}1} \qquad 3\text{-}5$$

Hierbei ist $m_{Xylose,enzym.}$ die Masse an Xylose nach der enzymatischen Hydrolyse und $m_{E,Xylan}$, die Menge an Xylan in der Eingangsfaser.

3.2.2.4 Berechnung weiterer aufschlussrelevanter Kenngrößen

Als weitere Kenngrößen der Aufschlusseffizienz wurden die Xyloseausbeute in der Aufschlusslösung, die Xylanausbeute in der Aufschlusslösung, die Xylanwiederfindung und die Gesamtxylanabtrennung ermittelt.

Die Xyloseausbeute in der Aufschlusslösung $Y_{Xylose,liquid}$ wurde berechnet aus dem Verhältnis von gemessener Xylosemasse in der Aufschlusslösung $m_{Xylose,liquid}$ bezogen auf den Xylananteil der Eingangsfaser $m_{E,Xylan}$:

$$Y_{Xylose,liquid} = \frac{m_{Xylose,liquid}}{m_{E,Xylan}} \cdot \frac{132{,}1}{150{,}1} \qquad 3\text{-}6$$

Die Masse des gelösten Xylans $m_{Xylan,liquid}$ (siehe Kapitel 7.2.3) bezogen auf die maximal mögliche Xylanmasse in der Eingangsfaser ergibt dementsprechend die sogenannten Xylanausbeute der Aufschlusslösung $Y_{Xylan,liquid}$:

$$Y_{Xylan,liquid} = \frac{m_{Xylan,liquid}}{m_{E,Xylan}} \qquad 3\text{-}7$$

In der Aufschlusslösung kann eine Xylanwiederfindung R_{Xylan} aus der gemessenen Masse aller gelösten Xylo-Saccharide $m_{Xylan,liquid}$ (siehe Kapitel 7.2.3) und der Masse an

solubilisiertem Xylan ermittelt werden. Die Masse an solubilisiertem Xylan entspricht der maximal möglichen Xylanmasse ohne Bildung von Furfural und Ameisensäure. Diese Masse wird aus der Faserbilanz errechnet (siehe Kapitel 3.2.2.1) und ist das Produkt aus der Xylansolubilsierung $\zeta_{liquid,Xylan}$ und der Xylanmasse in der Eingangsfaser $m_{E,Xylan.}$

$$R_{Xylan} = \frac{m_{Xylan,liquid}}{\zeta_{liquid,Xylan} \cdot m_{E,Xylan}} \qquad 3\text{-}8$$

Mit Hilfe der Xylosewiederfindung ließ sich somit die Degradation der Xylose zu Furfural und Ameisensäure abschätzen. Darüber hinaus wurden auch die Konzentrationen der Zuckerabbauprodukte direkt gemessen (siehe 7.2.4).

3.2.3 Vorauswahl geeigneter Vorbehandlungsmethoden

Zur Vorauswahl geeigneter Vorbehandlungsverfahren für Weizenstroh wurden unterschiedliche Vorbehandlungsversuche in einem 13 L-Autoklaven, in einem Doppelkammerautoklaven (DuoRaff), sowie in einem 1 L-Reaktor (Versoclave, Fa Büchi) durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.1). Eine Übersicht über die durchgeführten Vorbehandlungsversuche von Weizenstroh ist in Tabelle 12 dargestellt. Soweit nicht anders vermerkt, sind alle Angaben in Masseprozent. Der Feststoffanteil aller Vorbehandlungsversuche lag bei 8 % (w/w). Die Vorbehandlungen mit dem 13 L und der Duo-Raff Anlage (LZ10 -LZ23) wurden vom Fraunhofer ICT durchgeführt. Die Aufschlüsse IGB1-IGB3 wurden selbst durchgeführt.

Die Vorbehandlungsversuche von Miscanthus und Pappelholz wurden alle in einem 1 L-Reaktor (Versoclave, Fa Büchi) durchgeführt. In Tabelle 13 ist eine Übersicht über die Vorbehandlungsversuche von Miscanthus und Pappelholz dargestellt. Soweit nicht anders vermerkt, sind alle Angaben in Masseprozent. Der Feststoffanteil aller Vorbehandlungsversuche lag bei 8 % (w/w).
Für die Durchführung der Versuche im 1 L-Reaktor wurden 25 g_{TS} Weizenstroh eingewogen und in dem jeweiligen Lösemittel suspendiert. Die Gesamtmasse der Fasersuspension lag bei 312,5 g (+/- 0,5 g). Für jeden Durchlauf wurde bei einer Reaktortemperatur von 30 °C zuerst mit N_2 für 1 min inertisiert und anschließend ein Vordruck von 6 bar aufgegeben.

Nach dem Aufschluss wurde die Aufschlusslösung über Glasfaserfilter abgesaugt und separat gesammelt. Die verbleibende Faser wurde anschließend zweimal mit jeweils dem gleichen Volumen und der Zusammensetzung des eingesetzten Lösemittels gewaschen. Anschließend wurde zusätzlich zweimal mit jeweils 500 mL VE-Wasser nachgewaschen. Die Faser wurde im Abzug getrocknet und die Faserauswaage bestimmt. Zur Auswahl des geeigneten Verfahrens wurden die Delignifizierung, die Xylansolubilisierung, die Glukansolubilisierung, die Hydrolysierbarkeit der Fasern mit Cellulasen und Xylanasen ermittelt (siehe Kapitel 3.2.2).

Tabelle 12: Übersicht Vorbehandlungsversuche von Weizenstroh

Bezeichnung / Reaktortyp	Lösemittel	Gesamtmasse / g	Zeit /min	T /°C
LZ10 / DuoRaff	50 % EtOH	8700	120	220
LZ16 / DuoRaff	50 % EtOH	8700	120	220
LZ18 / 13L Batch	2% NaOH	8700	120	160
LZ20 / DuoRaff	H_20	8700	120	160
LZ23 /13 L Batch	1% $Ca(OH)_2$	8700	120	160
IGB1 / Versoclave	50 % EtOH	312,5	60	180
IGB2 / Versoclave	50 % Aceton	312,5	60	180
IGB3 / Versoclave	2 % NaOH	312,5	60	180

Tabelle 13: Übersicht über Vorbehandlungsversuche von Miscanthus und Pappelholz

Vorbehandlung	Konzentration	Gesamtmasse / g	Zeit / min	T / °C	Rohstoff
Alkalisch	2 % NaOH	312,5	180	60	Miscanthus Pappel
Organosolv	50 % Ethanol	312,5	180	60	Miscanthus Pappel
Organosolv (sauer)	0,2 % H_2SO_4 50 % EtOH	312,5	180	60	Miscanthus Pappel
Organosolv (alkalisch)	0,5 % NaOH 50 % EtOH	312,5	180	60	Miscanthus Pappel
Kalkmilch	2 % $Ca(OH)_2$	312,5	180	60	Miscanthus
Aquasolv	H_2O	312,5	180	60	Miscanthus Pappel

3.2.4 Optimierung der ausgewählten Vorbehandlungsmethode

Die Optimierung der ausgewählten Verfahren erfolgte anhand eines orthogonal quadratischen Versuchsplans (Response Surface Plan) mit dem Programm Design Expert V 8.0 (Fa. Stat-Ease). Die Grundlagen der statistischen Versuchsplanung sind im Anhang Kapitel 7.3 beschrieben. Als Einflussparameter wurden die Prozessparameter Temperatur, Zeit und Konzentration an NaOH sowie H_2SO_4 variiert. In Tabelle 14 sind die Wertebereiche der untersuchten Haupteinflussfaktoren X_1-X_3 für die unterschiedlichen Versuchsreihen der drei untersuchten Rohstoffe dargestellt.

Durch die Ermittlung des funktionellen Zusammenhangs zwischen den Zielgrößen der Aufschlusseffizienz und den Einflussfaktoren (siehe Kapitel 3.2.5.1) konnten durch Vorgabe von Auswahlkriterien (siehe Kapitel 4.1.2) optimale Betriebsbedingungen ermittelt werden. Diese theoretisch ermittelten optimalen Betriebsbedingungen wurden anschließend experimentell überprüft. Die Versuchsreihen mit entsprechenden Parametern sind im Anhang Kapitel 7.4 aufgelistet.

Tabelle 14: Haupteinflussfaktoren und deren Wertebereiche für die Erstellung der statistischen Versuchspläne mit Design Expert V 8.0

Rohstoff	Einflussfaktor X_1 T / °C	Einflussfaktor X_2 t^1 /min	Einflussfaktor X_3 c_{NaOH} und c_{H2SO4} / % (w/w)
Weizenstroh (alkalischer Aufschluss)	160 - 200	30 - 90	0,5 - 2,0 (NaOH)
Miscanthus (säurekatalysierter Organosolv-Aufschluss)	160 - 200	20 - 70	0,05 - 0,2 (H_2S0_4)
Pappelholz (säurekatalysierter Organosolv-Aufschluss)	160 - 200	30 - 90	0,05 - 0,2 (H_2S0_4)

3.2.5 Vorhersagemodelle für die Vorbehandlungsverfahren

Für die Modellbetrachtung der Vorbehandlungsverfahren wurden zwei unterschiedliche Modelle untersucht. Einerseits wurden empirische quadratische Regressionsmodelle mit den Einflussgrößen Temperatur, Haltezeit und Konzentration von Säure und Base mit Hilfe der Software Design Expert V 8.0 (Fa. Stat-Ease) ermittelt. Andererseits wurde ein sogenanntes Modified Severity-Faktor Model (MSFM) erstellt. Dieses Modell kombiniert die Effekte von pH-Wert, Temperatur und Haltezeit zu einer charakteristischen Prozessgröße [198, 199].

3.2.5.1 Quadratische Modelle zur Beschreibung der Vorbehandlung

Die allgemeine Formulierung eines quadratischen Modells mit zwei Einflussfaktoren (x_1, x_2) ist gegeben durch:

$$\hat{y}_i = b_o + b_1 \cdot x_{1i} + b_2 x_{2i} + b_{11} \cdot x_{1i}^2 + b_{12} \cdot x_{1i} \cdot x_{2i} + b_{22} \cdot x_{2i}^2 \qquad 3\text{-}9$$

Die Summe der quadratischen Abweichungen $Q_{Residual}$ zwischen den Modellwerten $\hat{y}_i$ (Schätzwerte) und den Messwerten y_i ist gegeben durch die folgende Beziehung:

$$Q_{Residual} = \sum_{i=1}^{N} \left(y_i - \hat{y}_i \right) \qquad 3\text{-}10$$

Für die Ermittlung der Regressionskoeffizietnen (b_0, b_1,…b_{22}) wird die Methode der kleinsten Quadrate angewandt, die die Abweichung bzw. $Q_{Residual}$ minimiert

$$Q_{Residual} = \sum_{i=1}^{N}\left(y_i - \hat{y}_i \right) \rightarrow \min \qquad 3\text{-}11$$

3.2.5.2 Modified Severity-Faktor Modell (MSFM)

Um einen Vergleich von experimentellen Daten verschiedener Vorbehandlungsverfahren und verschiedener Aufschlussbedingungen vergleichen zu können, werden die Aufschluss-temperatur T in K und die Haltezeit t in min zu einer Reaktionsordinate dem sogenannten Severity-Faktor R_0 zusammengefasst [200]. Der Severity-Faktor log R_0 basiert auf dem in der Papierindustrie eingeführten H-Faktor. Der H-Faktor beschreibt die Delignifizierung mit einem Arrheniusansatz erster Ordnung. Hierbei werden relative Reaktionsraten eingeführt, die sich auf eine Referenztemperatur T_R von 373 K (100 °C) beziehen [198]. Der Severity Factor log R_0 wird auch durch einen Arrheniusansatz approximiert, ist aber im Vergleich zum H-Faktor nicht auf einen Ansatz erster Ordnung beschränkt. Die allgemeine Form des Severity Parameters R_0 ist gegeben durch [67]:

$$R_0 = t \cdot \exp\left(\frac{T - T_R}{\omega} \right) \qquad 3\text{-}12$$

Der Term ω kann experimentell bestimmt werden. Mit der Annahme einer Reaktion erster Ordnung entspricht ω einer reduzierten Aktivierungsenergie:

$$\omega = \frac{T_f^2}{\Theta} = \frac{T_f^2 \cdot R}{E_A} \qquad 3\text{-}13$$

Hierbei ist T_f die Mittelpunktstemperatur zwischen Raumtemperatur und Aufschlusstemperatur, R die allgemeine Gaskonstante und E_A die Aktivierungsenergie [67, 198]. Für eine Reaktion erster Ordnung kann ω näherungsweise als 14,75 ermittelt werden. Oftmals wird dieser Wert zur Berechnung von R_0 herangezogen [101].

Für saure oder alkalische Aufschlüsse ist mitunter der Severity-Faktor log R_0 ungeeignet, weil der Einfluss des pH-Werts auf die Aufschlusseffizienz (beispielsweise Delignifizierung) nicht berücksichtig wird. Für säurekatalytische Verfahren wurde daher R_0 erweitert zu [201]:

$$R_0^{'} = R_0 \cdot \left[H^+\right] \qquad 3\text{-}14$$

$$\log R_0^{'} = \log R - pH \qquad 3\text{-}15$$

Diese Formulierung ist für alkalische Aufschlüsse ungeeignet, nachdem hohe pH-Werte zu geringen Severity-Werten führen würden. Jedoch werden bei alkalischen Aufschlüssen die Delignifizierung und die enzymatische Hydrolysierbarkeit deutlich gesteigert, so dass ein weiterer Severity-Faktor R_0'' eingeführt werden kann, der Aufschlussmethoden bei unterschiedlichen pH-Werten beschreiben kann [82, 101]:

$$\log R_0^{''} = \log R_0 - \left|pH - 7\right| \qquad 3\text{-}16$$

Als allgemeine Formulierung einer Reaktionsordinate, die sowohl Temperatur T, Haltezeit t als auch Konzentration des Katalysators c (sowohl sauer als auch alkalisch) berücksichtigt, kann schließlich folgender allgemeiner Zusammenhang formuliert werden [202]:

$$M_0 = c^n \cdot t \cdot \exp\left(\frac{T - Tr}{\omega}\right) \qquad 3\text{-}17$$

Hierbei ist n eine Reaktionskonstante, die durch Regression abgeschätzt werden kann. Zur Beschreibung des funktionellen Zusammenhangs zwischen der Aufschlusseffizienz und dem Severity-Faktor wurde die jeweilige Zielgröße Y_i als Funktion des Modified Severity-Faktors log M_0 definiert. Hierbei wurde je nach Zielgröße ein linearer, ein quadratischer, ein sigmoidaler oder ein Monod Ansatz ausgewählt.

$$Y_i = m * \log(M_0) + b \qquad 3\text{-}18$$

$$Y_i = a * (\log(M_0 - x_t)^2 + b_t \qquad 3\text{-}19$$

$$Y_i = \frac{a}{1 + \exp(-\log M_0)} \qquad 3\text{-}20$$

$$Y_i = \frac{m \cdot \log M_0}{b + \log M_0} \qquad 3\text{-}21$$

Die Anpassung der Modellparameter erfolgte durch einen Simplex-Algorithmus. Die Zielfunktion F zur Minimierung der relativen Summe der Fehlerquadrate wurde wie folgt berechnet:

$$F = \sum_{i}^{n} \left[\frac{Y_{calc} - Y_{\exp}}{Y_{\exp}} \right]^2 \qquad 3\text{-}22$$

Als Software zur Berechung der Modellparameter wurde die Software MATLAB® (The MathWorks, Inc., V.7.7.0.471.) verwendet.

3.3 Enzymatische Hydrolyse des Hemicellulose- und Cellulose-anteils der Faserfraktion

Im folgenden Abschnitt sollen die Methoden der enzymatischen Hydrolyse der Hemicellulose- und Cellulosefraktion vorgestellt werden. Hierbei soll zunächst auf die Auswahl von geeigneten kommerziellen Enzympräparaten eingegangen werden. Anschließend erfolgt eine Beschreibung der Prozessentwicklung zur Hochfeststoff-Hydrolyse in einem 1 L-Rührreaktor.

3.3.1 Auswahl von geeigneten Hydrolasen

Zur Auswahl von geeigneten Enzymen zur enzymatischen Hydrolyse der Zuckerfraktionen (Hemicellulose und Cellulose) wurden technische Enzympräparate verschiedenster Hersteller eingesetzt (siehe Kapitel 3.1.2 Tabelle 7). Zur Auswahl standen kommerziell verfügbare Enzyme, da die unmittelbare Bereitstellung der Enzyme für den Einsatz in einem Pilotmaßstab als Voraussetzung definiert wurde.

Die Auswahl einer geeigneten Xylanase und Cellulase erfolgte anhand unterschiedlicher Kriterien. Während bei den Xylanasen eine selektive Abtrennung von Xylan aus der Feststoffmatrix und die vollständige Umsetzung von Xylooligosacchariden zu Xylose im Vordergrund standen, wurden die Cellulasepräparate aufgrund ihres Umsatzgrades vor allem bei höheren Feststoffgehalten untersucht.

3.3.1.1 Auswahl von geeigneten Xylanasen

Ziel der Enzymauswahl war es ,eine geeignete Xylanase zu identifizieren, die selektiv Xylan, das nach der Vorbehandlung noch in der Faser war, vollständig zu Xylose umzusetzen.

Zur Auswahl der kommerziellen Xylanasepräparate wurden die Xyloseausbeute Y, die Selektivität S und der Anteil an Xylose, bezogen auf die Menge aller gelösten Zucker, der sogenannte F-Faktor, ermittelt.
Die Berechnung der Xyloseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse erfolgte analog zu Kapitel 3.2.2.3. Die Selektivität S wird wie folgt berechnet:

$$S = \frac{c_{Xylose}}{c_{Xylose} + c_{Glukose}} \qquad 3\text{-}23$$

Die Selektivität sagt aus, wie viel Xylosemonomere und -oligomere im Verhältnis zur Summe aller Zucker bei der Xylanhydrolyse entstanden sind.
Der F-Faktor vergleicht den Anteil der herausgelösten Monomere mit dem Gesamtanteil an herausgelösten Xylosesacchariden (Monomere + Oligmere).

$$F = \frac{c_{Monomer}}{c_{Monomere+Oligomere}} \qquad 3\text{-}24$$

Für die Experimente wurden die vorbehandelten Weizenstrohfasern (siehe Kapitel 3.2.3., Tabelle 18) eingesetzt. Die sauren Xylanasen Accellerase XY, Cellic HTec, Ecopulp TX200A und Rohament GE wurden in 50 mM Natrium Citrat-Puffer bei pH 5,0 eingesetzt, während für die alkalische Xylanase Pulpzyme HC, ein 50 mM Tris-HCl Puffer bei pH 8, verwendet wurde. Die Hydrolysen erfolgten bei 50 °C in Schüttelkolben bei 120 rpm (Amplitude 1,9 cm). Zur Messung der freigesetzten Monosaccharide wurde zunächst eine 1 mL Probe zur Inaktivierung der Enzyme für 10 min bei 95 °C erhitzt. Die Monosaccharide wurden dann mittels HPLC-RI analysiert (siehe Kapitel 7.2.4).
Zur Messung der Gesamtzuckerkonzentration wurde das Hydrolysat mit 4 % H_2S0_4 bei 121 °C für 10 min hydrolysiert [77]. Die Differenz aus der Monosaccharid-Konzentration nach der sauren Hydrolyse und der Monosaccharid-Konzentration ohne saure Hydrolyse entsprach der Oligomerkonzentration.

3.3.1.2 Auswahl von geeigneten Cellulasen

Ziel der Enzymauswahl war es, eine geeignete Cellulase zu identifizieren, die eine hohe Glukoseausbeute bei erhöhten Feststoffkonzentrationen von 100 - 200 g/L aufwies.

Für die Auswahl wurden vorbehandelte Weizenstrohfasern eingesetzt (siehe Kapitel 3.2.3., Tabelle 18). Die Cellulasen Celluclast 1.5L, Cellic CTec, Cellic CTec2 Novozym 188, Accellerase BG und Accellerase 1500 wurden in gepufferten Reaktionssystemen bei pH 5 (50 mM Natrium Citrat) eingesetzt. Die Hydrolysen erfolgten bei 50 °C in Schüttelkolben bei 120 rpm (Amplitude 1,9 cm).

Zur Messung der freigesetzten Monosaccharide wurde zunächst eine 1 mL Probe zur Inaktivierung der Enzyme für 10 min bei 95 °C erhitzt. Die Monosaccharide wurden dann mittels HPLC-RI analysiert (siehe Kapitel 7.2.4). Die Glukoseausbeuten Y_{Glu} zum Zeitpunkt t errechneten sich nach den Formeln von Kapitel 3.2.2.2. Zur Messung der Gesamtzuckerkonzentration wurde das Hydrolysat mit 4 % H_2SO_4 bei 121 °C für 10 min hydrolysiert [77]. Die Differenz aus der Monosaccharidkonzentration nach der sauren Hydrolyse und der Monosaccharidkonzentration ohne saure Hydrolyse entsprach der Oligomerkonzentration.

3.3.2 Verfahrensentwicklung zur Hochfeststoff-Hydrolyse HFH

Im folgenden Abschnitt sollen zunächst das Reaktorsystem der Hochfeststoffhydrolyse und die verwendeten Rührorgane vorgestellt werden. Anschließend erfolgt die Beschreibung der Methodik zur Bestimmung der Dichte der Fasersuspensionen, der Viskosität der eingesetzten Fluide sowie der Leistungs- und Mischzeitcharakteristik der eingesetzten Rührorgane. Abschließend soll das verwendete Modell zur Beschreibung der Hydrolysekinetik der Cellulosefraktion mit Cellulasen näher erläutert werden.

3.3.2.1 Verwendetes Rührreaktorsystem und verwendete Rührorgane

Zur Entwicklung eines Verfahrens zur Hochfeststoff-Hydrolyse wurde, ausgehend von Vorversuchen im Schüttelkolben, die enzymatische Hydrolyse in ein Rührreaktorsystem übertragen. Als Rührreaktor stand ein 1 L (D = 100 mm) Doppelwandglasreaktionsgefäß mit einem Innnendurchmesser von D = 100 mm und einer Füllhöhe von H = 100 mm zur Verfügung.. Die Abmessungen des Reaktors sind in Abbildung 16 gezeigt.

Als Rührorgane wurden ein Segmentwendelrührer (d = 90 mm) und ein doppelstufiger Schrägblattrührer (d = 80 mm) verwendet (siehe Abbildung 17). Die geometrischen Verhältnisse der eingesetzten Rührreaktorsysteme sind in Tabelle 15 aufgelistet.

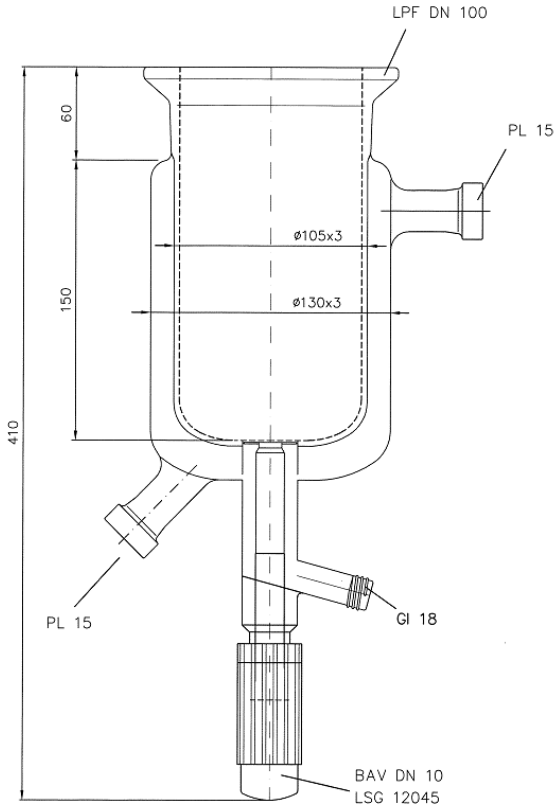


Abbildung 16: Abmessungen des Doppelwandglasreaktionsgefäßes

(A) (B)

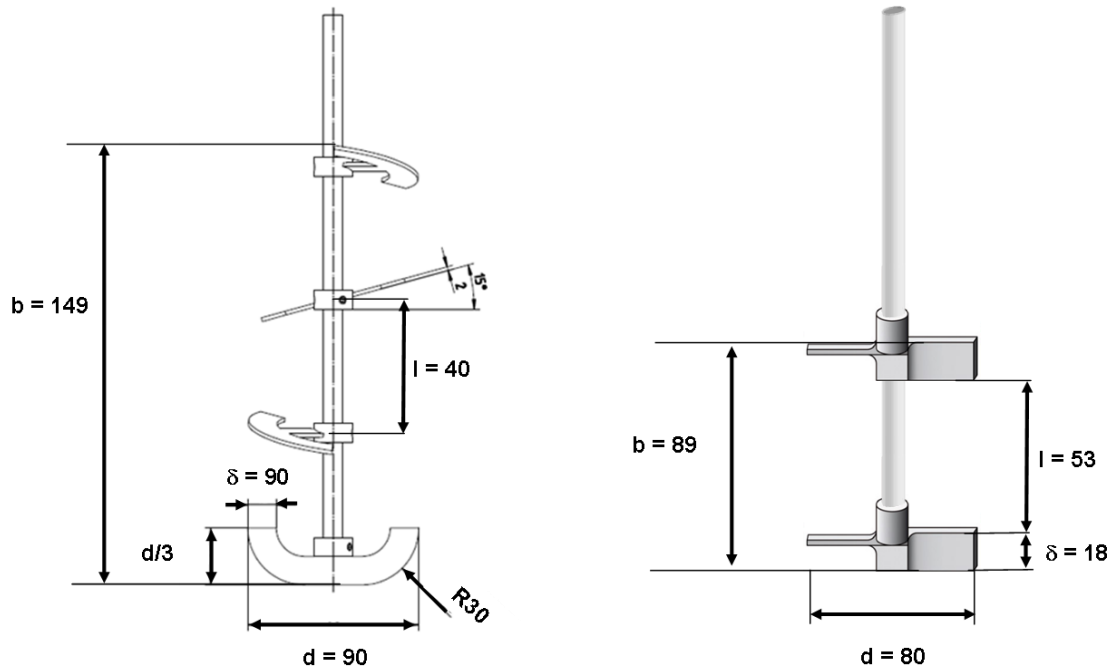


Abbildung 17: Abmessungen (A) des Segmentwendel- und des Schrägblattrührers (B).

Tabelle 15: Geometrische Verhältnisse der eingesetzten Rührreaktorsysteme

	H/D	D/d	h/d	b/d	δ/d	l/d
Segment-wendelrührer	1	1,1	0,01	1,66	0,333	0,44
Schrägblattrührer (2-stufig)	1	1,25	0,15	1,11	0,225	0,66

3.3.2.2 Dichtebestimmung der Fluide

Zur Berechnung der dimensionslosen Newton- Ne und Reynoldszahl Re mussten die Dichten der Fluide ermittelt werden. Die Dichten ergaben sich aus den Fluidmassen dividiert durch die Fluidvolumina. Die Bestimmung der Fluidmassen erfolgte durch Messung der Fluidmasse mit einer Feinwaage (Fa. Sartorius). Die Messung des Volumens erfolgte mittels eines 50 mL Messkolbens.

3.3.2.3 Rheologische Untersuchungen

Zur Bestimmung der Fluidviskositäten wurden rheologische Messungen mit dem Rheometer Physica MCR 301 durchgeführt. Als Messaufbau zur rheologischen Analyse von Carboxymethylcellulose (CMC)-Lösungen (0,1 % bis 1,5 % w/w) wurde ein Kegel /Zylinder System verwendet, während bei der Messung der Fasersuspensionen (10 % bis 22,5 % TS) ein Platte / Platte System eingesetzt wurde. Zunächst wurde die Scherrate logarithmisch im Bereich zwischen 0,1 s^{-1} und 1000 s^{-1} erhöht, um die Viskositätskurve der Fluide zu ermitteln. Anschließend wurde bei einer konstanten Scherrate von 60 s^{-1} die Viskosität gemessen. Diese Scherrate entsprach der Scherrate, die bei der Verwendung des Segmentwendelrührers mit 80 rpm auftrat.

3.3.2.4 Bestimmung der Leistungs- und Mischzeitcharakteristik

Mit Hilfe der Daten aus den Dichtemessungen und den rheologischen Untersuchungen war es möglich, eine empirische Korrelation zwischen dimensionsloser Newtonzahl Ne („Energieeintrag“) bzw. dimensionsloser Mischzeit nθ („Anzahl Umdrehungen zur vollständigen Vermischung“) und der Re-Zahl („Verhältnis Trägheitskraft zu Reibungskraft“) aufzustellen. Diese Beziehungen werden Leistungs- und Mischzeitcharakteristik genannt und können für den Vergleich von unterschiedlichen Rührergeometrien eingesetzt werden.
Mit Hilfe der empirischen Korrelation nach Metzner/Otto und dem Ostwald de Waele-Potenzgesetz kann eine effektive Reynoldszahl wie folgt berechnet werden [203]:

$$\mathrm{Re}_{eff} = \frac{nd^2\rho}{\eta_{eff}} = \frac{n^{2-m}d^2\rho}{K_{pI}k_{MO}^{m-1}} \qquad 3\text{-}25$$

Hierbei ist n die Drehzahl des Rührers, d der Rührerdurchmesser, ρ die Dichte des Fluids, K_{pI} der Konsistenzindex, m der Potenzgesetz-Index und k_{MO} die Metzner/Otto-Proportionalitätskonstante (k_{MO} = 35 für wandgängige Rührer [204]). Obige Gleichung ist insbesondere für Fluide gültig, deren Viskositätskurve mit Hilfe des Potenzansatzes beschrieben werden kann. Es ist zu berücksichtigen, dass unter Anwendung des Metzner/Otto-Verfahrens das nicht-newtonsche Fließverhalten nur über eine gemittelte Viskosität repräsentiert wird, was eine grobe Annäherung darstellt. Daneben werden viskoelastische Fließanteile nicht berücksichtigt. Nach Pörtner gelingt es aber bei gering viskoelastischen Fluiden die resultierenden Newton-Reynolds-Werte dem newtonschen Kennlinienverlauf anzunähern (beispielsweise CMC bis 1,5 %) [205]. Als Fluide wurden deshalb Wasser (Newtonsches Fluid) und CMC im Bereich von 0,1 - 1,5 % w/w eingesetzt. In diesen Konzentrationsbereichen ist der viskoelastische Effekt bei CMC sehr gering und das Verhältnis von Normalspannung zu Schubspannung (ausgedrückt durch die Weißenbergzahl Wi) geht Wi gegen 1. Dies konnte durch rheologische Messungen bestätigt werden. Der Zusammenhang zwischen Viskosität und Scherrate wurde ähnlich wie bei den Fasersuspensionen ebenfalls ermittelt und daraus die Parameter des Ostwald de Waele-Potenzgesetz abgeleitet.

Zum Betrieb eines Rührreaktors benötigt man die Kenntnis der aufzuwendenden Motorleistung. Diese ergibt sich aus der Rührleistung P, die in das Medium übertragen wird, und aus den Anteilen der Reibungsverluste (P_V) und der Anfahrleistung P_A. Zur Bestimmung der Rührleistung muss das Drehmoment M an der Rührwelle und die Drehzahl n bekannt sein [206].

$$P = M \cdot 2\pi \cdot n \qquad 3\text{-}26$$

Das Drehmoment M wurde in der vorliegenden Arbeit elektrisch mit Wirbelstromsensoren direkt am Rührwerk gemessen. Die Rührerleistung P einer bestimmten Rührergeometrie hängt sowohl von geometrischen Faktoren (beispielsweise Behälterdurchmesser D, Rührerdurchmesser Füllhöhe H) als auch von Stoffwerten des Fluids (Dichte, Viskosität) und der Drehzahl n ab. Die Zielgröße Leistung P lässt sich nach einer Dimensionsanalyse zu einer

dimensionslosen Ziel-Kennzahl der sogenannten Newton-Zahl Ne umformen [207]. Die Ne-Zahl ist im unbegasten System ohne signifikante Trombenbildung nur noch abhängig von der Re-Zahl. Dieser Zusammenhang wird als sogenannten Leistungscharakteristik (Ne vs. Re) bezeichnet.

$$Ne = \frac{P}{\rho n^3 d^5} \qquad 3\text{-}27$$

Die dimensionslose Mischzahl nθ wurde mit Hilfe einer Farbmethode ermittelt. Hierzu wurde der Farbstoff Remazol Brilliant Blue (RBB) an einer definierten Stelle auf die Fluidoberfläche aufgegeben und mit einer Videokamera die Verteilung des Farbstoffs im Fluid verfolgt. Als Mischzeit θ wurde die Zeit definiert, bei der eine fast vollständige schlierenfreie Vermischung des Farbstoffs erreicht war.
Die Messung der Leistungs- und Mischzeitcharakteristik des Segmentwendel- und des Schrägblattrührers wurde im 1 L-Reaktor durchgeführt. Als Fluide wurden Wasser und CMC-Lösungen im Bereich von 0,1 - 1,5 % w/w eingesetzt. Neben der Variation der Fluide wurde ebenfalls eine Variation der Drehzahl im Bereich von 60 - 200 rpm durchgeführt, um verschiedene Strömungszustände (Re Zahlen) zu erhalten.

3.3.2.5 Hydrolyse der Faserfraktionen bei hohen Feststoffdichten

Für die enzymatische Hydrolyse von alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh wurde Cellic CTec 2 eingesetzt. Dieses Präparat wurde in den Voruntersuchungen (siehe Kapitel 4.2.2.1) aufgrund der hohen Glukoseausbeuten ausgewählt. Die Hydrolyse der Fasern erfolgte in 50 mM Citrat-Puffer (pH 5,0) mit 20 FPU/g_{TS} Cellic CTec 2. Die Gesamtmasse des Systems betrug 800 g. Die Reaktionstemperatur lag bei 50 °C. Die Berechnung des Celluloseumsatzes X und der Zuckerkonzentrationen erfolgte mit einem summativen Ansatz nach Chung et al. [208]

3.3.3 Reaktionskinetik der enzymatischen Hydrolyse im Rührkesselreaktor

Eine schematische Abbildung des Reaktionsnetzwerks bei der enzymatischen Hydrolyse von Cellulose mit Cellulasen ist in Abbildung 18 gezeigt.

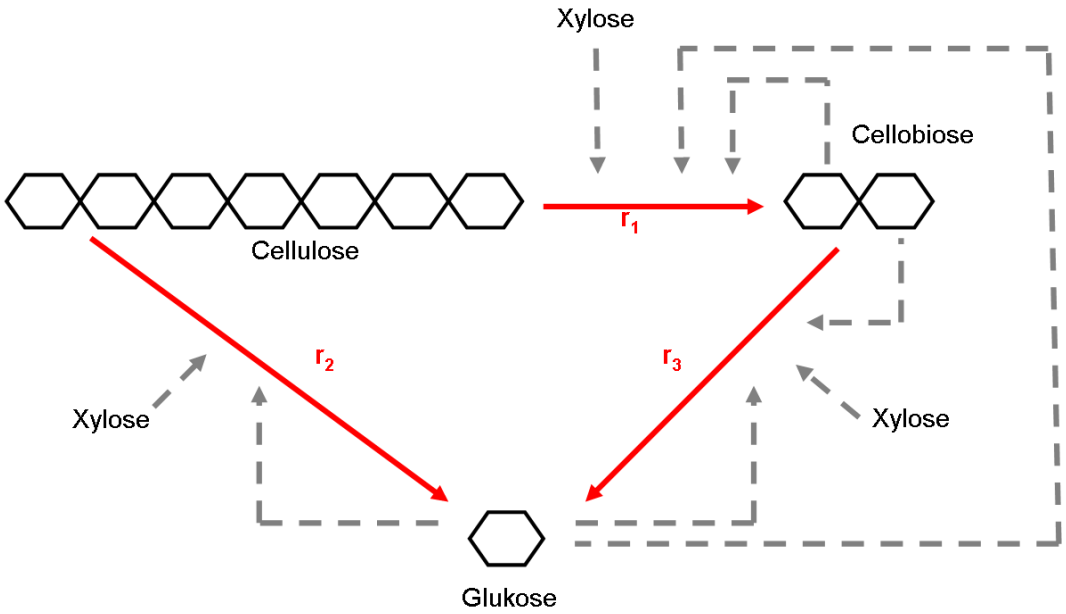


Abbildung 18: Reaktionsschema der enzymatischen Hydrolyse nach [209, 210]. Beteilige Enzyme bei den Reaktionsschritten r_1: Endo-ß-1,4-glucanase (E.C. 3.2.1.4) und Exo-ß-1,4-Cellobiohydrolyse (E.C.3.2.1.91). Bei r_2: Exo-ß-1,4-Cellobiohydrolyse (E.C.3.2.1.91) und Exo-ß-1,4-glycohydrolyase (E.C. 3.2.1.74). Bei r_3: ß- Glukosidase (E.C.3.2.1.21).

Das Reaktionsmodell besteht aus den drei getrennten Reaktionsschritten r_1, r_2 und r_3. Jeder Reaktionsschritt ist durch die jeweiligen Reaktionsprodukte Cellobiose und Glukose sowie Xylose inhibiert. Als Modellvereinfachung wurden lediglich die Zucker Cellobiose, Glukose und Xylose betrachtet. Zur Erstellung des Modells wurde angenommen, dass (1) die Adsorption der Cellulosespaltenden Enzyme (Endo-Cellulase und CBH) einer Langmuirisotherme folgt und die Reaktionen r_1 und r_2 nach einer Reaktion erster Ordnung verlaufen, dass (2) die Cellulose-Matrix gleichmäßig aufgebaut ist (kein Unterschied zwischen amorphen und kristallinen Regionen), dass (3) keine Enzyminaktivierung durch thermische oder mechanische Beanspruchung auftritt, dass (4) die Hydrolyse von Cellobiose zu Glukose homogen in der Reaktionslösung erfolgt und nach einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben wird, dass (5) die Endoglukanase, Cellobiohydrolyse und ß-Glukosidase auf Lignin unspezifisch adsorbieren, dass (6) die Cellulose keine Bindungsstellen für die unspezifische Adsorption aufweist, dass (7) die Endprodukthemmung der beteiligten Zucker (Glukose, Cellobiose und Xylose) nach dem Mechanismus der kompetitiven Hemmung verläuft und dass (8) das Reaktionssystem sich isotherm verhält.[209, 210]

Auf Basis der oben getroffenen Annahmen lässt sich die Massenbilanz für das Multireaktionsmodell wie folgt aufstellen:

Cellulose: $\frac{dS}{dt} = -r_1 - r_2$ 3-28

Cellobiose: $\frac{dG_2}{dt} = 1{,}056 r_1 - r_3$ 3-29

Glukose: $\frac{dG_1}{dt} = 1{,}111 r_2 + 1{,}056 r_3$ 3-30

Cellulase (EG/CBH i=1): $E_{1T} = E_{1f} + E_{1b}$ 3-31

ß-Glukosidase (i=2): $E_{2T} = E_{2f} + E_{2b}$ 3-32

Die Adsorption von Endoglukanase und Cellobiohydrolyse (EG/CBH) auf der homogenen Celluloseoberfläche wird nach einem Langmuir-Ansatz wie folgt beschrieben:

$$E_{1b} = \frac{E_{1\max} \cdot K_{1ad} \cdot E_{1f} \cdot S}{1 + K_{1ad} \cdot E_{1f}} \quad 3\text{-}33$$

Die unspezifische Adsorption von EG/CBH (i=1) und der ß-Glukosidase (i=2) auf Lignin wird durch folgenden Ausdruck formuliert:

$$E_{ibL} = \frac{E_{i\max L} \cdot K_{iadL} \cdot E_{if} \cdot L}{1 + K_{iadL} \cdot E_{if}} \quad 3\text{-}34$$

Die auf der Cellulose gebundene Enzymkonzentration E_{1bC} von EG/CBH wird aufgrund der unspezifischen Ligninadsorption verkleinert, so dass gilt:

$$E_{1bC} = E_{1b} - \lambda \cdot E_{1bL} \quad 3\text{-}35$$

wobei λ=1 angenommen wird (siehe Annahme (6)).

Die Reaktionsraten werden unter Berücksichtigung der getroffenen Annahmen errechnet durch:

$$r_1 = \frac{k_{1r} \cdot E_{1bC} \cdot S}{1 + \frac{G_2}{K_{1IG2}} + \frac{G_1}{K_{1IG}} + \frac{X}{K_{1IX}}} \quad 3\text{-}36$$

$$r_2 = \frac{k_{2r} \cdot E_{1bC} \cdot S}{1 + \frac{G_2}{K_{2IG2}} + \frac{G_1}{K_{2IG}} + \frac{X}{K_{2IX}}} \qquad 3\text{-}37$$

$$r_3 = \frac{k_{3r} \cdot E_{2f} \cdot G_2}{K_{3M} \cdot \left[1 + \frac{G_1}{K_{3IG}} + \frac{X}{K_{3IX}}\right] + G_2} \qquad 3\text{-}38$$

Die Anpassung der Modellparameter erfolgte durch einen Simplex-Algorithmus. Die Zielfunktion F zur Minimierung der relativen Summe der Fehlerquadrate wurde wie folgt berechnet:

$$F = \sum_i^n \left[\frac{Y_{calc} - Y_{\exp}}{Y_{\exp}}\right]^2 \qquad 3\text{-}39$$

Als Software zur Berechung der Modellparameter wurde die Software MATLAB® (The MathWorks, Inc, V.7.7.0.471.) verwendet.

3.4 Detoxifikation von zuckerhaltigen Aufschlusslösungen

Während der Vorbehandlung von Lignocellulose entstehen lösliche Zuckerabbauprodukte (HMF, Furfural, Ameisensäure und Lävulinsäure), Ligninabbauprodukte (phenolische Komponenten) sowie Essigsäure (Deactetylierung von Hemicellulose). Diese Verbindungen sind Verunreinigungen der Prozessströme und wirken sich in der Regel negativ auf die folgenden Prozessschritte der enzymatischen Hydrolyse und der Fermentation aus [139, 140]. Aus diesem Grund müssen die Lignocellulose-Abbauprodukte abgetrennt werden. Dieses Verfahren wird als Detoxifikation bezeichnet. In dieser Arbeit wurden zur Detoxifikation neben einem Laccase-katalysierten Verfahren auch adsorptive Methoden mit hydrophoben Adsorbern und Anionenaustauschern untersucht und optimiert. Im folgenden Abschnitt sollen die Methoden zur Prozessentwicklung der untersuchten Detoxifikationsverfahren näher beschrieben werden.

3.4.1 Verwendete Aufschlusslösungen

Für die Versuche zur Detoxifikation von Aufschlusslösungen wurden Überstände aus einer Organosolvbehandlung von Weizenstroh in einer Doppelkammeranlage (DuoRaff siehe Kapitel 3.2.1) verwendet. Die ermittelte Zusammensetzung und die verwendeten Betriebsbedingungen sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16: Zusammensetzung der ethanolfreien Aufschlusslösungen (Aufkonzentrierungsfaktor 2), die für die Detoxifikationsexperimente (siehe Kapitel 4.3.2) eingesetzt wurden

Analyte / g/L	LZ 16 (120 min, 220 °C EtOH/H_2O 1/1, DuoRaff)	LZ30 (120 min, 220 °C EtOH/H_2O 1/1, DuoRaff)
Ameisensäure	1,75	1,93
Acetat	3,4	2,16
Lävulinsäure	0,75	0,18
HMF	n.m	0,10
Furfural	n.m	0,01
Phenole[1]	3,4	3,5
Xylose*	0,26	0,59
Glukose*	n.m	0,43

n.m: nicht messbar; Werte unterhalb der Nachweisgrenze

* Zucker gemessen nach saurer Hydrolyse (siehe Kapitel 7.2.3)

Für die Auswahl geeigneter Adsorber wurde die Aufschlusslösung LZ16 eingesetzt. Nachdem diese Aufschlusslösung keine detektierbaren Mengen an Furfural, HMF und Lävulinsäure enthielt, wurden diese der Versuchsmatrix zugesetzt, um eine Konzentration von 1,5 g/L Furfural, HMF und Lävulinsäure zu erhalten.

3.4.2 Immobilisierung der Laccase und Charakterisierung der Immobilisate

Um die Laccase von *Trametes versicolor* nach der Detoxifikationsreaktion wiederzugewinnen und mehrfach einsetzen zu können, sollte diese auf einem geeigneten Träger immobilisiert werden. Als Grundmaterialien wurden die epoxy- und aminofunktionalisierten Träger Sepabeads EC und Sepabeads EA der Fa. Resindion verwendet (siehe Kapitel 3.1.3). Die Immobilisierung der Laccase wurde nach der Vorschrift des Herstellers (Fa. Resindion) durchgeführt. Nach der Immobilisierung wurde ein Teil der Immobilisate mit Glutardialdehyd quervernetzt. Dieser Modifikationschritt kann nach Angaben des Herstellers die Stabilität der immmobilisierten Enzyme positiv beeinflussen [211, 212]. Die Stabilität wird durch den mehrfachen Einsatz der Immobilisate ermittelt. Hierbei wird der Umsatz an Substrat nach der Reaktion gemessen. Falls der Umsatz sinkt, bedeutet dies einen Stabilitätsverlust der Immobilisate.

Zur Testung der Langzeitstabilität der Immobilisate wurden 500 mg Träger mit und ohne Quervernetzung (Oberflächenmodifizierung) wiederholt über mehrere Reaktionszyklen eingesetzt. Als Substrat wurde sowohl Acetosysringon als auch die Aufschlusslösung LZ16 verwendet. Die Reaktionslösungen wurden mit Natriumacetat pH 4,75 gepuffert und die Reaktionstemperatur lag bei 50 °C. Es wurden 10 mL der Substratlösung zum Träger gegeben und für 1 h bei 50 °C und 700 rpm im Heidolph Synthesis 1 inkubiert. Diese Reaktion entsprach einem Reaktionszyklus. Während der Langzeitstabilität wurden dabei mehrere Zyklen durchlaufen. Die Konzentration an phenolischen Komponenten wurde mit dem Folin-Assay bestimmt (siehe Kapitel 7.2.5) und der Umsatz X für die einzelnen Zyklen aus der Ausgangskonzentration c_0 berechnet.

$$X(t) = 1 - \frac{c(t)}{c_0} \qquad 3\text{-}40$$

Für den Stabilitätstest mit Aufschlusslösungen wurden in einem Gesamtvolumen von 15 mL 0,84 U/mL immobilisierte Laccase (Sepabeads EA-Träger) eingewogen. Für jeden Zyklus wurden in 50 mM Na-Acetat-Puffer pH 4,75 verschiedene Phenolkonzentrationen mit Aufschlusslösung eingestellt und 1 h bei 50 °C und 700 rpm inkubiert. Die Stabilität des Enzym-Träger-Komplexes wurde für 5, 10 und 20 mM Phenolkonzentrationen untersucht. Es wurden fünf Zyklen durchgeführt und nach jedem Zyklus wurde ebenfalls die Phenolkonzentration mit dem Folin-Assay bestimmt (siehe Anhang Kapitel 7.2.5).

3.4.3 Laccase-katalysierte Detoxifikation mit freier oder immobilisierter Laccase

Zur Detoxifikation der Aufschlusslösungen wurde freie und immobilisierte Laccase eingesetzt. Als Substrate wurden einerseits Einzelsubtanzen als Modellsubstrate für Phenolaldehyde (Vanillin), Phenolsäuren (Vanillinsäure) und Phenolketone (Acetosysringon) für grundlegende Untersuchungen eingesetzt. Andererseits wurde die Weizenstroh-Organosolv-Aufschlusslösung LZ16 als Testmatrix eingesetzt. Das Reaktionssystem wurde mit 50 mM Natriumacetat gepuffert (pH 4,75) und die Reaktionstemperatur betrug 50 °C. Die Reaktionen wurden im Heidolph Synthesis 1 durchgeführt. Die Phenolkonzentration und der Phenolumsatz wurden mit Hilfe des Folin-Assays (Kapitel 7.2.5) ermittelt.

3.4.4 Modellierung der Laccase-katalysierten Detoxifikation

Die reaktionstechnische Beschreibung der Laccase-katalysierten Detoxifikation von Aufschlusslösungen wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurden der funktionelle Zusammenhang zwischen Umsatz X der phenolischen Komponenten, der Laccasedosierung und der Substratkonzentration mit einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan erstellt. Hierbei wurde der Umsatz X der phenolischen Komponenten anhand einer polynomischen Regressionsfunktion zweiter Ordnung mit Hilfe des Programms Design-Expert®V8 (Stat-Ease Inc.) beschrieben (siehe Kapitel 7.3 und 3.2.5.1). Die Laccase (frei oder immobilisiert) wurde im Bereich von 0,36 - 1,28 U/mL dosiert und die phenolischen Komponenten einer Organosolv-Aufschlusslösung (LZ16) wurden in einem Bereich von 10 bis 30 mM eingesetzt. Für die Modellsubstrate der Vertreter von Phenolsäuren (Vanillinsäure), Phenolaldehyde (Vanillin) und Phenolketone (Acetosyringon) wurde hingegen ein Konzentrationsbereich von 1-5 mM untersucht.

Mit Hilfe der Regressionsfunktionen wurde anschließend die minimale Enzymkonzentration errechnet, für die sowohl ein maximaler Umsatz von $X > 0{,}85$ erreicht als auch eine maximale Substratkonzentration von > 20 mM eingesetzt werden konnte. Diese Enzymkonzentration wurde dann für die Beschreibung des kinetischen Modells verwendet.

Die Modellierung des zeitlichen Konzentrationsverlaufs der phenolischen Komponenten der Organosolv-Aufschlusslösung wurde mit Hilfe des Programms MATLAB® (The MathWorks, Inc, V.7.7.0.471.) durchgeführt. Als Modellansatz diente ein reversibles System, das bereits bei der Laccase-katalysierten Degradation von Farbstoffen eingesetzt wurde [213-215].

$$\upsilon = \frac{\upsilon_{\max}\left([S] - \frac{[P]}{K_{eq}}\right)}{K_m\left(1 + \frac{[P]}{K_{MP}}\right) + [S]} \qquad 3\text{-}41$$

Hierbei lässt sich die die Gleichgewichtskonstante K_{eq} wie folgt berechnen

$$K_{eq} = \frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}} = \frac{\upsilon_{\max} \cdot K_{MP}}{\upsilon_{\max,r} \cdot K_m} \qquad 3\text{-}42$$

K_m war die Michaelis-Menten-Konstante, während K_{MP} die Michaelis-Menten-Konstante für das Produkt, [P] die Produktkonzentration, [S] die Substratkonzentration und die Gleichgewichtskonstante darstellten.

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit υ_{max} der Hinreaktion ergab sich aus der kinetischen Konstanten k_2 und der Enzymkonzentration $[E]_0$ zu Beginn der Reaktion wie folgt:

$$\upsilon_{max} = k_2 \cdot [E]_0 \qquad 3\text{-}43$$

Die Modellkonstanten wurden anschließend mit einem Simplex-Algorithmus solange angepasst, bis ein Minimum zwischen gemessenen und berechneten Werten erreicht wurde. Die Zielfunktion F zur Minimierung der relativen Summe der Fehlerquadrate wurde wie folgt berechnet:

$$F = \sum_{i}^{n} \left[\frac{C_{calc} - C_{exp}}{C_{exp}} \right]^2 \qquad 3\text{-}44$$

wobei C_{calc} der berechneten Konzentration aus der Modellgleichung und C_{exp} den experimentell ermittelten Konzentrationen entsprach. N war die Gesamtzahl der experimentellen Punkte.

3.4.5 Adsorptive Detoxifikation

Für die Vorauswahl geeigneter Adsorbermaterialen (siehe Kapitel 3.1.4) wurden statische Adsorptionstests durchgeführt. Hierzu wurde eine Mischung der Abbauprodukte mit 1,5 g/L phenolischen Komponenten, 1,0 g/L HMF, 1,5 g/L Furfural, 2,5 g/L Ameisensäure, 2,5 g/L Essigsäure und 2,0 g/L Lävulinsäure eingesetzt. Die Adsorber wurden mit einer Beladung von 12 mg_{TM}/mL bei 30 °C für 16 h mit der Mischung im Heidolph Synthesis 1 bei 700 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Gleichgewichtsbeladung q_e der einzelnen Analyte ermittelt. Hierbei wurde, ausgehend von den gemessenen Konzentrationen der Analyte in der flüssigen Phase c und der ursprünglich eingesetzte Konzentration c_0, die Gleichgewichtsbeladung q_e wie folgt berechnet [216, 217]:

$$q_e = \frac{(c_0 - c) \cdot V}{m_{Träger}} \qquad 3\text{-}45$$

Anschließend wurden für die ausgewählten Adsorber mittels statischer Adsorptionstests für die Reinsubstanzen (25 mg/mL, 16 h, Heidolph Synthesis 1, 700 rpm) die Adsorptionsisothermen bei unterschiedlichen Temperaturen im Bereich von 15 - 40°C

ermittelt. Mittels linearer Regression wurden geeignete Adsorptionsmodelle ausgewählt. Für den funktionellen Zusammenhang zwischen Gleichgewichtsbeladung q_e und Gleichgewichtskonzentration in der flüssigen Phase c_e wurden die Adsorptionsmodelle von Langmuir und Redlich-Peterson eingesetzt [218, 219].

Die isostere Adsorptionsenthalpie ΔH_{ads} für unterschiedliche Beladungen q wurde ebenfalls ermittelt. Hierbei wurde die Van't Hoff Gleichung verwendet und durch Linearisierung konnte aus den Steigungsdaten die isostere Adsorptionsenthalpie ΔH_{ads} berechnet werden. [217, 220, 221]

Die Freie Gibbs-Energie ΔG und die Entropieänderung ΔS liesen sich wie folgt berechnen [218, 222, 223]:

$$\Delta G = -R \cdot T \int_0^a q \frac{da}{a} \qquad 3\text{-}46$$

Bei den geringen Konzentrationen konnte anstatt der Aktivität a der Molenbruch x eingesetzt werden:

$$\Delta G = -R \cdot T \int_0^x q \frac{dx}{x} \qquad 3\text{-}47$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \qquad 3\text{-}48$$

Nach der Auswahl und thermodynamischen Charakterisierung der Adsorber mit statischen Adsorptionstests wurden dynamische Adsorptionsversuche in einem Festbettadsorber durchgeführt, um das Durchbruchsverhalten (Durchbruchszeit, Durchbruchsvolumen) der ausgewählten Adsorber zu untersuchen. Das Fließbild der Anlage ist in Abbildung 19 dargestellt. Für die hydrophoben Substanzen phenolische Komponenten, Furfural und HMF wurde der hydrophoben Adsorber MN202 ausgewählt. Für organische Säuren wurde der Anionentauscher A103S eingesetzt. Die Spezifikationen der gepackten Festbettsadsorber sind in Tabelle 10 in Kapitel 3.1.4 dargestellt. Mit Hilfe eines Fraktionensammlers wurde am Säulenausgang die flüssige Phase nach konstanten Zeitintervallen in unterschiedliche Proben aufgeteilt. Die Konzentration der Abbauprodukte in den jeweiligen Proben wurden mit den Methoden, die im Anhang Kapitel 7.2.4 und 7.2.5 beschrieben sind, bestimmt. Anschließend wurde die Durchbruchskurve in Abhängigkeit der Prozesszeit und des Prozessvolumens

aufgetragen. In Abbildung 20 ist beispielhaft eine Durchbruchskurve mit den charakteristischen Durchbruchswerten wie Durchbruchszeit $t_{0,1}$ und Volumen $V_{0,1}$ dargestellt.

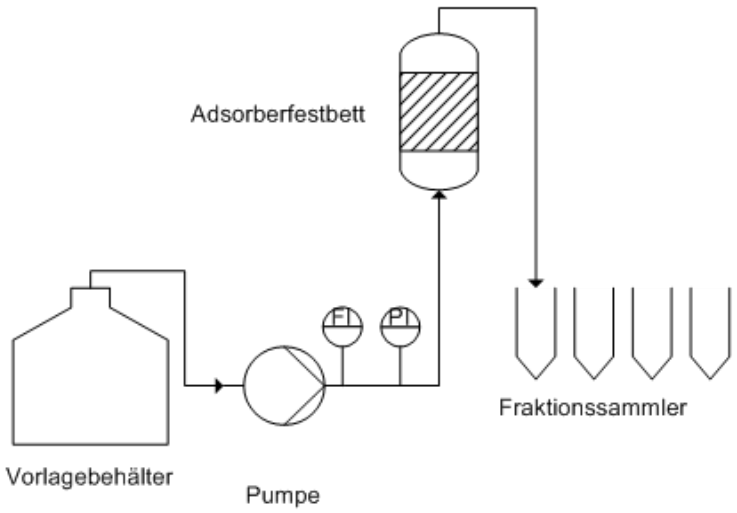


Abbildung 19: Fließbild der Adsorberanlage zur Detoxifikation von Aufschlusslösungen

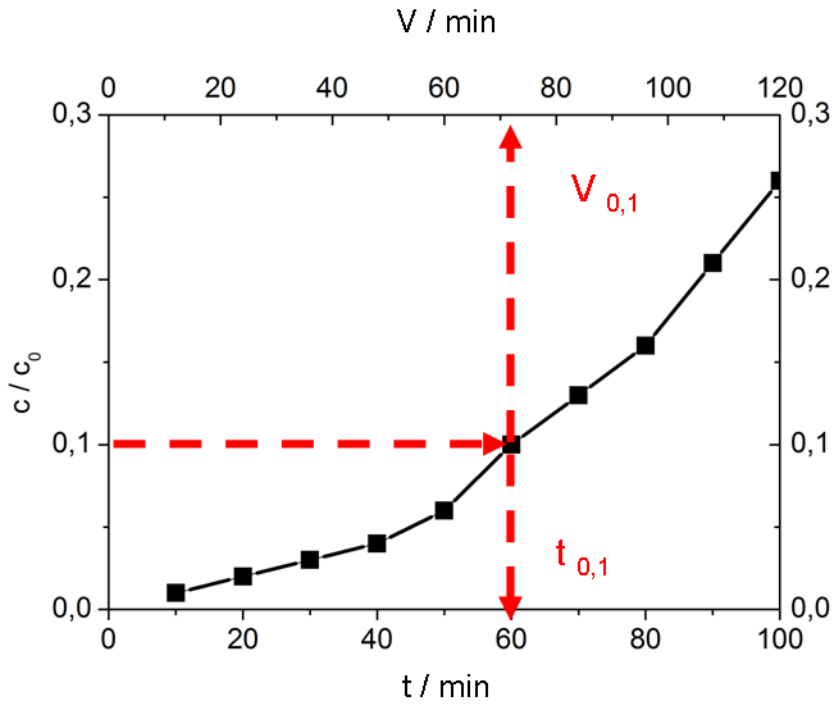


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Durchbruchskurve mit markiertem Durchbruchsvolumen $V_{0,1}$ und Durchbruchszeit $t_{0,1}$.

Die Optimierung der Prozessparameter für die Detoxifikation mittels Adsorption auf MN202 und auf A103S wurde mit Hilfe des Programms Design-Expert® 7 (Fa. Stat-Ease, Inc.)

anhand eines orthogonal quadratischen Versuchsplans durchgeführt (siehe Kapitel 7.3 und Kapitel 3.2.5.1).

Für die Detoxifikation mittels Adsorption wurden als Einflussgrößen die Konzentration der phenolischen Komponenten, der Essigsäure und der Ameisensäure sowie die Flussrate untersucht. Die Substratkonzentration wurde in einem Bereich von 5 - 20 mM phenolische Komponenten bzw. 3 - 8 g/L Essigsäure und 2 - 4 g/L Ameisensäure variiert. Die Flussrate wurde in einem Bereich von 0,6 - 2,0 mL/min bei MN202 und 2,0 - 5,0 mL/min bei A103S untersucht. Als Zielgrößen Y_i, wurden das Durchbruchsvolumen $V_{0,1}$ und die Durchbruchzeit $t_{0,1}$, sowie die daraus berechnete Produktivität P definiert.

$$P = \frac{V_{0,1}}{t_{0,1} + t_{Rüstzeit}} \qquad 3\text{-}49$$

Hierbei ist $t_{Rüstzeit}$ die Rüstzeit der Anlage. Diese ergab sich aus der Zeit für die Desorption und der Zeit zum Spülen der Säule mit VE-Wasser. Die Rüstzeit für den hydrophoben Adsorber lag bei 60 min, während die Rüstzeit des Anionenaustauschers bei 90 min lag.

3.4.6 Untersuchung der Fermentierbarkeit von Aufschlusslösungen

Der Modellorganismus *P. stipitis* wurde zur Untersuchung der Fermentierbarkeit von detoxifizierten und nicht detoxifizierten Aufschlusslösungen eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei einem pH-Wert von 5,0. Als Referenz wurde *P. stipitis* ebenfalls in Mineralmedium kultiviert (siehe 3.1.6). Bei allen Medien wurde eine Xyloseendkonzentration von 50 g/L eingestellt. Die Medien (150 mL in 250 ml Schüttelkolben) wurden definiert mit einer BTM von 0,2 g/L aus einer Vorkultur (16-20 h, YM-Medium, 30 °C ,120 rpm) angeimpft. Die Hauptkulturen wurden anschließend bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Als Messparameter wurden die optische Dichte sowie die Ethanol-, Xylose- und Xylitolkonzentration ermittelt. Die Methoden zur Analytik sind im Anhang Kapitel 7.2.4 näher erläutert. Die Ethanolproduktivität wurde wie folgt berechnet:

$$Q_P = \frac{dP}{dt} \qquad 3\text{-}50$$

3.4.7 Modellierung der adsorptiven Detoxifikation

Zur Auslegung von Festbettadsorbern ist die Vorhersage der Durchbruchskurve notwendig. Das Durchbruchsverhalten wird durch die Form und die Lage der Wellenfunktion am Säulenausgang charakterisiert. Bereits einfache dynamische Modelle, wie beispielsweise Modelle nach Bohart-Adams, Thomas, Yoon-Nelson und Wolborska, können eine empirische Vorhersage über das Durchbruchsverhalten liefern. Sie bieten den Vorteil, dass sie ohne großen rechnerischen Aufwand mit einfacher linearer Regression ermittelt werden können. Durch Vereinfachungen werden Diffusions- und Konvektionseffekte in diese Modelle nicht einbezogen [224-227].

Zur Beschreibung der Durchbruchskurve mit einfachen dynamischen Modellen wurden die gemessenen Durchbruchskurven mit Hilfe eines Simplex-Algorithmus an unterschiedliche Modellgleichungen angepasst. Hierzu wurde die Software MATLAB® (The MathWorks, Inc, V.7.7.0.471.) eingesetzt. In Tabelle 17 sind die verwendeten Modelle bzw. Modellgleichungen dargestellt, die die Sorbatkonzentration c am Säulenausgang in Abhängigkeit der Prozesszeit t beschreiben.

Das Bohart-Adams Modell basiert auf der Annahme, dass die Adsorptionsrate im Wesentlichen von der Reaktion zwischen dem Sorbat und den freien Adsorptionstellen auf der Oberfläche beeinflusst wird. Das Bohart-Adams Modell wird eingesetzt, um die initiale Phase der Durchbruchskurve zu beschreiben. Hierbei ist c_0 die Eingnagskonzentration des Sorbats (mg/dm^3), k die Geschwindigkeitskonstante (mg/dm^3), Z die Länge der Kolonne (cm), N_0 die Kapazität des Adsorbers (mg/dm^3) und U die lineare Durchflussgeschwindigkeit (cm/min) [228].

Beim Thomas-Modell geht man von einer Pfopfenströmung (plug flow) innenrhalb der Adsorptionskolonne aus. Das Adsorptionsgleichgewicht wird hierbei durch eine Langmuir Adsorptionsisotherme und die Adsorptionsreaktion wird mit Hilfe einer reversiblen Reaktion zweiter Ordnung beschrieben. Sorptionsprozesse, die einer Reaktion erster Ordnung folgen, können mit dem Thomas-Modell somit nur bedingt beschrieben werden. Das Modell eignet sich zur Modellierung von Soprtionsprozessen, die keine interne und externe Stofftransportlimitation aufweisen. Bei dem Thomas-Modell ist k_T die Thmoas Geschwindigkeitskonstante ($dm^3/(min*mg)$), c_0 die Konzentration des Sorbats am Säuleneingang (mg/dm^3), q_0 die maximale Oberflächenbeladung des Sorbats auf dem Sorbent (mg/g), $m_{Adsorber}$ die Sorbentmasse (Adsorber) in der Kolonne (g) und Q der Volumenstrom durch die Kolonne (dm^3/min) [229].

Tabelle 17: Einfache dynamische Modelle zur Vorhersage des Durchbruchsverhaltens

Model	Gleichung	Lit.
Bohart-Adams	$\ln\left(\frac{c_0}{c}-1\right)=\ln\left[\exp\left(k\cdot N_0\cdot\frac{Z}{U}\right)-1\right]-kc_0t$	[228]
Thomas	$\ln\left(\frac{c_0}{c}-1\right)=\frac{k_T\cdot q_0\cdot m_{Adsorber}}{Q}-k_T\cdot c_0t$	[229]
Yoon-Nelson	$\ln\left(\frac{c}{c_0-c}\right)=k_{YN}\cdot t-t_{0,5}\cdot k_{YN}$	[230]
Clark	$\ln\left[\left(\frac{c_0}{c}\right)^{n-1}-1\right]=-r\cdot t+\ln(A)$ mit $A=\left(\frac{c_0^{n-1}}{c_b^{n-1}}-1\right)e^{r\cdot t_b}$ und $r=\frac{ß}{U}\nu_m(n-1)$ $\nu_m=\frac{U\cdot c_0}{N_0+c_0}$	[231]
Wolborska	$\ln\left(\frac{c}{c_0}\right)=\frac{ßc_0}{N_0}\cdot t-\frac{ß\cdot Z}{U}$	[232]

Das Yoon-Nelson-Modell ist ein relativ simples Modell, das auf der Annahme basiert, dass die Reduzierung der Sorptionswahrscheinlichkeit von jedem einzelnen Sorbatmolekül proportional zur Wahrscheinlichkeit der Sorbat-Adsorption und des Sorbat-Durchbruchs durch den Adsorber ist. Beim Yoon-Nelson-Modell ist c_0 die Sorbatkonzentration am Säuleneingang, k_{YN} ist die Yoon-Nelson Geschwindigkeitskosntante (1/min) und $t_{0,5}$ (min) ist die Zeit bei der $c/c_0 = 50$ % erreicht ist [230].

Das Clark-Modell verwendet Massentransport-Koeffeizienten in Kombination mit der Freundlich-Isotherme. Hierbei ist n die Freundlich Konstante, c_b die Sorbatkonzentration (mg/dm^3) bei der Durchbruchszeit t_b (min), ν_m die Migrationsgeschwindgkeit des Konzentrationsprofils in der Säule (cm/min), c_0 die Sorbatkonzentration am Säuleneingang (mg/dm^3), ß eine Sorptionskonstante (1/min), U die lineare Durchflussgeschwindigkeit (cm/min) und N_0 die Kapazität des Adsorbers (mg/dm^3) [231].

Wolbarska entwickelte ebenfalls ein reduziertes Modell, um den Durchbruch bei niedriegen Konzentrationsbereichen am Säulenausgang zu beschreiben. Hierbei ist ß der kinetische Koeffizient für den externen Stofftransport (1/min), Z die Säulenlänge (cm), U die lineare

Durchflussgeschwindigkeit (cm/min), c_0 die Sorbatkonzentration am Säuleneingang (mg/dm^3) und N_0 die Kapazität des Adsorbers (mg/dm^3) [232].

3.5 Analytische Methoden

Die Durchführung zur Bestimmung des Feststoffgehaltes, der Zusammensetzung von Fasern und Aufschlussüberständen, der Monosaccharidkonzentrationen, der Konzentrationen der Lignocellulose-Abbauprodukte und der Enzymaktivitäten sind im Anhang Kapitel 7.2 aufgeführt. Des Weiteren sind die verwendeten Methoden zur Bestimmung des Molekulargewichts von niedermolekularen Ligninen mit Größenauschlusschromatographie ebenfalls im Anhang aufgeführt.

4 Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Verfahren und Prozessmodelle zur Gewinnung von Glukose-, Xylose- und Ligninproduktströmen aus ausgewählten lignocellulosehaltigen Rohstoffen entwickelt und optimiert. Das zu Grunde gelegte Verfahrenskonzept, bestehend aus der Vorbehandlung, der enzymatischen Hydrolyse der Fasern und der Detoxifikation der Aufschlusslösung, ist in Abbildung 21 dargestellt. Die Ergebnisse und die Diskussion der einzelnen Verfahrensschritte werden in den jeweiligen Kapiteln im Detail erläutert. In diesen Abschnitt soll ein allgemeiner Überblick des Verfahrens gegeben werden.

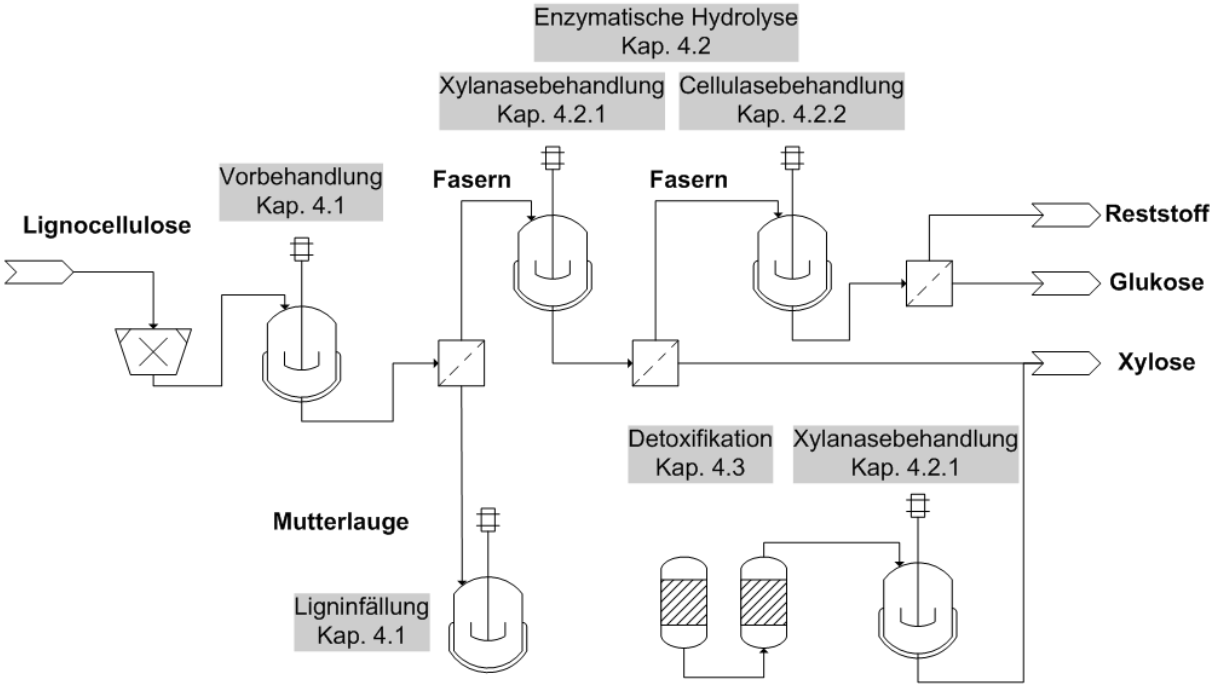


Abbildung 21: Grundverfahrensfließbild des entwickelten Verfahrens zur selektiven Fraktionierung von Lignocellulose in Glukose-, Xylose- und Ligninproduktströme.

Als Rohstoffe wurden Weizenstroh, Miscanthus und Pappelholz untersucht. Zunächst erfolgte jeweils die Zerkleinerung bis zu einer Faserlänge von 0,5 mm. Anschließend wurde jeweils die physikalische-chemische Vorbehandlung betrachtet (siehe Kapitel 4.1). Ziel dieser Vorbehandlung war es, eine cellulosereiche Faserfraktion sowie eine xylan- und ligninreiche Mutterlauge zu erhalten. Hierzu wurde auf Basis des erweiterten Severity-Faktors log R_0'' (siehe Kapitel 3.2.5.2) ein Vergleich unterschiedlicher Vorbehandlungsmethoden zum Aufschluss von Weizenstroh, Miscanthus und Pappelholz durchgeführt. Anhand der Auswahlkriterien Delignifizierung, Xylansolubilisierung und enzymatische Hydrolysierbar-

keit wurde für diese Rohstoffe jeweils das beste Vorbehandlungsverfahren ausgewählt, das mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung weitergehend optimiert wurde. Für die Optmierung wurden weitere Zielparameter wie beispielsweise die Selektivität von Xylose zu Glukose in der Aufschlusslösung oder die Bildung von Ligninabbauprodukten für die Bewertung der Verfahren eingesetzt. Als Grundlage für eine Maßstabsübertragung wurde das Modified Severity Modell eingesetzt, mit dem es möglich war, anhand einer charakteristischen Prozessgröße ($logM_0$) Vorhersagen über die prozessrelevanten Zielgrößen wie beispielsweise Delignifizierung oder Glukoseausbeute zu treffen (siehe Kapitel 3.2.5.2).

Die nach der Vorbehandlung erhaltene feste Faserfraktion und flüssige Mutterlauge wurden anschließend durch Filtration separiert. Aus der flüssigen Mutterlauge wurde das Lignin durch Ausfällung abgetrennt, so dass eine xylanreiche flüssige Fraktion, die sogenannte Aufschlusslösung, zur weiteren Verarbeitung bereit stand. Beide Stoffströme, Faser und Aufschlusslösung, wurden anschließend getrennt voneinander betrachtet.
Die feste Faserfraktion wurde mit Hilfe von Enzymen selektiv hydrolysiert, um die Zuckermonomere zu gewinnen (siehe Kapitel 4.2). Hierzu wurden zunächst geeignete Xylanasen ausgewählt, die in der Lage waren, selektiv Xylan, das noch in der Faserfraktion war, zu Xylose umzusetzen. Für die darauf folgende enzymatische Hydrolyse der Cellulose in der Faser wurden ebenfalls geeignete kommerzielle Cellulasepräparate miteinander verglichen. Hierbei stand der vollständige Umsatz von Cellulose zu Glukose bei hohen Feststoffkonzentrationen im Vordergrund. Zur Realisierung eines wirtschaftlichen Hydrolyseprozesses und zur Verringerung von Stofftransportlimitationen wurde anschließend ein Hochfeststoffhydrolyse-Verfahren (HFH) in einem skalierbaren Rührkesselreaktor entwickelt. Hierzu standen zwei unterschiedliche Rührergeometrien zur Verfügung, deren Leistungs- und Mischzeitcharakteristik im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurde, um ein geeignetes Rührorgan auszuwählen. Die enzymatische Hydrolyse wurde dann anschließend am Beispiel von NaOH-vorbehandelten Weizenstrohfasern untersucht, da diese in ausreichenden Mengen zur Verfügung standen.

Neben der festen Faserfraktion wurde ebenfalls ein Verfahren zur Aufreinigung der xylanreichen Aufschlusslösung entwickelt (siehe Kapitel 4.3). In diesem Fall sollten die löslichen Lignin- und Zuckerabbauprodukte aus der Aufschlusslösung selektiv entfernt werden. Hierzu wurden sowohl Laccase-katalysierte als auch adsorptive Verfahren

entwickelt, optimiert und mittels mathematischer Modellen beschrieben. Ein Vergleich der entwickelten Verfahren wurde anhand der Detoxifikation einer Organsosolv-Aufschluss-lösung durchgeführt. Hierbei wurde zur Testung der Fermentierbarkeit eine Modell-kultivierung mit *P stipitis* durchgeführt.

4.1 Vorbehandlung von lignocellulosehaltigen Rohstoffen

In diesem Kapitel soll die Entwicklung und Charakterisierung von geeigneten Vorbehandlungsverfahren von Weizenstroh, Miscanthus und Pappelholz dargestellt werden. Hierbei wurde zu Beginn ein systematischer Vergleich unterschiedlicher Vorbehandlungs-verfahren für die unterschiedlichen Rohstoffe durchgeführt. Anschließend wurden die ausgewählten Verfahren mittels statistischer Versuchsplanung optimiert. Die Vorbehandlungsverfahren wurden zusätzlich mit Hilfe einer charakteristischen Prozessgröße beschrieben, um eine Maßstabsvergrößerung von einem 1 L- zu einem 13 L-Autoklaven durchzuführen. Abschließend wurde eine Bilanzierung der Hauptstoffströme und eine Bewertung der Prozesse für die optimierten Verfahren erstellt.

4.1.1 Auswahl von geeigneten Vorbehandlungsverfahren

Für die Auswahl einer geeigneten Vorbehandlung von Weizenstroh, Miscanthus und Pappel wurden verschiedener Verfahren miteinander verglichen. Die Vorbehandlung sollte hierbei möglichst viel Lignin und Hemicellulose aus der Faser lösen, so dass eine cellulosereiche Restfaser entsteht, die von Cellulasen effizient hydrolysiert werden konnte. Als grundlegende Größe zum Vergleich der unterschiedlichen Vorbehandlungsverfahren mit teilweise unterschiedlichen Betriebsbedingungen wurde der sogenannte erweiterte Severity-Faktor log R''_0 verwendet. Mit log R''_0 wurden die Temperatur, die Verweilzeit und der pH-Wert zu einer Prozessgröße zusammengefasst (siehe Kapitel 3.2.5.2). Das Konzept log R''_0 eignet sich demnach für den Vergleich unterschiedlicher Verfahren mit unterschiedlichen pH-Werten, Temperaturen und Haltezeiten [101].

Ein geeignetes Vorbehandlungsverfahren war daher durch eine hohe Delignifizierung, eine hohe Xylansolubilisierung, eine geringe Cellulosesolubilisierung sowie eine hohe enzymatische Hydrolysierbarkeit für minimale log R''_0 Werte charakterisiert. Als Enzyme zur Hydrolyse der Faserfraktion wurden sowohl Xylanasen für die Hydrolyse der Xylanfraktion als auch Cellulasen für die Hydrolyse der Cellulosefraktion eingesetzt. Diese Enzyme wurden im Vorfeld aufgrund der erzielten Selektivitäten und Ausbeuten ausgewählt (siehe Kapitel 4.2).

4.1.1.1 Auswahl eines geeigneten Vorbehandlungsverfahrens für Weizenstroh

Zur Auswahl geeigneter Vorbehandlungsverfahren für Weizenstroh wurden unterschiedliche Vorbehandlungen in einem 13 L-Autoklaven und in einem Doppelkammerautoklaven (DuoRaff) am Fraunhofer ICT durchgeführt. Neben den Aufschlüssen am Fraunhofer ICT wurden auch EtOH-Organosolv- (EtOH-OS), Aceton Organosolv- (Aceton-OS) und NaOH-Aufschlüsse (NaOH) von Weizenstroh am Fraunhofer IGB in einem 1 L-Autoklaven durchgeführt (IGB 1, IGB 2, IGB 3). In Tabelle 18 sind die jeweiligen Verfahren mit den entsprechenden Betriebsbedingungen sowie die jeweiligen (erweiterten) Severity-Faktoren log R''_0 aufgelistet.

Tabelle 18: Übersicht über die Betriebsbedingungen der durchgeführten Versuche zur Vorbehandlung von Aceton-extrahiertem Weizenstroh. Hierbei ist log R''_0 = log R_0 + $|pH-7|$ und log R_0 = t*exp (T-100°C/14,75).

Vorbehandlung	Reaktortyp	T / °C	t / min	pH / -	Log R''_0
NaOH 2 % (w/w)	IGB3 1 L Batch	180	60	11	8,13
NaOH 2 % (w/w)	LZ18 13 L Batch	160	120	11	7,85
EtOH-OS 50 % (w/w)	LZ10 DuoRaff	220	120	4	8,61
EtOH-OS ex. 50 % (w/w)	LZ 16	220	120	4	8,61
EtOH-OS 50 % (w/w)	IGB1 1 L Batch	180	60	4	7,13
Aceton-OS 50 % (w/w)	IGB2 1 L Batch	180	60	4	7,13
Aquasolv	LZ20 DuoRaff	160	120	4	6,85

Im Folgenden sollen die Ergebnisse zur Delignifizierung, Xylansolubilisierung und enzymatischer Hydrolysierbarkeit einzeln vorgestellt und anhand des Severity-Faktors log R''_0 diskutiert werden.

Die Delignifizierung von Weizenstroh in Abhängigkeit des Severity-Faktors log R''_0 ist in Abbildung 22 aufgezeigt. Jeder einzelne Messpunkt entspricht dabei einem Vorbehandlungsversuch mit dem jeweilig zugehörigen log R''_0-Wert (siehe Tabelle 18). Die Ergebnisse zeigten, dass die beiden NaOH-alkalischen Aufschlüsse mit log R''_0 = 7,85 und log R''_0 = 8,13 die größte Delignifizierung von 82 % und 97 % zeigten. Alle anderen Verfahren zeigten eine Delignifizierung von < 75 %. Für die Delignifizierung von Weizenstroh war demnach die Vorbehandlung mit NaOH am besten.

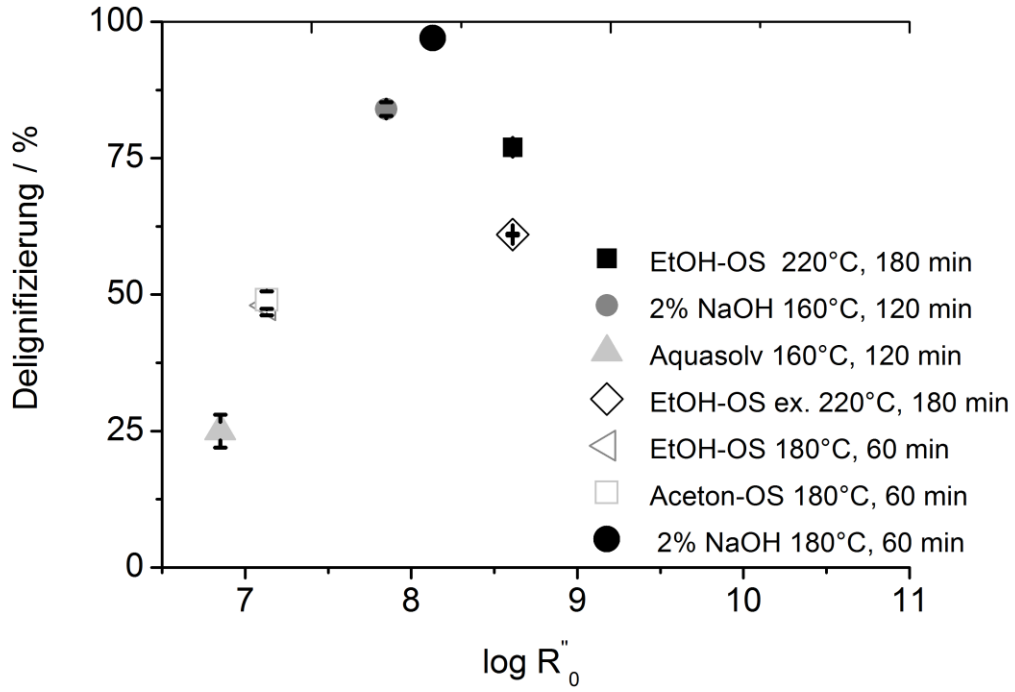


Abbildung 22: Delignifizierung von Weizenstroh in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 18).

Es ist bekannt, dass Weizensstrohlignin (WL) über einen hohen Anteil an p-Hydroxyphenyl (H)-Einheiten verfügt. Dies führt zu einer charakteristisch hohen Löslichkeit des WLs in alkalischen Lösemitteln [233, 234]. Darüber hinaus ist bekannt, dass der größte Anteil an Lignin-Phenolsäure-Polysaccharid-Verbindungsstellen durch etherverknüpfte Feroylsäure-gruppen realisiert wird. Diese Etherverbindungen sind instabil im alkalischen Milieu und führen ebenfalls zu einer hohen Löslichkeit des WLs in alkalischen Lösemitteln [235]. Sehr viele Verknüpfungsstellen, vor allem Esterverbindungen innerhalb des WL, können oftmals

bereits bei Raumtemperatur durch OH^- gespalten werden. Bei höheren Temperaturen werden dann auch zunehmend Etherbindungen gespalten [236, 237]. Für einen Aufschlussprozess hat dies zur Folge, dass bereits bei Temperaturen von 100 °C 70 % des WL mit NaOH-alkalischen Lösemitteln gelöst werden können. Bei Temperaturen um 160 - 180 °C gehen schließlich bis zu 90 % des WLs in Lösung [238], was auch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen konnten.

Bei den Organsosolv-Verfahren konnte nur bei sehr großen Severity-Faktoren von log R''_0 = 8,61 eine Delignifizierung von 78 % erreicht werden. Bereits mehrere Autoren konnten zeigen, dass bei Organosolv-Prozessen Temperaturen > 200 °C und Haltezeiten > 60 min benötigt werden, um Weizenstrohfasern optimal aufschließen zu können [15, 74, 79]. Die Spaltung des WL mit Ethanol war im Vergleich zu NaOH weniger effektiv, so dass der Organosolv-Prozess bei vergleichbaren Betriebsbedingungen weniger effektiv verläuft.

Neben einer hohen Delignifizierung sollte ein Vorbehandlungsverfahren auch eine hohe Xylansolubilisierung aufweisen. Die Ergebnisse der Xylansolubilisierung von Weizenstroh in Abhängigkeit des Severity-Faktors log R''_0 sind in Abbildung 23 aufgezeigt.

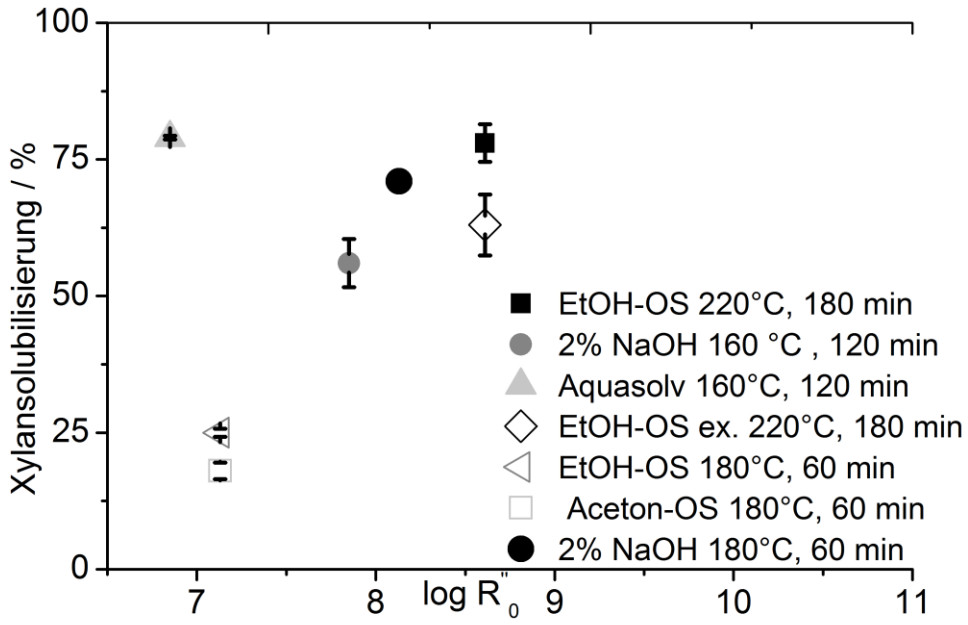


Abbildung 23: Xylansolubilisierung in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 18).

Es konnte festgestellt werden, dass der Aquasolv-Aufschluss mit dem geringsten log R''_0 von 6,85 die größte Xylansolubilisierung von 79 % aufwies. Das NaOH-alkalische Verfahren konnte bei einem moderaten Severity-Faktor von log R''_0 = 8,13 eine Xylansolubilisierung von 71 % (IGB3) erreichen. Bei den Organosolv-Verfahren zeigte sich erst bei log R''_0 = 8,61 eine Xylansolubilisierung von 78 %. Für die Entfernung des Xylans aus Weizenstroh war demnach das Aquasolv-Verfahren und der Aufschluss mit NaOH am besten geeignet.
Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass der Aquasolv-Prozess bei Weizenstroh zu einer hohen Xylansolubilisierung führt. Carvalhiero et al. konnten für Weizenstroh eine hohe Xylansolubilisierung von 64 % mit Hilfe eines Aquasolv-Verfahrens zwischen 200 - 220 °C und 20 -30 min realisieren [71]. Durch die Temperaturerhöhung wird die Dissoziation von Wasser erhöht, so dass der pKs-Wert von Wasser herabgesetzt wird. Die Steigerung der Protonenkonzentration führt schließlich dazu, dass die glykosidischen Bindungen des Xylans hydrolysiert werden und lösliche Oligo- und Monosaccharide entstehen [26]. Dieser Temperatureffekt kann durch Zugabe von Säuren als Katalyastor zusätzlich verstärkt werden [27]. In neutralen wässrigen und sauren Systemen können neben löslichen Oligosacchariden bereits Monomere mit einem Anteil von bis zu 50 % der Gesamtzucker isoliert werden [28].
Literaturdaten zur Xylansolubilisierung beim Aufschluss von Weizenstroh mit NaOH bei T > 140 °C sind bisher nicht vorhanden. So betrachtete Pedersen et al. den alkalischen Aufschluss von Weizenstroh bis maximal T = 140 °C und t = 10 min [100]. In diesem Bereich lag die Xylansolibilisierung bei 65 %. Es konnte gezeigt werden, dass Xylan neben der sauren Hydrolyse ebenfalls mit unterschiedlichen wässrigen Laugen gespalten und extrahiert wurde. In diesem Fall wurden vor allem Oligosaccharide mit Molekülmassen zwischen 20000 - 50000 g/mol extrahiert [29, 30]. Die Xylansolubilisierung im alkalischen Milieu war jedoch nicht so hoch wie bei pH-Werten < 4 [54]. Dies konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden. Mit steigender Temperatur erhöhte sich die Xylansolubilisierung im alkalischen Milieu.

Nachdem bei den untersuchten Verfahren keine vollständige Xylansolubilisierung erreicht werden konnte (siehe Abbildung 23), wurde ebenfalls die enzymatische Hydrolyse der Xylanfraktion in der vorbehandelten Faser mit Xylanasen untersucht. Dieser zusätzliche Verfahrensschritt würde in einem technischen Prozess eine höhere effektive Xylansolubilisierung der Faser und eine höhere Selektivität bedeuten. Die eingesetzten Xylanasen Accellerase XY und Cellic HTec waren hierbei in der Lage, die Xylanfraktion aus

der Faser selektiv zu Xylose umzusetzen (siehe Kapitel 4.2). In Abbildung 24 ist die Xyloseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse der Xylanfraktion dargestellt.

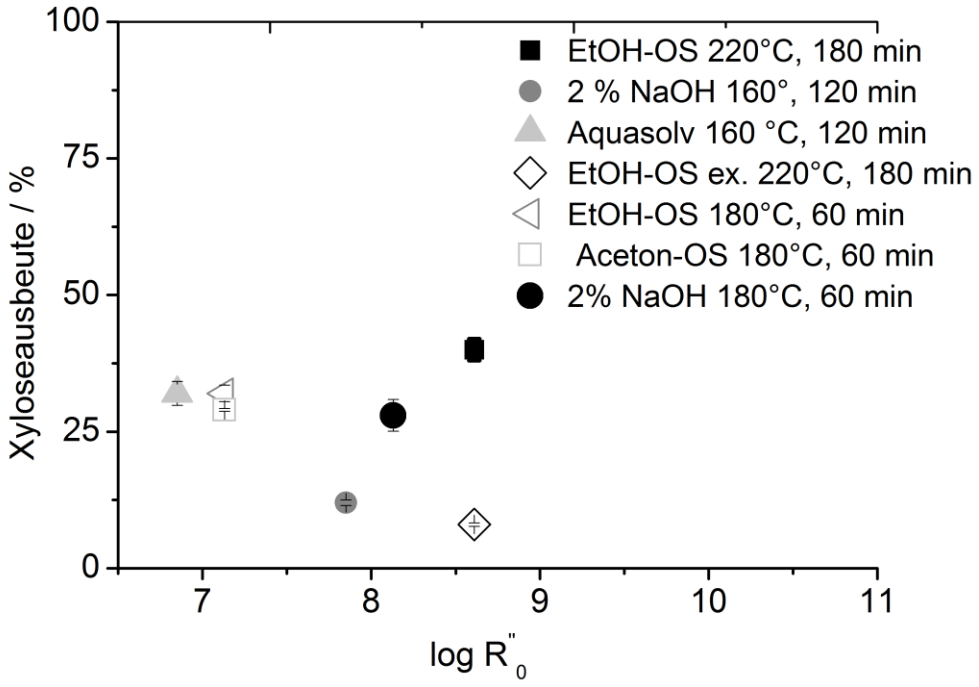


Abbildung 24: Xyloseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandelten Weizenstrohfasern mit Accellerase XY / Cellic HTec in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 18).

Die Daten zeigten, dass die Hydrolysierbarkeit sehr stark von der Vorbehandlungsmethode abhing. Das EtOH-Organosolv-Verfahren mit hohem Severity-Faktor log R''_0 (LZ10) zeigte mit 40 % die größte Xyloseausbeute. In diesem Fall konnte die Zugänglichkeit der Xylanfraktion für die Xylanasen durch Entfernung von Lignin und das Aufbrechen der Xylanfraktion erheblich verbessert werden.
Bei dem NaOH-Aufschluss wurde die Xyloseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse mit steigender Temperatur erhöht, in dem die Spaltung und die Solubilisierung von Xylan erhöht wurden. Dies konnte erstmals in dieser Arbeit gezeigt werden, nachdem bisherige Aufschlüsse mit NaOH bei T < 160 °C erfolgten [100, 239, 240].

Neben der Hydrolyse des Xylans in den vorbehandelten Weizenstrohfasern mit Xylanasen wurde ebenfalls die enzymatische Hydrolyse der Cellulosefraktion mit Cellulasen betrachtet. Hierzu wurden die Cellulasen Celuclast 1.5L und Novozym 188 eingesetzt. In Abbildung 25 ist die Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse dargestellt.

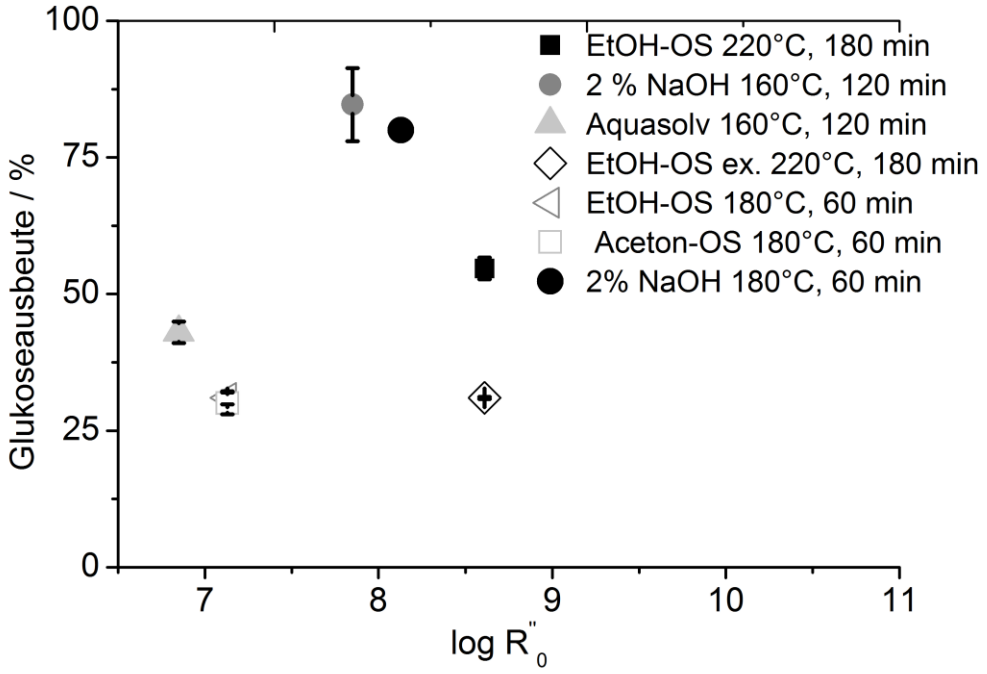


Abbildung 25: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandelten Weizenstrohfasern mit Celluclast 1.5 L / Novozym 188 in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 18).

Es konnte festgestellt werden, dass die NaOH-alkalischen Verfahren die größte Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse von 80 - 84 % aufwiesen. Im Vergleich zu Pedersen et al. [100], die einen alkalischen Aufschluss bei 140 °C und 10 min durchführten und eine Glukoseausbeute von 42 % erzielten, waren die Ausbeuten in dieser Arbeit wesentlich höher. Die höhere Temperatur während der Vorbehandlung von Weizenstroh mit NaOH hatte somit eine Verbesserung der enzymatischen Hydrolysierbarkeit zur Folge.

Mit Hilfe der Auftragung von der Glukoseausbeute in Abhängigkeit der Delignifizierung konnte festgestellt werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen bestand (siehe Abbildung 26). Ein solcher Zusammenhang konnte bei der Xyloseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse der Fasern mit Xylanasen nicht beobachtet werden.
Aus der Literatur ist bekannt, dass das Lignin in der Faser die Cellulasen wesentlich mehr hemmt als das Xylan. So werden die Cellulasen bei einem hohen Restligninanteil unspezifisch adsorbiert und stehen somit für die Cellulose-Hydrolyse nicht mehr zur Verfügung, während das Xylan lediglich eine sterische Hinderung der Cellulasen bewirkt [53]. Dieser Sachverhalt wurde in dieser Arbeit bei dem Aquasolv-Prozess am deutlichsten

beobachtet. Das Aquasolv-Verfahren konnte zwar einen großen Anteil der Xylanfraktion lösen, jedoch war die enzymatische Hydrolysierbarkeit aufgrund des hohen Restligninanteils in der Faser deutlich geringer im Vergleich zu den NaOH-alkalischen Aufschlüssen. Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Delignifizierung von Weizenstroh mindestens 80 % aufweisen musste, um eine optimale Hydrolysierbarkeit der Cellulosefraktion gewährleisten zu können. Dies konnte durch den Aufschluss mit NaOH bei Temperaturen um 160 °C realisiert werden, nachdem in diesem Fall eine Delignifizierung von > 80 % festgestellt wurden.

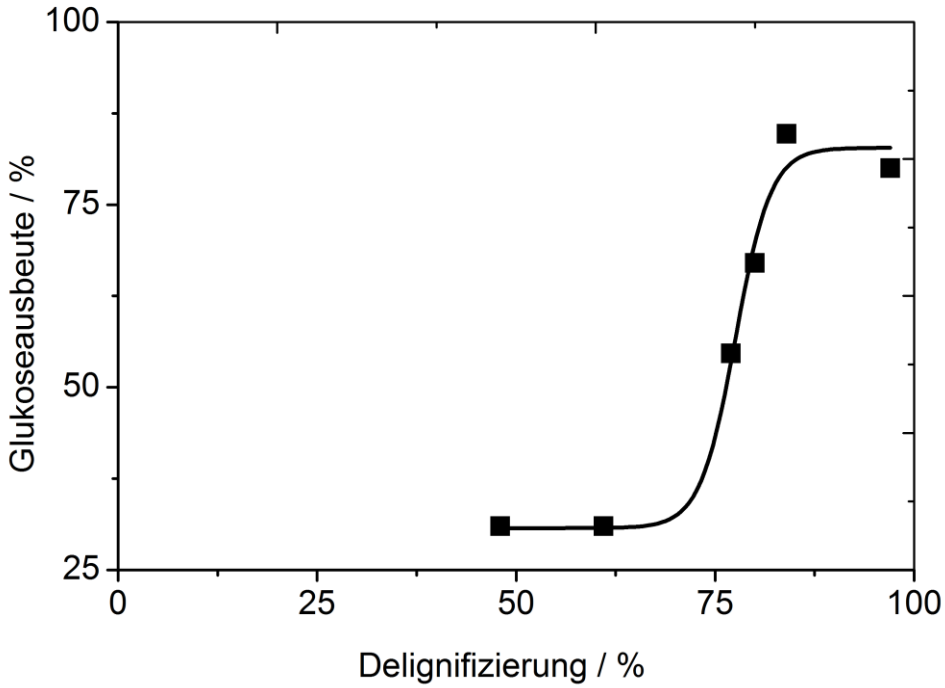


Abbildung 26: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandelten Weizenstrohfasern in Abhängigkeit der Delignifizierung der Faserfraktion. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 18).

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen schlussgefolgert werden, dass die Zielkriterien hohe Delignifizierung, hohe Xylansolubilisierung, niedrige Cellulosesolubilisierung und hohe Zuckerausbeute nach enzymatischer Hydrolyse der Faserfraktion bei niedrigem Severity-Faktor log R''_0 nur durch die NaOH-alkalischen Prozesse im Bereich von 180 °C realisiert werden konnten. Die Delignifizierung lag hierbei bei 97 % und die Xylansolubilisierung bei 71 %. Die Glukoseausbeuten und Xyloseausbeuten nach der enzymatischen Hydrolyse mittels Cellulasen und Xylanasen betrugen 80 % und 27 %. Dieses Verfahren wurde deshalb für Vorbehandlung von Weizenstroh ausgewählt.

Des Weiteren zeigte die vorliegende Arbeit den ersten Vergleich zwischen Organosolv-, Aquasolv- und alkalischen Prozessen zum Aufschluss von Weizenstroh auf Basis des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. In der Literatur wurden vergleichende Untersuchungen zur Vorbehandlung von Weizenstroh beispielsweise von Xu et al. (Organosolv-Prozesse mit organischen Säuren und Alkoholen) [80] und Pedersen et al. [82] (alkalisch und saure Prozesse) durchgeführt. In diesem Fall wurde jedoch keine einheitliche Prozessgröße definiert.

4.1.1.2 Auswahl eines geeigneten Vorbehandlungsverfahrens für Miscanthus

Zur Auswahl eines geeigneten Vorbehandlungsverfahrens für Miscanthus wurden unterschiedliche Methoden auf Basis des sogenannten erweiterten Severity-Faktors log R''_0. untersucht (siehe Tabelle 19). Der log R''_0 ermöglicht, wie in Kapitel 4.1.1.1 erläutert, einen Vergleich von alkalischen, saueren oder neutralen Verfahren anhand charakteristischer Prozessvariablen.

Tabelle 19: Übersicht über die Betriebsbedingungen der durchgeführten Vorbehandlungsversuche zur Vorbehandlung von Miscanthus. Hierbei ist log R''_0 = log R_0 + $|pH-7|$ und log R_0 = t*exp (T-100°C/14,75).

Vorbehandlung	Konzentration	T / °C	t / min	pH / -	Log R''_0
NaOH	2 % (w/w)	180	60	11	8,13
EtOH-OS	50 % (w/w)	180	60	5	6,13
H^+-EtOH-OS	0,2 % (w/w) 50 % (w/w)	180	60	4	7,13
OH^--EtOH-OS	0,5 % (w/w) 50 % (w/w)	180	60	9	6,13
$Ca(OH)_2$	0,2 % (w/w)	180	60	10	7,13
H_2O		180	60	5,5	5,63

In Abbildung 27 ist die Delignifizierung von Miscanthus in Abhängigkeit des Severity-Faktors log R''_0 aufgezeigt. Jeder einzelne Messpunkt entspricht dabei einem Vorbehandlungsversuch mit dem jeweilig zugehörigen log R''_0-Wert (siehe Tabelle 19).

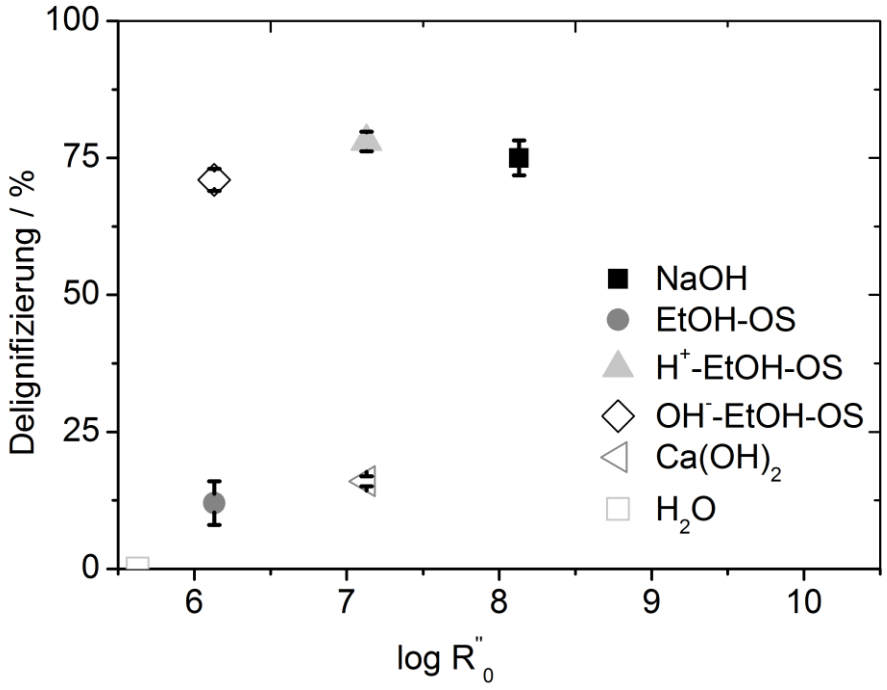


Abbildung 27: Delignifizierung von Miscanthus in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 19).

Die Experimente zeigten, dass eine hohe Delignifizierung > 70 % der Miscanthusfasern nur durch den NaOH-alkalischen Aufschluss und die säure- bzw. laugekatalysierten Organosolv-Aufschlüsse (H^+-EtOH-OS und OH^--EtOH-OS) realisiert werden konnte. Die höchste Delignifizierung von 78 % wies das H^+-EtOH-OS-Verfahren auf, das zugleich einen moderaten log R''_0 Wert von 7,13 hatte.

Der größte Anteil der intramolekularen Bindungen bei Miscanthuslignin bilden vorwiegend ß-O-4 Etherbindungen (46 %-93), die typischerweise durch OH^- gespalten werden können [90, 241]. Dies führt dazu, dass Miscanthus und auch andere Einjahrespflanzen durch alkalische Verfahren sehr gut delignifiziert werden können [86, 87].

Im Gegensatz hierzu ist aus Versuchen mit Modellsubstraten bekannt, dass die Spaltung von ß-Aryl-Etherbindungen durch Ethanol wesentlich langsamer abläuft als beispielsweise die Spaltung von α-Aryl-Etherbindungen [242], so dass nicht katalysierte EtOH-Organosolv-Prozesse höhere Severity-Faktoren benötigen, um die ß-Aryl-Ether-Bindungen des Miscanthuslignins aufbrechen zu können. So untersuchte beispielsweise Seranno den Aufschluss von Miscanthus mit einem NaOH-alkalischen Verfahren (7,5 % NaOH, 90 °C, 90 min, log R''_0 8 - 8,5) und einem EtOH-OS-Verfahren (60 % (v/v) EtOH, 190 °C, 90 min, log R''_0 8 - 8,5) und stellte fest, dass die Delignifizierung im Falle des NaOH mit 70 - 75 %

wesentlich größer war als beim unkatalysierten Organosolv-Verfahren (35 - 40 %) [88]. El Hage et al. erreichte auch nur eine geringe Delignifizierung (50 %) von Miscanthusfasern mit einem EtOH-Organosolv-Prozess (150 °C, 8 h, log R''_0 = 7,15) [91]. Die vorliegenden Experimente zeigten ebenfalls, dass für eine effektive Spaltung von Miscanthuslignin bei T < 200 °C und t ≤ 60 min mittels eines Organsolv-Verfahrens entweder saure oder alkalische Katalysatoren eingesetzt werden müssen. Die effektive Delignifizierung von Miscanthus mit einem H^+-EtOH-OS-Verfahren konnte ebenfalls von Brosse et al gezeigt werden [16].

Neben einer hohen Delignifizierung sollte ein Vorbehandlungsverfahren auch eine hohe Xylansolubilisierung aufweisen. Die Ergebnisse der Xylansolubilisierung von Miscanthus in Abhängigkeit des Severity-Faktors log R''_0 sind in Abbildung 28 aufgezeigt.

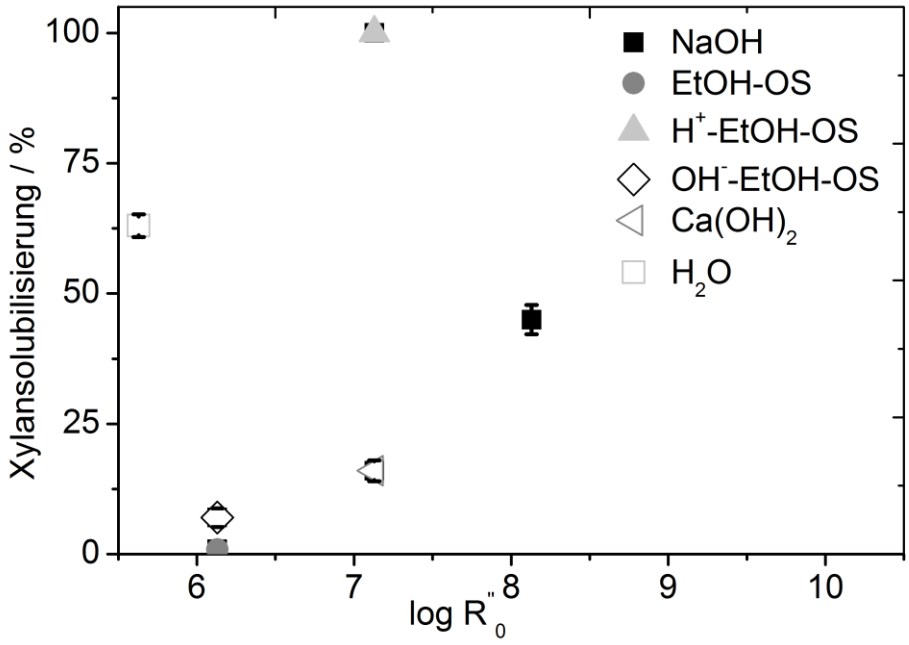


Abbildung 28: Xylansolubilisierung in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 19).

Bei der Xylansolubilisierung konnte festgestellt werden, dass der H^+ EtOH-OS-Prozess eine Abtrennung der Xylanfraktion von 99 % aufwies. Bereits in der Literatur konnte von Brosse et. al gezeigt werden, dass ein H^+-EtOH-OS-Verfahren zu einer hohen Xylansolubilisierung von 99 % führte, da die Spaltung der glykosidischen Bindungen von Xylan durch H^+-Ionen katalysiert wird [16]. Im Gegensatz zu Brosse et al., der 1,2 % H_2SO_4 einsetzte, wurde in dieser Arbeit eine geringere H_2SO_4-Konzentration von 0,2 % verwendet.

Der Aquasolv-Prozess konnte in dieser Arbeit im Gegensatz hierzu nur noch 63 % des Xylans aus der Matrix lösen, gefolgt vom NaOH-Aufschluss, der nur noch eine Xylansolubilisierung von 45 % aufwies. Ähnliche Ergebnisse zu der alkalischen Vorbehandlung konnten von de Vrjie et al. und Vintila et al. beobachtet werden [86, 87]. Ergebnisse zum Aufschluss von Miscnathus mit Aquasolv-Prozessen sind bisher nicht veröffentlicht worden, so dass in diesem Fall kein Vergleich durchgeführt wurden konnte.

Nachdem der H^+-EtOH-OS-Prozess eine Xylansolubilisierung um 99 % aufwies, war der Einsatz von Xylanasen zur enzymatischen Hydrolyse des in der Faser verbliebenen Xylans nicht grundsätzlich notwendig. Aus diesem Grund wurde für Miscanthus nur die enzymatische Hydrolisierbarkeit der Cellulose in der Faser mit den Cellulasen Celuclast 1.5L und Novozym 188 betrachtet (siehe Abbildung 29).

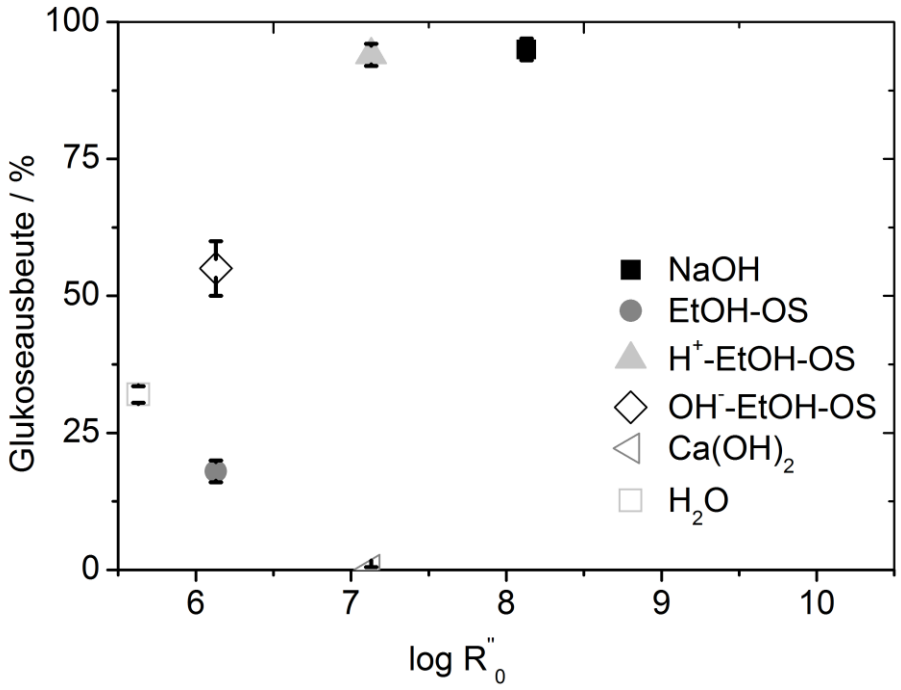


Abbildung 29: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandelten Miscanthusfasern in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. (siehe Tabelle 19).

Es konnte festgestellt werden, dass das H^+-EtOH-OS-Verfahren zu einer Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von Miscanthus von 95 % führte. Im Vergleich dazu erzielten Brosse et al. eine Glukoseausbeute von 80 % nachdem Miscanthus mit Hilfe eines H^+ EtOH-OS aufgeschlossen wurde [16]. Brosse et al. verwendeten aber wesentlich höhere

H_2SO_4- Konzentrationen von 1,2 %, so dass die Delignifizierung der Faser mit 45 % sehr gering war. Dies führte zu der verschlechterten Hydrolysierbarkeit der Faser.
Bei dem OH^- EtOH-OS-Aufschluss lag die Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse bei nur noch 55 %. Dieses Verfahren wurde für Miscanthus erstmals untersucht, so dass in diesem Fall keine Literaturdaten zum Vergleich vorliegen. Alle weiteren Verfahren führten zu Glukoseausbeuten < 35 % und sind daher nicht geeignet für den Aufschluss von Miscanthus.

Der Zusammenhang zwischen Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse und der Delignifizierung der Miscanthusfaser ist in Abbildung 30 dargestellt.

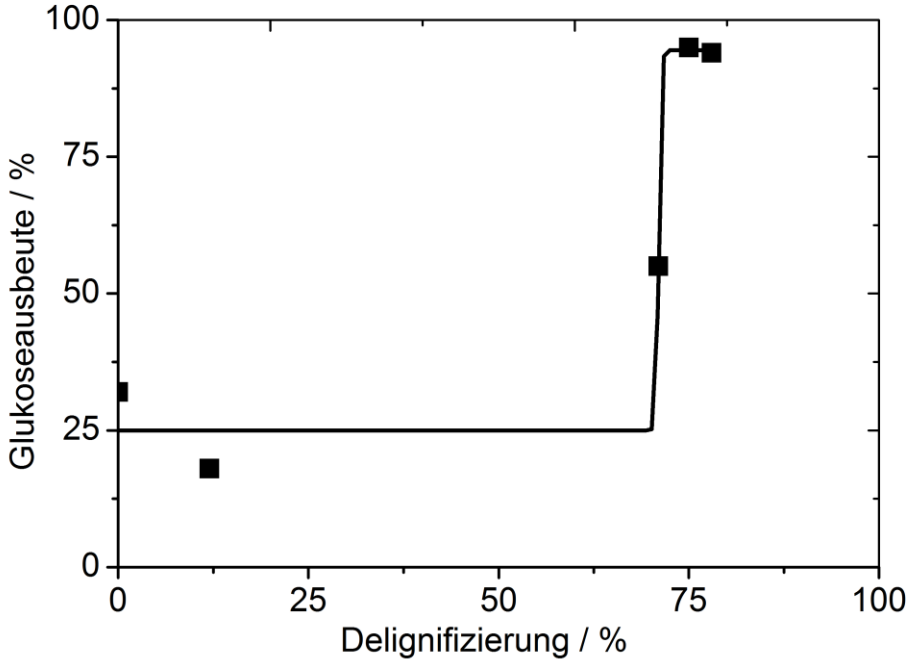


Abbildung 30: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandelten Miscanthusfasern in Abhängigkeit der Delignifizierung der Faserfraktion.

Es konnte festgestellt werden, dass erst ab einer Delignifizierung von 70 - 75 % eine signifikante Hydrolysierbarkeit der Faser auftrat. Die Ergebnisse zeigten, dass die Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von Miscanthus im Wesentlichen von der Delignifizierung abhängig war, da die Cellulasen unspezifisch auf dem Restlignin in der Faser adsorbierten und dann nicht mehr für die Cellulose-Hydrolyse zur Verfügung standen. Dies konnte auch von Yoshida et al. bestätigt werden [243]. Ein optimaler Aufschluss von

Miscanthus müsste demnach mindestens 75 % des Lignins aus der Fasermatrix entfernen, um eine optimale Hydrolysierbarkeit der Fasermatrix zu erhalten.

Fasst man die Ergebnisse von Delignifizierung, Xylansolubilisierung sowie Glukoseausbeute zusammen, so kann festgestellt werden, dass der H^+-EtOH-OS-Verfahren alle oben genannten Kriterien erfüllte und somit dieses Verfahren zum Aufschluss von Miscanthus ausgewählt wurde. Das H^+-EtOH-OS-Verfahren führte zu einer Delignifizierung von 78 % und einer Xylansolubilsierung von 99 %. Nachdem die Xylanfraktion vollständig aus der Faser entfernt wurde, musste keine zusätzliche Xylanasebehandlung der Faserfraktion erfolgen. Die Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse der Faserfraktion lag bei 95 %.
Darüber hinaus zeigte die vorliegende Arbeit den ersten Vergleich zwischen Organosolv-, Aquasolv- und alkalischen Prozessen zur Vorbehandlung von Miscanthus. In der Literatur wurden vergleichende Untersuchungen bisher noch nicht veröffentlicht.

4.1.1.3 Auswahl eines geeigneten Vorbehandlungsverfahrens für Pappelholz

In Tabelle 20 sind die Verfahren und deren Betriebsbedingungen aufgelistet, die zur Vorbehandlung von Pappelholz eingesetzt wurden. Die Tabelle zeigt weiterhin den Severity-Faktor log R_0 sowie den erweiterten Severity-Faktor log R''_0.

Tabelle 20: Übersicht über die Betriebsbedingungen der durchgeführten Vorbehandlungsversuche zur Vorbehandlung von Pappelholz. Hierbei ist log R''_0 = log R_0 + $|pH-7|$ und log R_0 = t*exp (T-100°C/14,75).

Vorbehandlung	Konzentration	T / °C	t / min	pH / -	Log R''_0
NaOH	2 % (w/w)	180	60	11	8,13
EtOH-OS	50 % (w/w)	180	60	5	6,13
H+-EtOH-OS	0,2 % (w/w) 50 % (w/w)	180	60	4	7,13
OH^--EtOH-OS	0,5 % (w/w) 50 % (w/w)	180	60	9	6,13
H_2O		180	60	5,5	5,63

In Abbildung 31 ist die Delignifizierung von Pappelholz in Abhängigkeit des Severity-Faktors log R''_0 aufgezeigt.

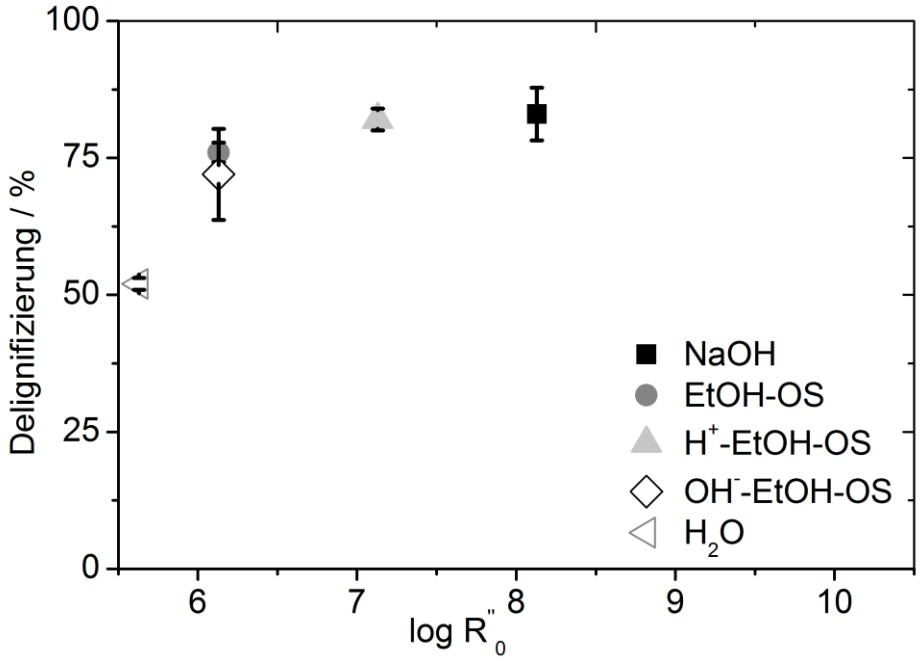


Abbildung 31: Delignifizierung von Pappelholz in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuche (siehe Tabelle 20).

Betrachtet man die Delignifizierung, so war festzustellen, dass NaOH-alkalische und der H^+-EtOH-OS-Aufschluss zu der höchsten Delignifizierung von 83 % und 82 % führten. Im Vergleich zum Aufschluss mit NaOH war jedoch der Severity-Faktor log R''_0 des H^+ EtOH-OS-Aufschlusses mit 7,13 deutlich kleiner. Im Gegensatz zu Miscanthus und Weizenstroh wies das unkatalysierte EtOH-OS-Verfahren bei niedrigen log R''_0 (T < 200 °C, ≤ 1) mit 72 % eine hohe Delignifizierung auf.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Laubholz (GS-Lignine), also auch Pappelholz, eine höhere Delignifizierung mit Organosolv-Prozessen aufweist als Nadelholz [244]. Im Allgemeinen zeigt Laubholz wie das Pappelholz einen höheren Anteil an α-Aryl-Etherbindungen, die wesentlich leichter gespalten werden können, als ß-Aryl-Etherbindungen [242]. Zudem ist der Ligninanteil in Laubhölzern wesentlich kleiner. Untersuchungen zeigten, dass in Laubholzligninen die ß-Aryl-Etherbindungen höhere Hydrolyseraten aufweisen und es zu weniger Kondensationsreaktionen, die einer Spaltung von Lignin entgegenwirken, kam. Durch Zugabe von sauren Katalysatoren kann die Spaltung der α-Etherbindungen innerhalb des Lignins weiter erhöht werden, so dass generell katalysierte Alkohol-Organosolv-Prozesse eine höhere Deligifizierung aufweisen [98, 198]. Teilweise werden im sauren Milieu bei hohen Severity-Faktoren auch ß-Aryl-Etherbindungen gespalten [244]. Die höhere

Delignifizierung bei H^+-katalysierten Organosolv-Prozessen konnte auch in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden. Das durchgeführte OH^--EtOH-OS-Verfahren zeigte ebenfalls eine hohe Delignifizierung. In diesem Fall werden vor allem α-Aryl-Etherbindungen mit freien Hydroxygruppen gespalten [244].

Wie im Falle von Weizenstroh und Miscanthus war die Delignifizierung von Pappelholz mit NaOH ebenfalls sehr effizient. Mit NaOH können sowohl Ester als auch Etherbindungen (Esterverbindungen bei Raumtemperatur, Etherbindungen bei T > 100 °C) innerhalb des Lignins und auch die Ester- sowie Etherbindungen zwischen Lignin-Phenolsäuren-Polysacchariden gespalten werden [237, 245]. Die erzielte Xylansolubilisierung aller betrachteten Verfahren ist in Abbildung 32 dargestellt.

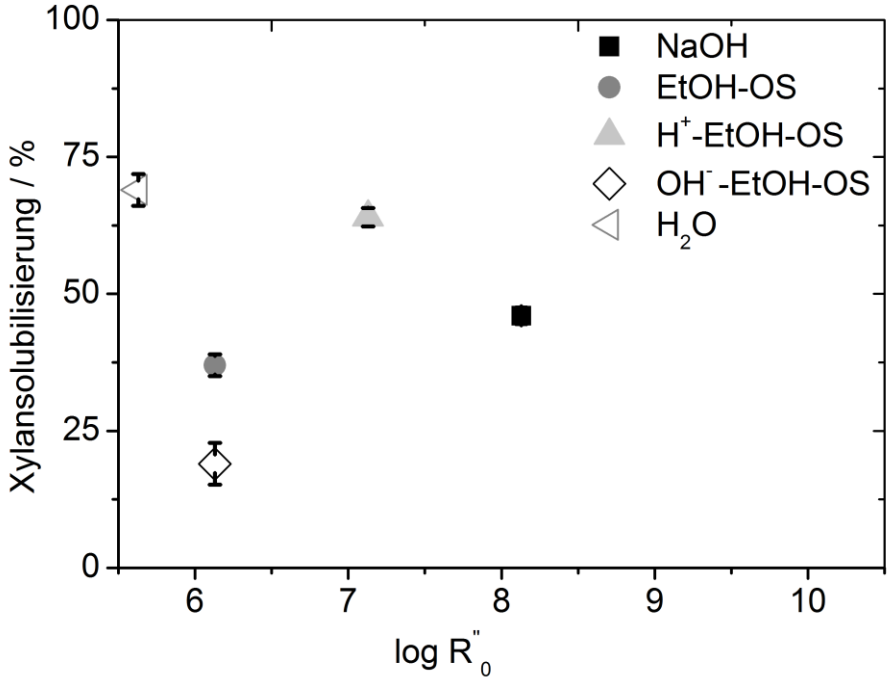


Abbildung 32: Xylansolubilisierung in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 20).

Es konnte beobachtet werden, dass der Aquasolv-Prozess mit 69 % und der H^+-EtOH-OS mit 64 % die größte Xylansolubilisierung zeigten. Aus der Literatur ist bekannt, dass es mit Aquasolv-Verfahren möglich ist, Xylan selektiv aus der Fasermatrix zu lösen. So erzielte Kim et al. eine Xylansolubilisierung von 62 % (200 °C, 10 min) [95], während Negro von einer vollständigen Xylansolubilisierung der Pappelfaser bei Temperaturen > 220 °C berichtete. Bei diesen Betriebsbereichen konnte jedoch zunehmend eine Bildung von Abbauprodukten

festgestellt werden, so dass die Xylanwiederfindung in der Aufschlusslösung < 40 % betrug [94].

Nachdem die durchgeführten Vorbehandlungsverfahren zu keiner vollständigen Xylansolubilisierung führten (siehe Abbildung 32), wurde ebenfalls die enzymatische Hydrolyse der Xylanfraktion mit Xylanasen (Accellerase XY und Cellic HTec) durchgeführt Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 gezeigt. Es konnte festgestellt werden, dass die Hydrolysierbarkeit der Xylanfraktion im Wesentlichen von der Vorbehandlungsmethode abhängig war. Der OH^--EtOH und der EtOH-Aufschluss zeigten mit 30 und 25 % die größten Xyloseausbeuten nach enzymatischer Hydrolyse der Faserfraktion mit Xylanasen. Alle anderen Verfahren führten zu Xyloseausbeuten ≤ 13 %.

Die Abtrennung von Xylan (Xylansolubilisierung) während der Vorbehandlung war somit wesentlich größer, als die Abtrennung des Xylans durch die enzymatische Hydrolyse mit Xylanasen. Eine zweistufige Abtrennung der Xylanfraktion mit Hilfe der Vorbehandlung und der enzymatischen Xylanhydrolyse war demnach nicht effektiv genug und wurde daher nicht weiter betrachtet.

Neben der Hydrolyse des Xylans in der Faser mit Xylanasen wurde auch die Hydrolyse der Cellulose in der Faser zu Glukose mit Hilfe der Cellulasen Celuclast 1.5L und Novozym 188 untersucht (siehe Abbildung 34). Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Verfahren mit NaOH oder H^+-EtOH/H_2O als Lösemittel zu den größten Glukoseausbeuten von 86 % bzw. 90 % führten. Pan et al. konnte ebenfalls hohe Glukoseausbeuten von 91 % mit Hilfe eines H^+ EtOH-OS-Verfahren erreichen [17]. Literaturdaten zur Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von NaOH-vorbehandeltem Pappelholz sind bisher nicht veröffentlicht worden, so dass kein Vergleich angestellt werden konnte.

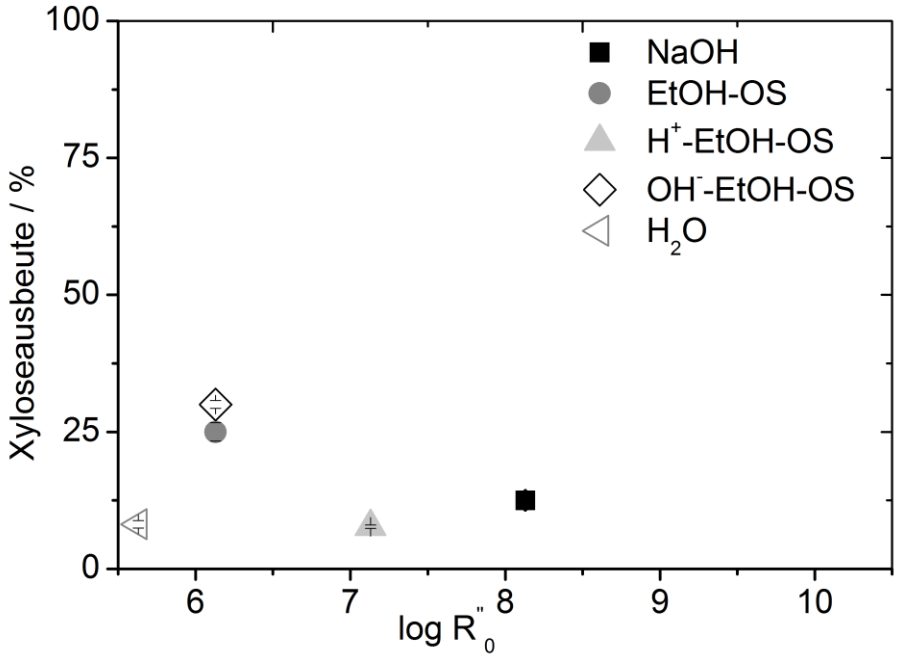


Abbildung 33: Xyloseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandeltem Pappelholz mit Accellerase XY / Cellic HTec in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 20).

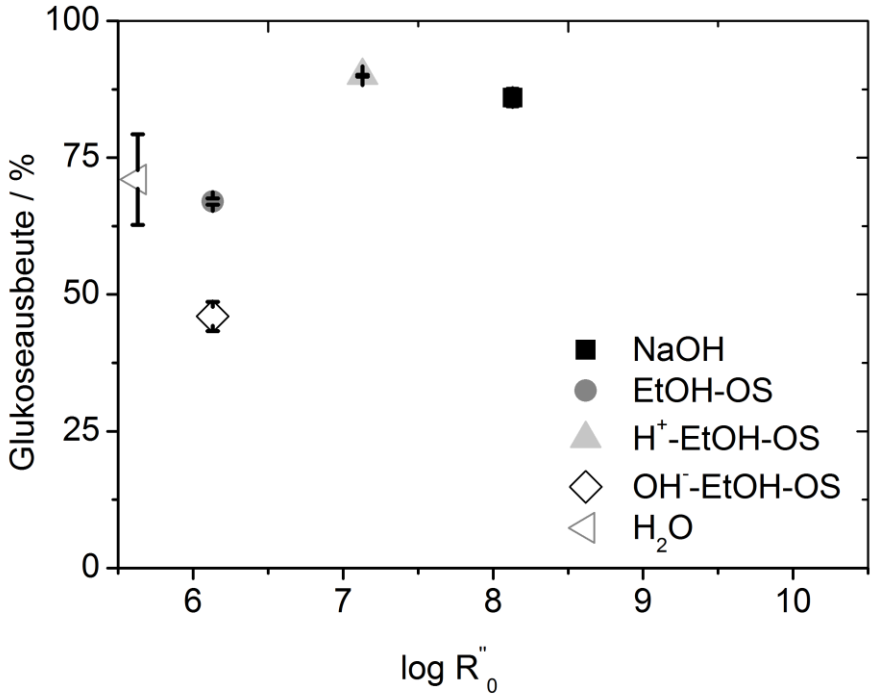


Abbildung 34: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandeltem Pappelholz mit Celluclast 1.5 L / Novozym 188 in Abhängigkeit des erweiterten Severity-Faktors log R''_0.

Aus der Auftragung der Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse und der jeweiligen Delignifizierung der Faserfraktion (siehe Abbildung 35) war zu erkennen, dass mit steigender Delignifizierung von 72 - 83 % die erzielbare Glukoseausbeute linear von 50 auf 90 % anstieg. Ein optimaler Aufschluss von Pappelholz müsste demnach mindestens 80 % des Lignins aus der Fasermatrix entfernen, um eine optimale Hydrolysierbarkeit der Fasermatrix zu erhalten. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen Xyloseausbeute und Delignifizierung konnte nicht festgestellt werden.

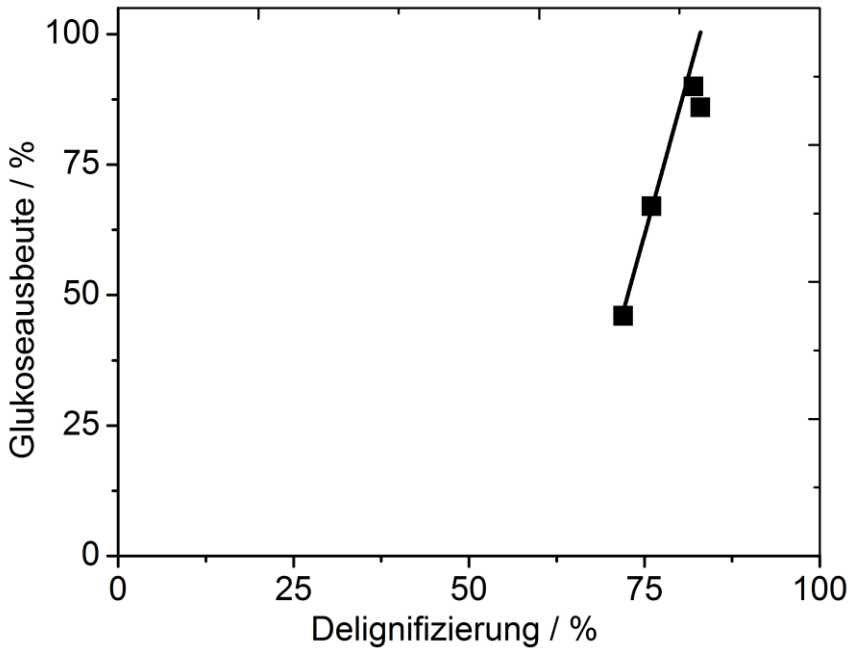


Abbildung 35: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandeltem Pappelholz in Abhängigkeit der Delignifizierung von Papppelholz. Jeder Versuchspunkt entspricht hierbei einem Vorbehandlungsversuch (siehe Tabelle 20).

Die NaOH- und H^+-EtOH-OS-Verfahren waren unter Betrachtung aller Auswahlkriterien die effektivsten Vorbehandlungsmethoden zum Aufschluss von Pappelholz. Aufgrund der Möglichkeit, in einem späteren Prozess Ethanol zu rezyklieren und des geringeren Severity-Faktors, wurde für die weitergehenden Experimente der H^+ EtOH-OS-Prozess ausgewählt. In diesem Fall lag die Delignifizierung bei 82 % und die Xylansolubilisierung betrug 64 %. Die Xylose- und Glukoseausbeute lagen bei 13 bzw. 90 %.

Die vorliegende Arbeit zeigte den ersten Vergleich zwischen Organosolv-, Aquasolv- und alkalischen Prozessen zur Vorbehandlung von Pappelholz auf Basis des erweiterten Severity-Faktors log R''_0. Ein erstmaliger systematischer Vergleich verschiedener Vorbehandlungs-

verfahren für Pappelholz wurde erst im Jahre 2010 für die Diluted Acid-, SO_2-Steam Explosion-, Aquasolv-, ARP-, AFEX- und $Ca(OH)_2$-Verfahren durchgeführt [96], ohne jedoch log R''_0 mit einzubeziehen.

4.1.1.4 Vergleich der Rohstoffe und zusammenfassende Bewertung

Durch die Einführung eines sogenannten erweiterten Severity-Faktors log R''_0, der den Einfluss von pH-Wert, Temperatur und Reaktionszeit zu einer charakteristischen Größe zusammenfasst, wurde in den vorherigen Kapiteln eine vergleichende Untersuchung verschiedener Rohstoffe und deren Vorbehandlungsmethoden aufgezeigt, die bislang in diesem Umfang noch nicht beschrieben wurden. Generell zeigte der Vergleich von unterschiedlichen Vorbehandlungsverfahren auf Basis des log R''_0 das die Aufschluss-effizienz der unterschiedlichen Verfahren auch vom Rohstoff abhängig war. Dies hatte zur Folge, dass die Auswahl eines geeigneten Vorbehandlungsverfahrens individuell auf den entsprechenden Rohstoff ausgelegt werden musste. Dies konnte auch von mehreren Autoren bestätigt werden [52, 54, 96].

Es zeigte sich, dass für die Vorbehandlung von Weizenstroh Organosolv-Verfahren weniger geeignet waren, als beispielsweise für die Vorbehandlung von Pappelholz. Lediglich Organosolv-Verfahren mit hohen Severity-Faktoren ($T > 200°C$, $t > 1$ h) konnten eine Fraktionierung der Weizenstrohfaser aufweisen. Weizenstroh wurde aufgrund der Ligninstruktur (hoher Anteil an H-Lignin, hoher Anteil an Esterbindungen und hoher Anteil an Feroyl-Ether-Bindungen [234-237]) sehr effektiv von NaOH delignifiziert. Dies führte zu einer hohen Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse. Das NaOH-Verfahren konnte zwar keine vollständige Xylansolubilisierung der Weizenstrohfasern bewirken, jedoch konnte mit einer zusätzlichen selektiven Xylanhydrolyse mittels Xylanasen weitere Xylose aus der Fasermatrix abgetrennt werden.

Im Falle von Miscanthus war es möglich, mit Hilfe eines H^+-katalysierten Organsolv-Prozesses bei $T < 200°C$ und $t < 1$ h die Faser effektiv zu delignifizieren. Der hohe Anteil an ß-0-4 Ethern innerhalb des Miscanthuslignins führt dazu, dass ein saurer Katalysator benötigt wurde, um diese Verbindungen spalten zu können. Das Organsolv-Verfahren ohne Katalysator konnte demnach die Faser nicht effektiv delignifizieren.

Im Gegensatz hierzu konnte Pappelholz bereits mit einem nicht katalysierten Organsolv-Verfahren aufgeschlossen werden, nachdem Laubholzlignine, wie beispielsweise Pappelholzlignin, eine höhere Reaktivität der ß-Aryl-Etherbindungen und einen höheren Anteil α-Aryl-Etherbindungen aufweisen. Darüber hinaus treten bei diesen Ligninen weniger

Kondensationsreaktionen auf, die eine weitere Spaltung von Lignin verhindern [244]. Durch die Zugabe eines sauren Katalysators konnte die Delignifizierung und die Xylan-solubilisierung noch weiter erhöht werden, so dass in diesem Fall der H^+-EtOH-OS-Prozess ebenfalls für die Vorbehandlung geeignet war.

4.1.2 Optimierung der ausgewählten physikalisch-chemischen Vorbehandlungs-methoden

Im folgenden Kapitel soll die Optimierung der Vorbehandlungsverfahren näher erläutert werden.

Zur Optimierung der Vorbehandlungsmethoden wurde im vorhergehenden Kapitel 4.1.1 für Weizenstroh die NaOH-alkalische Vorbehandlung und für Miscanthus und Pappelholz der säurekatalysierte Organosolv-Aufschluss (H^+-EtOH-OS) ausgewählt. Die weitere Optimierung der jeweiligen Aufschlüsse erfolgte anhand eines zentral zusammengesetzten Versuchsplans mit Hilfe der Software Design Expert (siehe Kapitel 3.2.5.1 und Kapitel 7.3). Hierbei konnten sowohl die Haupteinflussfaktoren als auch die mathematischen Zusammenhänge zwischen den Ziel- und Prozessgrößen aufgestellt werden. Darüber hinaus wurden die Bestimmtheitsmaße R^2 und $PredR^2$ (siehe Kapitel 7.3) für die Modellgleichungen ermittelt. Die mathematischen Zusammenhänge zwischen den Zielgrößen und den Einflussgrößen sowie die dazugehörigen Bestimmtheitsmaße sind im Anhang Kapitel 7.4.1 aufgelistet.

4.1.2.1 Optimierung des alkalischen Aufschlusses von Weizenstroh mit NaOH

Zur Optimierung des NaOH-alkalischen Aufschlusses von Weizenstroh wurde die NaOH-Konzentration (0,5 - 2,0 % (w/w)), die Reaktionstemperatur T (160 - 200 °C) und die Haltezeit t (30 - 90 min) variiert. Eine Übersicht über die durchgeführten Experimente ist im Anhang in Kapitel 7.4.1 aufgelistet.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der einzelnen Zielgrößen anhand der Response Surface Plots vorgestellt und diskutiert werden. Abschließend soll das optimierte Verfahren mit Vorbehandlungsverfahren aus der Literatur verglichen werden.

Die Delignifizierung in Abhängigkeit der Temperatur und der NaOH-Konzentration für eine Haltezeit von t = 30 min ist in Abbildung 36 dargestellt Es zeigte sich, dass die Delignifizierung im untersuchten Versuchsraum nur von der NaOH-Konzentration abhängig war. Mit steigender NaOH-Konzentration stieg die Delignifizierung ebenfalls an, weil die

Spaltung der Ester- und Etherbindungen innerhalb des Weizenstrohlignins erhöht wurde (siehe Kapitel 4.1.1.1). Dieser Einfluss konnte von Pedersen et al. für Temperaturen bis 140 °C ebenfalls beobachtet werden [100]. In dieser Arbeit wurde die maximale Delignifizierung von 98 % bei NaOH-Konzentrationen von 1,5 % (w/w) bei T = 160 °C und t = 30 min erreicht.

Mit steigender NaOH-Konzentration und steigender Temperatur stieg auch die Konzentration der phenolischen Komponenten (Abbauprodukte von Lignin) in der Aufschlusslösung an, weil vermehrt das Lignin gespalten wurde. So wurden beispielsweise nach 30 min 1,3 g/L phenolische Komponenten bei 0,5 % NaOH und 160 °C gemessen, während bei 2 % NaOH und 200 °C die Konzentration auf bis zu 4,8 g/L anstieg. Durch die umfassende Prozessanalytik konnte dies erstmals für T > 160 °C gezeigt werden.

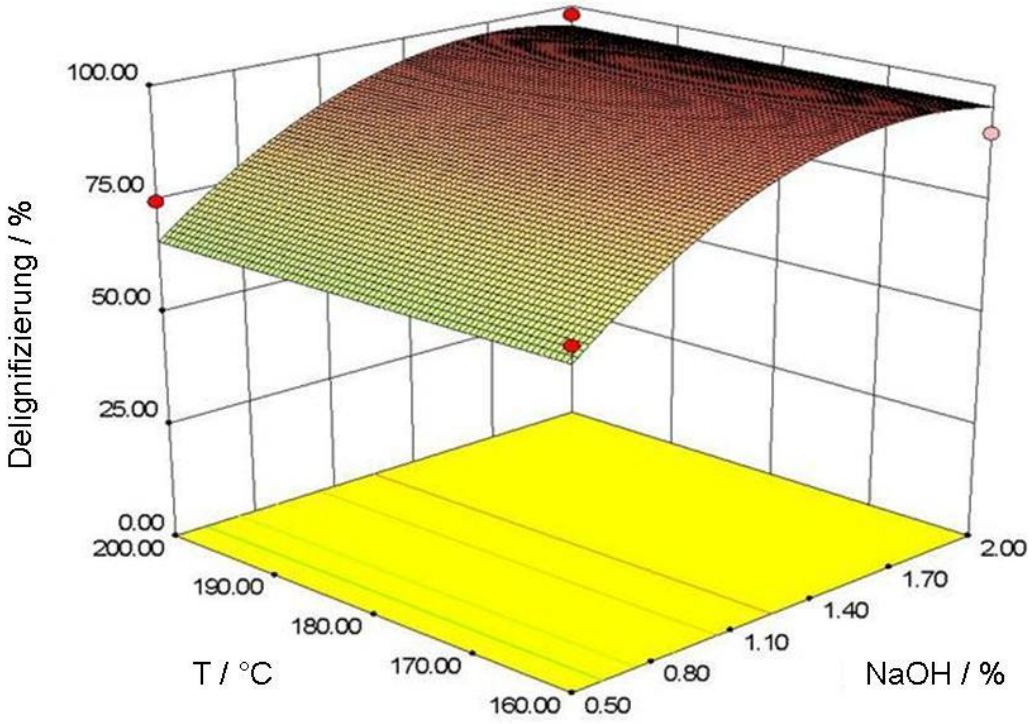


Abbildung 36: Delignifizierung von Weizenstroh in Abhängigkeit der Temperatur und der NaOH-Konzentration für eine Haltezeit von 30 min.

Der Einfluss von Temperatur und NaOH-Konzentration auf die Xylansolubilisierung ist in Abbildung 37 für t = 30 min dargestellt.

Die Xylansolubilisierung erhöhte sich proportional sowohl zur NaOH-Konzentration als auch zur Reaktionstemperatur, da hierbei die Spaltung der glykosidischen Bindungen vermehrt

stattfand. Dies konnte von Pedersen et al. für T < 140 °C ebenfalls beobachtet werden [100]. Im untersuchten Versuchsraum konnte die größte Xylansolubilisierung mit 75 % für T = 200 °C und 2 % NaOH erreicht werden. Demanch wurde für eine effektive Spaltung von Xylan neben einer gewissen Menge an OH^--Ionen eine gewisse Aktivierungsenergie benötigt. Die Haltezeit zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Xylansolubilisierung.

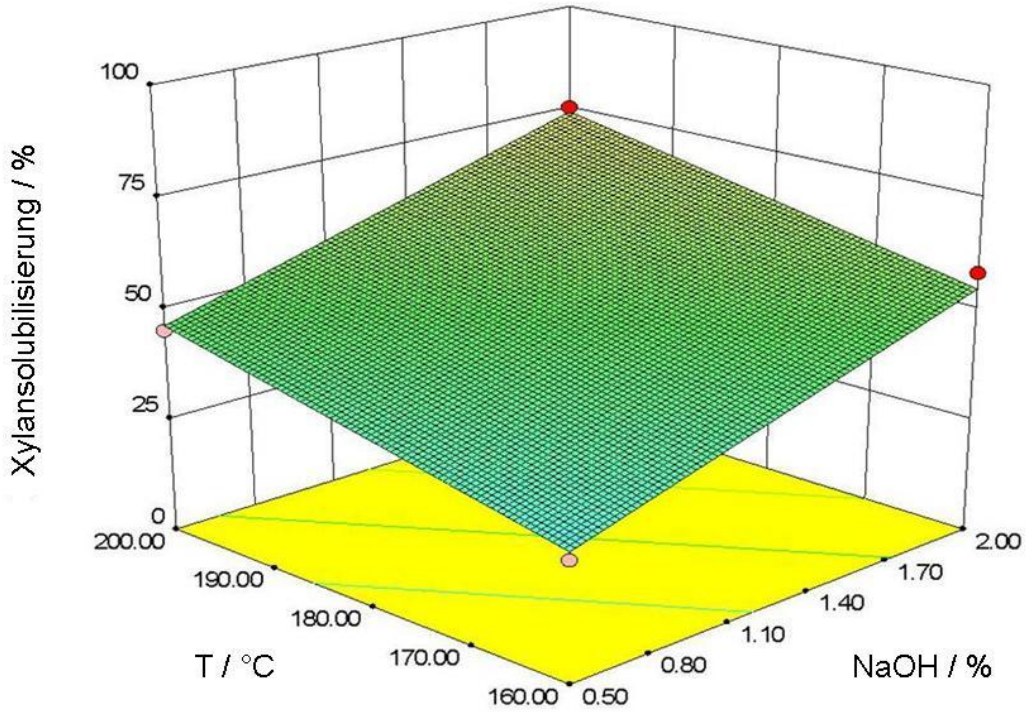


Abbildung 37: Xylansolubilisierung von Weizenstroh in Abhängigkeit der Temperatur und der NaOH-Konzentration für eine Haltezeit von 30 min.

In Abbildung 38 sind die Xylanausbeute in der Aufschlusslösung in Abhängigkeit der Temperatur und der NaOH-Konzentration für eine Haltezeit von t = 30 min aufgezeigt. Generell ist anzumerken, dass die freigesetzten löslichen Xylane in Form von Xylooligosacchariden vorlagen. Dies konnte von Wen et al. und Sun et al. ebenfalls bestätigt werden [29, 30].

Die Haltezeit zeigte, wie bei der Xylansolubilisierung bereits beschrieben, nur einen geringen Effekt auf die Xylanausbeute in der Lösung. Die Reaktionstemperatur und die NaOH-Konzentration zeigten hingegen einen wesentlich höheren Einfluss auf die Xylanausbeute. Mit steigender Xylansolubilisierung stieg prinzipiell die Xylanausbeute in der Aufschlusslösung an. Die Xylanausbeute wurde jedoch mit steigenden Temperaturen >180 °C

und steigenden NaOH-Konzentrationen > 1,4 % deutlich auf < 30 % reduziert. In diesem Bereich wurden vermehrt die freigesetzten Zucker zu Abbauprodukten, wie beispielsweise Formiat und Acetat, umgesetzt [246]. So wurde bei 0,5 % NaOH und 160 °C 1 g/L Formiat und 2 g/L Acetat in der Aufschlusslösung gemessen, während bei 2,0 % NaOH und 200 °C die Formiat- und Acetatkonzentration auf 3,5 g/L und 2,6 g/L anstieg.

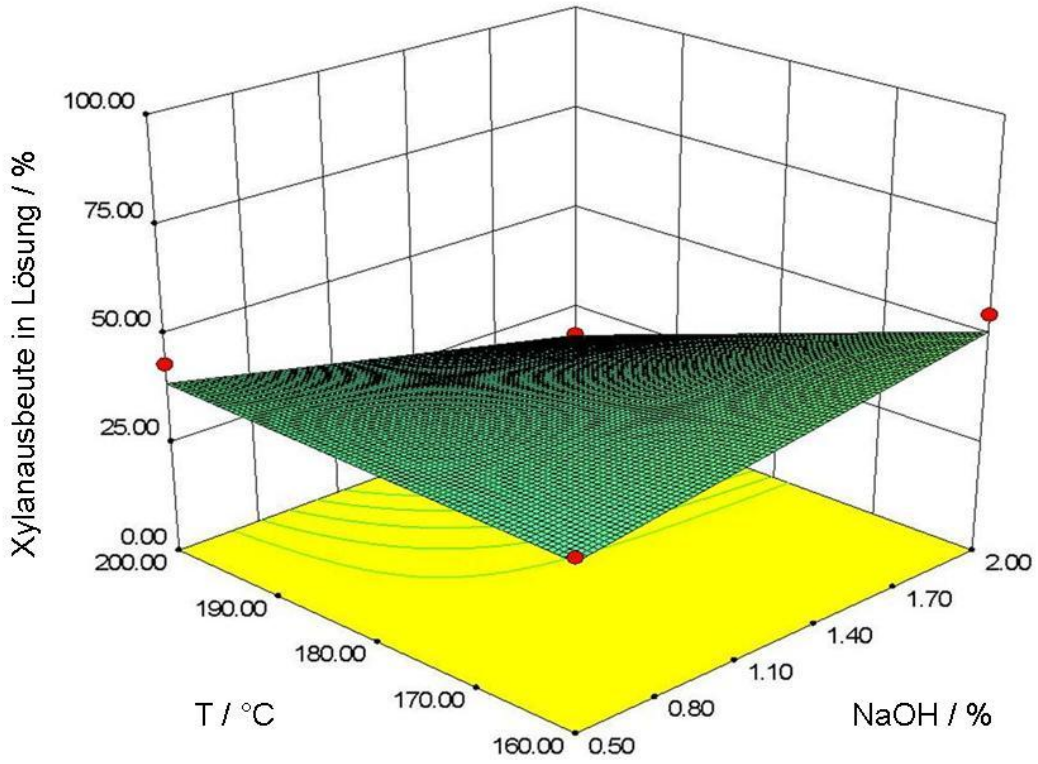


Abbildung 38 Xylanausbeute in der Weizenstroh-Aufschlusslösung in Abhängigkeit der Temperatur und der NaOH-Konzentration für eine Haltezeit von 30 min.

Neben der Xylanausbeute in der Aufschlusslösung, war in der vorligenden Arbeit auch die Selektivität von Xylose entscheidend. Die Selektivität S ergab sich aus dem Verhältnis von Gesamtmenge Xylose (Monomer und Oligomer) zu Gesamtmenge aller Zucker (Monomer und Oligomer) und sollte > 0,9 g/g_{Gesamt} betragen. In Abbildung 39 ist die Selektivität S von Xylose zu Gesamtzuckern in der Aufschlusslösung in Abhängigkeit der Temperatur und der NaOH-Konzentration für eine Haltezeit von t = 30 min gezeigt.

Die Selektivität war hauptsächlich von der Temperatur und der NaOH-Konzentration abhängig. Mit steigender NaOH-Konzentration und Temperatur fiel S von 0,95 g/g_{Gesamt} bei T = 160 °C und 0,5 % NaOH auf 0,85 g/g_{Gesamt} bei 200 °C und 2,0 % NaOH ab, weil vermehrt

Cellulose aus dem Faserverbund gelöst wurde. In der Literatur ist die Selektivität bisher noch nicht betrachtet worden [100, 239, 240]. Somit wurde in dieser Arbeit erstmalig der Einfluss von Temperatur, NaOH-Konzentration und Haltezeit auf die Selektivität während der alkalischen Vorbehandlung untersucht.

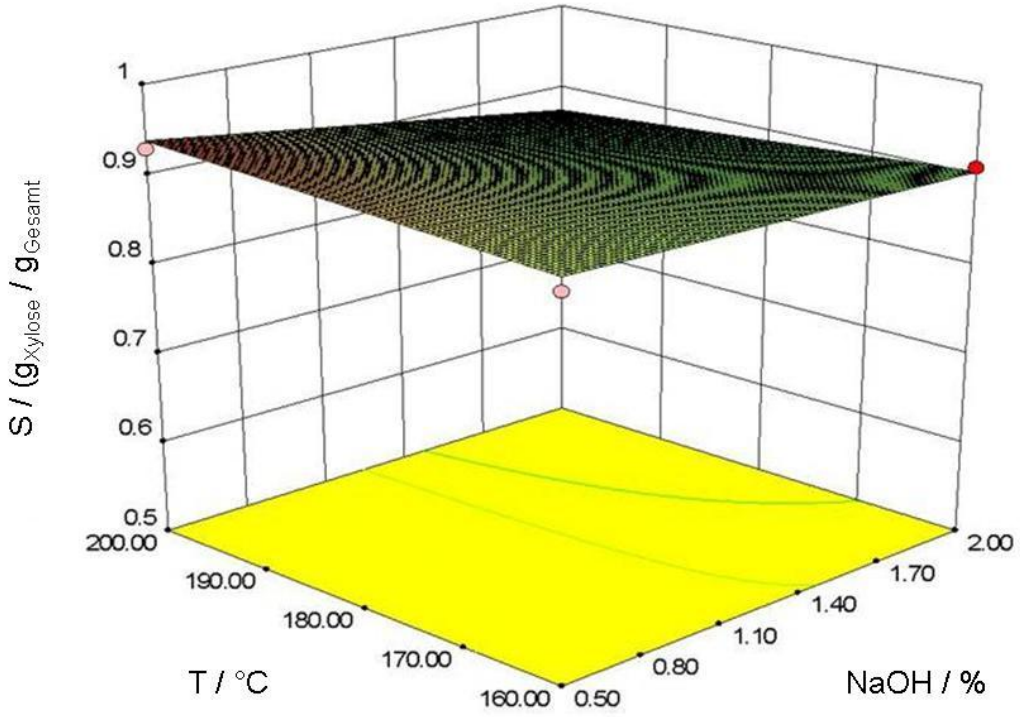


Abbildung 39 Selektivität S (Xylose zu Gesamtzucker) in der Weizenstroh-Aufschlusslösung in Abhängigkeit der Temperatur und der NaOH-Konzentration für eine Haltezeit von 30 min.

Nachdem die NaOH-alkalische Vorbehandlung keine vollständige Xylansolubilisierung aufwies, wurde mit Hilfe der Xylanasebehandlung die verbliebene Xylanfraktion in der Faser selektiv mit Xylanasen (Accellerase XY und Cellic HTec) zu Xylose umgesetzt. In Abbildung 40 sind die Xyloseausbeuten nach enzymatischer Hydrolyse mit Xylanasen in Abhängigkeit der NaOH-Konzentration und der Reaktionstemperatur für t = 30 min dargestellt.

Die Xyloseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse der Faserfraktion war im Wesentlichen von der Reaktionstemperatur und der NaOH-Konzentration abhängig, während die Haltezeit keinen signifikanten Einfluss hatte. Mit steigender NaOH-Konzentration nahm die Xyloseausbeute linear von 40 auf 25 % ab. Somit waren Xylansolubilisierung und Xylan-ausbeute nach enzymatischer Hydrolyse gegenläufig. Mit steigender Xylansolubilisierung wurde der Anteil an Xylan, der eine hohe Zugänglichkeit aufwies, reduziert, so dass während

der Xylanasebehandlung der Anteil an Xylan, der schwer zugänglich war, erhöht wurde. Dies führte zu geringeren Xyloseausbeuten nach der enzymatischen Hydrolyse.

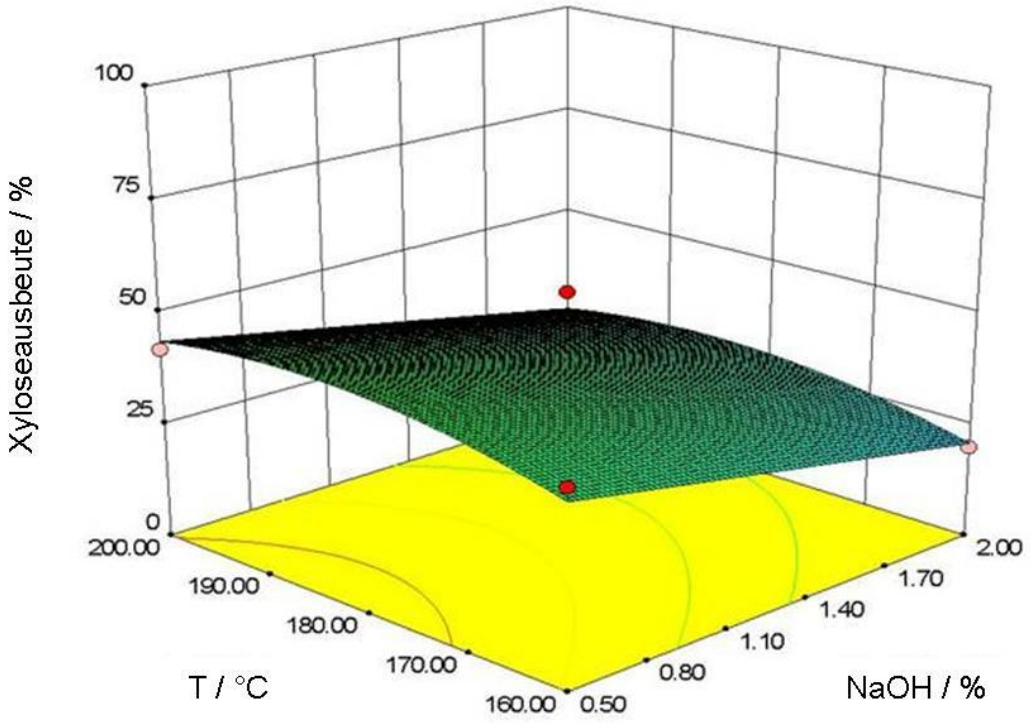


Abbildung 40: Xyloseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandeltem Weizentroh mit Xylanasen in Abhängigkeit der Temperatur und der NaOH-Konzentration für eine Haltezeit von 30 min.

Neben der Hydrolyse der Xylanfraktion in der Faser mit Xylanasen wurde auch die Hydrolyse der Cellulosefraktion in der Faser mit Cellulasen betrachtet. Hierbei sollte der Einfluss von Temperatur, NaOH-Konzentration und Haltezeit auf die Hydrolysierbarkeit der Cellulose analysiert werden. Der Einfluss von Temperatur und NaOH-Konzentration auf die Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse der Faser mit Cellulasen ist in Abbildung 41 gezeigt.

Die Ergebnisse zeigten, dass lediglich die NaOH-Konzentration einen Einfluss auf die Hydrolysierbarkeit der Faserfraktion hatte. Die Glukoseausbeute wurde mit steigender NaOH-Konzentration von 0,5 auf 2,0 % von 80 auf 86 % erhöht. Demnach wurde mit steigender Delignifizierung und Xylansolubilisierung auch die Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse erhöht. Dies konnte für T < 140 °C von Pedersen et al. ebenfalls bestätigt werden [100].

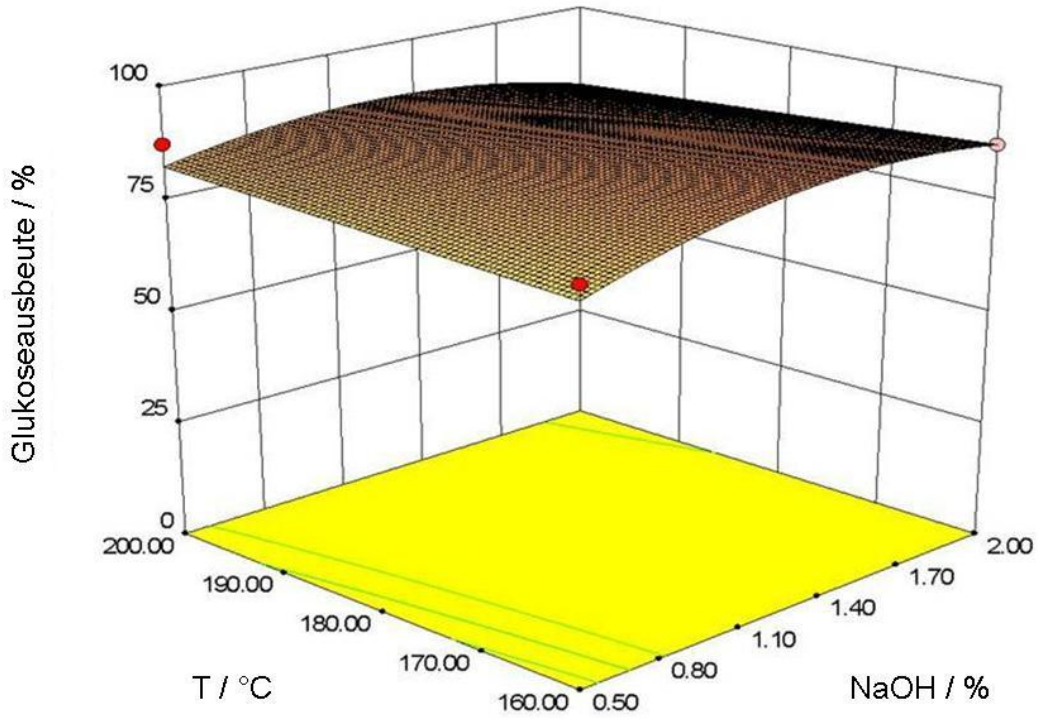


Abbildung 41: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandeltem Weizentroh mit Cellulasen in Abhängigkeit der Temperatur und der NaOH-Konzentration für eine Haltezeit von 30 min.

Aus den Ergebnissen ging hervor (siehe Abbildung 36 bis Abbildung 41), dass nicht alle Zielgrößen, wie beispielsweise die Delignifizierung, die Xylanausbeute in der Lösung oder die Xyloseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse die gleichen optimalen Betriebsbereiche, aufwiesen. Somit musste für das Vorbehandlungsverfahren eine Optimierung anhand aller Zielgrößen erfolgen. Mit Hilfe der Software Design Expert war es möglich, für die Auswahlkriterien minimale Temperatur, minimale Haltezeit und minimale NaOH-Konzentration die optimalen Betriebsbedingungen von 1,45 % NaOH, 180 °C und 30 min zu identifizieren.

Zur Bestätigung der Vorhersagemodelle wurden zwei Aufschlüsse bei den optimierten Betriebsbedingungen durchgeführt. In Tabelle 21 ist der Vergleich von den vorhergesagten Modellwerten und experimentellen Daten für die optimalen Betriebsbedingungen von 1,45 % NaOH, 180 °C und 30 min aufgezeigt. Darüber hinaus ist ein Vergleich mit den besten Verfahren aus der Literatur aufgeführt, um das entwickelte Verfahren bewerten zu können. Es ist dabei anzumerken, dass bei beiden Verfahren, die in der Literatur beschrieben wurden,

keine Hydrolyse mit Xylanasen erfolgte, so dass in diesem Fall keine vergleichende Aussagen getroffen werden konnten.

Es konnte festgestellt werden, dass die vorhergesagten Messwerte größtenteils im Konfidenzintervall der Modelle lagen. Lediglich für die Xylanausbeute und die Glukoseausbeute lagen die Messwerte um 16,6 und 13,6 % höher als vorhergesagt. Die statistische Versuchsplanung konnte daher zur Optimierung der Betriebsbedingungen und zur Vorhersage der optimierten Zielgrößen eingesetzt werden.

Der Vergleich mit den Verfahren aus der Literatur zeigte, dass das in dieser Arbeit vorgestellte alkalische Verfahren mit 86 % eine bessere Delignifizierung von Weizenstroh aufzeigen konnte. Das entwickelte Verfahren zeigte zudem mit S = 0,93 g/g_{Gesamt} eine höhere Xyloseselektivität in der Aufschlusslösung. Lediglich die gesamte Xylanausbeute, die sich nach der Vorbehandlung der enzymatischen Hydrolyse mit Xylanasen ergab, war mit 60 % etwas geringer als bei dem NaOH-Aufschluss von Pedersen et al mit 65 % [100]. Jedoch war die erzielte Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse der Faserfraktion mit 100 % wesentlich höher als bei Pedersen et al., die 30 % erzielten. Huijgen et al. konnten ebenfalls mit 90 % eine hohe Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse erhalten, jedoch zeigte dieses Aceton-Organosolv-Verfahren aus der Literatur mit 0,76 g/g_{Gesamt} insgesamt eine geringe Selektivität von Xylose zu Gesamtzucker in der Aufschlusslösung, als das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Verfahren [15].

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines Verfahrens zur selektiven Fraktionierung von Weizenstroh in die Produktströme Cellulose, Xylan und Lignin. Die zu erzielenden Selektivitäten der Zuckerströme sollten hierbei > 0,9 $g/g_{Gesamtzucker}$ mit Ausbeuten von Glukose $\geq$ 70 % und Xylose $\geq$ 60 % betragen. Diese Zielvorgaben konnten mit dem entwickelten alkalischen Verfahren realisiert werden. Dies bedeutete im Vergleich zur Literatur eine bessere Fraktionierung von Weizenstroh. Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Arbeit mathematische Modelle für alle prozessrelevanten Zielgrößen, wie beispielsweise die Xylansolubilisierung, die Xyloseselektivität und Xylanausbeute in der Aufschlusslösung, ermittelt.

Tabelle 21: Vergleich der vorhergesagten Modellwerte und experimentellen Daten für den Aufschluss von Weizenstroh mit 1,45 % NaOH bei 180 °C und 30 min. STABW entspricht der Standardabweichung für n = 2. Die relative Abweichung ergab sich aus der Abweichung von Modell und Experiment bezogen auf den experimentellen Wert.

Zielgröße	Eigene Arbeit Modell (CI 95%) Experiment (± STABW) (rel. Abweich. / %)	Pedersen et al. NaOH-Aufschluss[2] [100]	Huijgen et al. Aceton Organosolv-Aufschluss[3] [15]
Delignifizierung / %	90 (86 - 64) 86 (± 2,0) (4,4)	75	70
Xylansolubilisierung / %	54 (52 - 56) 53 (± 4,6) (1,8)	k.A.	k. A.
Xylanausbeute Aufschlusslösung / %	36 (32 - 40) 42 (± 1,0) (16,6)	65	60
Selektivität S / g_{Xyl}/ g_{Gesamt}	0,90 (0,88 - 0,92) 0,93 (± 0,01) (3,3)	0,50	0,76
Xyloseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse / %	34 (31 - 37) 34 (± 1,1) (0,0)	k.A.	k.A
Gesamte Xylanausbeute[1] / %	60	65	60
Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse / %	88 (82 - 92) 100 (± 6,0) 13,6	30	90

[1] Gesamte Xylanausbeute der flüssigen Xylosefraktion nach Vorbehandlung und enzymatischer Hydrolyse.

[2] NaOH-Aufschluss: pH 13, 140 °C, 10 min.

[3] Aceton Organosolv-Aufschluss: 50 % Aceton, 205°C, 60 min.

4.1.2.2 Optimierung des säurekatalysierten EtOH-Organosolv-Aufschlusses von Miscanthus

Wie in Kapitel 4.1.1.2 beschrieben, wurde ein säurekatalysierter EtOH-Organosolv-Aufschluss (H^+-EtOH-OS) zur Vorbehandlung von Miscanthus ausgewählt. Zur Optimierung dieses Vorbehandlungsverfahrens wurden die H_2SO_4-Konzentration (0,05 - 0,2 % (w/w)), die Reaktionstemperatur (160 - 200 °C) und die Haltezeit t (20 - 60 min) variiert. Eine Übersicht über die durchgeführten Experimente und die Messdaten sind im Anhang in Kapitel 7.4.2 aufgelistet. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der einzelnen Zielgrößen anhand der Response Surface Plots vorgestellt und diskutiert werden. Abschließend soll das optimierte Verfahren mit Vorbehandlungsverfahren aus der Literatur verglichen werden.

Die Delignifizierung der Miscanthusfaser erhöhte sich linear mit steigender Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration, nachdem es vermehrt zur Spaltung des Miscanthuslignins kam (siehe Kapitel 4.1.1.2). So konnte die Delignifizierung bei 200 °C mit einer H_2SO_4-Konzentration von 0,2 % auf 78 % gesteigert werden. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 42 dargestellt. Die Haltezeit hingegen hatte keinen Einfluss auf die Delignifizierung der Miscanthusfaser.

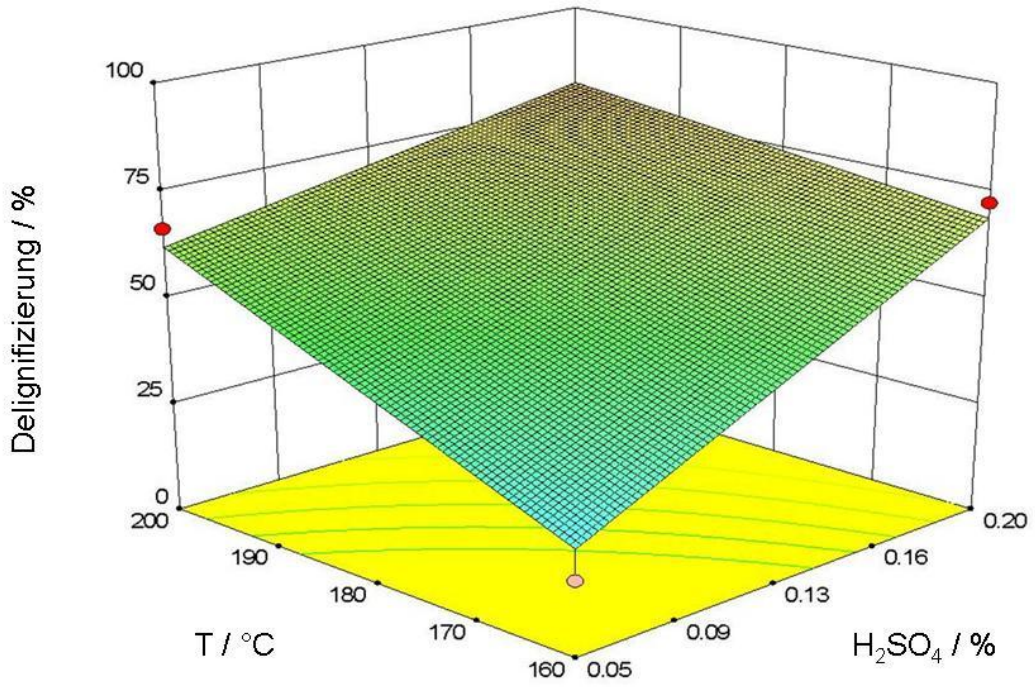


Abbildung 42: Delignifizierung von Miscanthus in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 60 min.

Brosse et al. konnten durch Variation von T und der H_2SO_4-Konzentration bereits ähnliche Zusammenhänge beobachten. In diesem Fall wurden maximal 45 % des Lignins aus der Faser entfernt. Eine Beschreibung der Delignifizierung mit mathematischen Modellen wurde in diesem Fall nicht betrachtet [16].

Bei der Analyse der Xylansolubilisierung konnte festgestellt werden, dass diese von der Temperatur, der Haltezeit und der H_2SO_4-Konzentration abhängig war. Somit erhöhte sich die Spaltung der glykosidischen Bindungen innerhalb des Xylans mit allen drei Einflussfaktoren.
Die Xylansolubilisierung erhöhte sich proportional zur Temperatur und H_2SO_4-Konzentration, bis schließlich bei 200 °C und 0,2 % H_2SO_4 das Xylan vollständig aus der Faser entfernt wurde. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 43 für t = 60 min gezeigt. Mit steigender Haltezeit wurde ebenfalls die Xylansolubilisierung erhöht.
Einen ähnlichen Einfluss zwischen T, t und H_2SO_4-Konzentration konnten Brosse et al. beobachten [16]. Hierbei lag die maximale Xylansolubilisierung ebenfalls bei 99 %. Dies konnte in diesem Fall jedoch nur durch eine zusätzliche Vorimprägnierung mit 2 M H_2SO_4 für 17 h am Siedepunkt der Lösung realisiert werden [16].

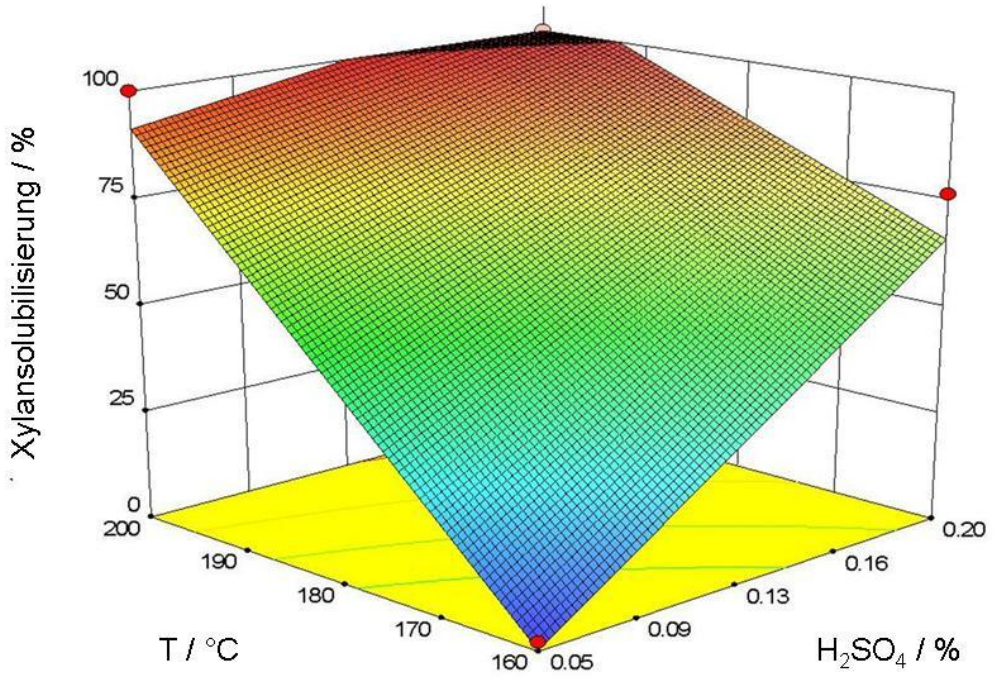


Abbildung 43: Xylansolubilisierung von Micanthus in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 60 min.

In Abbildung 44 ist die Xylanausbeute in der Aufschlusslösung in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für t = 60 min aufgetragen. Die Beobachtungen zur Xylanausbeute waren übereinstimmend mit denen von Brosse et al. [16]. So war die Xylanausbeute im Wesentlichen von der Reaktionstemperatur und der H_2SO_4-Konzentration abhängig. Bei niedrigen Temperaturen und H_2SO_4-Konzentrationen war die Xyloseausbeute < 10 %, weil die Xylansolubilisierung sehr gering war. Bei einer hohen Temperatur und H_2SO_4-Konzentration wurden vermehrt Abbauprodukte gebildet, dies hatte eine Reduktion der Xylanausbeute zur Folge. So wurden beispielsweise in dieser Arbeit bei 200 °C, 60 min und 2,0 % H_2SO_4 1,3 g/L Essigsäure, 3,0 g/L Ameisensäure, 0,2 g/L Lävulinsäure, 1,5 g/L HMF und 3,5 g/L Furfural gemessen, während für 160 °C, 60 min und 0,5 % H_2SO_4 nur 0,6 g/L Essigsäure in der Aufschlusslösung detektiert werden konnten.

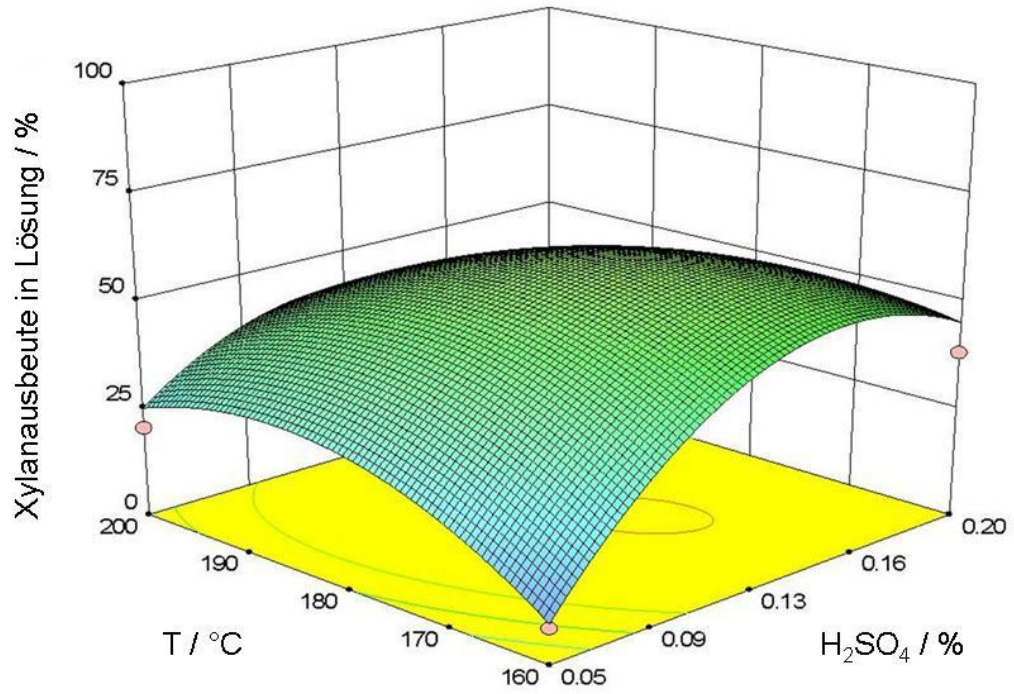


Abbildung 44: Xylanausbeute in der Miscanthus-Aufschlusslösung in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 60 min.

Die Selektivität von Xylose zu den Gesamtzuckern in der Aufschlusslösung war unabhängig von der Haltezeit. Im Bereich von 160 - 190 °C und 0,05 - 0,14 % H_2SO_4 bei t = 60 min war $S \geq 0{,}9\ g/g_{Gesamt}$. Bei höherer Temperatur und höherer H_2SO_4-Konzentration ging die Selektivität zurück (siehe Abbildung 45). In diesen Betriebsbereichen konnte eine erhöhte

Glukansolubilisierung und eine erhöhte Glukosekonzentration in der Aufschlusslösung ermittelt werden, so dass die Selektivität von Xylose vermindert wurde. Dies konnte von Brosse et al. bestätigt werden [16].

Das Verhältnis von Xylose zu den Xylooligosacchariden erhöhte sich mit steigender H_2SO_4-Konzentration, weil die Hydrolyse der glykosidischen Bindungen durch die H^+-Ionen katalysiert wurde. So war der Anteil an Xylose innerhalb des gelösten Xylans <1 % bei 0,05 % H_2SO_4, während bei 0,2 % H_2SO_4 90 % des Xylans aus Xylose bestand.

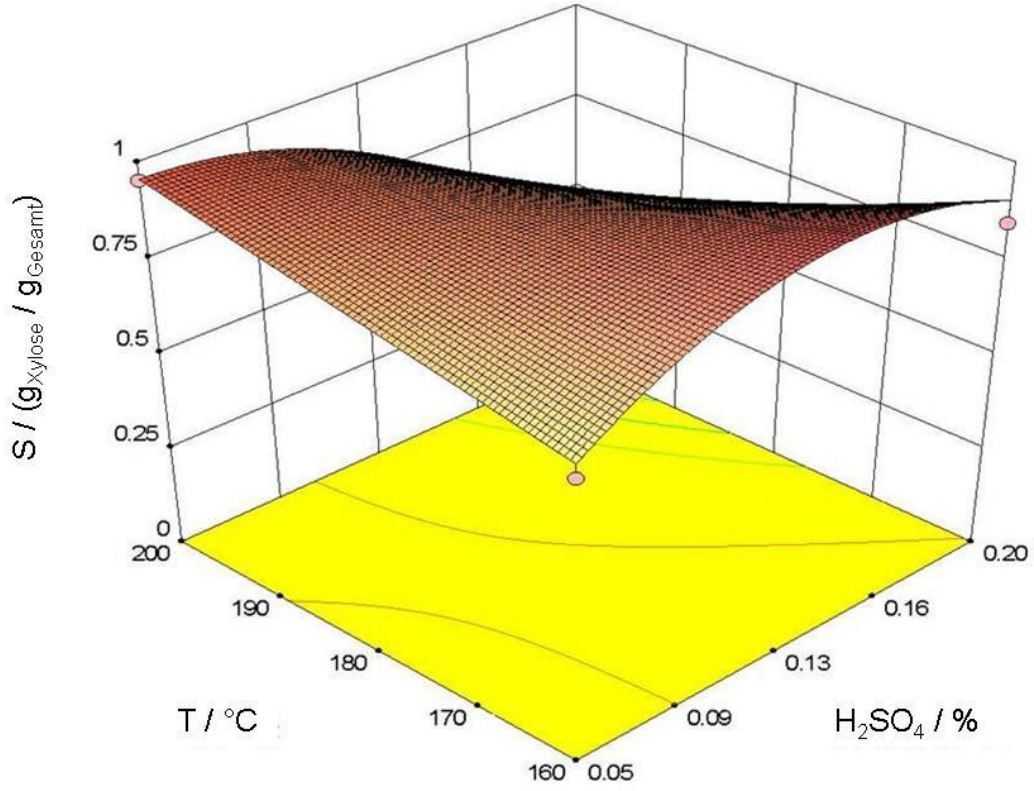


Abbildung 45: Selektivität von Xylose in der Miscanthus-Aufschlusslösung in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 60 min.

Nach der Vorbehandlung von Miscanthus bei den unterschiedlichen Betriebsbedingungen wurde die Cellulosefraktion mit Hilfe von Cellulasen hydrolysiert. Der Haupteinflussfaktor auf die Glukoseausbeute war die Temperatur und die H_2SO_4-Konzentration (siehe Abbildung 46). Durch Steigerung der H_2SO_4-Konzentration von 0,05 auf 0,2 % bei 180 °C und t = 60 min konnte die Glukoseausbeute von 25 auf 80 % gesteigert werden, nachdem der Ligninanteil in diesem Bereich erheblich reduziert wurde. Dies konnten auch Brosse et al. bestätigen [16].

Mit Hilfe der Software Design Expert war es möglich, für die Auswahlkriterien minimale Temperatur, minimale Haltezeit und minimale H_2SO_4-Konzentration die optimale Betriebsbedingungen für Miscanthus von 0,16 % H_2SO_4, 185 °C und 60 min mit 50 % (w/w) EtOH zu identifizieren.

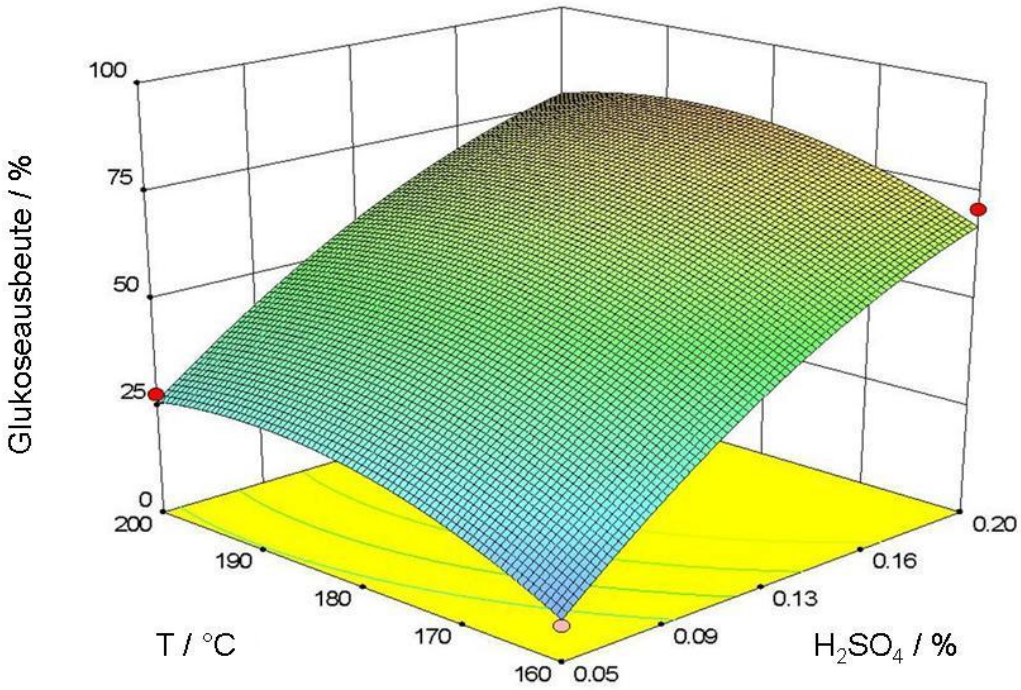


Abbildung 46: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandeltem Miscanthus mit Cellulasen in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 60 min.

In Tabelle 22 ist der Vergleich der vorhergesagten Zielgrößen mit den gemessenen Zielgrößen während des H^+-EtOH-Organosolv-Aufschlusses von Miscanthus dargestellt. Des Weiteren ist ein Vergleich mit den besten Verfahren aus der Literatur aufgeführt, um das entwickelte Verfahren bewerten zu können. Für den Aufschluss von Miscanthus lagen bis auf die Delignifizierung alle Messwerte innerhalb des Konfidenzintervalls CI 95 %. Mit 88 % wurde in diesen Fall eine um 18,2 % erhöhte Delignifizierung gemessen. Alle weiteren Zielgrößen zeigten relative Abweichungen von < 12,9 %, so dass die optimalen Betriebsbedingungen mit einer ausreichenden Genauigkeit vorhergesagt werden konnten.

Tabelle 22: Vergleich der vorhergesagten Modellwerte und experimentellen Daten des H^+ EtOH-Organosolv-Aufschlusses von Miscanthus bei 50 % EtOH, 0,16 % H_2SO_4, 185 °C und 60 min. STABW entspricht der Standardabweichung für n=2. Die relative Abweichung ergab sich aus der Abweichung von Modell und Experiment bezogen auf den experimentellen Wert.

Zielgröße	Eigene Arbeit Modell (CI 95%) Experiment (± STABW) (rel. Abweich. / %)	Brosse et al. H^+-Ethanol-Organosolv-Aufschluss[1] [16]	de Vrije et al. NaOH-Extrusion[2] [86]	Murnen et al. AFEX[3] [59]
Delignifizierung / %	72 (65 -78) 88 (± 3,3) (18,2)	45	77	0
Xylansolubilisierung / %	88 (76 -100) 100 (± 0,0) (12)	99	44	k.A
Xylanausbeute Aufschlusslösung / %	55 (48 - 62) 60 (± 2,0) (8,3)	60	k.A	0
Selektivität S / g_{Xyl}/ g_{Gesamt}	0,90 (0,84 - 0,96) 0,95 (± 0,01) (5,2)	0,69	k.A	k. A.
Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse / %	74 (60 - 88) 85 (± 3,8) 12,9	80	58	96

[1] H^+-EtOH-Organosolv-Aufschluss: 180 °C, 60 min und 1,2 % H_2SO_4,Vorimprägnierung in 2 M H_2SO_4 für 17 h

[2] NaOH Extrusion: 12 % NaOH, 100 °C, 15 kg/h.

[3] AFEX Ammonia Fibre Explosion: 2:1 Ammoniak zu Miscanthus, 160°C, 5 min.

Im Vergleich zu den optimierten Verfahren aus der Literatur führte der in dieser Arbeit untersuchte H^+-EtOH-Organosolv-Aufschluss von Miscanthus zu einer besseren Fraktionierung der Lignin-, Xylan- und Celluosefraktion. Die Delignigfizierung betrug bei optimalen Betriebsbedingungen 88 % und war demnach wesentlich höher als bei den anderen Verfahren. Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren führte zu einer vollständigen

Entfernung von Xylan aus der Faser. Die Xylanausbeute in der Aufschlusslösung betrug hierbei 60 %. Eine vergleichbare Aubeute konnte nur von Brosse et al. erreicht werden [16]. Brosse et al. verwendete hierbei ebenfalls ein H^+-EtOH-OS-Verfahren, jedoch mit einer zusätzlichen Vorimprägnierung mit 2 M H_2SO_4 für 17 h am Siedepunkt der Lösung. Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren benötigte keine Vorimprägnierung und die Schwefelsäuremenge während des Organosolv-Aufschlusses konnte ebenfalls um 87 % reduziert werden. Die höhere Schwefelsäuremenge führte bei Brosse et al. zudem zu einer schlechteren Selektivität S = 0,69 g_{Xylose}/g_{Gesamt} [16]. Der untersuchte H^+-EtOH-Organosolv-Aufschluss führte zu einer sehr guten enzymatischen Hydrolysierbarkeit der Faserfraktion zu Glukose mit Hilfe von Cellulasen. Ähnlich hohe Glukoseausbeuten nach der enzymatischen Hydrolyse konnten nur durch den optimierten AFEX-Prozess von Murnen et al. erreicht werden [59]. Jedoch verblieben beim AFEX-Prozess die Ligninfrakion und die Xylanfraktion in der Faser. Die anschließende enzymatische Hydrolyse mit einer Mischung aus Cellulasen und Xylanasen lieferte somit ein Hydrolysat, das sowohl aus C5- als auch aus C6-Zuckern bestand. Die Restfaser, die nach der Hydrolyse vorhanden war, zeigte neben Lignin einen hohen Anteil an Kohlenhydraten. Eine Isolierung von reinem Lignin blieb somit im Vergleich zur vorliegenden Arbeit aus.

Schlussfolgernd lässt sich Folgendes festhalten: Die zu erzielenden Selektivitäten der Zuckerströme von S ≥ 0,9 g/g_{Gesamt}, die zu erzielende Glukoseausbeute von ≥ 70 % sowie die Xyloseausbeute von ≥ 60 % konnten mit dem entwickelten H^+-EtOH-Organosolv-Aufschluss erreicht werden. Dies bedeutete im Vergleich zur Literatur eine verbesserte Fraktionierung von Miscanthus. Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals mathematische Modelle für alle prozessrelevanten Zielgrößen, wie z.B die Xylansolubilisierung, die Xyloseselektivität und Xylanausbeute in der Aufschlusslösung, ermittelt.

4.1.2.3 Optimierung des säurekatalysierten EtOH-Organosolv-Aufschlusses von Pappelholz

Zur Optimierung des säurekatalysierten EtOH-Organosolv-Aufschluss (H+-EtOH-OS), welcher in Kapitel 4.1.1.3 als geeignete Vorbehandlungsmethode für Pappelholz ausgewählt wurde, wurden die Einflussparameter H_2SO_4-Konzentration (0,05 - 0,2 % (w/w)), Reaktionstemperatur (160 - 200 °C) und Haltezeit t (20 - 60 min) variiert. Eine Übersicht über die durchgeführten Experimente und die Messdaten sind im Anhang in Kapitel 7.4.3 aufgelistet.

Die Delignifizierung war im Wesentlichen abhängig von der H_2SO_4-Konzentration und der Reaktionstemperatur. Dies konnte von Pan et al bestätigt werden [17, 99]. Mit steigender Temperatur und steigender H_2SO_4-Konzentration konnte eine Erhöhung der Delignifizierung erreicht werden, nachdem die Ether- und Esterbindungen innerhalb des Lignins vermehrt gespalten wurden (siehe Kapitel 4.1.1.3). Bei Betriebsbedingungen von T > 180 °C und 0,13 % H_2SO_4 konnte eine maximale Delignifizierung von 80 % erreicht werden. Dies ist in Abbildung 47 für t = 48 min gezeigt. Mit steigender Delignifizierung wurde ebenfalls die Konzentration an phenolischen Komponenten in der Aufschlusslösung erhöht, so dass bei 200 °C und 0,2 % H_2SO_4 maximale Konzentrationen von 36 mM (5,4 g/L) für t = 90 min gemessen wurden.

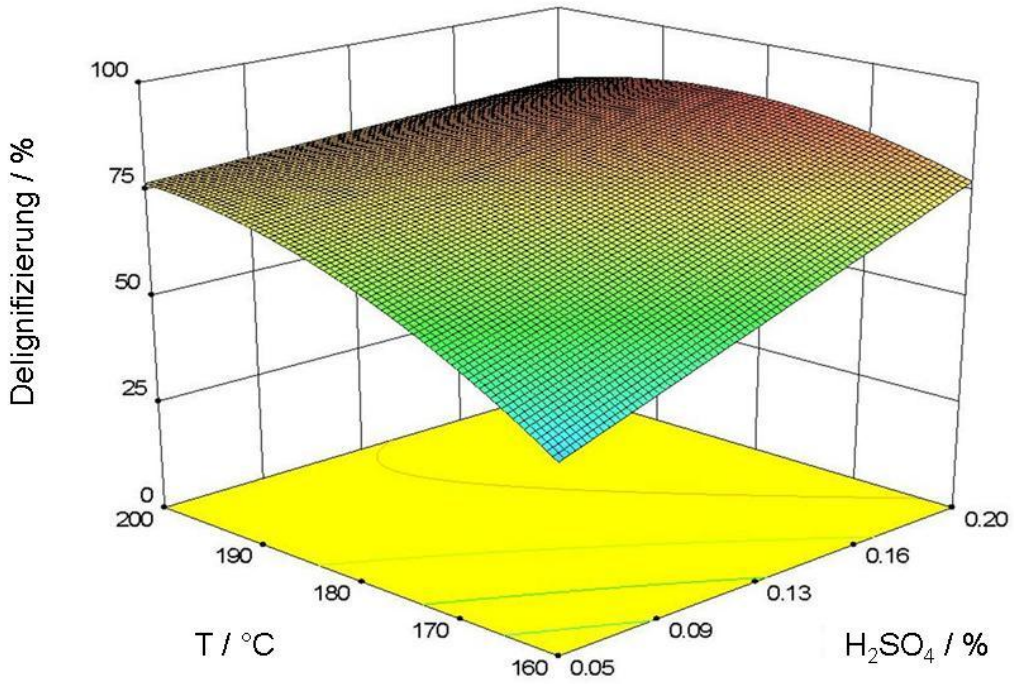


Abbildung 47: Delignifizierung von Pappelholz in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 48 min.

Bei der Xylansolubilisierung konnte festgestellt werden, dass diese im Wesentlichen von der Reaktionstemperatur und der H_2SO_4-Konzentration abhängig war (siehe Abbildung 48). Bei der Erhöhung dieser Parameter wurde die Xylansolubilisierung ebenfalls erhöht, nachdem die Spaltung der glykosidischen Bindungen innerhalb des Xylans erhöht wurde. Diese Beobachtungen waren übereinstimmend mit Pan et al. [17, 99]. In der vorliegenden Arbeit lag

die maximalen Xylanausbeute von 80 - 85 % im Bereich von 180 - 200 °C und 0,16 -0,2 % H_2SO_4.

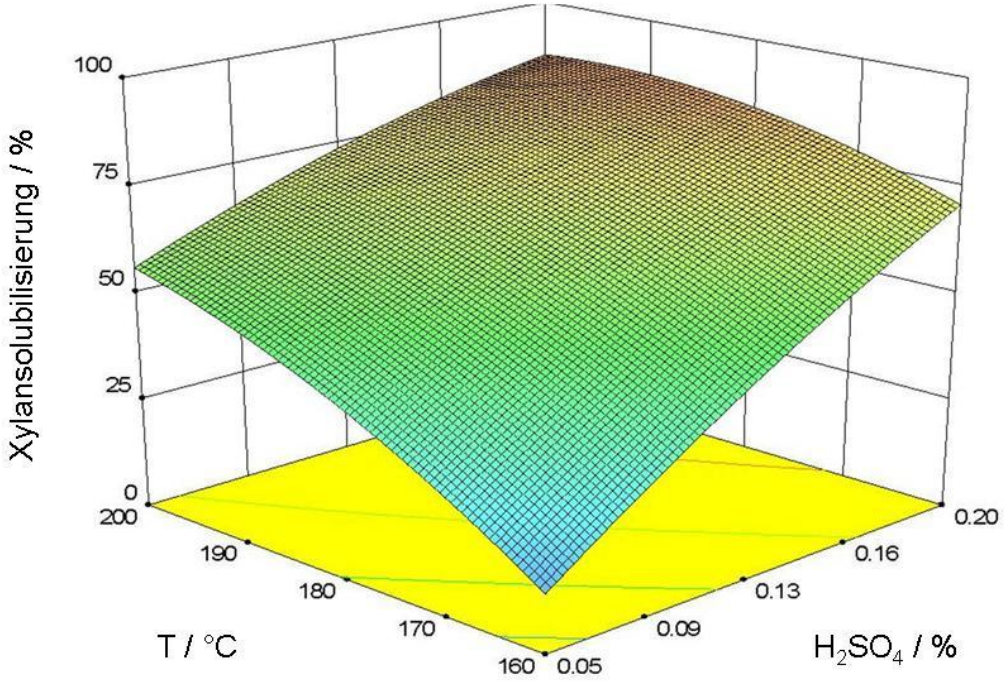


Abbildung 48: Xylansolubilisierung von Pappelholz in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 48 min.

Bei der Xylanausbeute in der Lösung zeigte sich, dass diese bei Temperaturen im Bereich von 165 - 175 °C und H_2SO_4-Konzentrationen von 0,17 - 0,2 % die größten Werte von 80 - 85 % innerhalb des untersuchten Versuchsraums aufwies. Die Xylanausbeute wurde aus der Summe von Xylose und den Xylooligosacchariden errechnet und ist in Abbildung 49 dargestellt.

Das Verhältnis von Monomer zu Gesamtzuckern war im Wesentlichen abhängig von der H_2SO_4-Konzentration. Mit steigender H_2SO_4-Konzentration von 0,05 auf 2,0 % stieg der Anteil von Xylose innerhalb der gelösten Xylane von 5 auf 50 %. Des weiteren konnte festgestellt werden, dass mit steigender Temperatur und steigender H_2SO_4-Konzentration vermehrt Zuckerabbauprodukte wie Furfural und Ameisensäure gebildet wurden. Dies führte, wie Pan et al. ebenfalls beobachteten [17, 99], zu einer Verringerung der Xylanausbeute.

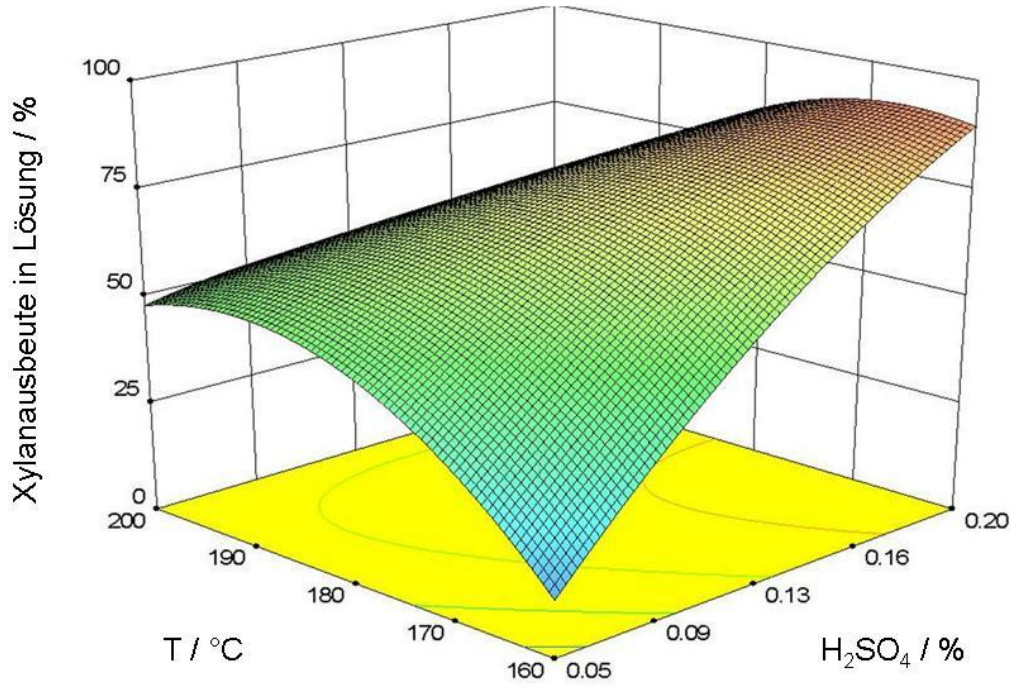


Abbildung 49: Xylanausbeute in der Pappelholz-Aufschlusslösung in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 48 min.

Die geforderte Selektivität von Xylan in der Aufschlusslösung von $S \geq 0{,}9\ g_{Xylose}/g_{Gesamt}$ wurde nur in gewissen Grenzen von T und der H_2SO_4-Konzentration erreicht. In Abbildung 50 wird dieser Bereich durch eine diagonal verlaufende Gerade repräsentiert. Auf diesem Sattelpunkt wurden die größten Selektivitäten im Bereich von 0,9 bis 0,95 ermittelt. Durch die steigende Glukansolubilisierung im Bereich $T > 180$ °C und $H_2SO_4 > 0{,}14$ % wurde die Selektivität S auf $< 0{,}9\ g_{Xylose}/g_{Gesamt}$ reduziert. Außerdem wurde aufgrund der geringen Xylansolubilisierung bei $T < 170$ °C und $H_2SO_4 < 0{,}09$ % die Selektivität S ebenfalls auf $< 0{,}9\ g_{Xylose}/g_{Gesamt}$ erniedrigt.

Den größten Effekt auf die Hydrolysierbarkeit der Cellulosefraktion zeigten, wie auch von Pan et al. festgestellt, die Reaktionstemperatur und die H_2SO_4-Konzentration, nachdem die Erhöhung beider Betriebsbedingungen zu einer Erhöhung der Delignifizierung und Xylansolubilisierung führten [17, 99]. Während mit steigender Temperatur die Glukoseausbeute linear anstieg, zeigte die Glukoseausbeute in Abhängigkeit der H_2SO_4-Konzentration einen maximalen Wert von 70 % bei 200 °C und 0,16 - 0,2 % H_2SO_4. Dies ist in Abbildung 51 verdeutlicht. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Glukoseausbeute nicht von der Haltezeit t beeinflusst war.

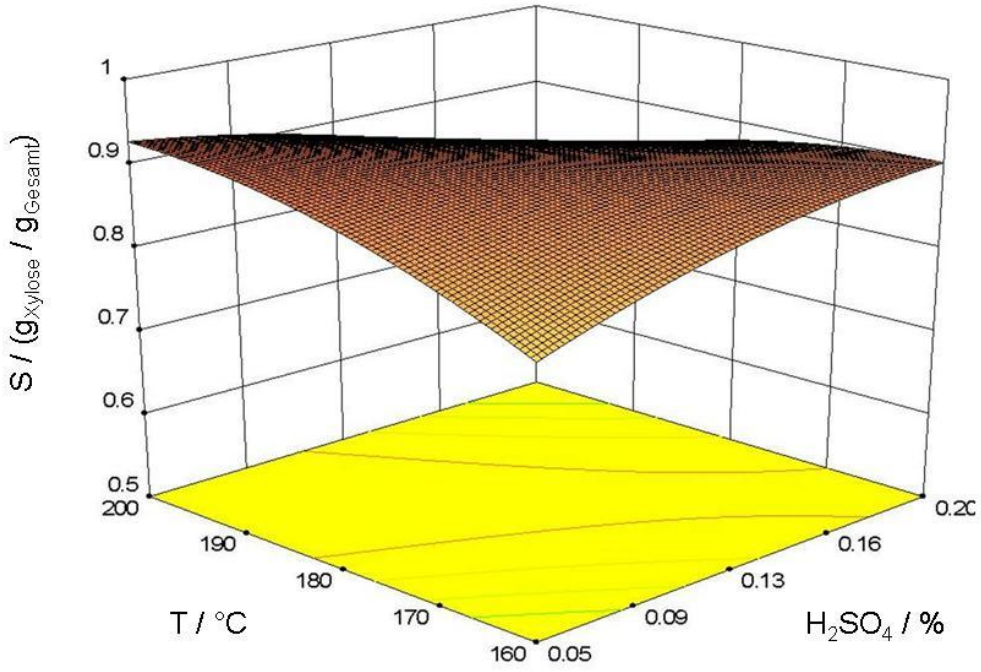


Abbildung 50: Selektivität von Xylose in der Pappelholz-Aufschlusslösung in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 48 min.

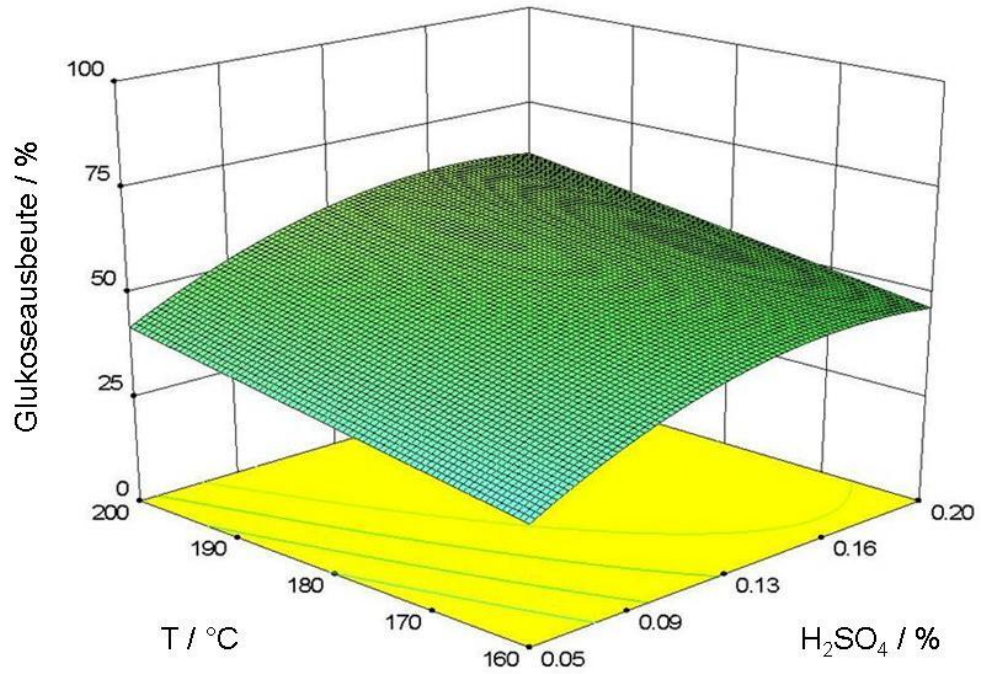


Abbildung 51: Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandeltem Pappelholz mit Cellulasen in Abhängigkeit der Temperatur und der H_2SO_4-Konzentration für eine Haltezeit von 48 min.

Mit Hilfe der Software Design Expert war es möglich, für die Auswahlkriterien minimale Temperatur, minimale Haltezeit und minimale H_2SO_4-Konzentration die optimalen Betriebsbedingungen für Pappelholz von 0,19% H_2SO_4, 182 °C und 48 min mit 50 % (w/w) EtOH zu identifizieren. In Tabelle 23 ist der Vergleich der vorhergesagten Zielgrößen mit den gemessenen Zielgrößen während des H+ EtOH-Organosolv-Aufschlusses von Pappelholz aufgeführt. Zudem sind zur Bewertung des entwickelten Verfahrens die Ergebnisse der besten Verfahren aus der Literatur dargestellt.

Tabelle 23: Vergleich der vorhergesagten Modellwerte und experimentellen Daten des H^+ EtOH-Organosolv-Aufschlusses von Pappelholz bei 50 % EtOH, 0,19 % H_2SO_4, 182 °C und 48 min. STABW entspricht der Standardabweichung für n=2. Die relative Abweichung ergab sich aus der Abweichung von Modell und Experiment bezogen auf den experimentellen Wert.

Zielgröße	Eigene Arbeit Modell (CI 95%) Experiment (± STABW) (rel. Abweich. / %)	Pan et al. H^+-Ethanol-Organosolv-Aufschluss [17, 99]	Chum et al. H^+-Methanol Organosolv-Aufschluss [98, 198]	Kim et al. Aquasolv-Aufschluss [95]
Delignifizierung / %	86 (83 -89) 84 (± 0,8) (2,3)	72	95	k. A.
Xylansolubilisierung / %	82 (78 -86) 80 (± 0,4) (2,5)	81	80	
Xylanausbeute Aufschlusslösung / %	81 (77 - 85) 86 (± 6,4) (5,8)	52	70	59
Selektivität S / g_{Xyl}/ g_{Gesamt}	0,88 (0,86 - 0,90) 0,90 (± 0,01) (4,4)	0,94	k. A.	0,89
Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse / %	60 (64 - 66) 69 (± 0,3) (13,0)	92	60	64

Bei dem Aufschluss von Pappelholz mit optimalen Betriebsbedingungen zeigte die Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse der Faserfraktion mit 13 % die größte relative Abweichung von den vorhergesagten Messwerten. Alle weiteren Zielfaktoren konnten mit einer Genauigkeit von < 5,8 % vorhergesagt werden, so dass die ermittelten empirischen Modelle zur Vorhersage der optimalen Betriebsbedingungen herangezogen werden konnten.

Im Vergleich zu den optimierten Verfahren aus der Literatur führte der in dieser Arbeit untersuchte H^+-EtOH-Organosolv-Aufschluss von Miscanthus zu einer besseren Fraktionierung der Lignin-, Xylan- und Cellulosefraktion. Die Delignifizierung betrug unter optimalen Betriebsbedingungen 88 % und war demnach wesentlich höher als bei dem H^+-EtOH- Organosolv-Verfahren von Pan et al. [17] und dem Aquasolv-Verfahren von Kim et al. [95]. Lediglich das H^+-MeOH-Organosolv-Verfahren von Chum et al. zeigte mit 96 % Delignifizierung eine effektivere Entfernung von Lignin aus der Faser [98, 198]. Es ist bekannt, dass Methanol zu einer besseren Spaltung von Lignin führt als Ethanol oder andere höhere Alkohole [66]. Dies ließ sich mit den Daten ebenfalls bestätigen. Das in dieser Arbeit untersuchte Vorbehandlungsverfahren zeigte im Vergleich zu den anderen Verfahren mit 86 % die höchste Xylanausbeute in der Lösung. Die geforderte Selektivität von $S \geq 0{,}90\ g_{Xylose}/g_{Gesamt}$ konnte mit $S = 0{,}90\ g_{Xylose}/g_{Gesamt}$ ebenfalls erreicht werden. Im Vergleich zur Literatur wurde lediglich bei Pan et al. eine um 7 % höhere Selektivität erreicht [17]. Die Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse für 24 h lag in dieser Arbeit bei 69 %. Lediglich Pan et al. konnte mit Hilfe des H^+-EtOH-Organosolv-Aufschlusses eine höhere Hydrolysierbarkeit von 92 % erreichen [17]. Es ist jedoch anzumerken, dass Pan et al. die Faserhydrolysierbarkeit mit der zweifachen Enzymkonzentration an Celluclast 1.5L (20 FPU/g_{TS}) und der vierfachen ß-Glukosidase-Dosierung (40 CBU/g_{TS}) durchführte. Die Optimierung der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandelten Pappelholz führte dazu, dass Glukoseausbeuten von > 90 % für Feststoffkonzentrationen < 5 % TS erreicht wurden (siehe Kapitel 4.2.2.2).

4.1.3 Maßstabsübertragung anhand des Modified Severity Faktors log M_0

In dem vorherigen Kapitel 4.1.2 wurde für die Optimierung der jeweiligen Vorbehandlungsverfahren der Einfluss der einzelnen Betriebsparameter Temperatur, Haltezeit und NaOH- bzw. H_2SO_4-Konzentration auf die Zielgrößen wie beispielsweise Delignifizierung oder Xylansolubilisierung untersucht. In einem weiteren Schritt sollten die Vorbehandlungsverfahren anhand einer charakteristischen Prozessgröße beschrieben werden. Das Ziel hierbei war, dass die charakterstische Prozessgröße für eine Maßstabsübertragung eingesetzt werden sollte.

Die Notwendigkeit einer derartigen charakterstischen Größe soll an folgendem Beispiel erklärt werden. Muss beispielsweise aufgrund des maximal zulässigen Betriebsdrucks die Reaktionstemperatur im großen Maßstab reduziert werden, so kann durch Erhöhung der Reaktionszeit und der NaOH-Konzentration die charakteristische Prozessgröße konstant gehalten werden. Hierfür muss ein funktioneller Zusammenhang zwischen den Zielgrößen und charakteristische Prozessgröße bestehen und mehrere unterschiedliche Parametervariationen, aus denen eine gleiche charakteristische Prozessgröße berechnet wird, müssen den gleichen Wert für die Zielgröße aufweisen.

Für die Auswahl der Vorbehandlungsverfahren wurde bereits der erweiterten Severity-Faktor $\log R''_0$ verwendet (siehe Kapitel 4.1.1). Bei dieser Größe geht der pH-Wert linear in die Berechnungsgleichung ein, um unterschiedliche Verfahren vergleichbar zu machen. Es sollte in dieser Arbeit weitergehend untersucht werden, ob der Severity-Faktor $\log R''_0$ auch dazu eingesetzt werden konnte, um einen Zusammenhang zwischen den gemessenen Zielgrößen und den unterschiedlichen Betriebsbedingungen einer Vorbehandlungsmethode, ausgedrückt über unterschiedliche $\log R''_0$, herzustellen. Hierzu wurden die gemessenen Zielgrößen gegen $\log R''_0$ aufgetragen. In Abbildung 52 (A) ist dies anhand der Xylansolubilisierung beispielhaft gezeigt. Es konnte festgestellt werden, dass kein exakter funktioneller Zusammenhang zwischen den Zielgrößen und den unterschiedlichen $\log R''_0$-Werten vorhanden war. Dies galt auch für alle anderen Zielgrößen, wie beispielsweise für die Delignifizierung oder die Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse.

Nachdem der Severity-Faktor $\log R''_0$ die oben genannten Anforderungen an eine charakteristische Prozessgröße nicht erfüllte, wurde anschließend der sogenannte Modified Severity-Faktor log M_0 als mögliche charakterstische Prozessgröße untersucht. Im Gegensatz zum Severity-Faktor $\log R''_0$, kann bei dem Modified Severity-Faktorlog M_0 der Einfluss der

H^+- bzw. OH^--Ionen mit Hilfe des Terms c^n genauer beschrieben werden (siehe Kapitel 3.2.5.2). Dies führte dazu, dass die Zielgrößen, die für die Vorbehandlung der untersuchten lignocellulosehaltigen Rohstoffe relevant waren, mittelslog M_0 mathematisch beschrieben werden konnten. In Abbildung 52 (B) ist der Zusammenhang zwischen der Xylansolubilisierung und dem logarithmischen Modified Severity-Faktors log M_0 am Beispiel Weizenstroh dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass mit steigendem log M_0 die Xylansolubilisierung linear anstieg, nachdem durch die erhöhten Prozessbedingunen vermehrt sowohl die glykosidischen Bindungen innerhalb des Xylans als auch die Esterbindungen zwischen Xylan und Lignin gespalten wurden. Unterschiedliche Kombinationen von t, T, und c_{NaOH} die den gleichen log M_0 Wert besaßen, zeigten ebenfalls eine ähnliche Xylan-solubilisierung. Das Modell konnte daher zur Vorhersage der Vorbehandlung eingesetzt werden.

(A) (B)

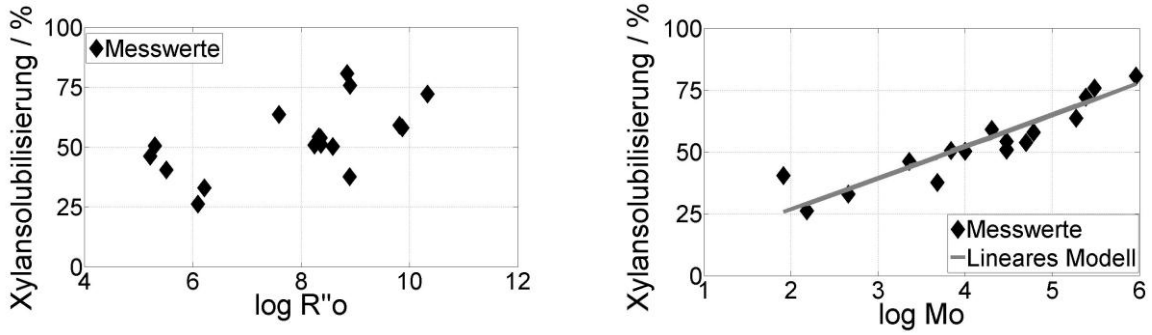


Abbildung 52: (A) Xylansolubilisierung von Weizenstroh in Abhängigkeit von log $R''_{0.}$ (B) Xylansolubilisierung von Weizenstroh in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors log M_0 (R^2 = 0,92).

In dem folgenden Kapitel sollen die errechneten Modelle unter Verwendnung des Modified Severity Faktos log M_0 am Beispiel des alkalischen Aufschlusses von Weizenstroh vorgestellt und diskutiert werden. Eine ausführliche Darstellung der Modellverläufe für Miscanthus und Pappelholz, der mathematischen Formel sowie die Bestimmtheitsmaße sind im Anhang in Kapitel 7.5 aufgelistet. Neben der mathematischen Beschreibung wurde das Konzept anschließend für die Maßstabsübertragung des alkalischen Aufschlusses von Weizenstroh eingesetzt.

In Abbildung 53 (A) bis (D) sind die Delignifizierung, die Xylansolubilsierung, die Xylose und Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandelten Weizenstrohfasern dargestellt.

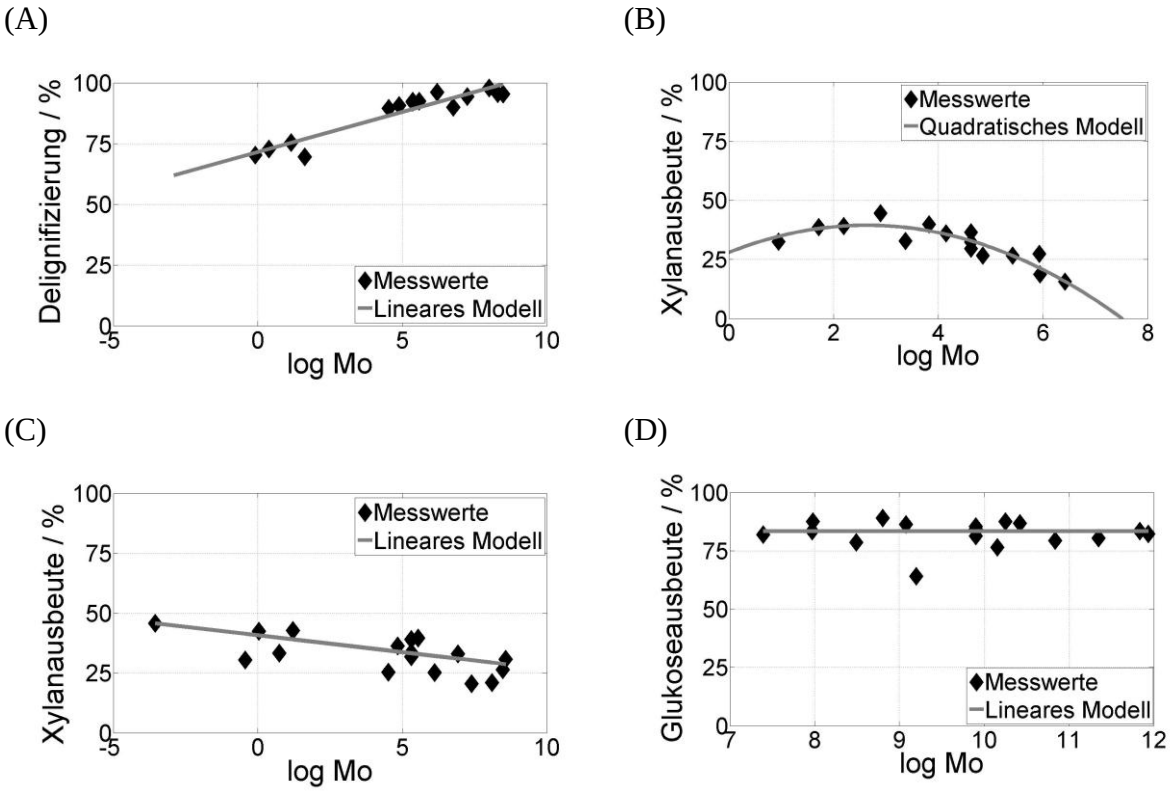


Abbildung 53: (A) Delignifizierung der Weizenstrohfaser in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0. (B) Xylanausbeute in der Aufschlusslösung in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0. (C) Xylanausbeute und (D) Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandelten Weizenstrohfasern mit Xylanasen bzw. Cellulasen in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0.

Es konnte festgestellt werden, dass die Delignifizierung linear mit log M_0 im Bereich von 75 - 98 % anstieg. Durch die erhöhten Prozessbedingungen wurde somit vermehrt Lignin zu löslichen Spaltprodukten umgesetzt. Dies entsprach auch der Tendenz, die bei der statistischen Versuchsplanung beobachtet wurde. Hierbei hatte vor allem die NaOH-Konzentration einen wesentlichen Effekt auf die Entfernung von Lignin. (siehe Kapitel 4.1.2.1).

Wie bereits bei den Modellen aus der statistischen Versuchsplanung zu beobachten war, ging die Xylanausbeute aufgrund der Bildung von Abbauprodukten bei hohen log $M_0 > 4{,}5$ (= hohe Temperaturen und hohe NaOH-Konzentrationen) zurück. In diesem Fall musste ein quadratisches Modell eingesetzt werden, um den Rückgang der Xylanausbeute zu berücksichtigen.

Die Xyloseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse mittels Xylanasen konnte durch eine lineare Gleichung beschrieben werden (siehe Abbildung 53 (C)) . In diesem Fall lag jedoch

R^2 bei 0,66. Die Fehler, die durch die Durchführung der Experimente, durch die biologische Matrix oder durch die Analytik hervorgerufen wurden, führten zu einer geringeren Genauigkeit des Modells, vor allem weil nur geringe Differenzen zwischen maximalen und minimalen Xyloseausbeuten vorhanden waren. Dennoch konnte die Reduzierung der Xyloseausbeute mit steigendem log M_0 ausreichend genau prognostiziert werden. Die Ergebnisse zeigten, dass je mehr Xylan aus der Fasermatrix gelöst wurde, umso geringer war die Xyloseausbeute in der darauf folgenden Xylanhydrolyse mit Xylanasen. Demnach verblieb nach den Aufschlüssen, die eine hohe Xylansolubilisierung zeigten, ein schwer hydrolysierbarer Anteil an Xylan in der Faser zurück. Dieser Anteil konnte von den Xylanasen aufgrund der reduzierten Zugänglichkeit nicht vollständig hydrolysiert werden. Dies wird auch von Beg et al. und Jorgensen et al. beschrieben [24, 53].
Durch die hohe Delignifizierung im untersuchten Versuchsraum konnte bei allen Parametervariationen eine hohe Glukoseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse im Bereich von 83 % festgestellt werden. Sowohl T und t aber auch die NaOH-Konzentration hatten im untersuchten Versuchsraum keinen signifikanten Effekt auf die Glukoseausbeute, so dass die Glukoseausbeute mit dem Modified-Severity-Faktor-Modell (MSM-Modell) nur durch einen konstanten Term von 83 % beschrieben wurde. Dieser konstante Term entsprach dem Mittelwert aus allen durchgeführten Experimenten.

In der Literatur wurde das Konzept des Modified Severity-Faktors log M_0 bisher lediglich von Silverstein et al. [199] eingesetzt, um den alkalischen und sauren Aufschluss von Baumwollstängel zu beschreiben. Demzufolge wurde log M_0 erstmals für Weizenstroh, Miscanthus und Pappel eingesetzt. Während Silverstein et al. nur den Zusammenhang zwischen log M_0 und der Delignifizierung sowie der Xylansolubilisierung untersuchten, wurde in dieser Arbeit die Delignifizierung, die Xylansolubilisierung und Xylanausbeute in der Aufschlusslösung sowie die enzymatische Hydrolysierbarkeit der Faserfraktion in Abhängigkeit von log M_0 beschrieben. Darüber hinaus konnte erstmalig gezeigt werden, dass neben sauren und alkalischen Aufschlüssen ebenfalls Organosolv-Prozesse mit dem MSM-Modell beschrieben werden können. Organosolv-Prozesse haben insbesondere im Hinblick auf das Konzept der Lignocellulose-Bioraffinerie ein großes Potential, da sie die Lignocellulose-Fraktionen Hemicellulose, Cellulose und Lignin effektiv voneinander trennen können [66].

Die von Silverstein entwickelten linearen Modelle für die Delignifizierung und Xylansolubilisierung hatten Bestimmtheitsmaße von ≤ 0,89 [199]. Die Modelle in der vorliegenden Arbeit konnten durch Erweiterung der Modelle auf quadratische, hyperbolische oder sigmoidale Gleichungen jeweils mit $R^2 \geq 0{,}89$ beschrieben werden. Lediglich die Beschreibung der Xyloseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse von mit NaOH vorbehandeltem Weizenstroh zeigte R^2 von 0,66. In diesem Fall konnte jedoch ebenfalls ein Zusammenhang zwischen den Betriebsbedingungen bzw. log M_0 ermittelt werden.
Im Vergleich zur statistischen Versuchsplanung (DoE) lieferte das MSM-Modell eine generelle Interpretation anhand einer charakteristischen Verfahrensgröße (log M_0). Eine Analyse der Effekte der Einzelfaktoren sowie den Wechselwirkungen zwischen zwei Einflussgrößen konnte durch die Varianzanalyse des DoE exakt beschrieben werden. Eine derartige detaillierte Betrachtung war mit dem MSM-Modell aufgrund der Abzissentransformation nicht möglich. Dennoch konnten mit beiden Methoden die Zielgrößen im untersuchten Versuchsraum beschrieben und optimiert werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die entwickelten MSM-Modelle die Zielgrößen wie beispielsweise Delignifizierung, Xylansolubilisierung, Xylanausbeute in der Lösung oder Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse beschreiben konnten, wurde exemplarisch eine Maßstabsübertragung des NaOH-alkalischen Aufschlusses von Weizenstroh bei optimalen Betriebsbedingungen durchgeführt. Hierbei wurde der Aufschluss auf einen 13 L-Autoklaven mit einem Skalierungsfaktor von 16 übertragen.
Zur Optimierung aller Zielgrößen wurden als Grenzen für die Betriebsparameter T < 200 °C, t < 60 min und c_{NaOH} < 1,5 % gesetzt. Als optimale log M_0 wurden folgende Werte ermittelt: (1) Delignifizierung log M_0 = 5,97, (2) Xylansolubilisierung log M_0 = 4,70, (3) Xylanausbeute in der Aufschlusslösung log M_0 = 4,94 und (4) Xyloseausbeute nach Xylanasebehandlung log M_0 = 6,10. Dies entsprach den Betriebsparameter von t = 30 min, T = 190 °C und 1,45 % NaOH (weitere optimale Betriebsbedingung t = 60 min, T = 180 °C und 1,45 % NaOH). Die mit dem MSM-Modell berechneten optimalen Betriebedingungen entsprachen somit den optimalen Betriebsbedingungen, die mit der statistischen Versuchsplanung ermittelt wurden.

In Tabelle 24 ist der Vergleich zwischen der Vorhersage mit dem MSM-Modell und den gemessenen Werten im 13 L-Reaktor aufgezeigt. Bei der Maßstabsübertragung von einem 1 L

in einen 13 L-Reaktor konnten mit Hilfe des MSM bis auf die Xylansolubilisierung alle Zielgrößen mit Abweichungen < 11,3 % vorhergesagt werden. Im Gegensatz zum Modell war die Xylansolubilisierung im 13 L-Reaktor um 19,5 % geringer. In den vorherigen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die Xylansolubilisierung sowohl von der NaOH-Konzentration als auch von der Temperatur abhing. Dementsprechend könnte eine nicht homogene Durchmischung innerhalb der 13 L-Reaktors dazugeführt haben, dass Temperaturgradienten auftraten. Somit war die über den Reaktor gemittelte Temperatur geringer. Diese veringerte Temperatur führte dementsprechend zur geringeren Xylansolublisierung.

Tabelle 24: Vergleich der vorhergesagten Zielgrößen (MSM Modell) mit den gemessenen Zielgrößen nach Aufschluss von Weizenstroh im 13 L-Autoklaven. Die relative Abweichung ergab sich aus der Abweichung von Modell und Experiment bezogen auf den experimentellen Wert.

Zielgröße	MSM-Vorhersage	Messwert 13 L	Rel. Abweichung / %
Delignifizierung / %	90	89	1,1
Xylansolubilisierung / %	55	46	19,5
$Xylanausbeute_{Lösung}$ / %	35	35	0,0
$Glukoseaubeute_{enzym}$ / %	86	97	11,3
$Xyloseaubeute_{enzym}$ / %	32	34	5,8

4.1.4 Bilanzierung und Zusammenfassung der Vorbehandlungsverfahren

Für die Zusammenfassung der optimierten Vorbehandlungsverfahren und für den Vergleich der einzelnen Rohstoffe sind die Bilanzierungen für die Fraktionierung von Weizenstroh, Miscanthus und Pappel in der Abbildung 54 bis Abbildung 56 dargestellt. Die Bilanzierung umfasst sowohl den Aufschluss, die Ligninfällung als auch die enzymatische Hydrolyse der Faserfraktion. Die enzymatische Hydrolyse wurde für die Bilanzierung mit aufgenommen, nachdem diese direkt durch die Vorbehandlung beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurde in der Literatur zur Beurteilung von Fraktionierungsverfahren ebenfalls die vollständige Bilanzierung, bestehend aus dem Aufschluss und der enzymatischen Hydrolyse, betrachtet [17, 96]. Auf die Prozessentwicklung zur enzymatischen Hydrolyse der Faserfraktion soll in Kapitel 4.2 näher eingegangen werden.

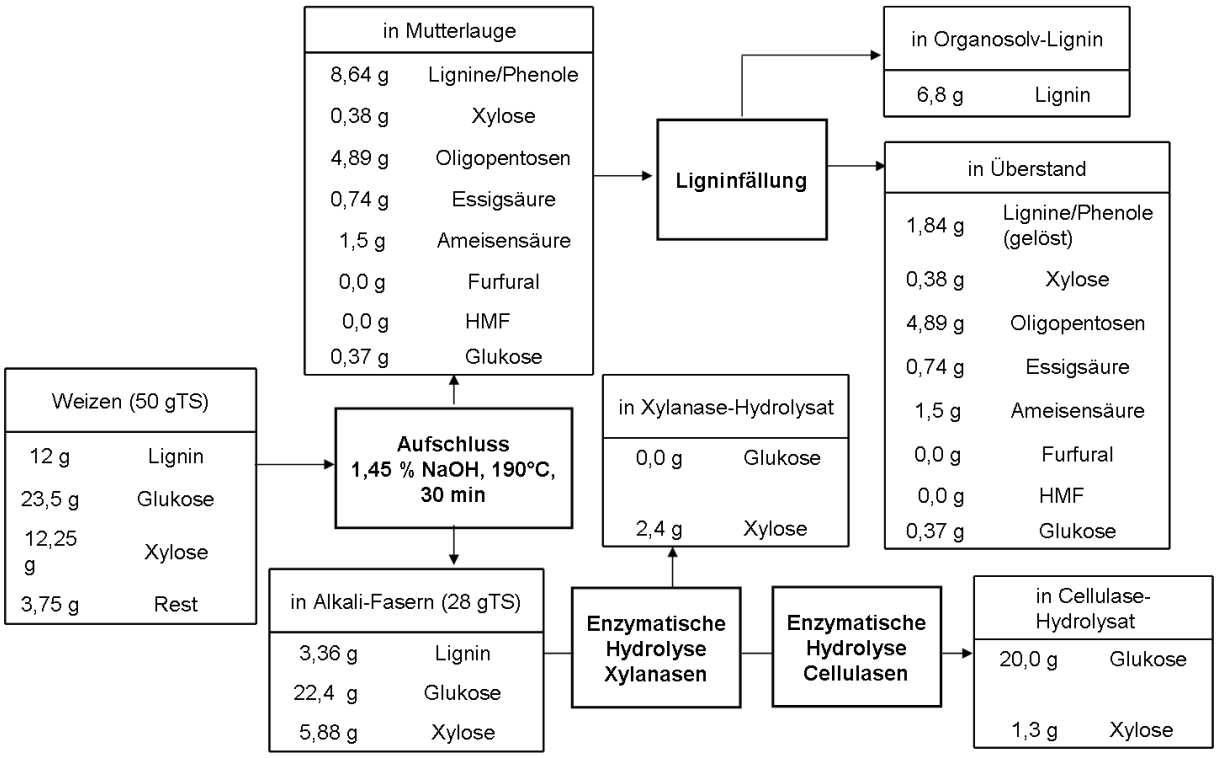


Abbildung 54: Bilanzierung der Fraktionierung von Weizenstroh mit Hilfe des optimierten NaOH-Vorbehandlungsverfahrens gefolgt von der enzymatischen Hydrolyse der Faserfraktion mit Hilfe von Xylanasen und Cellulasen.

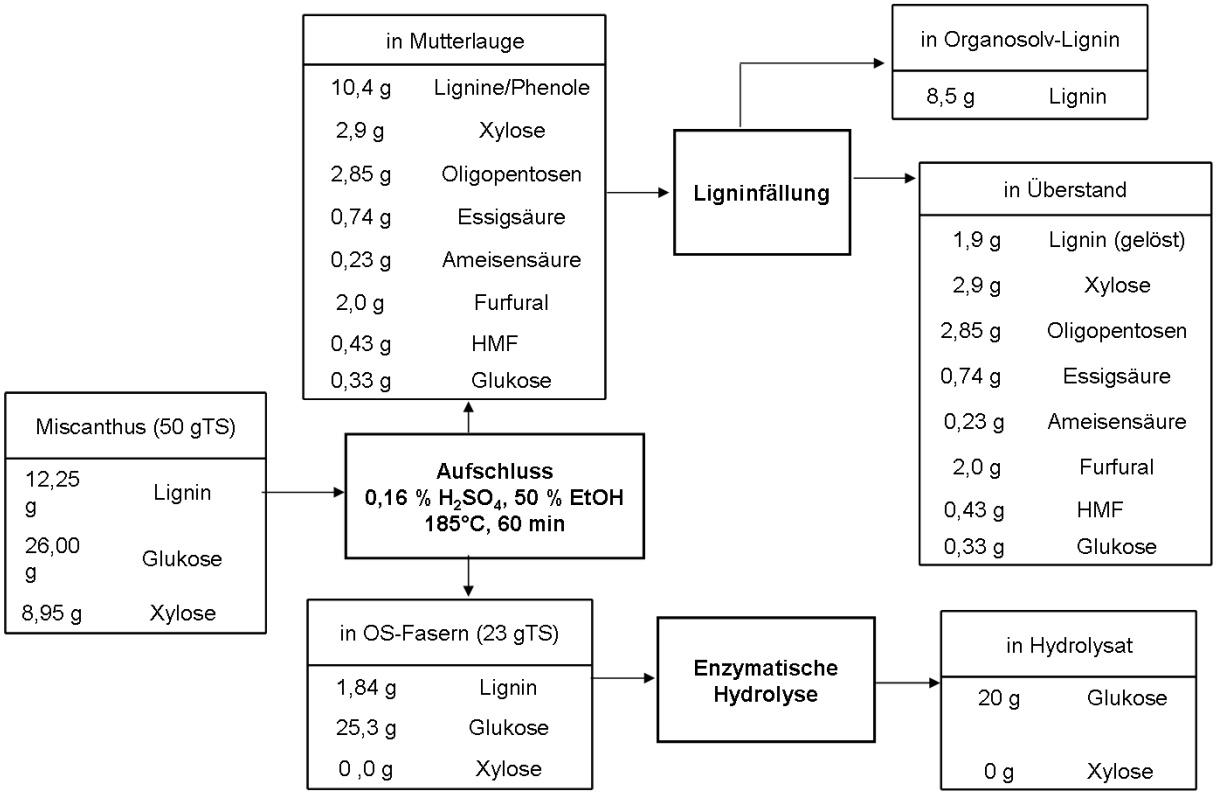


Abbildung 55: Bilanzierung der Fraktionierung von Miscanthus mit Hilfe des optimierten H^+-EtOH-Organosolv-Aufschlusses gefolgt von der enzymatischen Hydrolyse der Faserfraktion mit Hilfe von Cellulasen.

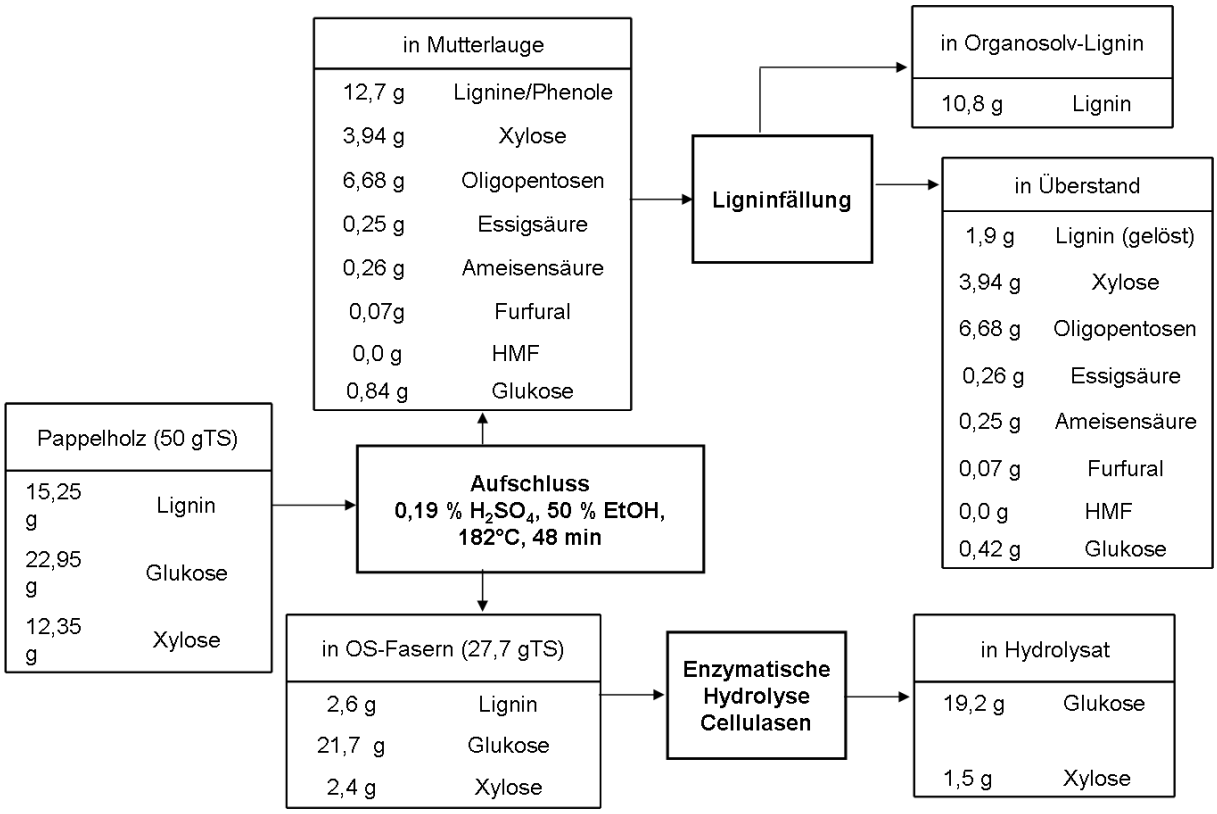


Abbildung 56: Bilanzierung der Fraktionierung von Pappelholz mit Hilfe des optimierten H^+-EtOH-Organosolv-Aufschlusses gefolgt von der enzymatischen Hydrolyse der Faserfraktion mit Hilfe von Cellulasen.

Die Daten zeigten, dass die entwickelten Verfahren für alle drei Rohstoffe sehr hohe Ausbeutekoeffizienten an Glukose im Bereich von 0,38 g/gTS - 0,40 g/gTS aufwiesen. Dies entsprach einer Glukoseausbeute von 85, 77 und 84 % für Weizen, Miscantus und Pappel. Die Glukoseselektivitäten lagen hierbei > 0,93 $g_{Glukose}/g_{Gesamt}$. Für die Isolierung von Lignin eignete sich vor allem der Organosolv-Aufschluss von Pappelholz. In diesem Fall konnten 0,22 g/gTS Lignin abgetrennt werden. Dies entsprach einer Ligninausbeute von 71 %. Aus Miscanthus konnten im Vergleich hierzu 0,17 g/gTS (70 %) Lignin abgetrennt werden, während Weizenstrohlignin einen Ausbeutekoeffizient von 0,14 g/gTS (57 %) aufwies. Den höchsten Ausbeutekoeffizienten zur Freisetzung von Xylose und Xylooligosacchariden wurde bei dem Organosolv-Aufschluss von Pappelholz erreicht. Hierbei konnten 0,21 g_{Xylan}/g_{TS} aus dem Pappelholz mit einer Selektivität von 0,96 g_{Xylan}/g_{Gesamt} isoliert werden. Somit wurde eine Xyloseausbeute von 86 % erreicht. Aufgrund des geringeren Xylangehaltes konnten jedoch für die Einjahrespflanzen Weizenstroh und Miscanthus nur Ausbeutekoeffizienten von 0,11 g_{Xylan}/g_{TS} und 0,12 g_{Xylan}/g_{TS} erreicht werden. Dies entsprach Ausbeuten von 63 % und 64 %. Die erzielten Selektivitäten waren mit S = 0,93 g_{Xylan}/g_{Gesamt} ebenfalls sehr hoch.

Für die Nutzung von Weizenstroh wurde darüber hinaus ein sequentielles enzymatisches Verfahren entwickelt. Hierbei konnte im ersten Schritt mit Hilfe der Xylanasen Accellerase XY und Cellic HTec selektiv Xylan aus der Fasermatrix gelöst werden und zu Xylose umgesetzt werden. Anschließend wurde die Faser mit Cellulasen hydrolysiert.
Die entwickelten Verfahren erfüllten die geforderten Selektivitäten von Xylose und Glukose. Darüber hinaus konnten im Vergleich zur Literatur die Ausbeuten an Glukose und Xylose weiter gesteigert werden, so dass alle Zielanforderungen für die Entwicklung eines effizienten und selektiven Verfahrens erreicht wurden (siehe Kapitel 1.2).

4.2 Enzymatische Hydrolyse der Faserfraktion mit Xylanasen und Cellulasen

Im vorherigen Kapitel 4.1 wurde die Vorbehandlung der lignocellulosehaltigen Rohstoffe Weizenstroh, Miscanthus und Pappel untersucht. Wie aus dem Grundverfahrensfließbild in Abbildung 21 am Beginn von Kapitel 4 zu sehen ist, erfolgte nach der Vorbehandlung der Lignocellulose und der Fest-Flüssig-Trennung die enzymatische Hydrolyse der Faserfraktion mit Xylansen und Cellulasen, um aus den vorbehandelten Fasern Xylose und Glukose zu erhalten. Hierfür mussten zunächst geeignete Xylanasen und Cellulasen identifiziert werden. Die Xylanasen sollte dabei das Xylan selektiv aus der Faser entfernen, in dem sie das Xylan zu Xylose hydrolysieren, ohne dass die Cellulose ebenfalls enzymatisch gespalten wurde. Bei der Verfahrensentwicklung der Xylanbehandlung sollten hierbei der Einfluss von möglichen limitierenden Faktoren wie Endproduktinhibition, Faserlänge sowie Feststoffkonzentration untersucht werden.
Im Anschluss an die Xylanasebehandlung sollte eine Cellulasebehandlung der vorbehandelten Fasern erfolgen, um schließlich die verbliebene Cellulose zu Glukose umzusetzen. Hierbei sollten ebenfalls geeignete Cellulasen identifiziert werden, die möglichst hohe Glukosekonzentrationen bei möglichst hohen Glukoseausbeuten erzielten. Um einen wirtschafltichen Hydrolyseprozess zu erhalten, sollten dabei möglichst hohe Feststoffkonzentrationen > 10 % TS eingesetzt werden. Demnach mussten die ausgewählten Cellulasen auch bei hohen Feststoffkonzentrationen möglichst hohe Ausbeuten erzielen. Nachdem hohe Feststoffkonzentrationen zu einer Stofftransportlimitation führten, fand eine Übertragung der Hydrolysereaktion von einem Schüttelkolben auf einen Rührkesselreaktor statt. Hierzu wurden neue Rührergeometrien, die für die Hochfeststoff-Hydrolyse speziell konzipiert wurden, anhand ihres Leistungseintrages und der Mischzeit charakterisiert. Die

Reaktionskinetik der Hochfeststoff-Hydrolyse im Rührkesselreaktor wurde hierbei abschließend mit Hilfe eines Multireaktionsmodells beschrieben, um die Hydrolysereaktion auf andere Reaktionsmaßstäbe übertragbar zu machen.

4.2.1 Enzymatische Hydrolyse des Xylananteils mit Xylanasen

Die Ergebnisse der Vorbehandlung aus Kapitel 4.1.2.1 zeigten, dass das ausgewählte NaOH-alkalische Vorbehandlungsverfahren von Weizenstroh bei optimalen Bedingungen 53 % des Xylans aus der Faser löste. Eine höhere Xylansolubilisierung konnte zwar erreicht werden, dies hatte jedoch eine signifikante Reduktion der Xylanausbeute in der Aufschlusslösung zur Folge, da das solubilisierte Xylan zu Abbauprodukten wie beispielsweise Furfural abgebaut wurde. Daher sollte der verbliebene Anteil des Xylans in der Faser vor der eigentlichen Hydrolyse der Cellulosefraktion mit geeigneten Xylanasen in einem zusätzlichen Schritt aus der Faser gelöst werden, um die Ausbeute an Xylan weiter zu erhöhen. Für die lignocellulosehaltigen Substrate Miscanthus und Pappelholz war diese zusätzliche Xylanasebehandlung nicht notwendig. Bei Miscanthus wurde, wie bereits gezeigt, die Xylanfraktion während der Vorbehandlung fast vollständig aus der Faser gelöst (siehe Kapitel 4.1.2.2) und bei Pappelholz führte die enzymatische Behandlung der Fasern mit Xylanasen nur zu geringen Xylanausbeuten, so dass die Xylanasebehandlung in diesem Fall unwirtschaftlich ist (siehe Kapitel 4.1.2.3).

Demnach war das Ziel der Arbeit, kommerzielle Xylanasepräparate zu identifizieren, die selektiv Xylan innerhalb der vorbehandelten Weizenstrohfaser umsetzen konnten. Die Selektivität sollte hierbei im Bereich $\geq 0{,}9\ g/g_{Gesamtzucker}$ liegen und mehr als 90 % der löslichen Zucker sollten Monomere darstellen. Als Messgrößen wurden somit für die Verfahrensentwicklung neben der Xyloseausbeute auch die Selektivität S und der Anteil an Xylose an der gesamten Menge an löslichen Xylosacchariden (F-Faktor) ermittelt. Die Berechnungsformeln sind in Kapitel 3.3.1.1 gegeben. Neben der Identifizierung geeigneter Xylanasepräparate sollte anschließend der Einfluss von möglichen limitierenden Faktoren wie Endproduktinhibierung, Faserlänge sowie Feststoffkonzentration untersucht werden.

4.2.1.1 Charakterisierung und Auswahl von Xylanasen

Für die vergleichenden Untersuchungen wurden fünf kommerziell erhältliche Xylanasepräparate ausgewählt: Pulpzyme HC, Rohament GE, Ecopulp TX-200A, Accellerase XY und Cellic HTec. Zur eingehenden Charakterisierung der Enzyme wurden die Cellulase-,

die Xylanase-, die α-Arabinofuranosidase-, die ß-Xylosidase- und die ß-Glukosidaseaktivität gemessen (siehe Tabelle 25). Ein ideales Xylanasepräparat sollte neben einer hohen Xylanase und ß-Xylosidaseaktivität eine geringe Cellulase-, α-Arabinofuranosidase und ß-Glukosidaseaktivität aufweisen.

Die Aktivitätsmessungen zeigten, dass Pulpzyme HC eine reine Endoxylanase war, die lediglich lösliche Oligosaccharide, aber keine Xylose aus dem Xylan in der Faser freisetzen kann. Dies konnte von Ryu und Kim ebenfalls bestätigt werden [247]. Die Enzyme Rohament GE und Ecopulp TX-200A hatten ähnliche Endo- und Exo-Cellulase- und Xylanaseaktivitäten sowie eine ähnliche α-Arabinofuranosidaseaktivität. Beide Präparate zeigten neben einer ähnlichen Aktivitätsverteilung in Vorversuchen gleiche Bandenmuster bei einer Charakterisierung mit SDS-Gelelektrophorese, so dass für weitere Untersuchungen nur Rohament GE eingesetzt wurde. Accellerase XY war ein hochkonzentriertes Enzympräparat mit Endo- und Exo-Cellulase- und Xylanaseaktivität. Cellic HTec zeigte nur geringe Endo- und Exo-Cellulaseaktivitäten und stellte somit neben Pulpzyme HC die reinste Xylanasemixtur dar. Im Gegensatz zu Pulpzyme HC zeigte Cellic HTec jedoch eine zusätzliche ß-Xylosidaseaktivität.

Tabelle 25: Übersicht über die gemessenen Enzymaktivitäten der untersuchten Xylanasepräparate

Enzym	Cellulase / (FPU/ml)	Xylanase / (U/ml)	Arabino-Furanosidase / (U/ml)	ß-Xylosidase / (U/ml)	ß- Glukosidase / (U/ml)
Pulpzyme HC	-	6896	-	-	-
Rohament GE	0,3	9382	2,3	4,8	1,7
Ecopulp TX-200A	2,4	7969	1,7	3,3	3,5
Accellerase XY	20,2	30309	-	23,1	35,4
Cellic HTec	0,6	8814	-	2,95	1

Nach der Aktivitätsmessung wurde das Reaktionsverhalten der Xylanasepräparate Pulpzyme HC, Rohament GE, Accellerase XY und Cellic HTec anhand der Hydrolyse von Organosolv-vorbehandelten Weizenstroh (LZ10) untersucht. Hierbei wurde die Enzymdosierung zwischen 600 und 1500/g_{TS} variiert, um ein optimales Enzym-/Substratverhältnis zu identifizieren. Die

Xylose- und Xylooligisaccharidausbeuten nach der enzymatischen Hydrolyse der Xylanfraktion mit den unterschiedlichen Xylanasepräparaten ist in Abbildung 57 gezeigt. Die Hydrolysezeit betrug hierbei 48 h.

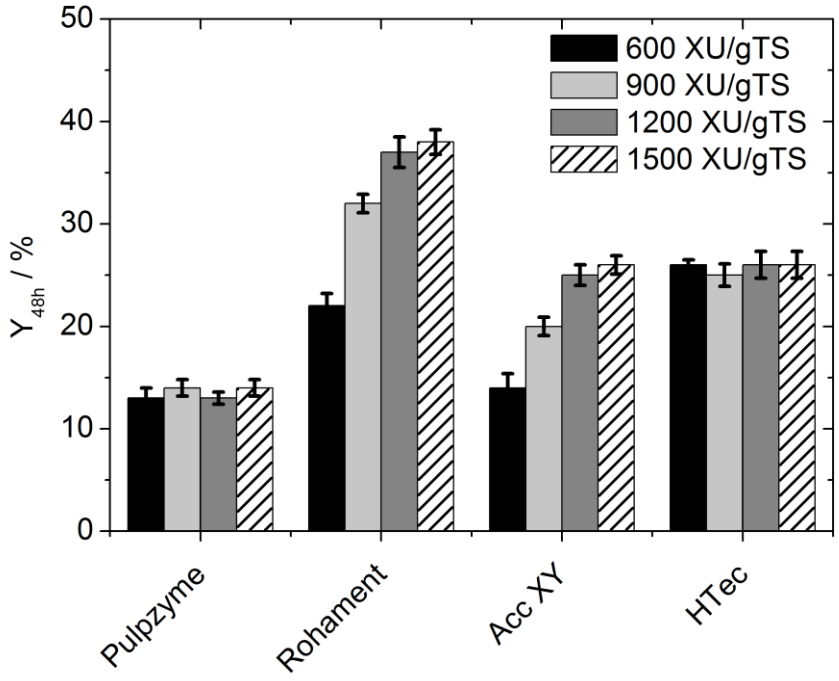


Abbildung 57: Ausbeute Y von Xylose und Xylooligosacchariden nach der enzymatischen Hydrolyse der LZ10 Faser (50 g/L) mit 600 XU/gTS bis 1500 XU/gTS Xylanasen nach 48 h Reaktionszeit.

Es konnte festgestellt werden, dass eine Steigerung der Xylanasedosierung von 600 auf 1500 XU/g_{TS} bei Pulpzyme HC und Celic HTec zu keiner weiteren Steigerung der Xylanausbeute führte. Das optimale Enzym-/Substratverhältnis bei Rohament GE und Accellerase XY lag im Gegensatz dazu bei 1200 XU/g_{TS}. Die größte Ausbeute zeigte Rohament GE mit 37 %, gefolgt von Accellerase XY und Cellic HTec mit 25 %. Insgesamt konnte mit diesen Experimenten festgestellt werden, dass die Hydrolisierbarkeit der Xylanfraktion durch bisher unbekannte limitierende Faktoren eingeschränkt war, nachdem eine Steigerung der Xylanasemenge zu keiner weiteren Erhöhung der Xyloseausbeute führte. In der Literatur wurden bereits die Endproduktinhibierung, die Stofftransportlimitierung bei hohem Feststoffgehalt oder die eingeschränkte Zugänglichkeit der Xylanfraktion durch die Lignin- oder die Cellulosematrix als mögliche limitierende Faktoren identifiziert [37, 53, 108, 121, 136, 248-250]. Aus diesem Grund wurden diese Faktoren ebenfalls untersucht (siehe Kapitel 4.2.1.2).

Neben den Ausbeuten wurden auch die Selektivitäten S und die F-Faktoren (Verhältnis Xylose zu Xylose und Xylooligosacchariden) bei 1200 XU/g_{TS} gemessen (siehe Abbildung 58). Die Ergebnisse machten deutlich, dass Rohament GE trotz seiner hohen Ausbeuten aufgrund seiner hohen Cellulase- und ß-Glukosidaseaktivität die geringste Selektivität aufwies. Accellerase XY zeigte wegen seiner hohen ß-Xylosidaseaktivität eine vollständige Umsetzung der freigesetzten Oligosaccharide zu Xylose mit einer Selektivität S = 0,9 g/g. Die höchste Selektivität hatte Cellic HTec, weil in diesem Präparat keine Nebenaktivitäten vorhanden waren. In diesem Fall wurde zwar keine Glukose aus der Faser freigesetzt, jedoch waren aufgrund der geringen Xylosidaseaktivität von Cellic CTec nur 30 % der löslichen Xylane Xylose. Liavoga et al. konnten ebenfalls bei einem Vergleich mehrerer kommerziell erhältlicher Xylanasepräparate feststellen, dass vor allem die ß-Xylosidaseaktivität entscheidend für die vollständige Umsetzung von Xylan zu Xylose war [110].

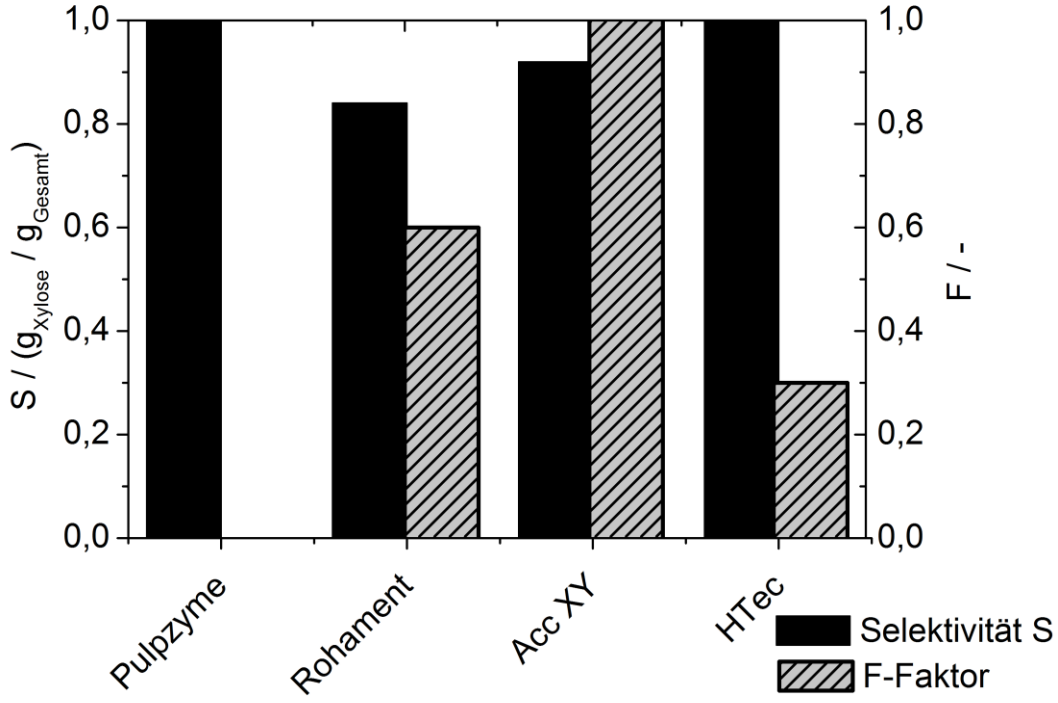


Abbildung 58: Selektivität S und F-Faktor (Verhältnis Xylose zu Xylose und Xylosoligosacchariden) nach 48 h in Abhängigkeit der eingesetzten Xylanasen bei 1200 XU/gTS.

In einem weiteren Schritt wurde die Kombination von Accellerase XY und Celic HTec betrachtet, um die Vorteile beider Präparate zu kombinieren. Die erzielten Ausbeuten Y, Selektivitäten S und F-Faktoren sind in Abbildung 59 gezeigt.

Die Ergebnisse zeigten, dass durch die Kombination von Accelerase XY und Celic HTec die Ausbeute von jeweils 25 % auf 48 % gesteigert werden konnte. Die Selektivität der Xylanasekombination lag mit 0,9 $g/g_{Gesamtzucker}$ bei der Selektivität von Accellerase XY. Somit wurde die Selektivität der Mischung im Wesentlichen durch die geringste Selektivität des Einzelpräparates limitiert. Das Verhältnis von Xylose zu Xylose und Xyloologisaccharide lag für die Enzymkombination mit F = 0,92 unter dem Wert von Accellerase XY mit F = 1,0. In diesem Fall wurde F durch die geringe ß-Xylosidaseakivität von Cellic HTec geringfügig reduziert. Somit war die Kombination von Accellerase XY und Cellic HTec in der Lage, selektiv Xylan aus der Faser zu lösen und die löslichen Xylooligosacharide fast vollständig zu Xylose umzusetzen. Die vorgegebenen Zielvorgaben mit $S \geq 0{,}9$ $g/g_{Gesamtzucker}$ und $F \geq 0{,}9$ konnte mit dieser Kombination erreicht werden. Vergleichbare Experimente mit dieser Enzymkombination sind in der Literatur nicht vorhanden, so dass in dieser Arbeit erstmals die Kombination aus Accelerase XY und Cellic HTec eingesetzt wurde, um selektiv Xylan aus Lignocellulose zu Xylose umzusetzen.

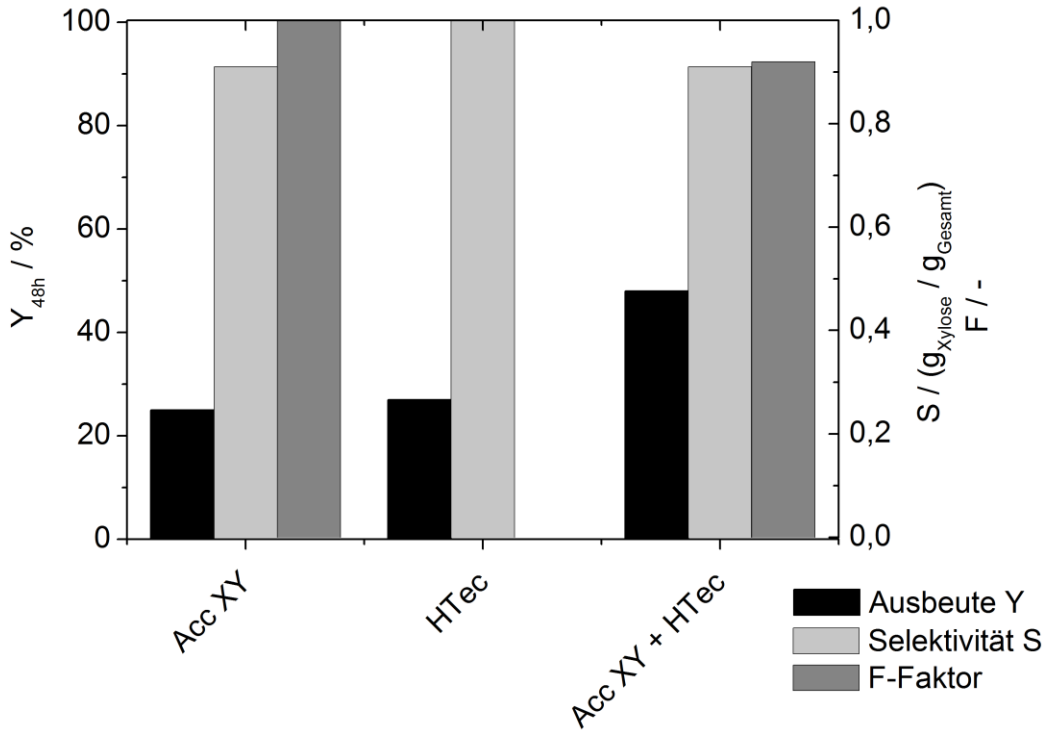


Abbildung 59: (A) Ausbeute Y von Xylose, Selektivität S und F-Faktor (Verhältnis Xylose zu Xylose und Xylosoligosacchariden) nach 48 h in Abhängigkeit der eingesetzten Xylanasekombinationen.

4.2.1.2 Limitierende Faktoren der Xylanhydrolyse

Bei der Auswahl von geeigneten Xylanasen zeigte sich, dass die Kombination aus Cellic HTec und Accellerase XY zwar zu einer selektiven Abtrennung des Xylans aus der Faser und zu einer vollständigen Umsetzung zu Xylose führte, jedoch lagen die Xyloseausbeuten unter 48 %. Die Xylanhydrolysierbarkeit war somit von bisher unbekannten Faktoren begrenzt. Wie in Kapitel 4.2.1.1 bereits erwähnt, wurden in der Literatur bereits die Endproduktinhibierung, die Stofftransportlimitation bei hohem Feststoffgehalt sowie die eingeschränkte Zugänglichkeit der Xylanfraktion durch die Lignin- und die Cellulosematrix als mögliche limitierende Faktoren identifiziert [37, 53, 108, 121, 136, 248-250]. Die Zugänglichkeit der Xylanfraktion kann größtenteils durch Vergrößerung der spezifischen Oberfläche bzw. Verkleinerung der Faserlänge oder durch die Entfernung von Lignin aus der Fasermatrix verbessert werden [53, 54, 56]. Im folgenden Kapitel soll zur weiteren Charakterisierung der Xylanhydrolyse der Einfluss von möglichen limitierenden Faktoren wie Endproduktinhibierung, Faserlänge, Vorbehandlungsmethode sowie Feststoffgehalt untersucht werden.

Einfluss der Endproduktinhibierung

Aus der Literatur ist bekannt, dass Xylanasen genauso wie Cellulasen von ihren Reaktionsprodukten inhibiert werden können. Während Endoxylanasen vorwiegend von Xylobiose inhibiert werden, werden ß-Xylosidasen vorwiegend durch Xylose inhibiert [248-250]. Somit stellt die Endprodukthemmung von Xylanasen durch Xylose einen limitierenden Faktor dar. Das Schlüsselenzym bei der Hydrolyse von Lignocellulose mit der ausgewählten Kombination Accelerase XY und Cellic HTec war die ß-Xylosidase von Accellerase XY. Aus diesem Grund wurde die Effektorkinetik von Accellerase XY mit Birkenxylan als Modellsubstrat genauer betrachtet.

In Abbildung 60 ist die Lineweaver Burk-Auftragung für unterschiedliche Konzentrationen an Xylose dargestellt, um eine mögliche Enzymhemmung identifizieren zu können. Sowohl der Schnittpunkt mit der x-Achse als auch der Schnittpunkt mit der y-Achse wurden durch steigende Xylosekonzentrationen verändert. Dies deutet auf einen nicht-kompetitiven Inhibitionsmechanismus hin, bei dem sowohl das Enzym als auch der Enzym-Substrat-Komplex durch Xylose inhibiert wurden [213]. Ball und McCarthy hingegen beobachteten eine kompetitive Inhibition von Xylanasen, die aus diversen Actinomyceten stammten [251].

Es ist jedoch bereits von Cellulasen bekannt, dass sowohl kompetitive als auch nicht-kompetitive Inhibitionen auftreten können [102].

Mit der Lineweaver Burk-Auftragung konnten aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse und aus der Steigung der Geraden die Michaelis-Menten-Konstanten K_M = 0,33 L/g_{Xylan} und v_{max} = 0,0174 g/(L*min) ermittelt werden. Die Messdaten zeigten, dass bereits ab einer Konzentration von 1 g/L Xylose eine Reduzierung der Reaktionsrate und somit eine Endproduktinhibition bei der Umsetzung des Modellsubstrates Xylan auftrat. Die Arbeitsgruppen von Rajaram und Varma konnten beispielsweise zeigen, dass die Xylanaseaktivität von *Bacillus thermoalkalophilus* bei 3 g/L Xylose um 50 % reduziert wurde [250]. Ähnliche Xylosekonzentrationsbereiche, in denen eine Endproduktinhibierung von Xylanasen stattfand, konnten auch Bachmann et al. und Bhattacharyya et al. beobachten [248, 249]. Demnach sind Xylanasen deutlich früher von der Endproduktinhibierung beeinflusst als Cellulasen, die erst ab 20 g/L Glukose eine Endproduktinhibierung zeigen [102, 252].

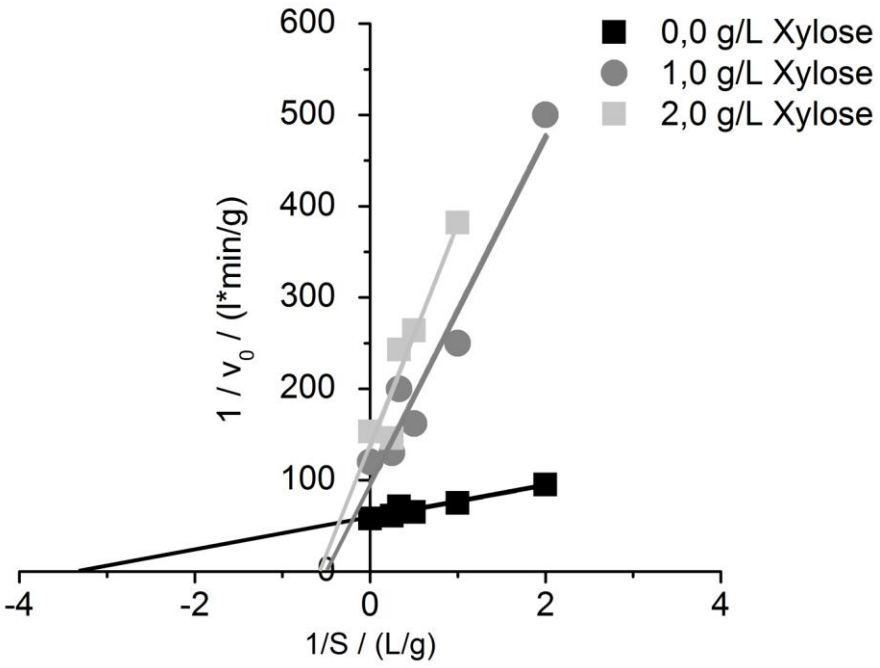


Abbildung 60: Lineweaver Burk Auftragung der reziproken Anfangsreaktions-geschwindigkeit $1/v_0$ gegen 1/S

Nach der Untersuchung der Endproduktinhibierung anhand des Modellsubstrates Xylan wurde der Einfluss der Endproduktinhibierung auf die Xyloseausbeute ebenfalls mit vorbehandeltem Weizenstroh als Susbtrat untersucht. Hierzu wurde bei einem Teil der

Reaktionsansätze nach 24 h das Hydrolysat entfernt und neue Enzymlösung ohne Xylose zu der Faserfraktion gegeben. Im Falle einer Endproduktinhibierung würde somit durch die Zugabe von frischem Enzym die Ausbeute signifikant erhöht werden. In Abbildung 61 ist die Xyloseausbeute in Abhängigkeit der Prozesszeit für die Einzelenzyme Accellerase XY und Cellic HTec sowie deren Kombination für die Ansätze mit und ohne Hydrolysatentfernung dargestellt.

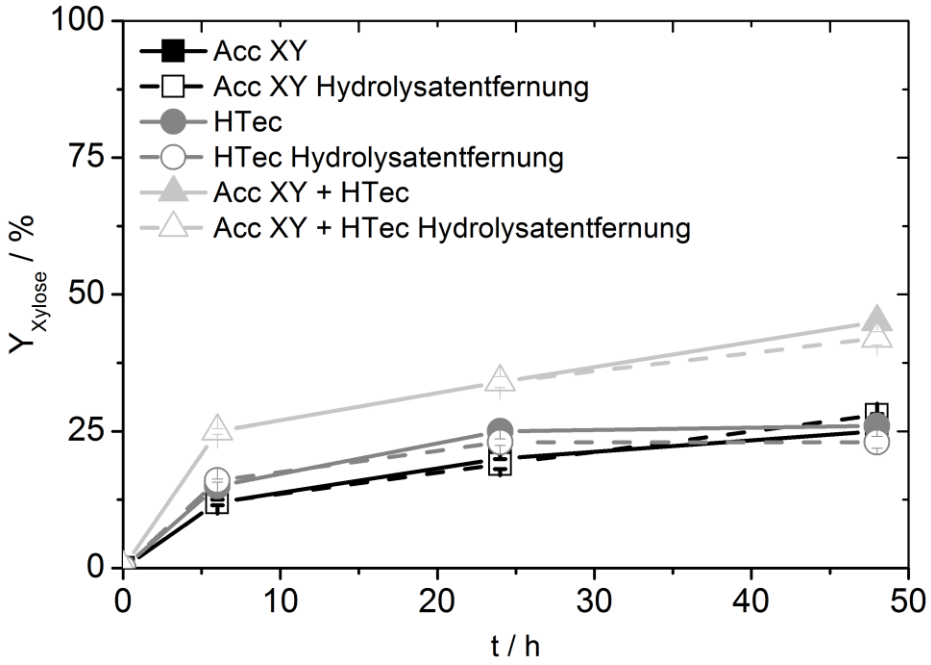


Abbildung 61: Ausbeute Y von Xylose in Abhängigkeit der Prozesszeit nach der enzymatischen Hydrolyse der LZ10 Faser (50 g/L) mit 1200 XU/gTS Accellerase XY (Acc XY) bzw. Cellic HTec (HTec) und der Kombination der beiden Präparate (jeweils 1200 XU/gTS). Bei einem Teil der Proben wurde nach 24 h das Hydrolysat entfernt und frische Enzymlösung dazugegeben (Hydrolysatentfernung).

Es konnte beobachtet werden, dass es trotz der Verwendung von neuer Enzymlösung nach 24 h weder bei den Einzelenzymen noch bei der Kombination zu einer Steigerung der Ausbeute kam. Obwohl bei den Hydrolseversuchen mit dem Modellsubstrat Xylan eine Endproduktinhibierung im Bereich von 1,0 g/L Xylose festgestellt werden konnte, konnte bei der Hydrolyse der Weizenstrohfasern die Endproduktinhibierung nicht als einziger limitierender Faktor identifiziert werden. Neben der Inhibition durch das Endprodukt Xylose mussten ebenfalls strukturelle Faktoren, die die Zugänglichkeit der Xylanfraktion einschränkten, einen limitierenden Einfluss auf die Xyloseausbeute gehabt haben. Die Zugänglichkeit der Xylanfraktion kann größtenteils durch Vergrößerung der spezifischen

Oberfläche bzw. Verkleinerung der Faserlänge oder durch die Entfernung von Lignin aus der Fasermatrix verbessert werden [53, 54, 56]. Aus diesem Grund wurde in weiteren Untersuchungen der Einfluss von strukturellen Faktoren wie Faserlänge (spezifische Oberfläche) und Vorbehandlungsmethode analysiert.

Einfluss der Faserlänge

Zur Untersuchung des Einflusses der Fasergröße auf die enzymatische Xylanhydrolyse wurden drei verschiedene Korngrößenklassen (unzerkleinert; d < 0,75 mm; d < 0,5 mm) eingesetzt. Die Partikelgröße bei unzerkleinertem Stroh variierte stark und war im Durchschnitt > 1 mm. Die Experimente sollten zeigen, in wie fern sich die Zugänglichkeit der Xylanfraktion durch Erhöhung der spezifischen Oberfläche verändern ließ.

In Abbildung 62 ist die Xyloseausbeute in Abhängigkeit der Prozesszeit für die unterschiedlichen Fasergrößen aufgezeigt. Es konnte festgestellt werden, dass eine Vergrößerung der spezifischen Oberfläche durch Zerkleinerung der Fasern keinen Einfluss auf die Xylanhydrolysierbarkeit hatte. Die Zugänglichkeit der Xylanfraktion konnte demnach durch Zerkleinerung der Fasern nicht erhöht werden.

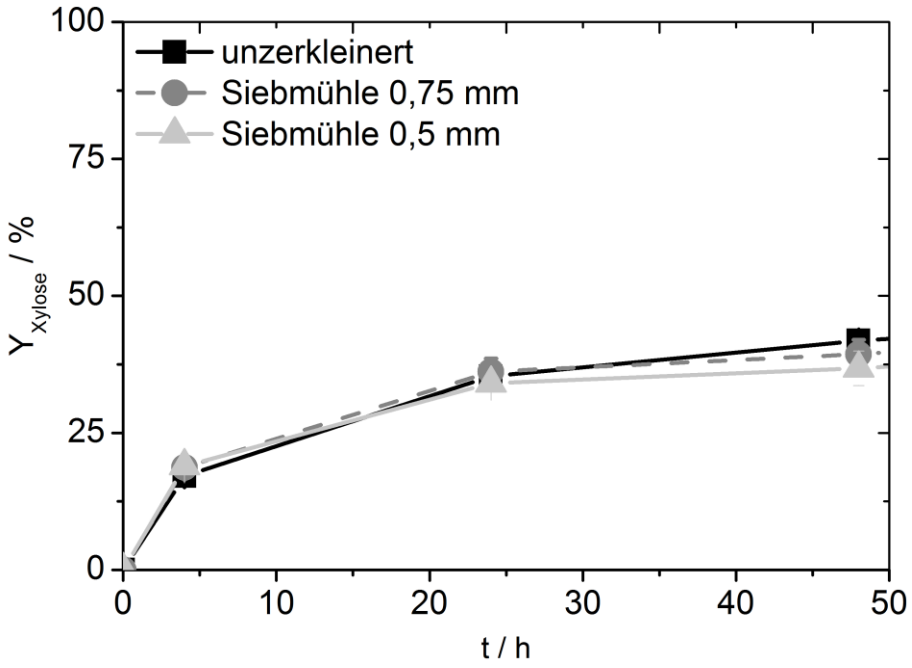


Abbildung 62: Ausbeute Y von Xylose in Abhängigkeit der Prozesszeit nach der enzymatischen Hydrolyse unterschiedlich mechanisch vorbehandelter LZ10 Fasern (50 g/L) mit 1200 XU/gTS Accellerase XY und 1200 XU/gTS Cellic HTec.

Einfluss der Vorbehandlungsmethode

Der Einfluss der Vorbehandlungsmethode auf die Hydrolysierbarkeit der Xylanfraktion in der Faser wurde bereits in Kapitel 4.1.1.1 erläutert. Die Daten zeigten, dass die Hydrolysierbarkeit sehr stark von der Vorbehandlungsmethode abhing.

Die Zugänglichkeit der Xylanfraktion in der Faser wurde durch eine erhöhte Delignifizierung verbessert. Eine ausreichende Delignifizierung wurde vor allem durch Ethanol- oder NaOH-haltige Lösemittel erreicht. Gokahle et al. konnte dies ebenfalls bestätigen. In diesem Fall führte die Delignifizierung der Rohstoffe Bagasse, Maisstroh und Jutefasern durch alkalische Vorbehandlung zu einer signifikanten Erhöhung (> Faktor 9) der Xylanausbeute [108].

Darüber hinaus zeigte sich, dass eine vermehrte Spaltung und Solubilisierung der Xylanfraktion zu einer Erhöhung der Hydrolysierbarkeit während der enzymatischen Hydrolyse führte. Eine ausreichende Spaltung und eine teilweise Solubilisierung der Xylanfraktion in der Faser wurde im Wesentlichen bei Temperaturen T > 160 °C erreicht. Auch Liavoga et al. konnten eine Erhöhung der Xylanhydrolysierbarkeit beobachten, sobald der Xylananteil in der Faser gespalten und teilweise solublisiert wurde [110].

Einfluss des Feststoffgehaltes

Neben der Produktinhibition, der Faserlänge und der Vorbehandlungsmethode wurde ebenfalls der Einfluss der Feststoffkonzentration auf die enzymatische Hydrolyse der Xylanfraktion untersucht. Hierzu wurde die Feststoffkonzentration im Bereich von 50 g/L bis 100 g/L und die Accellerase sowie die Cellic HTec-Dosierung im Bereich von 1200 XU/g_{TS} bis 2000 XU/g_{TS} variiert. Die Versuchspunkte wurden in Form eines zentral zusammengesetzten Versuchsplans mit der Software Design Expert V8.0 erstellt (siehe Anhang in Kapitel 7.3). Der Einfluss der Feststoffkonzentration und der Enzymdosierung wurde anhand einer Varianzanalyse ermittelt. In Abbildung 63 ist der funktionelle Zusammenhang zwischen der Zielgröße Xyloseausbeute und der Accellerase XY-Dosierung bei einer konstanten Dosierung von Cellic HTec mit 1200 XU/gTS dargestellt.

Die Varianzanalyse zeigte, dass die Xyloseausbeute im Wesentlichen von der Feststoffkonzentration abhängig war. Mit steigender Feststoffkonzentration konnte ein Rückgang der Xyloseausbeute festgestellt werden. Dieser Effekt wurde bisher nur bei der Hydrolyse von Cellulose mit Cellulasen beobachtet. Durch die erhöhte Feststoffkonzentration steigt die Viskosität der Fasersuspension. Dies hat zur Folge, dass die Reaktionsraten durch Limitierung der Stofftransportprozesse erniedrigt wurden [121].

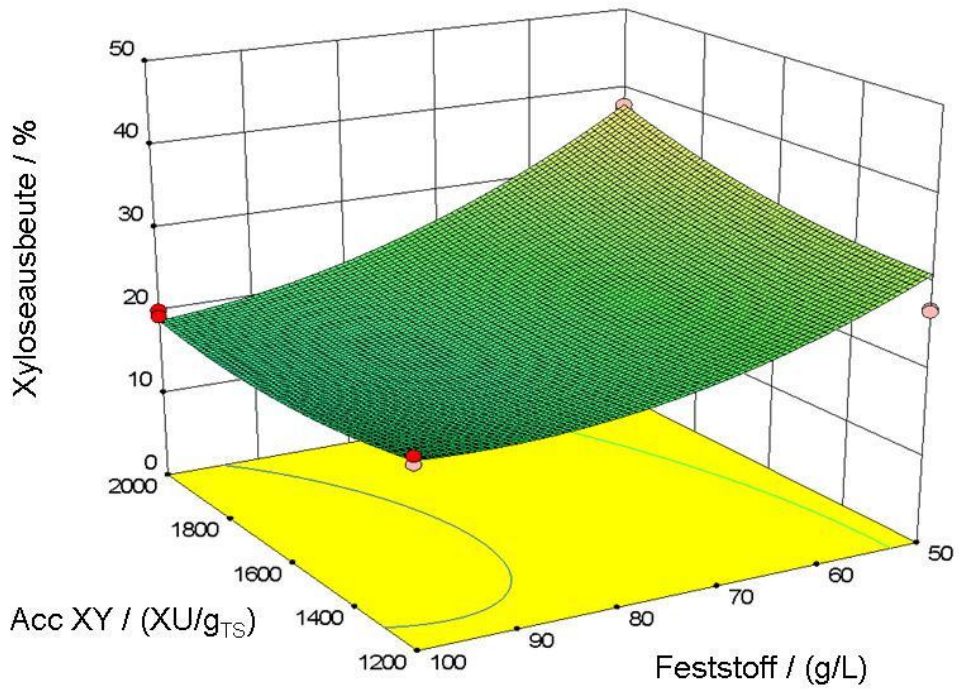


Abbildung 63: Xyloseausbeute nach der enzymatischen Hydrolyse (t = 48 h) in Abhängigkeit des Feststoffgehalts (NaOH-alkalisch vorbehandelte Weizenstrohfaser, 180 °C, 30 min, 1,45 % NaOH) und der Accellerase XY-Dosierung bei einer Cellic HTec Dosierung von 1200 XU/gTS.

Die Messdaten zeigten, dass Hydrolyseprozesse bei Feststoffkonzentrationen bis max. 50 g/L durchgeführt werden sollten. In diesem Fall konnten Ausbeuten von 35 - 40 % erreicht werden. Die freigesetzten Xylooligosaccharide konnten vollständig zu Xylose umgesetzt werden (F = 1,0). Hierbei konnten keine Glukose oder Glukooligosaccharide im Hydrolysat detektiert werden (S=1 g_{Xylan}/g_{Gesamt}). Die Gesamtausbeute an freigesetztem Xylan nach der alkalischen Vorbehandlung und enzymatischer Hydrolyse betrug in der vorliegenden Arbeit 60 %. Ein Vergleich des entwickelten Hydrolyseprozesses mit Daten aus der Literatur ist in Tabelle 26 dargestellt.

Mit den in dieser Arbeit ausgewählten Enzymen Cellic HTec und Accellerase XY konnten im Vergleich zum Stand der Technik wesentlich höhere Ausbeuten bei der Hydrolyse von vorbehandeltem Weizenstroh erreicht werden. Zudem konnte die Xylanfraktion wesentlich selektiver aus der Fasermatrix gelöst werden. Neben der Hydrolyse der festen Fasermatrix, kann die ausgewählte Enzymkombination zudem für die enzymatische Hydrolyse der

Aufschlussüberstände eingesetzt werden, um die gelösten Oligosaccharide zu Xylose umzusetzen.

Tabelle 26: Literaturvergleich der erzielten Xyloseausbeute Y, Selektivität S und dem Anteil an Xylose an der gesamten Menge an löslichen Xylosacchariden (F-Faktor) nach enzymatischer Hydrolyse von vorbehandeltem Weizenstroh.

Vorbehandlung	Enzym	Feststoffgehalt / (g/L)	Y[1] / %	S / (g/g_{Gesamt})	F	Ref.
Keine	Endoxylanase Bacillus sp,	20	< 10	k.A.	< 0,1	[106]
Keine	Endoxylanase Bacillus sp I-1018	20	< 10	k.A.	< 0,1	[107]
Saure Vorbehandlung	Multifect Xylanase	15	9	< 0,9	0,9	[110]
Aquasolv-Aufschluss	Multifect Xylanase	15	8	< 0,9	0,9	[110]
Ammoniak-Aufschluss 30 % v/v, 50°C,72 h	Endoxylanase T. xylanilyticus	25	20	> 0,9	<0,1	[111]
1,45 %NaOH-Aufschluss 190 °C, 30 min	Accellerase XY Cellic HTec	50	35 -40	0,9	1,0	Eigene Arbeit

[1] Ausbeute nach 48 h

4.2.2 Enzymatische Hydrolyse des Celluloseanteils mit Cellulasen

Wie in Kapitel 4.1 beschreiben, stand nach der Vorbehandlung, und im Falle von Weizenstroh nach der Xylanasebehandlung, eine cellulosereiche Faser zur Verfügung, die durch enzymatische Hydrolyse mit Hilfe von Cellulasen zu Glukose umgesetzt werden sollte. Das Ziel der Arbeit war es hierbei, dass ein Verfahren zur Hochfeststoff-Hydrolyse in einem skalierbaren Rührkessel entwickelt werden sollte, um Feststoffgehalte von > 10 % TS zu hydrolysieren. Wie bereits in Kapitel 2.5.2.2 erläutert, ist die Steigerung der

Feststoffkonzentration eine Grundvoraussetzung zur Etablierung eines wirtschaftlichen Hydrolyseprozesses [121, 125].

Zu Beginn der Verfahrensentwicklung wurden geeignete kommerzielle Cellulasepräparate miteinander verglichen und das beste Cellulasepräparat ausgewählt. Anschließend wurde die Hydrolyse der Cellulosefraktion bei hohen Feststoffgehalten im Schüttelkolben untersucht, um bereits frühzeitig erste Informationen über die erzielbaren Glukoseausbeuten und Konzentrationen bei technisch relevanten Feststoffkonzentrationen > 10 % TS zu erhalten.
Die Verfahrensentwicklung im Rührreaktorsystem wurde beispielhaft anhand von NaOH-alkalisch vorbehandelten Weizenstrohfasern durchgeführt, nachdem diese in ausreichenden Mengen zur Verfügung standen. Ausgehend von rheologischen Untersuchungen der Fasersuspensionen wurde ein geeignetes Rührorgan anhand des Mischzeitverhaltens und des Leistungseintrages in hochviskosen Fluiden ausgewählt. Zur Auswahl standen hierbei ein zweistufiger Schrägblattrührer und ein Segementwendelrührer (siehe Kapitel 3.3.2.1). Nach der Auswahl des Rührorgans wurde abschließend die Hydrolyse der Cellulosefraktion im entwickelten Hochfeststoffhydrolysereaktor untersucht und mit bereits vorhandenen Reaktionssystemen verglichen. Zur Beschreibung der Reaktionskinetik wurde abschließend ein Multireaktionsmodell eingesetzt, das in der Lage war, den Konzentrationsverlauf der Reaktionsprodukte zu beschreiben, um so die Hydrolysereaktion auf andere Reaktionsmaßstäbe übertragbar zu machen.

4.2.2.1 Auswahl von Cellulasen

Während bei der in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Hydrolyse der Xylanfraktion vor allem die Selektivität von Xylose im Vordergrund stand, war das Hauptziel der enzymatischen Hydrolyse der Cellulosefraktion eine möglichst hohe Glukosekonzentration bei hohen Gesamtausbeuten zu erhalten. Demnach wurden die Cellulasen anhand der erzielten Glukoseausbeute, der Selektivität S von Glukose und der erzielten F-Faktoren (Verhältnis Monomer zu Gesamtzucker) ausgewählt (Berechnung siehe Kapitel 3.3.1.2).
Zur Auswahl standen die Cellulasen Accellerase 1500, Celluclast 1.5L und Cellic CTec sowie die ß-Glukosidase Novozym 188. Wie aus Tabelle 27 ersichtlich ist, zeigte Celluclast 1.5L die geringste ß-Glukosidaseaktivität.

Tabelle 27: Übersicht über die gemessen Enzymaktivitäten der untersuchten Cellulasepräparate

Enzym	Cellulase (FPU/ml)	Xylanase / (U/ml)	Arabino-Furanosidase / (U/ml)	ß-Xylosidase / (U/ml)	ß-Glukosidase / (U/ml)
Accellerase 1500	148	780	-	4,8	529
Celluclast 1.5 L	27	1919	41,2	14,0	28
Novozyme 188	-	209	14,3	2,1	87
Cellic CTec	40	1667	50,1	46,7	890

Aus der Literatur ist bekannt, dass die ß-Glukosidase Novozym 188 zusätzlich zu Celluclast 1.5L eingesetzt werden muss, um die Cellulose vollständig zu Glukose umsetzen zu können und um eine Endproduktinhibierung der Cellulasen durch Cellobiose zu vermeiden [53, 102]. Aus diesem Grund wurde bei allen Cellulasepräparaten zunächst die ß-Glukosidase Novozym 188 zusupplementiert.

Ein Vergleich der Cellulasen Celluclast 1.5L, Cellic CTec und Accellerase 1500, die zusätzlich mit der ß-Glukosidase Novozym 188 supplementiert wurden, zeigte, dass das von der Fa. Novozymes neuentwickelte Präparat Cellic CTec die größte Glukoseausbeute (93 %), größte Selektivität (0,93 $g_{Glukose}/g_{Gesamt}$) und den größten F-Faktor (0,99) während der enzymatischen Hydrolyse von Organosolv-vorbehandeltem Weizenstroh (LZ10) aufwies. Dies ist in Abbildung 64 und Abbildung 65 dargestellt. Die Cellulase Celluclast 1.5L führte zwar zu einer identischen Glukoseausbeute, jedoch waren die Selektivität mit 0,85 $g_{Glukose}/g_{Gesamt}$ und der F-Faktor mit 0,95 im Vergleich zu Cellic CTec geringer. Die Cellulase Accellerase 1500 konnte mit 45 % keine ausreichende Glukoseausbeute erzielen. Daher wurden für die weiteren Untersuchungen Cellic CTec und Celluclast 1.5L betrachtet, während die Cellulase Accellerase 1500 nicht weiter untersucht wurde

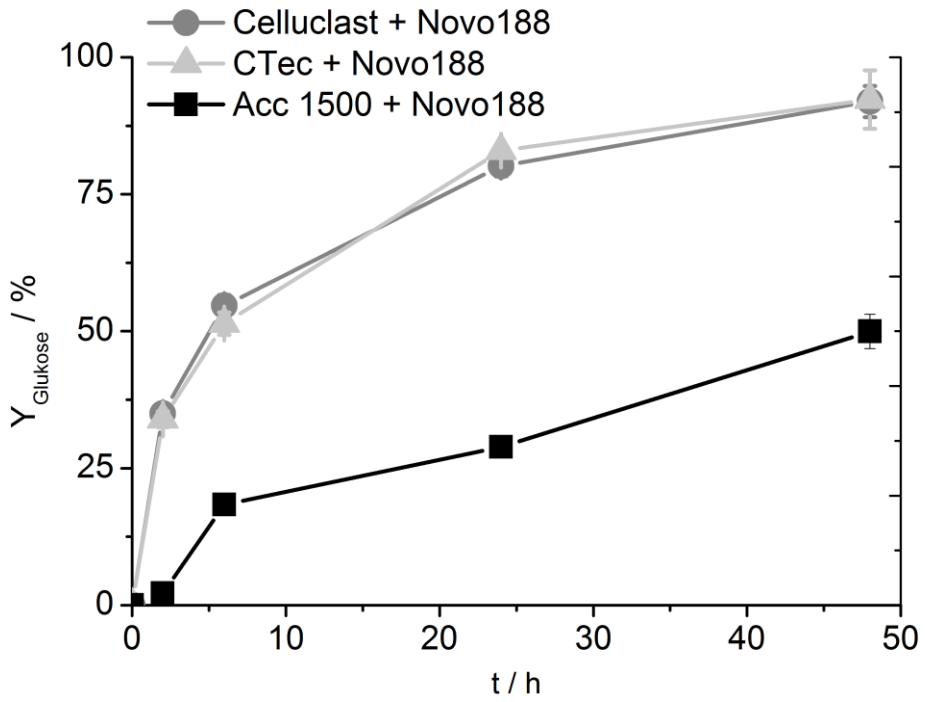


Abbildung 64: Ausbeute Y in Abhängigkeit der Prozesszeit nach der enzymatischen Hydrolyse der LZ10 Faser (50 g/L) mit 30 FPU/gTS Celluclast 1.5L (Celluclast), Cellic CTec (CTec), Accellerase 1500 (Acc 1500) sowie 50 CBU/gTS Novozym 188 (Novo188).

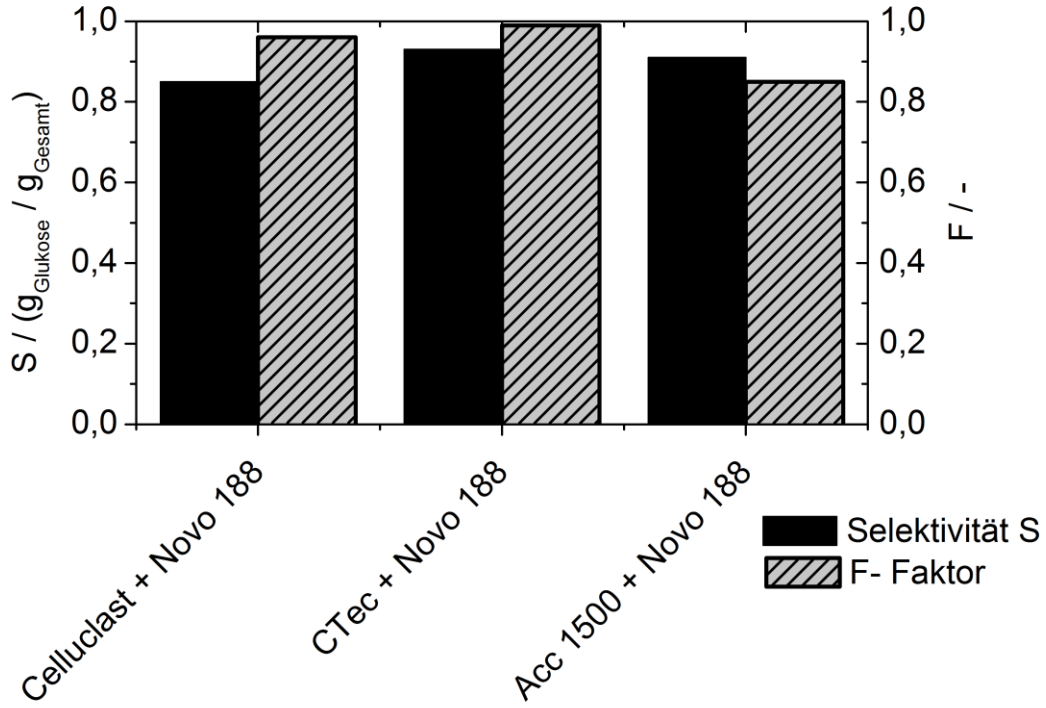


Abbildung 65: Selektivität S und F-Faktor (Verhältnis Glukose zu Glukose und Glukooligosacchariden) nach 48 h in Abhängigkeit der eingesetzten Cellulasekombinationen.

Nachdem Cellic CTec eine hohe ß-Glukosidasaktivität aufwies (siehe Tabelle 27), wurde in einem weiteren Schritt Cellic CTec ohne Novozym 188 eingesetzt, um zu untersuchen, ob die zusätzliche Supplementierung von Novozym 188 überhaupt nötig war. Der Verlauf der Glukoseausbeute mit und ohne Novozym 188 ist in Abbildung 66 veranschaulicht. Das Präparat Cellulcast 1.5L wurde zum Verlgeich ebenfalls mit und ohne Novozym 188 eingesetzt. Es konnte festgestellt werden, dass es möglich war, mit Hilfe der kommerziell erhältlichen Cellulase Cellic CTec effizient den Celluloseanteil von vorbehandelter Lignocellulose zu Glukose zu hydrolysieren, ohne eine zusätzliche ß-Glukosidase einzusetzen Im Vergleich zur Literatur wurde das Präparat Cellic CTec bisher noch nicht verwendet und untersucht. Oftmals wurden für die Hochfeststoffhydrolyse Celluclast 1.5L und Novo188 [53, 126, 128, 131] sowie vereinzelt Spezyme CP [121] und Cellulase GC220 [123] eingesetzt. Im Verlauf der Arbeit wurde von der Fa. Novozyme das Nachfolgeprodukt Cellic CTec 2 zur Verfügung gestellt. Dieses Präparat zeigte identische Eigenschaften wie Cellic CTec. Auch in diesen Fall konnte auf die zusätzliche Supplementierung mit Novozym 188 verzichtet werden.

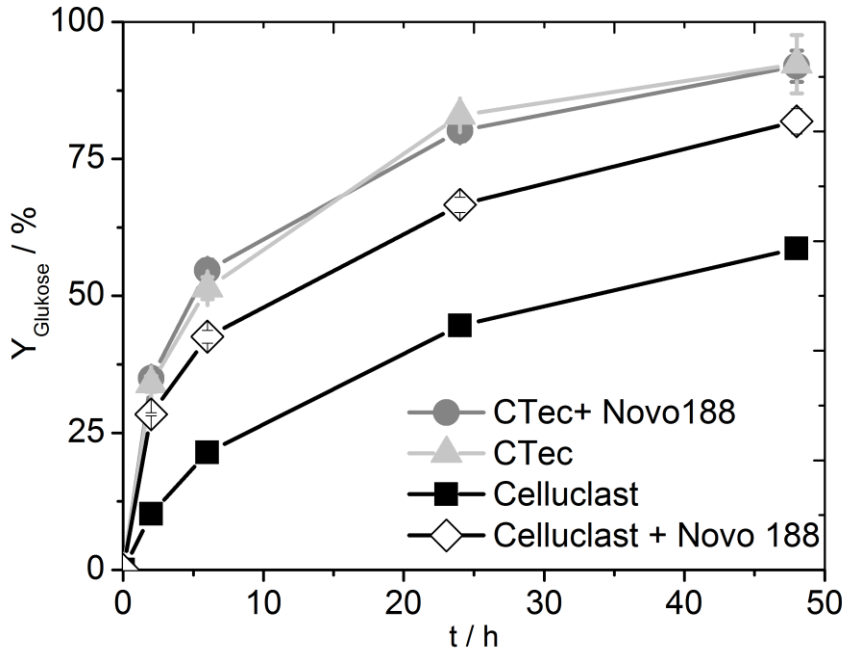


Abbildung 66: Glukoseausbeute Y in Abhängigkeit der Prozesszeit nach der enzymatischen Hydrolyse der LZ16 Faser (50 g/L) mit 30 FPU/gTS Celluclast 1.5L (Celluclast) und Cellc CTec (CTec) sowie 50 CBU/gTS Novozym 188 (Novo188).

4.2.2.2 Hochfeststoffhydrolyse im Schüttelkolben

Nachdem Cellic CTec als bestes Enzympräparat für die Hochfeststoffhydrolyse ausgewählt wurde, wurde anschließend die enzymatische Hydrolyse im Schüttelkolben betrachtet. Als Substrate wurden in dieser Arbeit Weizenstroh, Miscanthus und Pappelholz eingesetzt, die mit den optimierten Verfahren aufgeschlossen wurden (siehe Kapitel 4.1.2). Ziel der Experimente war es, bereits frühzeitig Informationen über die erzielbaren Glukoseausbeuten bei technisch relevanten Feststoffkonzentrationen > 10 % TS zu erhalten. Mit Hilfe der Hydrolyseexperimente im Schüttelkolben sollte zudem die optimale Cellulasedosierung ermittelt werden, um Ausbeuten von mindesten 70 % nach 48 h zu erreichen.

Die Response Surface Plots für die Glukoseausbeute nach 48 h in Abhängigkeit der Cellulasedosierung und der Feststoffkonzentration für NaOH vorbehandeltes Weizenstroh, H^+-EtOH-OS vorbehandelter Miscanthus und H^+-EtOH-OS vorbehandeltes Pappelholz sind in den Abbildung 67 bis Abbildung 69 dargestellt.

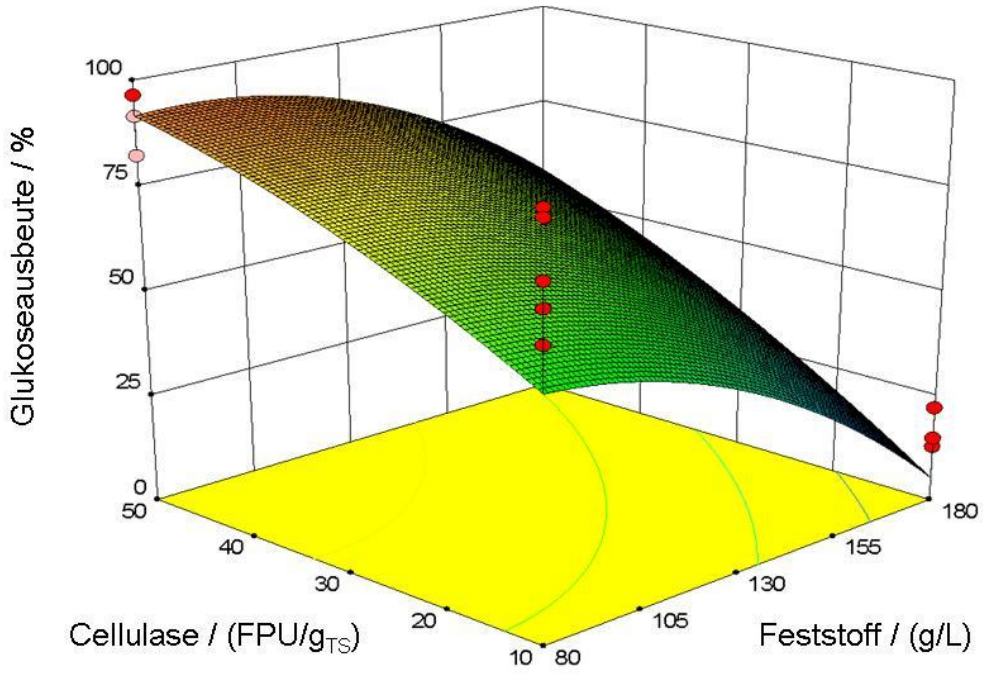


Abbildung 67: Glukoseausbeute in Abhängigkeit der Cellulasedosierung (Cellic CTec 2) und der Feststoffkonzentration nach 48 h enzymatischer Hydrolyse von NaOH-vorbehandeltem Weizenstroh (1,45 % NaOH, 180 °C, 30 min).

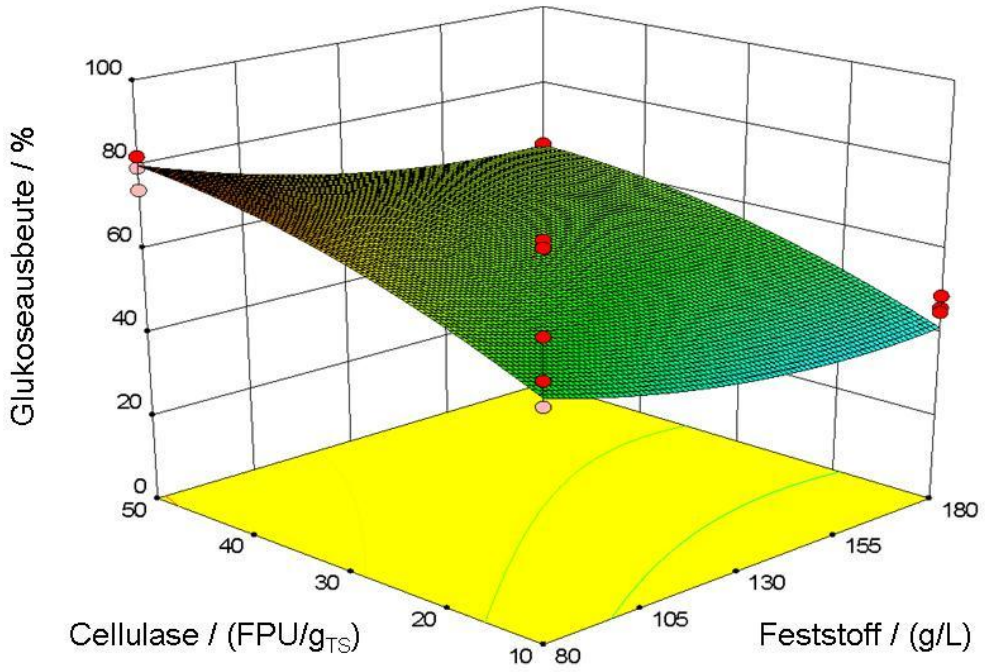


Abbildung 68: Glukoseausbeute in Abhängigkeit der Cellulasedosierung (Cellic CTec 2) und der Feststoffkonzentration nach 48 h enzymatischer Hydrolyse von H^+-EtOH-OS-vorbehandeltem Miscanthus (0,16 % H_2SO_4, 185 °C, 60 min, 50 % EtOH)

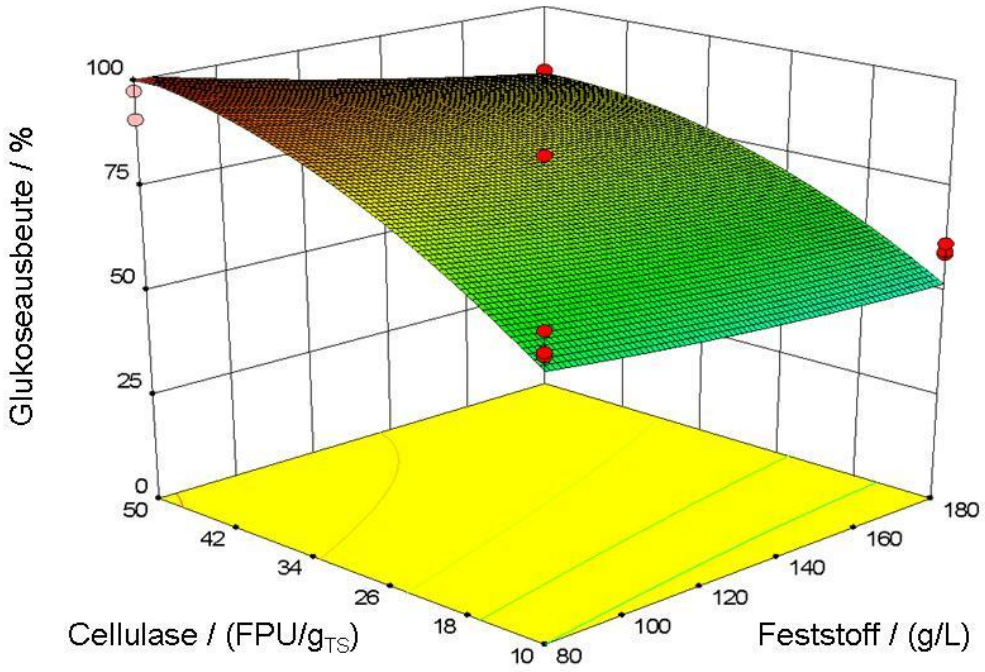


Abbildung 69: Glukoseausbeute in Abhängigkeit der Cellulasedosierung (Cellic CTec 2) und der Feststoffkonzentration nach 48 h enzymatischer Hydrolyse von H^+-EtOH-OS-vorbehandeltem Pappelholz (0,19 % H_2SO_4, 182 °C, 48 min, 50 % EtOH)

Bei Weizenstroh und Pappelholz konnte eine starke Abhängigkeit der Glukoseausbeute von der Feststoffkonzentration und der Cellulasedosierung beobachtet werden. Mit steigender Feststoffkonzentration fiel die Glukoseausbeute. Eine Reduktion der Cellulasedosierung hatte ebenfalls eine Erniedrigung der Ausbeute zur Folge. Die enzymatische Hydrolyse von Miscanthus war im untersuchten Versuchsraum im Wesentlichen von dem Feststoffgehalt beeinflusst. Mit steigendem Feststoffgehalt fiel die Ausbeute. Im Vergleich zu Weizenstroh und Pappelholz hatte die Cellulasedosierung jedoch einen geringen Effekt auf die Glukoseausbeute bei der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandeltem Miscanthus.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Steigerung der Feststoffkonzentration zu sinkenden Ausbeuten führt. Im Wesentlichen verursachen die erhöhten Feststoffkonzentrationen eine Stofftransportlimitation, die dazu führt, dass die effektive Reaktionsrate erniedrigt wird [135, 136]. Tabelle 28 zeigt einen Literaturvergleich der erzielten Glukoseausbeuten nach 48 h bei 15 % TS.

Tabelle 28: Vergleich der Hochfeststoffhydrolyse im Schüttelkolben mit 15 % TS.

Substrat / Vorbehandlung	Enzym	$Y_{Glukose}$ / %	Ref.
Reisstroh / AFEX	Cellulase 100L 30 FPU/g_{TS}	42	[119]
Maisstroh / Aufschluss mit verdünnter H_2SO_4	Spezyme CP 24 FPU/g_{TS}	60	[121]
Maisstroh / Aufschluss mit verdünnter H_2SO_4	GC 220 10 FPU/g_{TS}	55	[123]
Weizenstroh / Wet Explosion-Aufschluss	Celluclast 1.5L Novozym 188 20 FPU/g_{TS}	45	[122]
Weizenstroh / 1,45 % NaOH-Aufschluss	Cellic CTec2 30 FPU/g_{TS}	45	Eigene Arbeit
Miscanthus / H^+-EtOH-OS-Aufschluss	Cellic CTec2 30 FPU/g_{TS}	55	Eigene Arbeit
Pappelholz / H^+-EtOH-OS-Aufschluss	Cellic CTec2 30 FPU/g_{TS}	75	Eigene Arbeit

Es ist zu erkennen, dass die erzielten Glukoseausbeuten für Weizenstroh und Miscanthus vergleichbar mit denen aus der Literatur sind. Die Hydrolyse von Pappelholz zeigte hingegen wesentlich höhere Ausbeuten.

Für die Optimierung der Cellulasedosierung wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der empirischen mathematischen Gleichungen eine minimale Cellulasedosierung ermittelt, mit der es möglich war, innerhalb von 48 h eine Glukoseausbeute von 70 % bei maximaler Feststoffkonzentration zu erreichen. Ein ähnliches Optimierungskriterium zum Vergleich der Hydrolyseeffizienz wurde von Arantes und Saddler 2011 vorgestellt [131]. Anstatt 72 h Prozesszeit, die Arantes und Saddler betrachteten, wurde in dieser Arbeit 48 h als Endpunkt gesetzt, um frühzeitig Prozessbedingungen wie Feststoffkonzentration und Cellulasedosierung für eine effektive Hydrolyse mit Prozesszeiten < 48 h identifizieren zu können. Im Gegensatz zu Arantes und Saddler, die die minimale Cellulasedosierung mit Feststoffkonzentrationen von 20 g/L berechneten, wurden die Feststoffkonzentrationen > 100 g/L vorausgesetzt. In Tabelle 29 sind die ermittelten Cellulasedosierungen für die unterschiedlichen Fasertypen aufgezeigt.

Tabelle 29: Benötigte Cellulasedosierung Cellic CTec 2 zum Erreichen einer Glukoseausbeute von 70 % innerhalb von 48 h. Neben der Enzymdosierung sind die einzusetzende Feststoffkonzentration und die erzielbare Glukosekonzentration aufgelistet.

Substrat	FPU / gTS ($mg_{Protein}$/gTS)	Feststoff / (g/L)	Y_{48h} / %	Glukose / (g/L)
Weizen	29 (12,3)	121	70	63
Miscanthus	45 (19,2)	106	70	75
Pappel	25 (10,7)	180	70	109

Es konnte festgestellt werden, dass die vorbehandelte Pappel mit 25 FPU/g_{TS} die geringste Enzymdosierung benötigte, um innerhalb von 48 h einen Umsatz von 70 % zu erreichen. Hierbei konnten Feststoffkonzentrationen von 180 g/L eingesetzt werden, um 109 g/L Glukose zu erreichen. Für NaOH-vorbehandeltes Weizenstroh mussten 29 FPU/g_{TS} Cellic CTec 2 eingesetzt werden, um mit 121 g/L Fasern einen Umsatz von 70 % innerhalb von 48 h zu realisieren. Dies entsprach einer Glukosekonzentration von 67 g/L. Die größte

Cellulasedosierung mit 45 FPU/g_{TS} musste bei der Hydrolyse von Miscanthus verwendet werden. In diesen Fall wurden aus 106 g/L Fasern innerhalb von 48 h 75 g/L Glukose freigesetzt. Im Vergleich zu Arantes und Saddler konnten wesentlich geringere Mengen an Proteinbeladung eingesetzt werden, um die Fasern mit einen Umsatz von 70 % innerhalb von 48 h zu hydrolysieren [130, 131].

4.2.2.3 Rheologie von Fasersuspensionen am Beispiel von Weizenstroh

Wie in Kapitel 4.2.2.2 bereits beobachtet, führte eine Erhöhung der Feststoffkonzentration zu einer Reduktion der Glukoseausbeuten. Als Grund hierfür wird in der Literatur auf zunehmende Stofftransportlimitierungen verwiesen, die durch eine erhöhte Viskosität der Fasersuspension hervorgerufen werden [135, 136, 206]. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden. Mit steigender Feststoffkonzentration stieg auch die dynamische Viskosität auf bis zu 18 Pas bei 17,5 % TS an (siehe Abbildung 70). Die erhöhten Viskositäten führten demnach in den Experimenten im Schüttelkolben zu einer Reduzierung des konvektiven und diffusiven Stofftransports. Demnach musste eine Intensivierung der Reaktionsprozesse durch die Übertragung des Reaktionssystems mit direktem Leistungseintrag realisiert werden.

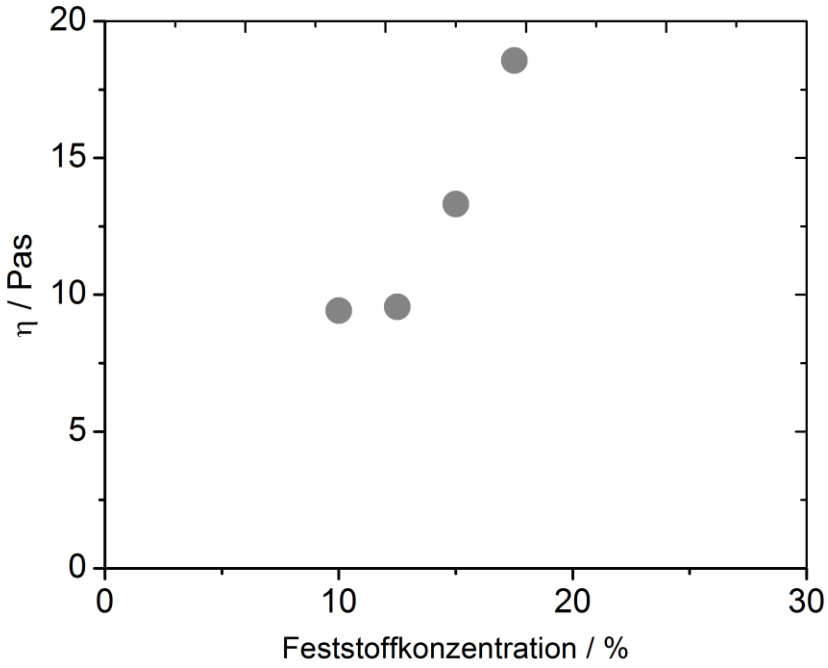


Abbildung 70: Zusammenhang zwischen dynamischer Viskosität η und der Feststoffkonzentration bei einer Scherrate von γ = 60 /s für NaOH-vorbehandeltes Weizenstroh

Aufgrund der Beschaffenheit der Fasermatrix konnten nur Feststoffkonzentrationen > 17,5% gemessen werden. Bei TS > 17,5 % war der Probenkörper zu trocken und zu instabil, nachdem die flüssige Phase in die Poren aufgenommen wurde. Diese Quellung der Fasermatrix führte zu einer stetigen Erhöhung der Viskosität. Ausgelöst wurde die Quellung der Faser durch den erhöhten Xylananteil von 11 %. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine derartige Quellung auf einen erhöhten Anteil an Xylan zurückgeführt werden kann [253].

Die Zunahme der Viskosität mit steigendem Feststoffgehalt für Lignocellulose-Fasersuspensionen konnten auch von Lu et al. [254] und Rosgaard et al. [129] bestätigt werden. Die Arbeitsgruppen konnten ebenfalls ein scherverdünnendes Verhalten der Fasersuspensionen feststellen. In der vorliegenden Arbeit konnte dies bei den Weizenstroh-fasern ebenfalls festgestellt werden, denn die Fasersuspension zeigte ähnlich wie langkettige Polymerlösungen ein scherverdünnendes (strukturviskoses) Verhalten. Mit steigender Scherrate konnten sich demnach die Fasern in Richtung der Scherung orientieren, so dass die dynamische Viskosität verringert wurde [255]. Der Zusammenhang zwischen der dynamischen Viskosität (bzw. Schubspannung) und der Scherrate wurde anschließend mit dem Ostwald de Waele-Potenzgesetz beschrieben [256]. Die charakteristischen Parameter wie der Konsistenzindex K und der Fließindex m sind Tabelle 30 aufgelistet.

Tabelle 30: Konsistenzindex K und Fließindex m des Ostwald de Waele-Potenzgesetzes für die Fasersuspensionen von NaOH-vorbehandeltem Weizen bei unterschiedlichen Feststoffkonzetrationen

Feststoffgehalt / %	K	m
10	815,2	0.022
15	1297,8	0.023
20	1565,4	0,032

Zur Abschätzung der auftretenden Re-Zahlen während der Hydrolyse im Rührkesselreaktor wurden zunächst die auftretenden Scherraten γ mit Hilfe der Gleichung von Metzner und Otto für den Schrägblatt- und Segmentwendelrührer berechnet [203].

$$\gamma = kn \qquad 4\text{-}1$$

Hierbei wurde der Proportionalitätsfaktor k für einen Schrägblattrührer mit k = 13 [257] und für einen Segmentwendelrührer mit k = 35 [204] abgeschätzt. Anhand der Gleichung von Metzner und Otto wurden während der enzymatischen Reaktion die auftretenden Scherraten im Bereich von 50 - 70 s^{-1} (60 - 120 rpm) ermittelt. Mit Hilfe des funktionellen Zusammenhangs zwischen der Viskosität und der Scherrate konnten somit die effektiven Re-Zahlen wie folgt ermittelt werden:

$$\mathrm{Re}_{eff} = \frac{nd^2\rho}{\eta_{eff}} \qquad 4\text{-}2$$

Die Abschätzung ergab, dass Re-Zahlen Re < 10 zu erwarten waren. Dies bedeutete, dass durch die hohen Viskositäten ein laminarer Strömungszustand vorlag [204, 206], bei dem keine turbulenten Verwirbelungen auftraten. Aufgrund der langsamer ablaufenden Stofftransportprozesse im laminaren Bereich, musste somit im nächsten Schritt ein geeignetes Rührorgan ausgewählt werden, das in der Lage war, bei hohen Fluidviskositäten eine ideale Durchmischung des Reaktors zu gewährleisten.

4.2.2.4 Auswahl eines Rührorgans anhand der Mischzeit- und Leistungscharakteristik

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die enzymatische Hydrolyse im Schüttelkolbensystem bei hohen Feststoffkonzentrationen im Wesentlichen durch die auftretenden hohen Viskositäten im Bereich zwischen 5 - 18 Pas limitiert waren, sollte die Reaktion mit Hilfe des direkten Energieeintrags über Rührorgane intensiviert werden. Für die enzymatische Hydrolyse der vorbehandelten Fasern wurden hierzu ein doppelstufiger Schrägblattrührer und ein Segmentwendelrührer für die Anwendung im Bereich der Hochfeststoffhydrolyse konzipiert. Diese Rührergeometrien wurden anhand ihres Mischzeitverhaltens und ihrer Leistungscharakteristik miteinander verglichen, um ein geeignetes Rührorgan auszuwählen, das in der Lage war, bei hohen Fluidviskositäten eine ideale Durchmischung des Reaktors zu gewährleisten. Das Homogenisierungsverhalten von unterschiedlichen Rührergeometrien bei unterschied-lichen Strömungszuständen (Re-Zahlen) kann durch die Mischzeitcharakteristik aufgedeckt werden [206, 207, 256]. In Abbildung 71 ist die dimensionslose Mischzeit $n\theta$ in Abhängigkeit der Re-Zahl für den Schrägblattrührer und den Segmentwendelrührer dargestellt. Die Mischzeiten wurden anhand einer Farbstoffschlierenmethode mit Carboxymethylcellulose als Fluid analysiert (siehe Kapitel 3.3.2.3) [258].

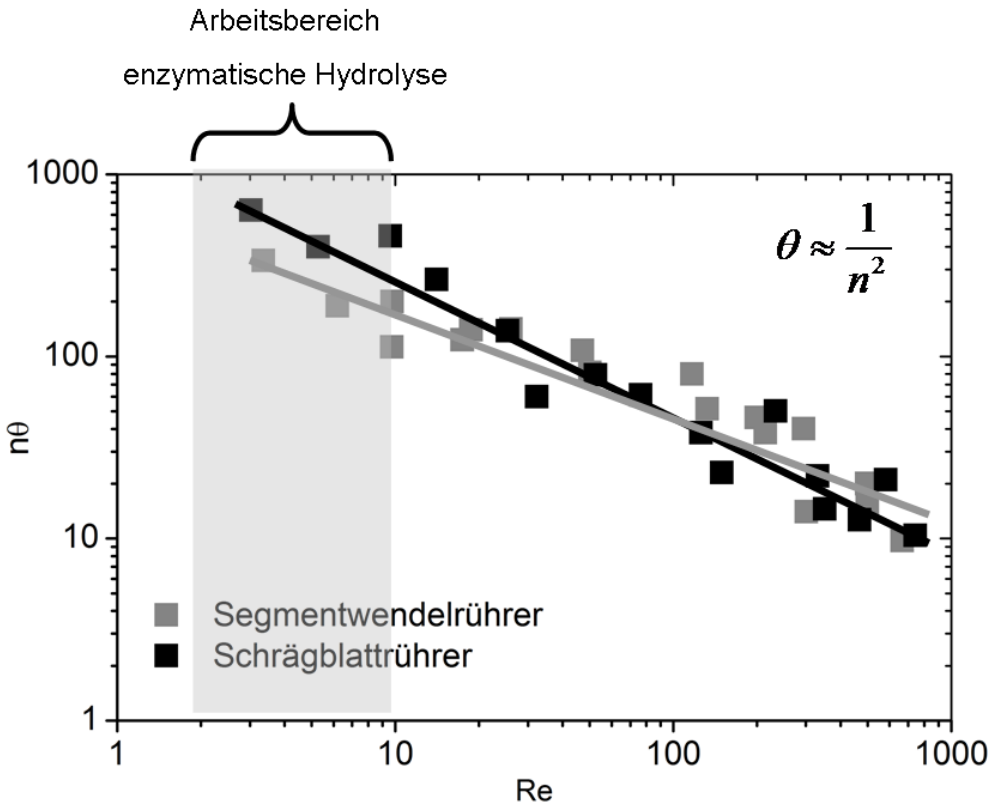


Abbildung 71: Dimensionslose Mischzeit in Abhängigkeit der Re-Zahl für den Schrägblattrührer und den Segmentwendelrührer. Als Analysemethode wurde eine Farbstoffschlierenmethode eingesetzt.

Es konnte festgestellt werden, dass der Segmentwendelrührer bei kleineren Re Zahlen < 10, also bei niedrigen Drehzahlen und/oder hohen Viskositäten (= laminarer Strömungszustand) ein besseres Homogenisierungsverhalten zeigte, als der Schrägblattrührer. Im Gegensatz zum Schrägblattrührer konnte beim Segmentwendelrührer zum Erreichen eines bestimmten Homogenisierungszustandes eine geringere Rührerdrehzahl eingestellt werden. In beiden Fällen bestand ein reziproker Zusammenhang zwischen der dimensionslosen Mischzeit und der Re-Zahl. Demnach nahm die Mischzeit im untersuchten Re-Bereich von 2 - 10^4 mit dem Quadrat der Umfangsgeschwindigkeit ab. Die Bereiche Re > 10^4 sind bei Experimenten im Labormaßstab nur sehr schwer zugänglich, nachdem die Mischzeiten $\theta \rightarrow 0$ gehen und es somit zu großen Messungenauigkeiten kommt. Die Messungen in Re-Bereich > 10^4 werden daher nur in Behältern technischer Größe mit sehr niedrigviskosen Fluiden durchgeführt [206].

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass sich beim Homogenisieren des RBB-Farbstoffs mit dem Schrägblattrührer in hochviskosen Fluiden Totzonen nahe der Behälterwand

ausbildeten. Diese hatten zur Folge, dass sich beim Schrägblattrührer ein inhomogener Vermischungsverlauf ausbildete, während der Segmentwendelrührer homogen den Farbstoff verteilte. Dies ist in Abbildung 72 exemplarisch für eine 1,5 % CMC Lösung nach 1 min bei 80 rpm dargestellt.

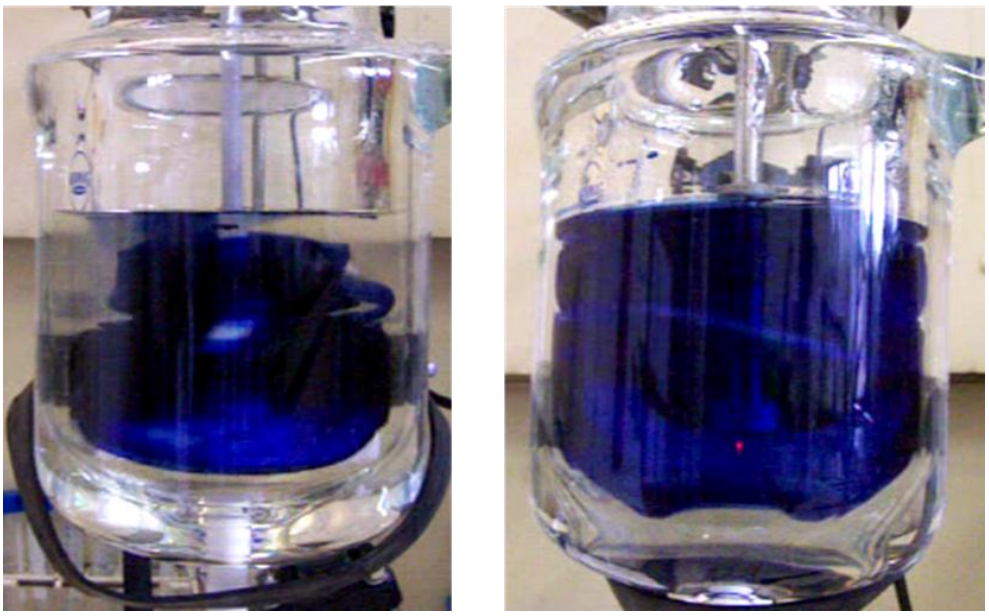


Abbildung 72: Abbildung des Homogenisierungszustandes von RBB nach 1 min für (A) den doppelstufigen Schrägblattrührer und (B) den Segmentwendelrührer bei 1,5 % CMC Lösung mit n = 80 rpm

Neben der Mischzeitcharakteristik wurde auch die Leistungscharakteristik der beiden Rührorgane ermittelt, um Aussagen über den benötigten Energieeintrag und über die benötigte Motorleistung des Rührwerks treffen zu können. In Abbildung 73 sind die gemessenen Leistungscharakteristiken für den Segmentwendelrührer und den doppelstufigen Schrägblattrührer im Re-Bereich von $2 - 10^4$ dargestellt. Wie bereits bei der Mischzeitcharakteristik erwähnt, müssen für Messungen im Re-Bereich > 10^4 Behälter im technischen Maßstab mit niedrigviskosen Fluiden eingesetzt werden [206].

Bei der Leistungscharakteristik konnte für beide Rührergeometrien im Bereich Re = 1 - 1000 ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen Ne und Re beobachtet werden, d.h. die eingetragene Leistung erhöhte sich proportional zu n^2, d^3 bzw. η^1. Der Segmentwendelrührer zeigt bei Re-Zahlen < 30 aufgrund der größeren Querschnittsfläche orthogonal zur Strömungsrichtung größere Drehmomente an der Rührwelle. Dementsprechend war in diesen Re-Bereichen ein höherer Leistungseintrag im Fluid vorhanden. Dieser höhere Leistungseintrag führt zwar zu einer größeren Durchmischung des

Systems (siehe Mischzeitcharakteristik), muss aber bei der Maßstabauslegung mit einer höheren Motorleistung berücksichtigt werden. Der größere Leistungsbedarf wird jedoch durch das oben bereits erwähnte bessere Mischzeitverhalten kompensiert, da zum Erreichen eines bestimmten Homogenisierungsgrades für den Segmentwendelrührer eine geringere Drehzahl eingestellt werden konnte.

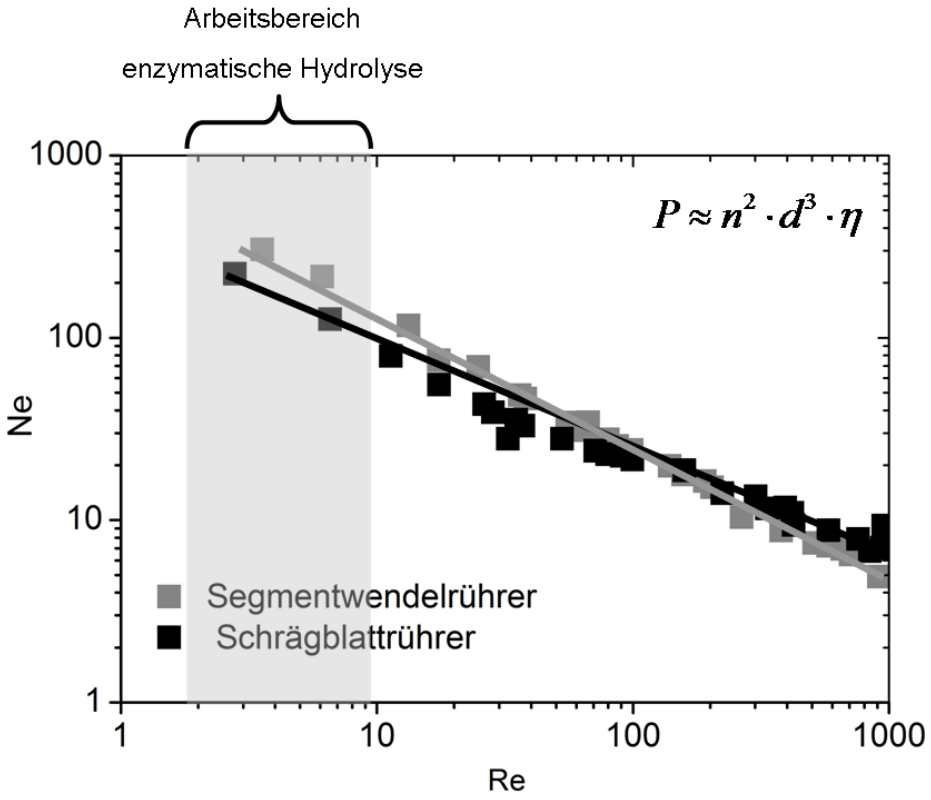


Abbildung 73: Gemessene Leistungscharakteristik (Ne vs. Re) für den Schrägblattrührer und den Segmentwendelrührer.

Für die Auswahl einer geeigneten Rührergeometrie wurde das Mischzeitverhalten als Hauptkriterium definiert, nachdem bereits in Vorversuchen die Stofftransportlimitation als Haupteinflussfaktor identifiziert werden konnte. Der Segmentwendelrührer war demnach für die Realisierung einer Hochfeststoffhydrolyse besser geeignet als der Schrägblattrührer.

4.2.2.5 Hochfeststoffhydrolyse (HFH) im Rührreaktor

Im Rahmen der durchgeführten Arbeit sollte ein Verfahren entwickelt werden, das eine effiziente Hydrolyse der cellulosereichen Faser bei Feststoffgehalten > 10 % gewährleistet. Wie bereits gezeigt werden konnte, führten die hohen Feststoffkonzentrationen zu hohen

Viskositäten im Bereich >> 5 Pas. Somit konnten aufgrund der hohen Feststoffkonzentrationen zunehmend Stofftransportlimitationen bei eigenen Vorversuchen im Schüttelkolben aber auch aus Daten der Literatur identifiziert werden [129, 136, 254, 259]. Durch Übertragung des Reaktionssystems von einem Schüttelkolben auf ein Rührreaktorsystem sollte demnach eine Intensivierung der Hydrolysereaktion durch direkten Leistungseintrag in die Suspension erzielt werden. Als Rührorgan wurde ein Segmentwendelrührer eingesetzt (siehe Kapitel 4.2.2.4). In Tabelle 31 ist ein Vergleich der Glukoseausbeuten nach 48 h und der Zeitpunkt der Verflüssigung während der enzymatischen Hydrolyse von Weizenstrohfasern bei 20 % TS mit Cellic CTec2 in den Reaktionssystemen Schüttelkolben und 1 L-Rührreaktor dargestellt.

Tabelle 31: Vergleich der Glukoseausbeute und der Zeit der Verflüssigung des Reaktionsansatzes zwischen Schüttelkolben und 1 L-Rührreaktorsystem für die mit NaOH vorbehandelten Weizenstrohfasern (20 % TS). Die enzymatische Hydrolyse wurde bei 50 °C mit 20 FPU/g_{TS} Cellic CTec 2 bei pH 5 durchgeführt.

Reaktionssystem	Y_{48h} / %	Verflüssigung / h
Schüttelkolben	30	60
1 L-Reaktor	76	8

Es konnte beobachtet werden, dass der Zeitpunkt der Verflüssigung im Falle des Rührreaktorsystems deutlich früher einsetzte. Dies bedeutete eine schnellere Hydrolyse der Fasermatrix und eine deutliche Reduzierung der Viskosität. Dies konnte durch die Messung der freigesetzten Glukose und durch Ermittlung der Glukoseausbeuten bestätigt werden. Bei den mit NaOH vorbehandelten Weizenstrohfasern konnte nach 48 h im Schüttelkolben eine Ausbeute von 30 % ermittelt werden, während im Rührreaktorsystem sich die Ausbeute auf 76 % erhöhte. Durch die wesentlich höheren Viskositäten der Weizenstrohfasersuspensionen wurden im Schüttelkolben signifikante Stofftransportlimitierungen erreicht. Durch Intensivierung der Stofftransportvorgänge im Rührreaktorsystem konnte die enzymatische Hydrolyse der Weizenstrohfasern jedoch wesentlich verbessert werden. Dieses Phänomen konnte auch von Qin bestätigt werden [127].

Zur Identifizierung möglicher Regime, bei denen Stofftransportlimitationen auftraten, wurden anschließend die erzielten Glukoseausbeuten bei der Hydrolyse im 1 L-Rührreaktor gegenüber dem eingesetzten Feststoffgehalt aufgetragen [137, 259]. Die erzielten Glukosekonzentrationen wurden darüber hinaus in Relation zu den theoretisch möglichen

Glukosekonzentrationen bei 100 % Ausbeute und 80 % Ausbeute gesetzt (siehe Abbildung 74).

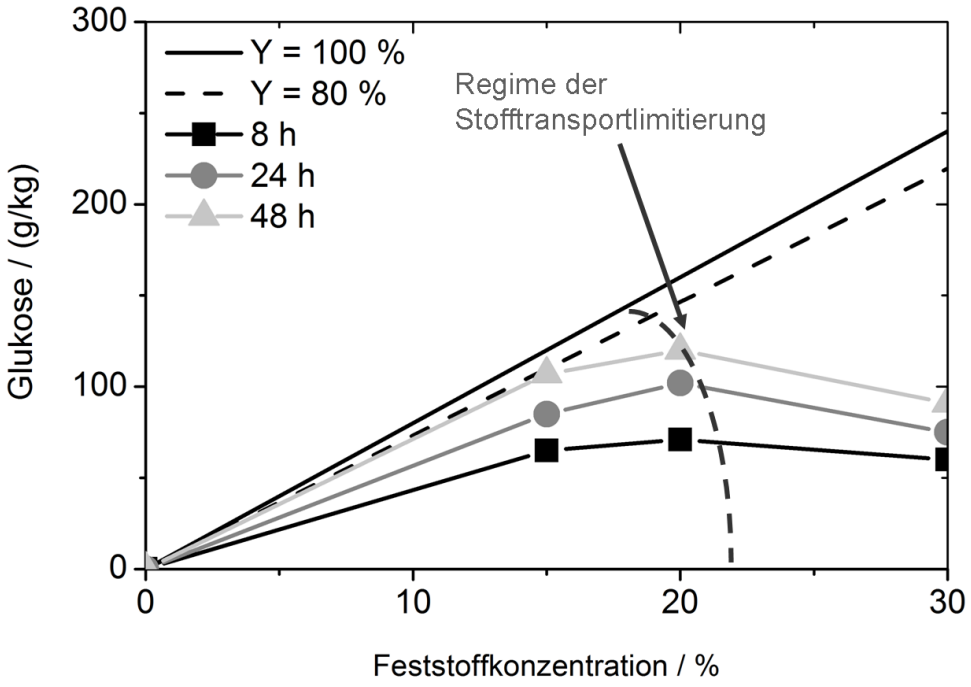


Abbildung 74: Glukosekonzentration nach der enzymatischen Hydrolyse von mit NaOH behandelten Weizenstrohfasern Cellic CTec2 in Abhängigkeit des Feststoffgehalts für verschiedene Reaktionszeiten im 1 L-Reaktor mit dem Segmentwendelrührer (80 rpm, pH 5,0, 50 °C).

Bei den Weizenstrohfasern wurde eine signifikante Stofftransportlimitation ab 20 % TS beobachtet, nachdem die Weizenstrohfasersuspensionen ab TS > 10 % sehr hohe Viskositäten aufwiesen (siehe Kapitel 4.2.2.3). Diese Grenze von 20 % TS wurde ebenfalls von Hodge et al. beobachtet [137, 259]. Die erhöhte Viskosität der Weizenstrohfasersuspension wurde vor allem durch Quellung der Fasermatrix hervorgerufen, die durch den höheren Xylananteil hervorgerufen wurde [253]. Aus der Auftragung von Abbildung 74 ist weiterhin ersichtlich, dass die enzymatische Hydrolyse von Fasersubstraten niemals den theoretischen Wert von 100 % erreichen kann. Mit Reaktionszeiten von $t \rightarrow \infty$ streben die Glukoseausbeuten immer einen Wert von $Y_{max} < 100$ % an. Dieser definierte Endwert Y_{max} hängt von der Faserart und der Vorbehandlungsmethode ab, während er durch Stofftransportlimitationen kaum beeinflusst wird, da bei ausreichend langen Reaktionszeiten dieser Endwert erreicht werden kann [136]. Aus detaillierten Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass mit fortschreitender Celluloseumsetzung die möglichen Adsorptionsstellen für CBH reduziert werden. Dies führt zur unvollständigen Umsetzung der Cellulose aufgrund von strukturellen

Limitierungen [136]. Bei den in der Arbeit untersuchten Fasern konnte festgestellt werden, dass Y_{max} bei 80 % lag. In der Literatur wurde von Werten für Y_{max} von 60 % [117] bis 80 % berichtet [137, 259]. Der Beginn der Stofftransportlimitierung wurde hierbei im Bereich > 20 % TS ermittelt. Die Beobachtungen in dieser Arbeit waren somit übereinstimmend mit der Literatur. In Tabelle 32 ist ein Vergleich der erzielten Ausbeuten mit Werten aus der Literatur dargestellt.

Tabelle 32: Vergleich der erzielten Glukoseausbeuten bei der Hochfeststoffhydrolyse mit unterschiedlichen Reaktorsystemen.

Rohstoff / Vorbehandlung	Reaktor	TS / %	Y / % (Zeit)	Ref.
Weizenstroh / Dampfextrusion	Horizontaler Trommelreaktor mit Paddelrührer	10 20 40	80 62 45 (96 h)	[53, 124, 125]
Maisstroh / Aufschluss mit verdünnter H_2SO_4	High Solids Bioreactor HSBR Horizontaler Trommelreaktor	20 30	62 47 (72 h)	[137]
Pappelholz / Organosolv-Aufschluss	Horizontaler Reaktor mit PEG-Mixer	20	60 (48 h)	[127]
Fichte / SO_2-Steam Explosion	Vertikaler Rührkessel mit Impeller-rührer	10	55 (72 h)	[128].
Gerstenstroh / Dampf-Aufschluss	Vertikaler Rührkessel mit Impeller-rührer	15	68 (48 h)	[129]
Weizenstroh / NaOH-Aufschluss	Vertikaler Rührkessel mit Segment-wendelrührer	15 20 30	80 76 45 (48 h)	Eigene Arbeit

Es konnte festgestellt werden, dass das in dieser Arbeit entwickelte Reaktorkonzept sehr effizient Lignocellulosehaltige-Substrate bei hohen Feststoffgehalten hydrolysieren konnte. Während in der Literatur bei Feststoffgehalten von 20 % TS Ausbeuten von 60 % bis 65 %

mit Hydrolysezeiten > 48 h erzielt werden konnten, wurde mit dem Segmentwendelrührer eine Ausbeute für Weizenstroh von 76 % innerhalb von nur 48h erreicht.

4.2.2.6 Reaktionskinetik der Hochfeststoffhydrolyse

Zur Beschreibung des Konzentrationsverlaufs von Glukose während der HFH wurde anschließend ein Multireaktionsmodell (MRM) erstellt, das bereits bei enzymatischen Hydrolysen von den Arbeitsgruppen Kadam und Zheng mit Feststoffgehalten bis zu 8 % TS eingesetzt wurde [209, 210]. In dem Multireaktionsmodell gingen sowohl die Adsorption der Cellulasen auf der Fasermatrix, als auch die unspezifische Adsorption auf Lignin und die Produktinhibition der Cellulasen durch Glukose, Cellobiose und Xylose ein (siehe Kapitel 3.3.3). Effekte der Stofftransportlimitierung wurden jedoch mit dem Modell von Kadam und Zheng nicht berücksichtigt [209, 210]. Die durchgeführten Arbeiten sollten demnach drei Ziele verfolgen: (1) die Übertragung des Modells auf die Hochfeststoffhydrolyse > 10 % TS, (2) die Evaluierung des Modells in Bereichen der Stofftransportlimitation und (3) die Anpassung des Modells für den Fall, dass Stofftransportlimitationen nicht beschrieben werden können.

In Abbildung 75 sind die gemessenen Glukosekonzentrationen und die mit dem MRM-Modell berechneten Konzentrationsverläufe von mit NaOH-vorbehandeltem Weizenstroh im Bereich von 10 - 20 % TS aufgezeigt. Bei der Hydrolyse von Weizenstroh konnte festgestellt werden, dass die mit dem MRM-Modell berechneten Konzentrationsverläufe bei Feststoffkonzentrationen bis 15 % TS die Messdaten mit ausreichender Genauigkeit (rel. Abweichung < 8 %) beschrieben werden konnten. Bei einer Feststoffkonzentration von ≥ 20 % TS lagen die Messwerte deutlich unter dem berechneten Konzentrationsverlauf. Demnach konnte das MRM-Modell keine Vorhersagen für Feststoffkonzentrationen treffen, bei denen signifikante Stofftransportlimitationen auftraten.

Unter Einbeziehung eines sogenannten Effectivness Faktor ε konnte das MRM-Modell um den Einfluss der Stofftransportlimitation erweitert werden. Der Effectivness Faktor ε ergibt sich aus dem Verhältnis der effektiven zu der theoretischen Produktbildungsrate von Glukose ohne Stofftransportlimitierung [137]:

$$\varepsilon = \frac{r_{Glukose,eff}}{r_{Glukose,theo}} \qquad 4\text{-}3$$

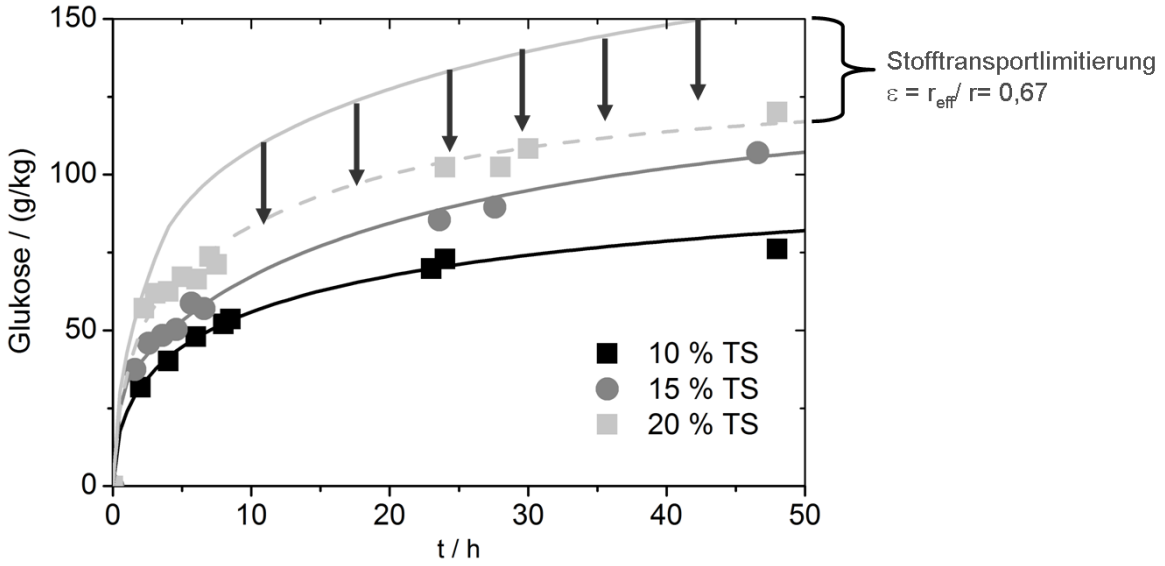


Abbildung 75: Gemessene Glukosekonzentration nach enzymatischer Hydrolyse von mit NaOH behandeltem Weizenstrohfasern mit 20 FPU/g_{TS} Cellic CTec2 und berechnetes Multireaktionsmodell in Abhängigkeit der Reaktionszeit für verschiedene Feststoffkonzentrationen.

Durch den Einsatz des Segmentwendelrührers konnte der Gültigkeitsbereich des MRM-Modell auf bis zu 15 % TS im Falle des Weizenstrohs erstmalig erweitert werden. Für höhere Feststoffkonzentrationen mussten aufgrund der Stofftransportlimitation ein sogenannter Effectivness Faktor ε miteinbezogen werden. Mit dieser Erweiterung konnte ebenfalls der Reaktionsverlauf im Bereich bis 20 % TS beschrieben werden.

4.2.2.7 Zusammenfassende Bemerkungen zum entwickelten Hochfeststoffhydrolyse-Verfahrens (HFH)

Wesentliche Verbesserungen in der Wirtschaftlichkeit der enzymatischen Hydrolyse von Lignocellulose lassen sich vor allem durch Erhöhung der Faserkonzentration erreichen [113, 115, 260]. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit ein Verfahren zur Hochfeststoffhydrolyse in einem skalierbaren Reaktionssystem entwickelt werden.

Um frühzeitig in der Prozessentwicklung Aussagen über die Hydrolysierbarkeit der Faserfraktionen bei hohen Feststoffgehalten (> 10 % TS) zu erhalten, wurde in dieser Arbeit erstmals mit Hilfe eines statistischen Versuchsplans die minimale Enzymdosierung ermittelt, bei der innerhalb von 48 h eine Glukoseausbeute von 70 % bei maximaler Feststoffkonzentration erreicht wurde. Die Ergebnisse der Schüttelkolbenexperimente zeigten, dass die Hydrolysierbarkeit in der Reihenfolge Miscanthus < Weizenstroh < Pappel zunahm.

Bereits bei diesen Untersuchungen im Schüttelkolben konnte festgestellt werden, dass durch die Erhöhung der Feststoffkonzentration die Ausbeuten reduziert wurden. Die rheologischen Messungen zeigten, dass durch die Erhöhung des Feststoffgehalts die Viskosität der Suspensionen anstieg. Dies führte dazu, dass die Hydrolyse durch die Stofftransportlimitierung beeinflusst war.

Um eine Intensivierung der Hydrolyseprozesse realisieren zu können, wurde das Reaktionssystem von einem Schüttelkolben auf ein skalierbares Rührreaktorsystem übertragen. Hierfür wurden ein doppelstufiger Schrägblattrührer und Segmentwendelrührer eingesetzt. Mit Hilfe von grundlegenden Untersuchungen zum Leistungseintrag und zur Mischzeitcharakteristik konnte festgestellt werden, dass der Segmentwendelrührer bei hohen Viskositäten ein besseres Homogenisierungsverhalten zeigte als der Schrägblattrührer.

Im Vergleich zur Hydrolyse im Schüttelkolben, konnte bei der Hydrolyse im Rührreaktor der Zeitpunkt der Verflüssigung deutlich reduziert werden und die Ausbeute nach 48 h wurde gleichermaßen signifikant erhöht. Eine Intensivierung des Hydrolyseprozesses war demnach mit dem Segmentwendelrührer realisierbar.

Die Hydrolyse im 1 L-Rührreaktor wurde exemplarisch mit NaOH vorbehandeltem Weizenstroh durchgeführt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass das in dieser Arbeit entwickelte Reaktorkonzept im Vergleich zu Reaktorsystemen aus der Literatur sehr effizient Lignocellulose-Substrate bei hohen Feststoffgehalten innerhalb von 48 h hydrolysieren konnte. Während in der Literatur bei Feststoffgehalten von 20 % TS Ausbeuten von 60 % bis 65 % erzielt werden konnten [124, 126-129, 137, 259], wurde mit dem Segmentwendelrührer eine Ausbeute von 76 % von NaOH-vorbehandeltem Weizenstroh erreicht. Es zeigte sich, dass aufgrund von Stofftransportlimitierung bei Feststoffkonzentrationen > 20 % TS eine signifikante Reduzierung der Hydrolyserate auftrat. Diese Grenze wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe Hodge beobachtet [137, 259].

Die anschließende Beschreibung der Reaktionskinetik konnte mit dem sogenannten Multireaktionsmodell MRM beschrieben werden. Im Gegensatz zur Literatur konnte in dieser Arbeit erstmals das MRM für Hydrolysen bei TS > 10 % eingesetzt werden. Das MRM berücksichtigt keine Effekte der Stofftransportlimitierung, so dass eine Erweiterung des Modells mit dem sogenannten Effectivness Faktor ε erfolgte. Dieser ergab sich aus dem Verhältnis der Reaktionsraten mit und ohne Stofftransportlimitierung. Die Anpassung an die Messwerte zeigte, dass im Falle des Weizenstrohs bei 20 % TS die Reaktionsrate um 33 % reduziert wurde ($\varepsilon = 0{,}67$).

4.3 Abtrennung von Abbauprodukten aus zuckerhaltigen Prozessströmen

In den vorherigen Kapiteln wurde sowohl die Vorbehandlung der lignocellulosehaltigen Rohstoffe Weizenstroh, Miscanthus und Pappelholz (siehe Kapitel 4.1), als auch die Verfahrensentwicklung der enzymatischen Hydrolyse von den jeweiligen Faserfraktionen mit Xylanasen und Cellulasen dargestellt (siehe Kapitel 4.2). In diesem Kapitel soll abschließend die Entwicklung von Verfahren zur Abtrennung von Lignocellulose-Abbauprodukten aus xylosehaltigen Aufschlusslösungen vorgestellt werden.

Wie bereits in Kapitel 2.6.1 erwähnt, werden die Cellulose, die Hemicellulose und das Lignin in der Faser während der Vorbehandlung von Lignocellulose mit chemischen oder physikalisch-chemischen Verfahren zu Zucker- und Ligninabbauprodukten wie Furfural, HMF, Ameisensäure oder phenolische Komponenten abgebaut. Diese Abbauprodukte liegen dann gelöst in den xylosereichen Aufschlusslösung vor und wirken sich inhibierend auf Mikroorganismen und Enzyme aus, so dass die fermentative Produktion von beispielsweise Ethanol aus Xylose beeinträchtigt wird [139, 140]. Um die störenden Abbauprodukte abzutrennen und die Fermentierbarkeit der Aufschlusslösung zu verbessern, werden daher sogenannte Detoxifikationsverfahren eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde zum Einen die Detoxifikation mit Hilfe einer Laccase von *T. versicolor* untersucht und weiterentwickelt, um selektiv phenolische Komponenten durch Oxidation und Polymerisation aus den Aufschlusslösungen zu entfernen (siehe Kapitel 4.3.1). Zum Anderen wurden adsorptive Verfahren mit hydrophoben Adsorbern und Anionenaustauschern (AIEX) untersucht, um hydrophobe Komponenten und organische Säuren aus den Aufschluss-lösungen abzutrennen (siehe Kapitel 4.3.2). Die entwickelten und optimierten Verfahren sollten zu einem flexiblen zweistufigen Kombinationsverfahren verknüpft werden, um eine vollständige Abtrennung aller Abbauprodukte zu realisieren. Die Detoxifikationswirkung der entwickelten Verfahren wurde abschließend anhand von Modellkultivierungen von *P. stipitis* evaluiert (siehe Kapitel 4.3.3).

4.3.1 Laccase-katalysierte Detoxifikation von phenolischen Komponenten

Die Detoxifikation von Aufschlusslösungen mit Hilfe von Laccasen stellt ein sehr selektives, enzymatisches Verfahren zur Entfernung der phenolischen Komponenten dar [143, 160]. Die wasserlöslichen phenolischen Komponenten werden hierbei durch Oxidation zu wasserunlöslichen niedermolekularen Ligninen polymerisiert und können aus der

Aufschlusslösung abgetrennt werden. Diese Lignine bieten ein großes Potential zur weiteren Verwendung im Bereich von ligninbasierten Werkstoffen [261, 262]. Bei der Laccase-katalysierten Detoxifikation werden im Gegensatz zur Extraktion oder der $Ca(OH)_2$-Detoxifikation keine weiteren Prozesschemikalien benötigt und die in der Aufschlusslösung enthaltenen Zucker (v.a. Xylose und Xylooligosaccharide) werden vollständig zurückgewonnen.

In diesem Kapitel 4.3.1 soll zunächst auf grundlegende Vorversuche zur Laccase-katalysierten Polymerisation mit freier Laccase eingegangen werden, in denen die Verwendung eines Redox-Mediators, der Sauerstoffverbrauch während der Reaktion und die Charakterisierung der Reaktionsprodukte mittels Größenausschlusschromatographie untersucht wurden. Anschließend wurde die Laccase auf epoxy- und aminofunktionalisierten Trägern immobilisiert, um eine Wiederverwendung des Enzyms zu realisieren. Die unterschiedlichen Immobilisate wurden anhand ihrer Beladungskapazität, ihrer Reaktivität und ihrer Langzeitstabilität charakterisiert, um ein geeignetes Trägermaterial für weitere Untersuchungen auswählen zu können.

In weiteren Schritten wurde die Detoxifikation mittels freier und immobilisierter Laccase mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung optimiert. Es sollten hierbei die Zusammenhänge zwischen Substratkonzentration und Enzymdosierung aufgezeigt werden. Mit Hilfe der ermittelten optimalen Enzymdosierung wurden für eine Maßstabsübertragung kinetische Untersuchungen durchgeführt, die als Basis für eine Modellierung der Reaktionskinetik des Organosolv-Aufschlusslösungen herangezogen wurden. Als Modellansatz wurde ein reversibles System ausgewählt, das bereits bei der Laccase-katalysierten Degradation von Farbstoffen eingesetzt wurde [214, 215]. Abschließend soll die Neuentwicklung eines In-Situ-Verfahrens (ISPR) zur Abtrennung von wasserunlöslichen phenolischen Komponenten aus Aufschlusslösungen mit immobilisierter Laccase dargestellt werden. Hierbei konnten die phenolischen Komponenten durch Polymerisation auf der Trägeroberfläche aus der Aufschlusslösung isoliert werden.

4.3.1.1 Vorversuche zur Laccase-katalysierten Polymerisation von phenolischen Komponenten mit freier Laccase

Für die Oxidation von phenolischen Komponenten benötigt die Laccase molekularen Sauerstoff als Cofaktor. Die gebildeten Intermediate, oftmals instabile Phenoxyradikale, polymerisieren schließlich zu höher molekularen Verbindungen [173, 176]. Mit dem Einsatz sogenannter Mediatoren kann das Redoxpotential der Laccase (0,5 - 0,8 V) je nach pH-Wert

und Mediator auf bis zu 0,9 - 1,1 V erhöht werden. Damit können auch nicht-phenolische Komponenten, sogenannte Lignine, oxidiert werden [263, 264]. In den ersten Untersuchungen sollte daher ermittelt werden, ob ein zusätzlicher Mediator die Degradation von phenolischen Komponenten verbessert. Als Substrate wurden sowohl Modellsubstrate als auch eine Organosolv-Aufschlusslösung eingesetzt. Die Modellsubstrate waren hierbei so gewählt, dass jeweils ein Vertreter der Phenolsäuren (Vanillinsäure), der Phenolaldehyde (Vanillin) und der Phenolketone (Acetosyringon) betrachtet wurde [145]. Die Organosolv-Aufschlusslösung stammte aus einem Verfahren mit hohem Severity-Faktor (LZ10, 220°C, 2 h, log $R''_0 = 8{,}61$), um eine Versuchsmatrix mit einer hohen Konzentration an Abbauprodukten (Worst-Case Szenario) untersuchen zu können.

In Abbildung 75 ist der Reaktionsumsatz X nach 60 min für die Laccase-katalysierte Oxidation von Vanillin (Phenolaldehyd), Vanillinsäure (Phenolsäure), Acetosyringon (Phenolketon) und einer Organosolv-Aufschlusslösung mit und ohne Violursäure als Mediator dargestellt.

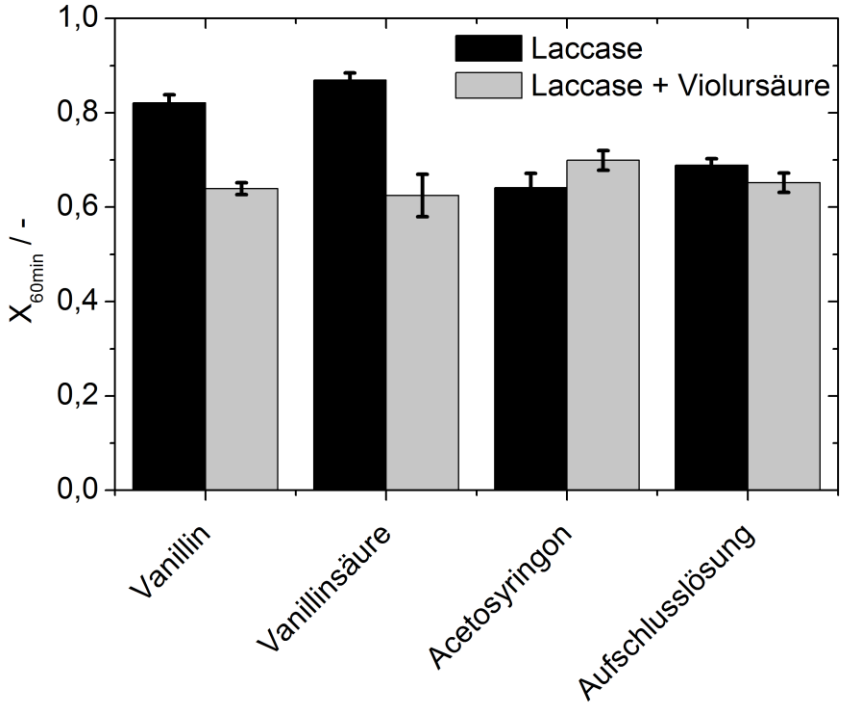


Abbildung 76: Reaktionsumsatz X nach 60 min für die Laccase- und Laccase-Mediator-katalysierte Oxidation (0,32 U/mL) verschiedener Modellsubstrate (1 mM) und der Aufschlusslösung LZ10 (20 mM phenolische Komponenten) in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,75) bei 45 °C.

Es konnte festgestellt werden, dass eine zusätzlich Zugabe von Violursäure als Mediator keine Verbesserung des Reaktionsumsatzes für die Modellsubstrate und für die

Aufschlusslösung zur Folge hatte. Das Redoxpotential der Laccase von *T. versicolor* war demnach ausreichend für die Oxidation der Modellsubstrate und der Aufschlusslösung. Eine zusätzliche Dosierung des Mediators war somit nicht notwendig. Dies konnte von Jurado et al und Jönnson et al. ebenfalls festgestellt werden [143, 160].

Durch Messung der Sauerstoffkonzentration (DO) konnten zu keinem Zeitpunkt DO-Werte < 1 mg/mL im Reaktionssystem festgestellt werden, so dass keine Limitation der Reaktion durch Sauerstoff vorlag. Dies ist in Abbildung 77 gezeigt.

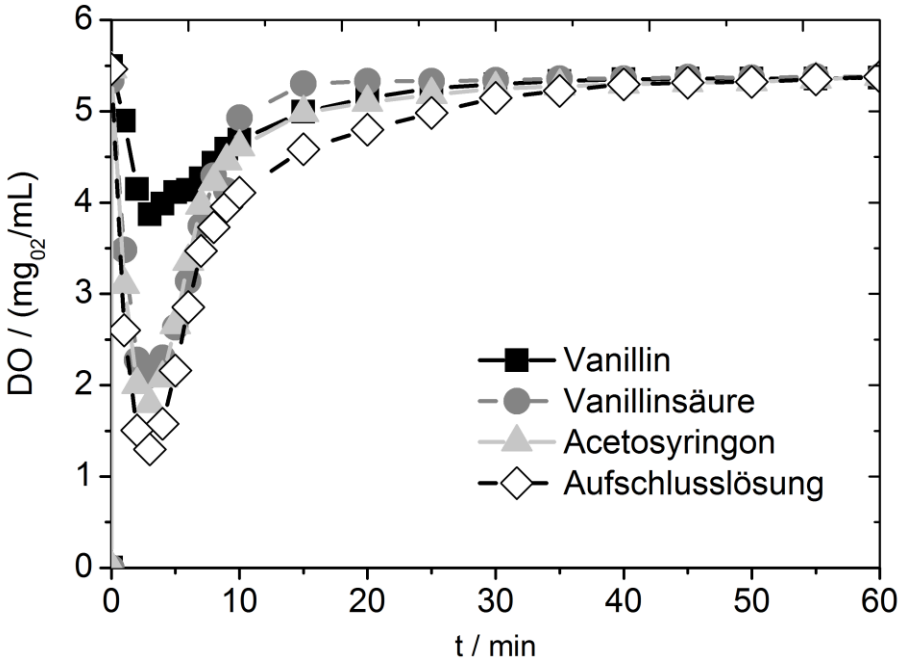
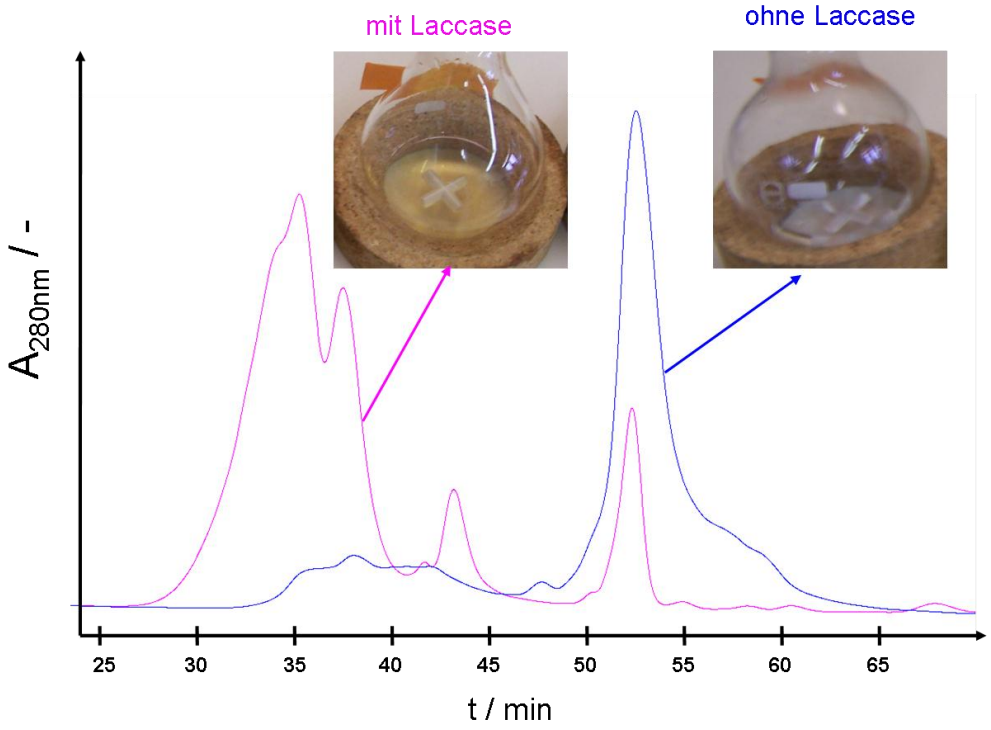


Abbildung 77: Gelöstsauerstoffkonzentration (DO) in Abhängigkeit der Reaktionszeit für die Laccase-katalysierte Oxidation verschiedener Modellsubstrate und der Aufschlusslösung LZ10.

Bereits durch visuelle Beobachtung konnte festgestellt werden, dass es im Falle von Vanillin, Vanillinsäure und der Aufschlusslösung zu einer Bildung von unlöslichen Polymerisationsprodukten kam. Im Falle von Acetosyringon wurde eine dunkelrote Färbung der Reaktionslösung beobachtet, die auf eine Bildung von chinoiden Strukturen hinwies. Eine Analyse der Reaktionsprodukte mit Größenausschlusschromatographie (SEC) vor und nach der Laccase-katalysierten Oxidation ergab, dass es im Falle von Vanillin, Vanillinsäure und der Aufschlusslösung zu einer Polymerisation kam. Die Größenausschlusschromatogramme von Vanillinsäure und Organosolv-Aufschlusslösung sind beispielhaft in Abbildung 78 A und B dargestellt. Die weiteren Chromatogramme von Vanillin und Acetodsyringon sind im Anhang in Kapitel 7.6 in Abbildung 109 dargestellt.

(A)



(B)

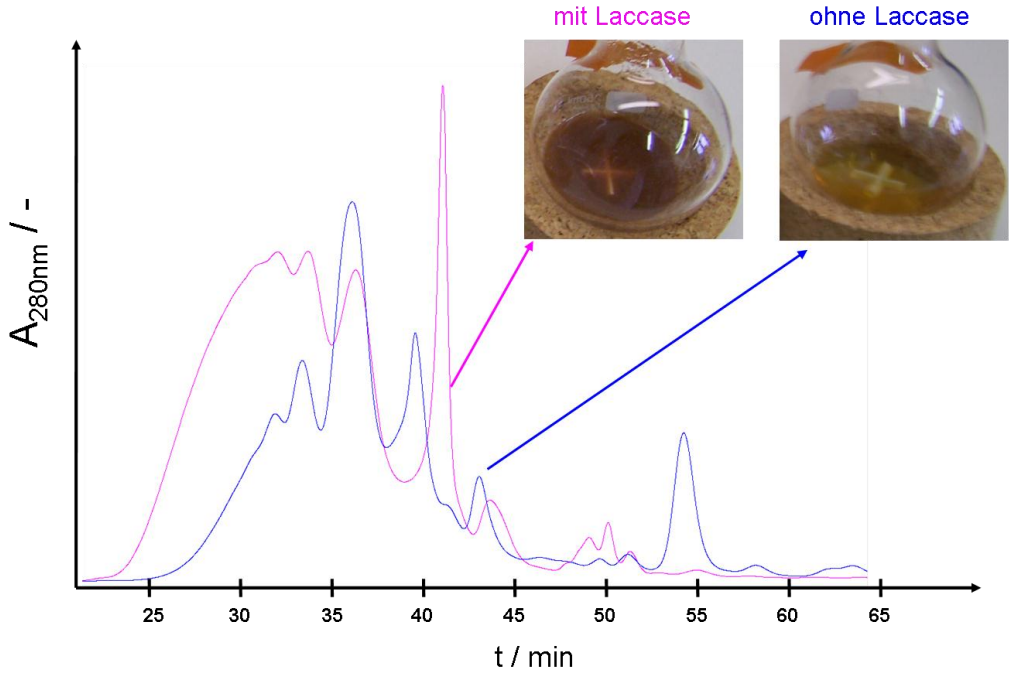


Abbildung 78: Chromatogramm der SEC-Analyse für die Laccase und Laccase-Mediator katalysierte Oxidation von Vanillinsäure (A) und der Aufschlusslösung LZ10 (B).

Bei Acetosyringon konnte keine Vergrößerung der Molmasse von den Reaktionsprodukten beobachtet werden. Es ist bekannt, dass Acetosyringon mit Hilfe von Laccase zu einem

Chinon oxidiert wird und keine Polymerisationsreaktionen eingeht [265, 266]. Im Falle von Vanillin und Vanillinsäure sind bereits Polymerisationsreaktionen beobachtet worden. Die postulierten Polymerisationsreaktionen starten hierbei durch die Bildung eines Phenoxy-radikals (para-Stellung). Hierbei können 5'-5'- und 4-O-5'-Bindungen zwischen zwei Monomeren ent-stehen. Der Polymerisationsgrad kann dabei n = 5 erreichen [267-270]. Eine Mischung unterschiedlicher phenolischer Komponenten zeigt demnach bei der Laccase-katalysierten Oxidation tendenziell eine Vergrößerung des Molekulargewichts und die Bildung eines unlöslichen Reaktionsproduktes.

Dies konnte bei den durchgeführten Untersuchungen mit einer Organosolv-Aufschlusslösung ebenfalls bestätigt werden. Juardo et al. konnte bei der Laccase-katalysierten Detoxifikation ein Steam Explosion Weizenstroh-Aufschlusslösung ebenfalls eine Erhöhung des Molekulargewichts feststellen [160]. Demnach ist die Polymerisationsreaktion von phenolischen Komponenten unabhängig von der Vorbehandlungsmethode. Die Laccase-katalysierte Oxidation von phenolischen Komponenten führt also insgesamt zu der Bildung von wasserunlöslichen Polymerisaten. Diese unlöslichen Polymerisate können dann in einem weiteren Schritt abgetrennt werden, um die Aufschlusslösung zu detoxifizieren.

4.3.1.2 Immobilisierung der Laccase und Charakterisierung der Immobilisate

In dem vorherigen Kapitel 4.3.1.1 wurde die Enzym-katalysierte Detoxifikation mit Hilfe einer freien Laccase vorgestellt. Ein wichtiger Aspekt der Verfahrensentwicklung von biokatalytischen Verfahren stellt generell die Rückgewinnung des Enzyms dar, um den wiederholten Einsatz des Katalysators zu gewährleisten und dadurch die Prozesskosten zu reduzieren [271]. Hierbei bietet sich die Möglichkeit der Immobilisierung von Enzymen auf Partikeloberflächen mit einem mikrometerskaligen Durchmesser (100-500 µm) an. Diese beladenen Träger können dann durch einfache Sedimentation oder Filtration aus dem Prozess zurückgewonnen werden. Eine technisch aufwendigere Rückgewinnung des freien Enzyms durch Ultrafiltration entfällt daher [188]. In dieser Arbeit sollte die Laccase von *T. versicolor* auf amino- und epoxyfunktionalisierten Trägern der Fa. Resindion S.R.L. immobilisiert werden, um anschließend die Enzymträger für die Laccase-katalysierte Detoxifikation einzusetzen. Die unterschiedlichen Immobilisate wurden anhand ihrer Beladungskapazität, ihrer Reaktivität und ihrer Langzeitstabilität charakterisiert.

Die Beladungskapazität der eingesetzten Träger ist in Abbildung 79 dargestellt. Der epoxyfunktionalisierte Träger EC-EP zeigte mit 82 $U/g_{Träger}$ im Vergleich zu dem aminofunktionalisierten Träger EC-EA mit 26 $U/g_{Träger}$ eine größere maximale Beladungs-

kapazität. Die optimale Beladungsdosierung betrug bei EC-EP 230 $mg_{Laccase}/g_{Träger}$ während für EC-EA ein Wert von 160 $mg_{Laccase}/g_{Träger}$ ermittelt wurde.

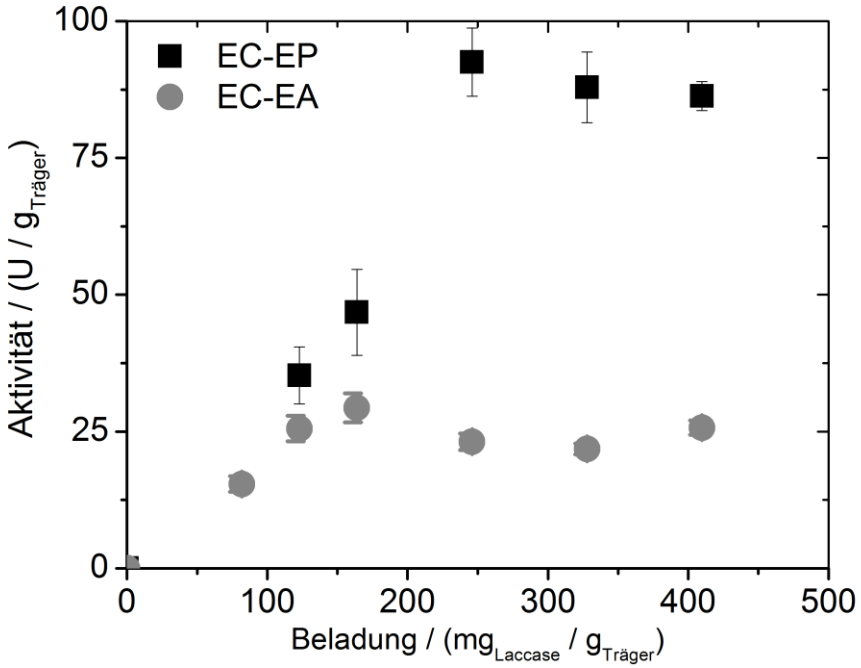


Abbildung 79: Aktivität der Träger in Abhängigkeit der Laccasebeladung von epoxyfunktionalisierten Trägern EC-EP und aminofunktionalisierten Träger EC-EA.

Hublik und Schinner erzielten eine Aktivität der immobilisierten Laccase von *Pleurotus ostreatus* RK 36 von bis zu 24 U/g mit epoxyfunktionalisiertem Eupergit C als Trägermaterial [183], während die Verwendung eines epoxyfunktionalisierten Trägers EC-EP bei Kunamneni et al. zu einer Aktivität von 206 U/g führte [179]. Eine derartig hohe Trägeraktivität konnte in dieser Arbeit mit EC-EP nicht erreicht werden. Es ist jedoch bekannt, dass die Immobilisierung wesentlich von der Enzymart und dem Enzymursprung abhängig ist, da leichte Variationen in den funktionellen Seitengruppen des Enzyms zu unterschiedlichen Bindungskapazitäten führen [211, 212]. Literaturdaten zur Immobilisierung von Laccasen auf aminofunktionalisierten Träger sind bisher noch nicht vorhanden, so dass in diesem Fall kein Vergleich erfolgen konnte.

Bei der anschließenden Laccase-katalysierten Oxidation der Modellsubstrate und der Aufschlusslösung mit freier Laccase und den Immobilisaten EC-EP / EC-EA zeigte sich, dass das EC-EP-Immobilisat im Falle von Vanillin, Vanillinsäure und der Aufschlusslösung im Vergleich zu der freien Laccase und dem Immobilisat EC-EA deutlich geringere Umsätze

nach 60 min aufwies (siehe Abbildung 80). Lediglich im Falle von Acetosyringon war EC-EP mit X = 0,75 besser als EC-EA mit X = 0,62. Das Immobilisat EC-EA wies bei allen Substraten bis auf Acetosyringon die gleichen Reaktionsumsätze wie die freie Laccase auf.

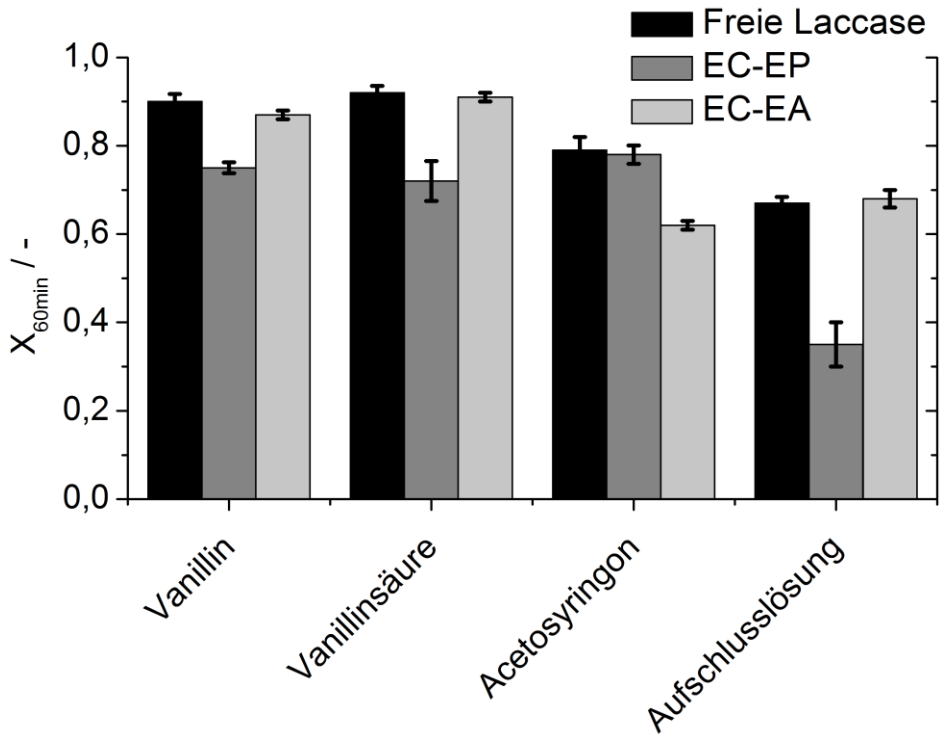


Abbildung 80: Reaktionsumsatz X nach 60 min für die Laccase-katalysierte Oxidation verschiedener Modellsubstrate (4 mM) und der Aufschlusslösung LZ10 (20 mM phenolische Komponenten) in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,75) bei 45 °C mit freier und immobilsierter Laccase (0,32 U/mL)

Neben dem Reaktionsverhalten wurde auch die Langzeitstabilität der Träger getestet, d.h. die Träger wurden über mehrere Reaktionszyklen eingesetzt, um zu untersuchen, ob ein wiederholter Einsatz der immobilisierten Laccase möglich war. Ein Reaktionszyklus betrug dabei 60 Minuten. Insgesamt wurden 28 Reaktionszyklen durchlaufen. Als Substrat wurde 4 mM Acetosyringon verwendet (siehe Abbildung 81). Neben nicht modifizierten Trägern wurden ebenfalls EC-EP- und EC-EA-Träger eingesetzt, die nach der Immobilisierung mit Glutardialdehyd (GDA) behandelt wurden, um die restlichen funktionellen Gruppen auf der Trägeroberfläche zusätzlich zu vernetzen. Die Quervernetzung (Crosslinking) kann zu einer Verbesserung der Langzeitstabilität führen und wurde daher ebenfalls in die Experimente mit einbezogen [211, 212].

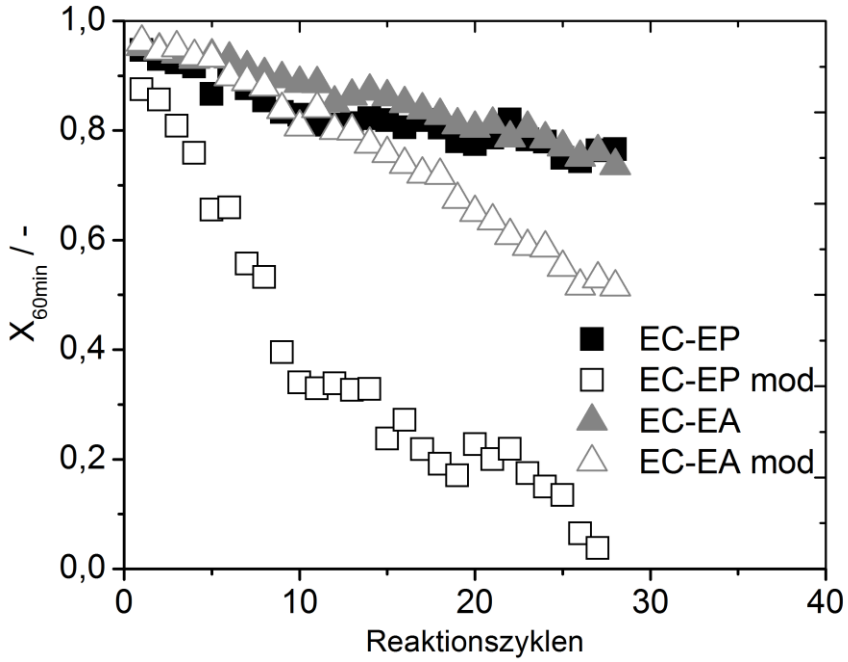


Abbildung 81: Umsatz X nach wiederholter Laccase-katalysierter Oxidation von Acetosyringon mit den Immobilisaten EC-EP und EC-EA. Beide Träger wurden nach der Immobilisierung ebenfalls mit Glutardialdehyd quervernetzt (EC-EP mod und EC-EA mod). Ein Reaktionszyklus bestand aus einer Laccase-katalysierte Oxidation von 4 mM Acetosyringon für 60 min in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,75) bei 45 °C mit immobilisierter Laccase (0,32 U/mL).

Die Messdaten zeigten, dass eine zusätzliche Quervernetzung mit 200 mM GDA zu keiner Verbesserung der Langzeitstabilität führte. Demnach war eine zusätzliche Quervernetzung der Träger nicht sinnvoll. Beide Immobilisate zeigten ohne Quervernetzung ein ähnliches Langzeitverhalten bei der Umsetzung von 4 mM Acetosyringon. Nach 28 Zyklen wurden immer noch 75 % des Acetosyringons umgesetzt, so dass eine Inaktivierung der Laccase nur teilweise vorhanden war.
Andere Immobilisate, die in der Literatur vorgestellt wurden, waren weitaus instabiler bei der Umsetzung von reinen Substraten. Die Arbeitsgruppe Brandi konnte bei der Verwendung von in Alginat immobilisierter Laccase bei der Oxidation von Anisaldehyd bereits einen signifikanten Rückgang des Umsatzes von 60 % innerhalb von drei Zyklen beobachten [188].

Aufgrund der höheren Umsätze während der Umsetzung von Modellsubstraten und den phenolischen Komponenten in der Organosolv-Aufschlusslösung wurde der amino-funktionalisierte Träger EC-EA für die weiteren Experimente ausgewählt. Der epoxy-funktionalisierte Träger EC-EP zeigte darüber hinaus schlechtere Materialeigenschaften. Ein

Teil EC-EP-Träger zeigte eine geringere mechanische Stabilität, so dass ein Teil der Träger entweder agglomerierten oder auf der Lösemitteloberfläche aufgeschwemmt wurde. Dies hatte zur Folge, dass sich das Sedimentationsverhalten im Gegensatz zu dem EC-EA deutlich verschlechterte.

Neben der Langzeitstabilität mit Acetosyringon als Modellsubstrat wurde anschließend die Langzeitstabilität der EC-EA-Immobilisate anhand der Umsetzung von phenolischen Komponenten in der Organosolv-Aufschlusslösung LZ10 untersucht. Hierbei wurden unterschiedliche Konzentrationen an phenolischen Komponenten eingesetzt, um den Einfluss der Substratkonzentration auf die Langzeitstabilität zu untersuchen (siehe Abbildung 82).

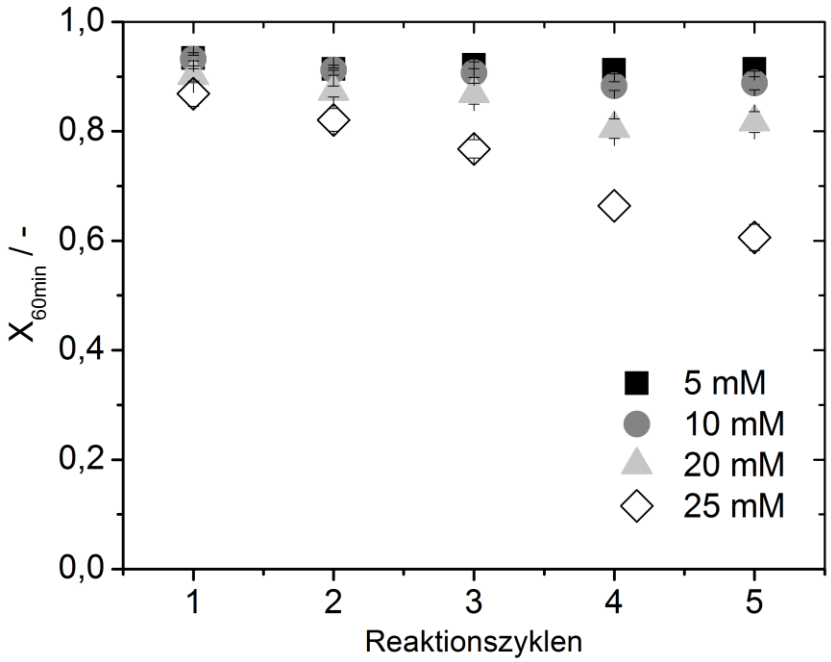


Abbildung 82: Umsatz X nach wiederholter Laccase-katalysierter Oxidation von phenolischen Komponenten aus LZ10 bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen (5 mM - 25 mM phenolische Komponenten). Ein Reaktionszyklus bestand aus einer Laccase-katalysierten Oxidation für 60 min in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,75) bei 45 °C mit immobilisierter Laccase EC-EA (0,32 U/mL).

Es konnte festgestellt werden, dass mit steigender Konzentration an phenolischen Komponenten der Umsatz nach 60 min mit fortschreitender Zykluszahl durch Inaktivierung der Laccase zurückging. Während bei Konzentrationen bis zu 10 mM phenolische Komponenten der Umsatz von 95 % nur auf 88 % nach fünf Zyklen zurückging, konnten bei 20 mM und bei 25 mM phenolische Komponenten nur noch 80 % und 60 % Umsatz erreicht

werden. Vergleichbare Langzeitexperimente mit Aufschlusslösungen sind in der Literatur nicht vorhanden, so dass in diesem Fall kein Vergleich möglich war.

Aus den Messdaten zur Langzeitstabilität während der Reaktion mit Acetosyringon und der Organosolv-Aufschlusslösung ging somit hervor, dass der Aktivitätsverlust abhängig ist (1) von den eingesetzten Substraten (Acetosyringon und Aufschlusslösung) und (2) von der eingesetzten Konzentration der Substrate. Dies hat für die Beurteilung der Langzeitstabilität von immobilisierten Laccasen zur Folge, dass man mit Stabilitätstests anhand von Modellsubstraten nur bedingt auf die Stabilität im späteren Prozess schließen kann. Für endgültige Aussagen muss daher die reelle Versuchsmatrix eingesetzt werden. Ein Vergleich der Langzeitstabilitäten von verschiedenen immobilisierten Laccasen ist somit sehr schwierig, sobald unterschiedliche Substrate eingesetzt werden.

Die Arbeitsgruppe Leonowicz konnte mit reinen Substraten ebenfalls zeigen, dass die Aktivitätsverminderung (Rückgang des Reaktionsumsatzes) abhängig vom Molekültyp ist. So wurde mit Koffeinsäure ein Rückgang des Umsatzes von 30 % innerhalb von sechs Zyklen festgestellt, während bei Feroylsäure nach sechs Zyklen ein Umsatz von nur noch 5 % detektierbar war [184].
Andere Autoren ermittelten die Standzeit der Immobilisate mit Hilfe der Umsetzung von ABTS (2,2-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonsäure) als Modellsubstrat. Hierbei bildet sich ein stabiles Radikal aus, das nicht weiter polymerisiert (siehe Kapitel 7.2.7). Die Langzeitstabilitätsmessung mit ABTS vermitteln generell deutlich längere Standzeiten mit Aktivitätsrückgängen von beispielsweise 20 % innerhalb von 17 Zyklen [179] (Laccase auf Epoxyträger) oder 30 % innerhalb von 10 Zyklen (Laccase auf magnetischen Partikel) [187]. Diese Langzeitstabilitäten waren vergleichbar zur gemessenen Langzeitstabilität der EC-EA-Immobilisate mit Acetosyringon als Modellsubstrat. Somit waren die Immobilisate sehr stabil bei der Umsetzung von reinen Modellsubstraten.
Nachdem in der Literatur keine Daten zur Detoxifikation von Lignocellulose-Aufschlusslösungen mit immobilisierten Laccasen vorhanden sind, konnten keine direkten Vergleiche zur Langzeitstabilität angestellt werden. Die Messdaten zeigten jedoch, dass die Reaktionsumsätze innerhalb der ersten fünf Zyklen bei Konzentrationen an phenolischen Komponenten ≥ 20 mM deutlich reduziert wurden. Zur Durchführung der Detoxifikation sollten daher Reaktionen in Konzentrationsbereichen ≤ 20 mM durchgeführt werden.

Ansatzpunkte zur weiteren Verbesserung der Langzeitstabilität der immobilisierten Laccase könnte der Einsatz von weiteren Trägermaterialien wie beispielsweise poröse Glaskugeln (aktiviert durch 3-Aminopropyltriethoxysilan) [184] oder mesoporöse Silikapartikel (aktiviert durch 3-Aminopropyltriethoxysilan) sein [186]. Darüber hinaus wäre das Aufbringen einer zusätzlichen porösen Silikonschicht denkbar. Diese Technik führte beispielsweise zu einer weiteren Stabilitätsverbesserung der immobilisierten Lipase (CalB) [272].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine erfolgreiche Immobilisierung der Laccase auf epoxy- und aminofunktionalisierten Trägern möglich war. Aufgrund des besseren Reaktionsverhaltens wurden für weitere Betrachtungen die aminofunktionalisierten Träger ausgewählt. Untersuchungen zur Langzeitstabilität mit Modellsubstraten zeigten eine sehr gute Langzeitstabilität, die bekannte Werte aus der Literatur teilweise übertraf. Eine Messung der Langzeitstabilität mit einer Aufschlusslösung machte jedoch deutlich, dass die Langzeitstabilität wesentlich von der Art des Substrates und von der Substratkonzentration abhing. Nachdem für das neuentwickelte Verfahren keine Anhaltswerte aus der Literatur bekannt waren, konnte kein direkter Vergleich erfolgen.

4.3.1.3 Charakterisierung der Reaktionsprodukte nach Oxidation mit immobilisierter Laccase

In diesem Kapitel soll die Charakterisierung der Reaktionsprodukte nach Oxidation mit immobilisierter Laccase aufgezeigt werden.

Wie bereits in Kapitel 4.3.1.1 erläutert wurde, konnten bei der Reaktion mit freier Laccase bereits durch visuelle Beobachtung unlösliche Reaktionsprodukte in der Lösung identifiziert werden. Bei der Detoxifikation mit immobilisierter Laccase lagerten sich hingegen die Reaktionsprodukte als unlösliche Polymerisate auf der Trägeroberfläche ab, nachdem die Oxidationsreaktion direkt an der Oberfläche stattfand. Dies ist in Abbildung 83 veranschaulicht. Die Beobachtungen zeigten, dass die Präzipation der Polymersiate auf der Oberfläche energetisch günstig war, nachdem die Reaktionsprodukte sich überwiegend auf der Trägeroberfläche ablagerten. Dieses Phänomen ist auch von der heterogenen primären Keimbildung von Krisallisationsprozessen bekannt [273]. Mit steigender Konzentration an phenolischen Komponenten konnte beobachtet werden, dass die Menge der Ablagerungen zunahm.

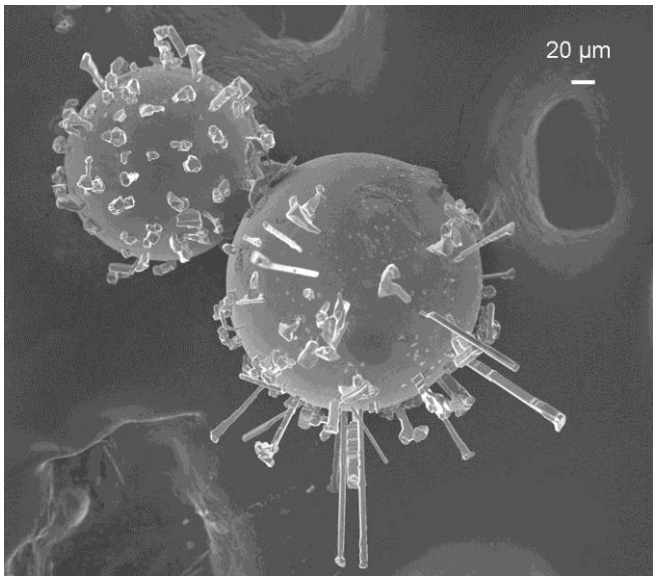


Abbildung 83: REM-Aufnahme eines EC-EA-Trägerpartikels nach einer Laccase-katalysierten Umsetzung einer Organosolv-Aufschlusslösung mit 20 mM phenolischen Komponenten.

Anhand einer quantitativen GPC-Analyse der Polymerisate konnten das Zahlenmittel M_n und Massenmittel M_w der Molmasse und die Polydispersität D (M_n / M_w) ermittelt werden. Hierbei konnte festgestellt werden, dass das Massenmittel M_w während der Reaktion auf 187 g/mol auf 412 g/mol zunahm (Faktor 2,2), während das Zahlenmittel M_n sich von 100 g/mol auf 131 g/mol erhöhte. Somit nahm die Polydispersität von 1,86 auf 3,14 der Reaktionsprodukte zu. Diese inhomogene Verteilung spricht für eine unspezifische radikalische Polymerisation. Darüber hinaus lässt sich beim Vergleich der Masseverteilungen vor und nach der Reaktion darauf schließen, dass vorwiegend monomere und dimere Phenolderivate zu Trimeren und Tetrameren polymerisierten. Dies konnte auch bei der Polymerisation von Vanillinderivaten beobachtet werden [267]. In weiteren Arbeiten mit freien Laccasen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Laccasen spezifisch phenolische Komponenten wie beispielsweise Guaiacol, Catechol, Vanillin, Phenol oder ortho-Cresol umsetzen. Die oxidativen Reaktionsprodukte besitzen dabei durch die Polymerisations-Folgereaktionen eine größere Molmassenverteilung und fallen teilweise als unlösliche Feststoffe aus [143, 160, 163].

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass bei der Verwendung von immobilisierter Laccase, die Reaktionsprodukte sich auf der Oberfläche der Träger ablagern. Dieses Phänomen konnte eingesetzt werden, um eine In-Situ-Produktabtrennung der phenolischen Komponenten aus Aufschlusslösungen zu realisieren. Die unlöslichen

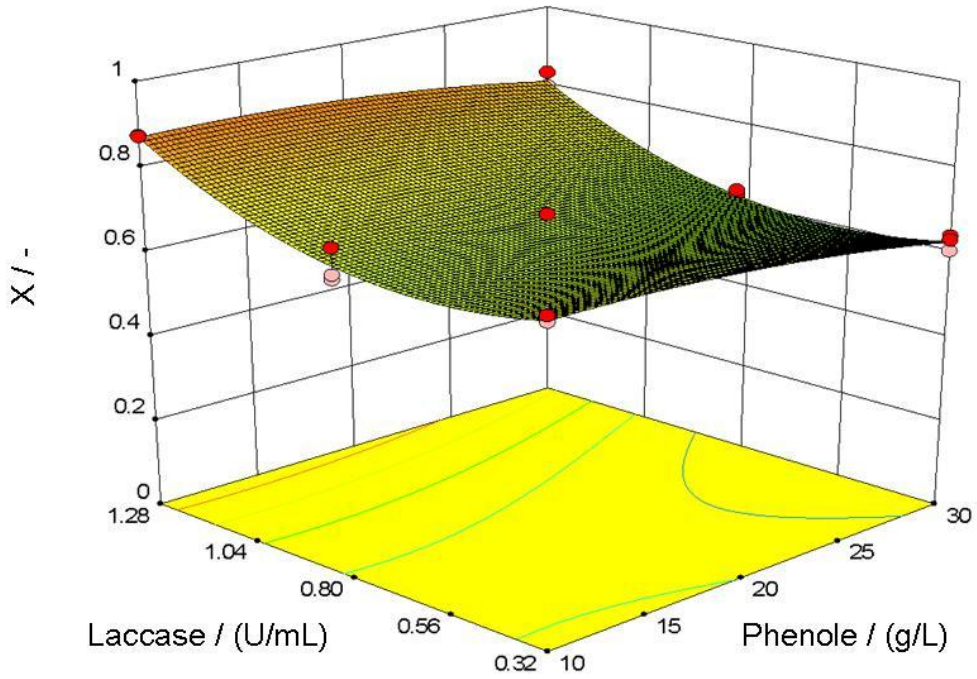
Polymerisate wurden dabei mit Hilfe von Ethanol/Wasser-Lösungen wieder von der Trägeroberfläche gewaschen (siehe Kapitel 4.3.1.6).

4.3.1.4 Optimierung der Detoxifikation mit freier und immobilisierter Laccase

Nachdem in den vorherigen Kapiteln 4.3.1.2 und 4.3.1.3 der aminofunktionalisierte Träger EC-EA für die Immobilisierung der Laccase ausgewählt wurde und die Reaktionsprodukte der Laccase-katalysierten Detoxifikation charakterisiert wurden, erfolgte die Optimierung der Detoxifikationverfahren mit freier und immobilisierter Laccase. Hierbei erfolgte ein Vergleich zwischen freier und immobilisierter Laccase anhand des Reaktionsumsatzes. Das Ziel der Optimierung war dabei, die minimale Laccasedosierung zu ermitteln, bei der Reaktionsumsätze $X > 0,85$ erreicht werden konnten.

Der Einfluss der Substratkonzentration und der Laccasedosierung auf den Reaktionsumsatz X nach 60 min wurde dabei mit Hilfe eines zentral zusammengesetzten Versuchsplans (Software Design Expert) im Bereich von 10 mM bis 30 mM phenolische Komponenten (Aufschlusslösung LZ10) und einer Laccasedosierung im Bereich von 0,32 U/mL bis 1,28 U/mL untersucht (siehe Abbildung 84). Es konnte festgestellt werden, dass bei gleicher Konzentration und Laccasedosierung die immobilisierte Laccase im ganzen Versuchsraum wesentlich größere Umsätze aufwies, als die freie Laccase. Während der Reaktionsumsatz bei EC-EA nur bei sehr hohen Konzentrationen an phenolischen Komponenten > 20 mM und bei Laccasedosierung < 0,80 U/mL von beiden Einflussgrößen abhängig war, konnte bei der freien Laccase eine deutlichere Abhängigkeit des Reaktionsumsatzes von der Laccasedosierung im gesamten Versuchsraum beobachtet werden. Im Falle der freien Laccase wurden die größten Umsätze mit 80 - 82 % bei einer Laccasedosierung von 1,28 U/mL beobachtet. Die minimale Laccasedosierung, die nötig war, um einen maximalen Reaktionsumsatz von 88 % - 90 % zu erreichen, betrug im Falle der immobilisierten Laccase nur bei 0,84 U/mL. Die Immobilisierung der Laccase führte daher zu einer effizienten Umsetzung der phenolischen Komponenten. Dennoch konnte in beiden Fällen kein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet werden.

(A)



(B)

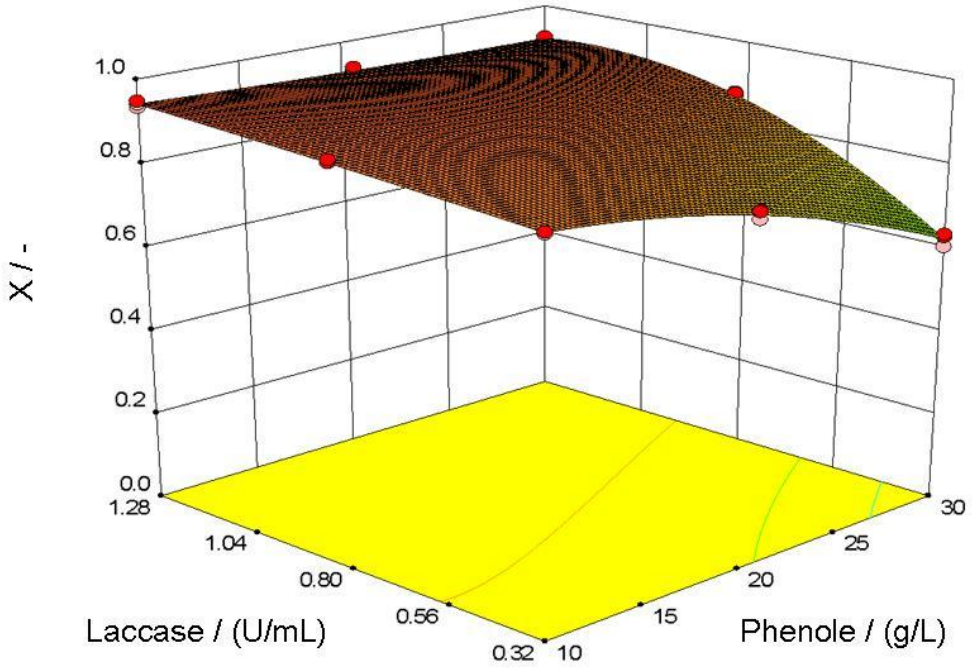


Abbildung 84: (A) Reaktionsumsatz in Abhängigkeit der Konzentration an phenolischen Komponenten und der Laccasedosierung für die freie Laccase (A) und die immobilisierte Laccase EC-EA (B).

In der Literatur konnte von einigen Autoren die unvollständige Umsetzung von phenolischen Komponenten ebenfalls beobachtet werden [143, 163, 172, 173]. Hierbei wurden im Vergleich zu dieser Arbeit geringere Ausbeuten von < 80 % erreicht. Eine Beschreibung der Einflussparameter wie beispielsweise Laccasedosierung oder Substratkonzentration auf den Umsatz an phenolischen Komponenten wurde in der Literatur nicht durchgeführt. Darüber hinaus wurde keine Optimierung der Reaktionen durchgeführt.

Erst im Jahre 2009 führte Jurado [160] parallel zu der vorliegenden Arbeit erste Optimierungsexperimente durch, in dem er Aufschlussüberstände von dampfbehandeltem Weizenstroh mit verschiedenen Laccasen von *T. villosa* und *C. Rigida* detoxifizierte. Die Laccase von *C. Rigida* zeigte bei gleicher Inkubationszeit mit 75 % einen höheren Umsatz als die Laccase von *T. villosa* mit 70 %. Aus dem Reaktionsverhalten wurde ebenfalls ersichtlich, dass kein vollständiger Umsatz an phenolischen Komponenten erreicht werden konnte. Die Optimierung der Enzymdosierung wurde anschließend mit der Laccase von *C. Rigida* bei ansonsten konstanten Versuchsbedingungen in einem separaten Versuch durchgeführt [160]. Hierbei zeigte sich, dass eine Steigerung der Aktivität über 0,5 U/L zu keiner weiteren Steigerung der Reaktionsumsätze führt.

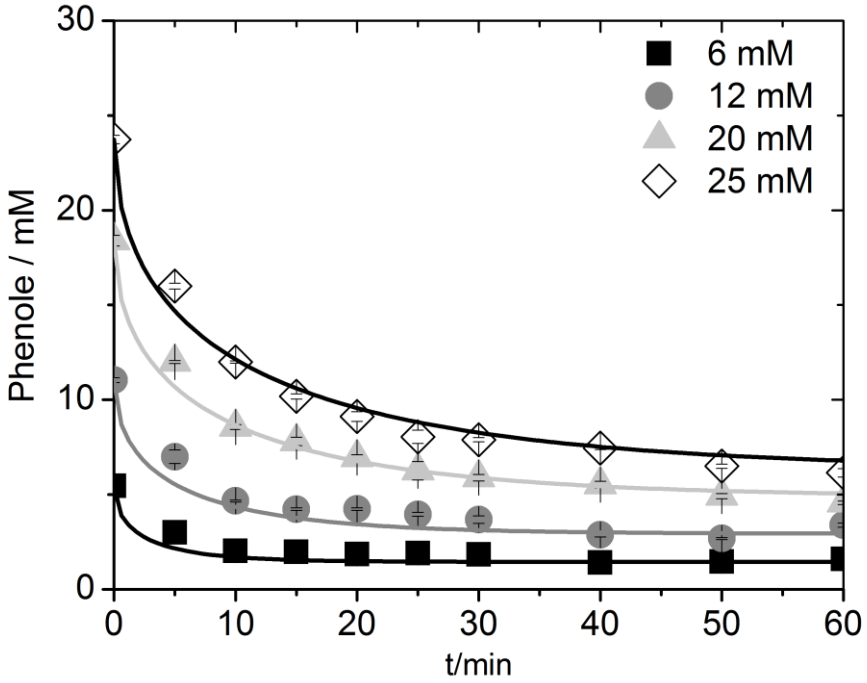
4.3.1.5 Beschreibung der Reaktionskinetik

Mit Hilfe der ermittelten optimalen Enzymdosierung (1,28 U/mL freie Laccase und 0,84 U/mL immobilisierter Laccase) wurden kinetische Untersuchungen durchgeführt. Ziel der Versuche war die Modellierung der Reaktionskinetik, um eine zukünftige Maßstabsübertragung gewährleisten zu können. Als Substrat wurde eine Organosolv-Aufschlusslösung verwendet. Für die Berechnung wurde ein reversibles Modell ausgewählt, das bereits beim Laccase-katalysierten Abbau von Farbstoffen eingesetzt wurde, um den Reaktionsumsatz beschreiben zu können [214, 215].

In Abbildung 84 ist die Konzentration der phenolischen Komponenten in Abhängigkeit der Reaktionszeit für Startkonzentrationen im Bereich von 5 mM bis 25 mM an phenolischen Komponenten für die freie Laccase (A) und die immobilisierte Laccase (B) dargestellt.

Es konnte festgestellt werden, dass die Reaktionskinetik und der unvollständige Reaktionsumsatz im untersuchten Konzentrationsbereich von 5 mM bis 25 mM an phenolischen Komponenten mit dem reversiblen Modell mathematisch beschrieben werden konnte ($R^2 \geq 0{,}98$). Die ermittelten kinetischen Parameter sind im Anhang Kapitel 7.6 aufgelistet.

(A)



(B)

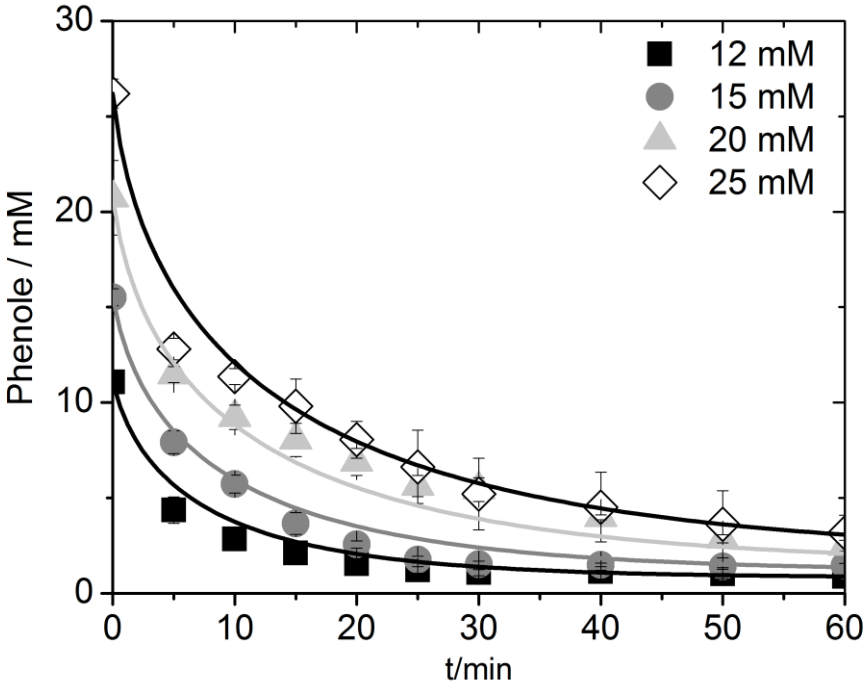


Abbildung 85: Gemessene Konzentrationen an phenolischen Komponenten in Abhängigkeit der Reaktionszeit für die freie (A) und immobilisierte Laccase (B) und die berechneten Konzentrationsverläufe.

Wie mit den Modellen des DoE vorhergesagt, war der Reaktionsumsatz während der Reaktion mit freier Laccase im Bereich von 75 % bis 80 % und im Fall der immobilisierten Laccase im Bereich von 88 % bis 92 %. Mit den in dieser Arbeit entwickelten kinetischen Modellen konnte erstmals für eine freie und immobilisierte Laccase die Reaktionskinetik auf Basis eines reversiblen Michaelis-Menten-Ansatzes dargestellt werden.

In der Literatur wurden neben der Verwendung der reversiblen Modellgleichungen [214, 215] zur Beschreibung des unvollständigen Umsatzes Laccase-katalysierter Reaktionen auch Modellgleichungen eingesetzt, die zusätzlich den Sauerstoffverbrauch berücksichtigen [274]. Für diesen Ansatz musste jedoch eine Messung der Sauerstoffkonzentration mit einer speziellen Messsonde erfolgen. Hierbei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die phenolischen Komponenten nicht vollständig umgesetzt wurden. Die Messung der Sauerstoffkonzentration (DO) machte deutlich, dass zu keinem Zeitpunkt geringe Sauerstoffkonzentrationen ausschlaggebend für die unvollständige Umsetzung der phenolischen Substrate war, so dass Modelle basierend auf O_2-Konzentrationen nicht nötig waren. Dies konnte in dieser Arbeit, wie in Kapitel 4.3.1.1 bereits erwähnt, ebenfalls beobachtet werden.

4.3.1.6 Entwicklung einer In-Situ-Produkt-Rückgewinnung (ISPR) von polymerisierten Ligninen

Wie bereits in Kapitel 4.3.1.2 beschrieben, wurden während der Laccase-katalysierten Oxidation von phenolischen Komponenten die unlöslichen polymerisierten Reaktionsprodukte auf der Trägeroberfläche abgeschieden. Aus diesem Grund sollte ein Verfahren zur In-Situ-Produktabtrennung der Polymerisate entwickelt werden. Nachdem sich die Reaktionsprodukte auf der Trägeroberfläche ablagerten, mussten diese anschließend in einem separaten Schritt spezifisch von der Oberfläche entfernt werden, ohne die Reaktivität der Immobilisate negativ zu beeinflussen.

Für die Entfernung der Polymerisate wurde die charakteristische Löslichkeit der niedermolekularen Lignine in Ethanol/H_2O-Mischungen ausgenutzt. Zur Untersuchung der Löslichkeit wurden bereits benutzte Immobilisate (Zyklenzahl n = 5) mit EtOH/H_2O-Gemischen im Bereich von 40 - 60 % (w/w) Ethanol bei 30 – 50 °C für 15 min und 30 min inkubiert. Die Löslichkeit der phenolischen Komponenten wurde dabei mit Hilfe der Extinktion bei 230 nm quantitativ ermittelt. Je größer die Resolubilisierung der phenolischen Komponenten war, desto größer war die Extinktion bei 230 nm (E_{230nm}). Der Zusammenhang

zwischen E_{230nm} und der Ethanolkonzentration sowie der Temperatur ist für 15 min und 30 min Inkubationszeit in Abbildung 86 und Abbildung 87 dargestellt.

Es konnte festgestellt werden, dass mit steigender Inkubationstemperatur die Extinktion und somit die Löslichkeit der phenolischen Komponenten, wie zu erwarten, anstieg. Die Ethanolkonzentration hatte im betrachteten Bereich von 40 % bis 60 % keinen signifikanten Einfluss auf die Resolubilisierung der polymerisierten phenolischen Komponenten. Somit war die Löslichkeit der niedermolekularen Lignine für Ethanol > 40 % bereits ausreichend.

Mit steigender Inkubationszeit von 15 auf 30 min konnte die Resolubilisierung der phenolischen Komponenten nur für Temperaturen < 40 °C erhöht werden. Die Solubilisierung war demnach nur bei Temperaturen < 40 °C kinetisch kontrolliert.

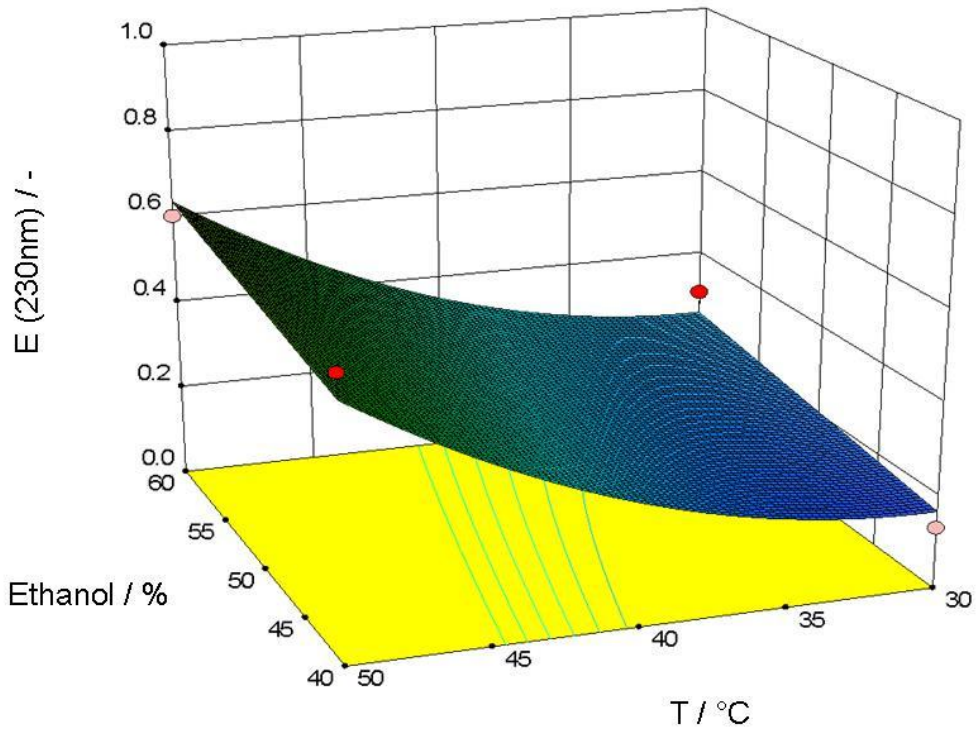


Abbildung 86: Extinktion E_{230nm} der gelösten polymerisierten phenolischen Komponenten in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration und der Inkubationstemperatur bei 15 min Inkubationszeit.

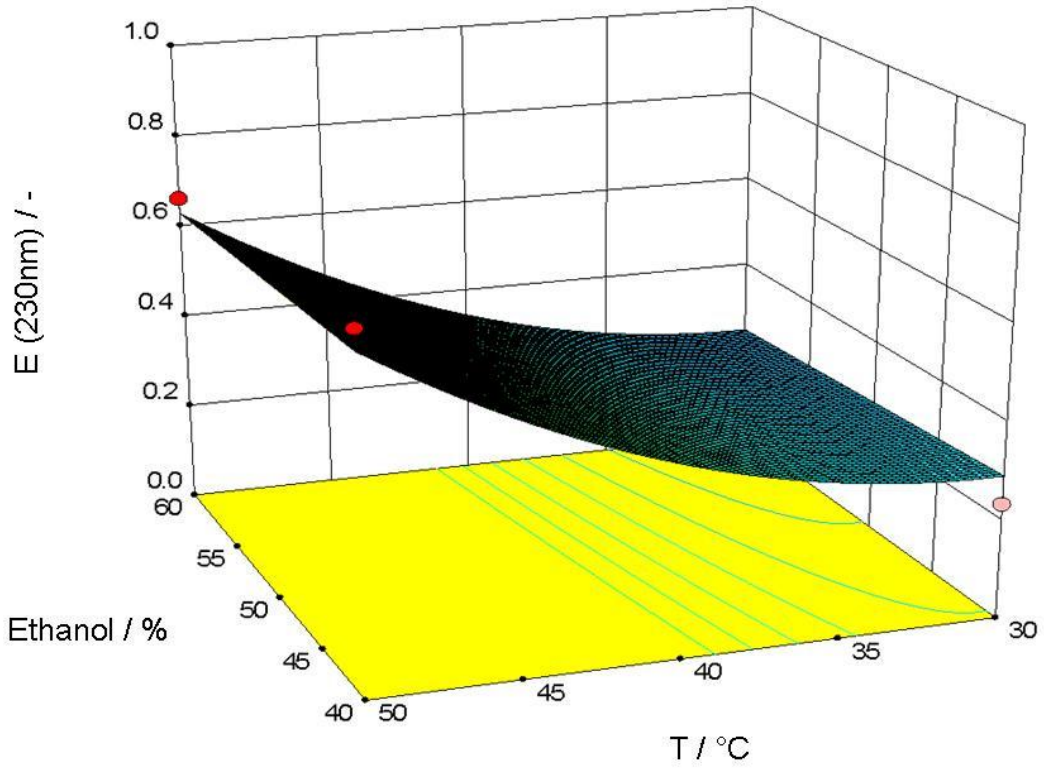
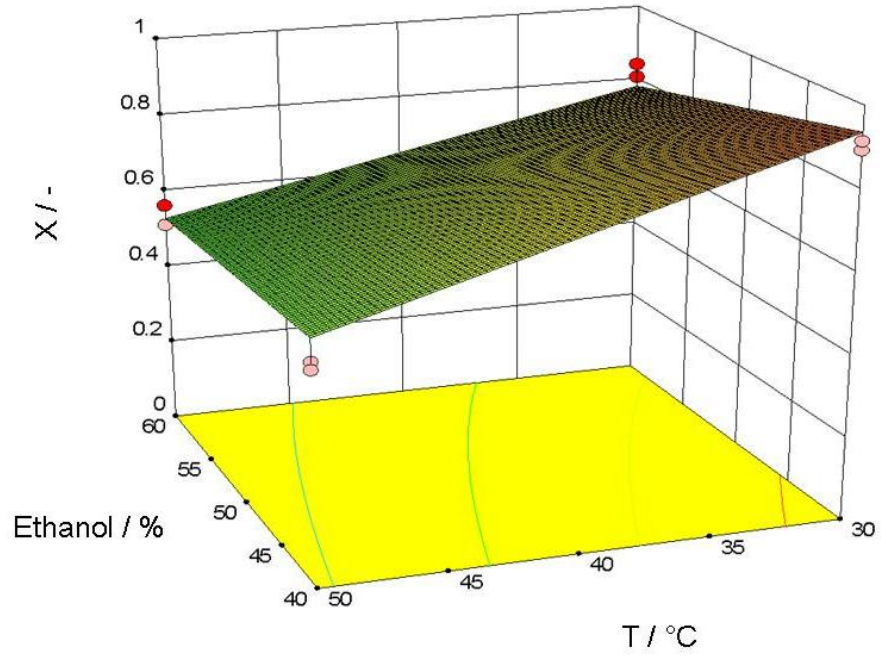


Abbildung 87: Extinktion E_{230nm} der gelösten polymerisierten phenolischen Komponenten in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration und der Inkubationstemperatur bei 30 min Inkubationszeit.

Neben der Resolubilisierung der polymerisierten phenolischen Komponenten wurde auch das Reaktionsverhalten der Immobilisate nach der Ethanolbehandlung untersucht, um eine mögliche Inaktivierung der Laccase durch Ethanol zu bestimmen. Hierzu wurden die EC-EA-Immobilisate zunächst bei unterschiedlichen Temperaturen (30 - 50 °C) und bei unterschiedlichen EtOH-Konzentrationen (40 - 60 %) für 15 - 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Immobilisate mit Acetatpuffer gewaschen und für eine Umsetzung von 1 mM Vanillin bei 45 °C für 60 min bei einer Laccasedosierung von 0,84 U/mL eingesetzt. In Abbildung 88 (A) und (B) ist der Umsatz von Vanillin in Abhängigkeit der unterschiedlichen Betriebsparameter der vorherigen Ethanol/H_2O-Behandlung für t = 15 min und t = 30 min dargestellt.

Es zeigte sich, dass mit steigender Inkubationstemperatur der Umsatz von Vanillin signifikant zurückging. Ethanol wirke sich somit bei T > 40 °C negativ auf die Enzymaktivität der Laccase aus. Dies konnte auch von Rodakiewicz-Nowak et al. beobachtet werden [275]. In diesem Fall wurde eine Inhibition der Laccase durch Ethanol ab Konzentrationen von > 1 M Ethanol beobachtet.

(A)



(B)

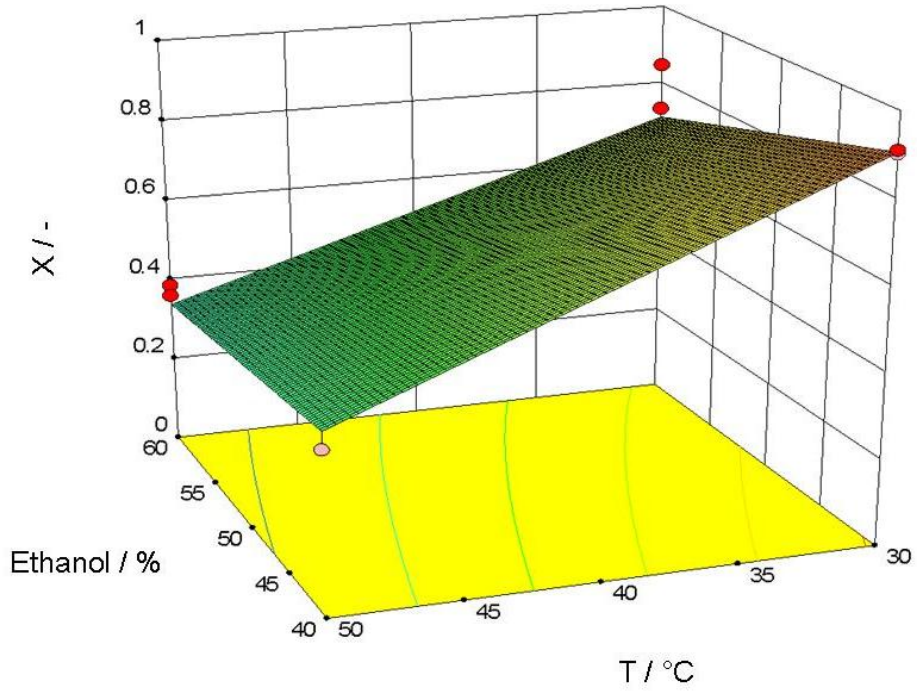


Abbildung 88: Reaktionsumsatz X nach 60 min nach der Ethanol-Waschung der Immobilisate mit den angegebenen Ethanolkonzentrationen und Temperaturen für eine Inkubationsdauer von 15 min (A) und 30 min (B).

Aus dem Vergleich der Messergebnisse der Resolubilisierung (siehe Abbildung 86 und Abbildung 87) und der Umsetzung von Vanillin nach der Ethanolbehandlung (siehe Abbildung 88) konnte festgestellt werden, dass beide Größen gegenläufig waren. Während die Resolubilisierung vor allem mit steigender Temperatur zunahm, reduzierte sich der Umsatz von Vanillin mit steigender Inkubationstemperatur. Es konnten anschließend mit Hilfe der empirischen Modellgleichungen zwei optimale Betriebsbedingungen identifiziert werden, bei denen der Umsatz > 70 % war. Das erste Optimum lag bei 45 % EtOH und 35 °C für 15 min. Das zweite Optimum lag bei 40 % EtOH und 32 °C für 30 min.

Nach Identifizierung der optimalen Betriebsbedingungen für die Resolubilisierung der polymerisierten phenolischen Komponenten wurde ein Langzeitexperiment durchgeführt, bei dem 25 mM phenolische Komponenten mit 0,84 U/mL immobilisierter Laccase für 60 min umgesetzt wurden. Diese Reaktion wurde sieben Mal hintereinander wiederholt. Nach dem zweiten sowie nach dem vierten Zyklus wurden die Immobilisate entweder mit 45 % EtOH bei 35 °C für 15 min oder 40 % bei 32 °C für 30 min behandelt. Darüber hinaus wurden Immobilisate ohne den EtOH-Waschschritt als Referenz eingesetzt. In Abbildung 89 ist der Umsatz der phenolischen Komponenten in Abhängigkeit der Reaktionszyklen dargestellt.

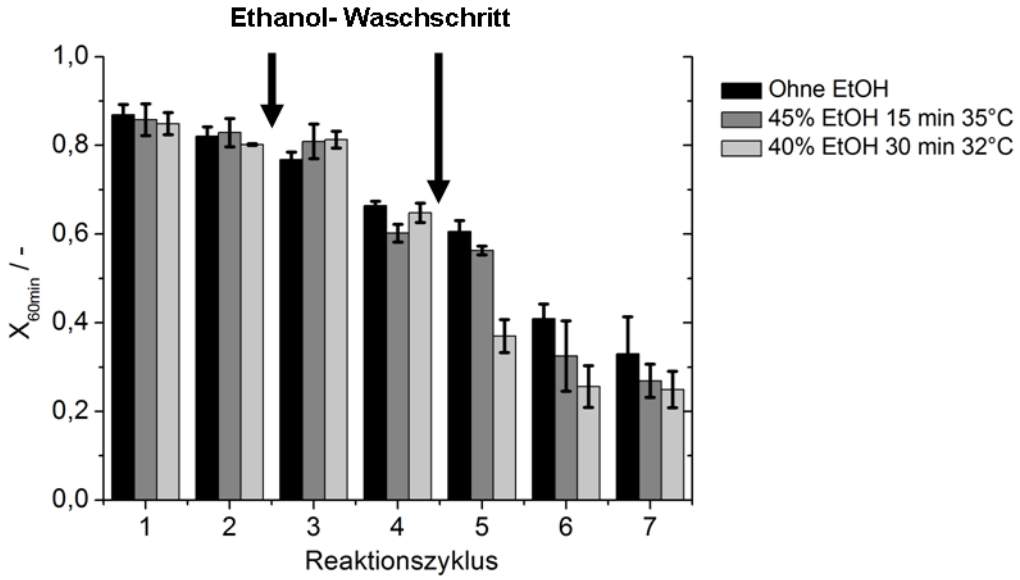


Abbildung 89: Umsatz von 25 mM phenolischen Komponenten in Abhängigkeit der Reaktionszyklen für die EtOH-gewaschenem bzw. nicht EtOH-gewaschenen Immobilisate.

Es konnte beobachtet werden, dass in den ersten vier Reaktionszyklen der Rückgang des Umsatzes für alle Reaktionsansätze gleich verlief. Der Umsatz ging von 83 % nach dem

ersten Zyklus auf 65 % beim vierten Zyklus zurück. Der EtOH-Waschschritt nach dem zweiten Zyklus hatte demnach bei keiner der zwei untersuchten Methoden einen negativen Einfluss auf den erzielbaren Umsatz. Nach dem zweiten EtOH-Waschschritt nach dem vierten Zyklus konnte jedoch für die zweite Methode (40 % EtOH, 30 min, 32 °C,), ein signifikanter Rückgang des Umsatzes auf 38 % festgestellt werden. Bei der unbehandelten Referenz und bei der ersten Methode (45 % EtOH, 15 min, 35 °C) lag der Umsatz nach vier Zyklen hingegen bei 60 %. Nach Zyklus 6 und 7 waren die Umsätze für alle drei Ansätze < 40 %. Die erste Methode (45 % EtOH, 15 min, 35 °C) konnte demnach die polymerisierten Phenole von der Oberfläche lösen, ohne signifikante Rückgänge der Umsätze hervorzurufen.

Der Effekt der Resolubilisierung der polymerisierten Phenole ist in Abbildung 90 durch REM-Aufnahmen exemplarisch für die erste EtOH-Behandlung nach dem zweiten Zyklus dargestellt.

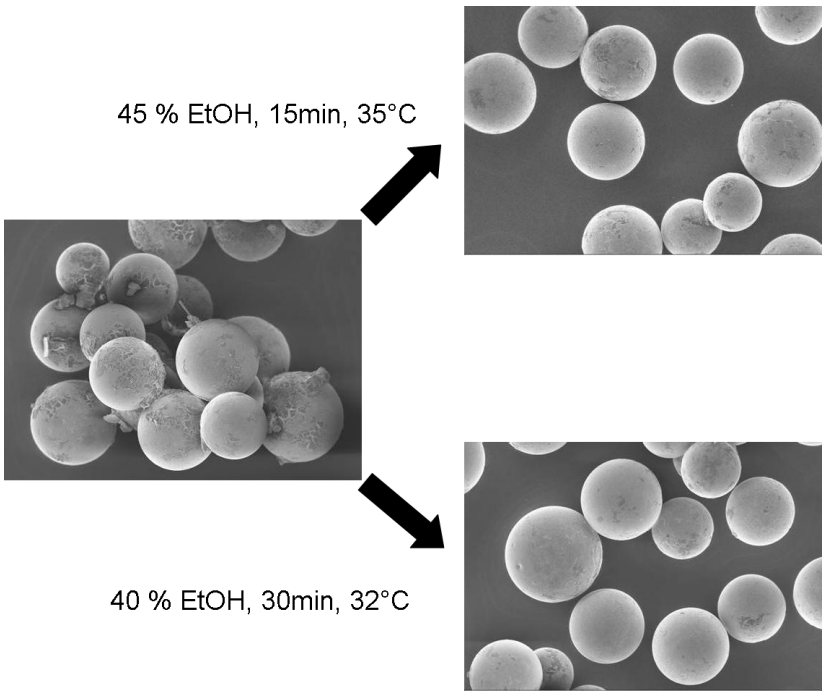


Abbildung 90: REM-Aufnahmen vor und nach der EtOH-Waschung der Immobilisate. (Anzahl der Reaktionszyklen n = 2).

In dieser Arbeit konnte somit erstmals ein Verfahren zur In-Situ-Produktabtrennung von phenolischen Komponenten aus Aufschlusslösungen mit Hilfe von immobilisierter Laccase entwickelt werden. Hierbei wurden durch radikalische Polymerisation die phenolischen Komponenten auf der Trägeroberfläche abgeschieden und in einem anschließenden Schritt mit einer Ethanol-Wasser-Lösung resolubilisiert. Die ausgewählten Prozessbedingungen

(45 % EtOH, 15 min, 35 °C) führten zu keiner zusätzlichen Inaktivierung der Laccase-aktivität.

4.3.2 Adsorptive Detoxifikation

Neben der selektiven Entfernung von phenolischen Komponenten mittels Laccase-katalysierter Oxidation sollten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls adsorptive Verfahren zur Detoxifikation von zuckerhaltigen Aufschlusslösungen untersucht werden.

Ein Vorteil der adsorptiven Verfahren gegenüber chemischen Methoden ist, dass durch geeignete Wahl der Adsorbentien selektiv die drei Hauptgruppen der Lignocellulose-Abbauprodukte: phenolische Komponenten (Ligninabbauprodukte), Furanderivate (HMF, Furfural) und organische Säuren (Ameisensäure, Essigsäure, Lävulinsäure) entfernt werden können [139, 140]. Die ausgewählten Adsorber können dann anschließend reversibel durch Desorption der Abbauprodukte regeneriert werden, so dass Adsorber ein großes Potential zur Detoxifikation von Aufschlussüberständen besitzen [163, 170].

In den folgenden Kapiteln soll zunächst auf die Auswahl geeigneter Adsorber eingegangen werden. Zunächst sollten die ausgewählten Adsorber durch statische Adsorptionstests charakterisiert werden. Hierbei wurden neben den Adsorptionsisothermen auch die isosteren Adsorptionsenthalpien ΔH, freie Energien ΔG und die Entropieänderungen ΔS berechnet. Nach der thermodynamischen Charakterisierung der ausgewählten Adsorber wurden dynamische Detoxifikationsexperimente in Festbettadsorbern durchgeführt. Hierbei sollte der Zusammenhang zwischen dem Durchbruchsvolumen $V_{0,1}$ und der Durchbruchszeit $t_{0,1}$ sowie den Betriebsparametern Durchflussrate und Eingangskonzentration beschrieben werden, um anschließend optimale Betriebsparameter identifizieren zu können. Anschließend sollte der zeitliche Verlauf der Durchbruchskurve anhand von empirischen Modellen beschrieben und vorhergesagt werden.

4.3.2.1 Auswahl geeigneter Adsorber

Ein geeigneter Adsorber für die Detoxifikation von zuckerhaltigen Aufschlusslösungen muss neben der effektiven Entfernung der drei Hauptgruppen der Lignocellulose-Abbauprodukte (Ligninabbauprodukte, Furanderivate und organische Säuren) eine geringe Adsorption von Zuckern aufweisen.

Zur Auswahl standen in der vorliegenden Arbeit jeweils zwei hydrophobe Adsorber MN105 und MN202 sowie die vier Anionenaustauscher (AIEX) A860, Dowex 1x4, A103S und A500MBOH. Alle ausgewählten Adsorber zeigten eine Entfernung von Xylose und Glukose

< 2 %. Somit waren prinzipiell alle Adsorber für die Detoxifikation zuckerhaltiger Aufschlusslösungen geeignet. Als Versuchsmatrix wurde eine Organosolv-Aufschlusslösung (LZ16, log R''_0 = 8,16) eingesetzt (siehe Kapitel 3.4.1). Der Einfluss des pH-Werts auf die Abtrennung der Analyte wurde durch Variation des pH-Werts im Bereich pH 3, pH 4,5 und pH 6 untersucht. Dies entsprach pH-Werten unterhalb und oberhalb der pKs-Werte der organischen Säuren (pKs-Werte: Ameisensäure 3,77; Lävulinsäure 4,59, Essigsäure 4,75).

In Abbildung 91 und Abbildung 92 sind exemplarisch die Abtrennung von phenolischen Komponenten und von Ameisensäure aus der Aufschlusslösung LZ10 dargestellt. Die Entfernung der anderen Abbauprodukte ist im Anhang Kapitel 7.7.1 dargestellt.

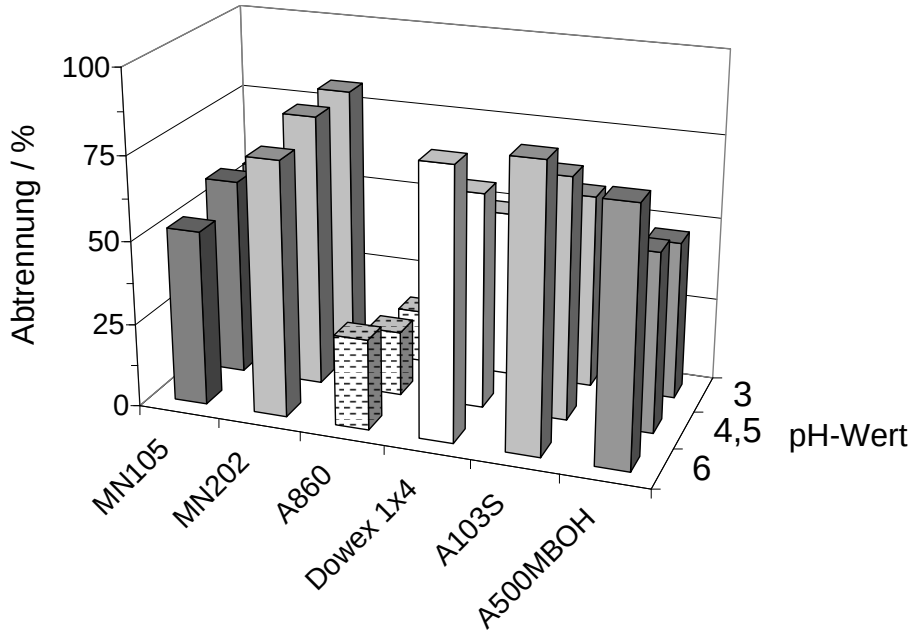


Abbildung 91: Abtrennung von phenolischen Komponenten bei der Verwendung der hydrophoben Adsorber MN105 bzw. MN202 und den Anionenaustauschern A860, Dowex 1x4, A103S und A500MBOH für unterschiedliche pH-Werte.

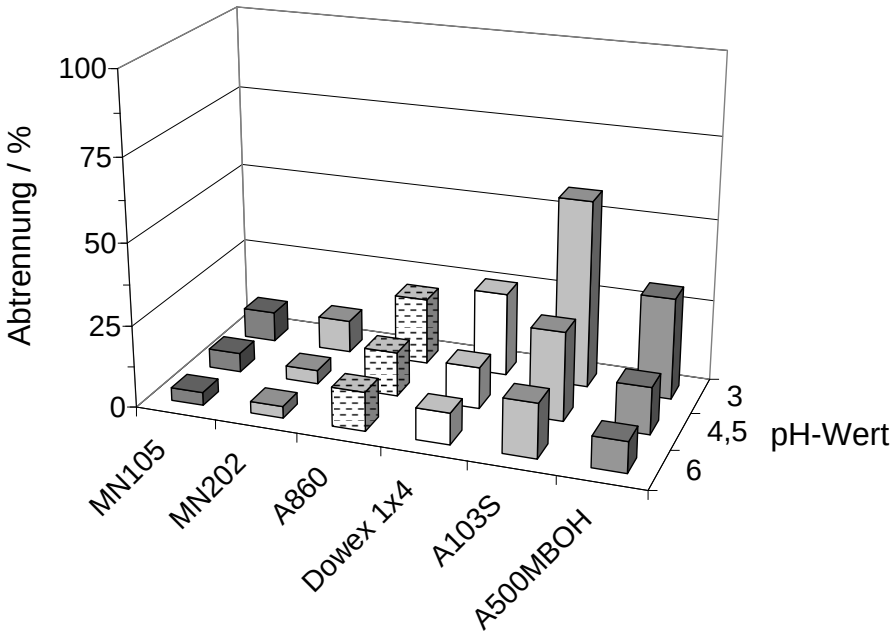


Abbildung 92: Abtrennung von Ameisensäure bei der Verwendung der hydrophoben Adsorber MN105 bzw. MN202 und den Anionenaustauschern A860, Dowex 1x4, A103S und A500MBOH für unterschiedliche pH-Werte.

Die Messdaten machten deutlich, dass eine effiziente Abtrennung aller Abbauprodukte (Phenole, Furane und organische Säuren) nur durch Kombination des hydrophoben Adsorbers MN202 (1. Stufe) gefolgt von dem AIEX A103S (2. Stufe) realisiert werden konnte.

Der hydrophobe Adsorber MN202 entfernte effizient die hydrophoben Abbauprodukte. Dabei konnte festgestellt werden, dass mit steigender Hydrophobizität der Abbauprodukte sich die Abtrennung verbesserte (HMF 30 % < Furfural 60 % < phenolische Komponenten 80 %). Dieser Sachverhalt konnte auch von Nilvebrandt et al. beobachtet werden [170]. Die organischen Säuren konnten nicht effektiv von den hydrophoben Adsorbern gebunden werden.

Der AIEX A103S konnte hingegen bei pH-Werten < 4,5 organische Säuren, insbesondere Ameisensäure, binden (55 % Ameisensäure, 20 % Essigsäure, 18 % Lävulinsäure). Die Entfernung der Ameisensäure ist für die Detoxifikation von Aufschlusslösungen von zentraler Bedeutung. Im Gegensatz zu Essigsäure und Lävulinsäure, ist die Diffusion von Ameisensäure durch die Zellmembran von Mikroorganismen aufgrund der kleineren Molekülgröße wesentlich höher. Dies führt dazu, dass die Zelltoxizität von Ameisensäure wesentlich höher ist. Essigsäure und Lävulinsäure wirken hingegen erst bei sehr hohen Konzentrationen ab 6,0 g/L bzw. 10 g/L zelltoxisch [139, 140, 276-278].

Neben der Entfernung der organischen Säuren war der AIEX A103S auch in der Lage, mit sinkendem pH-Wert die phenolischen Komponenten effektiv zu entfernen (70 - 80 %). Dies lag im Wesentlichen an der hydrophoben Grundmatrix der Träger, die neben den geladenen Oberflächengruppen auch als Adsorptionsstelle zur Verfügung stand. Dies konnte von de Mancilha et al. und von Carvalheiro et al. ebenfalls bestätigt werden [168, 169].

Die Ergebnisse in dieser Arbeit machten deutlich, dass die Adsorption wesentlich vom pH-Wert abhängig war. Die Bindungsaffinität von hydrophoben Adsorbern und Anionenaustauschern (AIEX) in Abhängigkeit des pH-Werts wurde ebenfalls von Nilvebrandt und seinen Mitarbeitern untersucht [170]. Die Versuche zeigten, dass sowohl die Adsorption auf dem hydrophoben XAD-8 als auch auf dem AIEX stark pH-Wert abhängig waren. So wurden insgesamt mehr Substanzen bei pH 5,5 adsorbiert als bei pH 10. Die Zunahme der Adsorption mit sinkendem pH-Wert konnte in dieser Arbeit ebenfalls beobachtet werden. Der Einfluss des pH-Werts während der Detoxifikation mit AIEX wurde ebenfalls von Carvalheiro mit statischen Adsorptionstests ermittelt [168]. Als Adsorber wurde ein AIEX (Dowex-MWA1) bei den pH-Werten von 0,77 und 5 untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass im stark sauren pH-Wertbereich (pH 0,77) die Abtrennung von HMF, Furfural, Essigsäure und Ameisensäure größer war als bei pH 5,5. Diese Untersuchungen konnten die in dieser Arbeit vorgestellte pH-Wert-Abhängigkeit ebenfalls bestätigen.

Wie in diesem Kapitel beschrieben, konnten zur effektiven Entfernung von phenolischen Komponenten, Furanderivaten und organischen Säuren aus zuckerhaltigen Aufschluss-lösungen geeignete Adsorber identifiziert werden. Zur effektiven Entfernung von hydrophoben Komponenten wurde der hydrophobe Adsorber MN202 ausgewählt. Dieser wurde erstmals zur Detoxifikation von Aufschlussüberständen in dieser Arbeit charakterisiert. Zur Entfernung von organischen Säuren und phenolischen Komponenten wurde der von de Mancilha bereits erwähnte AIEX A103S ausgewählt [169]. Im Gegensatz zu de Mancilha wurde jedoch zusätzlich der Einfluss des pH-Werts betrachtet. Es konnte festgestellt werden, dass mit sinkendem pH-Wert die Abtrennung der organischen Säuren zunahm. Demnach sind für Adsorptionsprozesse im technischen Maßstab pH-Werte < 4,0 anzustreben. Anhand der Vorversuche konnte bereits ein Verfahrensvorschlag für die Durchführung dynamischer Adsorptionsprozesse ausgearbeitet werden. Im ersten Schritt sollten die hydrophoben

Komponenten mit dem MN202 entfernt werden, während in der zweiten Stufe eine effektive Entfernung der organischen Säuren erfolgen sollte.

4.3.2.2 Thermodynamische Charakterisierung der isothermen stationären Adsorption

Nachdem der hydrophobe Adsorber MN202 und der AIEX A103S zur Entfernung von Phenolen, Furanderivaten und organischen Säuren ausgewählt wurde, sollten die Adsorptionsisothermen bei unterschiedlichen Adsorptionstemperaturen ermittelt werden, um Aussagen über die maximale Beladungskapazität, die Bindungsaffinität, die Adsorptionsenthalpie, die Bindungsart (Chemisorption oder Physisorption) sowie über die Änderung der thermodynamischen Zustandsvariablen ΔG (freie Energie) und ΔS (Entropie) zu erhalten [222, 279].

Aus der Literatur, aber auch aus der vorliegenden Arbeit, ist bekannt, dass die Konzentration an Lävulinsäure in Aufschlusslösungen deutlich geringer ist als die der Essigsäure [139, 140, 276, 278]. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Untersuchungen der Einfluss der Lävulinsäure vernachlässigt und Ameisensäure sowie Essigsäure als Vertreter der organischen Säuren für weitere Untersuchungen mit dem A103S betrachtet. Die Adsorption von MN202 wurde mit den phenolischen Komponenten, Furfural und HMF untersucht.

In Abbildung 93 ist beispielhaft die Adsorptionsisotherme für die Adsorption der phenolischen Komponenten auf MN202 für Temperaturen im Bereich von 293 K bis 313 K dargestellt. Die entsprechende linearisierte Arrhenius-Kurve für unterschiedliche Beladungen im Bereich von 0,2 mmol/g bis 0,7 mmol/g ist in Abbildung 94 dargestellt. Die Adsorptionsisothermen und die dazugehörigen linearisierten Arrhenius-Kurven für die anderen Abbauprodukte sind im Anhang Kapitel 7.7.2 aufgelistet.

Es konnte, wie erwartet, festgestellt werden, dass mit steigender Adsorptionstemperatur die Adsorption abnahm. Dies ist typisch für die Adsorption von gelösten Substanzen auf einer festen Matrix [280]. Die Adsorptionsisotherme für die phenolischen Komponenten, HMF, Furfural und Ameisensäure konnte in dieser Arbeit mit Hilfe der Langmuir-Adsorptionsisotherme beschrieben werden ($R^2 > 0{,}98$), während die Adsorption von Essigsäure auf A103S mit Hilfe der Adsorptionsisotherme nach Redlich beschrieben wurde ($R^2 > 0{,}98$).

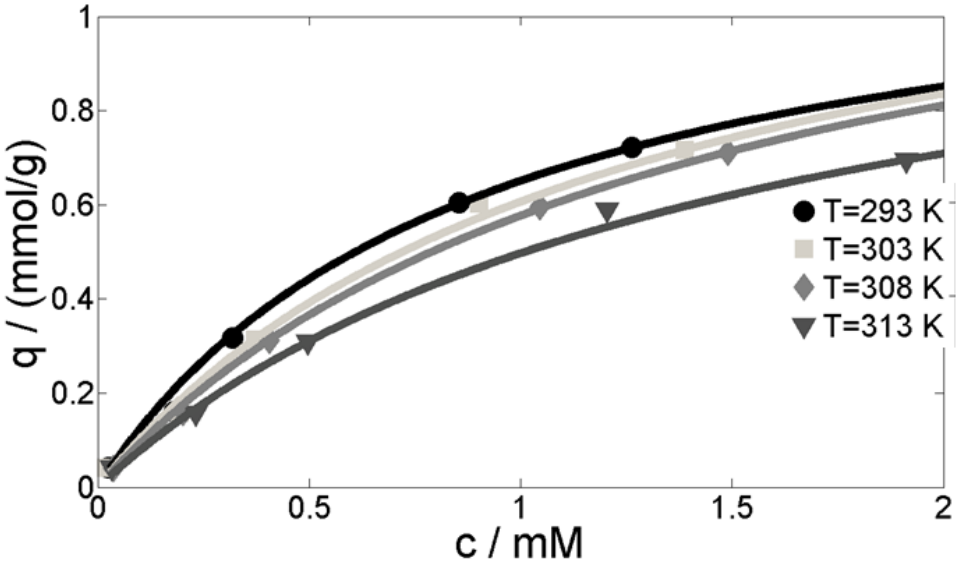


Abbildung 93: Gleichgewichtsbeladung der phenolischen Komponenten auf MN202 in Abhängigkeit der Gleichgewichtskonzentration c für unterschiedliche Adsorptions-temperaturen.

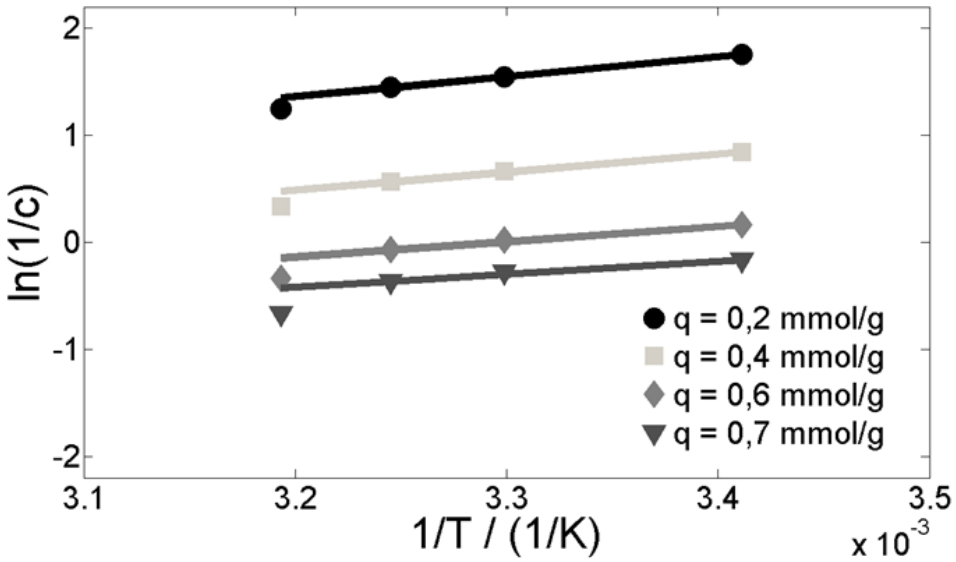


Abbildung 94: Linearisierte Arrhenuiskurven für unterschiedliche Beladungen q.

Die maximale Beladung q_{max} sowie der Adsorptionsparameter K für die Langmuir- bzw. Redlich-Adsorptionsisotherme sind in Tabelle 33 gezeigt. Je kleiner der Adsorptionsparameter K ist, desto größer ist die Konzentration des Analyten in der Flüssigphase bei $q = q_{max}/2$, d.h. desto größer ist die Affinität des Analyten für den Adsorber.

Tabelle 33: Ermittelte Adsorptionsisothermen und die jeweiligen Bestimmtheitsmaßen R^2

Abbauprodukt	Adsorber	Isotherme	K / (L/mmol)	q_{max} / (mmol/g)	n	R^2
Phenolische Komponenten	MN202	Langmuir	0,82	1,34	-	0,98
HMF	MN202	Langmuir	0,66	1,24	-	0.99
Furfural	MN202	Langmuir	1,34	1,00	-	0,99
Essigsäure	A103S	Redlich	0,10	2,50	0,98	0,99
Ameisensäure	A103S	Langmuir	2,30	2,29	-	0,95

Die ermittelten Werte für K und q_{max} zeigten, dass im Falle des MN202-Adsorbers die Affinität in der Reihe HMF < phenolische Komponenten < Furfural zunahm. Dies konnte bereits bei den Adsorptionsversuchen in Kapitel 4.3.2.1 beobachtet werden. Demnach wurden vor allem Furfural und die phenolischen Komponenten sehr stark gebunden, während mit steigender Polarität die Affinität für HMF geringer wurde. In Bezug auf die maximale Beladungskapazität von MN202 konnte festgestellt werden, dass die phenolischen Komponenten mit 1,34 mmol/g die größte Beladungskapazität zeigten, gefolgt von HMF mit 1,24 mmol/g und Furfural mit 1,00 mmol/g.

Beim AIEX A103S hatte die Ameisensäure mit 2,3 L/mol einen wesentlich größeren K-Wert als Essigsäure, d.h. im Gegensatz zur Essigsäure wurde Ameisensäure sehr effektiv gebunden. Dies zeigten bereits die Ergebnisse bei der Auswahl der Adsorber (siehe Kapitel 4.3.2.1). Die maximale Beladungskapazität von Ameisensäure war jedoch mit 2,29 mmol/g etwas geringer als bei Essigsäure mit 2,50 mmol/g.

Die isostere Adsorptionsenthalpie ΔH konnte anschließend durch Auftragung von ln(1/c) gegen 1/T aus der Steigung der Geraden für unterschiedliche Beladungen q ermittelt werden (siehe Abbildung 94 und Anhang Kapitel 7.7.2). Für eine Beladung von q = 0,2 mmol/g bis 0,7 mmol/g lag ΔH im Bereich von - 15,39 kJ/mol bis - 10,06 kJ/mol. Dieser Bereich ist typisch für eine Physisorption [217, 218, 281]. Die Adsorptionsisothermen für die anderen Analyte (Furfural, HMF, Ameisensäure und Essigsäure) lagen ebenfalls im Bereich < 40 kJ/mol, so dass in diesen Fällen ebenfalls eine Physisorption vorlag [218]. Alle

ermittelten Adsorptionsisothermen und Arrheniusgraphen sind im Anhang Kapitel 7.7.2 aufgelistet.

Die Werte der freien Energie ΔG und Entropie ΔS sind im Anhang Kapitel 7.7.2 dargestellt. Obwohl die thermodynamischen Daten nicht aus kalorischen Messungen stammten, können die gemessenen Wertebereiche der Zustandsgrößen als erste Nährung herangezogen werden [222]. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede zwischen kalorischen Daten und Daten aus Adsorptionsisothermen kaum Abweichungen aufwiesen [282, 283]. Nachdem es sich bei der Adsorption um eine Physisorption handelte, waren die Änderungen von ΔG in Abhängigkeit der Temperatur sehr gering. Die negativen Werte bestätigten, dass der Adsorptionsprozess spontan verläuft. Die negativen Entropiewerte decken sich mit der Tatsache, dass die adsorbierten Moleküle auf der Oberfläche einen geordneten Zustand einnahmen [218, 222, 281].

Die statischen Adsorptionsexperimente mit den Einzelkomponenten zeigten, dass die hydrophoben Komponenten mit steigender Hydrophobizität (HMF < phenolische Komponenten < Furfural) effektiv aus wässrigen Lösungen entfernt werden konnten. Der AIEX A103S adsorbierte sehr effektiv Ameisensäure, während Essigsäure eine geringere Affinität zeigte. In weiteren Schritten sollten anschließend die ausgewählten Adsorber MN202 und A103S eingesetzt werden, um mittels dynamischer Adsorption in einem Festbettadsorber die Abbauprodukte aus wässrigen Lösungen zu entfernen.

4.3.2.3 Entfernung von phenolischen Komponenten mit hydrophoben Adsorbern im Festbettadsorber

Nachdem MN202 als geeigneter Adsorber zur Abtrennung von hydrophoben Abbauprodukten wie phenolische Komponenten, Furfural und HMF ausgewählt und anhand von statischen Adsorptionstest thermodynamisch charakterisiert wurde, sollte anschließend die Abtrennung der Abbauprodukte in einem dynamischen Festbettadsorber realisiert werden. Wie bereits erwähnt, stellte die Entfernung aller hydrophoben Substanzen durch Adsorption mit MN202 den ersten Schritt der adsorptiven Detoxifikation dar, während eine zusätzliche Entfernung der organischen Säuren, insbesondere der Ameisensäure, mit dem AIEX A103S in einem zweiten Schritt realisiert werden sollte.
Generell wird ein Festbettadsorber durch die Durchbruchszeit und das Durchbruchsvolumen charakterisiert (siehe Kapitel 3.4.5). Als Kriterium zum Erreichen eines bestimmten

Abtrennungsgrads kann hierbei das Verhältnis der Konzentration am Adsorbereingang c_0 zur Konzentration am Adsorberausgang c definiert werden [224, 226, 284]. In der vorliegenden Arbeit wurde $c/c_0 = 0,1$ als Durchbruchskriterium gesetzt, d.h. sobald die Konzentration am Adsorberausgang 10 % der Eingangskonzentration betrug, war die Detoxifikation beendet. Im Vergleich zu statischen Adsorptionstests kann durch die Wahl des Durchbruchskriteriums somit die Entfernung der Komponenten beliebig eingestellt werden. Lediglich das Volumen der detoxifizierten Lösung ist abhängig von der Wahl des Durchbruchskriteriums. Je geringer c/c_0 gesetzt wird, desto kleiner wird das detoxifizierte Volumen.

Als Versuchsmatrix wurde eine die Organosolv-Aufschlusslösung LZ10 eingesetzt, die vor allem phenolische Komponenten (3,4 g/L bzw. 22mM), Ameisensäure (1,75 g/L) und Essigsäure (3,4 g/L) und Lävulinsäure (0,75 g/L) enthielt. Furfural und HMF konnten nicht detektiert werden. Durch die Verdampfung wurde demnach das flüchtige Furfural bereits aus der Aufschlusslösung entfernt. Dies konnten bereits mehrere Autoren bestätigen [163, 164]. Als Leitsubstanz zur Entfernung von hydrophoben Substanzen wurden somit die phenolischen Komponenten festgelegt. Alle technischen Daten zur Adsorption sind in Anhang Kapitel 3.1.4 aufgeführt.

Der Einfluss der Durchflussrate und der Konzentration von phenolischen Komponenten am Adsorbereingang c_0 auf das Durchbruchsvolumen $V_{0,1}$ bzw. die Durchbruchszeit $t_{0,1}$ sind in Abbildung 95 und Abbildung 96 dargestellt.

Es konnte beobachtet werden, dass das Durchbruchsvolumen und die Durchbruchszeit signifikant durch eine Steigerung der Eingangskonzentration der phenolischen Komponenten reduziert wurden. Somit war mit steigender Eingangskonzentration die Kapazität des Adsorbers früher erreicht. Mit steigender Durchflussrate wurde das Durchbruchsvolumen und die Durchbruchszeit mit steigender Durchflussrate aufgrund der geringeren Verweilzeit reduziert. Die Abnahme von Durchbruchsvolumen $V_{0,1}$ und Durchbruchszeit $t_{0,1}$ mit steigender Eingangskonzentration und steigendem Volumenstrom konnte von vielen Autoren beobachtet werden [224-226]. Die Arbeitsgruppe Srivastava konnte beispielsweise beobachten, dass das Durchbruchsvolumen bei der Adsorption von Phenol (100 mg/L) auf Bagasseasche von 3,33 L bei 0,2 ml/min auf 0,54 L bei 0,4 mL/min zurückging. Wurde die Eingangskonzentration an Phenol auf 500 mg/L bei 0,2 mL/min gesteigert, so reduzierte sich ebenfalls das Durchbruchsvolumen auf 0,39 L [227].

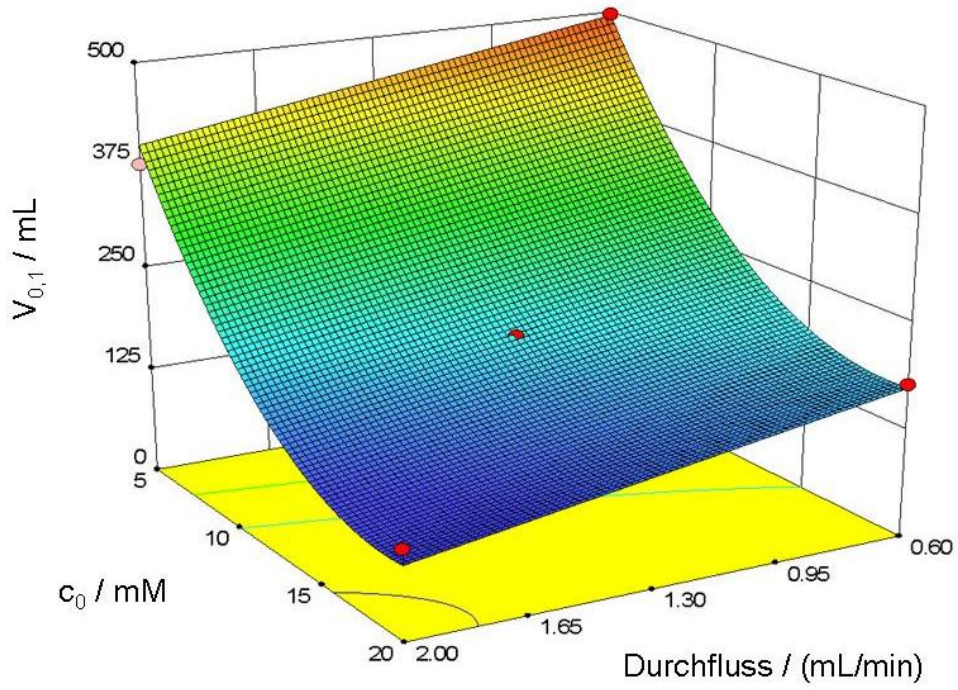


Abbildung 95: Durchbruchsvolumen $V_{0,1}$ in Abhängigkeit der Konzentration an phenolischen Komponenten am Adsorbereingang c0 und des Durchflusses.

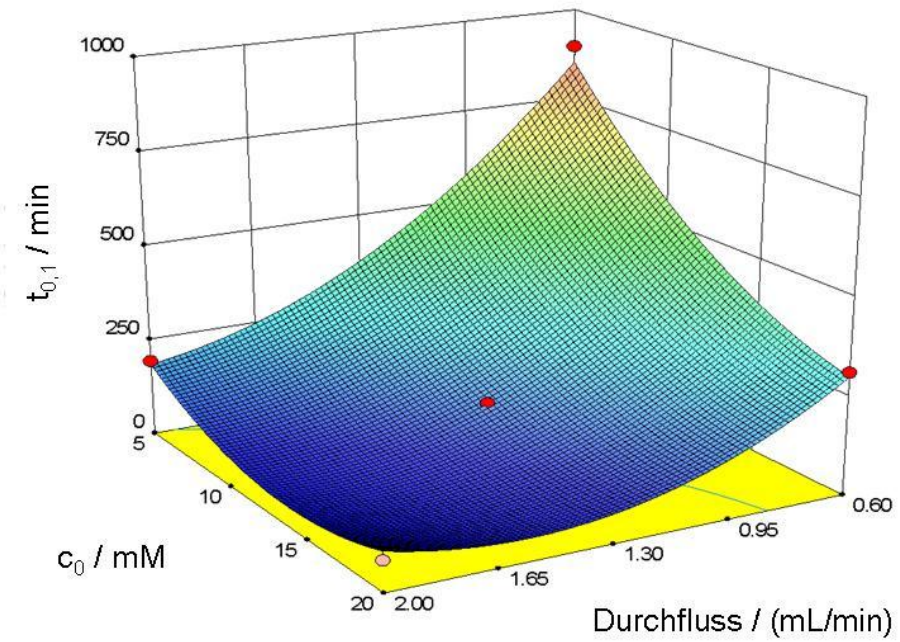


Abbildung 96: Durchbruchszeit $t_{0,1}$ in Abhängigkeit der Konzentration von phenolischen Komponenten am Adsorbereingang und in des Durchflusses.

Nachdem die Abhängigkeit des Durchbruchvolumens und der Durchbruchszeit von der Eingangskonzentration und von dem Volumenstrom charakterisiert wurde, erfolgte als

nächster Schritt die Optimierung der Adsorption. Als Optimierungsparameter wurde die Adsorberproduktivität P herangezogen (siehe Kapitel 3.4.5). Diese wurde definiert als das Verhältnis von Durchbruchsvolumen zu Gesamtbetriebszeit. Diese ergab sich aus der Durchbruchszeit und der Regenerationszeit des Adsorbers (100 min). Nachdem die Konzentration am Adsorbereingang bei einem realen Prozess nicht willkürlich gewählt werden kann, sondern von den Aufschlussbedingungen während der Vorbehandlung abhängig ist, wurde mit einer maximalen Konzentration an phenolischen Komponenten (20 mM) als Worst Case Scenario gerechnet. Mit Hilfe des Programms Design Expert konnte daraufhin die größtmögliche Durchflussrate für eine maximale Produktivität mit c_0 > 18 mM zu 1,6 mL/min berechnet werden. Mit diesem Durchfluss konnten 16 mL/g detoxifiziert werden.

Zur Überprüfung der optimierten Betriebsbedingungen wurden schließlich Experimente mit der vierfachen Menge an Adsorber (22,8 g) durchgeführt. Das vorhergesagte Durchbruchsvolumen bzw. Durchbruchszeit betrug demnach 444,6 mL bzw. 278 min. In Abbildung 97 sind die Messwerte der Durchbruchskurve für die Detoxifikation von 20 mM Aufschlusslösung mit einer optimalen Durchflussrate von 1,6 mL/min dargestellt.

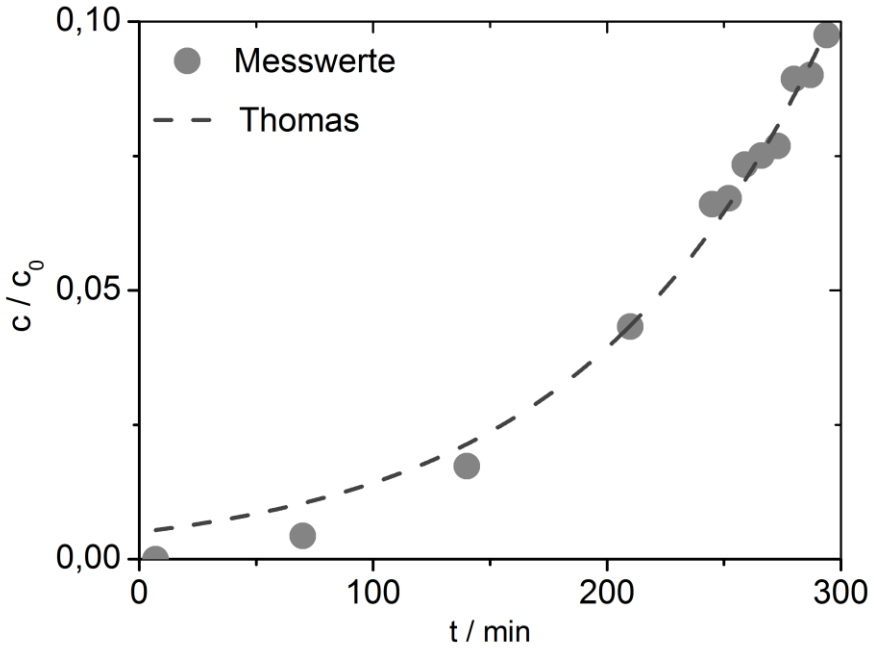


Abbildung 97: Messwerte zum Durchbruchsverhalten eines MN202-Festbettadsorbers bei optimalen Betriebsbedingungen (c_0 = 20 mM und 1,6 mL/min) sowie das entsprechende kinetische Modell nach Thomas.

Das gemessene Durchbruchsvolumen und die Durchbruchszeit betrugen hierbei 460 mL und 295 min. Die relative Abweichung vom Modell betrug 3,4 % (Durchbruchsvolumen) bzw. 6,1 % (Durchbruchszeit).

Die kinetische Beschreibung der Durchbruchskurve wurde mit Hilfe von drei unterschiedlichen empirischen Modellen nach Bohart-Adams, Clark und Thomas berechnet. Alle drei Modelle konnten den zeitlichen Verlauf der Durchbruchskurve exakt vorhersagen (R2 > 0,98). Auch von anderen Autoren konnten diese empirischen Modelle zur Beschreibung der Durchbruchskurve eingesetzt werden [224-227]. Exemplarisch ist der Verlauf der Durchbruchskurve für das Thomas-Modell in Abbildung 97 gezeigt. Die ermittelten kinetischen Parameter der drei Modelle sind in Tabelle 34 aufgelistet.

Tabelle 34: Kinetische Parameter für die Modelle nach Bohart-Adams, Clark und Thomas zur Vorhersage der Durchbruchskurve von phenolischen Komponenten (20 mM) bei 1,6 ml/min.

Modell	Modellparameter	Rel. Abweichung / %
Bohart-Adams	$k = 4{,}5*10^{-4}$ cm^3/(min*mmol)	0,2
	$N_0 = 2533$ mmol/g	
Clark	n = 2	0,2
	b = 0,01 1/min	
	$N_0 = 0{,}29$ mmol/cm^3	
Thomas	$k_T = 4{,}5\ 10^{-4}$ cm^3/(min*mmol)	0,2
	$q_0 = 5398$ mmol/g	

In der Literatur sind für diesen Adsorber und dieses Anwendungsgebiet keine Daten vorhanden, so dass kein direkter Vergleich erfolgen konnte. Zudem existieren nur vereinzelte Untersuchungen zur Detoxifikation von hydrophoben Adsorbern in kontinuierlichen Festbettadsorbern [190-192]. In diesen Veröffentlichungen wurden bis zu vier unterschiedliche Adsorber (hydropobe Adsorber und IEX) in Reihe geschaltet. Trotz der guten Detoxifikation der Aufschlussüberstände ließ sich aus diesen Daten nicht die Wirkungsweise der einzelnen Trägermaterialien interpretieren. Eine systematische Beschreibung der Zusammenhänge zwischen Betriebsparameter und erzielter Detoxifikationswirkung wurde nicht durchgeführt. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals das dynamische Verhalten von MN202 für die Abtrennung von phenolischen

Komponenten aus Aufschlussüberständen charakterisiert und optimiert werden. Mit Hilfe von empirischen Modellen konnte die Durchbruchskurve vorhergesagt werden. In weiteren Experimenten sollte analog zur Adsorption des MN202 die Detoxifikation der AIEX A103S charakterisiert und optimiert werden.

4.3.2.4 Entfernung von organischen Säuren mit Anionenaustauschern im Festbettadsorber

Nach der Entfernung von hydrophoben Abbauprodukten, insbesondere den phenolischen Komponenten, mit dem hydrophoben Adsorber MN202 in der ersten Adsorberstufe wurden ebenfalls dynamische Adsorptionsexperimente in einem zweiten Festbettadsorber mit dem AIEX A103S durchgeführt. In der ersten Adsorptionsstufe MN202 wurden sämtliche hydrophoben Komponenten entfernt und die zu erwartenden Prozessströme enthielten vorwiegend Ameisensäure und Essigsäure. Aus diesem Grund wurde zur Optimierung der dynamischen Adsorption der organischen Säuren mit dem AIEX A103S eine Mischung von Ameisensäure und Essigsäure bei unterschiedlichen Konzentrationen im Bereich von 2 - 4 g/L Ameisensäure und 3 - 8 g/L Essigsäure betrachtet. Im Gegensatz zu dem hydrophoben Adsorber MN202 konnte beim A103S die Durchflussrate wesentlich größer gewählt werden (2 mL/min - 5 mL/min, Angaben lt. Hersteller). Weitere technische Daten zur Adsorption sind in Kapitel 3.1.4 aufgeführt.

In den Experimenten konnte beobachtet werden, dass die Essigsäurekonzentration keinen signifikanten Einfluss auf die Durchbruchszeit und das Durchbruchsvolumen von Ameisensäure hatte. Es konnte in diesem Fall beobachtet werden, dass Essigsäure aufgrund der geringeren Bindungsaffinität von der Ameisensäure verdrängt wurde, so dass vor allem Ameisensäure aus der flüssigen Phase entfernt wurde, während die Essigsäure nicht abgetrennt wurde. Die Ameisensäure wurde somit für die Auslegung der adsorptiven Detoxifikation mit Hilfe des AIEX A103S als Leitsubstanz gesetzt.

In Abbildung 98 und Abbildung 99 ist das Durchbruchsvolumen $V_{0,1}$ und die Durchbruchszeit $t_{0,1}$ von Ameisensäure in Abhängigkeit der Konzentration an Ameisensäure am Adsorbereingang und der Durchflussrate bei einer Essigsäurekonzentration von 5,5 g/L dargestellt. Die Messdaten zeigten, dass das Durchbruchsvolumen und die Durchbruchszeit durch Steigerung der Ameisensäurekonzentration reduziert wurden. Durch die Steigerung der Konzentration wurde somit die Kapazität das Adsorbers früher erreicht. Die Erhöhung der Durchflussrate von 2,0 mL/min auf 5,0 mL/min führte ebenfalls zu einer deutlichen

Reduzierung der Durchbruchszeit und des Durchbruchsvolumens aufgrund der geringeren Verweilzeit im Adsorber.

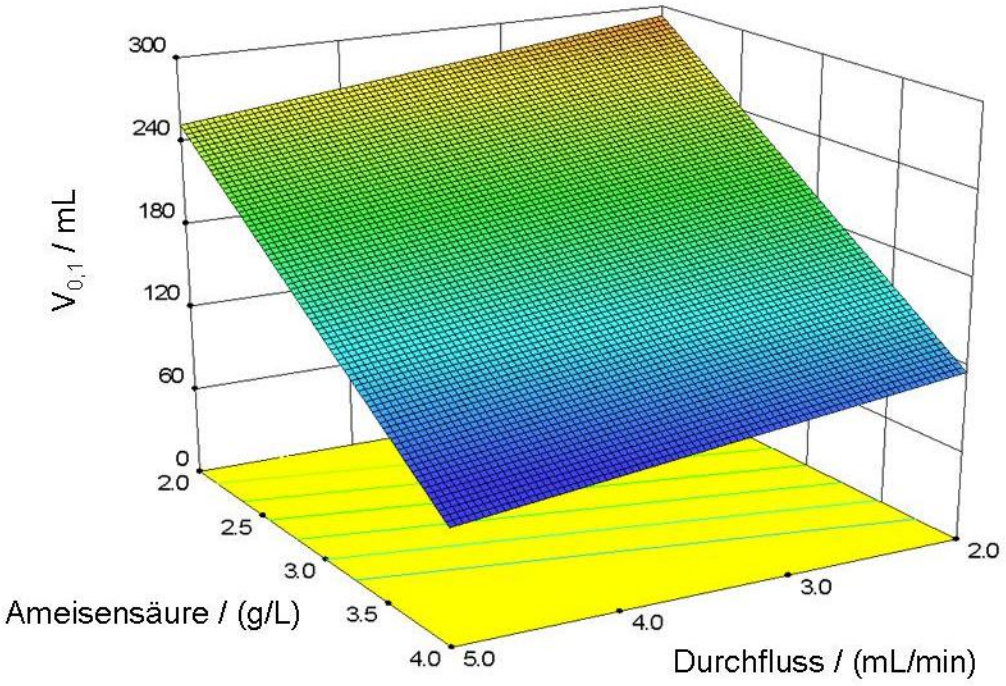


Abbildung 98: Durchbruchsvolumen $V_{0,1}$ in Abhängigkeit der Konzentration an Ameisensäure am Adsorbereingang und der Durchflussrate bei einer Essigsäurekonzentration von 5,5 g/L.

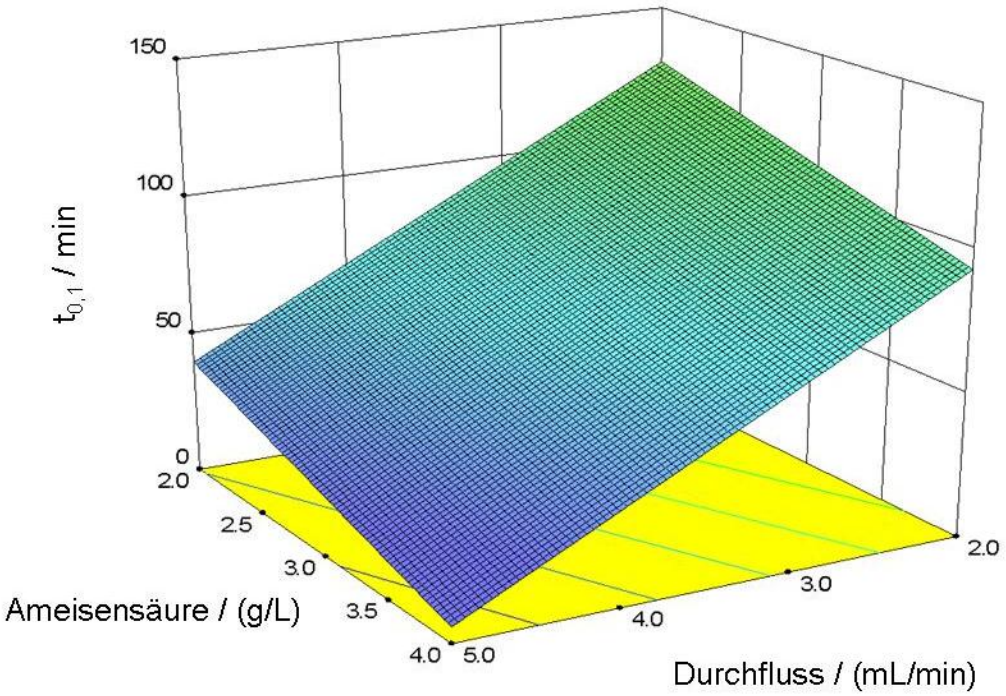


Abbildung 99: Durchbruchszeit $t_{0,1}$ in Abhängigkeit der Konzentration an Ameisensäure am Adsorbereingang und der Durchflussrate bei einer Essigsäurekonzentration von 5,5 g/L.

Das dynamische Verhalten der Durchbruchskurve von Ameisensäure wurde ebenfalls mit empirischen Modellen von Bohart-Adams, Clark, Thomas, Wolborska und Yoon-Nelson auf Grundlage der Versuchsergebnisse berechnet [224-227]. In Abbildung 100 ist ein Vergleich der verschiedenen Modelle mit den experimentellen Daten für 3,0 g/L Ameisensäure und 5,5 g/L Essigsäure bei 2,7 mL/min aufgezeigt. Bis auf das Wolborska-Modell konnten alle untersuchten mathematischen Modelle den Verlauf der Durchbruchskurven beschreiben. Im Falle des Wolborska-Modells waren die relativen Abweichungen bei Werten $c/c_0 > 0,1$ größer als 5 %.

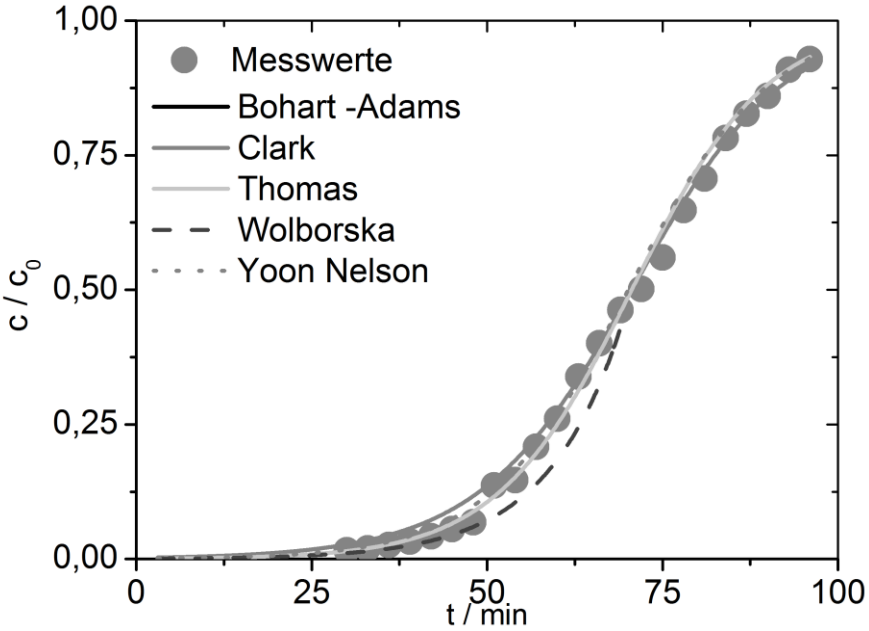


Abbildung 100: Vergleich der kinetischen Modelle von Bohart-Adams, Clark, Thomas, Wolborska und Yoon Nelson zur Beschreibung der Durchbruchskurve von Ameisensäure (c_0 = 3,0 g/L) bei 2,7 mL/min und einer Essigsäurekonzentration von 5,5 g/L.

Abbildung 101 zeigt beispielhaft die experimentellen Daten und das berechnete Thomas-Modell für die Durchbruchskurven von Ameisensäure mit steigenden Durchflussraten von 1,3 mL/min bis 5,0 mL/min für eine Essigsäurekonzentration von 5,5 g/L.

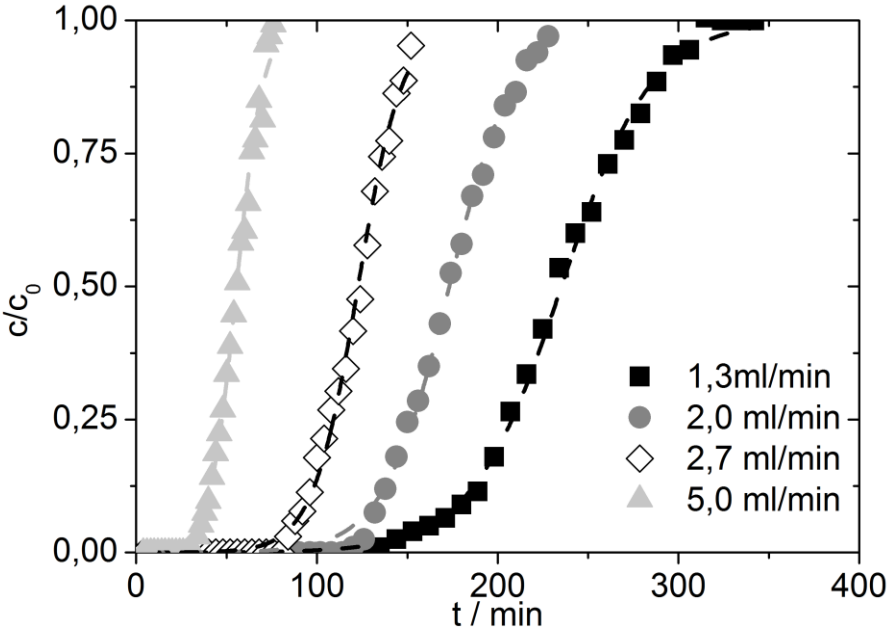


Abbildung 101: Gemessene Messpunkte und die mit dem Thomas-Modell vorhergesagte Durchbruchskurve für Ameisensäure (c_0 = 3,0 g/L) bei verschiedenen Durchflussraten. Die Essigsäurekonzentration betrug in allen Fällen 5,5 g/L.

Als Optimierungsparameter wurde wie beim MN202 ebenfalls die Adsorberproduktivität P herangezogen (siehe Kapitel 3.4.5). Diese wurde definiert als das Verhältnis von Durchbruchsvolumen zur Gesamtbetriebszeit. Diese ergab sich aus der Durchbruchszeit und der Regenerationszeit des Adsorbers (200 min). Die Regenerationszeit ergab sich im Falle des A103S aus der vollständigen Sättigung des Adsorbers mit 5 % NaCl Lösung, gefolgt von einem Anionenaustausch mit 2 % NaOH. Nachdem die Konzentration am Adsorbereingang bei einem realen Prozess nicht willkürlich gewählt werden kann, sondern von den Aufschlussbedingungen während der Vorbehandlung abhängig ist, wurde mit einer maximalen Konzentration an Ameisensäure von 4,0 g/L als Worst-Case Scenario gerechnet. Diese Konzentration übersteigt alle in der Literatur erreichten Ameisensäurekonzentrationen. Mit Hilfe des Programms Design Expert konnte daraufhin die größtmögliche Durchflussrate (im untersuchten Versuchsraum) für eine maximale Produktivität mit einer Ameisensäurekonzentration > 3,8 g/L zu 5,0 mL/min berechnet werden.

Zur Überprüfung des DoE-Modells wurden schließlich Experimente mit 6,0 g AIEX durchgeführt und die Versuchsmatrix hatte eine Ameisensäure- bzw. Essigsäurekonzentration von 2,0 g/L und 7,0 g/L. Das durch das empirische DoE-Modell vorhergesagte

Durchbruchsvolumen pro g Adsorber lag bei 34,6 mL/g. Somit war ein Durchbruchsvolumen von 208 mL in 41 min zu erwarten. Das experimentell ermittelte Durchbruchsvolumen betrug 200 mL mit einer Durchbruchszeit von 38 min, so dass das Adsorberverhalten mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung ausreichend genau vorhergesagt werden konnte.

Wie bei dem hydrophoben Adsorber MN202 ist ein Vergleich der Detoxifikation von Aufschlusslösungen mit einem A103S-Festbettadsorber aufgrund der mangelnden Literaturdaten erschwert. De Mancilha et al. [169] untersuchte den AIEX A103S in Festbettadsorbern. Die Detoxifikation wurde anhand eines Aufschlussüberstands einer sauren Vorbehandlung von Maisstroh durchgeführt. Angaben zu den Konzentrationen der Abbauprodukte wurden nicht gemacht. Insgesamt wurden drei Bettvolumina (BV) detoxifiziert und als Analyte wurden HMF, Furfural, Essigsäure und Xylose gemessen. Eine Beschreibung der Durchbruchskurve oder eine Parameteroptimierung wurde nicht betrachtet.
Des Weiteren existieren Veröffentlichungen, in denen bis zu vier unterschiedliche Adsorber (hydropobe Adsorber und IEX) in Reihe geschaltet wurden [190-192]. Trotz der guten Detoxifikation der Aufschlussüberstände ließ sich aus diesen Daten nicht die Wirkungsweise der einzelnen Trägermaterialien herauslesen. Eine systematische Beschreibung der Zusammenhänge zwischen Betriebsparametern und erzielter Detoxifikationswirkung wurde ebenfalls nicht durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der vorliegenden Arbeit erstmals das dynamische Verhalten von A103S für die Abtrennung von Ameisensäure und Essigsäure aus Aufschlussüberständen charakterisiert und optimiert werden konnte. Die Ameisensäure zeigte eine größere Affinität gegenüber A103S als die Essigsäure, so dass bei zunehmender Beladung adsorbierte Essigsäure wieder vom Adsorber desorbiert wurde. Somit konnte das dynamische Verhalten die Ergebnisse der statischen Experimente bestätigen. Die Adsorption der Ameisensäure war unabhängig von der Essigsäurekonzentration und dem Volumenstrom im untersuchten Versuchsraum. Durch Erhöhung der Ameisensäurekonzentration wurden das Durchbruchsvolumen und die Durchbruchszeit signifikant verringert. Mit Hilfe von empirischen Modellen konnte die Durchbruchskurve vorhergesagt werden. Somit können die entwickelten Modelle für eine zukunftige Auslegung des Verfahrens herangezogen werden.

4.3.3 Evaluierung der entwickelten Detoxifikationsverfahren anhand von Modellkultivierungen

Nach der systematischen Optimierung der einzelnen Detoxifikationsverfahren und der mathematischen Beschreibung der Prozesse (Kapitel 4.3.1 und 4.3.2), sollte anschließend die Detoxifikationswirkung anhand von Modellkultivierungen von *P. stipitis* evaluiert werden. Hierbei standen unterschiedliche Verfahrensvarianten zur Auswahl (siehe Abbildung 102).

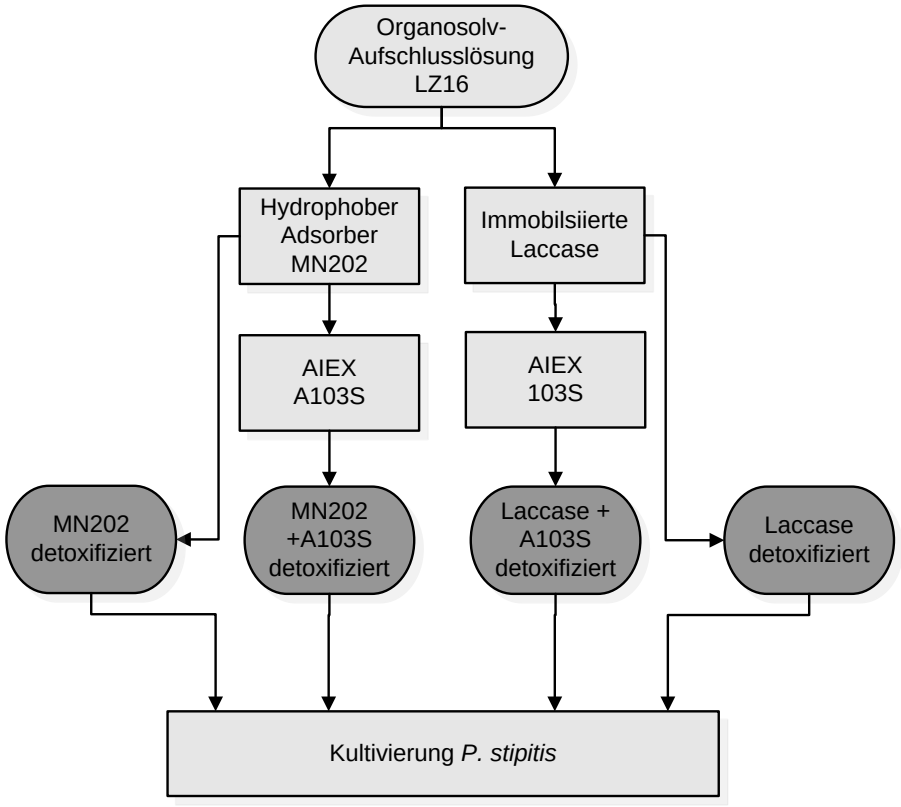


Abbildung 102: Überblick über die durchgeführten Verfahrensvarianten zur Detoxifikation der Weizenstroh-Organosolv-Aufschlusslösung LZ16.

Einerseits konnten die phenolischen Komponenten, die den größten Anteil der Abbauprodukte darstellten, selektiv von der immobilisierten Laccase durch Polymerisation abgetrennt werden. Andererseits konnte durch die Kombination aus immobilisierter Laccase mit dem AIEX A103S eine zusätzliche Entfernung der organischen Säuren, insbesondere der Ameisen-säure, realisiert werden. Eine weitere Gruppenabtrennung bestand prinzipiell aus der Kombination des hydrophoben Adsorbers MN202 gefolgt von der Adsorption der organischen Säuren auf A103S. Wie im Falle der Laccase, konnte der Adsorber MN202 auch einzeln eingesetzt werden, um die hydrophoben Komponenten wie Furfural, HMF und die Ligninabbauprodukte zu entfernen. Diese unterschiedlichen Verfahrensvarianten galt es

abschließend anhand ihres Abtrennungsvermögens und der Fermentierbarkeit der behandelten Aufschlusslösungen zu vergleichen. Als Aufschlusslösung wurde beispielhaft eine Organosolv-Aufschlusslösung LZ30 eingesetzt, die bei der zweistündigen Behandlung von Weizenstroh bei 220 °C entstand. Bei der Entfernung des Ethanols aus der Aufschlusslösung mit Hilfe eines Rotationsverdampfers wurde das flüchtige Furfural ebenfalls abgetrennt, sodass LZ30 eine sehr geringe Furfuralkonzentration von 0,1 g/L aufwies.

In Tabelle 35 ist die Abtrennung der Zucker und Ligninabbauprodukte für die unterschiedlichen Detoxifikationsverfahren im Vergleich zu Daten aus der Literatur aufgezeigt. Aufgrund der geringen Furfuralkonzentration von 0,1 g/L konnten in dieser Arbeit alle Verfahrensvarianten Furfural vollständig entfernen. Der hydrophobe Adsorber MN202 konnte die phenolischen Komponenten um 95 %, HMF um 80 % und Lävulinsäure um 78 % reduzieren. Die Ameisensäure wurde wie erwartet nur um 47 % reduziert. Das zweistufige Kombinationsverfahren aus MN202 und A103 konnte hingegen die Ameisensäure um 80 % reduzieren. Die Abtrennung der anderen Analyten entsprach in etwa dem einstufigen MN202-Verfahren. Demnach konnte der AIEX 103S zusätzlich weitere Ameisensäure aus der Aufschlusslösung entfernen.

Die immobilisierte Laccase konnte, wie erwartet, selektiv 82 % der phenolischen Komponenten aus der Aufschlusslösung entfernen. Darüber hinaus konnten auf der hydrophoben Grundmatrix des A103S ebenfalls die geringen Mengen an Furfural durch Sorption gebunden werden. Eine zusätzliche Behandlung mit dem A103S führte vor allem zu einer weiteren Abtrennung von HMF (80%) sowie Lävulinsäure (30 %). Im Gegensatz zu dem MN202 + A103S-Verfahren konnte für Laccase + A103S nur 60 % der Ameisensäure aus der Aufschlusslösung entfernt werden, weil in diesem Fall größere Mengen an HMF und Lävulinsäure auf der A103S-Matrix adsorbiert wurden.

Ein direkter Vergleich mit den Literaturdaten ist äußerst schwierig, nachdem keine identischen Ausgangskonzentrationen der Abbauprodukte der Bewertung zu Grunde gelegt werden können. Generell ist jedoch anzumerken, dass die entwickelten ein- und zweistufigen Verfahren eine vergleichbare Abtrennung der Abbauprodukte zeigten. Tendenziell zeigten alle zweistufigen Prozesse eine höhere Abtrennung der Abbauprodukte als einstufige Verfahren. Nachteilig hierbei sind jedoch die erhöhten Prozesskosten. Des Weiteren war ersichtlich, dass Anionenaustauscher wie A103S, A860S oder D311 dazu eingesetzt werden

konnten, organische Säuren abzutrennen, während hydrophobe Adsorber oder Aktivkohle vor allem hydrophobe Komponenten wie Phenole, Furfural oder HMF entfernen können.

Tabelle 35: Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten Detoxifikationsverfahren mit Daten aus der Literatur

Methode	Abtrennung in %					
	Phenole	Furfural	HMF	Ameisensäure	Essigsäure	Lävulinsäure
MN202 diese Arbeit	95	100	80	40	94	74
MN202+A103S diese Arbeit	96	100	80	75	94	80
Laccase* diese Arbeit	82	100	10	20	0	
Laccase*+A103S diese Arbeit	71	100	90	62	20	39
A013S [169]	k. A.	99	100	k. A.	100	k. A.
AK+A860S [191]	69	100	99	k. A.	49	k. A.
AK+MN105 [191]	95	100	100	k. A.	83	k. A.
Laccase T. versicolor [163]	80	0	0	0	0	0
AG-1-X8 [163]	71	31	26	92	89	86
Laccase C rigida [160]	75	0	0	0	0	0
D311+ Ether [285]	96	81	k. A.	99	60	k. A.
D311+$Ca(OH)_2$ [285]	77	90	k. A.	78	96	k. A.

* immobilisierte Laccase *T. versicolor*; AK = Aktivkohle; k. A. = keine Angaben

Nachdem die Aufschlusslösungen mit den vier verschiedenen Verfahrensvarianten detoxifiziert wurden, wurden die erhaltenen Aufschlusslösungen als Kultivierungsmedium eingesetzt. Als Modellorganismus wurde *P. stipitis* eingesetzt, der sowohl C5- als auch C6-Zucker bei anaeroben bis mirko-anaeroben Kultivierungsbedingungen vorwiegend zu Ethanol umsetzt [286, 287], während Xylitol unabhängig von der Begasungsrate nur in geringen Mengen produziert wird [288].

Als Referenz wurde *P. stipitis* in einer Mineralmedium ohne Aufschlusslösung mit 50 g/L Xylose eingesetzt. Die Ansätze mit nicht detoxifizierten und detoxifizierten Aufschlussüberständen wurden mit den gleichen Mengen an Mineralien versetzt. Die Xylosekonzentration dieser Ansätze wurde ebenfalls auf 50 g/L Xylose eingestellt. In Abbildung 103 ist die Ethanolproduktivität von *P. stipitis* für das Referenzmedium und für die nicht detoxifizierten und detoxifizierten Aufschlussüberstände dargestellt.

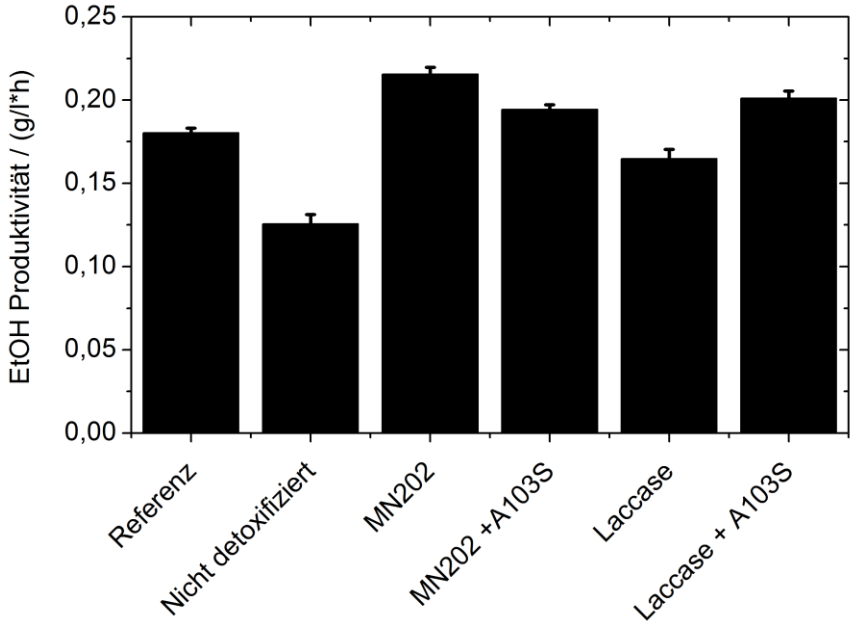


Abbildung 103: Ethanolproduktivität von *P. stipitis* im Referenzmedium (Mineralmedium 50 g/L Xylose) und in den nicht detoxifizierten und detoxifizierten Kultivierungsmedien mit Xylose 50 g/L als einzige C-Quelle.

Es konnte beobachtet werden, dass im Gegensatz zum Referenzmedium, die Ethanolproduktivität mit dem nicht detoxifizierten Medium von 0,18 g/(l*h) auf 0,13 g/(l*h) reduziert wurde. Im Falle von MN202 führten die verbliebenen organischen Säuren (vor

allem Essigsäure 14,4 mM und Lävulinsäure 1,11 mM) sogar zu einer erhöhten Ethanolproduktivität. Dies konnte auch von Larsson bestätigt werden [278]. Sowohl Essigsäure als auch Lävulinsäure stimulierten bei Konzentrationen bis 100 mM die Ethanolproduktivität, während bei höheren Konzentrationen diese organischen Säuren inhibierend wirkten. Die Laccase-katalysierte Detoxifikation konnte mit 0,17 g/(L*h) 95 % der Ethanolproduktivität der Referenz aufweisen. Die Detoxifikationsverfahren MN202 + A103S und Laccase + A103S führten hingegen zu den gleichen Ethanol-Produktivität wie bei der Verwendung des Referenzmediums.

Somit konnten alle durchgeführten Detoxifikationsverfahren die Fermentierbarkeit der Aufschlusslösungen vollständig wieder herstellen. Insbesondere waren bereits die einstufigen Verfahren mit MN202 und Laccase in der Lage, die Aufschlusslösungen effektiv zu detoxifizieren. Eine erfolgreiche Detoxifikation der entwickelten Verfahren konnte demnach gezeigt werden. Die in dieser Arbeit erzielten Ethanolproduktivitäten von 0,18 g/(L*h) - 0,20 g/(L*h) waren ähnlich zu den in der Literatur berichteten Produktivitäten von 0,11 g/(L*h) - 0,27 g/(L*h), die bei der Kultivierung von *P. stipitis* mit Aufschluss-überständen erreicht wurden [289-293].

5 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel soll die vorliegenden Arbeit zusammengefasst werden, um abschließend auf zukünftige Arbeitschritte einzugehen.

5.1 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Verfahren und Prozessmodellen zur Gewinnung von Glukose-, Xylose- und Ligninproduktströmen aus lignocellulosehaltigen Rohstoffen. Als Rohstoffe wurden Weizenstroh, Miscanthus und Pappelholz eingesetzt. Die gewonnenen Glukose-, Xylose- und Ligninfraktionen sollten hohe Reinheitsgrade aufweisen, damit in den Folgeprozessschritte einer zukünftigen LCB keine Nebenprodukte aufgrund von Verunreinigungen auftreten.

Zur Realisierung dieser Zielsetzung mussten folgende Einzelprozesse entwickelt, optimiert und zu einem Gesamtverfahren verknüpft werden:

- die Vorbehandlung der lignocellulosehaltigen Rohstoffe Weizenstroh, Miscanthus und Pappelholz,
- die enzymatische Hydrolyse der Cellulose in der vorbehandelten Faserfraktion bei möglichst hohen Feststoffkonzentrationen und
- die Abtrennung von Lignocellulose-Abbauprodukten aus den hemicellulosehaltigen Aufschlusslösungen.

Zusätzlich wurden für eine Maßstabsübertragung mathematische Modelle für die relevanten Prozesseinheiten entwickelt [74].

Vorbehandlung der Lignocellulose

Bei der Auswahl von geeigneten Vorbehandlungsmethoden für Weizenstroh, Pappel und Miscanthus wurde erstmals ein systematischer Ansatz anhand einer charakteristischen Prozessgröße, dem sogenannten erweiterten Severity-Faktors $\log R''_0$ verfolgt. Diese Größe errechnet sich aus den Prozessgrößen Zeit, Temperatur und pH-Wert, so dass es möglich war, unterschiedliche Verfahren wie saure oder alkalische Behandlungen miteinander vergleichen zu können. Die Ergebnisse zeigten, dass ein geeignetes Vorbehandlungsverfahren individuell vom Rohstoff abhing.

Die Vorbehandlung von Weizenstroh mit einem Organosolv-Verfahren war weniger geeignet als der alkalische Aufschluss mit NaOH. Weizenstroh wurde aufgrund der Ligninstruktur sehr effektiv von NaOH delignifiziert. Die optimalen Betriebsparameter waren hierbei 1,45 % NaOH bei 190 °C für 30 min. Die alkalische Vorbehandlung führte zu einer hohen Glukoseausbeute von 85 % mit einer Selektivität von S > 0,93 $g_{Glukose}/g_{Gesamt}$. Der alkalische Aufschluss von Weizenstroh führte zu keiner vollständigen Xylansolubilisierung, so dass in einem zweiten Vorbehandlungsschritt die Xylanfraktion selektiv mit Xylanasen entfernt wurde. Hierzu wurden die Enzyme Cellic HTec und Accellerase XY ausgewählt. Diese konnten im Vergleich zur Literatur wesentlich höhere Ausbeuten im Bereich von 40 % und höhere Xyloseselektivitäten S > 0,9 g_{Xylan}/g_{Gesamt} bei einem maximalen Feststoffgehalt von 5 % erreichen. Insgesamt betrug die Xylanausbeute 63 % mit einer Selektivität von S = 0,93 g_{Xylan}/g_{Gesamt}. Am Ende der Fraktionierung konnte durch saure Fällung von Lignin aus der Aufschlusslösung 57 % Lignin isoliert werden.

Im Falle von Miscanthus war es möglich, mit Hilfe eines optimierten säurekatalysierten Organosolv-Prozesses (0,16 % H_2SO_4, 50 % EtOH) bei 185 °C für 60 min die Faser effektiv zu delignifizieren, um somit eine Glukoseausbeute von 77 % zu erzielen. Die Glukoseselektivität lag hier bei > 0,93 $g_{Glukose}/g_{Gesamt}$. Nach Abzug des Ethanols durch Verdampfung konnten 70 % des Lignins als Feststoff isoliert werden. Die Xyloseausbeute der Vorbehandlung betrug 64 % mit einer Selektivität von S = 0,93 g_{Xylan}/g_{Gesamt}.

Als optimales Vorbehandlungsverfahren für Pappelholz konnte ebenfalls ein säurekatalysierter Organosolv-Prozess (0,19 % H_2SO_4, 50 % EtOH) identifiziert werden. Die optimalen Temperaturen und Haltezeiten lagen bei 182 °C und 48 min. Hierbei wurde eine Glukoseausbeute von 84 % mit einer Selektivität S > 0,93 $g_{Glukose}/g_{Gesamt}$ erzielt. Die Xyloseausbeute betrug 86 % mit einer Selektivität von S = 0,93 g_{Xylan}/g_{Gesamt}. Die Lignin-ausbeute lag bei 71 %.

Als Basis für eine Maßstabsübertragung von Vorbehandlungsverfahren wurde in dieser Arbeit für die ausgewählten Verfahren erstmals ein sogenanntes Modified Severity Modell (MSM) entwickelt. Das MSM-Modell konnte die Zielgrößen Delignifizierung, Xylansolubilisierung, Xylanausbeute in der Aufschlusslösung und die enzymatische Hydrolysierbarkeit der vorbehandelten Faser anhand der charakteristischen Prozessgrößelog M_0 vorhersagen. Diese Größe beinhaltete sowohl den Einfluss der Haltezeit, der Temperatur als auch die Konzentration von H^+- oder OH^--Ionen. Mit Hilfe des MSM-Modells konnten ebenfalls optimale Betriebsbedingungen in Form von optimalen log M_0-Werten identifiziert werden.

Unter Beibehaltung der optimalenlog M_0-Werte wurde abschließend eine erfolgreiche Maßstabsübertragung am Beispiel des NaOH-Aufschlusses von Weizenstroh von einem 1 L-Autoklaven in einer 13 L-Reaktor durchgeführt.

Enzymatische Hydrolyse der Cellulosefraktion bei hohen Feststoffgehalten

Nachdem die Vorbehandlung der Rohstoffe Weizenstroh, Miscanthus und Pappelholz optimiert und das entsprechende Prozessmodell erstellt wurden, wurde anschließend die enzymatische Hydrolyse der vorbehandelten Cellulosefaser betrachtet. Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines enzymatischen Hydrolyseverfahrens von vorbehandelter Lignocellulose bei Feststoffgehalten > 10 % zur Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute. Hierbei sollte die Reaktionskinetik der enzymatischen Hydrolyse mit mathematischen Modellen bei Feststoffkonzentrationen > 10 % als Basis einer Prozessauslegung beschrieben werden.

Zu Beginn der Untersuchungen konnte die kommerzielle Cellulase Cellic CTec anhand ihrer Celluloseausbeuten (>70 %) und Selektivitäten (S > 0,93 $g_{Glukose}/g_{Gesamt}$) als bestes Präparat identifiziert werden. Aufgrund der hohen ß-Glukosidaseaktivität wurde die Cellulose vollständig zu Glukose umgesetzt. Um frühzeitig in der Prozessentwicklung Aussagen über die Hydrolysierbarkeit der vorbehandelten Faserfraktionen (Weizen, Miscanthus und Pappel) bei hohen Feststoffgehalten (> 10 % TS) zu erhalten, wurde in dieser Arbeit erstmals mit Hilfe eines statistischen Versuchplans die minimale Enzymdosierung an Cellic CTec ermittelt, bei der innerhalb von 48 h eine Glukoseausbeute von 70 % unter Maximierung der Feststoffkonzentration erreicht wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass die Hydrolysierbarkeit in der Reihenfolge Miscanthus < Weizenstroh < Pappel zunahm. Um die geforderte Ausbeute von 70 % zu erreichen, mussten für Weizen, Miscanthus und Pappel 29 FPU/g_{TS}, 45 FPU/g_{TS} und 25 FPU/g_{TS} eingesetzt werden.

Die Versuche im Schüttelkolben zeigten, dass mit steigendem Feststoffgehalt die Ausbeuten aufgrund der höheren Viskositäten sanken. Somit musste für die Prozessentwicklung eine Intensivierung des Stofftransportes realisiert werden. Aus diesem Grund wurde das Reaktionssystem von einem Schüttelkolben auf ein skalierbares Rührreaktorsystem übertragen. Hierfür wurden ein doppelstufiger Schrägblattrührer und ein Segmentwendelrührer eingesetzt. Mit Hilfe von grundlegenden Untersuchungen zum Leistungseintrag und zur Mischzeitcharakteristik konnte festgestellt werden, dass der Segmentwendelrührer bei hohen Viskositäten ein besseres Homogenisierungsverhalten zeigte als der Schrägblattrührer. Die Hydrolyse von Lignocellulose-Substraten im Hochfeststoff-

Hydrolysereaktor wurde anschließend am Beispiel von alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh durchgeführt. Das in dieser Arbeit entwickelte Reaktorkonzept konnte im Vergleich zu Reaktorsystemen aus der Literatur sehr effizient lignocellulosehaltige Substrate bei hohen Feststoffgehalten (> 10 % TS) innerhalb von 48 h hydrolysieren. Im Vergleich zu den Schüttelkolbenexperimenten konnte die Glukoseausbeute nach 48 h bei 20 % TS von 30 % auf 76 % erhöht werden. Zudem konnte der Zeitpunkt der Verflüssigung der Fasersuspension von 60 h auf 8 h reduziert werden. Somit hatte der Einsatz des Rührreaktors mit Segementwendelrührer eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute zur Folge.

Die anschließende Beschreibung der Reaktionskinetik konnte mit dem sogenannten Multireaktionsmodell (MRM) beschrieben werden. Im Gegensatz zu Literatur konnte in dieser Arbeit erstmals das MRM-Modell für Hydrolysen > 10 % TS eingesetzt werden. Das Modell wurde zudem weitergehend modifiziert, um Reaktionen die unter Stofftransportlimitation ablaufen, ebenfalls beschreiben zu können.

Abtrennung von Lignocellulose - Abbauprodukten aus den hemicellulosehaltigen Aufschlusslösungen

Zur Aufarbeitung und Detoxifikation von zuckerhaltigen Aufschlusslösungen wurden in der vorliegenden Arbeit abschließend sowohl durch Laccase-katalytisierte als auch adsorptive Verfahren charakterisiert, optimiert und mit mathematischen Modellen beschrieben. Als Verfahrensvarianten wurden Prozesse betrachtet, die entweder aus einem hydrophoben Adsorber MN202 oder einer immobilisierten Laccase (*T. versicolor*) in der ersten Stufe und einer Entfernung der organischen Säuren mit einem Anionentauscher A103S in einer zweiten Stufe bestanden.

Bei Verwendung der immobilisierten Laccase konnten die phenolischen Komponenten durch Polymerisation auf der Trägeroberfläche abgelagert werden. Die unlöslichen Reaktionsprodukte konnten mit einer Ethanol-Wasser-Lösung resolubilisiert werden, ohne dass es zu einer zusätzlichen Inaktivierung der Laccase kam. Somit konnte in dieser Arbeit erstmals ein Verfahren zur In-Situ-Produktabtrennung von phenolischen Komponenten aus Aufschlusslösungen mit Hilfe von immobilisierter Laccase entwickelt werden.

Abschließend konnte die Detoxifikationswirkung der entwickelten Verfahren anhand der Kultivierung von *P. stipitis* in Organosolv-Aufschlusslösungen erfolgreich aufgezeigt werden. Die Detoxifikationsverfahren konnten die Ethanolproduktivität von 0,13 g/(L*h) auf 0,18-

0,22 g/(L*h) in der Reihenfolge Laccase < Laccase+A103S, MN202+A103S < MN202 steigern.

5.2 Ausblick

Die durchgeführte Arbeit zeigte wesentliche Fortschritte entlang der gesamten Prozesskette von der Vorbehandlung über die Hydrolyse bis hin zur Aufreinigung der Stoffströme auf. Die entwickelten empirischen mathematischen Modelle sollten in weiteren Schritten für die Maßstabsübertragung der untersuchten Prozesseinheiten herangezogen werden.

Am Ende dieser Arbeit standen C5- und C6-Zucker zur Verfügung, die in Zukunft für Folgeprozesse wie beispielsweise Fermentation oder chemische Konversion eingesetzt werden sollten. Mögliche Anwendungsgebiete wären beispielsweise die fermentative Herstellung von Monocarbonsäuren, Dicarbonsäuren, Biotensiden oder Alkoholen. Für diese Prozesse wird die Fermentierbarkeit der Prozessströme einen zentralen Parameter darstellen. Die in dieser Arbeit entwickelten mehrstufigen Detoxifikaitonsverfahren können dabei eingesetzt werden, um gezielt die Stoffströme zu detoxifizieren. Hierbei müssen im Vorfeld Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Lignocellulose-Abbauprodukte für die verwedeten Produktinosstämme erstellt werden, um die Anforderungen an die Detoxifikation zu identifizieren.

Neben biotechnologischen Folgeprozessen wird die chemische Umsetzung von Zuckern zu Produkten wie HMF, Furfural, Xylitol oder Sorbitol zukünftig ebenfalls eine wesentliche Rolle spielen.

Ein weiteres großes Aufgabengebiet wird die stoffliche Nutzung von Lignin darstellen. Im Zuge dieser Arbeit konnte reines Lignin isoliert werden, das für weitere biotechnologische oder chemische Konversionsprozesse eingesetzt werden kann. Hierzu sollte ein weiterer Fokus auf die Lignineigenschaft in Abhängigkeit der relevanten Prozessparameter während des Aufschlusses von Lignocellulose untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Rubin, E.M., *Genomics of cellulosic biofuels.* Nature, 2008. **454**(14).
2. Bader, J. and S. Horn, *Informationsserie Nachwachsende Rohstoffe*. 2009, Fonds der chemischen Industrie im Verband der Chemischen Industrie e. V.: Frankfurt a. M.
3. Peters, D. and N. Holst, *Nachwachsende Rohstoffe in der Industrie*. 2010, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR): Gülzow.
4. *http://www.theoildrum.com/story/2006/11/13/225447/79*.
5. Busch, R. and T. Hirth, The utilization of renewable resources in German industrial production. Biotechnol J,, 2006. **1**: p. 770–776.
6. Muffler, K. and R. Ulber, Use of Renewable Raw Materials in the Chemical Industry – Beyond Sugar and Starch. Chem Eng Technol,, 2008. **31**(5): p. 638–646.
7. Lichtenthaler, F.W. and S. Peters, *Carbohydrates as green raw materials for the chemical industry.* C R Chimie, 2004. **7**: p. 65–90.
8. Zhu, S. and Y. Wu, The effect of microwave irradiation on enzymatic hydrolysis of rice straw. Bioresource Technology, 2006. **97**: p. 1964–1968.
9. Kamm, B. and M. Kamm, *International biorefinery systems.* Pure Appl. Chem., Vol. 79, No. 11, pp. , , 2007. **79**(11): p. 1983–1997.
10. Michels, J., Lignocellulose-Bioraffinerie: Von der Idee zur Realisierung, in Projekttag "Stoffliche Biomassenutzung - Mit Innovationen den Wirtschaftsstandort Deutschland stärken". 2010.
11. Hofmann, M., *Energieholzproduktion in der Landwirtschaft*, F.N.R.e.V. (FNR), Editor. 2010: Gülzow-Prüzen.
12. Joint deliverable report Biorefinery Euroview (addenda D1.2 and D1.3) & Biopol (D4.2). 2009, IAR und Wageningen UR.
13. Cherubini, F., The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. Energy Conversion and Management, 2010. **51**: p. 1412–1421.
14. Kamm, B., P.R. Gruber, and M. Kamm, *Biorefineries – Industrial Processes and Products*. 2007 Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
15. Huijgen, W.J.J. and J.H. Reith, Pretreatment and Fractionation of Wheat Straw by an Acetone-Based Organosolv Process. Ind. Eng. Chem. Res., 2010. **49**: p. 10132–10140.

16. Brosse, B., P. Sannigrahi, and A. Ragauskas, Pretreatment of Miscanthus x giganteus Using the Ethanol Organosolv Process for Ethanol Production. Ind. Eng. Chem. Res. , 2009. **48**: p. 8328–8334.
17. Pan, P. and N. Gilkes, Bioconversion of Hybrid Poplar to Ethanol and Co-Products Using an Organosolv Fractionation Process: Optimization of Process Yields. Biotechnology and Bioengineering, 2006. **94**(5): p. 851-861.
18. Carpita, N.C. and D.M. Gibeaut, Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. me Plant Journal, 1993. **3**(1): p. 1-30.
19. Boudet, A.M. and S. Kajita, Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. TRENDS in Plant Science 2003. **8**(12): p. 576-581.
20. Ritter, S.K., *Lignocellulose: A Complex Biomaterial.* C&EN, 2008. **86**(49): p. 15.
21. Sánchez, C., Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. Biotechnology Advances 2009. **27**: p. 185–194.
22. A Cornu, A. and J.M. Besle, Lignin-carbohydrate complexes in forages: structure and consequences in the ruminal degradation of cell-wall carbohydrates. Reprod Nutr Dev, 1994. **34**: p. 385-398.
23. Argyropoulos, D.S. and S.M. Menachem, *Lignin.* Advances in Biochemical Engineering, 1997. **57**: p. 128-151.
24. Beg, Q.K. and M. Kapoor, *Microbial xylanases and their industrial applications: a review.* Appl Microbiol Biotechnol, 2001. **51**: p. 326–338.
25. Gírio , F.M., C. Fonseca, and F. Carvalheiro, *Hemicelluloses for fuel ethanol: A review.* Bioresource Technology, 2010. **101**: p. 4775–4800.
26. Ingram, T. and T. Rogalinski, *Semi-continuous liquid hot water pretreatment of rye straw.* J. of Supercritical Fluids, 2009 **48**: p. 238–246.
27. Allen, S.G. and D. Schulman, A Comparison of Aqueous and Dilute-Acid Single-Temperature Pretreatment of Yellow Poplar Sawdust. Ind. Eng. Chem. Res., 2001. **40**: p. 2352-2361.
28. Lloyd, T.A. and C.E. Wyman, Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. Bioresource Technology 96, 2005. **96**: p. 1967–1977.
29. Wen, J.-L. and L.-P. Xiao, Comparative study of alkali-soluble hemicelluloses isolated from bamboo (Bambusa rigida). Carbohydrate Research 2011. **346**: p. 111–120.

30. Sun, Y.-C., Organosolv- and alkali-soluble hemicelluloses degraded from Tamarix austromongolica: Characterization of physicochemical, structural features and thermal stability

Polymer Degradation and Stability 2011.

31. Saake, B. and R. Lehnen, *Lignin*, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2007, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim.

32. Martinez, A.T. and S. Camarero, *Studies on wheat lignin degradation by Pleurotus species using analytical pyrolysis.* Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2001. **58–59**: p. 401–411.

33. Whetten, R. and R. Sederoff, *Lignin Biosynthesis.* The Plant Cell, 1995. **7**: p. 1001-1013.

34. Kamm, B., C. Hille, and P. Schönicke, *Green biorefinery demonstration plant in Havelland (Germany).* Biofuels, Bioprod. Bioref., 2010. **4**: p. 253–262

35. Fagernäs, L. and Y. Solantausta, *Lignocellulosic Biorefinery*

in *BioreFuture*. 2009, VTT Technical Research Centre of Finland: Brüssel.

36. Bozell, J.J. and G.R. Petersen, Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy's "Top 10"*revisited.* Green Chem., 2010. **12**: p. 539–554.

37. Carvalheiro, F., F.C. Duarte, and F.M. Gírio, *Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments.* Journal of Scientific & Industrial Research, 2008. **67**: p. 849-864.

38. Frost and Sullivan, Chapter 2: Biorefineries, in Strategic Analysis of the Worldwide Market for Biorenewable Chemicals. 2008.

39. Amidon, T.E. and S. Liu, *Biorefinery:Development and Status in USA*, in *PRS*. 2009: Kuopio, Finland.

40. Solomon, B.D. and J.R. Barnes, *Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy.* Biomass and Bioenergy, 2007. **31**: p. 416–425.

41. Sanderson, K., *A field in ferment.* Nature, 2006. **444**(7).

42. Tolan, J.S., *Iogen's process for producing ethanol from cellulosic biomass.* Clean Techn Environ Policy, 2002. **3**: p. 339–345.

43. Pauls, A. and M. Carus, Potenzialanalyse über alternative heimische und exotische Nachwachsende Rohstoffe für die Holzwerkstoffindustrie in Deutschland, nova-Institut, Editor. 2008: Knapsack.

44. LTZ. *Tagungsband: Kurzumtriebshölzer und Miscanthus*. 2008. Rheinstetten: Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg.
45. von Wühlisch, G., *Pappeln, Aspen und Weiden in Deutschland: Nutzung, Erhaltung, Forschung*, B.f.F.-u. Holzwirtschaft, Editor. 2003: Hamburg.
46. Rödl, A., *Ökobilanzierung der Holzproduktion im Kurzumtrieb*, I.f.Ö.d.F.-u. Holzwirtschaft, Editor. 2008: Hamburg.
47. *http://www.miscanthus.de/flachen.htm*. 16.06.2011].
48. Reeg, T. and A. Bemmann, *Anbau und Nutzung von Bäumen auf landwirtschaftlichen Flächen*. 2009, Weinheim: Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
49. *http://energieberatung.ibs-hlk.de/plangetrei_dat.htm*. 14.06.2011].
50. *http://www.miscanthusverein.de/10.html*. 14.06.2011].
51. Galbe, M. and G. Zacchi, *Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production.* Adv Biochem Engin/Biotechnol, 2007. **108**: p. 41–65.
52. da Costa Sousa, L. and S. Chundawat, *'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies.* Current Opinion in Biotechnology 2009. **20**: p. 339–347.
53. Jørgensen, H., J.B. Kristensen, and C. Felby, *Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities.* Biofuels, Bioprod. Bioref. , 2007. **1**: p. 119–134, DOI: 10.1002/bbb.
54. Mosier, N. and C. Wyman, Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, 2005. **96**: p. 673–686.
55. Lora, J.H. and W.G. Glasser, *Recent Industrial Applications of Lignin: A Sustainable Alternative to Nonrenewable Materials.* Journal of Polymers and the Environment, 2001. **10**: p. 39-48.
56. Mani, S. and L.G. Tabila, Grinding performance and physical properties of wheat and barley straws,corn stover and switchgrass. Biomass and Bioenergy, 2004. **27**: p. 339 – 352.
57. Hendriks, A.T.W.M. and G. Zeeman, *Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass.* Bioresource Technology, 2009. **100** p. 10–18.
58. Teymouri, F. and F. Laureano-Perez, Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. Bioresource Technology, 2005. **96**: p. 2014–2018.

59. Murnen, H.K. and V. Balan, Optimization of Ammonia Fiber Expansion (AFEX) Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Miscanthus x giganteus to Fermentable Sugars. Biotechnol. Prog., 2007. **23**: p. 846-850.
60. Fengel, D. and G. Wegener, *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions.* . 1984, Berlin: De Gruyter.
61. Sun, R. and J.M. Lawther, Fractional isolation and physico-chemical characterization of alkali-soluble lignins from wheat straw. Holzforschung, 1997. **51**: p. 244–250.
62. Sun, R. and J. Tomkinson, Fractional isolation and physico-chemical characterization of alkali-soluble lignins from fast-growing poplar wood. Polymer, 2000. **41**: p. 8409–8417.
63. Yoon, H.H., Z.W. Wu, and Y.Y. Lee, *Ammonia-recycled percolation process for pretreatment of biomass feedstock.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 1995. **51/52**: p. 5–19.
64. Iyer, P.V., et al., *Ammonia recycled percolation process for pretreatment of herbaceous biomass.* Applied Biochemistry and Biotechnology 1996. **57/58**: p. 121–132.
65. Hon, D.N.S. and N. Shiraishi, *Wood and Cellulosic Chemistry,*. 2001, New York: Dekker,.
66. Zhao, K. and K. Cheng, *Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis.* Appl Microbiol Biotechnol, 2009. **82**: p. 815–827.
67. Chum, H.L., S.K. Black, and D.K. Johnson, Organosolv pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplars:isolation and quantitative structural studies of lignins. Clean Products and Processes 1999. **1**: p. 187–198.
68. Hofrichter, M., *Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP).* Enzyme and Microbial Technology, 2002. **30**: p. 454–466.
69. Crawford, D.L. and R.L. Crawford, *Microbial degradation of lignin.* Enzyme Microb. Technol., 1980. **2**: p. 11-22.
70. Tuor, U. and K. Winterhalter, Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. Journal of Biotechnology, 1995. **41**: p. 1-17.
71. Carvalheiro, F. and T. Silva-Fernandes, *Wheat Straw Autohydrolysis: Process Optimization and Products Characterization.* Appl Biochem Biotechnol, 2009. **153**: p. 84–93.

72. Perez, J.A. and A. Gonzalez, Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor. J Chem Technol Biotechnol, 2007. **82**: p. 929–938.

73. Petersen, M.Ø. and J. Larsen, Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. Biomass and Bioenergy, 2009. **33**: p. 834-840.

74. Bonn, H.G. and G.F. Stirmeyer, Hydrothermal and organosolv pretreatments of poplar wood and wheat straw for saccharification by a Trichoderma viride cellulase. Wood Sci. Technol., 1987. **21**: p. 179-185.

75. Florbela Carvalheiro, F. and T. Silva-Fernandes, *Wheat Straw Autohydrolysis: Process Optimization and Products Characterization.* Appl Biochem Biotechnol, 2009. **153**: p. 84–93.

76. Rosgaard, L. and S. Pedersen, Comparison of Different Pretreatment Strategies for Enzymatic Hydrolysis of Wheat and Barley Straw. Appl Biochem Biotechnol 2007. **143**(284-296).

77. Ahring, B.K. and K. Jensen, Pretreatment of wheat straw and conversion of xylose and xylan to ethanol by thermophilic anaerobic bacteria. Bioresource Technology 1996. **58**: p. 107-113.

78. Hongzhang, C. and L. Liying, Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction. Bioresource Technology, 2007. **98**: p. 666–676.

79. Jimenez, L. and M.J. de la Torre, *Organosolv pulping of wheat straw by use of acetone-water mixtures.* Process Biochemistry Vol. 33, No. 4, pp. , , 1998. **33**(4): p. 4111-4118.

80. Xu, F. and F. Liu, *Characterisation of degraded organosolv hemicelluloses from wheat straw.* Polymer Degradation and Stability, 2006. **91**: p. 1880-1886.

81. Xu, F. and J.-X. Sun, *Comparative study of organosolv lignins from wheat straw.* Industrial Crops and Products 23, 2006. **23**: p. 180–193.

82. Pedersen, M. and A. Viksø-Nielsen, Monosaccharide yields and lignin removal from wheat straw in response to catalyst type and pH during mild thermal pretreatment. Process Biochemistry, 2010. **45**: p. 1181–1186.

83. Chang, V.S., M. Nagwani, and M.T. Holtzapple, *Lime Pretreatment of Crop Residues Bagasse and Wheat Straw.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 1998. **74**: p. 135-158.

84. Kootstraa, A.M.J. and H.H. Beeftink, Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. Process Biochemistry 2005. **40**: p. 3693–3700.

85. Kabel, M.A. and G. Bos, Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. Bioresource Technology, 2007. **98**: p. 2034–2042.

86. de Vrije, T. and G.G. de Haas, *Pretreatment of Miscanthus for hydrogen production by Thermotoga elfi.* International Journal of Hydrogen Energy 2002. **27**: p. 1381 – 1390.

87. Vintila, T. and M. Dragomirescu, Saccharification of lignocellulose - with reference to Miscanthus - using different cellulases. Romanian Biotechnological Letters, 2010. **15**(4).

88. Serrano, L. and I. Egües, *Miscanthus sinensis fractionation by different reagents.* Chemical Engineering Journal, 2010. **156**: p. 49–55.

89. Sørensen, A. and P.J. Teller, Hydrolysis of Miscanthus for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pre-treatment and enzymatic treatment. Bioresource Technology, 2008. **99**: p. 6602–6607.

90. El Hage, R. and N. Brosse, *Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from miscanthus.* Polymer Degradation and Stability, 2009. **94**: p. 1632–1638.

91. El Hage, R. and N. Brosse, Effects of process severity on the chemical structure of Miscanthus ethanol organosolv lignin. Polymer Degradation and Stability, 2010. **95**: p. 997-1003.

92. El Hage, R. and L. Chrusciel, Effect of autohydrolysis of Miscanthus x giganteus on lignin structure and organosolv delignification. Bioresource Technology, 2010. **101**: p. 9321–9329.

93. Heitz, M. and E. Capek-Menard, Fractionation of Populus tremuloides at the Pilot Plant Scale: Optimization of Steam Pretreatment Conditions using the STAKE II Technology. Bioresource Technology, 1991. **35**: p. 23-32.

94. Negro, M.J. and P. Manzanares, *Hydrothermal Pretreatment Conditions to Enhance Ethanol Production from Poplar Biomass.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 2003. **105–108**: p. 87-100.

95. Kim, Y. and N. Mosier, *Enzymatic Digestion of Liquid Hot Water Pretreated Hybrid Poplar*. Biotechnol. Prog., 2009. **25**(2): p. 340-348.

96. Wyman, C.E. and B.E. Dale, Comparative Sugar Recovery and Fermentation Data Following Pretreatment of Poplar Wood by Leading Technologies. Biotechnol. Prog., 2009. **25**(2).

97. Ucar, G., Pretreatment of poplar by acid and alkali for enzymatic hydrolysis. Wood Sci. Technol., 1990. **24**: p. 171-180.

98. Chum, H.L. and D.K. Johnson, Organosolv Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis of Poplars: I. Enzyme Hydrolysis of Cellulosic Residues. Biotechnology and Bioengineering, 1988. **31**: p. 643-649.

99. Pan, X. and D. Xie, Effect of Organosolv Ethanol Pretreatment Variables on Physical Characteristics of Hybrid Poplar Substrates. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2007. **136-140**: p. 367-377.

100. Pedersen, M. and K.S. Johansen, Low temperature lignocellulose pretreatment: effects and interactions of pretreatment pH are critical for maximizing enzymatic monosaccharide yields from wheat straw. Biotechnology for Biofuels, 2011. **4**(11): p. 1-10.

101. Pedersen, M. and A.S. Meyer, *Lignocellulose pretreatment severity – relating pH to biomatrix opening.* New Biotechnology, 2010. **27**(6): p. 740-748.

102. Lynd, L.R. and P.J. Weimer, *Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology.* Microbiology and Molecular Reviews, 2002. **66**(3): p. 506–577.

103. Henrissat, B., T.T. T. T. Teeri, and R.A.J. Warren, A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants.. FEBS Lett., 1998. **425**: p. 352–354.

104. Teeri, T.T., Crystalline cellulose degradation: new insight into the*function of cellobiohydrolases.* Trends Biotechnol. , 1997. **15**: p. 160–167.

105. Mosier, N.S. and P. Hall, *Reaction Kinetics, Molecular Action, and Mechanisms of Cellulolytic Proteins.* Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology, 1999. **65**: p. 24-38.

106. Zilliox, C. and P. Deheire, Hydrolysis of wheat straw by a thermostable endoxylanase: Adsorption and kinetic studies. Enzyme and Microbial Technology, 1998. **22**: p. 58-63.

107. Lequart, C. and J.-M. Nuzillard, Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. Carbohydrate Research, 1999. **319**: p. 102–111.

108. Gokhale, D.V. and S.G. Patil, Potential application of yeast cellulase-free xylanase in agrowaste material treatment to remove hemicellulose fractions. Bioresource Technology, 1998. **63**: p. 187-191.

109. Yang, R. and S. Xua, Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylooligosaccharides. LWT, 2005. **38**: p. 677–682.

110. Liavoga, A.B. and Y. Bian., Release of D-Xylose from Wheat Straw by Acid and Xylanase Hydrolysis and Purification of Xylitol. J. Agric. Food Chem., 2007. **55**: p. 7758–7766.

111. Rémond, C. and N. Aubry, Combination of ammonia and xylanase pretreatments: Impact on enzymatic xylan and cellulose recovery from wheat straw. Bioresource Technology 101, 2010. **101**: p. 6712–6717.

112. Hodge, D.B. and M.N. Karim, *Model-Based Fed-Batch for High-Solids Enzymatic Cellulose Hydrolysis.* Appl Biochem Biotechnol, 2009. **152**: p. 88–107.

113. Wingren, A., M. Galbe, and G. Zacchi, Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. T. Biotechnol Prog, 2003. **19**: p. 1109-1117.

114. Katzen, R., P. Madson, and G. Moon, *Alcohol destillation – the fundamentals.* The Alcohol Textbook 1999: Nottingham: Nottingham University Press.

115. Zacchi, G. and A. Axelsson, Economic-Evaluation of Preconcentration in Production of Ethanol from Dilute Sugar Solutions. Biotechnol Bioeng, 1989. **34**: p. 223-233.

116. Bayrock, D.P. and W.M. Ingledew, *Application of multistage continuous* fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity *fermentation technology.* J Ind Microbiol Biotechnol, 2001. **27**: p. 87–93.

117. Mohagheghi, A. and M. Tucker, High Solids Simultaneous Saccharification and Fermentation of Pretreated Wheat Straw to Ethanol. Appl Biochem Biotechnol, 1992. **33**: p. 67-81.

118. Fan, Z. and C. South, Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor. Bioprocess Biosyst Eng, 2003. **26**: p. 93-101.

119. Vlasenko, E. and H. Ding, *Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw.* Bioresource Technology, 1997. **59**: p. 109-119.

120. Cara, C. and M. Moya, Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. Process Biochemistry, 2007. **42**: p. 1003–1009.

121. Hodge, D.B. and M.N. Karim, Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Bioresource Technology 2008. **99**: p. 8940–8948.

122. Georgieva, T.I. and X. Hou, Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Fermentation of High Dry Matter Wet-Exploded Wheat Straw at Low Enzyme Loading. Appl Biochem Biotechnol, 2008. **148**: p. 35–44.

123. Roche, C.M. and C.J. Dibble, Laboratory-scale method for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass at high-solids loadings. Biotechnology for Biofuels, 2009. **2**(28): p. 1-11.

124. Felby, K., J. Larson, and H. Jorgensen, Enzymatic hydrolysis of biomass having a high dry matter (dm) content. 2009.

125. Kristensen, J.B. and C. Felby, *Determining Yields in High Solids Enzymatic Hydrolysis of Biomass.* Appl Biochem Biotechnol, 2009. **156**: p. 557–562.

126. Larsen, J. and M.Ø. Petersen, *The IBUS Process – Lignocellulosic Bioethanol Close to a Commercial Reality.* Chem. Eng. Technol., 2008. **31**(5): p. 765–772.

127. Qin, W., High consistency enzymatic hydrolysis of lignocellulose, in Departemnt of Forestry. 2010, Univerity of British Columbia: Vancouver.

128. Tengborg, C., M. Galbe, and G. Zacchi, Influence of Enzyme Loading and Physical Parameters on the Enzymatic Hydrolysis of Steam-Pretreated Softwood. Biotechnol. Prog., 2001. **17**: p. 110-117.

129. Rosgaard, L. and P. Andric, Effects of Substrate Loading on Enzymatic Hydrolysis and Viscosity of Pretreated Barley Straw. Appl Biochem Biotechnol, 2007. **143**: p. 27–40.

130. Walker, L.P. and D.B. Wilson, *Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: An Overview.* Bioresource Technology, 1991. **36**: p. 3- l 4.

131. Arantes, V. and J.N. Saddler, Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. Biotechnology for Biofuels, 2011. **4**(3): p. 1-16.

132. Sun, Y. and C. J., Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology 83, 2002. **83**: p. 1–11.

133. Bansal, P., et al., *Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates.* Biotechnol Adv, 2009. **27**: p. 833–848.

134. Alkasrawi, M., et al., The effect of Tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. Enzyme and Microbial Technology, 2003. **22**: p. 71–78.

135. Jørgensen, H., et al., *Liquefaction of Lignocellulose at High-Solids Concentrations.* Biotechnology and Bioengineering, 2007. **96**(5): p. 862-870.

136. Kristensen, J.B. and C. Felby, *Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose.* Biotechnology for Biofuels, 2009. **2**(11): p. 1-10.

137. Hodge, D.B. and M.N. Karim, High-Solids Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass, in 27th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. 2005: Denver.

138. Mussatto, S.I. and I.C. Roberto, Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. Bioresource Technology 2004. **93**: p. 1–10.

139. Palmqvist, E. and B. Hahn-Hägerdal, *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification.* Bioresource Technology, 2000. **74** p. 17-24.

140. Palmqvist, E. and B. Hahn-Hägerdal, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource Technology, 2000. **74**: p. 25-33.

141. Pienkos, P.T. and M. Zhang, Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. Cellulose 2009. **16**: p. 743–762.

142. Tran, A.V. and R.P. Chambers, Red oak derived inhibitors in the ethanol fermentation of xylose by Pichia stipitis CBS 5776. Biotechnol. Lett., 1985. **7**: p. 841-847.

143. Jönsson, L.J. and E. Palmqvist, Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus Trametes versicolor. Microbiol. Biotechnol. Appl., 1998. **49**: p. 691-697.

144. Clark, T. and K.L. Mackie, Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood Pinus radiata. J. Chem. Biotechnol. Lett., 1984. **34**: p. 101-110.

145. Klinke, H.B. and L. Olsson, Potential Inhibitors From Wet Oxidation of Wheat Straw and Their Effect on Ethanol Production of Saccharomyces cerevisiae: Wet Oxidation and Fermentation by Yeast. Biotechnol Bioeng, 2003. **81**(6): p. 738-747.

146. Fenske, J.J. and D.A. Griffin, *Comparison of aromatic monomers in lignocellulosic biomass prehydrolysates.* Ind Microbiol Biotechnol, 1998. **20**: p. 364–368.

147. Chen, S.-F. and R.A. Mowery, High-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of aliphatic acid, aromatic acid and neutral degradation products in biomass pretreatment hydrolysates. J Chromatogr Adv Biochem Engin/Biotechnol, 2006. **1104**: p. 54–61.

148. Banerjee, N. and R. Bhatnagar, *Inhibition of glycolysis by furfural in Saccharomyces cerevisiae.* Eur J Appl Microbiol Biotechnol, 1981. **11**: p. 226–228.

149. Heipieper, J.J. and F.J. Weber, *Mechanism of resistance of whole cells to toxic organic solvents.* TIBTECH 12, 1994: p. 409–415.

150. Zaldivar, J. and L.O. Ingram, Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic Escherichia coli LY01. Biotechnol Bioeng, 1999. **66**: p. 203-210.

151. Zaldivar, J. and L.O. Ingram, Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic Escherichia coli. . Biotechnol Bioeng, 1999. **65**: p. 24-33.

152. Zaldivar, J. and L.O. Ingram, Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic Escherichia coli. Biotechnol Bioeng 2000. **68**: p. 524–530.

153. Jing, X. and X. Zhang, Inhibition Performance of Lignocellulose Degradation Products on Industrial Cellulase Enzymes During Cellulose Hydrolysis. Appl Biochem Biotechnol, 2009. **159**: p. 696–707.

154. Cantarella, M. and L. Cantarella, Effect of Inhibitors Released during Steam-Explosion Treatment of Poplar Wood on Subsequent Enzymatic Hydrolysis and SSF. Biotechnol. Prog. , 2004. **20**: p. 200-206.

155. Mes-Hartree, M. and J.N. Saddler, The nature of inhibitory materials present in pretreated lignocellulosic substrates which inhibit the enzymatic hydrolysis of cellulose. Biotechnology Letters, 1983. **5**(8): p. 531-536.

156. Panagiotou, G. and L. Olsson, Effect of Compounds Released During Pretreatment of Wheat Straw on Microbial Growth and Enzymatic Hydrolysis Rates. Biotechnology and Bioengineering, 2007. **96**(2).

157. Tengborg, C., M. Galbe, and G. Zacchi, *Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood.* Enzyme and Microbial Technology, 2001. **28**: p. 835–844.

158. Wierckx, F. and F. Koopman, Isolation and characterization of Cupriavidus basilensis HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate Microbial Biotechnology, 2010. **3**(3): p. 336–343.

159. Zhang, J. and Z. Zhu, Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, Amorphotheca resinae ZN1, and the consequent ethanol fermentation. Biotechnology for Biofuels, 2010. **3**(26): p. 1-15.

160. Jurado, M. and A. Prieto, Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. Bioresource Technology 100, 2009. **100**: p. 6378–6384.

161. Lopez, M. and N. Nichols, *Isolation of microorganisms for biological detoxification.* Appl Microbiol Biotechnol, 2004. **64**: p. 125–131.

162. Converti, A. and J.M. Domınguez, *Wood hydrolysis and hydrolyzate detoxification for subsequent xylitol production.* Chem. Eng. Technol., 2000. **23**: p. 1013–1020.

163. Larsson, S. and A. Reimann, Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. Appl. Biochem. Biotechnol. , 1999. **77**: p. 91-103.

164. Parajo, J.C. and H. Domınguez, Improved xylitol production with Debaryomyces hansenii Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. Enzyme Microb. Technol. , 1997. **21**: p. 18–24.

165. Ranatunga, T.D. and J. Jervis, The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. Enz Microb Technol 2000. **27**: p. 240–247.

166. Persson, P. and S. Larsson, Supercritical fluid extraction of a lignocellulosic hydrolysate of spruce for detoxification and to facilitate analysis of inhibitors. Biotechnol Bioeng 2002. **79**: p. 694–700.

167. Thomanetz, E., D. Bardtke, and E. Köhler, Untersuchung zur Entfärbung von kommunalem Abwasser mittels biologisch sich regenerierender Aktivkohle. gwt Wasser Abwasser,, 11987. **8**: p. 432–441.

168. Carvalheiro, F. and L.C. Duarte, Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by Debaryomyces hansenii CCMI 941. Process Biochemistry 2005. **40**: p. 1215–1223.

169. de Mancilha, I.M. and M.N. Karim, Evaluation of Ion Exchange Resins for Removal of Inhibitory Compounds from Corn Stover Hydrolyzate for Xylitol Fermentation. Biotechnol. Prog., 2003. **19**: p. 1837-1841.

170. Nilvebrant, N.-O. and A. Reimann, *Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates with Ion-Exchange Resins.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 2001. **91-93**: p. 35-49.

171. van Zyl, C. and B.A. Prior, *Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by Pichia stipitis.* Enzyme Microb. Technol., 1991. **13**: p. 82-86.

172. Bollag, J.-M. and K.L. Shuttleworth, *Laccase-Mediated Detoxification of Phenolic Compounds.* Applied and Environmental Microbiology, 1988. **54**(12): p. 3086-3091.

173. Chandel, A.K. and R.K. Kapoor, DetoxiWcation of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by Candida shehatae NCIM 3501. Bioresource Technology, 2007. **98**.

174. Kleppmann, W., *Taschenbuch Versuchsplanung Produkte und Prozesse optimieren*, ed. J. Brunner. 2003, München Wien: Carl Hanser Verlag.

175. Jaouani, A. and F. Guillen, Role of Pycnoporus coccineus laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. Enzyme and Microbial Technology, 2005. **36**: p. 478–486.

176. Casa, R. and A. D'Annibale, Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (Triticum durum Desf.) germinability. Chemosphere, 2003. **20**: p. 959–966.

177. Tsioulpas, A. and D. Dimou, Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of Pleurotus spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. Bioresource Technology, 2002. **84**: p. 251–257.

178. Celem, B.E. and S. Önal, Immobilization of phytase on epoxy-activated Sepabead EC-EP for the hydrolysis of soymilk phytate. Journal of Molecular Catalysis B, 2009.

179. Kunamneni, A. and I. Ghazi, Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. Process Biochemistry, 2008. **43**: p. 169–178.

180. Quan, D. and Y. Kim, Characterization of an amperometric laccase electrode covalently immobilized on platinum surface. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2004. **561**: p. 181–189.

181. Shuttleworth, K.L. and J.-M. Bollag, Soluble and immobilized laccase as catalysts for the transformation of substituted phenols. Enzyme Microb. Technol., 1986. **8**: p. 171-177.

182. Lante, A. and A. Crapisi, *Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor.* Process Biochemistry, 2000. **36**: p. 51–58.

183. Hublik, G. and F. Schinner, Characterization and immobilization of the laccase from Pleurotus ostreatus and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. Enzyme and Microbial Technology, 2000. **27**: p. 330–336.

184. Leonowicz, A. and J.M. Sarkar, *Improvement in stability of an immobilized fungal laccase.* Appl Microbiol Biotechnol 1988. **29**: p. 129-135.

185. Reyes, P. and M.A. Pickard, Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase. Biotechnology Letters, 1999. **21**: p. 875–880.

186. Salis, A. and M. Pisanoa, Laccase from Pleurotus sajor-caju on functionalised SBA-15 mesoporous silica: Immobilisation and use for the oxidation of phenolic compounds. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009. **58**: p. 175–180.

187. Zhu, Y. and S. Kaskel, Immobilization of Trametes versicolor Laccase on Magnetically Separable Mesoporous Silica Spheres. Chem. Mater., 2007. **19**(26): p. 6408–6413.

188. Brandi, P. and A. D'Annibale, *In search for practical advantages from the immobilisation of an enzyme: the case of laccase.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006. **41** p. 61–69.

189. Tran, A.V. and R.P. Chambers, Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolysate by the yeast Pichia stipitis CBS 5776. Enzyme Microb. Technol., 1986. **8**: p. 439-444.

190. Canilha, L. and J.B. Almeida e Silva, Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption or ion-exchange resins for xylitol production. Process Biochemistry, 2004. **39**: p. 1909–1912.

191. Carvalho, W. and L. Canilha, Detoxification of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate with ion-exchange resins for xylitol production by calcium alginate-entrapped cells. J Chem Technol Biotechnol, 2004. **79**: p. 863–868.

192. Villarreal, M.L.M. and A.M.R. Prata, Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by Candida guilliermondii. Enzyme and Microbial Technology, 2006. **40**: p. 17–24.

193. Sørensen, H.R. and A.S. Meyer, Enzymatic Hydrolysis of Water-Soluble Wheat Arabinoxylan. 1. Synergy Between a-L-Arabinofuranosidases, Endo-1,4-ß-Xylanases, and ß-Xylosidase Activities. Biotechnology and Bioengineering, 2003. **81**(6): p. 726-731.

194. Produktdatenblatt, *Genencore International*.

195. Calsavara, L.P.V. and D.M.F. F., *Comparison of Catalytic Properties of Free and Immobilized Cellobiase Novozym 188.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 2001. **91-93**: p. 615-626.

196. Khan, M.A., Hydrolysis of hemiellulose by commercial enzyme mixtures, in Department of Chemical Engineering 2010, Lulea University of Technology: Lulea.
197. Produktdatenblatt, *AB Enzymes GmbH*.
198. Chum, H.L. and D.K. Johnson, Organosolv Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis of Poplars. 2.-Catalyst Effects and the Combined Severity Parameter. Applied Blochernistry and Biotechnology, 1990. **24/25**: p. 1-14.
199. Silverstein, R.A. and Y. Chen, A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. Bioresource Technology, 2007. **98**: p. 3000–3011.
200. Overend, R.P. and E. Chornet, *Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatment,*. Phil. Trans. R. Soc., 1987. **321**: p. 523-536.
201. Abatzogloua, N. and E. Chornet, Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation. Chemical Engineering Science, 1992. **47**(5): p. 1109-1122
202. Silverstein, R.A. and Y. Chen, comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. Bioresource Technology, 2007. **98**: p. 3000–3011.
203. Metzner, A.B. and R.E. Otto, *Agitation of Non-Newtonian Fluids.* AIChE J., 1957. **1**: p. 3-10.
204. Todtenhaupt, E.K. and G. Zeiler, *Handbuch der Rührtechnik.* . 2000: EKATO Rühr- und Mischtechnik GmbH, Schopfheim.
205. Pörtner, R., Zur Homogenisierung newtonscher, strukturviskoser und viskoelastischer Flüssigkeiten in Rührbehältern. 1989, Dissertation, Universität Dortmund.
206. Zlokarnik, M., *Rührtechnik Theorie und Praxis*. 1999: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
207. Heiser, M. and J. Ritter, *Koaxialrührwerk zum Rühren hochviskoser und nicht-Newtonscher Medien.* Chemie Ingenieur Technik, 2007. **79**(7): p. 1029-1034.
208. Chung, Y.-C. and A. Bakalinsky, *Analysis of Biomass Cellulose in Simultaneous Saccharification and Fermentation Processes.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 1997. **66**: p. 249–262.
209. Kadam, K.L. and E.C. Rydholm, Development and Validation of a Kinetic Model for Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. Biotechnol. Prog. , 2004. **20**: p. 698-705.

210. Zheng, Y. and Z. Pan, *Kinetic Modeling for Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Creeping Wild Ryegrass*. Biotechnology and Bioengineering, 2009. **102**(6): p. 1558-1569.

211. Giesecke, U., *Immobilisation on Amino carriers*. 2009, W42 Industrial Biotechnology GmbH.

212. Giesecke, U., *Immobilisation on Epoxy carriers*. 2009, W42 Industrial Biotechnology GmbH.

213. Chmiel, H., *Bioprozesstechnik* 2011: Spektrum Akademischer Verlag.

214. Cristóvão, R.O. and A.P.M. Tavares, *Modeling the discoloration of a mixture of reactive textile dyes by commercial laccase*. Bioresource Technology 2009. **100**: p. 1094–1099.

215. Cristovao, R.O. and P.M. Tavares, Kinetic modelling and simulation of laccase catalyzed degradation of reactive textile dyes. Bioresource Technology, 2008. **99**: p. 4768–4774.

216. Sulaymon, A. and K. Ahmed, Competitive Adsorption of Furfural and Phenolic Compounds onto Activated Carbon in Fixed Bed Column. Environ. Sci. Technol. , 2008. **42**: p. 392–397.

217. Li, A. and Q. Zhang, Adsorption of phenolic compounds from aqueous solutions by a water-compatible hypercrosslinked polymeric adsorbent. Chemosphere, 2002. **47**: p. 981–989.

218. Garcia-Delgado, R.A. and L.M. Cotoruelo-Minguez, *Equilibrium Study of Single-Solute Adsorption of Anionic Surfactants with Polymeric XAD Resins.* Separation Science and Technology, 1992. **27**(7): p. 975 — 987.

219. Lucas, S. and J. Cocero, Adsorption isotherms for ethylacetate and furfural on activated carbon from supercritical carbon dioxide. Fluid Phase Equilibria, 2004. **219**: p. 171–179.

220. Ruey-Shin, J. and S. Jia-Yun, Effect of Temperature on Equilibrium

Adsorption of Phenols onto Nonionic Polymeric Resins. Separation Science and Technology, 1999. **34**(9): p. 1819 — 1831.

221. Silke Klinnert, S. and W. Bechmann, Adsorption von Phenolderivaten an Substrate unterschiedlich anthropogen überprägter Böden. Umweltchem. Okotox., 1996. **8**(4): p. 184-186

222. Bell, J.P. and M. Tsezos, *Removal of Hazardous Organic Pollutants by Biomass Adsorption.* Water Pollution Control Federation, 1987. **59**(4): p. 191-198.

223. Jiang, Z.M. and A.M. Li, Adsorption of phenolic compounds from aqueous solutions by aminated hypercrosslinked polymers. J Environ Sci . , 2007. **19**(2): p. 135-140.

224. Ahmad, A.A. and B.H. Hameed, Fixed-bed adsorption of reactive azo dye onto granular activated carbon prepared from waste. Journal of Hazardous Materials, 2010(175): p. 298–303.

225. Aksu, Z. and F. Gönen, Biosorption of phenol by immobilized activated sludge in a continuous packed bed: prediction of breakthrough curves. Process Biochemistry, 2004. **39**: p. 599–613.

226. Singh, S. and V.C. Srivastava, *Fixed-bed study for adsorptive removal of furfural by activated carbon.* Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 2009. **332**: p. 50–56.

227. Srivastava, V.C. and B. Prasad, Prediction of Breakthrough Curves for Sorptive Removal of Phenol by Bagasse Fly Ash Packed Bed. Ind. Eng. Chem. Res. , 2008. **47**: p. 1603-1613.

228. Bohart, G.S. and E.Q. Adams, *Behavior of charcoal towards chlorine.* J. Chem. Soc., 1920. **42**: p. 523–529.

229. Thomas, H.C., *Heterogeneous ion exchange in a flowing system.* J. Am. Chem. Soc., 1944. **66**: p. 1466–1664.

230. Yoon, Y.H. and J.H. Nelson, Application of gas adsorption kinetics. Part 1. A theoretical model for respirator cartridge service time,. Am. Ind. Hyg. Assoc. J. , 1984. **45**: p. 509–516.

231. Clark, R.M., Evaluating the cost and performance of field-scale granular activated carbon systems. EnViron. Sci. Technol., 1987. **21**: p. 573-580.

232. Wolborska, A., Adsorption on activated carbon of p-nitrophenol from *aqueous solution.* Water Res. , 1989. **23**: p. 85-91.

233. Beckman, E., O. Liesche, and F. Lehmann, Qualitative und quantitative unterschiede der lignine einiger Holz- und Stroharten. . Biochem. Z., 1923. **139**: p. 491-508.

234. Crestini, C. and D.S. Argyropoulos, Structural Analysis of Wheat Straw Lignin by Quantitative 31P and 2D NMR Spectroscopy. The Occurrence of Ester Bonds and ß-O-4 Substructures. J. Agric. Food Chem., 1997. **45**: p. 1212-1219.

235. Scalbert, A. and B. Monties, *Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw.* Phytochemistry, 1985. **24**(6): p. 1359-1362.

236. Sun, R. and J.M. Lawther, *A tentative chemical structure of wheat straw lignin.* Industrial Crops and Products, 1997. **6**: p. 1-8.

237. Iiyama, K. and T.B.T. Lam, *Pheolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat straw*. Phytochemistry, 1990. **29**(3): p. 733-737.

238. Sun, R. and J.M. Lawther, *Influence of alkaline pre-treatments on the cell wall components wheat straw.* Industrial Crops and Products, 1995. **4**: p. 127-145.

239. Carrillo, F. and M.J. Lis, Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: Kinetic study. Process Biochemistry, 2005. **40**: p. 3360–3364.

240. Koullas, D.P. and P. Christakopoulos, *Correlating the Effect of Pretreatment on the Enzymatic Hydrolysis of Straw.* Biotechnology and Bioengineering, 1992. **39**: p. 113-116.

241. Villaverde, J.J. and J. Li, Native Lignin Structure of Miscanthus x giganteus and Its Changes during Acetic and Formic Acid Fractionation. J. Agric. Food Chem., 2009. **57**: p. 6262–6270.

242. Kishimoto, T. and S. Yoshihiro, Delignification Mechanism During High-Boiling Solvent Pulping. V. Reaction of Nonphenolic ß-O-4 Model Compounds in the Presence and Absence of Glucose. Journal of Wood Chemistry and Technology, 2003. **23**: p. 279–292.

243. Yoshida, M. and Y. Liu, Effects of Cellulose Crystallinity, Hemicellulose, and Lignin on the Enzymatic Hydrolysis of Miscanthus sinensis to Monosaccharides. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2008. **72**(3): p. 805–810,.

244. McDonough, *Chemistry of organosolv Delignification*, I.o.P.S.a. Technology, Editor. 1992: Atlanta, Georgia. p. 1-17.

245. Sun, R., X.F. Sun, and S.Q. Wang, Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. Industrial Crops and Products 15 (2002) 2002: p. 179–188.

246. Gleason, W.B. and R. Barker, *Oxidation of pentoses in alkaline solution.* Canadian Journal of Chemistry, 1971. **49**.

247. Ryu, K.G. and Y.G. Kim, *Effects of Surfactants on the Enzymatic Bleaching by Xylanase.* Biotechnol. Bioprocess Eng. , 1997. **2**: p. 94-96.

248. Bachmann, S. and A. McCarthy, Purification and Cooperative Activity of Enzymes Constituting theXylan-Degrading System of Thermomonospora fusca. Applied and Environmental Microbiology, 1991. **Aug.** : p. 2121-2130.

249. Bhattacharyya, S. and S. Khowala, Purification and Characterization of an Extracellular ß-Xylosidaseof Termitomyces clypeatus. Biotechnol. Prog., 1997. **13**: p. 822-827.

250. Rajaram, S. and A. Varma, Production and characterization of xylanase from Bacillus thermoalkalophilus grown on agricultural wastes. Appl Microbiol Biotechnol, 1990. **34**: p. 141-144.

251. Ball, A.S. and A.J. McCarthy, *Production and properties of xylanases from actinomycetes.* Journal of' Applied Bacteriology, 1989. **66**: p. 439-444.

252. Xiao, Z., X. Zhang, and D.J. Gregg, Effects of Sugar Inhibition on Cellulases and β-Glucosidase During Enzymatic Hydrolysis of Softwood Substrates. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2004. **113-166**: p. 1115-1126.

253. Wan, J.Q. and Y. Wang, Effects of hemicellulose removal on cellulose fiber structure and recycling characteristics of eucalyptus pulp. Bioresource Technology 2010. **101**: p. 4577–4583.

254. Lu, Y. and Y. Wang, Influence of High Solid Concentration on Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Steam-Exploded Corn Stover Biomass. Appl Biochem Biotechnol, 2010. **160**: p. 360–369.

255. Hochstein, B., Rheologie von Kugel- und Fasersuspensionen mit viskoelastischen MatrixflŸssigkeiten, in Fakultät für Chemieingenieurwesen. 1997, Universität Fridericiana Karlsruhe (Technische Hochschule): Karlsruhe.

256. Kraume, M., *Mischen und Rühren: Grundlagen und moderne Verfahren.* . 2003: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim.

257. Ducla, J.M. and J.L. Desplanches, *Chem. Eng. Commun.* 21, 1983: p. 29-36.

258. Judat, H., Mischvorgange, in Interne Arbeitssitzung des GVC-Fachausschusses ,,Mischvorgange". 1983: Bad Driburg.

259. Hodge, D.B. and M.N. Karim, Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Bioresource Technology, 2008. **99**: p. 8940–8948.

260. Sassner, P. and M. Galbe, Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. Biomass and Bioenergy, 2008. **32**: p. 422-430.

261. A. Tejado, A. and C. Pena, Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol–formaldehyde resin synthesis. Bioresource Technology, 2007. **98**: p. 1655–1663.

262. Lora, J.H. and W.G. Glasser, *Recent Industrial Applications of Lignin: A Sustainable Alternative to Nonrenewable Materials.* Journal of Polymers and the Environment, 2002. **10**: p. 39-48.

263. Xu, F. and J.J. Kulys, *Redox Chemistry in Laccase-Catalyzed Oxidation of N-Hydroxy Compounds.* Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(5): p. 2052–2056.

264. Call, H.P. and I. Mücke, History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). Journal of Biotechnology, 1997. **53**: p. 163–202.

265. Young, M. and C. Steelink, Peroxidase catalyzed oxidation of naturally-occuring phenols and hardwood lignins. Phytochemistry, 1973. **12**: p. 2851 - 2861.

266. Kaplan, D., Reactivity of different oxidases with lignins and lignin model compounds. Phytochemistry, 1979. **18**: p. 1917-1919.

267. Areskogh, D. and J. Li, Oxidative polymerisation of models for phenolic lignin end-groups by laccase. Holzforschung, 2010. **64**: p. 21–34.

268. Bollag, J.-M. and S.-Y. Liu, *Enzymatic oligomirization of vanillic acid.* Soil Biol. Biochem., 1982. **14**: p. 157-163.

269. Rittstieg, K. and A. Suurnakki, Investigations on the laccase-catalyzed polymerization of lignin model compounds using size-exclusion HPLC. Enzyme and Microbial Technology, 2002. **31**: p. 403–410.

270. Rittstieg, K. and A. Suurnäkki, Polymerization of Guaiacol and a Phenolic â-O-4-Substructure by Trametes hirsuta Laccase in the Presence of ABTS. Biotechnol. Prog., 2003. **19**: p. 1505-1509.

271. Katchalski-Katzir, E. and D.M. Kraemer, *Eupergitw C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000. **10**: p. 157–176.

272. Wiemann, L.O. and R. Nieguth, Composite Particles of Novozyme 435 and Silicone: Advancing Technical Applicability of Macroporous Enzyme Carriers. ChemCatChem, 2009. **1**: p. 455 – 462.

273. Hoffmann, G., *Kristallisation in der industriellen Praxis*. 2004, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

274. Kurniawati, S. and J.A. Nicell, *Kinetic Model of Laccase-Catalyzed Oxidation of Aqueous Phenol.* Biotechnology and Bioengineering, 2005. **91**(1).

275. Rodakiewicz-Nowak, J., et al., *Effect of Ethanol on Enzymatic Activity of Fungal Laccases.* Bioscience Reports, 1999. **19**(6): p. 589-600.

276. Klinke, H.B. and A.B. Thomsen, Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. Appl Microbiol Biotechnol, 2004. **66**: p. 10–26.

277. Diaz, M.J. and E. Ruiz Inhibition of Pichia stipitis fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings. World J Microbiol Biotechnol, 2009. **25**: p. 891–899.

278. Larsson, S. and E. Palmqvist, *The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood.* Enzyme and Microbial Technology, 1999. **24**: p. 151–159.

279. Chern, J.-M. and Y.-W. Chien, Adsorption Isotherms of Benzoic Acid onto Activated Carbon and Breakthrough Curves in Fixed-Bed Columns. Ind. Eng. Chem. Res. , 2001. **40**: p. 3775-3780.

280. Juang, R.-S. and J.-Y. Shiaua, *Effect of Temperature on Equilibrium Adsorption of Phenols onto Nonionic Polymeric Resins.* Separation Science and Technology, 1999. **34**(9): p. 1819-1831.

281. Zhen-mao, J. and L. Ai-min, Adsorption of phenolic compounds from aqueous solutions by aminated hypercrosslinked polymers. Journal of Environmental Sciences, 2007: p. 135-140.

282. Crisp, D.J., The Adsorption of Alcohols and Phenols from Non polar Solvents on to Alumina. Colloid Interface Sci., 1956. **11**(353).

283. Kern, H.E., Adsorption from Solution of Chain Molecules onto Graphite: Evidence for Lateral Interactions in Ordered Monolayers. Colloid and Polymer Sci., 1978. **65**(118).

284. Richter, E. and K. Knoblauch, *Modellierung isothermer Festbettadsorber.* Chem.-Ing.-Tech., 1978. **50**(8): p. 600-611.

285. Zhuang, J. and Y. Liu, Hydrolysis of wheat straw hemicellulise and detoxifikaiotn of hydrolysate for xylitol production. BioResources, 2009. **4**(2): p. 674-686.

286. Grootjen, D.R.J. and v.d.L.R.G.J. M., Effects of the aeration rate on the fermentation of glucose and xylose by Pichia stipitis CBS 5773. Enzyme Microb Technol, 1990. **12**: p. 20–30.

287. Delgenes, J.P., R. Moletta, and J.M. Navarro, The effect of aeration on D-xylose fermentation by Pachysolen tannophilus, Pichia stipitis, Kluyveromyces marxianus and Candida shehatae. Biotechnol Lett, 1986. **8**(12): p. 897–900.

288. Furlan, S.A. and P. Bouilloud, Influence of Oxygen on Ethanol and Xylitol Production by Xylose Fermenting Yeasts. Process Biochemistry, 1994. **29**: p. 657-662.

289. Amartey, S.A. and T.W. Jeffries, Comparison of corn steep liquor with other nutrients in the fermentation of D-xylose by Pichia stipitisCBS6054. Biotechnol Lett 1994. **16**(4): p. 211-214.

290. Eken-Saracoglu, N. and Y. Arslan, Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulose hydrolysate with Pichia stipitis and Candida shehatae. Biotechnol Lett, 2000. **22**: p. 855–858.

291. Agbogbo, F.K. and K.S. Wenger, *Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolyzate using P. stipitis.* Ind Microbiol Biotechnol, 2007. **34**(11): p. 723–727.

292. Fenske, J.J. and A. Hashimoto, . Relative fermentability of lignocellulosic dilute-acid prehydrolyzates application of a Pichia-based toxicity assay. Appl Biochem Biotechnol Bioeng, 1993. **73**: p. 145–157.

293. Nigam, J.N., Development of xylose-fermenting yeast Pichia stipitis for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. J Appl Microbiol. Biotechnol. Appl., 2001. **90**: p. 208–215.

294. Sluiter, A., et al., Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. 2008, National Renewable Energy Laboratory.

295. Sluiter, A., et al., *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*. 2008, National Renewable Energy Laboratory.

296. Sluiter, A., et al., Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. 2008, National Renewable Energy Laboratory.

297. Cicco, N., M.T. Lanorte, and M. Paraggio, A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. Microchemical Journal, 2009. **91** p. 107–110.

298. Bailey, M.J., P. Biely, and K. Poutanen, *Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity.* Journal of Biotechnology, 1992. **23** p. 257-270.

299. Xiao, Z., R. Storms, and A. Tsang, *Microplate-Based Filter Paper Assay to Measure Total Cellulase Activity.* Biotechnology and Bioengineering, 2004. **88**(7): p. 834-837.

300. Megazyme. *Assay of endo-Arabinase using Red Debranched Arabinan*. 1999; Available from: http://www.megazyme.com/downloads/en/data/S-RDAR.pdf.

301. Poutanen, K., *An a-L-arabinofuranosidase of Trichoderma reesei.* Journal of Biotechnology, 1988. **7**: p. 271-282.

302. Li, A., Y. Zhu, and L. Xu, *Comparative study on the determination of assay for laccase of Trametes sp.* African Journal of Biochemistry Research, 2008. **2**(8): p. 181-183.

303. Alcalde, M. and T. Bulter, Colorimetric Assays for Screening Laccases in Methods in Molecular Biology: Directed Enzyme Evolution: Screening and Selection Methods, F.H. Arnold and G. Georgiou, Editors. 2003, Humana Press Inc., Totowa, NJ.

304. Terrón, M.C., M. López-Fernández, and J.M. Carbajo, Tannic acid interferes with the commonly used laccase-detection assay based on ABTS as the substrate. Biochimie 2004. **86**: p. 519–522.

305. Niku-Paavola, M.-J., E. Karhunen, and P. Salola, *Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus Phlebia radiata.* Biochem. J. , 1988. **254**: p. 877-884.

306. Haitz, F., Prozessentwicklung zur Produktion von C5 und C6-Zuckern als biobasierte Plattformchemikalien aus Lignocellulose, in Fakultät Maschinenbau und Verfahrenstechnik. 2010, Hochschule Offenburg: Offenburg.

7 Anhang

7.1 Chemikalien

Tabelle 36: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller, Ort
ABTS ≥98% (TLC)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acetosyringon (97%)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Calciumcarbonat (technisch, 95%)	Merck, Darmstadt
D(+)-Glukose (zur Analyse)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
D(+)-Xylose (≥99%)	Merck, Darmstadt
Di-Ammoniumhydrogenphosphat $(NH_4)_2HPO_4$ (zur Analyse)	Merck, Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4 (zur Analyse)	Merck, Darmstadt
3,5-Dinitrosalicylsäure	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Eisen-(III)-chlorid $FeCl_3$ (wasserfrei)	Fluka Chemie AG, Buchs SG, Schweiz
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (96%)	Roth, Karlsruhe
Folin-Ciocalteus Phenolreagens	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Glutardialdehyd (25 %)	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt (für die Mikrobiologie)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 (≥99%)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid (>85%)	Merck, Darmstadt
Kobalt-(II)-chlorid-Hexahydrat $CoCl_2$ x 6 H_2O (zur Analyse)	Merck, Darmstadt
Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat $CuSO_4$ x 5 H_2O (zur Analyse)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat Heptahydrat $MgSO_4$ x 7 H_2O	Merck, Darmstadt
Malzextrakt (für die Mikrobiologie)	Merck, Darmstadt
Mangan-(II)-sulfat-Monohydrat $MnSO_4$ x H_2O (zur Analyse)	Merck, Darmstadt

Chemikalien	Hersteller, Ort
Natriumcarbonat (wasserfrei)	Merck, Darmstadt
Natrium-Acetat (≥ 99%, wasserfrei)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (≥ 98%)	Merck, Darmstadt
Natrium-Kalium-Tartrat	Merck, Darmstadt
Natriummolybdat-Dihydrat Na_2MoO_4 x 2 H_2O (zur Analyse)	Merck, Darmstadt
Natriumsulfit (≥ 99%)	Fluka Chemie AG, Buchs SG, Schweiz
Pepton aus Casein (granuliert, für die Mikrobiologie)	Merck, Darmstadt
4-Nitrophenol (≥ 99%)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
p-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside (pNG)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Salzsäure	
Schwefelsäure (72%)	Merck, Darmstadt
Sepabeads® EC-EA	Resindion, Binasco (MI), Italien
Sepabeads® EC-EP	Resindion, Binasco (MI), Italien
Vanillin (≥ 99%, HPLC)	Fluka Chemie AG, Buchs SG, Schweiz
Xylitol (≥ 99%)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Zinksulfat-Heptahydrat $ZnSO_4$ x 7 H_2O (zur Analyse)	Merck, Darmstadt
Zitronensäure-Monohydrat (zur Analyse)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim

7.2 Analytische Methoden

Im Folgenden sollen die verwendeten analytischen Methoden beschrieben werden.

7.2.1 Feststoffbestimmung

Der Bestimmung des Feststoffgehalts der Faserfraktionen erfolgte nach NREL/TP-510-42621 [294] mit dem Feuchtebestimmer MA 35 der Fa. Sartorius bei 105 °C.

7.2.2 Analyse der Zusammensetzung von Lignocellulosesubstraten

Die Bestimmung der Zusammensetzung von lignocellulosehaltigen Rohstoffen erfolgte nach NREL/TP-510-42618 [295]. Als Messparameter wurden der Anteil an säurelöslichem Lignin, säureunlöslichem Lignin, der Aschegehalt und die Zusammensetzung der Kohlenhydrate in

der Faser analysiert. Die Bestimmung der Faserzusammensetzung wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

7.2.3 Analyse der Zusammensetzung von Aufschlusslösungen

Die Bestimmung der Zusammensetzung von Aufschlusslösungen erfolgte nach NREL/TP-510-42623 [296]. Als Messparameter wurden der Anteil an Monosacchariden, organischen Säuren (Essigsäure, Ameisensäure, Lävulinsäure), Hydroxymethylfurfural, Furfural sowie Ethanol analysiert. Darüber hinaus wurde der Anteil der Gesamtzucker mittels einer sauren Hydrolyse ermittelt. Die Bestimmung der Zusammensetzung von Aufschlusslösungen wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

7.2.4 Bestimmung von Monosacchariden, Lignocelluloseabbauprodukten, Alkoholen und organischen Säuren mittels HPLC-RI

Zur Bestimmung der Monosacchariden, Abbauprodukten, Alkoholen und organische Säuren wurde ein isokratische HPLC-RI Analytik durchgeführt. Als Säulenmaterial wurden je nach Analyte eine Aminex HPX-87 H (Glukose, Alkohole, Abbauprodukte und organische Säuren) oder eine Phenomenex RPM-Monosaccharide Pb^{+2} (Glukose, Xylose, Arabinaose, Mannose und Galaktose) mit entsprechenden eingesetzt. Als Fließmittel wurden 5 mM H_2S0_4 bzw. Reinstwasser bei einer Flussrate 0,6 mL/min eingesetzt. Die Säulentemperatur betrug 60 °C (Aminex HPX-87 H) bzw. 85 °C (RPM Pb+2) und die Detektortemperatur (RI 8120 Fa. Bischoff, Leonberg) lag bei Raumtemperatur. Die Proben wurden vor der Analyse mittels Spritzenvorsatzfilter (Celluloseacetat 0,2 µm) filtriert. Das Injektorvolumen betrug 20 µL. Die Konzentration der Analyte wurde auf Basis von Kalibriergeraden der Mischungen von Reinstsubstanzen ermittelt.

7.2.5 Bestimmung der phenolischen Komponenten

Die Konzentration der phenolischen Substanzen als Summenparameter wurden mit dem Folin-Ciocalteu Reagenz nach modifizierten Methode von Cicco et al. bestimmt [297]. Die Konzentrationsbestimmung wurde auf Basis von Vanillin durchgeführt, so dass die Konzentrationsangaben Vanillinäquivalente entsprechen. Die Bestimmung der phenolischen Komponenten wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Zur Bestimmung der phenolischen Substanzen wurden 25 µL der zu untersuchenden Probe in einer geeigneten Verdünnung bzw. 25 µL des Vanillinstandards mit 25 µL Folin Ciocalteus Reagenz in eine 96-well PCR-Platte pipettiert, 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und

anschließend 200 µL 5 % (w/v) Na_2CO_3 dazu gegeben. Die Platte wurde für 20 min bei 40 °C in einem Thermocycler inkubiert. Nach der Inkubation wurden 200 µL der Lösung in eine 96-well Platte pipettiert und die Extinktion bei 740 nm mit einem Well-Reader (Synergy 2, Fa. Biotek) gemessen. Mit Vanillin als Referenzsubstanz wurde eine Kalibriergerade in einem Konzentrationsbereich von 0,1 - 1 mM erstellt. Anhand der Kalibriergerade konnte über die Extinktion der Proben die Konzentration an phenolischen Substanzen in der Lösung berechnet werden.

7.2.6 Messung der Hydrolaseaktivitäten

Zur definierten Einstellung des Enzym/Substrat-Verhältnisses wurden die volumenspezifischen Aktivitäten der Enzympräparate vor jeder Versuchreihe mit spezifischen Enzymassays ermittelt. Auftretende Aktivitätsreduzierung während der Lagerung konnte somit ausgeglichen werden. Die spezifischen Enzymassays dienten darüber hinaus auch zur qualitativen Charakterisierung verschiedener kommerzieller Enzympräparate. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

7.2.6.1 Messung der Xylanaseaktivität

Zur Bestimmung der Xylanaseaktivität wurde mit eine für den 96-well Maßstab modifizierten Assay nach Bailey et al. mit Birkenxylan als Substrat durchgeführt [298]. Hierbei wurden 8 µL des Enzympräparats in geeigneter Verdünnung bzw. 8 µL Xylosestandard (Konzentrationsbereich von 0,625 g/L bis 10 g/L) mit 72 µL einer 1% (w/v) Xylanlösung (in 50 mM Citrat-Puffer pH 5) versetzt und für 5 min bei 50 °C im Thermocycler inkubiert. Danach wurden 120 µL DNS-Reagenz zugegeben und das Reaktionsgemisch für 5 min auf 99 °C erhitzt. Die Extinktion von 150 µL der Reaktionslösung wurde bei 540 nm gemessen. Eine Xylanase - Unit XU entsprach dabei der Menge an Enzym, die 1 µmol reduzierende Äquivalente pro Minute bei gegeben Reaktionsbedingungen freisetzt.

7.2.6.2 Messung der Filterpaperaktivität FPU (Cellulaseaktivität)

Die Cellulaseaktivität wurde mit Hilfe des Filterpaperunit (FPU)-Assay nach Xiao et al. bestimmt [299]. Als Substrat wurden ausgestanzte kreisförmige Cellulosefilter der Fa. Schell mit einer Fläche von etwa 38,5 mm^2 und einer Masse von 3,5 mg eingesetzt.

7.2.6.3 Messung der Arabinasektivität mit Red-Debranched Arabinan (RDA)

Die Messung der Arabinaseaktivität (endo-Arabinase) erfolgte mit Red-Debranched Arabinan als Susbtrat nach Assay der Fa. Megazyme [300].

7.2.6.4 Messung der ß-Glukosidase, ß-Xylosidase und α-Arabinofuranosidaseaktivität

Zur Bestimmung der ß-Glukosidase, ß-Xylosidase und α-Arabinofuranosidaseaktivität wurden para-Nitrophenol markierte Substrate (p-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, p-Nitrophenyl-β-D-xylanopyranoside, p-Nitrophenyl-α-L-arabinofuranoside) eingesetzt. Hierbei fungieren die markierten Zucker als Zucker-Dimer-Analoga als Substrate, um die entsprechende Glycosylhydrolyseaktivität durch Freisetzung von para-Nitrophenol (pNP) zu quantifizieren (Pro Mol freigesetztem pNP wird 1 mol Zuckermonomer freigesetzt). Die Durchführung der Enzymassays erfolgte nach einer modifizerten Methode von Poutanen er al. [301].

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden 70 µL 50 mM Natrium Citrat (pH 5,0) mit 10 µL Enzymlösung bzw. pNP Standard (0,5 mM - 5mM) versetzt. Die Lösung wurden anschließend 20 µL Substratlösung (2 mg/mL) zugegeben und bei 50 °C für 10 min inkubiert. Die reaktion wurde durch Zugabe von 100 µL 1 M Na_2CO_3 gestoppt. Die Extinktion von 150 µL Reaktionslösung wurde bei 400 nm gemessen. Eine Unit U ist definiert als die Menge an Enzym, die 1 µmol pNP pro Minute bei gegebenen Reaktionsbedingungen freisetzt.

7.2.7 Messung der Laccaseaktivitäten

Die Messung der Laccasaktivität erfolgte spektrometrisch durch Oxidation ABTS (2-2′-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) zu dem stabilen radikal bei einer Wellenlänge von 436 nm gemessen werden (ε_{436nm} = 29300 L/(mol*cm)) [302-304]. Die Reaktionskinetik der freien Laccase konnte direkt durch In-Situ Messung der Extintkionsänderung durchgeführt werden, während für die Aktivitätsmessung der immobilsierten Laccase dem Reaktionssystem Proben für die Extinktionsmessung entnommen wurden. Die Bestimmung der Laccaseaktivitäten wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

7.2.7.1 Messung der Laccaseaktivität des freien Enzyms

Die Bestimmung der Aktivität der freien Laccase wurde mit einem modifizierten ABTS Assay nach Niku-Paavola et al. ermittelt [305]. Hierzu wurden 50 µL der Enzymprobe in einer geeigneten Verdünnung mit 100 µL 50 mM Natrium Acetat Puffer pH 4,75 und mit

50 µL ABTS 20 mM in eine 96 well Platte pipettiert und die Extinktion als Reaktionskinetik in einem Zeitintervall von 5 min bei 436 nm bei Raumtemperatur gemessen. Mit Hilfe dieser Extinktionsdifferenz pro Zeiteinheit wurde die Konzentrationsänderung der Laccase ermittelt. Eine Unit U ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µmol ABTS+• pro Minute bei gegebenen Reaktionsbedingungen freisetzt. Die Laccaseaktivität pro mL Probe wurde aus der Extinktionsänderung $\frac{\Delta E}{\Delta t}$ folgendermaßen errechnet:

$$\frac{U}{mL} = \frac{\Delta E}{\Delta t \cdot \varepsilon_{0,436nm} \cdot d \cdot V_{Probe}} \cdot V_{Gesamt} \qquad 7\text{-}1$$

Hierbei war d die Schichtdicke von 0,6 cm, V_{Probe} das Probevolumen von 0,05 mL und V_{Gesamt} das Gesamtvolumen pro well von 200 µL.

7.2.7.2 Messung der Laccaseaktivität der immobiliserten Laccase

Die Bestimmung der Laccaseaktivität der Immobilisate wurde bei gleichen Konzentrationsverhältnissen wie bei der Aktivitätsmessung der freien Laccase in einem Gesamtflüssigvolumen von 20 mL in einem 100 mL Erlenmeyerkolben mit Schikanen durchgeführt. Die Einwaage der Enzymträger lag im Bereich zwischen 1 mg bis 100 mg. Die Reaktion der Enzymträger mit 20 mM ABTS in einem 50 mM Natrium Acetat Puffer (pH 4,75) wurde für einen Zeitraum von 5 min unter Rühren mit einem Kreuzbalkenrührer (350 rpm) bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurden Probenahmen bei 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 und 300 s durchgeführt. Mit einer Einmalspritze mit Kanüle wurden 700 µL Probe entnommen und durch einen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter (Celluloseacetat) in bereits vorbereitete 1,5 mL Reaktionsgefäße bei 95 °C im Thermoblock gegeben. Von diesen einzelnen Proben wurden jeweils 50 µL in eine 96-well- Platte mit 100 µL 50 mM Natrium-Acetat Puffer pipettiert und die Extinktion bei 436 nm gemessen. Aus diesen Extinktionswerten wurde die Steigung ermittelt und die Aktivität mittels der Formel in Kapitel 7.2.7.1 unter Berücksichtigung der entsprechenden Verdünnung errechnet.

7.2.8 Größenauschlusschromatographie von niedermolekularen Ligninen

Qualitative Veränderungen der Molmassenverteilung während der Laccase katalysierten Oxidation von phenolischen Substanzen wurden mittels Gelfiltrations - Chromatographie nach [160, 175] ermittelt (Sephadex G-50 1 cm × 48 cm, System: Aktä Purifier). Als Fließmittel wurde 50 mM NaOH eingesetzt bei einem Fluss von 0,4 ml/min. 100 µL Probe

(eingestellt auf 50 mM NaOH) wurden injiziert. Die niedermolekularen Lignine wurden mittels Extinktion bei 280 nm detektiert.

Die quantitative Größenausschlusschromatographie wurde am Fraunhofer ICT mit einem Agilent 1100 System durchgeführt. Als Detektoren wurden ein Brechungsindex- (Agilent 1100/RI) und ein Viskositätsdetektor (ETA 2040) eingesetzt. Die mobile Phase war THF mit einer Flussrate von 1,0 mL/min. Eine PSS SDV 100 Å + 1000 Å + 10000 Å Säulenkombination wurde eingesetzt, um die Lignine nach ihrer Größe aufzutrennen. Die Säulentemperatur betrug 23 °C und das Injektionsvolumen war 100 µL (4 g/L unlösliche Lignine gelöst in THF)

7.3 Statistische Versuchsplanung, Response Surface Pläne und Optimierung

Der allgemeine Zusammenhang zwischen Einflussgrößen (Reaktionsparametern), Störgrößen und Zielgrößen ist in Abbildung 104 gezeigt.

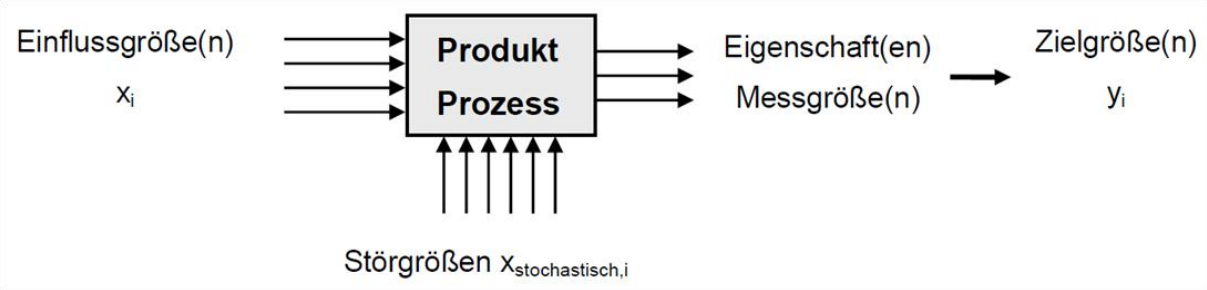


Abbildung 104: Zusammenhang zwischen Einflussgrößen, Störgrößen und Zielgrößen bei einem allgemeinen Prozessschema

Als Einflussgröße werden diejenigen Parameter ausgewählt, die die Zielgröße möglicherweise beeinflussen. Größen, die zufällige vom Experimentator nicht beeinflussbare Schwankungen zeigen, werden als Störgrößen definiert. Zur Erstellung eines Versuchsraums werden die ausgewählten Einflussgrößen X_i in einem 2-stufigen Wertebereich definiert (high, low). In diesen Fall ergeben sich 2k faktorielle Versuchspläne (Screening) mit denen sich dieHaupteinflussgrößen (Einflussgrößen mit signifikanten Effekten auf die Zielgrößen) nach einer Varianzanalyse aus der Gesamtheit der untersuchten Einflussgrößen auswählen lassen.
Für die empirische Beschreibung von quadratischen, nichtlinearen Effekten werden diese 2k faktoriellen Versuchspläne mit einem Zentrumspunkt und den sogenannten Sternpunkten erweitert. Eine schematische Darstellung eines Response-Surface Versuchsraums mit den

unterschiedlichen Versuchspunkten (Zentrumspunkt, faktorielle Punkte und Sternpunkte) ist beispielhaft für den alkalischen Aufschluss von Weizenstroh in Abbildung 105 gezeigt. Jeder gezeigte Punkt entspricht einem Versuchspunkt mit entsprechenden Reaktionsparametern. Die Haupteinflussfaktoren bilden mit ihren zwei Stufen (high, low) die faktoriellen Punkte. Der Mittelwert aller Einflussfaktoren bildet den sogenannten Zentrumspunkt. Ausgehend vom Zentrumspunkt im Abstand α liegen die Sternpunkte. Abhängig von α werden im Wesentlichen vier Grundtypen von Versuchsplänen unterschieden: orthogonal, drehbar, drehbar und orthogonal sowie flächenzentriert. Berechnungsformel für α können [174] entnommen werden. Bei orthogonalen Versuchplänen entstehen keine Korrelationen zwischen den Modelltermen, so dass die Schätzung der Modelle relativ genau wird

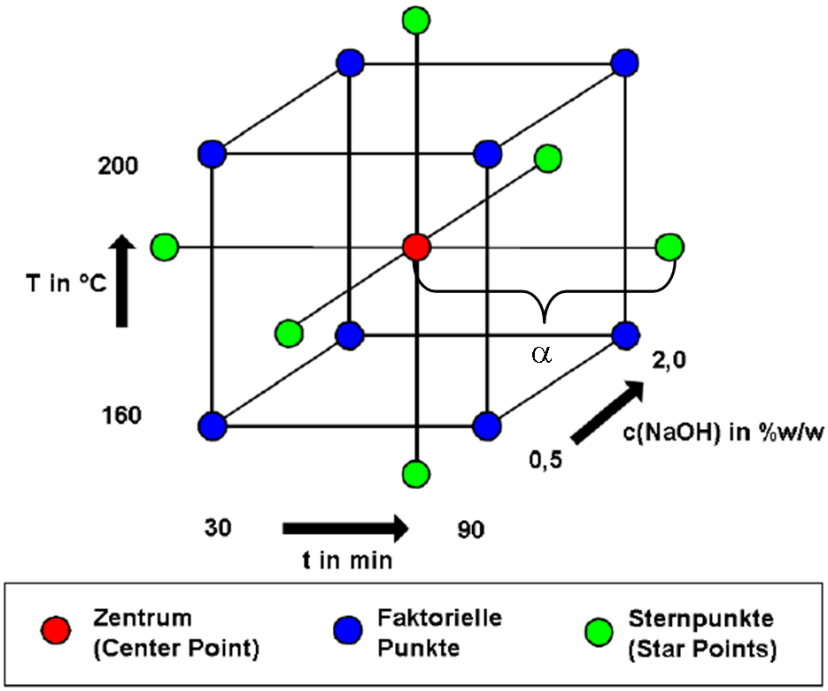


Abbildung 105: Schematische Darstellung des Versuchsraums eines Response Surface Plans am Beispiel des alkalischen Aufschlusses von Weizenstroh [306].

Aus dem Wertebereich der Einflussfaktoren und der Form des Versuchsraums lassen sich die einzelnen Versuchsparameter errechnen. Anschließend wird die Reihenfolge der Versuche randomisiert, um eine größtmögliche Unabhängigkeit zwischen den einzelnen Versuchen zu erhalten.

Durch die Erstellung eines funktionellen Zusammenhangs zwischen den einzelnen Zielgrößen Y und den Einflussfaktoren X in der Form Y= f(X1,…Xi) (siehe 3.2.5), lassen sich mit Hilfe einer Optimierungsfunktion alle Größen unabhängig oder abhängig voneinander optimieren. Hierbei können alle Zielgrößen und Einflussgrößen mit Werteeigenschaften wie größer als

kleiner als oder gleich definiert werden. Darüber hinaus lassen sich auch Größen maximieren oder minimieren. Bei gegenläufigen Zielgrößen müssen oft Zielwertekonflikte gelöst werden. Hierbei kann eine Gewichtung zwischen den einzelnen Zielkriterien erfolgen.

7.4 Optimierung der Vorbehandlungsverfahren mittels statistischer Versuchsplanung

7.4.1 Optimierung des NaOH-alklischen Aufschlusses von Weizenstroh

Tabelle 37: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Optimierung des NaOH-alkalischen Aufschlusses von Weizenstroh

Run No	Messpunkt	NaOH /%	t /min	T / °C
1	Factorial	2	90	200
2	Factorial	0,5	90	160
3	Center	1,25	60	180
4	Factorial	2	30	200
5	Axial	1,25	60	152
6	Factorial	2	30	160
7	Factorial	0,5	90	200
8	Axial	1,25	60	207
9	Center	1,25	60	180
10	Factorial	2	90	160
11	Axial	2,26	60	180
12	Factorial	0,5	30	160
13	Axial	0,24	60	180
14	Axial	1,25	100	180
15	Factorial	0,5	30	200
16	Axial	1,25	19	180
17	Center	1,25	60	180

7.4.2 Optimierung des säurekatalysierten EtOH-Aufschlusses von Miscanthus

Tabelle 38: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Optimierung des H+ EtOH-Organosolv-Aufschlusses von Miscanthus

Run No	Messpunkt	NaOH / %	t /min	T / °C
1	Factorial	0,05	20	200
2	Factorial	0,05	60	160
3	Center	0,125	40	180
4	Factorial	0,2	20	200
5	Factorial	0,2	60	160
6	Axial	0,125	40	207
7	Axial	0,125	40	153
8	Factorial	0,2	60	200
9	Axial	0,125	67	180
10	Axial	0,125	13	180
11	Axial	0,024	40	180
12	Factorial	0,05	20	160
13	Center	0,125	40	180
14	Factorial	0,2	20	160
15	Center	0,125	40	180
16	Factorial	0,05	60	200
17	Axial	0,23	40	180

7.4.3 Optimierung des säurekatalysierten EtOH-Aufschlusses von Pappelholz

Tabelle 39: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Optimierung des H^+-EtOH-Organosolv-Aufschlusses von Pappelholz

Run No	Messpunkt	NaOH /%	t /min	T / °C
1	Axial	0,23	60	180
2	Center	0,125	60	180
3	Factorial	0,2	90	160
4	Axial	0,125	100	180
5	Factorial	0,05	90	160
6	Factorial	0,2	30	200
7	Axial	0,125	19	180
8	Axial	0,125	60	207
9	Factorial	0,05	90	200
10	Center	0,125	60	180
11	Factorial	0,05	30	160
12	Factorial	0,2	30	160
13	Center	0,125	60	180
14	Factorial	0,05	30	200
15	Axial	0,024	60	180
16	Factorial	0,2	90	200
17	Axial	0,125	60	153

7.5 Modified Severity Modelle

7.5.1 Modified Severity Modell für den NaOH-alkalischen Aufschluss von Weizenstroh

$$Delignifizierung = 3{,}29 \cdot \log M_0 + 71{,}56 \qquad R^2 = 0{,}94$$

mit $M_0 = c^{11{,}39} \cdot t \cdot \exp\left(\frac{T - T_R}{14{,}75}\right)$

$$Xylansolubilisierung = 12{,}66 \cdot \log M_0 \qquad R^2 = 0{,}92$$

mit $M_0 = c^{3{,}53} \cdot t \cdot \exp\left(\frac{T - T_R}{14{,}75}\right)$

$$Xylanausbeute_{Lösung} = -1{,}65 \cdot (\log M_0 - 2{,}63)^2 + 39{,}46 \qquad R^2 = 0{,}89$$

mit $M_0 = c^{5{,}06} \cdot t \cdot \exp\left(\frac{T - T_R}{14{,}75}\right)$

$$Glukoseausbeute_{enzymatisch} = 83{,}46 = const.$$

$$Xyloseausbeute_{enzymatisch} = -1{,}39 \cdot \log M_0 + 40{,}89 \qquad R^2 = 0{,}66$$

mit $M_0 = c^{12{,}25} \cdot t \cdot \exp\left(\frac{T - T_R}{14{,}75}\right)$

7.5.2 Modellgleichungen für Miscanthus

(A) (B)

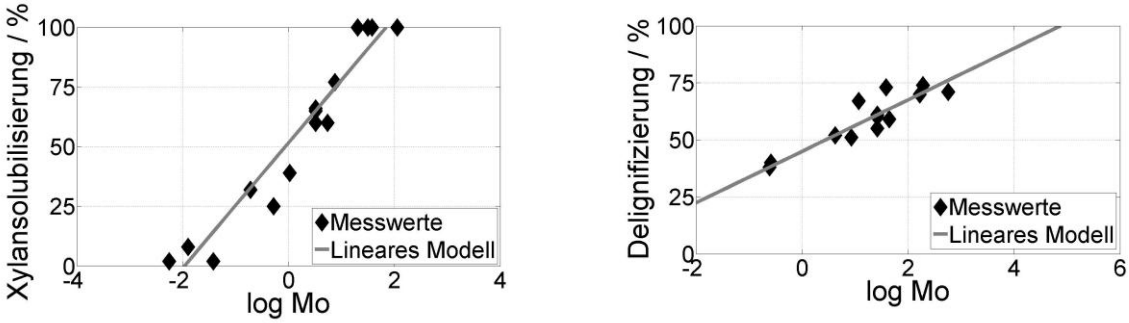


Abbildung 106: (A) Xylansolubilisierung in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0. (B) Delignifizierung der Miscanthusfaser in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0.

$$Delignifizierung = 11{,}29 \cdot \log M_0 + 44{,}93 \qquad R^2 = 0{,}90$$

mit $M_0 = c^{2{,}80} \cdot t \cdot \exp\left(\frac{T - T_R}{14{,}75}\right)$

$$Xylanso\,\text{lub}\,ilisierung = 26{,}23 \cdot \log M_0 + 51{,}55 \qquad R^2 = 0{,}97$$

mit $M_0 = c^{3{,}82} \cdot t \cdot \exp\left(\frac{T - T_R}{14{,}75}\right)$

(A) (B)

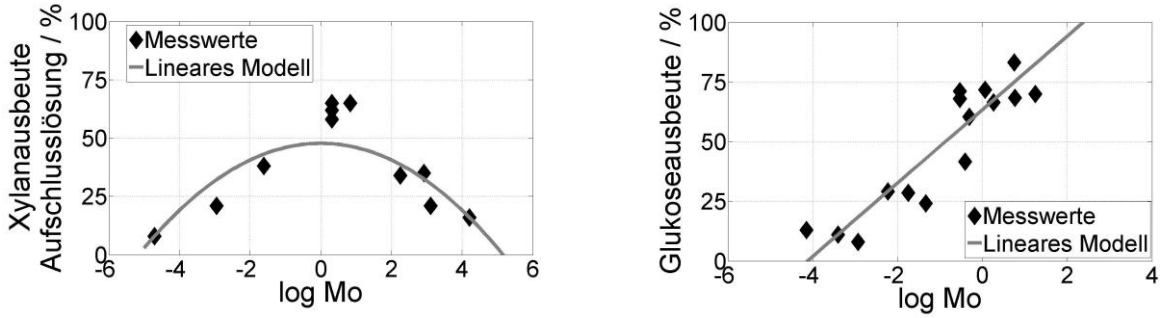


Abbildung 107: (A) Xylanausbeute in der Aufschlusslösung in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0. (B) Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse der vorbehandelten Miscanthusfaser mit Cellulasen in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0.

$$Xylanausbeute_{Lösung} = -1{,}80 \cdot (\log M_0)^2 + 47{,}75 \qquad R^2 = 0{,}89$$

mit $M_0 = c^{4{,}37} \cdot t \cdot \exp\left(\frac{T - T_R}{14{,}75}\right)$

$$Glukoseausbeute_{enzymatisch} = 15{,}36 \cdot \log M_0 + 63{,}39 \qquad R^2 = 0{,}90$$

mit $M_0 = c^{4{,}98} \cdot t \cdot \exp\left(\frac{T - T_R}{14{,}75}\right)$

7.5.3 Modellgleichungen für Pappelholz

$$Delignifizierung = \frac{118{,}14 \cdot \log M_0}{1{,}07 + \log M_0} \qquad R^2 = 0{,}95$$

mit $M_0 = c^{2{,}20} \cdot t \cdot \exp\left(\frac{T - T_R}{14{,}75}\right)$

$$Xylanso\,\text{lub}\,ilisierung = 18{,}19 \cdot \log M_0 + 51{,}94 \qquad R^2 = 0{,}92$$

mit $M_0 = c^{3{,}58} \cdot t \cdot \exp\left(\frac{T - T_R}{14{,}75}\right)$

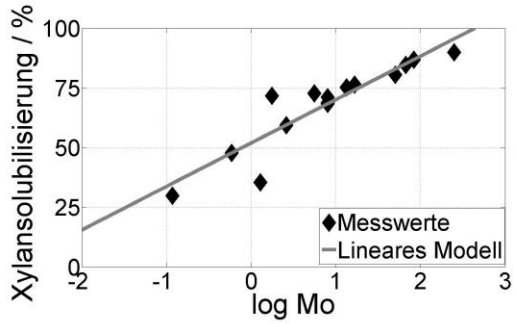
$$Xylanausbeute_{Lösung} = \frac{100{,}00}{1 + \exp(-\log M_0)} \qquad R^2 = 0{,}92$$

mit $M_0 = c^{3{,}90} \cdot t \cdot \exp\left(\frac{T - T_R}{14{,}75}\right)$

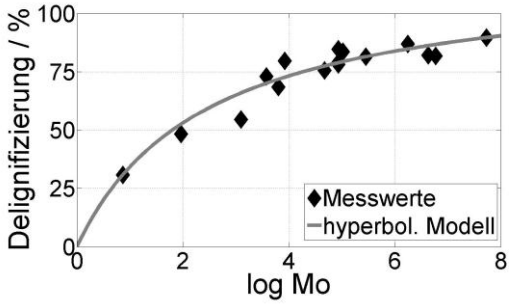
$$Glukoseausbeute_{enzymatisch} = 17{,}71 \cdot \log M_0 + 16{,}05 \qquad R^2 = 0{,}91$$

mit $M_0 = c^{2{,}27} \cdot t \cdot \exp\left(\frac{T - T_R}{14{,}75}\right)$

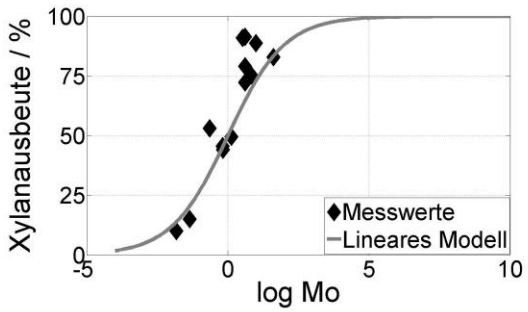
(A)



(B)



(C)



(D)

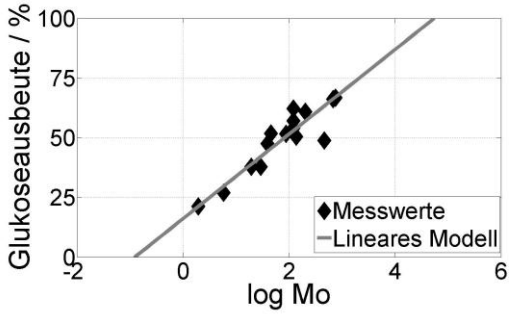
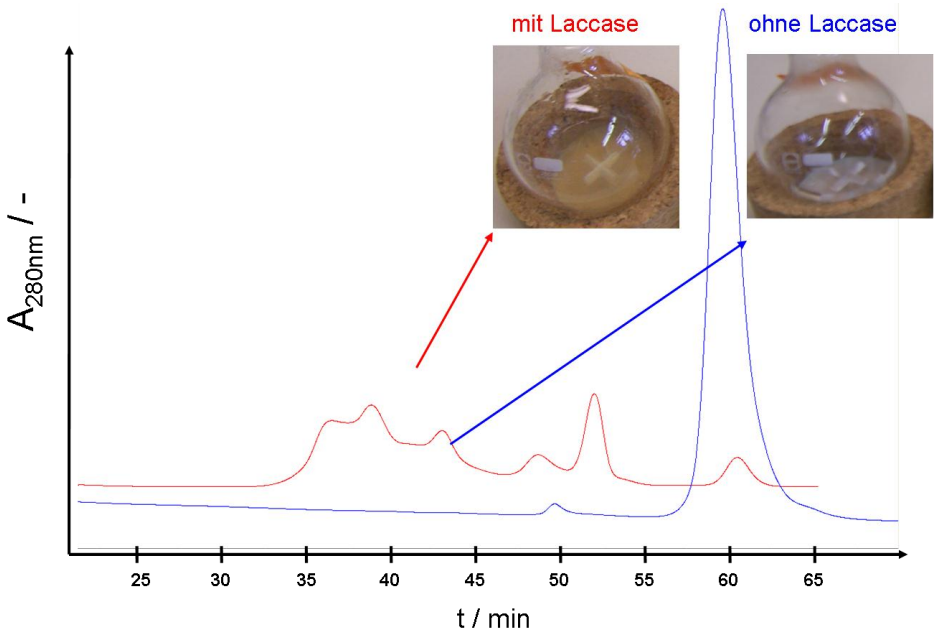


Abbildung 108: (A) Xylansolubilisierung. (B) Delignifizierung und (C) Xylanausbeute in der Aufschlusslösung in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0. (D) Glukoseausbeute nach enzymatischer Hydrolyse der vorbehandelten Miscanthusfaser mit Cellulasen in Abhängigkeit des Modified Severity-Faktors M_0.

7.6 Laccase katalysierte Detoxifikation von phenolischen Komponenten

(A)



(B)

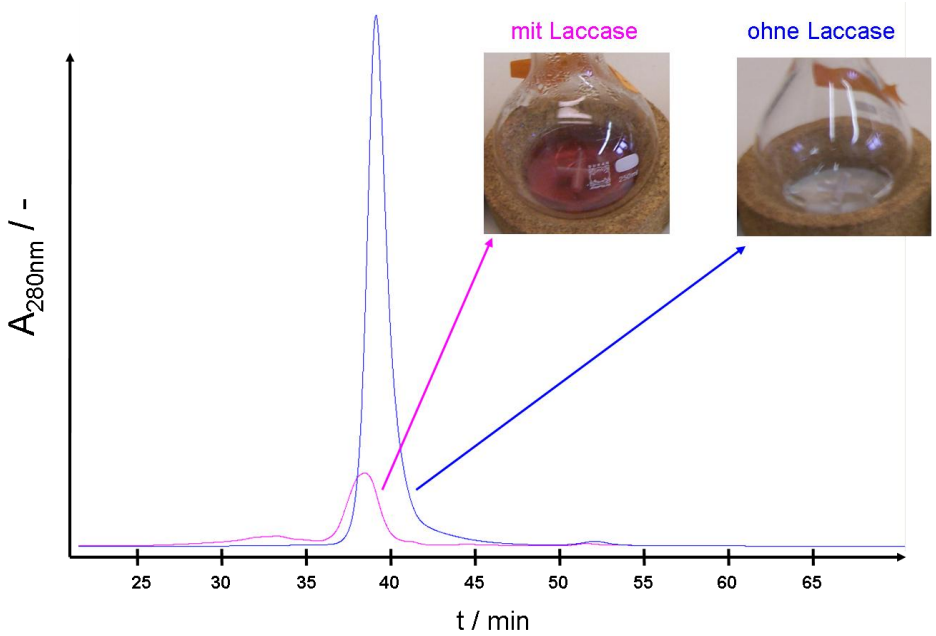


Abbildung 109: Chromatogramm der SEC-Analyse für die Laccase und Laccase-Mediator katalysierte Oxidation von Vanillin (A) und Acetosyringon (B).

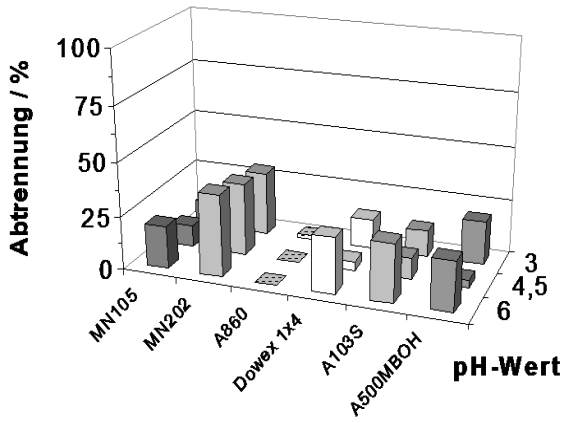
Tabelle 40: Berechnete kinetische Konstanten für die Laccase-katalysierte Oxidation von phenolischen Komponenten in der Aufschlusslösung LZ10 mit freier und immobilsierter Laccase (Träger EC-EA)

	Freie Laccase	Immobilisierte Laccase
k_2 / mmol/(mg*min)	1,801	0,474
K_M / ($mmol_S$ / L)	40,347	1,962
K_{MP} / ($mmol_P$ / L)	0,081	0,004
K_{eq} / ($mmol_P$ /$mmol_S$)	2,768	0,012
R^2	0,98	0,98

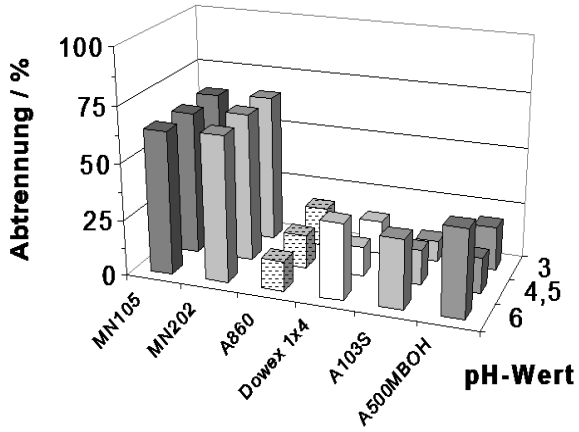
7.7 Adsorptive Detoxifikation

7.7.1 Auswahl von geeigneten Adsorbern

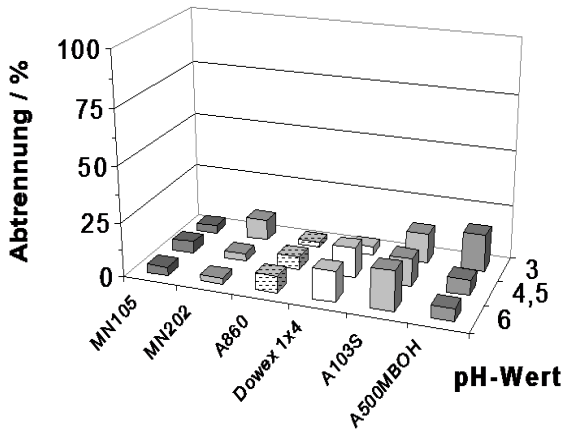
(A) HMF



(B) Furfural



(C) Lävulinsäure



(D) Essigsäure

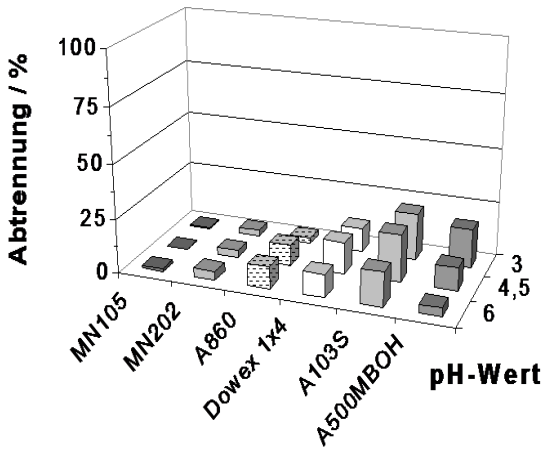
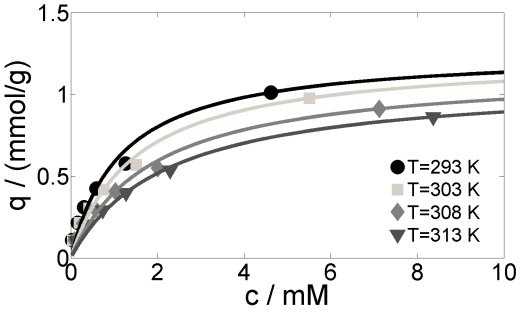


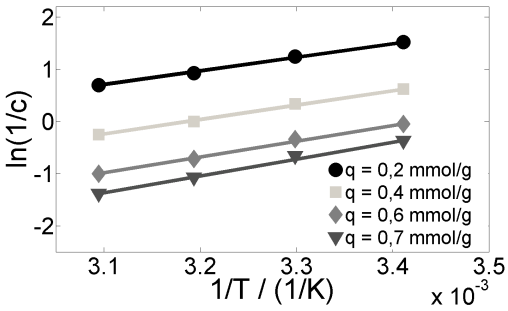
Abbildung 110: (A) Abtrennung von (A) HMF (B) Furfural, (C) Lävulinsäure und (D) Essigsäure aus der Modellmischung in Abhängigkeit des pH-Werts für die jeweiligen Adsorber bzw. Anionentauscher bei 30 °C und 16 h Inkubationszeit.

7.7.2 Thermodynamische Charakterisierung der ausgewählten Adsorber

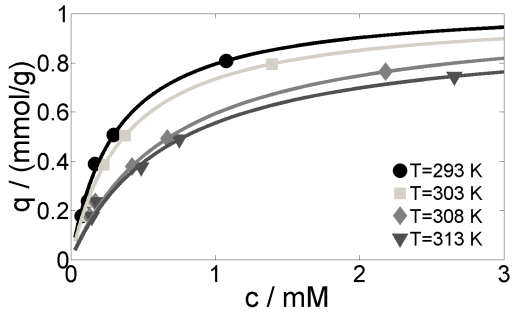
(A) HMF mit MN202



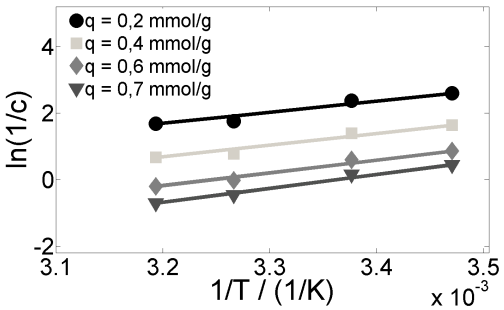
(B)



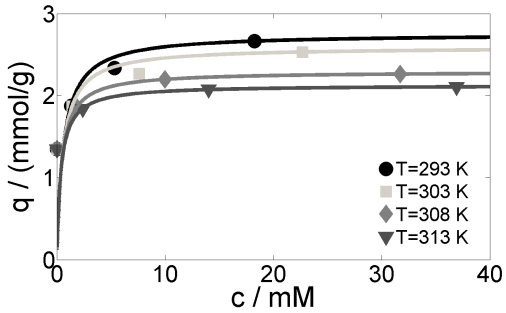
(C) Furfural mit 202



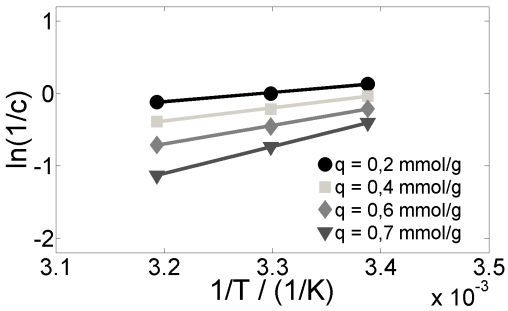
(D)



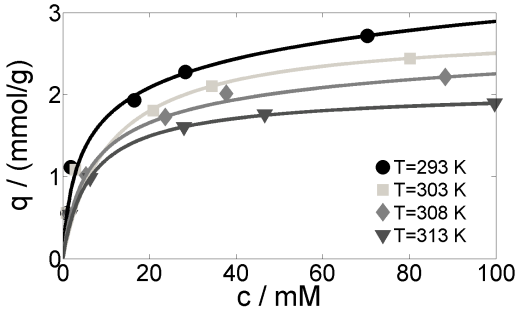
(E) Ameisensäure mit A103S



(F)



(G) Essigsäure mit A103S



(H)

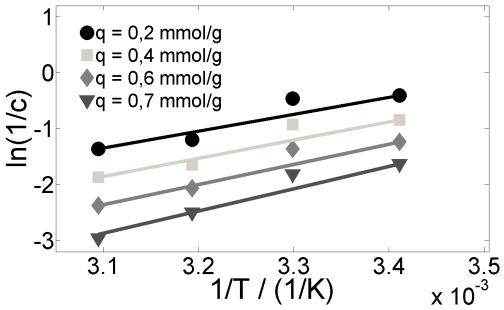


Abbildung 111: Adsorptionsisothermen und Arrheniuskurven von HMF (A+B), Furfural (C+D), Ameisensäure (E+F) und Essigsäure (G+H). Für Furfural und HMF wurde die Isotherme nach Langmuir und für Essigsäure die Isotherme nach Redlich verwendet.

Tabelle 41: Thermodynamische Daten zur Adsorption der phenolischen Komponenten auf MN202.

q	ΔH	ΔG				ΔS			
mmol/g	kJ/mol	J/mol				J/mol/K			
		293K	303K	308K	313K	293K	303K	308K	313K
0,2	-15,39	-10,44	-10,61	-10,74	-11,10	-52,47	-50,73	-49,91	-49,11
0,4	-14,02	-25,76	-25,52	-25,73	-27,22	-47,77	-46,19	-45,44	-44,71
0,6	-11,74	-50,40	-48,00	-48,03	-52,67	-39,88	-38,58	-37,95	-37,33
0,7	-10,06	-69,34	-64,13	-63,85	-71,91	-34,08	-32,97	-32,44	-31,89

Tabelle 42: Thermodynamische Daten zur Adsorption der HMF auf MN202.

q	ΔH	ΔG				ΔS			
mmol/g	kJ/mol	J/mol				J/mol/K			
		293K	303K	313K	323K	293K	303K	313K	323K
0,2	-21,63	-10,37	-10,75	-11,24	-11,71	-73,76	-71,33	-69,05	-66,91
0,4	-22,87	-25,34	-26,35	-28,05	-29,67	-77,91	-75,34	-72,93	-70,67
0,6	-24,96	-48,82	-51,00	-55,93	-60,66	-84,99	-82,18	-79,54	-77,06
0,7	-26,69	-66,38	-69,62	-78,11	-86,40	-90,81	-87,80	-84,97	-82,32

Tabelle 43: Thermodynamische Daten zur Adsorption der Furfural auf MN202.

q	ΔH	ΔG				ΔS			
mmol/g	kJ/mol	J/mol				J/mol/K			
		288K	396K	306K	313K	288K	396K	306K	313K
0,2	-27,68	-10,64	-11,01	-11,36	-11,83	-96,04	-93,44	-90,39	-88,37
0,4	-29,04	-27,78	-29,05	-29,82	-32,04	-100,67	-97,95	-94,75	-92,62
0,6	-31,79	-59,85	-63,97	-65,00	-74,24	-110,11	-107,12	-103,62	-101,27
0,7	-34,62	-89,36	-97,39	-98,05	-119,0	-119,82	-116,56	-112,75	-110,16

Tabelle 44: Thermodynamische Daten zur Adsorption der Essigsäure auf A103S.

q	ΔH	ΔG				ΔS			
mmol/g	kJ/mol	J/mol				J/mol/K			
		293K	303K	313K	323K	293K	303K	313K	323K
0,75	-25,13	-45,1	-48,9	-48,0	-53,6	-85,6	-82,7	-80,1	-77,6
1	-27,03	-68,7	-76,3	-72,8	-85,0	-92,0	-88,9	-86,1	-83,4
1,25	-29,90	-100,0	-114,8	-105,6	-130,9	-101,7	-98,3	-95,2	-92,1
1,5	-33,03	-143,6	-173,2	-150,8	-204,5	-112,2	-108,4	-105,0	-101,6

Tabelle 45: Thermodynamische Daten zur Adsorption der Formiat auf A103S.

q	ΔH	ΔG			ΔS		
mmol/g	kJ/mol	J/mol			J/mol/K		
		288K	295K	303K	288K	295K	303K
1,6	-10,65	-179,07	-231,82	-290,40	-35,49	-34,38	-33,09
1,7	-15,07	-210,40	-285,35	-375,84	-50,35	-48,77	-46,92
1,8	-21,33	-249,18	-359,03	-509,14	-71,44	-69,19	-66,50
1,9	-31,06	-298,24	-467,03	-745,47	-104,21	-100,90	-96,79

7.8 Zusatz

Im Rahmen der vorliegendenArbeit sind folgende Abschluss- und Praktikumsarbeiten unter wissenschaftlicher Anleitung von Daniel Ludwig entstanden:

Rapp S. (2009). Enzymatische Degradation von Lignocellulose zur Gewinnung von Monosacchariden, Hochschule Esslingen, Praktikumsarbeit.

Westermann P. (2010). Enzymatische Aufarbeitung von Lignin und Ligninabbauprodukten zur stofflichen Verwertung von Lignocellulose. Hochschule Furtwangen. Bachelorarbeit.

Siegert J. (2010). Enzymatische Hydrolyse von Lignocellulose mit Hilfe kommerzieller Enzympräparate. TU Bergakademie Freiberg. Studienarbeit.

Haitz F. (2010). Prozessentwicklung zur Produktion von C5 - und C6 - Zuckern als biobasierte Plattformchemikalien aus Lignocellulose. Hochschule Offenburg. Masterarbeit.

Weisser S. (2011). Prozessentwicklung zur Produktion von Zuckern und Lignin als biobasierte Plattformchemikalien aus Lignocellulose. Hochschule Furtwangen. Praktikumsbericht.

Bahret E. (2011). Entwicklung und Charakterisierung eines Hochfeststoff-Hydrolyseverfahrens für Lignocellulose. Hochschule Furtwangen. Praktikumsbericht.

Stolarow J. (2012). Prozessentwicklung zur Umwandlung und Nutzung von Lignocellulosekomponenten. Universität Stuttgart. Diplomarbeit.

8 Wissenschaftliche Beiträge

Teilaspekte der vorliegenden Arbeit wurden in Rahmen von Publikationen, Posterbeiträgen und Vorträgen veröffentlicht.

Publikationen:

Ludwig, D., M. Buchmann, et al (2013). High solids enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic materials with a powerful stirrer concept. (Submission)

Ludwig, D., M. Amann, et al. (2013). Development and optimization of single and combined detoxification processes to improve the fermentability of lignocellulose hydrolyzates. Bioresource Technology. 133: 455-461.

Daniel Ludwig, Manfred Amann, Thomas Hirth, Steffen Rupp, Susanne Zibek (2010) Weizenstroh – eine potentialle Rohstoffquelle für die chemische Industrie. Chem. Ing. Tech., No 9, 1597

Daniel Ludwig, Manfred Amann, Thomas Hirth, Steffen Rupp, Susanne Zibek (2010) Stoffliche Nutzung von Lignocellulose- Detoxifikation von Aufschlusslösungen mit immobilisierter Laccase. GIT Labor Fachzeitschrift, 10, 765-767

Daniel Ludwig, Manfred Amann, Thomas Hirth, Steffen Rupp, Susanne Zibek (2010) Laccase-katalysierte Detoxifizierung von löslichen Ligninabbauprodukten in vorbehandelten Lignocellulose-Hydrolysaten. Chem. Ing. Tech., 82, No 8, 1183-1189

Posterbeiträge:

Ludwig, D. u., A. Gronen, et al. (2011). From lignocellulose to platform chemicals. Seventh International Conference on Renewable Resources and Biorefineries RRB 7. Brügge, Belgien, Medicongress 114.

Daniel Ludwig, Thomas Hirth, Steffen Rupp, Susanne Zibek (2010) Biotechnological process development for the production of C5 and C6 sugars as bio-based building blocks from

lignocellulose, Poster und Tagungsband S. 74, Industrielle Nutzung nachwachsender Rohstoffe- Chemie, Biotechnologie, Verfahrenstechnik, Germany, 20. - 21. Januar 2010

Daniel Ludwig, Thomas Hirth, Steffen Rupp, Susanne Zibek (2010) Wheat straw – making a natural carbon source accessible for industry, Poster und Tagungsband, European workshop on lignocellulosics and pulp, Germany, 16. – 19. August 2010

Daniel Ludwig, Thomas Hirth, Steffen Rupp, Susanne Zibek (2010) Wheat straw - a potential substrate for lignocellulose biorefineries, Poster und Tagungsband, ProcessNet-Jahrestagung 2010 und 28. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Germany, 21. – 23. September 2010

Daniel Ludwig, Susanne Zibek, Manfred Amann, Steffen Rupp, Thomas Hirth (2009) Biotechnological process development for the production of C5 and C6 sugars as bio-based building blocks from lignocellulosic materials, Poster, Green Talents Symposium Berlin, Germany, 31. August - 10. September 2009

Vorträge:

Ludwig, D., T. Hirth, et al. (2012). Process development of a lignocellulose biorefinery with several feedstocks. Achema 2012. Frankfurt am Main, Germany, Dechema.

Ludwig, D., T. Hirth, et al. (2011). Lignocellulose Biorefinery: Producing Precursors for chemical industry. Interanational conference on Materials and Technologies for Green Chemistry. Tallinn, Estland, Tallinn University of Technology.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:
Daniel Ludwig
Am Bahnhof 2
64347 Griesheim

Geburtstag und Geburtsort:	04.12.1982 in Nürnberg
Berufsausbildung	Chemie – und Bioingenieur (Dipl.-Ing. Univ.)
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

06/2012 – heute	Prozessingenieur bei der Evonik Industries AG in der Abteilung Bioprocess Technology & Life Cycle Management im Bereich Process Technology & Engineering
05/2008 – 06/2012	Promotion zum Dr. Ing am Institut für Grenzflächen-verfahrenstechnik und Plasmatechnologie der Universität Stuttgart (Prof. Dr. rer. nat Thomas Hirth)
04/2004 – 02/2008	Hauptstudium Chemie- und Bioingenieurwesen an der Friedrich Alexander Universität Erlangen- Nürnberg.
10/2002 – 04/2004	Grundstudium Chemie- und Bioingenieurwesen an der Friedrich Alexander Universität Erlangen-Nürnberg
09/1990 – 06/2002	Wolfgang Borchert Gymnasium Langenzenn

Griesheim, den 04.04.2014

Aufgrund der unausweichlichen Verknappung fossiler Rohstoffe und den zunehmenden klimatischen Auswirkungen von Treibhausgasen wird in Zukunft die nachhaltige Nutzung nachwachsender Rohstoffe immer bedeutender werden. Lignocellulosehaltige Rohstoffe werden hierbei eine wichtige Rolle spielen, da sie mit ihrem jährlichen Produktionspotential von 150 Milliarden Tonnen pro Jahr in ausreichenden Mengen vorhanden sind und nicht in direkter Konkurrenz zur Futtermittel- und Nahrungsmittelindustrie stehen.
In dieser vorliegenden Arbeit wurden daher Verfahren und Prozessmodelle zur Fraktionierung von Lignocellulose in getrennte Glukose-, Xylose- und Ligninproduktströme entwickelt. Diese getrennten Produktströme sind Grundlage einer Lignocellulose-Bioraffinerie, in der die Lignocellulose in ihrer Gesamtheit stofflich und energetisch genutzt werden kann. Der entwickelte Gesamtprozess bestand aus der Entfernung von Lignin und Hemicellulose durch Vorbehandlung der Lignocellulose, der enzymatischen Hydrolyse der vorbehandelten cellulosereichen Faserfraktion bei möglichst hohen Feststoffkonzentrationen und der Abtrennung toxischer Lignocellulose-Abbauprodukte aus der hemicellulosehaltigen Aufschlusslösung (Detoxifikation).

ISBN 978-3-8396-0696-4