



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

**Entwicklung eines Thermodruckhydrolyse-Verfahrens zur
Vorbehandlung von Weizenstroh ohne vorherige
mechanische Zerkleinerung für die Produktion von
Polyhydroxybuttersäure**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg Universität
in Mainz

Patrick Ballmann

geb. am 13.10.1982 in Goslar

Mainz, 2014

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2014

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von Oktober 2010 bis Dezember 2013 in der Abteilung Biotechnologie am Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens e.V. durchgeführt.

I. Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
1. Einleitung	3
1.1 Verfügbare Weizenstrohmenge in Deutschland.....	6
1.2 Nutzung von Weizenstroh als nachwachsender Rohstoff	6
1.3 Zusammensetzung des Weizenstrohs.....	8
1.3.1 Cellulose	9
1.3.2 Hemicellulose.....	10
1.3.3 Lignin	12
1.3.4 Akzessorische Inhaltsstoffe der Lignocellulose.....	12
1.4 Vorbehandlung von Lignocellulose zur Gewinnung der Zucker	13
1.4.1 Physikalische Vorbehandlung	14
1.4.2 Biologische Vorbehandlung.....	14
1.4.3 Chemisch-thermische Vorbehandlungsmethoden	15
1.5 Enzymatische Hydrolysen von lignifizierter Biomassen	22
1.5.1 Mechanismus des enzymatischen Cellulose-Abbaus	22
1.5.2 Einflussfaktoren auf die enzymatischen Hydrolyse	23
1.5.3 Kommerziell erhältliche enzymatische Präparate	24
1.6 Produktion von Biogas aus landwirtschaftlichen Reststoffen	25
1.6.1 Bildung von Biogas	26
1.7 Biopolymere auf Basis von Polyhydroxybuttersäure (PHB)	27
1.7.1 Mikrobielle Synthesen von Polyhydroxybuttersäure (PHB).....	28
1.7.2 Verbreitete PHB-Produzenten	30
1.7.3 Substrate zur PHB-Produktion	32
1.7.4 Eigenschaften des PHB	32

1.7.5	PHB-Produktion im industriellen Maßstab	34
1.8	Motivation und Zielsetzung.....	36
2.	Material und Methoden	38
2.1	Geräte und Hilfsmittel.....	38
2.2	Chemikalienliste	39
2.3	Weizenstrohanalytik	41
2.3.1	Herkunft des Weizenstrohs	41
2.3.2	Zusammensetzung des Weizenstrohs.....	41
2.4	Vorbehandlung von Weizenstroh in der TDH.....	44
2.4.1	Vorbehandlungen in der 125 L TDH-Anlage.....	44
2.4.2	Vorbehandlungen in der 425 L TDH-Aufschlussanlage	46
2.5	Enzymatische Hydrolyse von TDH-Stroh.....	47
2.5.1	Enzymanalytik.....	48
2.5.2	Enzymatische Hydrolysen von TDH-Stroh.....	49
2.6	Ermittlung des Biogaspotentials	51
2.7	Fermentative PHB-Produktion.....	52
2.7.1	Charakteristika der Bakterienstämme.....	52
2.7.2	Stammhaltung.....	52
2.7.3	Kultivierungsmedien.....	53
2.7.4	Kultivierung von <i>Cupriavidus necator</i> im Schüttelkolben	53
2.7.5	Bestimmungen der Biotrockenmasse	54
2.7.6	Bestimmungen der PHB-Konzentration.....	54
2.8	Allgemeine Analytik.....	55
2.8.1	Bestimmungen der Trockensubstanz-Gehalte (TS-Gehalt)	55
2.8.2	Bestimmung des Glühverlustes (GV)	56
2.8.3	Bestimmung der Zucker- und Nebenproduktausbeuten.....	56
2.8.4	Quantifizierungen der phenolischen Verbindungen	57

2.8.5	Bestimmungen der Ammonium-Stickstoff-Konzentrationen mittels Wasserdampfdestillation.....	57
2.8.6	Bestimmungen der Spurenelement-Konzentrationen mittels ICP-MS.....	58
2.8.7	Gesamtstickstoff nach Kjeldahl	58
3.	Ergebnisse.....	59
3.1	Optimierung der Vorbehandlung von Weizenstroh in der 125 L TDH-Anlage	59
3.1.1	Optimierung der Behandlungstemperatur.....	59
3.1.2	Optimierung der Behandlungszeit	64
3.1.3	Optimierung der Säure-Konzentrationen bei der TDH-Behandlung	69
3.1.4	Optimierung der Dampfzufuhr bei der TDH	77
3.2	Vorbehandlung des Weizenstrohs in der 425 L TDH-Anlage.....	80
3.2.1	Vorbehandlung von Weizenstroh in der 425 L TDH-Anlage.....	81
3.2.2	Vorbehandlung eines kompletten Strohballens im 425 L-Reaktor.....	82
3.3	Energiebilanzierung im 125 L TDH-Reaktor	83
3.3.1	Zweistufiger Aufheizprozess bei der TDH (Szenario 1)	84
3.3.2	Einstufiger Aufheizprozess bei der TDH (Szenario 2).....	86
3.4	Verbesserung der enzymatische Hydrolyse des TDH-Strohs	88
3.4.1	Temperaturoptimierung der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh	90
3.4.2	Optimierung der Inkubationszeit und Enzym-Konzentration	92
3.4.3	Optimierung des pH-Werts bei der enzymatischen Hydrolyse	94
3.5	Enzymatische Hydrolyse im 100 L Rührreaktor.....	94
3.6	Ermittlung des Biogaspotentials der Reststoffe	96
3.6.1	Bestimmung der Biogas-Ausbeuten	97
3.7	Produktion von PHB in enzymatischen Hydrolysaten aus TDH-Stroh.....	98
3.7.1	Kultivierung von <i>Cupriavidus necator DSM 545</i> im enzymatischen Hydrolysat.....	98
3.7.2	Zugabe von Spurenelementen zum enzymatischen Hydrolysat	101
3.7.3	Kultivierung im enzymatischen Hydrolysat mit zusätzlichen Nährstoffen	102

4. Diskussion.....	105
4.1 Vorbehandlung von Weizenstroh in der TDH.....	105
4.2 Auswirkungen der TDH auf die enzymatische Hydrolyse	109
4.3 Up-Scaling des Vorbehandlungsprozesses in den 425 L TDH-Reaktor	113
4.4 Energetische Betrachtung der TDH-Vorbehandlung.....	114
4.5 Mikrobielle Produktion von PHB	115
5. Ausblick.....	119
6. Referenzen:	121
7. Anhang	135
Abbildungsverzeichnis	139
Tabellenverzeichnis.....	144
Veröffentlichungen.....	155

Abkürzungsverzeichnis

5-HMF	5-Hydroxymethylfurfural
a	Jahr
Abb.	Abbildung
AFEX-Verfahren	Ammonia Fiber Explosion-Verfahren
BG	Beta-Glucanase
BHKW	Blockheizkraftwerk
btu	Britisch thermal unit
ca.	Circa
C	Kohlenstoff
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
dest.	Destilliertes Wasser
DNS-Reagenz	3,5-Dinitrosalicylsäure-Reagenz
EEL	Energy Equivalent Liter
ENG	Endoglucanasen
EXG	Exoglucanasen
EIA	Energy Information Administration
FPU	Filter Paper Unit
g	Gramm
GC-MS	Gaschromatograph-Massenspektrometer
GL	Gigaliter
GV-Wert	Glühverlust-Wert
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICP	Inductively Coupled Plasma
IFEU	Institut für Energie- und Umweltforschung Heidelberg
K	Kelvin
kg	Kilogramm
kWh	Kilowattstunde
L	Liter
lat.	lateinisch
LHW-Verfahren	Liquid Hot Water-Verfahren
mg	Milligramm
min	Minute

mL	Milliliter
MPa	Megapascal
ms	Millisekunden
N	Stickstoff
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphate
NOAA	National Oceanic and Atmospheric Administration
NREL	National Renewable Energy Laboratory
pH	potentio hydrogenii (pH-Wert)
PHA	Polyhydroxyalkanoate
PHB	Polyhydroxybuttersäure
PI-Regler	Proportional-Integral-Regler
PLA	Polylactic acid
ppm	parts per million
rpm	Rounds per minute
SE-Verfahren	Steam Explosion-Verfahren
Sek	Sekunde
SFP-Verfahren	Supercritical Fluid Pretreatment
T	Temperatur
t	Zeit
to	Tonne
Tab.	Tabelle
TCA	Tricarbonsäurezyklus
TDH	Thermodruckhydrolyse
TS-Wert	Trockensubstanz-Wert
U	Unit (enzymatische Aktivität)
UNO	United Nation Organization
US	United States
UV	Ultraviolett
VDLUFA	Verband deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

Zusammenfassung

Die Lignocellulose spielt als nachwachsender Rohstoffe eine immer wichtigere Rolle bei der Produktion von biobasierten Produkten wie beispielsweise Biopolymeren. Im Bereich der Biopolymere besitzt vor allem das PHB (Polyhydroxybuttersäure) aufgrund guter Eigenschaften wie z.B. Temperaturbeständigkeit ein großes Potential für die Zukunft. Lignocellulose kommt in der Natur in vielen Formen vor und macht den größten Teil der organischen Masse auf der Erde aus. Das landwirtschaftliche Koppelprodukt Weizenstroh ist in dem Zusammenhang vor allem in Deutschland von großer Bedeutung als potentieller Rohstoff. Um die darin enthaltenen mengenmäßig größten Zuckerfraktionen Glucose und Xylose für die Produktion biobasierter Produkte nutzen zu können, ist eine Vorbehandlung des Weizenstrohs mit anschließender enzymatischer Hydrolyse notwendig. Verschiedene Arbeiten haben sich mit diesem Thema befasst. Allerdings wurde hierbei in der Regel das Weizenstroh zuvor mechanisch zerkleinert, um die Effektivität der Vorbehandlung zu steigern. Die mechanische Zerkleinerung ist allerdings sehr energieintensiv und macht die Nutzung von Weizenstroh wirtschaftlich problematisch. Auch wurden die meisten Studien ausschließlich im Labormaßstab durchgeführt, wodurch der Bezug zum halbertechnischen Maßstab fehlt. Dieser ist wichtig, da nur so der spätere Schritt in den Großmaßstab sinnvoll durchführbar wäre.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Vorbehandlung von Weizenstroh in einer Thermodruckhydrolyse im halbertechnischen Maßstab ohne vorherige Zerkleinerung des Weizenstrohs im 125 L – und 425 L TDH-Reaktor durchgeführt. Verschiedene Prozessparameter wie Behandlungstemperatur, Behandlungszeit und Säure-Konzentration wurden optimiert. Im 425 L TDH-Reaktor wurden auch ganze Weizenstroh-Ballen eingesetzt um das Potential dieses Verfahrens zu zeigen. Die Behandlung im TDH-Reaktor erfolgte dabei mit direkter Einwirkung von Heißdampf. Im Anschluss an die TDH-Vorbehandlung erfolgte die enzymatische Hydrolyse des TDH-Strohs. Hierdurch wurden die Zucker größtenteils freigesetzt. Auch hier wurde in Anlehnung an die TDH eine Optimierung der Prozessbedingungen durchgeführt. Die Reststoffe nach der enzymatischen Hydrolyse wurden genutzt um Biogas zu produzieren. Hierdurch sollte die für den Prozess benötigte Energie gewonnen werden. Im letzten Schritt erfolgte die Produktion von PHB in den enzymatischen Hydrolysaten mit dem bekannten PHB-Produzenten *Cupriavidus necator* um eine vielversprechende Nutzung der freigesetzten Zucker im wachsenden Markt der Biopolymere aufzuzeigen.

Die im Rahmen der Arbeit erzielten Ergebnisse zeigten, dass die optimalen Bedingungen für die Vorbehandlung von Weizenstroh bei 150 °C und 60 min Behandlungszeit lagen. Als Säure-Konzentration wurde eine verdünnte Säure mit einer Endkonzentration von 0,64 % (v/v)

an Salpetersäure eingestellt. Durch die anschließende enzymatische Hydrolyse bei 50 °C und pH 5,0 war es möglich nach 72 h 90 % der enthaltenen Glucose und 65 % der Xylose freizusetzen. Die Enzym-Dosierung lag bei 18,5 FPU g⁻¹ TS. Durch Verkürzung der Behandlungszeiten in der TDH auf 5 min konnte die Xylose-Ausbeute auf 80 % gesteigert werden. Auch die Implementierung des Vorbehandlungsprozesses in den 425 L-Reaktor konnte erfolgreich durchgeführt werden. Auch hier war es möglich bei einer Behandlungstemperatur von 150 °C, 60 min Behandlungszeit und 0,64 % (v/v) Salpetersäure nach der enzymatischen Behandlung den Großteil der enthaltenen Glucose freizusetzen. Durch die Nutzung der anfallenden Reststoffe nach der enzymatischen Hydrolyse konnten 377 NL Biogas kg oTS gewonnen werden.

Im letzten Schritt erfolgte die Nutzung der enzymatischen Hydrolysate zur Produktion des Biopolymers PHB durch *Cupriavidus necator DSM 545*. Hier war es möglich PHB-Ausbeuten von 40 % nach 72 h bei 30 °C zu erreichen. Dieses konnte durch Zugabe von Spurenelementen und einer Stickstoffquelle erreicht werden.

Stichworte: Nachwachsende Rohstoffe, Weizenstroh, Vorbehandlung, Thermodruckhydrolyse, Enzyme, Biopolymere, Polyhydroxybuttersäure, *Cupriavidus necator*

1. Einleitung

Nach Berechnungen der UNO (United Nations Organization) wird die Weltbevölkerung im Jahr 2015 um 78 Millionen Menschen pro Jahr zunehmen (*UNO 2012*). Damit steigt auch der Bedarf an Energie. Im *Annual Energy Outlook 2013*, einer jährlich erscheinenden Veröffentlichung der U.S. Energy Information Administration (EIA) wird eine Steigerung des Energiebedarfs von 2010 bis 2040 um 56 % prognostiziert. So soll der Energieverbrauch von 524 Milliarden British thermal units (btu) auf 630 Milliarden btu im Jahr 2020 und 820 Milliarden btu 2040 steigen (*Conti and Holtberg 2013*). (Eine btu definiert die Wärmeenergie die benötigt wird um 1 britisches Pfund Wasser um 1 Grad Fahrenheit zu erwärmen. In SI-Einheiten ausgedrückt entspricht 1 btu gleich 1055,1 Joule). Gleichzeitig erreicht der CO₂-Ausstoß hinsichtlich der Folgen für das Klima und die Umwelt ein kritisches Maß. So überschritt im Jahr 2013 an einer Messstation der amerikanischen Ozean- und Atmosphärenbehörde (NOAA) auf Hawaii die Kohlendioxid-Konzentration in der Atmosphäre den Wert von 400 ppm (parts per million). Dieses Niveau wurde zuletzt während des Zeitalters des Pliozäns vor 2,58 Mio. Jahren erreicht (*NAOO 2013*). Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, Alternativen zu den bisher vorzugsweise genutzten fossilen Brennstoffen wie z.B. Erdöl zu finden, welche den stetig wachsenden Bedarf an Energie befriedigen und gleichzeitig möglichst CO₂-neutral sind.

Nachwachsende Rohstoffe besitzen in dem Zusammenhang ein großes Potential im Hinblick auf eine stoffliche und energetische Nutzung als Alternative zu den fossilen Brennstoffen. So wurden im Jahr 2011 weltweit über 85 Millionen Tonnen Ethanol als Biokraftstoff auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen produziert (*Lichts 2011; Lichts 2012*). Auch der Markt für andere chemische Produkte aus nachwachsenden Rohstoffen wächst. Nach Dornburg et al. (2008) könnten bis zum Jahr 2050 38 % der petrobasierten organischen Chemikalien durch biobasierte ersetzt werden. Eine wichtige Rolle nehmen hierbei Kunststoffe auf Basis von Biopolymeren ein. Langfristiges Ziel ist es, die klassischen petrobasierten Polymere wie z.B. Polyethylen oder Polypropylen durch biobasierte Kunststoffe zu ersetzen. Eine Reihe von verschiedenen Biokunststoffen kommt hierfür in Frage. Neben den klassischen Biopolymeren wie PLA (Polylactidacid, Biopolymere auf Basis von Milchsäure) oder Stärkeblends rücken auch andere Biopolymere wieder in den Fokus der Aufmerksamkeit. Hier wäre vor allem die Gruppe der Polyhydroxyalkanoate (PHA) wie z.B. Polyhydroxybuttersäure (PHB) zu nennen (*Endres and Siebert-Raths 2009*). Bereits in den 1980er Jahren wurde diese PHAs industriell im kleineren Maßstab hergestellt. Allerdings ging durch den sinkenden Erdölpreis

Ende der 80er Jahre das Interesse wieder verloren (*Endres and Siebert-Raths 2009*). Durch den erneut steigenden Erdölpreis und ein gestiegenes ökologisches Bewusstsein in den letzten Jahren nimmt das Interesse an Biopolymeren und speziell an PHB bzw. PHAs aber wieder zu. Im Vergleich zu anderen Biopolymeren ermöglicht PHB gute Produkteigenschaften wie z.B. hohe Temperaturstabilität und wäre auch in Bereichen einsetzbar, welche für PLA (z.B. Hochtemperaturbereich) nicht ohne weitere möglich sind (*Steinbuechel 1992*).

Aktuell wird für die Produktion von Bioethanol oder anderen chemische Produkten fast ausschließlich Stärke oder Zuckerbagasse als nachwachsende Rohstoffe eingesetzt (*Schmer et al. 2006*). Vor allem die Nutzung von Stärke ist problematisch. In den USA wurden im Jahr 2010 knapp 40 % der Maisernte für die Produktion von Bioethanol verwendet. Als Futtermittel hingegen wurden nur noch knapp 36 %, von ehemals 84 % im Jahr 1960 eingesetzt (*Lichts 2012*). Dies führt zu einer kontroversen Diskussion über die Nutzung von Maisstärke als nachwachsender Rohstoff wegen der starken Konkurrenz zur Nahrungsmittel-Produktion. (*Tilman et al. 2009*). Auch die verstärkte Nutzung von Zuckerbagasse in Südamerika ist problematisch, da die Landnutzung ebenfalls in Konkurrenz zur Lebensmittelproduktion steht oder ökologische Schäden wie verstärktes Abholzen von Wäldern zur Folge hat (*Azar and Larson 2000*). Diese Problematik wird sich in Zukunft noch verschärfen. Um die Situation zu entschärfen und den zusätzlichen Bedarf an nachwachsenden Rohstoffen decken zu können, sind Alternativen notwendig. Die Nutzung von Lignocellulose kann hierbei eine zentrale Rolle spielen (*Schmer et al. 2006*). Weltweit werden jedes Jahr über 200 Milliarden t an Lignocellulose durch Photosynthese gebildet (*Ragauskas et al. 2006*). Auch wenn nur ein Bruchteil der Menge für einen Nutzung als Rohstoff zur Verfügung stehen würde, so ist das Potential trotzdem gewaltig. Als potentiell nutzbare Biomasse wären hier vor allem die anfallenden Ernterückstände wie z.B. Weizen- oder Reisstroh zu nennen. Nach einer Studie von Kim et al. (2004) ist von 1,5 Pg (Petagramm) Trockenmasse pro Jahr die auszugehen (Erntereste von Mais, Weizen, Reis, Malz, Hafer, Sorghum und Zuckerrohr). Hieraus ergäbe sich ein theoretisches Potential von 442 GL (Gigaliter) Bioethanol pro Jahr (basierend auf dem heutigem technologischem Stand). Auch in Deutschland ist ein Potential an Ernterückständen vorhanden. So fallen jedes Jahr fast 21 Millionen t an Weizenstroh an (*Kaltschmitt et al. 2003*).

Wie die Maisstärke so enthält auch Lignocellulose große Mengen an verwertbaren Zuckern. Hauptsächlich sind das Glucose und Xylose (*C. Wyman 2005*). Allerdings ist die Gewinnung und Nutzbarmachung der Zucker im Vergleich deutlich schwieriger. So lässt sich Maisstärke im Vergleich zur Lignocellulose relativ leicht verarbeiten. Meistens ist eine enzymatische

Spaltung der Stärke ausreichend, wodurch die anfallenden Verarbeitungskosten relativ niedrig sind (*Ward et al. 1995*). Dieses wirkt sich vor allem auf den Preis für den produzierten Bioethanol aus. So lag der Preis für 1 Liter Bioethanol auf Basis von Maisstärke im Jahr 2006 bei 0,48 \$. Durch Nutzung von Lignocellulose als Basis steigt der Preis auf 0,7 – 1,10 \$ L⁻¹ an. Der genaue Preis hängt hierbei u.a. von den Kosten für die Vorbehandlung der Biomasse und den Enzymkosten ab (*McAloon et al. 2000; Hill et al. 2006*). Im Gegensatz zur Stärke muss die Lignocellulose vor der enzymatischen Verzuckerung zusätzlich vorbehandelt werden, damit im Anschluss eine effektive Verzuckerung möglich ist. Die hohen Kosten dafür sind der Grund für die Bevorzugung der Maisstärke bei der heutigen Produktion von Bioethanol. Im Laufe der letzten Jahre hat sich die Kostenlage verbessert. Vor allem durch die Einführung neuer leistungsfähigerer und günstigerer glycolytischer Enzyme sind die Produktionskosten weiter gefallen. Eine kommerzielle Bioethanol-Herstellung auf Basis von Lignocellulose könnte so bald möglich sein (*DuPont 2012; Novozymes 2013*).

Trotz der verbesserten Kostenlage durch die Einführung neuer kostengünstiger Enzyme, bleibt eine Vorbehandlung der Biomasse unerlässlich (*Brodeur et al. 2011b*). Diese Vorbehandlung kann bis zu 1/3 der Kosten bei der Ethanol-Herstellung ausmachen (*Wyman 1999*). Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, entsprechende Vorbehandlungsmethoden zu entwickeln und etablieren die auch im großtechnischen Maßstab eine effektive und günstige Vorbehandlung gewährleisten, um in der anschließenden enzymatischen Hydrolyse die enthaltenen Zucker freizusetzen. Eine Vielzahl an Vorbehandlungsmethoden stehen hier zur Verfügung, allerdings wurden diese Verfahren häufig nur im Labormaßstab durchgeführt (*Brodeur et al. 2011a*). Auch wurde das Weizenstroh bei fast allen bekannten Studien vor der eigentlichen Behandlung mechanisch zerkleinert. Hierfür ist eine beträchtliche Menge an Energie notwendig. In einer Studie der NREL wurden bei der Ethanol-Herstellung auf Basis von Weizenstroh knapp 1/3 der gesamten Prozessenergie für die Zerkleinerung des Strohs aufgewendet (*Selig et al. 2008*). Dieses verursacht einen großen Teil der benötigten Kosten und macht den Prozess häufig unwirtschaftlich (*Talebnia et al. 2010*). Trotz Verzicht auf eine weitestgehend mechanische Zerkleinerung des Weizenstrohs wird durch die Vorbehandlung Energie verbraucht. Eine Möglichkeit elektrische Energie einzusparen ist die Nutzung der anfallenden Reststoffe nach der enzymatischen Behandlung für die Gewinnung von Biogas. Über die Verbrennung in einem BHKW (Blockheizkraftwerk) lässt sich neben elektrischer Energie auch thermische Energie bereitstellen, die für den Prozess der Vorbehandlung genutzt werden kann (*FNR 2010*).

1.1 Verfügbare Weizenstrohmenge in Deutschland

Im folgenden Abschnitt wird das Potential an Weizenstroh in Deutschland näher beschrieben. Dies ist für die Nutzung als nachwachsender Rohstoff von zentraler Bedeutung. Weizenstroh gilt als landwirtschaftlicher Reststoff bzw. Rückstand und ist aus wissenschaftlich-technischer Sicht in der Norm über die festen Biobrennstoffe (EN 14588) definiert worden (*Normung 2010*). Hierunter werden Stoffe zusammengefasst die aus der Produktion, Ernte oder Verarbeitung im landwirtschaftlichen Bereich stammen. Bezogen auf die bisherige Nutzung besitzt vor allem das Getreidestroh in Deutschland, aber auch in Europa ein großes Potential als landwirtschaftlicher Reststoff. Über einen Zeitraum von 1999-2007 fielen in Deutschland durchschnittlich knapp 30 Mio. t. Getreidestroh jährlich an. Allerdings kann nicht die komplette Strohmenge genutzt werden, da ein Teil des anfallenden Strohs zur Düngung auf dem Feld verbleiben muss, um die Humusbilanz des Bodens konstant zu halten (*Zeller et al. 2012*). Bei der Berechnung der verfügbaren Getreidestrohmenge spielt somit die Menge, welche dem Bodenkreislauf erhalten bleiben muss, eine wichtige Rolle. Das Institut für Energie- und Umweltforschung in Heidelberg (IFEU) legt einen Durchschnittswert von 33 % zugrunde. Allerdings muss dieser den jeweiligen regionalen Bodengegebenheiten angepasst werden (*Münch 2008*).

1.2 Nutzung von Weizenstroh als nachwachsender Rohstoff

Nachdem im vorherigen Abschnitt die potentiell zur Verfügung stehende Menge an Weizenstroh aufgezeigt wurde, soll in diesem Abschnitt die bisherige Verwendung von Weizenstroh in Deutschland näher erläutert werden. Die derzeitige Nutzung von Stroh als nachwachsender Rohstoff beschränkt sich, abgesehen von der Landwirtschaft, fast ausschließlich auf die energetische Verwertung. Ein Großteil des Strohs wird konventionell verbrannt, was allerdings zu erheblichen Emissionsproblemen führt (*T. Seidel 2012*). Nach einer Studie von Kaltschmitt et al. (2001) aus dem Jahr 2001 sind europaweit 11 Heizkraftwerke, 78 Fernwärmewerke und ca. 13.000 dezentrale Kleinanlagen bekannt, welche auf Basis von Stroh betrieben werden. Seit dieser letzten Erhebung sind jedoch kaum noch Anlagen hinzugekommen (*Kaltschmitt M 2001*). In Deutschland gibt es nur zwei größere Anlagen mit 1 MW, welche von der TLL (Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft) bei Jena (*Peisker 2007*) und der Landesgesellschaft Mecklenburg-Vorpommern GmbH in Gülzow betrieben werden (*E. Knüppel 2013*).

Ein völlig neues Konzept wird in einem gemeinsamen Projekt des Forschungszentrums Karlsruhe und dem BFH-Institut für Holzchemie in Hamburg getestet (*Weirich 2012*). Die Biomasse wird dabei regional gesammelt und durch Schnellpyrolyse verflüssigt. Das entstehende Pyrolysegas wird verbrannt und für den Betrieb der Anlage genutzt. Die darüber hinaus entstehenden Pyrolyseöle und der gemahlene Pyrolysekoks werden zu einem Slurry vermischt und zu einer zentralen Flugstrom-Druckvergasungsanlage gebracht und dort zu Synthesegas verarbeitet. Das Synthesegas kann zu Methanol umgewandelt werden, welches direkt als Treibstoff genutzt oder über die Verwendung von Zeolith-Katalysatoren in Grundchemikalien umgewandelt werden kann (*Weirich 2012*). Eine wirtschaftliche Nutzung ist allerdings schwierig, da die Umsetzung nur in Form von Großanlagen möglich ist, was einerseits eine hohe Investition (1,3 Mrd. € Basisinvestition) voraussetzt und andererseits einen enormen Flächenbedarf erfordert um genügend Biomasse zur Verfügung zu stellen.

Eine weitere Möglichkeit der Strohnutzung stellt die direkte Verwertung in einer Biogasanlage zur Herstellung von Biogas dar. Die Angaben zum spezifischen Gasertrag variieren in der Literatur zwischen $0,4 - 0,6 \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1} \text{ oTS}$ (*G. Reinhold 2012*). Problematisch ist, dass Lignin oder lignininkrustrierte Cellulose nur sehr langsam oder unvollständig vergärt werden kann. Somit steigen die Verweilzeiten, was für eine wirtschaftliche Nutzung problematisch ist. Eine Alternative ist die thermische Vorbehandlung des Weizenstrohs. Hier am PFI konnte durch einen vorherigen hydrothermalen Aufschluss des Strohs der Biogasertrag enorm gesteigert werden (*Pacan B and Dröge S. 2010*)

Weltweit gibt es Anstrengungen, Lignocellulose wie das Weizenstroh als Rohstoff für die Herstellung von Bioethanol einzusetzen. Im Vergleich zu Bioethanol auf Basis von Maisstärke ist dieser allerdings wirtschaftlich noch nicht einsetzbar. So kann Bioethanol auf Basis von Maisstärke zu einem Preis von knapp 0.48 \$ pro „Energy Equivalent Liter (EEL)“ produziert werden. Wird Lignocellulose als Rohstoff eingesetzt schwanken die erzielten Preise zwischen 0,70 US\$ - 1,10 US\$ (*Hill et al. 2006*) Vor allem die Vorbehandlung und der Einsatz von Enzymen für die Spaltung der Zucker macht einen großen Teil der Kosten aus (*C. Wyman 2005*). In Deutschland wurde im Jahr 2012 von der Firma Clariant AG eine Demonstrationsanlage zur Herstellung von Bioethanol auf Strohbasis eröffnet. In dieser Anlage sollen jährlich 4.500 t Weizenstroh zu 1.000 t Bioethanol verarbeitet werden (*BMBF 2012*). Eine kommerzielle Nutzung ist heute allerdings noch nicht möglich, auch wenn dank großer Fortschritte bei den Enzymen die Kosten weiter gesenkt werden konnten (*DuPont 2012; Novozymes 2013*).

1.3 Zusammensetzung des Weizenstrohs

Für die Entwicklung einer effektiven Vorbehandlungsmethode ist der Aufbau des Weizenstrohs sehr wichtig. Dieser hat Einfluss auf die zu erzielenden Zuckerausbeuten nach der enzymatischen Hydrolyse des vorbehandelten Weizenstrohs. Daher werden im folgenden Abschnitt die einzelnen Bestandteile des Weizenstrohs näher erläutert. Weizenstroh besteht zum größten Teil aus der Lignocellulose. Die jährliche Reproduktionsleistung beträgt ca. 200 Milliarden Tonnen (*Ragauskas et al. 2006*). Es erfüllt als Stützgerüst eine wichtige Aufgabe in der Pflanzenwelt. Wie alle Arten von Lignocellulose besteht auch das Weizenstroh aus den drei Hauptkomponenten Hemicellulose, Cellulose und Lignin (*Herder 2003*). Abb. 1.1 zeigt den Aufbau von Lignocellulose mit den drei Hauptbestandteilen Cellulose, Hemicellulose und Lignin.

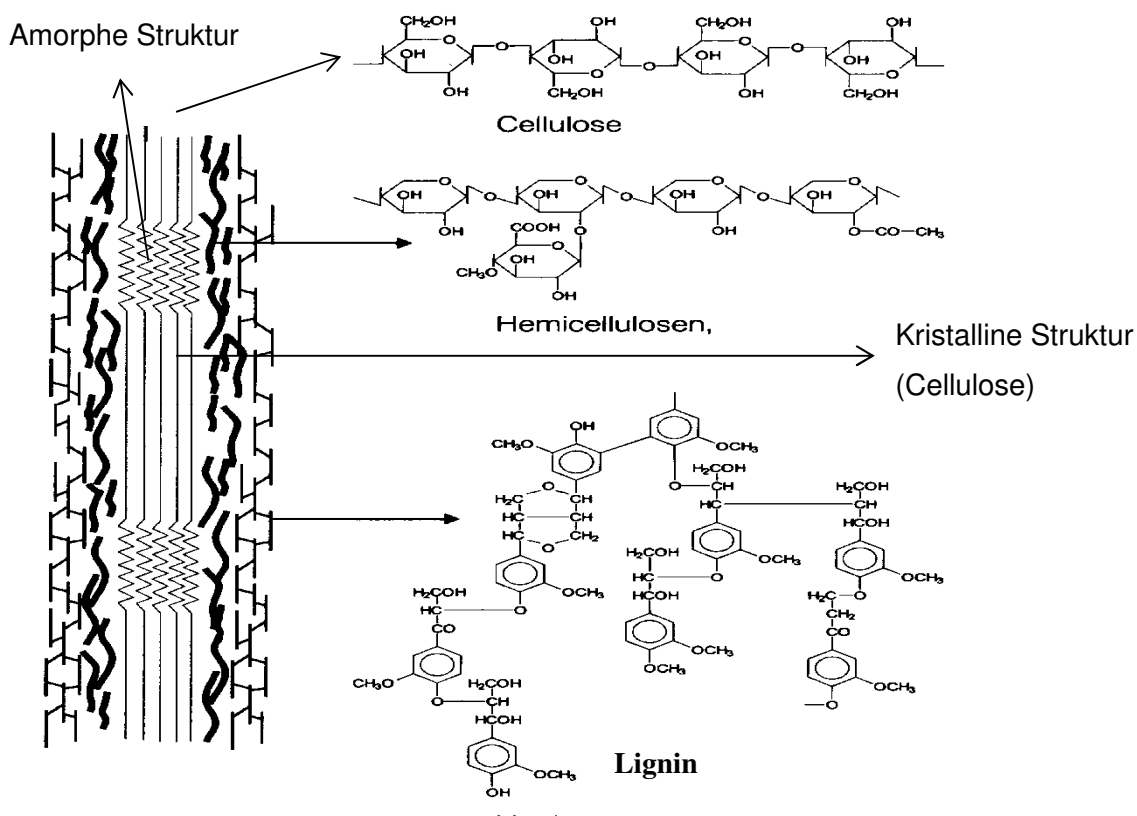


Abb. 1.1: Aufbau von Lignocellulose mit den drei Hauptbestandteilen Cellulose, Hemicellulose und Lignin (*Fritsche 2002*).

Abhängig von der Pflanzenart unterscheidet sich die genaue Zusammensetzung der Lignocellulose. Hölzer, vor allem bei Nadelbäumen haben einen deutlichen höheren Lignin-

Anteil als z.B. Weizenstroh (*Wagenführ 2008*). Wachstumsspezifische Faktoren wie Standort und Witterungsbedingungen haben ebenfalls einen Einfluss auf die genaue Zusammensetzung der Pflanze (*Douglas et al. 1980*). Durch Wärme wird die Bildung von Lignin gefördert, was den hohen Ligninanteil bei Tropenhölzern erklärt (*Eberswalde 2010*). Weizenstroh enthält in der Regel 35 – 45 % Cellulose, 20 – 30 % Hemicellulose und 8 – 15 % Lignin (*Gould 1984; Schmidt and Thomsen 1998; Sun et al. 2004*)

1.3.1 Cellulose

Cellulose (lat. *Cellula* „kleine Zelle“) ist ein lineares Homopolymer. Chemisch betrachtet handelt es sich um ein lineares Polymer von β -(1 \rightarrow 4)-verbundenen D-Glucopyranose-Monomer-Einheiten (*C. Wyman 2005*). Zwei benachbarte Glucose-Moleküle sind hierbei jeweils am C₁ und C₄-Atom über eine glykosidische Bindung miteinander verknüpft. Das Präfix β definiert die anomere Konfiguration der Bindung. Neben der β -Konfiguration existiert auch ein α -Form, u.a. bei der Bindung von zwei Glucose-Molekülen zu Stärke über eine α -(1 \rightarrow 4)-Bindung. Die Position der anomeren Kohlenstoffatome im Vergleich zur CH₂-OH-Gruppe am C₅-Atom entscheidet hierbei über eine α oder β -Verbindung (*McNaught 1996*). In Abb. 1.2 ist der strukturelle Aufbau der Cellulose dargestellt. Im oberen Teil ist die chemische Formel und im unteren Teil die räumliche Anordnung der Glucose-Monomere dargestellt.

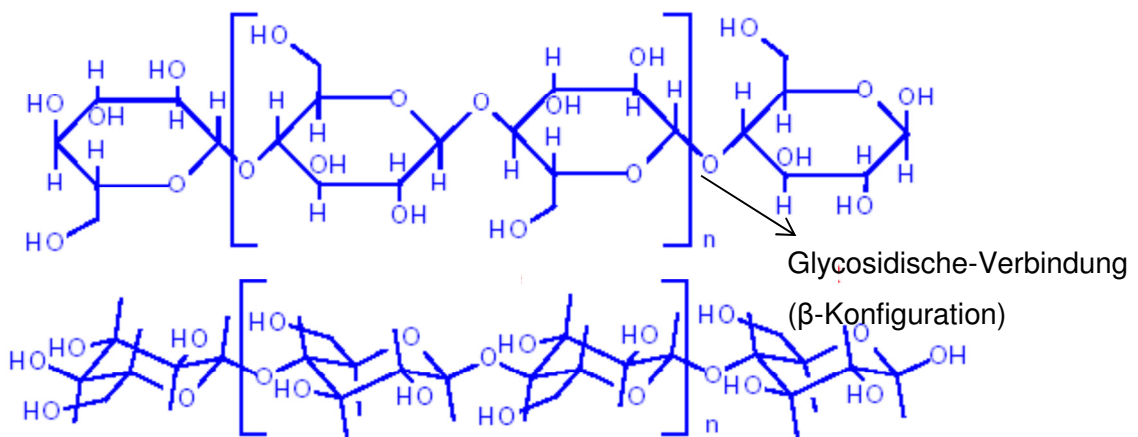


Abb. 1.2: Aufbau der Cellulose-Ketten. Oben ist die chemische Struktur dargestellt, während unten die räumliche Anordnung abgebildet ist. Die einzelnen Glucose-Monomere sind über eine β -glycosidische Bindung verbunden (*Gruber 2000*).

Die Anzahl der Glucose-Monomere im Polymer entscheidet über den Polymerisationsgrad

der Cellulose. Dieser ist von Pflanze zu Pflanze unterschiedlich. Zellen der primären Zellwand von Pflanzen haben in der Regel einen Polymerisationsgrad zwischen 5.000 – 7.500 Glucose-Monomere. Cellulose aus Holz besitzt zwischen 10.000 und 15.000 Einheiten (O'Sullivan 1997).

Die einzelnen Polymere der Cellulose sind in Mikrofasern (Mikrofibrillen) angeordnet, welche durch Wasserstoff-Bindungen stabilisiert werden. Diese Mikrofibrillen weisen eine Dicke von ungefähr 10 – 25 nm auf. 50 -100 Mikrofibrillen haben einen Durchmesser von ungefähr 0,5 µm und eine Länge von 4 µm. Die Cellulose-Mikrofibrillen liegen häufig als Bündel von Mikrofibrillen vor. Diese Bündel können in zwei verschiedenen Formen vorliegen. Einerseits als geordnete kristalline Struktur (Micellen) oder als nichtkristalline ungeordnete amorphe Struktur. Diese Strukturen können sich untereinander abwechseln (Gruber 2000). Im Gegensatz zu den amorphen Strukturen ist ein Eindringen von Wasser oder anderen chemischen Substanzen in die kristallinen Strukturen kaum möglich. Glucose ist mengenmäßig das Monosaccharid mit dem höchsten Anteil in der Cellulose. Mannose und Galactose können ebenfalls ein Bestandteil der Cellulose sein, wenn auch nur in geringen Mengen. Die Cellulose verleiht der Zelle Formstabilität. Sie kommt in allen höheren Pflanzen vor und macht die Hauptmasse aller organischen Verbindungen auf der Erde aus (Rotach 2001).

1.3.2 Hemicellulose

Hemicellulose verstärkt die Struktur der Pflanze und sorgt zusammen mit dem Pektin für die Stabilität der Zellwand. Der Name Hemicellulose (*hemi* = griechisch für *halb*-) leitet sich von der ursprünglichen, aber unrichtigen Annahme ab, es würde sich um eine Vorstufe der Cellulose handeln (Fresenius and Görlitzer 1991). Es lagert sich vor allem an der Oberfläche der Cellulose an.

Wie die Cellulose so ist auch die Hemicellulose als Polymer mit unterschiedlichen Kettenlängen aufgebaut. Während bei der Cellulose fast ausschließlich Glucane auftreten, kann Hemicellulose aus Xylanen, Glucanen, Mannanen und Galactanen aufgebaut sein. Den Hauptanteil machen allerdings die Xylane aus. Xylane bestehen hauptsächlich aus dem Monosaccharid D-Xylose, können aber auch andere Zucker-Monomer-Einheiten wie z.B. D-Glucose, D-Mannose, D-Arabinose oder D-Galactose enthalten. Diese Variation machen die Xylan-Moleküle sehr unterschiedlich (Hill 2005). Abb. 1.3 zeigt beispielhaft den Aufbau eines Xylans. Neben der Hauptkette sind u.a. Uronsäure und eine Acetyl-Seitenkette vorhanden.

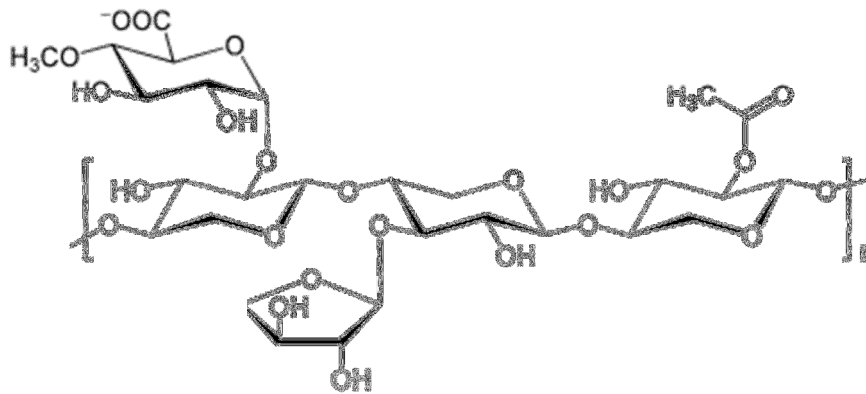


Abb. 1.3: Beispiel eines Xylans mit verschiedenen Seitenketten (Yikrazuul 2009).

Im Vergleich zur Cellulose hat die Hemicellulose mit maximal 200 Monomeren einen viel niedrigeren Polymerisationsgrad. Wie in Abb. 1.3 zu sehen, bildet die Hemicellulose Seitenketten aus, welche beispielsweise andere Monosaccharide oder Uronsäuren wie D-Glucuronsäuren oder Methyl-D-Glucuronsäuren enthalten können (Polizeli et al. 2005). Aufgrund der vielfältigen Verzweigung mit Seitenketten liegt die Hemicellulose ausschließlich in einer amorphen ungeordneten Struktur vor. Kristalline Strukturen treten praktisch nicht auf, da sich diese durch die Verzweigungen nicht ausbilden können (Rotach 2001; Weiler and Nover 2008). Durch die amorphen Strukturen und die vielen OH-Gruppen ist die Hemicellulose sehr zugänglich für Wasser und quillt in Folge dessen sehr leicht auf. In saurer Lösung ist Hemicellulose daher leicht löslich und lässt sich durch eine kurzzeitige Extraktion in saurer heißer Lösung aus der Zellwand lösen (Hill 2005).

Neben der stabilitätsgebenden Funktion, spielt Hemicellulose auch eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit dem dritten wichtigen Bestandteil der Lignocellulose, dem Lignin. Durch die Seitenketten der Xylane wird die Verbindung mit Lignin über Ester- und oder kovalente Bindungen hergestellt (Eriksson et al. 1980). Die Seitengruppen der Hemicellulose beeinflussen darüber hinaus die physiologischen Eigenschaften und Abbaubarkeit von gelöster oder in einer Matrix eingebetteten Hemicellulose (C. Wyman 2005). Acetylierungen senken die Löslichkeit in Wasser und verschlechtern auch die enzymatische Abbaubarkeit der Polysaccharide (Biely et al. 1985). Nach der Cellulose ist die Hemicellulose die zweithäufigste organische Verbindung auf der Erde (Polizeli et al. 2005).

1.3.3 Lignin

Neben der Cellulose und der Hemicellulose ist das Lignin (lat. *Lignum* „Holz“) der dritte wichtige Bestandteil der Lignocellulose. Das Lignin ist ein aus Phenylpropan-Einheiten aufgebautes amorphes Polymer, welches für die Druckfestigkeit der Lignocellulose von zentraler Bedeutung ist. Durch die Durchdringung der Lignocellulose mit dem Lignin wird die Stabilität der Pflanzen erreicht. Darüber hinaus schützt es die Zelle vor dem Eindringen von Wasser (Peter Sitte et al. 2002). Der Ligninanteil hängt stark von den Wuchsbedingungen ab, so wird die Ligninbildung durch Wärme gefördert (Eberswalde 2010). Niedere Pflanzen enthalten in der Regel kein Lignin (Rotach 2000). Chemisch betrachtet ist Lignin kein einheitlicher Stoff, vielmehr eine dicht vernetzte amorphe Masse. Durch die vielen aromatischen Verbindungen ist es unlöslich in Wasser. In Abb. 1.4 sind die 3 Grundbausteine (Phenylpropaneinheiten) aufgeführt, aus denen die Pflanzen das Lignin synthetisieren (Rotach 2000). Zusätzlich ist ein Beispiel einer Ligninstruktur abgebildet.

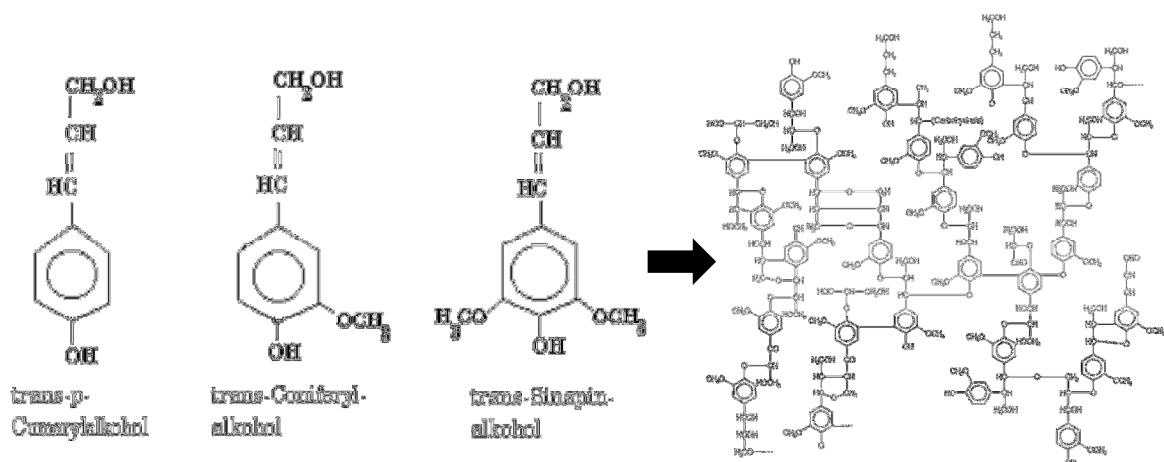


Abb. 1.4: Grundbausteine der Ligninsynthese in Pflanzen (Gruber 2000).

1.3.4 Akzessorische Inhaltsstoffe der Lignocellulose

Neben den zuvor genannten Bestandteilen Cellulose, Hemicellulose, Lignin und Pektin enthält das Weizenstroh noch eine Reihe weitere niedermolekulare Verbindungen wie z.B. verschiedene Extraktstoffe. Diese sind z.B. Wachse, Fette, phenolische Verbindungen oder Terpene. Fette und Wachse schützen die Zelle vor dem Eindringen von Wasser (Sluiter et al. 2008c). Auch hier schwankt der Anteil in Abhängigkeit von der Art der Pflanze. Einen relativ hohen Anteil macht die Rohasche aus, welche hauptsächlich aus den anorganischen Rest-

bestandteilen besteht und bis zu 7 % (w/w) der Trockenmasse ausmachen kann (*Sluiter et al. 2008a*). Diese besteht in der Regel aus Kalium-, Calcium- und Magnesiumverbindungen und in geringen Mengen auch Spurenelementen (*Rotach 2000*).

1.4 Vorbehandlung von Lignocellulose zur Gewinnung der Zucker

Im vorherigen Abschnitt wurde auf die Zusammensetzung des Weizenstrohs eingegangen. Das Verständnis des Aufbaus der Lignocellulose ist von zentraler Bedeutung für das Verständnis der Vorbehandlung. Dieses ist notwendig, da der Verbund aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin eine effektive Nutzung der Lignocellulose ohne vorherige Vorbehandlung erschwert. Die Komplexität der chemischen und physikalischen Struktur der Lignocellulose schützt die Pflanze in der Natur vor mikrobiellen Abbau durch ausgeschleuste cellulolytische Enzyme (*Wood 1985; C. Wyman 2005*). Vor allem die kristallinen Strukturen der Cellulose verhindern das Eindringen von Wasser und anderen Chemikalien, wodurch die enzymatische Spaltung erschwert wird (*O'Sullivan 1997; Gruber 2000*). Andere natürliche Polymere wie Stärke oder Hemicellulose quellen durch das Eindringen von Wasser auf und können somit leichter enzymatisch gespalten werden. Um die enzymatische Spaltung der Cellulose zu begünstigen und gleichzeitig die Hemicellulose zu lösen, muss die Lignocellulose vorbehandelt werden. Hier stehen verschiedene Methoden zur Verfügung.

In Tab. 1.1 sind die verschiedenen zur Verfügung stehenden Vorbehandlungsmethoden nach dem Wirkprinzip zusammengefasst. Methodisch wird hier zwischen der mechanischen (physikalischen), chemisch-thermischen und biologischen Vorbehandlung unterschieden. Die physikalische Vorbehandlungsmethode umfassen hauptsächlich die Zerkleinerung der Biomasse in einer Hammermühle oder Schneidmühle. Die biologische Vorbehandlungsmethode beinhaltet hauptsächlich die Vorbehandlung mit Enzymen (*Brodeur et al. 2011a*). Beim chemisch-thermischen Aufschluss werden Chemikalien, hauptsächlich Säuren und Basen in konzentrierter oder verdünnter Form in Kombination mit höheren Temperaturen und Drücken eingesetzt.

Tab. 1.1: Übersicht verschiedener Vorbehandlungsmethoden zur Behandlung von Biomassen mit Vor- und Nachteilen.

Wirkprinzip	Verfahren	Vorteile	Nachteile
Physikalisch	Zerkleinerung Scherung Druckentspannung	Kleinere Partikelgröße erhöht Aufschlusseffizienz	Hoher Energiebedarf, Verschleiß
Biologisch	Enzyme Hydrolysestufe	Milde Reaktionsbedingungen	Hohe Enzymkosten, Sehr ineffizient
Chemisch-thermisch	Säuren und Laugen bei hohen Temperaturen und Drücken	Gute Aufschlussergebnisse	Hoher Chemikalieneinsatz, toxische Abbauprodukte

Einzelnen eingesetzt sind die verschiedenen Verfahren häufig nur teilweise effektiv. Dies hat zur Folge, dass die Verfahren häufig in Kombination eingesetzt werden.

1.4.1 Physikalische Vorbehandlung

Die physikalische Vorbehandlung von Biomasse beinhaltet die Zerkleinerung der Biomasse in einer Schneidmühle oder Hammermühle. Häufig werden beide Verfahren nacheinander eingesetzt (*Bitra et al. 2009*). Durch Verringerung der Partikelgröße nimmt die Effektivität der enzymatischen Hydrolyse zu, allerdings steigt mit zunehmender Verringerung der Partikelgröße auch der Energieaufwand. Eine Zerkleinerung in der Hammermühle auf eine Partikelgröße von 0,8 oder 3,2 mm benötigt 11,4 bzw. 51,6 kWh t⁻¹ (*Talebnia et al. 2010*). Bei sehr kleinen Partikelgrößen übertrifft dieser Energieaufwand den Energiegehalt der Biomasse, was eine wirtschaftliche Nutzung problematisch macht. In einer Studie der NREL (National Renewable Energy Laboratory, Colorado, USA) zur Herstellung von Bioethanol aus Lignocellulose wurde ein Drittel der benötigten Gesamtenergie des Herstellungsprozesses für die Zerkleinerung der Biomasse benötigt (*Selig et al. 2008*).

1.4.2 Biologische Vorbehandlung

Bei der biologischen Vorbehandlung von Biomasse werden hauptsächlich Mikroorganismen, im besonderen Pilze, eingesetzt um Lignine, Hemicellulose und Cellulose abzubauen (*Zhang*

et al. 2007). Die Cellulose bleibt nahezu vollständig erhalten. Die biologische Vorbehandlung wird unter sehr milden Bedingungen durchgeführt, was im Vergleich zu vielen chemischen Methoden ein großer Vorteil ist. Allerdings ist die Effektivität des Aufschlusses nur sehr gering und die benötigte Zeit im Vergleich zu anderen Methoden ist sehr hoch (*Sun and Cheng 2002a; Taherzadeh and Karimi 2008*). Daher konnten sich die biologischen Vorbehandlungen nicht durchsetzen und werden nur selten eingesetzt.

1.4.3 Chemisch-thermische Vorbehandlungsmethoden

Die chemisch-thermische Vorbehandlung ist ein weit verbreitetes Verfahren zur Behandlung von Biomasse. Verschiedene Verfahren stehen hier zur Auswahl. Bei einer Reihe von Verfahren wird auf den Einsatz von Chemikalien verzichtet. Hier wären zu nennen das LHW (Liquid-Hot-Water)- und SE (Steam-Explosion)-Verfahren (*Brodeur et al. 2011b*). Beim LHW-Verfahren werden Temperaturen zwischen 160 °C und 240 °C eingesetzt, um die Hemicellulose aus der Lignocellulose zu entfernen. Bei Temperaturen bis 220 °C bleiben die Cellulose und das Lignin zurück. Um auch die Cellulose zu lösen sind höhere Temperaturen notwendig (*Ballesteros et al. 2006*). Das SE-Verfahren ist dem LHW-Verfahren sehr ähnlich, nur dass hierbei durch eine schnelle Druckentspannung eine zusätzliche Schädigung der Faserstruktur stattfindet (*Viola et al. 2008*). Durch den Verzicht auf Chemikalien bei beiden Verfahren sind Temperaturen über 210 °C notwendig.

Der Einsatz von Chemikalien verringert die notwendigen Temperaturen bei der Vorbehandlung von Biomasse (*Brodeur et al. 2011a*). So können durch die Verwendung von alkalischen Substanzen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid oder Kalk die Aufschlusstemperaturen auf nur noch 80 °C gesenkt werden. Allerdings sind lange Behandlungszeiten bis zu 144 h notwendig, um eine ausreichende Vorbehandlung zu gewährleisten. Außerdem muss der Ansatz ständig gerührt werden (*Sun and Cheng 2002a*). Um die Behandlungszeiten zu senken, lässt sich der Einsatz von alkalischen Substanzen mit dem oben vorgestellten SE-Verfahren kombinieren. Bei dem AFEX-Verfahren wird zusätzlich eine Druckentspannung durchgeführt. Durch den Einsatz der alkalischen Substanzen lässt sich die Behandlungstemperatur senken (*Alizadeh et al. 2005; Chundawat et al. 2010*). Neben dem Einsatz von alkalischen Substanzen können auch sogenannte ionische Flüssigkeiten eingesetzt werden. Diese bestehen aus einem kleinen Anion und einem großen Kation. Durch den geringen Dampfdruck sind diese Flüssigkeiten am Ende des Prozesses zu 99 % wiederverwertbar. Trotzdem sind die Kosten für den Einsatz immer noch sehr hoch, so dass eine wirtschaftliche Nutzung nicht sinnvoll ist

(*Brodeur et al. 2011a*).

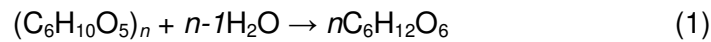
Im Gegensatz hierzu ist die chemisch-thermische Vorbehandlung (im Folgenden TDH genannt) mit verdünnten Säuren einer der State-of-the-Art Technik und wird sehr häufig eingesetzt (*Sun and Cheng 2002b; C. Wyman 2005; Brodeur et al. 2011a*). Durch die Verwendung von verdünnten Säuren als Katalysator können die Behandlungstemperaturen gesenkt werden. Hierbei werden vor allem mineralische Säuren wie Schwefelsäure, Salpetersäure oder Phosphorsäure eingesetzt. Die Säuremenge liegt in der Regel bei bis zu 2 % (v/v). Auf höhere Säure-Konzentrationen wird verzichtet, um Schäden durch Korrosion an der Anlage zu vermeiden (*Wyman 1999*). Die Behandlungszeit variiert zwischen wenigen Minuten und mehreren Stunden. Durch die Behandlung mit heißen Säuren wird die Hemicellulose aus der Lignocellulose extrahiert und in die entsprechenden Monomere gespalten (*Hill 2005*). Zusätzlich werden amorphe Bereiche der Cellulose gespalten und Teile des Lignins herausgelöst. Um Cellulose komplett mit verdünnter Säure zu spalten sind aber Temperaturen über 190 °C notwendig.

Da im Rahmen dieser Arbeit die thermisch-chemische Vorbehandlung in der TDH eingesetzt wurde, wird diese im Folgenden näher erläutert.

1.4.3.1 Stöchiometrie der sauren Hydrolyse

Die saure Hydrolyse von Cellulose und Hemicellulose lässt sich als eine Spaltung von größeren Ketten in kleinere Ketten beschreiben, welche am Schluss in die entsprechenden Zuckermonomere gespalten werden. Die Bedingungen für eine saure Hydrolyse von Cellulose und Hemicellulose sind allerdings unterschiedlich. Hemicellulose liegt ausschließlich in amorpher Form vor, was wiederum eine saure Hydrolyse bei moderateren Temperaturen möglich macht (*Heitz et al. 1991*). Die kristallinen Strukturen der Cellulose verhindern hingegen eine vollständige saure Hydrolyse in die Monomere bei moderaten Temperaturen. Hier werden vielmehr länger-kettige Glucose-Oligomere freigesetzt. Erst Temperaturen über 220 °C ermöglichen die vollständige Aufspaltung in die Monomere (*McParland et al. 1982*).

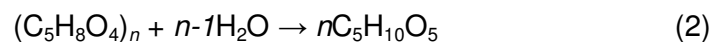
Bei der hydrothermalen Vorbehandlung von Cellulose und Hemicellulose durch die Reaktion von Wasser und Säure mit Glucan- oder Xylan-Molekülen werden die Ketten in einzelne Glucose- und Xylose-Monomere gespalten. Säuren wirken hierbei als Katalysator. Für die Spaltung der Cellulose ergibt sich folgende allgemeine Reaktionsgleichung



Gleichung 1: Stöchiometrische Reaktionsgleichung der Spaltung von Glucanen in Glucose-Monomeren durch saure Hydrolyse.

Durch die Reaktion vom Glucanen (162 Masseinheiten) mit Wasser (18 Masseinheiten) ergibt sich ein Glucose-Molekül mit 180 Masseneinheiten. Dies entspricht einem Massenzuwachs von 11,1 %. Für eine komplette Spaltung sind in der Regel Temperaturen von 220 °C und mehr notwendig (abhängig von der Konzentration an Säuren) (*Brodeur et al. 2011a*). Dies führt aber gleichzeitig zu einer verstärkten Bildung von Abbauprodukten wie Hydroxymethylfurfural (*Liu et al. 2004*).

Die Spaltung der Xylane durch die saure Hydrolyse mit Wasser verläuft ähnlich:

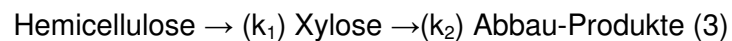


Gleichung 2: Stöchiometrische Reaktionsgleichung der Spaltung von Xylanen in Xylose-Monomeren durch saure Hydrolyse.

Mit einem $(C_5H_8O_4)_n$ bestehend aus n Arabinose (Arabinan) oder Xylose (Xylan) und $C_5H_{10}O_5$ als entsprechend korrespondierenden Pentose-Zucker. Zusätzlich werden bei der Spaltung auch enthaltene Seitenketten freigesetzt, die aber nicht weiter aufgeführt sind. Das molekulare Gewicht steigt von 132 Masseinheiten vor der Hydrolyse auf 150 Masseinheiten nach der Hydrolyse. Dies entspricht einem Zuwachs von 13,6%. Durch eine hydrothermale Vorbehandlung zwischen 100 – 200 °C mit verdünnter Säure lassen sich bis zu 90 % der Zucker aus der Hemicellulose freisetzen. Allerdings kommt es hierbei zu einem teilweisen Abbau der Zucker in Nebenprodukte wie z.B. Furfural (*Zeitsch 2000*). Reaktionen ohne Zugabe von Säure führen zu einer Freisetzung der Hemicellulose von maximal 65 %, wobei die Zucker häufig in Form von Oligomeren vorliegen. Der Abbau von Hemicellulose bewirkt eine gleichzeitige Freisetzung von Essigsäure (Seitenketten der Hemicellulose), welche die hydrolytische Reaktion bis zu einem gewissen Grad unterstützt (*Heitz et al. 1991*).

1.4.3.2 Freisetzung der Hemicellulose

Die meisten kinetischen Modelle zur Hydrolyse von Cellulose und Hemicellulose basieren auf Arbeiten von Saeman et al. (1945). Ursprünglich bezogen sich die Gleichungen nur auf die Hydrolyse von Cellulose (konkret die saure Hydrolyse von Douglasie (Tannenholz)), allerdings lassen sich die Aussagen auch auf die Hydrolyse von Hemicellulose übertragen. Da im Rahmen dieser Arbeit auf eine vollständige saure Hydrolyse der Cellulose verzichtet wurde, beschränkt sich die Beschreibung der Kinetik auf die Freisetzung der Hemicellulose. Die Hydrolyse von Hemicellulose kann als Reaktion erster Ordnung verstanden werden. Außerdem verläuft die Reaktion unter Zugabe von verdünnter Säure schnell genug, so dass die Bildung von Oligomeren zu vernachlässigen ist (Jacobsen and Wyman 2000). Somit lässt sich folgende Zweistufen-Reaktion aufstellen:



Gleichung 3: Zweistufen-Reaktion der sauren Hydrolyse von Hemicellulose mit k als Reaktionskonstante

Die Reaktionskonstante k_i lässt sich in Form der Arrhenius-Gleichung beschreiben und ist Temperaturabhängig:

$$k = k_0 * A * e^{\frac{-E_a}{R*T}}$$

Gleichung 4: Arrhenius-Gleichung zur Bestimmung der Reaktionskinetik in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur und Säure-Konzentration. Mit k als Reaktionskonstante, k_0 als präexponentieller Faktor, die Konzentration der Säure (A), Reaktionstemperatur (T) in Kelvin, universelle Gaskonstante R (8,314 J / K mol) und E_a als Aktivierungsenergie in J/ mol.

Hierbei ist k_0 der sogenannte präexponential Faktor (auch Frequenzfaktor genannt). Nach der Stoßtheorie (Map) entspricht dieser dem Produkt aus Stoßzahl Z und Orientierungsfaktor P , die in der betrachteten chemischen Reaktion eine maximale Geschwindigkeitskonstante ergäbe, wenn jede Begegnung der Reaktionspartner zum Reaktionsereignis führt (Bertelsmann-Lexikon 2012). Bei der Verwendung der Arrhenius-Gleichung spielt diese Konstante in der Regel keine Rolle. A ist die Konzentration an Säure (Gewicht), E_a ist die Aktivierungsenergie (in J mol⁻¹), R die universelle Gaskonstante (8,314 J K⁻¹ mol⁻¹) und T die

Temperatur (in Kelvin). Durch ein solches Model lassen sich maximale Ausbeuten zwischen 83 % und 95 % voraussagen (*Jacobsen and Wyman 2000*).

In einem Model von Overend und Chornet (*Overend et al. 1987*) werden die Behandlungstemperatur und -zeit im *Severity Factor* R_0 zusammengefasst. Dieser findet Anwendung bei der Behandlung von Hemicellulose mit Wasser oder Dampf, allerdings ohne Säurezugabe. R_0 wird wie folgt definiert:

$$R = t \times \exp\left(\frac{T-100}{14.75}\right)$$

Gleichung 5: Severity-Gleichung zum Verhältnis von Behandlungstemperatur und Zeit bei der Hydrolyse von Hemicellulose mit dem Severity Factor R und Temperatur T in Kelvin.

Hierbei ist t die Behandlungszeit in Minuten und T die Temperatur in Grad Celsius.

Die Freisetzung von Xylan aus der Hemicellulose aufgetragen gegen R_0 oder $\log R_0$ folgt immer demselben Muster für verschiedene Substrate und Temperaturen. Somit lässt sich bei der Vorbehandlung von Biomasse leichter ein Kompromiss zwischen Temperatur und Zeit abschätzen. Neben der Freisetzung der Xylane aus der Hemicellulose lässt sich über die *Severity-Gleichung* auch bis zu einem gewissen Grad die Freisetzung der Xylose abschätzen, auch wenn die Gleichung nur den Feststoffabbau erster Ordnung beschreibt. Auch hier erfolgt die Auftragung der freigesetzten Xylose gegen R_0 oder $\log R_0$.

Da eine reine thermische Vorbehandlung ohne die Zugabe von Säure nur einen unvollständigen Abbau der Hemicellulose zur Folge hat (*Heitz et al. 1991*), wird der *Severity-Gleichung* die Säure-Konzentration zugefügt. In Kombination mit dem Zucker-Rückgewinnungsfaktor C ergibt sich für verdünnte saure Hydrolysen (*Abatzoglov et al. 1986*):

$$C = [H^+] t \times \exp\left(\frac{T - 100}{14.75}\right)$$

Gleichung 6: Einbeziehung der Säure-Konzentration in die Severity-Gleichung zur Berechnung der Zuckerrückgewinnung C beim Hemicellulose Abbau mit der Säure-Konzentration H^+ und der Reaktionstemperatur T (in Kelvin).

H^+ ist hierbei die Wasserstoff-Ionen Konzentration. Alle anderen Parameter entsprechen denen in Gleichung 5.

1.4.3.3 Bildung von Nebenprodukten in der TDH

Die Spaltung der Hemicellulose ist eine Reaktion erster Ordnung. Bei hohen Behandlungstemperaturen ist die Reaktion allerdings mit der Freisetzung der Xylose nicht abgeschlossen. Vielmehr reagiert die Xylose (genauso wie die freiwerdende Glucose) weiter und bildet eine Reihe von Nebenprodukten. So entstehen durch die Konversion von Xylose und Glucose die beiden Furane Furfural und 5-Hydroxymethylfurfural (*Zeitsch 2000; Liu et al. 2004*). Furane stammen aus der Gruppe der Sauerstoffheterocyclen. Durch die Bildung von Furanen nehmen zum einen die Zuckerausbeuten ab, darüber hinaus hemmen diese das Wachstum von Mikroorganismen (*Palmqvist et al. 1999; Miller et al. 2009*). Furfural beispielsweise stört eine Reihe von enzymatischen Reaktionen im Energiestoffwechsel der Zelle (*Banerjee et al. 1981; Modig et al. 2002*). Die Konzentration, ab der Furfural toxisch wirkt, ist von Organismus zu Organismus verschieden. Hefen wie *Scheffersomyces stipitis* zeigen bereits kein Wachstum bei $0,5 \text{ g L}^{-1}$, während manche Bakterien bis zu 2 g L^{-1} tolerieren können (*Roberto et al. 1991*).

Neben der Bildung von Furfural und 5-HMF werden bei der Vorbehandlung von Lignocellulose in der TDH eine Reihe weiterer Nebenprodukte in Form von organischen Säuren gebildet, vor allem Essigsäure. Hierbei werden Acetylgruppen der Hemicellulose abgespalten und als Essigsäure freigesetzt (*Heitz et al. 1991*). Die Freisetzung der Essigsäure verstärkt zum einen die saure Hydrolyse in der TDH, auf der anderen Seite reagieren vor allem Hefen auf zu hohe Essigsäure-Konzentrationen sehr empfindlich (*Palmqvist et al. 1999*). Essigsäure diffundiert hierbei durch die Zellmembran und verändert den pH-Wert in der Zelle. Dies verändert die Zellaktivität und kann zum Absterben der Zelle führen (*Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000a*).

Neben den zuvor genannten Nebenprodukten wird bei der TDH von Lignocellulose auch eine

Reihe von verschiedenen phenolischen Verbindungen freigesetzt. Lignin als einer der drei Hauptbestandteile der Lignocellulose besteht aus einer Reihe von Phenylpropaneinheiten (siehe **Abschnitt 2.3.4**). Durch die Behandlung von Lignocellulose in der TDH werden Teile des Lignins als phenolische Verbindungen freigesetzt. In hohen Konzentrationen wirken phenolische Verbindungen inhibierend auf das Wachstum von Mikroorganismen (*Ximenes et al. 2010*). Hierbei gilt: je niedriger das Molekulargewicht der Verbindung, desto toxischer für die Zelle (*Mussatto and Roberto 2004*). Phenolische Verbindungen destabilisieren die Zellmembran, was deren Funktion als selektive Barriere stört (*Palmquist and Hahn-Hägerdal 2000b*). Selbst geringe Konzentrationen von $0,1 \text{ g L}^{-1}$ können unter Umständen schon letal für Mikroorganismen sein.

In Abb. 1.5 sind noch einmal die wichtigsten Nebenprodukte aufgelistet. Zusätzlich sind die chemischen Strukturen und die einzelnen Reaktionswege dargestellt. Hier sind vor allem die Xylose und die Glucose wichtig, da diese beiden Monomere die höchsten Anteile in der Lignocellulose ausmachen.

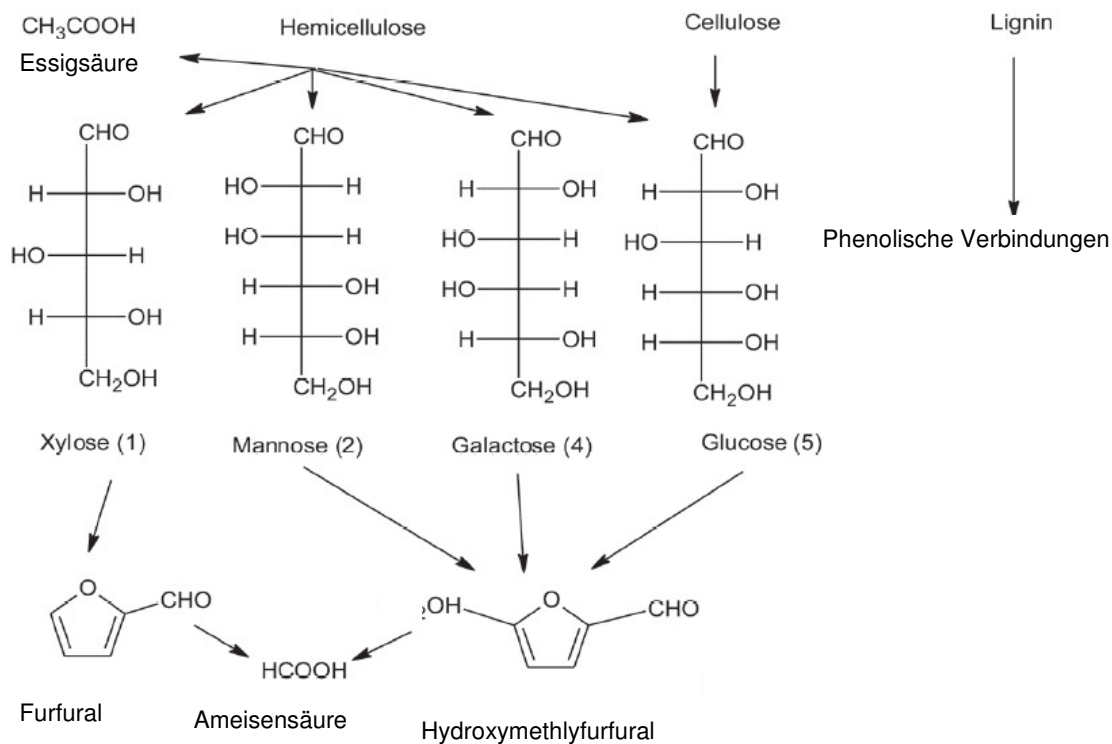


Abb. 1.5: Darstellung der wichtigsten Nebenprodukte bei der Vorbehandlung von Lignocellulose in der TDH (*Chandal AK 2011*).

Die organische Säure wie Ameisensäure tritt nur in geringen Mengen auf und sind in der Regel zu vernachlässigen.

1.5 Enzymatische Hydrolysen von lignifizierter Biomassen

Neben der Vorbehandlung des Weizenstrohs in der TDH ist die enzymatische Hydrolyse des vorbehandelten Weizenstrohs ein sehr wichtiger Prozessschritt, da hierbei die meisten enthaltenen Zucker freigesetzt werden. Hierbei spielen cellulolytische Enzyme, wie sie auch bei bestimmten Pilzen und Bakterien vorkommen eine wichtige Rolle. Im folgenden Abschnitt werden diese Enzyme näher beschrieben und darüber hinaus der verfahrenstechnische Hintergrund der enzymatischen Hydrolyse näher erläutert.

1.5.1 Mechanismus des enzymatischen Cellulose-Abbaus

Zur vollständigen Hydrolyse der Cellulose sind drei Enzymaktivitäten notwendig, die β -1-4-Endoglucanase (ENG, EC 3.2.1.4), die β -1-4-Exoglucanase (EXG, EC 3.2.1.91) und die β -1-3-Glucosidase (BG; EC 3.2.1.21) (*Smant et al. 1998; Cheng 2010; Creagh et al. 1996; Fadel 2000*). Die enzymatische Hydrolyse läuft hierbei in drei Teilschritten ab. Im ersten Schritt spaltet die ENG die Cellulose in Oligosaccharide. Die Endoglucanasen können als einzige Cellulase die Cellulose innerhalb der Kette spalten, allerdings nur in den amorphen Bereichen der Cellulose. Hierdurch werden viele weitere Enden erzeugt, wodurch die β -1-4-Exoglucanase effektiver arbeiten kann. Die β -1-4-Exoglucanase spaltet die Oligosaccharide an den Enden der Ketten in Cellobiose-Einheiten. Diese bestehen aus zwei Glucose-Molekülen. Im letzten Schritt erfolgt die Spaltung der Cellobiose durch die β -Glucosidase. In Abb. 1.6 ist dieser Vorgang nochmals graphisch dargestellt.

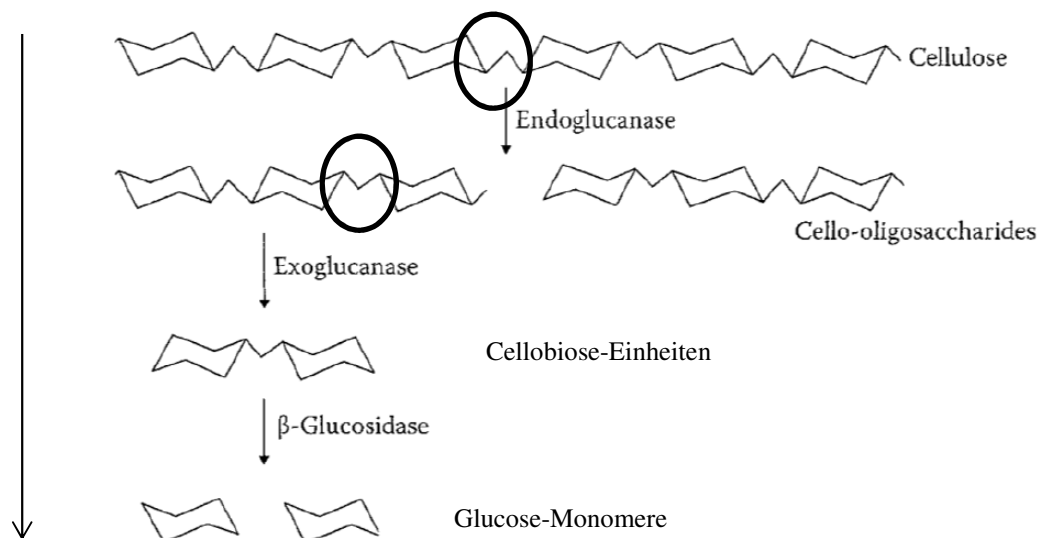


Abb. 1.6: Enzymatische Hydrolyse von Cellulose mittels der drei Enzymaktivitäten ENG, EXG und BG. Endoglucanasen können auch innerhalb der Kette spalten, während Exoglucanasen nur am Rand die glycosidische Bindung spalten können. (Cheng 2010)

Durch das Zusammenspiel der einzelnen enzymatischen Aktivitäten wird der Abbau der Cellulose stark beschleunigt. Dieser Exo-endo-Synergismus wurde 1979 zum ersten Mal von Hakansson beschrieben (Håkansson *et al.* 1979).

1.5.2 Einflussfaktoren auf die enzymatischen Hydrolyse

Die Enzymaktivität ist ein maßgeblicher Faktor bei der enzymatischen Hydrolyse. Verschiedene Faktoren haben Einfluss auf die enzymatische Aktivität der Cellulasen. In der Regel wird die enzymatische Aktivität von cellulolytischen Enzymen in der Einheit FPU (Filter Paper Unit) mL^{-1} angegeben (Adney and Baker 1996). Eine FPU entspricht der Enzymaktivität welche benötigt wird um bei 50 °C in 60 min 2 mg Glucose aus einem Streifen Filterpapier freizusetzen.

Eine Reihe von verschiedenen Faktoren haben Einflüsse auf die enzymatische Hydrolyse der Cellulose. Hierbei werden substratabhängige und substratunabhängige Faktoren unterschieden (Alvira *et al.* 2010). Ein substratabhängige Faktor ist z.B. die Kristallinität der Cellulose (Chang and Holtzapfle 2000). Je höher der Anteil an kristallinen Strukturen, desto schwieriger die enzymatische Zugänglichkeit und somit auch geringer die Effizienz der Hydrolyse. Darüber hinaus gibt es auch Untersuchungen die nahelegen, dass die Kettenlänge

der Cellulose einen Einfluss auf die enzymatische Hydrolyse hat (*Puri 2004*). Auch die anderen beiden anderen Bestandteile der Lignocellulose wie die Hemicellulose und das Lignin spielen eine wichtige Rolle als substratabhängige Faktoren (*Mansfield et al. 2008*). Durch die Gegenwart der Hemicellulose und des Lignins wird der Zugang der Enzyme eingeschränkt. Untersuchungen ergeben, dass die Entfernung der Xylane hierbei allerdings einen größeren Einfluss auf die enzymatische Spaltung hat als das Entfernen des Lignins (*Kumar et al. 2009*). Die Entfernung von Hemicellulose erhöht die Porengröße und sorgt somit für eine bessere Zugänglichkeit der Enzyme (*Chandra et al. 2007*).

Das Lignin hat noch einen anderen wichtigen Einfluss bei der enzymatischen Hydrolyse. Cellulasen binden häufig auch unspezifisch an Bereiche des Lignins und verlieren somit die hydrolytische Aktivität (*Esteghlalian et al. 2001*). Während die Hemmung bei verschiedenen Cellulasen durchaus unterschiedlich stark ausfallen kann, werden andere Enzyme wie z.B. Xylanasen weit weniger gehemmt (*Berlin et al. 2006b*).

Die substratunabhängigen Faktoren hingegen hängen vom eingesetzten Enzym selber ab. Hier sind üblicherweise die Temperatur, der pH-Wert und die Enzymmenge zu nennen. Bei den meisten cellulolytischen Enzymen liegt das Temperaturoptimum zwischen 45 und 50 °C und das pH-Optimum bei pH 5 – 6. (*Lowe et al. 1987*). Ein großes Problem bei der enzymatischen Hydrolyse ist die geringe Temperaturstabilität im thermophilen Bereich. Diese nimmt über einen längeren Zeitraum ab (*Kaar and Holtzapfle 1998*). Um diesem Effekt entgegen zu wirken können sogenannte Stabilisatoren eingesetzt werden. Dies können Tenside wie z.B. Polyethylenglycol sein (*Ouyang et al. 2010*). Auch der Energieeintrag bei der enzymatischen Spaltung spielt eine große Rolle. Ein höherer Energieeintrag durch verstärktes Rühren beschleunigt die enzymatische Hydrolyse

1.5.3 Kommerziell erhältliche enzymatische Präparate

Eine Reihe von verschiedenen Herstellern bietet enzymatische Präparate für die enzymatische Spaltung von Cellulose an. Zu den großen Anbietern gehören Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dänemark) oder Genencor (DuPont, USA). In Tab. 1.2 sind eine Reihe von angebotenen Präparaten und den entsprechenden Preisen aufgelistet.

Diese kommerziellen Präparate enthalten neben den drei entscheidenden Cellulase-Aktivitäten häufig auch gewisse Nebenaktivitäten z.B. in Form von Xylanasen. Ein großes

Problem bei den bisherigen Enzympräparaten sind die noch sehr hohen Kosten, wodurch beispielsweise eine kommerzielle Nutzung von Lignocellulose bei der Bioethanol-Herstellung noch nicht möglich ist (*Talebnia et al. 2010*). Seit kurzem bietet Novozymes das Cellic C-Tec3 an. Dieses soll bei gleicher Dosierung verglichen zu CTec2 eine 1,5-mal höhere Aktivität aufweisen und dadurch das erste Enzympräparat sein, welches laut Hersteller zur kommerziellen Bioethanolproduktion genutzt werden kann (*Novozymes 2012*). Zeitgleich hat DuPont das Enzympräparat Accellerase® TRIO vorgestellt, welches laut eigener Angabe ebenfalls eine kommerzielle Bioethanolproduktion zulässt (*DuPont 2012*).

Tab. 1.2: Preise verschiedener Enzympräparate für die enzymatische Hydrolyse von Lignocellulose (*Schober 2008*)

Enzympräparate	Enzympreis [€/kg]	Hersteller
MethaPlus L 100	30	DSM
GC 880	6	Genencor
Laminex BG	6	EDC (Enzyme Development Corporation)
Novozyme 188	30	Novozymes
Celluclast 1.5	35	Novozymes
Cellulase TXL	16,50	ASA-Spezialenzym (<i>Asa-Spezialenzym 2012</i>)

Nach der enzymatischen Hydrolyse des zuvor behandelten Weizenstrohs bleiben pflanzliche Reststoffe übrig, welche nicht durch die Hydrolyse abgebaut wurden. Um eine möglichst vollständige Nutzung des Weizenstrohs zu gewährleisten werden diese Reste am Ende zur Produktion von Biogas eingesetzt. Im folgenden Abschnitt soll dieser Prozess näher erläutert werden.

1.6 Produktion von Biogas aus landwirtschaftlichen Reststoffen

Die Nutzung von Biogas zur Erzeugung von Energie erlebte in den letzten 20 Jahren vor allem in Deutschland einen rasanten Anstieg. Gab es im Jahr 1992 nur 140 Anlagen, so wuchs die Anzahl auf 7.700 Biogasanlagen Ende 2013 (*K. Schumacher 2012*) mit einer installierten elektrischen Anlagenleistung von 2.850 MW.

Beim Biogas handelt es sich um ein Gemisch aus hauptsächlich Methan, Kohlendioxid und verschiedenen anderen Gasen. In Tab. 1.3 ist die Durchschnittliche Zusammensetzung von Biogas angegeben.

Tab. 1.3: Durchschnittliche Zusammensetzung von Biogas. (M. Kaltschmitt 2009)

Bestandteile	Konzentration
Methan (CH ₄)	50 – 70 Vol. %
Kohlendioxid (CO ₂)	25 - 45 Vol. %
Wasser (H ₂ O)	2-7 Vol. % (20-40 °C)
Schwefelwasserstoff (H ₂ S)	Bis zu 2 %
Stickstoff (N ₂)	< 2 Vol. %
Sauerstoff (O ₂)	< 2 Vol. %
Wasserstoff (H ₂)	< 1 Vol. %

Die genaue Zusammensetzung ist von mehreren Faktoren abhängig. So hat die Auswahl des Substrates einen großen Einfluss auf den Methangehalt des Biogases. Auch der Biogasertrag ist stark abhängig vom eingesetzten Material. Maissilage z.B. bringt einen Ertrag von 202 Nm³ Biogas t⁻¹ Frischmasse mit einem durchschnittlichen Methangehalt von 52 %. Rinder- oder Schweinegülle setzt nur 28 bzw. 25 Nm³ Biogas t⁻¹ Frischmasse frei, allerdings mit einem Methangehalt von knapp 60 %. (FNR 2008). Unbehandeltes Weizenstroh hat ein Biogaspotential von 270 Nm³ Biogas t⁻¹ Frischmasse (Pacan and Dröge 2010). Der Normkubikmeter (Nm³) bzw. Normliter (NL) bezeichnet hierbei die Gasmenge, welche bei festgelegten Bedingungen ein Gasvolumen von 1 Kubikmeter bzw. 1 Kubikliter einnimmt. Bei den Bedingungen handelt es sich um eine Temperatur von T_n = 273,15 K (T_n = 0 °C), einer Luftfeuchtigkeit von 0 % und einem Druck von p_n= 1,01325 bar.

1.6.1 Bildung von Biogas

Bei der Bildung von Biogas handelt es sich um einen Vergärungsprozess. Biogas entsteht natürlicherweise beim anaeroben Abbau von organischer Biomasse durch eine Reihe von verschiedenen Bakterien. Dieser Abbau findet in mehreren Stufen statt. Die erste Stufe umfasst die Hydrolyse. Hierbei werden die komplexen Ausgangssubstrate wie z.B. Kohlenhydrate, Proteine oder Fette gespalten und liegen danach als Zuckermomere, Aminosäuren oder andere einfache organische Verbindungen vor. Im Anschluss folgt die Acidogenese,

hierbei wandeln säurebildende Bakterien die zuvor gespaltenen organischen Verbindungen in Fettsäuren wie Essig-, Propion- oder Buttersäure um. Darüber hinaus wird ebenfalls Kohlendioxid und Wasserstoff gebildet. In der anschließenden Acetogenese wandeln acetogene Bakterien die Fettsäuren in Essigsäure um. An dieser Stelle spielt die Wasserstoff-Konzentration eine wichtige Rolle. Zu hohe Konzentrationen an Wasserstoff hemmen die Acetogenese, was dazu führt, dass sich Fettsäuren wie Propion- oder Buttersäure akkumulieren und der Gesamtprozess zum Stillstand kommt. In der letzten Phase, der Methanogenese, werden Essigsäure, zusammen mit dem Wasserstoff und dem Kohlendioxid von methanbildenden Bakterien in Methan umgewandelt. Hierbei handelt es sich um strikt anaerobe Archeen. Um die Wasserstoff-Konzentrationen niedrig zu halten müssen sowohl die Acetogenese, als auch die Methanogenese räumlich eng miteinander verknüpft sein (*M. Kaltschmitt 2009; Wandrey and Avasidis 1983*). In der Natur findet der Prozess bei einer Reihe von verschiedenen Tierarten statt. Ein gut erforschtes System ist hierbei der Termitendarm, in welchem durch verschiedenste cellulolytische Enzyme aufgenommene Lignocellulose abgebaut wird (*König et al. 2013*).

Die technische Umsetzung erfolgt meistens in gerührten Fermentern und wird unter mesophilen bzw. teilweise auch thermophilen Bedingungen gefahren.

Nachdem in den vorherigen Abschnitten Möglichkeiten zur Vorbehandlung des Weizenstrohs, die Freisetzung der enthaltenen Zucker durch die enzymatische Hydrolyse und die Nutzung der Reststoffe bei der Biogas-Produktion erläutert wurden, steht im nächsten Abschnitt die Herstellung des PHB im Vordergrund. Spezifische Bakterien sind in der Lage unter bestimmten Wachstumsbedingungen Zucker in PHB umzusetzen.

1.7 Biopolymere auf Basis von Polyhydroxybuttersäure (PHB)

Die Polyhydroxybuttersäure (PHB) gehört zur Gruppe der Polyhydroxyalkanoate (PHA). Der französische Mikrobiologe Maurice Lemoigne isolierte im Jahr 1926 als erster das PHB (*Lemoigne 1926*). Beim PHB handelt es sich um einen Polyester aus Hydroxyalkansäuren mit unterschiedlicher Kettenlänge. In der Natur werden PHAs als Reservestoff bei Mikroorganismen gebildet.

Mittlerweile sind weit über 300 verschiedene Arten bekannt, welche in der Lage sind PHA als Reservestoff zu bilden (*Endres and Siebert-Raths 2009*). Hierzu zählen verschiedenste Arten

von *Bacillus*- oder *Pseudomonaden*-Stämmen. Unter bestimmten Wachstumsbedingungen kann der PHB-Anteil in der Zelle bis zu 70 -80 % der Biotrockenmasse ausmachen (*Madison and Huisman 1999*). Aus den PHAs lassen sich Kunststoffe herstellen, welche ähnliche Eigenschaften wie petrochemisch basierte Kunststoffe wie Polyethylen oder Polypropylen besitzen.

1.7.1 Mikrobielle Synthesen von Polyhydroxybuttersäure (PHB)

Bei zwei Mikroorganismen wurde die Biosynthese von PHB intensiv untersucht, den Bakterien *Ralstonia eutropha* (früher *Alcaligenes eutrophus*) und *Zoogloea ramigera*. Beim letztgenannten wurde auch zum ersten Mal das PHB-Operon isoliert (*Peoples et al. 1987*).

Die PHB-Synthese besteht hauptsächlich aus drei enzymatischen Reaktionen, welche durch drei Enzyme katalysiert werden. Die Anordnung der Gene, wie sie in Abb. 1.7 dargestellt ist, gilt für eine Reihe von PHB-Produzenten, wie z.B. *Acinetobacter sp.*, *Alcaligenes latus*, oder *Ralstonia eutrophus* (*Peoples et al. 1987; Peoples and Sinskey 1989*).

Bei anderen PHB-bildenden Organismen liegen die drei Gene in anderer Reihenfolge vor oder sind teilweise getrennt voneinander angeordnet. Neben diesen drei Genen wurden eine Reihe weiterer wichtiger Gene identifiziert, welche bei der PHB-Synthese wichtig sind. Die entsprechenden Enzyme spielen u.a. bei der Bereitstellung der Monomere für die Polymerisation, der Granulatbildung, oder der Depolymerisation eine wichtige Rolle (*Madison and Huisman 1999*).

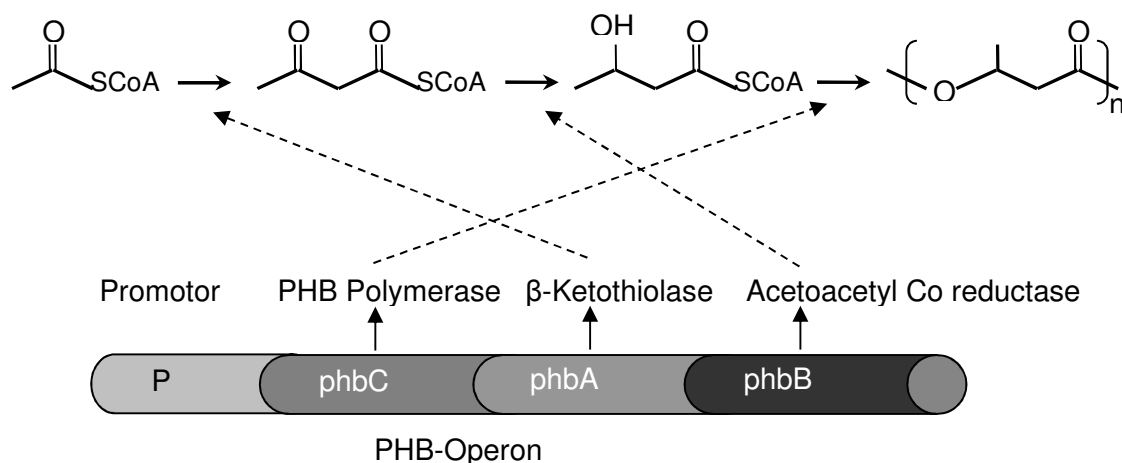


Abb. 1.7: Biosynthese von PHB und die korrespondierenden Gene des *phbCAB*-Operons (*Madison and Huisman 1999*)

Die PHB-Synthese läuft in mehreren Schritten ab. Abb. 1.8 zeigt den Biosyntheseweg von PHB. Ausgangspunkt ist das Acetyl-CoA, welches aus der Glykolyse in den TCA-Zyklus geschleust wird. Unter bestimmten Wachstumsbedingungen wie z.B. Stickstoffmangel im Medium kommt es zu erhöhten Konzentrationen an NAD(P)H, NADH und Acetyl-CoA, da der TCA-Zyklus herunter reguliert wird. Dies führt zu einer Hemmung der Citratsynthase und einer weiteren Rückregulierung des TCA-Zyklus. Die Konzentration an Acetyl-CoA steigt an. Durch eine β -Ketothiolase kondensieren zwei Acetyl-CoA-Moleküle zum Acetoacetyl-CoA. Die β -Ketothiolase wird als ein Schlüsselenzym für die PHB-Synthese angesehen, da hierdurch das energetische Gleichgewicht im sogenannten overflow-Metabolismus aufrechterhalten wird. Unter normalen Bedingungen wird die β -Ketothiolase durch freies CoA gehemmt. Eine Verringerung der TCA-Aktivität verringert die Konzentration an freiem CoA. Das Acetoacetyl-CoA wird im nächsten Schritt in einer stereospezifischen Reaktion mittels einer NAD(P)H-abhängigen Acetoacetyl-CoA Reduktase zu R-3-Hydroxybutyryl-CoA reduziert. Dieses dient als Ausgangssubstrat für die PHB-Polymerase, welche die eigentliche Polymerisation zum PHB durchführt (Mansfield et al. 1995; Braunegg et al. 1998).

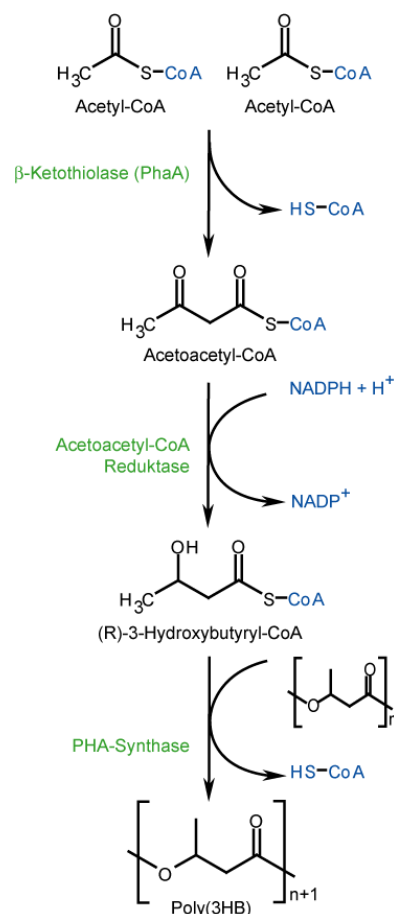


Abb. 1.8.: Biosyntheseweg von PHB (Reinecke 2005)

Die Synthese von PHB als Reservestoff setzt bei den meisten PHB-Produzenten in Folge eines Ungleichgewichtes bei der Nährstoffversorgung ein. Üblicherweise liegt die Kohlenstoffquelle noch im Überfluss vor, während die Konzentrationen an Stickstoff-, Phosphat- oder Schwefelverbindungen sich auf einem geringen Level befindet (*Babel et al. 2001*). Als besonders wirksam hinsichtlich einer fermentativen Produktion von PHB hat sich die Stickstoff-Limitierung gezeigt. In zahlreichen Studien konnten besonders hohe PHB-Ausbeuten bei einer Stickstoff-Limitierung erzielt werden (*Wang and Lee 1997; Patwardhan and Srivastava 2004*).

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der PHB-Synthese ist neben der Nährstoffsituation auch die Sauerstoffversorgung während der Fermentation. Eine geringere Sauerstoffversorgung erhöht die Konzentration an reduzierten Cofaktoren (NADH und NADPH), was den Kohlenstofffluss in Richtung der PHB-Synthese steuert. Allerdings führt eine schlechte Sauerstoffversorgung zu geringerem Zellwachstum und der Bildung von unerwünschten Nebenprodukten, die die Effizienz und Ausbeuten senken. Eine adäquate Sauerstoffversorgung ist daher für den Prozess der PHB-Synthese unerlässlich (*Kim 2000, Patnaik 2008*).

1.7.2 Verbreitete PHB-Produzenten

Neben diesen stressinduzierten PHB-Stämmen sind auch Stämme bekannt, welche das PHB bereits in der Wachstumsphase produzieren. Der bekannteste Vertreter ist der Stamm *Alcaligenes latus*, welcher auch schon seit längerem industriell zur PHB-Produktion eingesetzt wird (*Wang and Lee 1997*). In Tab. 1.4 ist eine Auflistung verschiedener PHB-Produzenten dargestellt, welche sich für eine PHB-Produktion eignen. Unter den natürlichen PHB-Produzenten haben sich vor allem *Ralstonia eutrophus* und *Alcaligenes latus* als besonders effektive heraus gestellt.

Tab. 1.4: Vergleich wichtiger Parameter bei natürlichen und rekombinanten PHB-Produzenten (*Kim et al. 1994, Young et al. 1994, Kim et al. 1996, Ryu et al. 1997, Wang and Lee 1997, Choi et al. 1998, Ahn et al. 2000*).

Organismus	Substrat	PHB-Ertrag [g/L]	P ¹ [g/L h]	PHB-Anteil ² [%]	Literatur
<i>Ralstonia eutrophus</i>	Glucose ^[5]	121 ^[3]	2,42	75	Kim et al. (1994)
<i>Ralstonia eutrophus</i>	Glucose ^[6]	232 ^[3]	3,14	80	Ryu et al. (1997)
<i>Alcaligenes latus</i>	Saccharose	99 ^[3]	4,94	88	Wang et al. (1997)
<i>Methylobacterium organophilum</i>	Methanol	130 ^[3]	1,8	52	Kim et al. (1996)
<i>Escherichia coli</i> ^[e]	Glucose	142 ^[3]	4,6	73	Choi et al. (1998)
<i>Escherichia coli</i> ^[e]	Molke	96 ^[3]	2,6	80	Ahn et al. (2000)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Xylose	4 ^[4]	0,04	49	Young et al. (1994)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Stärke	26 ^[3]	0,35	46	Kim et al. (1998)

¹ Produktivität, ² PHB-Anteil in % der bakteriellen Trockenmasse; ³ Fed-Batch Fermentation;

⁴ Batch Fermentation; ⁵ Stickstofflimitiert; ⁶ Phosphatlimitiert; rekombinante Stämme;

Neben dem Einsatz natürlicher Produzenten besteht ebenfalls die Möglichkeit rekombinante Stämme einzusetzen. Die Vorteile von rekombinanten Stämmen sind das weite Substratspektrum, so besitzt beispielsweise *Escherichia coli* mit Molke, Melasse, Glycerin oder Xylose ein sehr breites Substratspektrum (*Liu et al. 1998; Ahn et al. 2000; Nikel et al. 2006*). Als nicht natürlicher Produzent synthetisiert *E. coli* auch keine PHB-abbauenden Enzyme, welche bei natürlichen Produzenten häufig zu Problemen führen. Auch die Aufarbeitung ist einfacher, da *E. coli*-Bakterien in der Regel einfacher zu lysieren sind. Ein großer Nachteil bei der Verwendung rekombinanter Stämme ist die geringe genetische Stabilität der übertragenen Gene (*Madison and Huisman 1999*).

1.7.3 Substrate zur PHB-Produktion

Die höchsten PHB-Ausbeuten werden derzeit auf Basis von Glucose und Saccharose erzielt. Allerdings wird die Glucose im Moment noch in der Regel aus Maisstärke gewonnen. Hier wäre eine Alternative in Form von Glucose aus der Lignocellulose wünschenswert. Im dem Zusammenhang wäre eine Verwendung der Xylose aus der freigesetzten Hemicellulose ebenfalls wichtig, um das Substratspektrum zu erhöhen. Allerdings sind zurzeit nur wenige PHB-Produzenten bekannt, die die Xylose verwerten können. Eine Möglichkeit zur Verwertung der Xylose wäre eine Fermentation in ein Zwischenprodukt. Von einigen PHB-Produzenten wie z.B. *Ralstonia eutrophus* ist bekannt, dass sie in der Lage sind, organische Säuren wie Lactat oder Acetat als Substrat zu nutzen und in PHB umsetzen zu können. In einem ersten Schritt wird die Xylose durch ein Milchsäure-Bakterium in Lactat umgesetzt, welches dann im zweiten Schritt durch einen PHB-Produzenten in PHB umgewandelt wird (*Tsuge et al. 2001*). Wie weiter oben schon erwähnt stellt auch das Glycerin ein interessantes Substrat dar. In einem von der FNR geförderten Projekt wurden umfangreiche Untersuchungen zur Verwertung von Rohglycerin durch *Paracoccus denitrificans* und *Ralstonia eutrophus* durchgeführt. Damals fiel das Rohglycerin noch in großen Mengen als Abfallprodukt bei der Biodieselproduktion an. So konnte damals mit Produktionskosten von 2 €/kg gerechnet werden (*BioPro et al. 2008*). Seit dem Wegfall der steuerlichen Förderung beim Biodiesel ist die Produktion stark rückläufig und somit fällt weniger Rohglycerin an, was die Produktionskosten wieder ansteigen lässt.

Eine weitere Möglichkeit zur PHA/PHB-Produktion besteht über die Einbringung der PHB-Gene in Pflanzen und den Anbau dieser gentechnisch veränderten Pflanzen. Auch die Produktion von PHB über sogenannte zellfreie Systeme wird untersucht. Allerdings sind in beiden Ansätzen die Ausbeuten noch viel zu gering (*Endres and Siebert-Raths 2009*).

1.7.4 Eigenschaften des PHB

Das PHB gehört zur allgemeinen Gruppe der Polyhydroxyalkanoaten (PHA). Chemisch betrachtet handelt es sich bei den PHAs um eine Gruppe aliphatischer Polyester aus gesättigten und ungesättigten Hydroxyalkansäuren. In Abb. 1.9 ist die allgemeine chemische Struktur von PHB dargestellt.

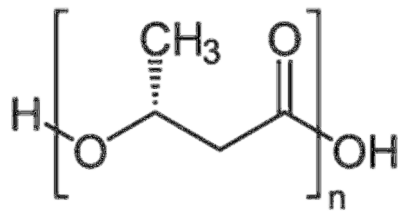


Abb. 1.9: Allgemeine chemische Struktur von PHB (Neurotiker 2008)

Entscheidend für die Eigenschaften der PHAs ist die Kettenlänge, d.h. aus wie vielen Monomeren der Polyester besteht. Hier werden generell zwei Längen unterschieden. Die kurzen PHAs mit 3-5 C-Atomen (*short-chain-length* PHA_{SCL}) und die längerkettige Monomere (*medium-chain-length* PHA_{MCL}) (Steinbüchel and Valentin 1995). Das PHB besteht aus etwa 60 Monomeren. Produkte aus reinem PHB haben einige gute Eigenschaften, sie sind wasserabweisend, relativ hart und haben eine hohe Thermostabilität. Allerdings geht mit der hohen Thermostabilität eine hohe Schmelztemperatur einher, welche sehr nah an der Zersetzungstemperatur liegt. Eine Verarbeitung ist daher nicht ganz unproblematisch. Durch Verlängerung der Ketten bzw. Verarbeitung mit einem Copolymer sinkt die Schmelztemperatur und Gasübergangstemperatur ab, während die Bruchdehnung deutlich ansteigt (Madison and Huisman 1999). Somit können je nach benötigtem Endprodukt die Kettenlängen bzw. die Copolymere angepasst werden. Entsprechend modifizierte PHBs weisen somit ähnliche Eigenschaften wie Polypropylen auf. In Tab. 1.5 sind die wichtigsten Eigenschaften zusammengefasst.

Tab. 1.5: Physikalische Eigenschaften verschiedener PHAs im Vergleich zu Polypropylen (PP).

Eigenschaften	P(3HB) ¹	P(3HB-3HV) ²	P(3HB-4HB) ³	PP ⁴
Schmelztemperatur [°C]	177	145	150	176
Glasübergangstemperatur [°C]	2	-1	-7	-10
Kristallinität [%]	70	56	45	60
Bruchdehnung [%]	5	50	444	400

¹ Poly(3-Hydroxybutyrat); ² Poly(3-Hydroxybutyrat/3-Hydroxyvalerat);

³ Poly(3-Hydroxybutyrat/4-Hydroxybutyrat); ⁴ Polypropylen

PHB ist in Wasser nahezu unlöslich. Hingegen lässt es sich in organischen Lösungsmitteln wie Chloroform (42 g L⁻¹)¹ oder Dichlormethan (40 g L⁻¹)¹ sehr gut lösen (Jacquel et al. 2007).

¹ Bei 30 °C

Ein großer Vorteil des PHBs im Vergleich zu den petrochemisch basierten Kunststoffen ist, dass diese in der Regel biologisch vollständig abbaubar sind (*Byrom 1987*). An diesem Abbau sind verschiedene Enzyme wie PHB-Hydrolasen und PHB-Depolymerasen beteiligt, welche von Bakterien ausgeschleust werden. Mittels des Enzyms D-beta-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase ist ein spezieller Bakterienstamm (*Acidovorax*) in der Lage PHB abzubauen (*Takanashi et al. 2004*). Der Zeitraum, in dem der biologische Abbau stattfindet, kann unterschiedlich lang sein, je nach Versuchsbedingungen und Ausgangsmaterial von wenigen Wochen bis Monaten (*Jendrossek et al. 1996*). Im Vergleich zu anderen Biopolymeren wie PLA (Polylactide) oder Stärkeblends weisen PHA gute Materialeigenschaften auf, die sie für den Einsatz im Bereich der Hochleistungskunststoffe ideal machen. So hat PHB eine gute Sperrwirkung gegen Gase und Wasserdampf und eine hohe Wärmeformbeständigkeit. Darüber hinaus ist PHB Wärme-, Wasser-, und UV-beständig. Auch die Verarbeitung ist relativ einfach, so lässt sich das PHB in konventionellen Spritzgussverfahren gut verarbeiten. Von Nachteil ist allerdings noch der hohe Materialpreis von zurzeit 4 -8 € pro kg (*Endres and Siebert-Raths 2009*).

1.7.5 PHB-Produktion im industriellen Maßstab

Unter dem Eindruck der ersten Ölkrise in den 1970er Jahren begann das britische Chemieunternehmen Imperial Chemical Industries (ICI) mit der Erforschung der PHB-Produktion. Die ersten Versuche mit methylotherphen Organismen auf Methanolbasis oder Vertretern der Gattung *Azotobacter* brachten nur unzureichende Erträge, außerdem war das Molekulargewicht des PHB zu niedrig.

Schließlich konnte eine PHB-Synthese im Maßstab von 300 t/a mit *Ralstonia eutrophus* etabliert werden (*Byrom 1992*). Bei dem produzierten PHB handelte es sich allerdings um ein Copolymer (P(3HB-3HV)). Copolymere wie das P(3HB-3HV) besitzen häufig viel bessere Eigenschaften. Das so gewonnene Produkt wurde unter dem Namen Biopol vertrieben. Mit dem Preisverfall beim Erdöl Ende der 1980er ging die Aufmerksamkeit im Bereich Biopolymere wieder verloren.

Neben ICI beschäftigte sich in den 1980er Jahren eine Reihe von weiteren Unternehmen mit der PHA/PHB-Herstellung, allerdings kam diese Forschung nie über das Stadium von Pilot- oder Demonstrationsanlagen hinaus. Mit dem erneuten Anstieg des Erdölpreises und unter dem Eindruck der knapper werdenden Reserven hat die PHB-Produktion in den letzten Jah-

ren wieder zugenommen. Eine Reihe von Herstellern haben ihre Produktionskapazitäten erweitert und planen neue Standorte. In Tab. 1.6 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen weltweiten Standorte der PHB-Produktion.

Tab. 1.6: Übersicht industrielle Produktion von PHB

Unternehmen	Substrat	PHA-Typ	Kapazität [t/a]
ICI, Großbritannien	Glucose	PHBV	300
Chemie Linz, Austria	Saccharose	PHB	100
PHB Industrial Brasil, Brasilien	Saccharose	PHB	60
Metabolix/AMD, USA	Glucose	Verschiedene PHAs	50.000
Tianan, China	Glucose	PHBV	2.000
Biomer	Saccharose	PHB	Auftragsproduktion

* Produktion eingestellt; []** im Bau

1.8 Motivation und Zielsetzung

Wie schon mehrfach erwähnt nimmt der Bedarf an nachwachsenden Rohstoffen stetig zu. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit neue Substrate wie z.B. die Lignocellulose für die Produktion von biobasierten Produkten einzusetzen. Allerdings ist eine Vorbehandlung der Lignocellulose notwendig, um die enthaltenen Zucker zu gewinnen, welche als Substrat für verschiedenste mikrobielle Produktionsprozesse genutzt werden können.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte daher eine effiziente Vorbehandlungsmethode für Weizenstroh entwickelt werden, die es erlaubt, auch ohne vorheriges mechanisches Zerkleinern die enthaltenen Zucker in einer anschließenden enzymatischen Hydrolyse effektiv zu gewinnen. Dieses Verfahren wurde in einem halb technischen Maßstab durchgeführt werden. Die gewonnenen Zucker wurden genutzt, um fermentativ PHB zu produzieren. Die anfallenden Reststoffe sollten zur Gewinnung von Biogas eingesetzt werden.

Aus den genannten Zielen ergeben sich folgende Teilaufgaben:

- Optimierung der Prozessparameter (Temperatur, Behandlungszeit, Säurezugabe und Dampfzufuhr) für die Vorbehandlung von Weizenstroh im 125 L TDH-Reaktor mit dem Ziel, hohe Zuckerausbeuten nach der anschließenden enzymatischen Hydrolyse zu erreichen.
- Vorbehandlung von Weizenstroh bzw. ganzen Ballen im 425 L TDH-Reaktor.
- Optimierung der enzymatischen Hydrolyse und Demonstration im 100 L Rührreaktor.
- Mikrobielle Gewinnung von PHB in enzymatischen Hydrolysaten durch den Einsatz von verschiedenen mikrobiellen PHB-Produzenten.
- Ermittlung des Biogaspotentials der anfallenden Reststoffe aus der Vorbehandlung der Biomasse in statischen Gärtests.

Zum Erreichen der Ziele wurde bei der Vorbehandlung im 125 L TDH-Reaktor der Einfluss der Temperatur (105 bis 150°C), der Behandlungsdauer (5 bis 60 min), der Säurekonzentration (0,32 bis 0,96 %) und der Dampfzufuhr (I-Regler, Werte zwischen 2 ms und 40 ms) auf die Zuckerausbeuten untersucht. Mittels der optimierten Parameter erfolgte der Übergang aus dem 125 L TDH-Reaktor in den 425 L TDH-Reaktor. Hier erfolgt die Vorbehandlung von losem Weizenstroh, aber auch ganzer Ballen. Am Beispiel der 125 L TDH-Anlage wurde eine Energiebilanzierung durchgeführt. Im nächsten Schritt sollte eine Optimierung der enzymatischen Hydrolyse durchgeführt werden. Hier wurden verschiedene Pa-

parameter wie Temperatur, pH-Wert, Inkubationsdauer und Enzym-Dosierung optimiert. Zusätzlich erfolgte ein Up-Scaling-Prozess in einen 100 L Rührreaktor. Für die fermentative Gewinnung von PHB sollte der PHB-Produzent *Cupriavidus necator DSM 545* im enzymatischen Hydrolysat kultiviert werden. Im letzten Schritt wurde das Biogaspotential der anfallenden Reststoffe aus der enzymatischen Hydrolyse untersucht, um die potentiell zur Verfügung stehenden Menge an Energie abschätzen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Hilfsmittel

Die in der vorliegenden Arbeit benutzten Geräte sind in **Tab. 2.1** zusammengefasst..

Tab. 2.1: Zusammenfassung der in der Arbeit verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav, 2540 EL	Tuttnauer Brenda, Niederlande
Brutschrank, Certomat IS	B. Braun, Göttingen Deutschland
Gaschromatograph, 6890 Series	Agilent, Santa Clara, USA
HPLC, 1200 Series	Agilent, Santa Clara, USA
ICP-OS; iCAP 6300 Duo	Thermo Scientific, Waltham, USA
Magnetrührer, MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Massenspektrometer, 5973N Series	Agilent, Santa Clara, USA
Muffelofen, Carbolite	Ubstad-Weiher, Deutschland
Gasanalysator NDIR mit Gascard NG	Brent GmbH, Düsseldorf, Deutschland
pH-Meter, Seven Multi	Mettler Toledo, Columbus, USA
Photometer, Spectronic Bio Mate 3	Thermo Scientific, Waltham, USA
Photometer, Spectronic Genesys 20	Thermo Scientific, Waltham, USA
Schneidemühle, Gullatto	Janke und Kunkel, heute IKA, Köln, Deutschland
Schüttelwasserbad, SW 23	Julabo, Seelbach, Deutschland
Thermodruckhydrolyse, 125 L-Anlage	Fa. Schmitt, Weselberg, Deutschland
Thermodruckhydrolyse, 425 L-Anlage	Fa. Schmitt, Weselberg, Deutschland
Trockenschrank, BD 23	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Trockenschrank	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Trommelgaszähler, TG05/3 Ritter	Dr.-Ing. Ritter Apparatebau GmbH & Co KG, Bochum, Deutschland

Fortsetzung **Tab. 2.1**

Geräte	Hersteller
Wasserdampfdestillation, Vapodest 20s	Gerhardt GmbH & Co KG, Königswinter, Deutschland
Wasserdampfdestillation, Vapodest 40s	Gerhardt GmbH & Co KG, Königswinter, Deutschland
Zentrifuge, 5430R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge, Minispin	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.2 Chemikalienliste

In Tabelle 3.3 sind die in der Arbeit verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tab. 2.2: Zusammenfassung der in der Arbeit verwendeten Arbeit

Chemikalie, Reinheit	Hersteller
3,5-Dinitrosalicylsäure, 97 %	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
5-Hydroxymethylfurfural, 99%	Sigma Aldrich, Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland
Ammoniumchlorid, p.a	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Antischaummittel, Silicon, 98 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
L-Arabinose, 98%	Sigma Aldrich, Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland
Benzoessäure, 99,5%,	Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure, 100 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid, p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Casein-Pepton	Fluka Chemicals, Seelze, Deutschland
Cellic CTec 2	Novozymes A/S, Bagsværd, Dänemark
Chloramphenicol, 98 %	Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland

Fortsetzung Tab. 2.2

Chemikalie, Reinheit	Hersteller
Chloroform, 99 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Chlorwasserstoffsäure	Bernd Kraft, GmbH, Duisburg, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat, 99 %	Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure, 99,9 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Furfural, p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
D-Glucose, 99 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gentamycin	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kalium-Natrium-Tartrat, 99 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat, 99 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kobaltchlorid, 99 %	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Kupfersulfat, 99 %	Bernd Kraft GmbH, Duisburg, Deutschland
Magnesiumsulfat, 99,5 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Manganchlorid, 99 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol, 99,8 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methylenblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methylenrot	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat, 99%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriummetabisulfit, 98%	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat, 99,8%	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge, 98%	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriummolybdat, 99,5	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland

Fortsetzung Tab. 2.2

Chemikalie, Reinheit	Hersteller
Polyhydroxybuttersäure, 98 %	Biomer, Krailling, Deutschland
Phenol, 99,8%	Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland
Salpetersäure, p.a.	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure, p.a.	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Xylose, 99 %	Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Zinksulfat, 99,5 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.3 Weizenstrohanalytik

Im folgenden Abschnitt wird die Weizenstrohanalytik näher beschrieben. Hierbei geht es um die Herkunft und Zusammensetzung des Weizenstrohs. Vor allem die Zusammensetzung ist sehr wichtig, da diese je nach Sorte und Wuchsbedingungen unterschiedlich sein kann. Um im späteren Verlauf der Arbeit die Vorbehandlung und die anschließende enzymatische Behandlung bilanzieren und bewerten zu können ist die genaue Zusammensetzung notwendig.

2.3.1 Herkunft des Weizenstrohs

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Weizenstroh stammt vom Hof Räder in Bad Kreuznach (Rheinland Pfalz, Deutschland) und wurde im Sommer 2012 geerntet. Nach der Ernte wurde das Weizenstroh auf dem Feld für mehrere Tage getrocknet. Durch die Zwischenlagerung auf dem Feld verfärbte sich das Weizenstroh bräunlich bis gräulich. Diese Verfärbung wurde vermutlich durch eine einsetzende mikrobielle Zersetzung verursacht. Die Packdichte des Strohs betrug $76,8 \text{ kg/m}^3$. Die Länge der Halme variierte im Schnitt zwischen 5 und 30 cm. Die weitere Lagerung der Strohballen erfolgte trocken in einem Seecontainer und war somit vor weiterer Nässeeinwirkung geschützt. Der Trockensubstanz-Gehalt (TS-Gehalt) des Weizenstrohs lag bei 96 % (w/w).

2.3.2 Zusammensetzung des Weizenstrohs

Die Bestimmung der Zusammensetzung des Weizenstrohs erfolgte nach einem Verfahren der NREL (National Renewable Energy Laboratory, Colorado, USA) (*Sluiter et al. 2008b*). Hierbei wurden die Anteile der drei Hauptfraktionen Cellulose, Hemicellulose und Lignin quantifiziert. Der Wasseranteil der Probe durfte nicht mehr als 10 % (w/w) ausmachen. Bei höheren Wasseranteilen wurde die Probe zuvor bei 50 °C im Trockenschrank (BD 23, Binder, Tuttlingen, Deutschland) vorgetrocknet.

Im ersten Schritt wurde das Stroh mittels einer Schneidmühle (Gullato, Janke und Kunkel (heute IKA), Köln, Deutschland) zerkleinert. Das verwendete Sieb hatte eine Porengröße von 1 – 2 mm. Im nächsten Schritt wurde die Probe mit Wasser und Ethanol über mehrere Stunden in einem Sandbad (ST72, Henry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf, Deutschland) nach einem Verfahren der NREL extrahiert (*Sluiter et al. 2008c*). Das extrahierte Weizenstroh musste wiederum im Trockenschrank (BD 23, Binder, Tuttlingen, Deutschland) getrocknet werden, um einen TS-Anteil von mindestens 90 % zu erhalten. Maximal 0,3 g des behandelten Weizenstrohs wurde im nächsten Behandlungsschritt mit 4 ml einer 72%igen Schwefelsäure-Lösung für 1 h bei 30 °C behandelt. Um eine gleichmäßige Behandlung zu gewährleisten wurde die Biomasse alle 10 min gerührt. Im Anschluss wurde 84 mL entionisiertes Wasser zugefügt und für 1 h bei 121 °C in festverschlossenen druckfesten Gefäßen im Autoklaven (Tuttnauer 2540 EL, Tuttnauer, Breda, Niederlande) behandelt. Da unter diesen Bedingungen auch ein Teil der freigesetzten Zucker zu Nebenprodukten (hauptsächlich Furane) weiterreagieren, wurde ein definierter Zuckerstandard (mit Glucose, Xylose und Arabinose) ebenfalls bei 121 °C behandelt. Im weiteren Prozessverlauf wurden dieser wie die Proben behandelt. Nach dem Abkühlen wurde die Biomasse mittels Keramikfiltertiegel abfiltriert. Ein Teil des Überstand wurde bei einer Wellenlänge zwischen 230 – 320 nm im Photometer (Spectronic BioMate 3, Thermo Scientific, Waltham, USA) vermessen, um den Anteil an säurelöslichen Lignin zu bestimmen. Je nach eingesetzter Biomasse wurde die entsprechende Wellenlänge ausgewählt. In 2.1 sind die verschiedenen Wellenlängen aufgelistet. Zusätzlich sind die verschiedenen Berechnungskoeffizienten angegeben mit denen durch die die entsprechende Gleichung (siehe NREL-Verfahren) die Konzentration bestimmt werden konnte.

2.1: Absorptionskonstanten für die Bestimmung des säure löslichen Lignin bei verschiedenen

ausgewählten Biomasse-Typen (*Sluiter et al. 2008b*).

Biomassen-Typ	λ_{\max} (nm)	Absorption bei λ_{\max} (L/ g cm)	Wellenlänge (nm)	Absorption (L/ g cm)
<i>Pinus Radiata</i> - NIST SRM 8493	198	25	240	12
Bagasse – NIST SRM 8491	198	40	240	25
Corn Stover NREL	198	55	320	30
<i>Populus delitodes</i>	197	60	240	25

Der restliche Überstand wurde in der HPLC (siehe Abschnitt 3.5.1) vermessen, um die Anteile an Hemicellulose und Cellulose bestimmen zu können. Hierzu wurde der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von Natriumcarbonat auf einen Wert zwischen pH 4 - 5 gebracht (Seven Multi, Mettler Toledo, Columbus USA). Der behandelte Zuckerstandard wurde ebenfalls in der HPLC vermessen. Die ermittelten Zuckerverluste während der Behandlung im Autoklaven wurden zu den gemessenen Konzentrationen an Glucose, Xylose und Arabinose addiert. Die Restbiomasse im Keramikfiltertiegel wurde mit mindestens 100 mL entionisiertem heißen Wasser gewaschen und für mindestens 12 h bei 105 °C im Trockenschrank (Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland) getrocknet. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurde das Gewicht bestimmt und der Filtertiegel bei 550 °C (Carbolite, Ubstadt-Weiher, Deutschland) im Muffelofen für mindestens 4 h verascht. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurde der Tiegel mit der restlichen Asche gewogen. Durch Abzug des Leergewichts konnte nun der Lignin- und Ascheanteil berechnet werden. Über eine Reihe von verschiedenen Gleichungen (siehe NREL-Verfahren, (*Sluiter et al. 2008b*)) konnten die Anteile von Cellulose, Hemicellulose und Lignin berechnet werden. Die Versuche wurden im dreifachen Ansatz durchgeführt. In Tab. 2.2 ist die Zusammensetzung für das hier verwendete Weizenstroh dargestellt.

Tab. 2.2: Zusammensetzung des Weizenstrohs (Hof Räder, Bad Kreuznach, Deutschland). Bestimmt

nach einem Verfahren der NREL im dreifachem Ansatz (Sluiter et al. 2008b).

Fraktion	Anteil [% (w/w) TS]
Cellulose	39,6 ± 0,4 %
Hemicellulose	28,9 ± 0,27 % (25,6 ± 0,44 % Xylan ; 3,3 ± 0,16 % Arabinose)
Lignin	18,1 ± 0,34 %
Asche	2,9 ± 0,13 %
Extraktstoffe (Wachse, Terpene etc. siehe Abschnitt 1.3.4)	8,8 %

Wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, lagert sich bei der hydrolytischen Spaltung von Glucanen und Xylanen in die entsprechenden Monomere ein Wassermolekül an, wodurch es zu einem Massenzuwachs kommt. Für die enzymatische Spaltung gilt prinzipiell das gleiche, auch hier kommt es zu einem Massenzuwachs. Um aus den Anteilen der Cellulose und Hemicellulose die theoretischen maximalen Ausbeuten an Glucose und Xylose zu ermitteln, werden der Cellulose-Anteil mit 1,1 und der Hemicellulose-Anteil mit 1,12 multipliziert. Aus den Werten in Tab. 2.2 wurde für die Glucose somit eine maximale Ausbeute von 429 g kg⁻¹ TS Weizenstroh und für die Xylose ein Wert von 280 g kg⁻¹ TS Weizenstroh berechnet.

2.4 Vorbehandlung von Weizenstroh in der Thermodruckhydrolyse (TDH)

Im nächsten Abschnitt wird die Vorbehandlung des Weizenstrohs näher erläutert. Hierbei werden die beiden Anlagen und der Prozess beschrieben. Die Vorbehandlung des Weizenstrohs erfolgte in einer 125 L und 425 L TDH-Anlage. Alle Versuche wurden als Duplikat durchgeführt.

2.4.1 Vorbehandlungen in der 125 L TDH-Anlage

In Abb. 2.1 ist die verwendete 125 L TDH-Anlage dargestellt (Firma Schmitt, Weselberg, Deutschland). Im Druckbehälter Nr. 2 erfolgte die Behandlung des Weizenstrohs. Das Weizenstroh wurde lose in einem Korb gefüllt. Über einen Zugang am Boden des Druckbehälters erfolgte die Dampfzufuhr des Heißdampfes aus dem Dampferzeuger (Nr. 3). Die Dampferzeugung erfolgte elektrisch. Nach der Vorbehandlung des Weizenstrohs wurde das flüssige

Hydrolysat vom TDH-Stroh im Druckbehälter getrennt und in Behälter Nr. 1 aufgefangen. Dieser war mit einem Propellerrührer ausgestattet. Zusätzlich war eine Temperierung über einen Doppelmantel möglich. Am Boden war ein Auslassventil angebracht. Der Behälter zwischen dem Druckbehälter und dem Dampferzeuger war für den Prozess der Weizenstroh-Vorbehandlung nicht von Bedeutung. Die Anlage ist bis zu einem Betriebsdruck von 8 bar ausgelegt.



Abb. 2.1: 125 L TDH Anlage zur Thermodruckhydrolyse von Weizenstroh mit dem Flüssigkeitsbehälter (1), Druckbehälter (2) und Dampferzeuger (3).

Für die Vorbehandlung wurden in der Regel 0,75 kg Weizenstroh eingewogen. Zum Weizenstroh wurden 5 L Leitungswasser gegeben. Dies ergab einen Feststoffanteil von 15 %. Als Katalysator wurde dem Wasser eine 65 %ige Salpetersäure-Lösung (HNO_3) beigemischt. Die Menge variierte je nach Versuchsansatz. Die Behandlung umfasste drei Phasen. In der ersten Phase wurde der Druckbehälter auf 120 °C vorgeheizt. Um den Prozess zu beschleunigen, wurde beim Erreichen von 1,20 bar im Druckbehälter das Außenventil geöffnet, so dass die im Behälter befindliche kühlere Luft entweicht und der Dampf somit den Druckbehälter schneller auf Temperatur bringen konnte. Im Anschluss startete die zweite Phase, welche die eigentliche Behandlung des Weizenstrohs beinhaltete. Die Temperatur und Behandlungsdauer variierten je nach gewählten Aufschlussbedingungen zwischen 105 – 150 °C bei 5 – 60 min Behandlungszeit. In der letzten Phase erfolgte die Entspannung des

Druckbehälters. Um die Anlage zu schonen, wurde diese erst nach Unterschreiten des Drucks auf unter 2 bar im Druckbehälter durchgeführt. Durch die Druckentspannung wurde die flüssige und feste Phase voneinander getrennt. Im Druckbehälter blieb das TDH-Stroh zurück.

Der Heißdampf wurde über ein automatisch gesteuertes Regelventil in den Druckbehälter geleitet. Um ein Übersteuern zu vermeiden, wurde das Ventil über einen PI-Regler gesteuert. Während der 1. Phase wurde die Ventilstellung über den Druck im Reaktor gesteuert, d.h. bei 1,20 bar öffnete ein Außenventil. Mit Erreichen der 120 °C war der Prozess abgeschlossen. In der eigentlichen Behandlungsphase wurde die Ventilstellung über die Temperatur gesteuert. Während der P-Anteil beim PI-Regler konstant 0,75 betrug, wurde der I-Anteil in Abhängigkeit vom Versuchsansatz zwischen 2 und 20 ms variiert. Je niedriger der I-Anteil, desto schneller öffnete das Dampfventil.

Der Abkühlvorgang lief relativ langsam ab, da es sich um einen rein passiven Schritt ohne aktive Kühlung handelte. Für die Bilanzierung der Zuckerausbeuten wurde die flüssige Phase ausgewogen, eine Probe aus dem Hydrolysat entnommen und bei -20 °C gelagert. Außerdem wurde der Korb mit dem TDH-Stroh nach der Behandlung gewogen. Für die Bestimmung des TS-Werte und anderer Parameter wurden Proben vom behandelten Stroh für eine spätere Analytik bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.4.2 Vorbehandlungen in der 425 L TDH-Aufschlussanlage

Neben der 125 L TDH-Anlage stand auch eine 425 L TDH-Anlage (Firma Schmitt, Weselberg, Deutschland) im halbtechnischen Maßstab zur Verfügung. Auch hier wurde der Reaktor mittels Heißdampf durch Einströmen am Reaktorboden erhitzt. Ähnlich wie im 125 L TDH-Reaktor war die Behandlungszeit ebenfalls in drei Phasen unterteilt. Eine Vorheizphase auf 120 °C, die eigentliche Behandlungszeit und die Abkühlphase mit anschließender Druckentspannung. Der eingesetzte Feststoffanteil des Wasser-Stroh-Gemisches betrug ähnlich wie im 125 L TDH-Reaktor 13,5 % (w/v). In Abb. 2.2 ist der obere Teil der Anlage abgebildet.



Abb. 2.2: 425 L TDH-Druckreaktorbehälter einer halbertechnischen TDH-Aufschlussanlage für Biomasse.

Zu erkennen ist der Druckreaktor, in dem die Behandlung des Weizenstrohs durchgeführt wurde. Unterhalb des Reaktors befindet sich ein Behälter, um das flüssige Hydrolysat vom TDH-Stroh zu trennen. Die Zugabe des Wassers mit der Säure erfolgte über einen Sprühkopf im Deckel des Reaktors, was eine sehr gleichmäßige Verteilung ermöglichte. Die Druckentspannung erfolgte bei unter 2 bar in den Behälter unterhalb des Druckbehälters. Neben losem Stroh wurden in dieser Anlage auch ganze Ballen vorbehandelt. Das Volumen des TDH-Hydrolysats wurde über die Druckdifferenz zwischen zwei Drucksensoren im Flüssigkeitsbehälter bestimmt. Für eine spätere Analytik wurde eine Probe des Hydrolysats bei -20 °C gelagert. Das TDH-Stroh wurde nach der Behandlung gewogen und ebenfalls eine Probe für die spätere Analytik entnommen.

2.5 Enzymatische Hydrolyse von TDH-Stroh

Nach der Vorbehandlung des Weizenstrohs wird dieses im Anschluss enzymatisch weiterbehandelt. Um den Prozess so effektiv wie möglich durchführen zu können, ist eine exakte Enzymanalytik notwendig. Diese umfasst die Quantifizierung der enzymatischen Aktivität, um die entsprechende Enzym-Dosierung anpassen zu können. Darüber hinaus wird ebenfalls der Prozess der enzymatischen Hydrolyse näher erläutert. Einerseits sollen im analytischen Maßstab die Bedingungen optimiert, auf der anderen Seite sollen im präparativen Maßstab die Substrate für die spätere PHB-Produktion zur Verfügung gestellt werden.

2.5.1 Enzymanalytik

In der vorliegenden Arbeit wurde ein flüssiges Enzym-Präparat der Firma Novozymes (Bagsværd, Dänemark) verwendet. Das Cellic CTec[®] 2 ist ein Präparat speziell für den Einsatz bei vorbehandelter Lignocellulose.

3.4.1.2 Quantifizierung der enzymatischen Aktivität

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität in FPU (Filter Paper Unit) mL⁻¹ erfolgte mittels eines standardisierten Verfahrens der NREL (*Adney and Baker 1996*). Für den Test wurde ein ca. 50 mg schwerer Filterstreifen (1.0 x 6.0 cm) der Firma Whatman No 1 benötigt. Dieser wurde zusammengerollt und in ein fest verschließbares Reagenzröhrchen gefüllt. Anschließend wurde 1 mL 0,05 M Na-Citrat-Puffer zugefügt, so dass der Filter vollständig mit Puffer bedeckt war. Das Reagenzröhrchen wurde in einem Schüttelwasserbad (SW 23, Julabo, Seelbach, Deutschland) auf 50 °C vorgewärmt. Die zu bestimmende Enzym-Lösung wurde mehrfach mit 0,05 M Na-Citrat-Puffer verdünnt. Die Verdünnungen wurden so gewählt, dass durch die Hydrolyse nach 60 min bei 50 °C 2 mg Glucose freigesetzt wurden. Für die Berechnung der enzymatischen Aktivität wurde ebenfalls eine Verdünnungsstufe darüber und darunter gewählt. 0.5 mL der Verdünnungen wurden zu den Filterstreifen in den Reagenzröhrchen gegeben. Zusätzlich zu den Ansätzen mit der Enzym-Lösung wurde ein Blindwert ohne die Zugabe der Enzym-Lösung (stattdessen Wasser) erstellt. Außerdem wurde für jede Verdünnungsstufe ein Ansatz ohne die Papierstreifen durchgeführt. Dies war wichtig, da enzymatischen Lösungen häufig Glucose enthalten. Diese wurde dadurch bestimmt und von den gemessenen Werten bei den einzelnen Verdünnungsstufen abgezogen. Alle Ansätze wurden bei 50 °C für 60 min im Schüttelwasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch die Zugabe von 3 mL DNS-Lösung (enthält 10,6 g 3,5- Dinitrosalicylsäure, 19,8 g Natriumhydroxid in 1416 mL entionisiertes Wasser, 306 g Kalium-Natrium-Tartrat, 8,3 g Natriummetabisulfit und 7,6 mL Phenol) unterbrochen. Durch 5 minütige Inkubationen in kochendem Wasser wurde die Reaktion endgültig gestoppt. Im nächsten Schritt wurden 0,2 mL Probe mit 2,5 ml entionisiertem Wasser verdünnt und bei einer Wellenlänge von 540 nm im Photometer (Spectronic Genesys 20, Thermo Scientific, Walham, USA) vermessen. Um die Glucose-Konzentration bestimmen zu können, wurde zuvor eine Kalibriergerade mit unterschiedlich konzentrierten Glucose-Standards erstellt.

Die Standards wurden ebenfalls für 1 h inkubiert, mit 3 mL DNS-Lösung versetzt und für 5 min bei 100 °C inkubiert.

Für die Berechnung der FPU wurde der Verdünnungsfaktor der einzelnen Ansätze gegen die jeweils freigesetzte Menge an Glucose aufgetragen. Die Ermittlung der freigesetzten Glucose-Menge erfolgte enzymatisch. Der Verdünnungsfaktor bei 2 mg Glucose wurde abgelesen und in die folgende Formel eingetragen.

$$\frac{0,37}{\text{Wert bei 2.0 mg Glucose}} = \text{FPU / mL}$$

Gleichung 7: Bestimmung der FPU-Aktivität über einen experimentell ermittelten Verdünnungsfaktor nach einem Verfahren der NREL (*Adney and Baker 1996*)

2.5.1.1 Bestimmungen der Protein-Konzentration nach Lowry (*Lowry et al. 1951*)

Beim Lowry-Test handelt es sich um einen weitverbreiteten quantitativen Nachweis von Proteinen. In der Regel lassen sich Konzentrationen zwischen 20 – 200 µg mL⁻¹ Protein in einer Lösung nachweisen. Für die Durchführung des Tests wurden mehrere Lösungen benötigt. Die Lösung A enthielt 4 g L⁻¹ NaOH, 2 g Na₂CO₃ und 0,2 g Kalium-Natrium-Tartrat. In der Lösung B wurden 5 g L⁻¹ CuSO₄ x 5 H₂O gelöst. Die Lösung C wurde aus 50 Teilen Lösung A und 1 Teil Lösung B hergestellt. Als letzte Lösung D wurde 1 Teil Folin-Reagenz mit 1 Teil Wasser vermischt. Lösung C musste bei jeder neuen Messung neu angesetzt werden. Für die Durchführung wurden 100 µL verdünnter Probe und 1 mL der Lösung C in eine Küvette (Halbmikro PS, VWR, Darmstadt, Deutschland) gegeben. Der Ansatz wurde vermischt und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Anschließend wurden 100 µL Lösung D zugegeben und für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte bei 660 nm im Photometer (Spectronic Genesys 20, Thermo Scientific, Walham USA). Die Erstellung einer Kalibriergerade erfolgte mit verschiedenen Verdünnungen einer Rinderalbumin-Lösung.

2.5.2 Enzymatische Hydrolysen von TDH-Stroh

Die enzymatische Hydrolyse wurde sowohl im analytischen als auch im präparativen Maßstab durchgeführt. Beim analytischen Maßstab wurde eine reduzierte Menge an TDH-Stroh eingesetzt, um sicherzustellen, dass es durch die freigesetzte Glucose zu keinen Hemmungen der enzymatischen Aktivität kommt. Die präparative Hydrolyse wurde genutzt, um Hydrolysate mit möglichst hohen Glucose-Konzentrationen für eine spätere fermentative Nutzung zu gewinnen.

2.5.2.1 Enzymatische Hydrolysen von TDH-Stroh im analytischen Maßstab

Für die enzymatischen Hydrolysen im analytischen Maßstab wurde ein 0,2 M Natrium-Acetat-Puffer benötigt. Um ein mikrobielles Wachstum zu verhindern wurden dem Puffer jeweils 50 µg /mL Gentamycin und Chloramphenicol zugesetzt. Der pH-Wert wurde entsprechend dem gewünschten Wert, in der Regel zwischen pH 6,0 und pH 4,5 eingestellt. Die Hydrolyse erfolgte in 250 mL verschließbaren Erlenmeyer-Kolben. Für die enzymatische Hydrolyse wurden 15 g TDH-Stroh eingewogen und mit dem Puffer vermischt. Im Anschluss wurde der pH-Wert nochmals überprüft und gegeben falls korrigiert. Zum Zeitpunkt t_0 wurde eine Probe entnommen und für die spätere Quantifizierung bei -20 °C aufbewahrt. Im Anschluss wurde die entsprechende Enzymmenge zugefügt (je nach gewünschter Enzymdosierung). Die Hydrolyse erfolgte im Wasserschüttelbad (SW 23, Julabo, Seelbach, Deutschland) bei einer Schüttelfrequenz von 200 rpm. Die Temperatur wurde entsprechend der Versuchsanordnung gewählt und lag in der Regel zwischen 40 – 60 °C. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und für 10 min in 100 °C Wasser behandelt, um die enzymatische Aktivität zu stoppen. Für eine spätere Quantifizierung wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Um die Ausbeuten an Glucose und Xylose zu bestimmen wurden die ermittelten Konzentrationen in Gleichung 8 eingesetzt.

$$\text{Ausbeute Zucker [g g}^{-1}\text{]} = \frac{C_{\text{Zucker HPLC}} * V_{\text{EH}}}{TM_{\text{EH}}}$$

Gleichung 8: Berechnung der Bilanzierung für die Glucose und Xylose-Ausbeuten nach der enzymatischen Hydrolyse mit der durch die HPLC ermittelten Zucker-Konzentrationen $C_{\text{Zucker HPLC}}$, dem Gesamtvolumen der enzymatischen Hydrolyse (V_{EH}) in L und der eingesetzten Trockenmasse (TM_{EH}) in g.

2.5.2.2 Enzymatische Hydrolysen von TDH-Stroh im präparativen Maßstab

Die präparative Hydrolyse wurde mit 75 g TDH-Stroh in 500 mL Erlenmeyer-Kolben durchgeführt. Statt des Puffers wurden 300 mL entionisiertes Wasser zugegeben und der pH-Wert auf pH 5.0 mit 1 M NaOH eingestellt. Auf die Zugabe von Antibiotika wurde verzichtet. Eine Probe zum Zeitpunkt t_0 wurde entnommen und für eine spätere Analytik bei -20 °C weggefroren. Die Enzym-Dosierung entsprach 18,5 FPU g⁻¹ TSTDH-Stroh. Die enzymatische Hydrolyse wurde bei 50 °C für 48 h im Schüttelwasserbad (SW 23, Julabo, Seelbach, Deutschland)

durchgeführt. Nach 48 h wurde der Feststoff von der Flüssigkeit getrennt. Um mikrobielles Wachstum zu verhindern wurde die Lösung entweder autoklaviert oder steril filtriert. Eine Probe wurde entnommen und für eine spätere Analytik bei -20 °C weggefroren.

2.6 Ermittlung des Biogaspotentials

Um das Weizenstroh komplett nutzen zu können, wurden die Reststoffe nach der enzymatischen Hydrolyse zur Produktion von Biogas eingesetzt. Im Folgenden wird dieser Prozessschritt näher erläutert.

Die Bestimmung des Biogaspotentials erfolgte in statischen Gärtests. Hierzu wurde das zu untersuchende Substrat mit ausgegastem Impfschlamm aus einer Biogasanlage vermischt und in gasdichten Behältern über eine Gasuhr und einen Gasanalysator die Biogasmenge bzw. der Methangehalt bestimmt.

Die Versuche im statischen Gärtest wurden im dreifachen Ansatz durchgeführt. Je Ansatz wurde 50 g Frischmasse eingewogen und mit 600 g Impfschlamm versetzt. Der Impfschlamm stammte aus einer landwirtschaftlichen Biogasanlage. Der Faseranteil wurde abgetrennt und der Impfschlamm ca. 6 Tage ausgegast. Jeder Ansatz wurde am Schluss auf 1000 g mit Wasser aufgefüllt. Um die Gasmengen abschätzen zu können, welche aus dem Impfschlamm freigesetzt wurden, liefen zwei Kontrollansätze ausschließlich mit Impfschlamm. Alle Ansätze wurden bei 40 °C in einem Wasserbad temperiert. Die Gasvolumenmessung erfolgte über einen Trommelgaszähler TG05/3 von Ritter (Dr.-Ing. Ritter Apparatebau GmbH & Co. KG Bochum). Der Methananteil wurde über einen NDIR Analysator mit einer Gascard NG (Bernt GmbH, Düsseldorf) gemessen. Die Versuche wurden über 4 Wochen durchgeführt. Die erzielten Biogasmengen wurden auf den oTS-Wert (also der gesamte organische Anteil der Probe) bezogen. Die Gasmenge wurde in NL g⁻¹ oTS angegeben. Der Normliter (NL) entspricht derjenigen Gasmenge, welche bei einem Druck von 1,01325 bar, einer Luftfeuchtigkeit von 0 % und einer Temperatur von 273,15 K (0°C) ein Volumen von 1 L einnimmt.

2.7 Fermentative PHB-Produktion

Die in der präoperativen Hydrolyse gewonnenen Hydrolysate (siehe **Abschnitt 3.3**) wurden genutzt, um fermentativ PHB zu produzieren.

2.7.1 Charakteristika der Bakterienstämme

Für die fermentative PHB-Produktion wurde der Stamm *Cupriavidus necator* DSM 545 (*Makkar and Casida 1987*) (Stammbezeichnung H 1 G⁺3) eingesetzt. Hierbei handelte es sich um eine Mutante des DSM Stamm 529, welcher in der Lage ist, auch Glucose zu verwerten. Frühere Bezeichnungen des Stammes waren *Alcaligenes eutrophus* oder auch *Ralstonia eutropha*. Es handelt sich um eine Art aus der Familie der Burkholderiaceae. *Cupriavidus necator* ist ein Gram-negatives stäbchenförmiges Bakterium, welches vorzugsweise im Boden lebt. Bei Nährstoffmangel (z.B. Stickstoff-, Phosphat oder Schwefeldefizit) synthetisiert es PHB und lagert dieses intrazellulär ein (*Steinbüchel and Valentin 1995*). Darüber hinaus ist es in der Lage, andere im Boden lebende Bakterien oder Pilze als Nahrungsquelle zu benutzen.

2.7.2 Stammhaltung

Die Stammhaltung von *Cupriavidus necator* erfolgte über Schrägagar-Röhrchen oder über Gefrierkulturen. Für die Schrägagar-Kulturen wurde eine 18%ige Agar-Lösung in ein Kultivierungsröhrchen gegossen und abgekühlt. Die Röhrchen wurden mit einer frischen Kultur beimpft und bei 30 °C im Brutschrank (Certomat IS, B. Braun, Göttingen, Deutschland) inkubiert. Um die Kultur vor Kontamination und Austrocknung zu schützen wurde diese mit sterilem Stopfen und flexibler Folie abgedeckt. Im Kühlschrank bei 4 °C waren die Kulturen für mehrere Monate haltbar.

Für eine längere Lagerung der Kulturen wurden -80 °C Gefrierkulturen aus einer frischen Kultur verwendet. Zum Anlegen einer Gefrierkultur wurden 900 µL Flüssigkultur in ein steriles 1,5 mL Reaktionsgefäß gefüllt. 100 µL einer 70%igen Glycerin-Lösung zugegeben und mit der Flüssigkultur vermischt. Für den Einfrierprozess wurde eine Ethanol-Lösung auf -80 °C abgekühlt und die Reaktionsgefäße eingefroren. Die Lagerung der Stämme erfolgte bei -20 °C bzw. bevorzugt bei -80 °C.

2.7.3 Kultivierungsmedien

Im Folgenden sind die Medien und Puffer mit der entsprechenden Zusammensetzung aufgeführt.

LB-Medium:

10 g L⁻¹ Cassein-Pepton
5 g L⁻¹ Hefeextrakt
pH-Wert: 7,0

Mineralsalzmedium 1 nach Ramsay (Ramsay et al. 1990):

6,7 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O
1,5 g KH₂PO₄
1,0 g (NH₄)Cl
0,2 g MgSO₄ x 7 H₂O
0,01 g CaCl₂ x 2 H₂O
0,06 g Eisenammoniumcitrat
1 mL Spurenelement-Lösung

Spurenelement-Lösung (je L): 0,3 g H₃BO₃, 0,2 g x 6 H₂O CoCl₂; 0,1 g ZnSO₄ x 7 H₂O; 0,03 g MnCl₂ x 4 H₂O; 0,03 g NaMoO₄ x 2 H₂O; 0,02 g NiCl₂ x 6 H₂O und 0,01 g CuSO₄ x 5 H₂O

Auffüllen des Mediums auf 1 L und autoklavieren oder steril filtrieren.

2.7.4 Kultivierung von *Cupriavidus necator* im Schüttelkolben

Kultivierungen wurden im 250 mL Schüttelkolben durchgeführt. Hierfür wurden 50 mL Flüssigmedium vorgelegt. Die Beimpfung mit *Cupriavidus necator* erfolgte entweder aus einer Gefrierkultur oder aus einer frischen Vorkultur. Wurde eine frische Vorkultur verwendet betrug das Inokulum in der Regel 5- 10 % (v/v). Die Kultivierungen wurden bei 30 °C und 121 rpm im Schüttelinkubator durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und für die weitere Analytik bei -20 °C gelagert. Bestimmt wurden die Biotrocken-

masse (BTM), die Glucose-Konzentration und die PHB-Ausbeuten.

2.7.5 Bestimmungen der Biotrockenmasse

Die Bestimmung der Biotrockenmasse wurde mit 5 mL Kulturbullion in getrockneten 15 mL Zentrifugenröhrchen durchgeführt. Die Röhrchen wurden zuvor für mindestens 12 h bei 60 °C in einem Trockenschrank (BD 23, Binder, Tuttlingen, Deutschland) getrocknet und in einem Exsikkator abgekühlt. Mittels Feinwaage wurde das Leergewicht bestimmt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 5 mL 0,9 % (v/v) NaCl-Lösung resuspendiert. Im Anschluss wurde die Probe nochmals zentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig abgenommen. Das Röhrchen mit dem Pellet wurde nun für 24 h bei 60 °C im Trockenschrank (BD 23, Binder, Tuttlingen, Deutschland) getrocknet und ausgewogen. Die Bestimmung erfolgte im Doppelversuch.

2.7.6 Bestimmungen der PHB-Konzentration

Die Bestimmung der PHB-Konzentrationen bzw. Ausbeuten erfolgte nach einer Methode von Braunegg et al. (*Braunegg et al. 1978*). Hierbei wurde das PHB über eine Methanolyse in Buttersäuremethylester umgewandelt und in einem GC-MS (Gaschromatographen-Massenspektrometer) quantifiziert. Für die Erstellung einer Kalibriergeraden wurde 98%iges PHB der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) verwendet. Um eine vollständige Methanolyse sicherstellen zu können, wurde nicht mehr als 20 mg reines PHB eingewogen. Dem PHB wurden 1 mL saures Methanol (3 % (v/v)) und 1 mL Chloroform zugefügt. Als interner Standard wurde Benzoesäure zugegeben. Die Probe wurde für 3 h bei 105 °C im Trockenschrank, (Memmert) inkubiert. Jede Stunde wurde die Probe für 2 min kräftig geschüttelt. Nach der Inkubation wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde 0.5 mL entionisiertes Wasser zugegeben. In einer Variation der Originalmethode von Braunegg et al. (*Braunegg et al. 1978*) von Betancourt et al. (*Betancourt et al. 2007*) wurde darüber hinaus zusätzlich noch 1 mL Chloroform zugefügt, um sicherzugehen, dass der Buttersäuremethylester möglichst vollständig in die organische Phase übergeht. Im Anschluss wurde die Lösung für 5 min kräftig geschüttelt. Nach anschließender vollständiger Trennung der wässrigen und organischen Phase wurde die untere organische Phase mittels Spritze und langer Kanüle entnommen und in einem GC-MS (GC: Agilent 6890; MS: Agilent 5973) aufgetrennt und quantifiziert. Als Säule wurde eine DB-5 HT von Agilent verwendet (Länge: 30 m; Durchmesser: 0,25 mm; Filmdicke: 0,1 µm). Die Starttemperatur betrug 37 °C und

wurde für 3 min gehalten. Danach erfolgte eine Temperaturzunahme um 15 °C min^{-1} auf 150 °C . Im Anschluss wurde eine zweite Rampe mit 10 °C min^{-1} auf 280 °C Endtemperatur und anschließender 4 min Haltephase eingestellt. Die Retentionszeit des Buttersäuremethyl-ester liegt bei 4,7 min.

Der PHB-Anteil bezogen auf die Biotrockenmasse wurde mit folgender Gleichung berechnet.

$$\text{PHB-Anteil (\%)} = \frac{\text{PHB-Konzentration [g L]}}{\text{Biotrockenmasse [g L]}} * 100$$

Gleichung 9: Berechnung des PHB-Anteils in % bezogen auf die gesamte Biotrockenmasse.

2.8 Allgemeine Analytik

Um die erzielten Ausbeuten an Zucker nach der Vorbehandlung und der enzymatischen Hydrolyse vergleichen zu können, wurden diese auf die Trockensubstanz-Gehalte bezogen. Der Glühverlust ist wichtig, um den gesamten organischen Anteil bestimmen zu können und die Biogas-Produktion berechnen zu können. Über die Quantifizierung der enthaltenen Zucker und Nebenprodukte in der HPLC oder Photometer wurden die Massenbilanzen aufgestellt. Für die Kultivierungen in den enzymatischen Hydrolysaten ist die genaue Zusammensetzung notwendig. Neben den zuvor erwähnten Zuckern, sind das auch andere Nährstoffe wie Ammoniumverbindungen, Phosphate, Spurenelemente und Gesamtstickstoff. Diese werden durch weiter unten erläuterte Verfahren quantifiziert.

2.8.1 Bestimmungen der Trockensubstanz-Gehalte (TS-Gehalt)

Die Ermittlung des Trockenrückstandes erfolgt in Anlehnung an die Norm DIN EN12880 (2001- 02). Zur Ermittlung der Trockenmasse wurde die zu untersuchende Probe in einen getrockneten Keramiktiegel eingewogen. Der Keramiktiegel wurde zuvor mindestens 12 h bei 105 °C im Trockenschrank (Mettler GmbH, Schwabach, Deutschland) getrocknet und anschließend mindestens 3 h in einem Exsikkator abgekühlt. Das Leergewicht wurde notiert. Nach dem Einwiegen wurde der Tiegel mit der Probe für mindestens 12 h bei 105 °C getrocknet. Anschließend wurde der Tiegel in einem Exsikkator abgekühlt und erneut gewogen. Mittels der Gleichung 10 ließ sich die Trockenmasse der Probe berechnen:

$$TS = \frac{(m_R - m_T)}{m_E} * 100 \%$$

Gleichung 10 : Gleichung zur Berechnung der Trockensubstanz von Biomasseproben. TS bezeichnet den Trockensubstanz-Gehalt in Gewichtsprozent, m_R die Masse der Probe samt Tiegel nach dem Trocken (in g), m_T die Masse des Tiegels (g) und m_E die Proben-einwaage (g).

2.8.2 Bestimmung des Glühverlustes (GV)

Beim Glühverlust handelt es sich um den Teil der Probe, welcher durch ein Veraschen aus der Probe entfernt wird, in der Regel der gesamte organische Anteil. Übrig bleibt der anorganische Anteil der Probe. Das Verfahren zur Bestimmung des Glühverlustes wurde in Anlehnung an das NREL-Verfahren „*Determination of Ash in Biomass*“ (Sluiter et al. 2008a) durchgeführt. Die eingewogene Probe wurde für mindestens 6 h bei 550 – 600 °C im Muffelofen (Carbolite, Ubstadt-Weiher, Deutschland) im Keramiktiegel verascht. Anschließend wurde der Tiegel für mindestens 3 h im Exsikkator abgekühlt und ausgewogen. Mittels der Gleichung 11 ließ sich der Glühverlust in der Probe ausrechnen. Der Glühverlust wurde hierbei als Asche-Anteil in % angegeben.

$$GV = \frac{m_R - m_T}{TR} * 100 \%$$

Gleichung 11: Gleichung zur Berechnung des Ascheanteils von Biomasseproben. Hierbei bezeichnet m_R die Masse des Tiegels mit der Asche (g), m_T die Masse des Tiegels und TR die Trockenmasse in (g).

2.8.3 Bestimmung der Zucker- und Nebenproduktausbeuten

Die Quantifizierung der Zuckerausbeuten aus den bei -20 °C weggefrorenen Proben aus der TDH-Vorbehandlungen, der enzymatischen Hydrolysen und der PHB-Kultivierungen wurden mittels HPLC durchgeführt. Die Proben wurden für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer HPLC-Anlage von Agilent mit RI-Detektor analysiert. Die Auftrennung der Probe erfolgte mittels Sepax HPLC-Säule (Spezifikationen: Carbomix H-Form,

NP5; 5 μm ; 7,8 x 300 mm bei einer Temperatur von 75 °C und einem Fluss von 0,7 mL min⁻¹). Als mobile Phase wurde eine 0,01 N H₂SO₄ Lösung verwendet. Die Säule war in der Lage, sowohl Zucker als auch Säuren aufzutrennen. Auch die Bestimmung der beiden Furane Furfural und 5-HMF war möglich. Die genaue Quantifizierung erfolgte mittels Kalibrierstandards. Für eine reine Bestimmung der Zucker-Konzentrationen reichten 25 min Laufzeit. Die zusätzliche Bestimmung der Furane verlängerte die Laufzeit aufgrund der späten Retentionszeiten auf 35 min.

2.8.4 Quantifizierungen der phenolischen Verbindungen

Eine Quantifizierung der phenolischen Verbindungen erfolgte über einen photometrischen Test mittels Folin-Ciocalteu-Reagenz (*Singleton et al. 1999*). Da der Nachweis sehr sensitiv ist, wurde die Proben mindestens 1:50 bzw. 1:100 verdünnt. Für die Quantifizierungen wurde eine Folin-Ciocalteu-Reagenz-Lösung 1:2 mit entionisiertem Wasser benötigt. Außerdem wurde eine 2 % (w/v) Natriumcarbonat-Lösung in 0,1 M NaOH angesetzt. Für die Quantifizierung wurde 1 mL verdünnter Probe mit 0,5 mL der Folin-Ciocalteu-Lösung vermischt und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 5 mL der Natriumcarbonat-Lösung zugegeben. Nach weiteren 30 min bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Absorption bei 750 nm in einem Photometer (Spectronic Genesys 20, Thermo Scientific, Walham, USA). Vor jeder Messreihe wurde eine Kalibrierung mit unterschiedlich konzentrierten Vanillin-Lösungen durchgeführt.

2.8.5 Bestimmungen der Ammonium-Stickstoff-Konzentrationen mittels Wasserdampfdestillation

Für die Bestimmung der Ammonium-Stickstoff-Konzentration im enzymatischen Hydrolysat wurde eine Wasserdampfdestillation mit anschließender Titration durchgeführt. Das Verfahren ist an die Norm DIN 38406 Teil 5 angelehnt. Für die Untersuchung wurden ca. 20 g Probe in ein Destillationsgefäß eingewogen. Der pH-Wert der Probe wurde mittels 1 M Salzsäure oder 1 M NaOH auf einen Wert zwischen 6,0 und 7,4 eingestellt. Um eine erhöhte Schaumbildung zu verhindern, wurde der Probe noch ein paar Tropfen Antischaummittel zugegeben. In einen 250 mL Glaskolben wurden 50 mL einer Borsäure-Lösung (20 g L⁻¹ Borsäure) zugefügt. Sowohl der Kolben mit der Probe, als auch der Glaskolben mit der Säure wurde in eine Wasserdampf-Destille (Gerhardt VAPODEST 20, Oberdollendorf, Deutsch-

land) eingespannt. Durch die Zugabe von heißem Wasserdampf in die Probe gehen sämtliche Ammoniumverbindungen als Ammoniak in die Vorlage mit Borsäure über. Anschließend wurde die verbrauchte Borsäure maßanalytisch über Titration (TA 20 plus, Schott Instruments, Landshut, Deutschland) mit einer 1 M Salzsäure-Lösung bestimmt. Um dem Farbumschlag qualitativ bestimmen zu können wurde der Borsäure-Lösung noch 10 mL Methylenrot-Lösung (Stammlösung: 0,5 g L⁻¹ Methylenrot) und 2 mL Methylenblau-Lösung (Stammlösung: 1,5 g L⁻¹ Methylenblau) pro L zugefügt.

2.8.6 Bestimmungen der Spurenelement-Konzentrationen mittels ICP-MS

Das Verfahren zur Bestimmung des Gehaltes an gelösten Nährstoffen und Spurenelementen erfolgt über eine ICP-OS (Induktiv gekoppeltes Plasma (ICP mit OES), Thermo Scientific iCAP 6300 DUO mit CETAC Autosampler ASX-260 und Thermoflex 900 Kryostat) nach der Norm DIN EN ISO 11885. Die zu vermessende Probe wurde entsprechend der zu erwartenden Konzentrationen an Spurenelementen unterschiedlich verdünnt vermessen. Über verschiedene Standardlösungen wurden entsprechende Kalibriergeraden erstellt und die Konzentration der Spurenelemente bestimmt.

2.8.7 Gesamtstickstoff nach Kjeldahl

Die Bestimmung der Gesamtstickstoffmenge erfolgte nach dem Verfahren der kjeldahlschen Stickstoffbestimmung. Das Verfahren lehnt sich an den Normentwurf DIN EN 16159 an (*BGK 2006*). Hierzu wird der Probe im Überschuss (20 mL) 96%ige Schwefelsäure zugegeben und gekocht. Um die Reaktion zu beschleunigen wird der Lösung ein Katalysator bestehend aus Hg-, Se-,Cu- oder Ti-Verbindungen zugegeben. Das Aufkochen erfolgt in mehreren Temperaturschritten zwischen 60 °C und 75 °C für 110 min. Zusätzlich wurde Antischaummittel zugefügt. Der Kohlenstoff im organischen Material wird zu Kohlendioxid und die Schwefelsäure zu Schwefeldioxid reduziert. Da es bei der Reaktion zur Bildung von gesundheitsschädlichen Gasen wie Schwefeldioxid kommt wird das Aufkochen in einem geschlossenen System mit Rauchabsaugung durchgeführt. Der Stickstoff liegt nach dem Kochen als Ammoniumsulfat in der der Schwefelsäure gelöst vor. Nach Abkühlen der Lösung wird dem Ansatz 50 mL dest. Wasser zugegeben. Durch die Zugabe einer starken Base wird die Schwefelsäure neutralisiert und Ammoniak ausgetrieben der quantitativ in eine Säure-Lösung überführt. Im Anschluss wird die Lösung titriert und über den Verbrauch an Maßlösungsvolumen kann der genaue Stickstoffgehalt berechnet werden.

3. Ergebnisse

3.1 Optimierung der Vorbehandlung von Weizenstroh in der 125 L TDH-Anlage

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der Optimierung der Vorbehandlung von Weizenstroh in der 125 L TDH-Anlage dargestellt. Hier galt es die Prozessparameter Behandlungstemperatur, Behandlungszeit, Säure-Konzentration und Heißdampfzufuhr zu optimieren, um in einer anschließenden enzymatischen Hydrolyse möglichst vollständig die enthaltenen Zucker freizusetzen. Der Fokus lag hierbei auf der Glucose und Xylose, welche mengenmäßig den höchsten Anteil an Zuckern ausmacht. Auf die Bilanzierung der anderen Zucker wie Arabinose oder Galactose wurde verzichtet, da diese wirtschaftlich nicht von Bedeutung sind. Wenn nicht anders erwähnt, so wurden die Vorbehandlung wie in Kapitel 2.4.1 durchgeführt. Die enzymatische Hydrolyse erfolgte im Anschluss in Anlehnung an Kapitel 2.5.2, wenn nicht anders beschrieben.

3.1.1 Optimierung der Behandlungstemperatur

Im ersten Schritt wurde eine Optimierung der Behandlungstemperatur bei der Vorbehandlung von Weizenstroh durchgeführt. Höhere Behandlungstemperaturen steigern den Energieverbrauch. Außerdem muss die Anlage entsprechend ausgelegt sein um die höheren Temperaturen und die damit verbundenen Drücke auszuhalten. Darüber hinaus ist bekannt, dass Behandlungstemperaturen über 130 °C in Kombination mit mineralischen Säuren zu einer Bildung von unerwünschten Nebenprodukten wie z.B. Furfural führt (*Zeitsch 2000*). Zu geringe Temperaturen reduzieren wiederum die erzielten Ausbeuten, durch unzureichende Vorbehandlung.

Abb. 3.1 zeigt die Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Behandlungstemperatur in der TDH. Hierzu wurden vier verschiedene Temperaturen zwischen 105 °C und 150 °C gewählt. Auf höhere Temperaturen wurde verzichtet, da bei sehr hohen Behandlungstemperaturen die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten stark zunimmt (*Zeitsch 2000*). Als Behandlungszeit wurde bei allen Ansätzen 60 min gewählt. Salpetersäure (65 % (v/v)) wurde zu einem prozentualen Anteil von 0,32 % (v/v) als Katalysator zugegeben. Der Feststoffanteil des Weizenstrohs in der TDH betrug 15 % (v/w). Die eingesetzte

Weizenstrohmenge lag bei 0,75 kg. Mit zunehmender Behandlungstemperatur wurden höhere Mengen an Xylose im TDH-Hydrolysat freigesetzt. Vor allem zwischen 120 °C und 135 °C stieg die Ausbeute an Xylose deutlich an. Neben der Xylose wurde durch die Behandlung von Weizenstroh in der TDH auch Glucose ins TDH-Hydrolysat freigesetzt. Allerdings stiegen die Glucose-Ausbeuten erst ab einer Behandlungstemperatur von 135 °C deutlich an. Bei Temperaturen von 105 °C und 120 °C wurden nur geringe Mengen an Glucose in das TDH-Hydrolysat freigesetzt.

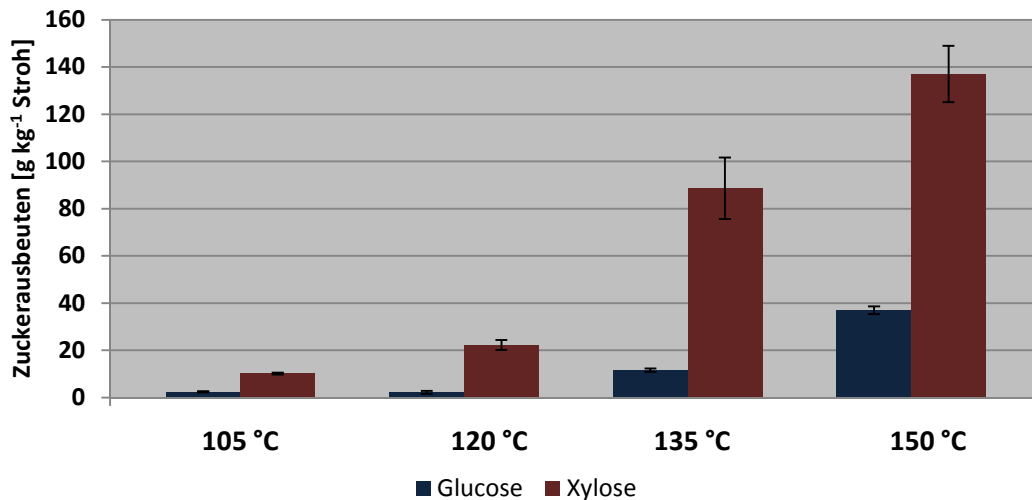


Abb. 3.1: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Behandlungstemperatur in der TDH. Sonstige Prozessparameter bei der TDH: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).

Die mit Abstand höchste Xylose-Ausbeute wurde bei einer Behandlungstemperatur von 150 °C mit 142 g Xylose kg⁻¹ TS WS erzielt. Eine Verringerung der Behandlungstemperatur reduzierte die Xylose-Ausbeute zum Teil deutlich. Vor allem zwischen 120 °C und 135 °C war ein deutliches Absinken der Xylose Ausbeute zu beobachten. Wurden bei 135 °C noch 88,7 g Xylose kg⁻¹ TS WS aus dem Stroh gelöst, so sank dieser Wert bei 120 °C auf nur noch 22,3 g Xylose kg⁻¹ TS WS. Dies entsprach einem Rückgang von fast 75 %. Eine weitere Absenkung der Behandlungstemperatur auf 105 °C setzte mit knapp 10 g Xylose kg⁻¹ Weizenstroh nur noch geringe Mengen an Xylose frei. Ein Vergleich mit der theoretischen Ausbeute von 286 g Xylose kg⁻¹ Weizenstroh zeigte, dass bei einer Behandlungstemperatur von 150 °C maximal ca. 50 % der enthaltenen Xylose aus der Hemicellulose freigesetzt werden konnte. Neben der Xylose konnten bei höheren Behandlungstemperaturen auch signifikante Mengen an Glucose nachgewiesen werden. Auch hier wurde die höchste Ausbeute mit knapp 40 g kg⁻¹ Weizenstroh bei einer Behandlungstemperatur von 150 °C erreicht. Durch

eine Herabsenkung der Behandlungstemperatur auf 135 °C sank die Glucose Ausbeute um knapp 70 % auf 11,2 g Glucose kg⁻¹ TS WS ab. Eine weitere Absenkung der Behandlungstemperatur setzte nur noch geringfügige Mengen an Glucose frei.

In Abb. 3.2 ist die Abhängigkeit der Glucose- und Xylose-Ausbeuten im enzymatischen Hydrolysat bei verschiedenen TDH-Behandlungstemperaturen dargestellt. Das TDH-Stroh wurde hierzu bei 50 °C für 24 h enzymatisch behandelt. Durch eine Steigerung der Behandlungstemperatur auf 150 °C konnte die höchste Glucose-Ausbeute erzielt werden. Vor allem zwischen 105 °C und 120 °C konnte eine deutliche Steigerung erreicht werden. Zusätzlich wurde durch die enzymatische Behandlung von TDH-Stroh weitere Xylose freigesetzt. So konnten die erzielten Xylose-Ausbeuten nach der enzymatischen Hydrolyse durch eine Erhöhung der TDH-Behandlungstemperatur auf 135 °C gesteigert werden. Eine Steigerung der Behandlungstemperatur auf 150 °C führte allerdings zu einem Rückgang der Xylose-Ausbeute im enzymatischen Hydrolysat.

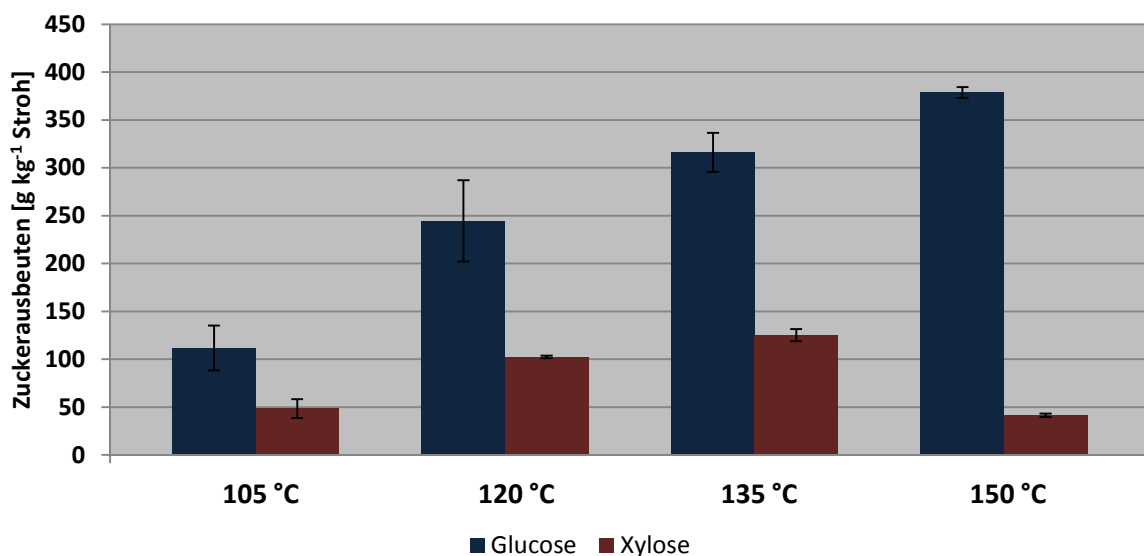


Abb. 3.2: Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat in Abhängigkeit von der TDH-Behandlungstemperatur. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % v/v). Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.

So wurden durch eine Behandlung bei 150 °C in der TDH nach der enzymatischen Hydrolyse knapp 379 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh freigesetzt. Eine Verringerung der Behandlungstemperatur in der TDH führte zu einer Reduzierung der erzielten Glucose-Ausbeute nach der enzymatischen Behandlung. Bei einer Behandlungstemperatur von 135 °C in der TDH wurden nur noch knapp 310 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh freigesetzt. Ein weiteres Absenken der

TDH-Temperatur auf 120 °C verringerte die Menge auf knapp 250 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh. Die geringste Glucose-Ausbeute wurde bei einer TDH- Behandlungstemperatur von 105 °C mit 105 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh erzielt. Neben der Glucose wurden durch die enzymatische Hydrolyse auch signifikante Mengen an Xylose freigesetzt. Vor allem bei einer vorherigen Behandlungstemperatur von 120 °C bzw. 135 °C wurden jeweils annähernd fast 125 g Xylose kg⁻¹ TS Weizenstroh freigesetzt. Im Gegensatz zur Glucose-Freisetzung verringerte eine weitere Erhöhung der Behandlungstemperatur von 135 °C auf 150 °C die Xylose-Ausbeuten auf 41 g Xylose kg⁻¹ TDH-Stroh. Dies entsprach einer Verringerung von fast 70 %.

In Abb. 3.3 sind die Gesamtausbeuten an Glucose und Xylose im TDH- und enzymatischen Hydrolysat bei unterschiedlichen TDH-Behandlungstemperaturen dargestellt. Die höchste Glucose-Ausbeute wurde bei einer TDH-Temperatur von 150 °C erzielt. Mit Reduzierung der Temperatur sanken die Glucose-Ausbeuten. Die höchsten Xylose-Ausbeuten wurden hingegen schon bei 135 °C Behandlungstemperatur erreicht. Durch eine weitere Steigerung der Temperatur auf 150 °C reduzierte sich wiederum die Xylose Freisetzung.

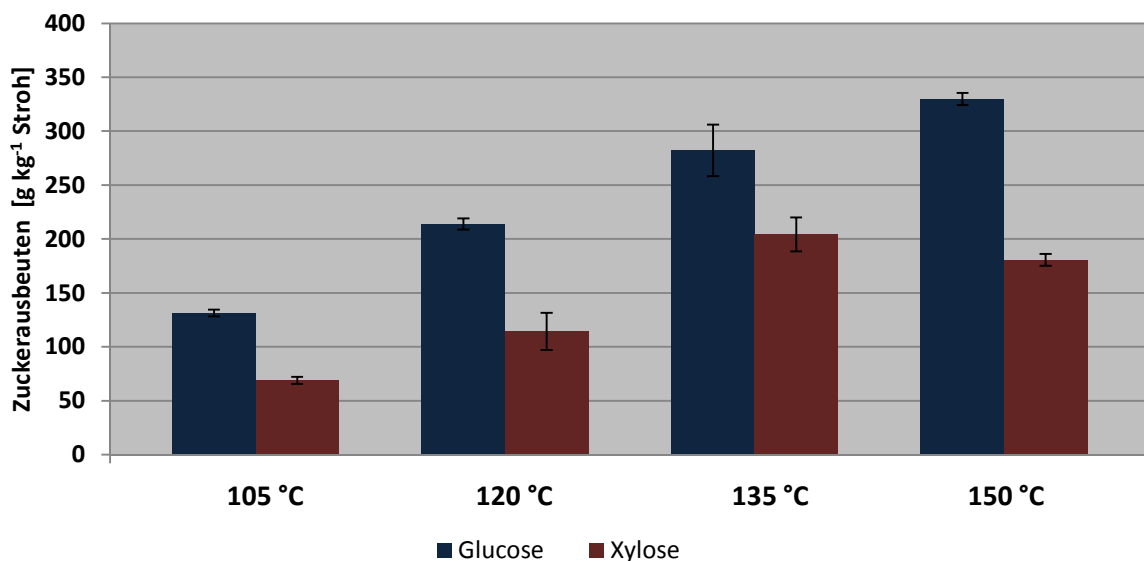


Abb. 3.3: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat von der TDH-Behandlungstemperatur. Sonstige TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v). Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.

Durch eine Behandlungstemperatur von 150 °C wurden insgesamt 329 g Glucose kg⁻¹ Weizenstroh freigesetzt. Verglichen mit der theoretischen Glucose-Ausbeute von 435 g Glucose kg⁻¹ Weizenstroh waren das 76 % der enthaltenen Glucose. Mit sinkender Behandlungstem-

peratur nahm auch die Glucose-Ausbeute ab. Trotzdem konnten auch bei 135 °C mit 282 g Glucose kg⁻¹ Weizenstroh noch fast 65 % der Glucose freigesetzt werden. Zwischen 120 °C und 105 °C nahmen die Ausbeuten dann stark ab. Bei 120 °C wurden knapp 210 g Glucose kg⁻¹ Weizenstroh freigesetzt, was einer theoretischen Glucose-Ausbeute von 48 % entsprach. Mit knapp 131 g Glucose kg⁻¹ Weizenstroh wurden bei 105 °C nur noch knapp 30 % der theoretischen Glucose-Ausbeute nachgewiesen.

In Bezug auf die Xylose konnten bei einer TDH-Behandlungstemperatur von 135 °C die höchsten Ausbeuten mit 204 g Xylose kg⁻¹ Weizenstroh erzielt werden, was wiederum 73 % der theoretischen Xylose-Ausbeute entsprach. Eine weitere Erhöhung der Behandlungstemperatur auf 150 °C ließ die Ausbeute auf 180 g Xylose kg⁻¹ TS WS absinken. Dies entsprach dann nur noch knapp 64 % der theoretisch enthaltenen Menge an Xylose. Niedrigere Behandlungstemperaturen führten ebenfalls zu einer Verringerung der Xylose-Ausbeuten. So wurden bei 105 bzw. 120 °C knapp 65 bzw. 110 g Xylose kg⁻¹ Weizenstroh freigesetzt.

Die Vorbehandlung von Weizenstroh in der TDH setzte eine Reihe von verschiedenen Nebenprodukten frei.

Abb. 3.4 zeigt die Abhängigkeit der vier wichtigsten Nebenproduktausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Behandlungstemperatur in der TDH. Vor allem die Essigsäure und die phenolischen Verbindungen wurden verstärkt nachgewiesen. Durch eine Erhöhung der Behandlungstemperatur stiegen die Ausbeuten dieser beiden Nebenprodukte stark an. Die beiden Furane Furfural und 5-HMF hingegen konnten erst ab 135 °C bzw. sogar erst bei 150 °C Behandlungstemperatur im TDH-Hydrolysat nachgewiesen werden.

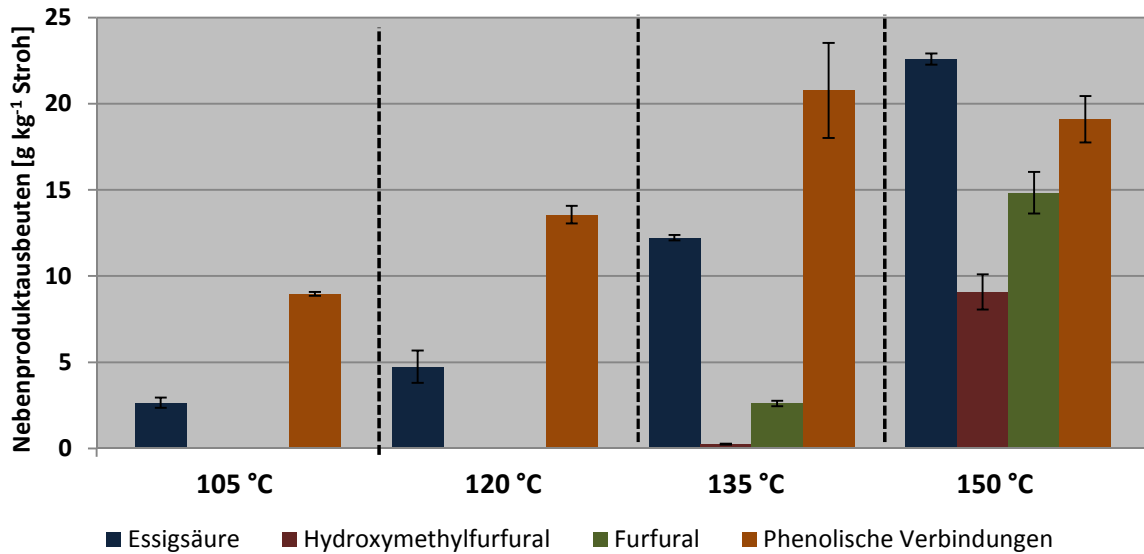


Abb. 3.4: Abhängigkeit der Nebenproduktausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Behandlungstemperatur in der TDH. Sonstige TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).

Bei 150 °C wurde eine maximale Essigsäure-Ausbeute von 22 g kg⁻¹ Weizenstroh freigesetzt. Eine Reduzierung der Behandlungstemperatur auf 135 °C setzte mit knapp 12,5 g Essigsäure kg⁻¹ Weizenstroh deutlich weniger Essigsäure frei. Eine weitere Verringerung der Behandlungstemperatur auf 120 °C bzw. 105 °C reduzierte die freigesetzte Menge auf 4,5 bzw. 2,5 g Essigsäure kg⁻¹ Weizenstroh. Die Ausbeute an phenolischen Verbindungen stieg mit Erhöhung der Behandlungstemperatur von knapp 8 g kg⁻¹ Weizenstroh bei 105 °C auf 13 g kg⁻¹ bei 120 °C. Die höchsten Ausbeuten wurden bei 135 bzw. 150 °C mit 21 bzw. 18 g phenolischen Verbindungen kg⁻¹ Weizenstroh. 5-HMF konnte nur bei einer Behandlungstemperatur von 150 °C mit 9 g kg⁻¹ Weizenstroh nachgewiesen werden. Auch das Furfural wurde ausschließlich bei Temperaturen ab 135 °C mit knapp 3 g kg⁻¹ Weizenstroh freigesetzt. Die höchste Ausbeute wurde bei 150 °C mit knapp 15 g Furfural kg⁻¹ nachgewiesen.

3.1.2 Optimierung der Behandlungszeit

Nach der erfolgreichen Optimierung der Behandlungstemperatur wurde im zweiten Optimierungsschritt die Behandlungszeit variiert. Die Behandlungszeit hat einen Einfluss auf die Verweilzeit des Weizenstrohs in der TDH-Anlage. Mit steigender Behandlungszeit nimmt der Energieverbrauch zu, außerdem sinkt der zu erzielende Durchsatz an Weizenstroh bei der Vorbehandlung. Abb. 3.5 zeigt die Abhängigkeit zwischen der Behandlungsdauer und den Zuckerausbeuten von Glucose und Xylose im TDH-Hydrolysat. Hierzu wurden verschiedene

Behandlungszeiten zwischen 5 min und 60 min untersucht. Als Behandlungstemperatur wurden 150 °C ausgewählt. Salpetersäure (65 % (v/v)) wurde zu einem prozentualen Anteil von 0,32 % (v/v) in den vier Ansätzen eingesetzt. Der Feststoffanteil in der TDH lag bei 15 %. Es zeigte sich, dass der Einfluss der Behandlungszeit auf die freigesetzten Xylose-Ausbeuten im TDH-Hydrolysat relativ gering war. Die höchste Xylose-Ausbeute wurde nach 30 min erreicht. Mit Steigerung der Behandlungszeit auf 60 min sank die freigesetzte Menge an Xylose wieder ab. Neben der Xylose wurde im TDH-Hydrolysat auch Glucose nachgewiesen. Die höchste Glucose-Ausbeute wurde nach einer 60-minütigen Behandlung erreicht. Mit sinkender Behandlungszeit reduzierte sich die freigesetzte Menge an Glucose im TDH-Hydrolysat.

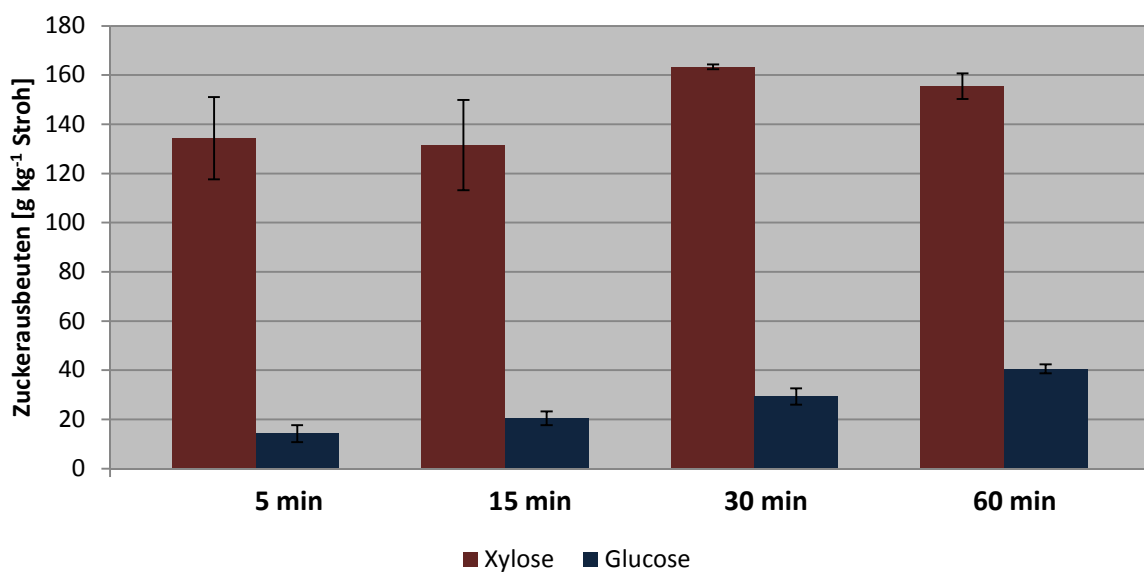


Abb. 3.5: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Behandlungszeit in der TDH. Sonstige Prozessparameter bei der TDH: T_{TDH} : 150 °C; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).

Die höchste Xylose-Ausbeute wurde bei einer Behandlungszeit von 30 min mit 156 g Xylose kg^{-1} Weizenstroh erzielt. Dies entsprach, bezogen auf die theoretische Xylose-Ausbeute von 286 g Xylose kg^{-1} Stroh, knapp 58 %. Durch eine Erhöhung der Behandlungszeit sank die Xylose-Ausbeute auf 142 g Xylose kg^{-1} Weizenstroh. Interessanterweise waren schon 5 min Behandlungszeit ausreichend um mit 134 g Xylose kg^{-1} Weizenstroh knapp 46 % der Xylose aus der Hemicellulose freizusetzen. Eine Erhöhung der Behandlungsdauer auf 15 min führte verglichen mit 5 min zu keinen signifikanten Verbesserungen. Wie schon im vorherigen Abschnitt 4.1.1 stiegen mit erhöhter Freisetzung der Xylose auch die Ausbeuten an Glucose durch die TDH an. Wurden nach 5 min Behandlungszeit knapp 13 g Glucose kg^{-1} Weizen-

stroh freigesetzt, so stieg die Ausbeute bei einer 60 min Behandlung auf 37 g Glucose kg^{-1} Weizenstroh an. Dies entsprach einer Steigerung um knapp 65 %.

In Abb. 3.6 ist die Abhängigkeit der Zuckerausbeuten von Glucose und Xylose bei verschiedenen TDH-Behandlungszeiten im enzymatischen Hydrolysat dargestellt. Die höchste Glucose-Ausbeute wurde durch eine 30 minütige TDH-Behandlungen erreicht. Geringere Behandlungszeiten bei der TDH reduzierten die freigesetzte Menge an Glucose im enzymatischen Hydrolysat. Eine weitere Erhöhung der Behandlungszeit auf 60 min zeigte kaum signifikante Verbesserungen. Neben der Glucose wurde im enzymatischen Hydrolysat auch Xylose nachgewiesen. Die maximale Xylose-Ausbeute wurde nach vorheriger 5-minütigen Behandlungszeit in der TDH erreicht. Mit steigender Temperatur sanken die freigesetzten Mengen an Xylose.

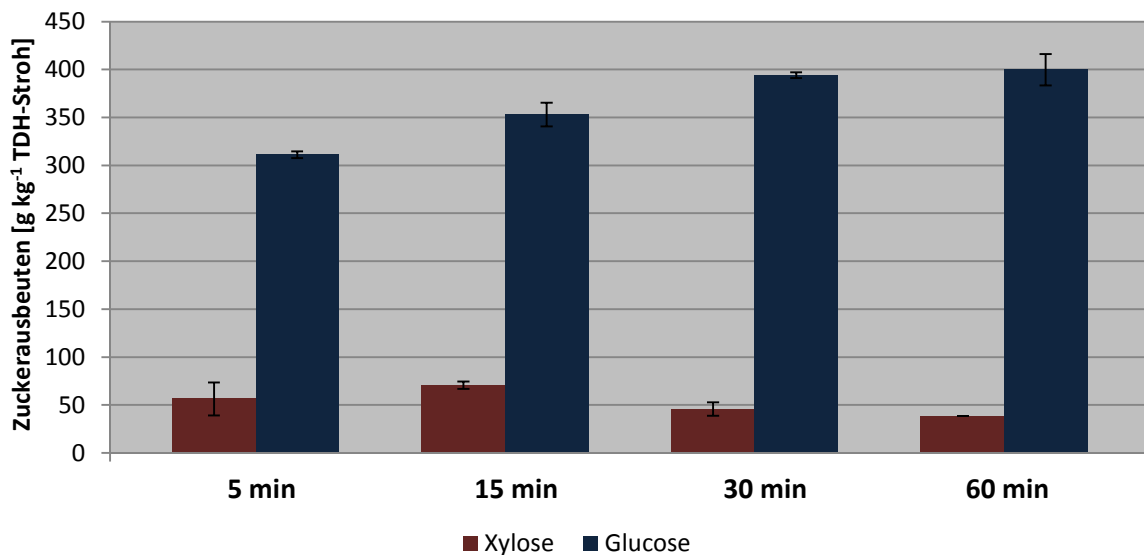


Abb. 3.6: Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat in Abhängigkeit von der TDH-Behandlungszeit. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g^{-1} TS. Sonstige TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; C_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v). Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.

Eine 5-minütige Behandlung in der TDH war ausreichend, um knapp 305 g Glucose kg^{-1} TDH-Stroh freizusetzen. Durch eine Verlängerung der Behandlungszeit auf 15 min stieg die Ausbeute auf 352 g Glucose kg^{-1} TDH-Stroh an. Eine Behandlungszeit von 30 min erhöhte die Glucose-Ausbeute sogar auf über 400 g kg^{-1} TDH-Stroh. Dies entsprach einer Steigerung von knapp 27 % im Vergleich zu 15 min Behandlungszeit. Eine weitere Erhöhung der Behandlungszeit auf 60 min setzte kaum zusätzlich höhere Mengen an Glucose frei. Bei der

Xylose-Ausbeute wurde ein gegenläufiger Trend nachgewiesen. Bei TDH-Stroh, welches zuvor 5 min in der TDH behandelt wurde, konnten nach der enzymatischen Hydrolyse knapp 126 g Xylose kg^{-1} TDH-Stroh freigesetzt werden. Eine Erhöhung der Behandlungszeit auf 15 bzw. 30 min verringerte die Xylose-Ausbeute auf 65 bzw. 55 g Xylose kg^{-1} TDH-Stroh. Bei TDH-Stroh, welches zuvor 60 min in der TDH behandelt wurde, konnten nur noch 42 g Xylose kg^{-1} TS WS freigesetzt werden. Dies waren knapp 70 % weniger als nach einer Behandlungszeit von 5 min in der TDH.

Abb. 3.7 zeigt die Gesamtausbeuten an Glucose und Xylose im TDH- und enzymatischen Hydrolysat. Die höchste Glucose-Ausbeute wurde hierbei nach einer 60-minütigen TDH-Behandlung von Weizenstroh erzielt. Mit sinkender Behandlungszeit nimmt auch die Menge an freigesetzter Glucose ab. Hinsichtlich der Xylose-Ausbeute zeigte sich ein gegenläufiger Trend. So wurde die höchste Xylose-Ausbeute bei einer 5-minütigen TDH-Behandlung erzielt. Mit steigender Behandlungszeit nahm die Ausbeute an Xylose im TDH- und enzymatischen Hydrolysat ab.

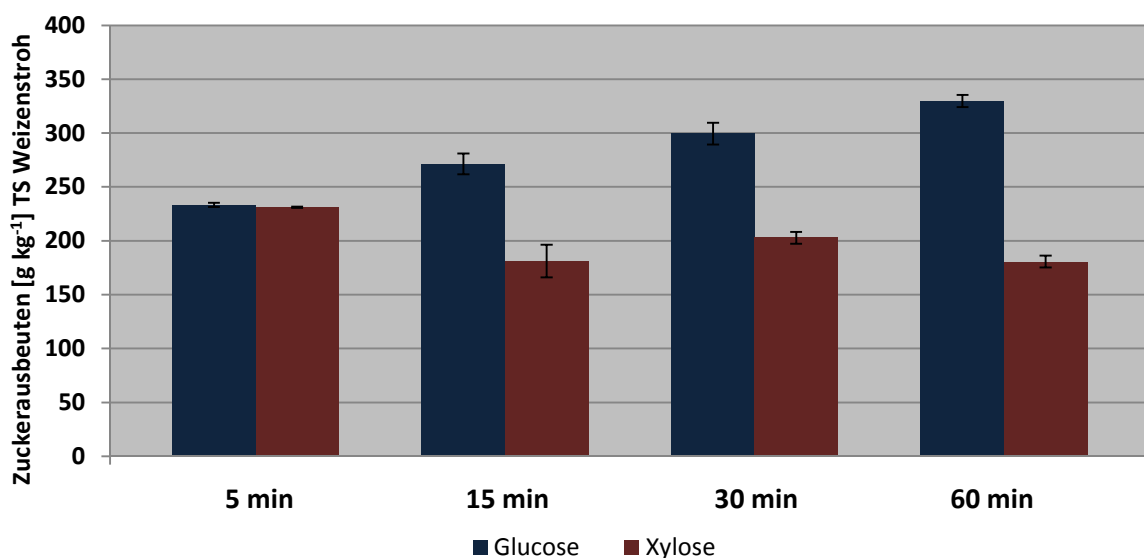


Abb. 3.7: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat von der TDH-Behandlungstemperatur. Sonstige TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v). Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g^{-1} TS. Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.

Nach 5 min Behandlungszeit in der TDH wurden mit 233 g Glucose kg^{-1} Weizenstroh Gesamtausbeute knapp 54 % der theoretischen Glucose-Ausbeute von 435 g Glucose kg^{-1} Stroh erreicht. Eine Erhöhung der Behandlungszeit auf 15 min steigerte die Glucose-

Ausbeute auf 270 g Glucose kg^{-1} Weizenstroh. Bezogen auf die theoretische Glucose-Ausbeute waren das knapp 61 %. Eine weitere Steigerung der Behandlungszeit auf 30 min erhöhte die Glucose-Ausbeute mit 300 g kg^{-1} Weizenstroh auf 69 %. Die höchste Ausbeute konnte nach 60 min erreicht werden. Hier wurden knapp 369 g Glucose kg^{-1} Weizenstroh freigesetzt, was knapp 86 % der maximal möglichen Ausbeute entsprach.

Bei den Xylose-Ausbeuten wurde eine andere Beobachtung gemacht. Je niedriger die Behandlungszeit, desto höher waren die Xylose-Ausbeuten. So konnten bei einer Behandlungszeit von 5 min mit 231 g Xylose kg^{-1} Weizenstroh annähernd 82 % der theoretisch enthaltenen Xylose-Menge von 286 g Xylose kg^{-1} Weizenstroh freigesetzt werden. Mit steigender Behandlungszeit nahm die Xylose-Ausbeute ab und erreichte bei 60 min nur noch knapp 180 g Xylose kg^{-1} TS WS, was nur noch knapp 58 % der theoretischen Xylose Ausbeute entsprach. Nach 30 min Behandlungszeit in der TDH wurden 200 g Xylose kg^{-1} Weizenstroh freigesetzt. Dies entsprach knapp 64 % der theoretischen Xylose-Ausbeute. Durch eine Verringerung der Behandlungszeit auf 15 min wurden mit 180 g Xylose kg^{-1} Weizenstroh knapp 58 % der Xylose aus den Xylanen der Hemicellulose freigesetzt.

Abb. 3.8 zeigt die Abhängigkeit der Nebenproduktbildung im TDH-Hydrolysat von der TDH-Behandlungstemperatur. Wie im Abschnitt 4.1.1 beschrieben wurde hauptsächlich die Essigsäure und größere Mengen an phenolischen Verbindungen freigesetzt. Mit steigender Behandlungszeit stiegen die Ausbeuten im TDH-Hydrolysat an. Die beiden Furane Furfural und 5-HMF hingegen wurden erst bei längeren Behandlungszeiten verstärkt gebildet. Vor allem das 5-HMF konnte erst bei einer Behandlungszeit von 60 min nachgewiesen werden.

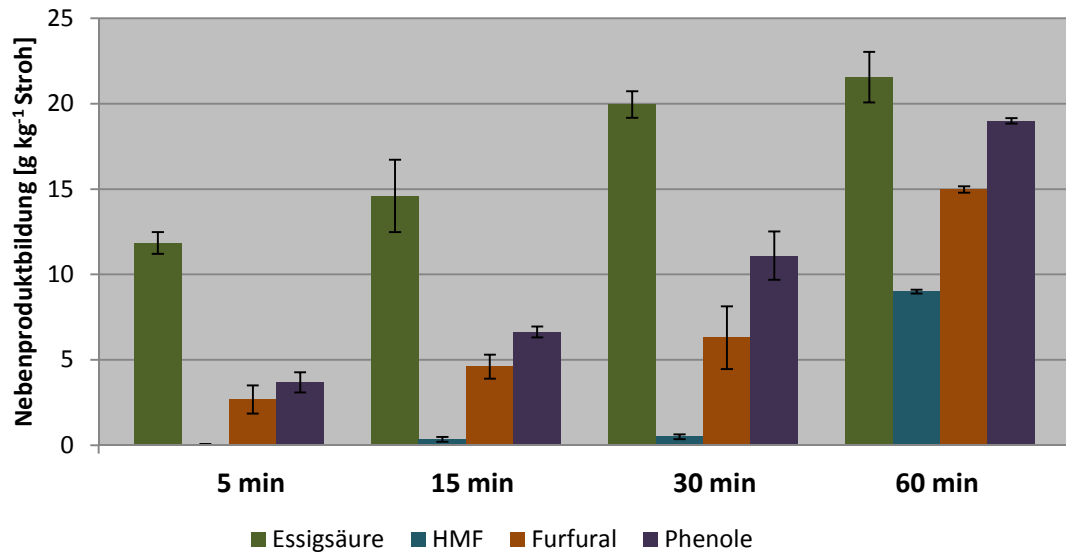


Abb. 3.8: Abhängigkeit der Nebenproduktausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Behandlungszeit in der TDH. Sonstige TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).

Durch eine Behandlungszeit von 5 min wurden knapp 12 g Essigsäure kg^{-1} Weizenstroh freigesetzt. Mit steigender Behandlungszeit auf 15 bzw. 30 min stieg dieser Wert auf 14 bzw. fast 20 g Essigsäure kg^{-1} Weizenstroh. Die höchste Ausbeute wurde mit fast 22 g Essigsäure kg^{-1} Weizenstroh bei einer 60 minütigen Behandlungsdauer erreicht. Auch die Ausbeuten an phenolischen Verbindungen stiegen von 4 g kg^{-1} auf knapp 8 g kg^{-1} Weizenstroh durch eine Steigerung der Behandlungszeit von 5 auf 15 min. Durch die weitere Erhöhung der Behandlungszeiten auf 30 und 60 min wurden mit 11 bzw. 20 g phenolischen Verbindungen kg^{-1} Weizenstroh die höchsten Ausbeuten erreicht. HMF konnte erst bei einer Behandlungszeit von 60 min in signifikanten Mengen nachgewiesen werden. Hier wurde eine Ausbeute von knapp 9 g HMF kg^{-1} Weizenstroh erreicht. Die höchste Furfural-Ausbeute wurde ebenfalls bei einer Behandlungszeit von 60 min mit 15 g kg^{-1} Weizenstroh erreicht. Durch eine Verringerung der Behandlungszeit auf 30 min sank die Ausbeute auf nur noch 6 g Furfural kg^{-1} Weizenstroh, was einem Rückgang von über 50 % entsprach. Kurze Behandlungszeiten von 5 bzw. 15 min setzten mit unter 5 g kg^{-1} Weizenstroh nur noch geringe Mengen an Furfural frei.

3.1.3 Optimierung der Säure-Konzentrationen bei der TDH-Behandlung

Ein dritter wichtiger Parameter bei der Vorbehandlung von Biomasse ist die eingesetzte Säure-Konzentration. In der Regel werden Behandlungen mit verdünnter mineralischer Säure bis 1 % (v/v) durchgeführt. Höhere Konzentrationen schädigen unter Umständen die Anlage

durch Korrosion. Im Folgenden werden zwei Aspekte näher untersucht, zum einen die Möglichkeit durch Erhöhung der Säure-Konzentration die eingesetzte Behandlungstemperatur zu senken um Energie zu sparen und die Bildung von Nebenprodukten zu minimieren. Zum anderen wurde die Säure-Konzentration bei der optimierten Behandlungstemperatur erhöht, um die Ausbeuten an Glucose nach der enzymatischen Hydrolyse weiter zu steigern.

3.1.3.1 Steigerung der Säure-Konzentrationen bei gleichzeitiger Verringerung der Behandlungstemperatur

Abb. 3.9 zeigt den Zusammenhang zwischen den Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat mit erhöhter Säure-Konzentration. Drei verschiedene prozentuale Anteile an HNO_3 zwischen 0,32 % (v/v) und 0,96 % (v/v) wurden bei der untersucht. Die Behandlungstemperatur wurde auf 120 °C abgesenkt. Die Behandlungszeit lag bei 60 min und der Feststoffanteil 15 % in der TDH.

Vor allem zwischen 0,32 % (v/v) und 0,64 % (v/v) wurden deutlich höhere Mengen an Xylose im TDH-Hydrolysat freigesetzt. Gleichzeitig stieg mit gesteigerter Säure-Konzentration auch die Ausbeute an Glucose im TDH-Hydrolysat an, welche durch die Vorbehandlung des Weizenstrohs nach der TDH freigesetzt wurde. Verglichen mit dem Einfluss auf die Xylose-Ausbeute war die Abhängigkeit der eingesetzten Menge an HNO_3 auf die Glucose-Freisetzung geringer.

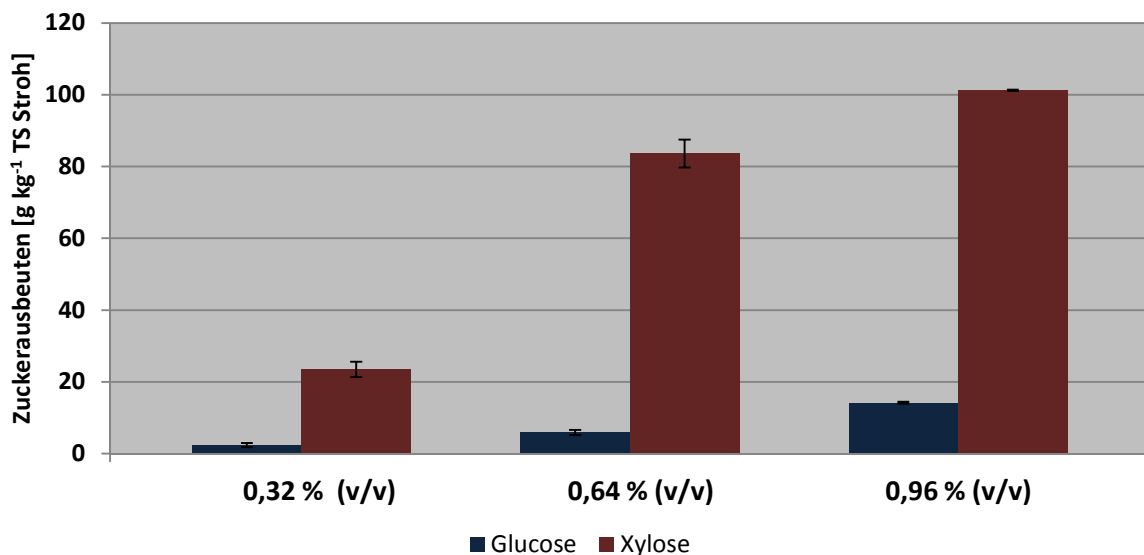


Abb. 3.9: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat vom prozentualen Anteil der HNO_3 in der TDH. Sonstige Prozessparameter bei der TDH: T_{TDH} 120 °C; t_{TDH} 60 min; c_{HNO_3} ; m_{TDH} 15 % (v/v).

Durch eine Erhöhung der Säure-Konzentration wurde deutlich mehr Xylose im TDH-Hydrolysat nachgewiesen. Waren es bei 0,32 % (v/v) HNO_3 nur 23 g Xylose kg^{-1} Weizenstroh, stieg die Ausbeute bei 0,64 % (v/v) HNO_3 auf 82 g Xylose kg^{-1} Weizenstroh. Dies entsprach einer Steigerung von 72 %. Die höchste Xylose-Ausbeute wurde bei einer Säure-Konzentration von 0,96 % (v/v) mit 101 g Xylose kg^{-1} erreicht. Wie in Abb. 3.9 zu sehen, war vor allem der Sprung zwischen 0,32 % und 0,64 % (v/v) sehr deutlich. Auch die Glucose-Ausbeute konnte durch die Erhöhung der Säure-Konzentration gesteigert werden. Wurden bei 0,32 % und 0,64 % (v/v) kaum signifikante Mengen an Glucose freigesetzt, stieg der Wert bei 0,96 % (v/v) HNO_3 auf knapp 18 g Glucose kg^{-1} Weizenstroh.

Abb. 3.10 zeigt den Einfluss der Menge an HNO_3 bei der TDH von Weizenstroh auf die Freisetzung von Glucose und Xylose im enzymatischen Hydrolysat. Durch den verstärkten Einsatz von HNO_3 stieg auch die Glucose-Ausbeute. Auch wenn die Unterschiede nur sehr geringfügig waren. Die im enzymatischen Hydrolysat nachgewiesene Menge an Xylose sank mit zunehmender Konzentration an HNO_3 ab.

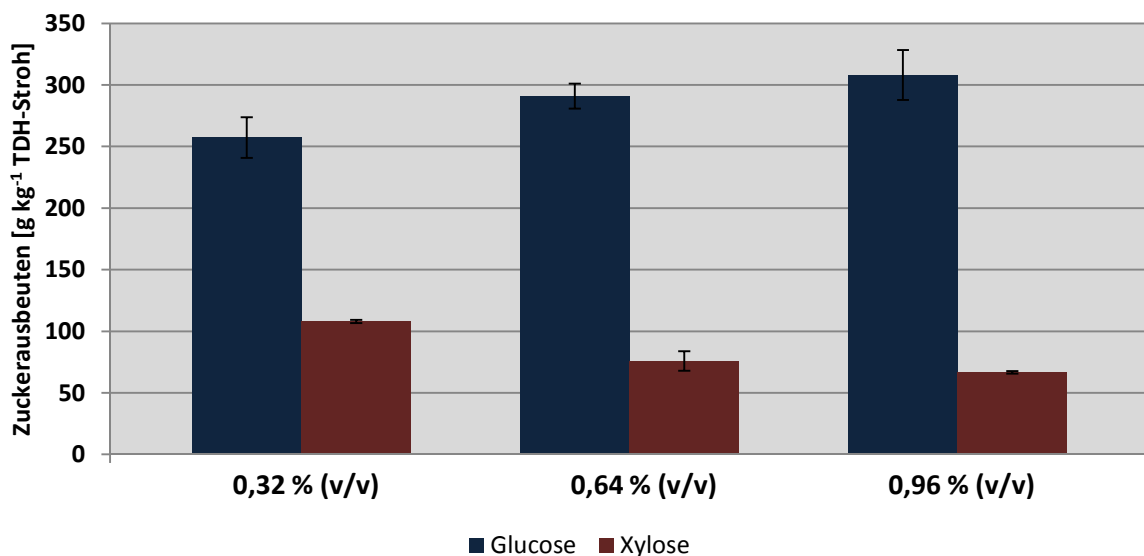


Abb. 3.10: Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat in Abhängigkeit vom prozentualen Anteil der HNO_3 bei der TDH. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g^{-1} TS. Sonstige TDH-Parameter: T_{TDH} 120 °C; t_{TDH} : 60 min; m_{TDH} : 15 % (v/v). Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.

Generell stieg die Glucose-Ausbeute im enzymatischen Hydrolysat mit Erhöhung der Säure-Konzentration bei der TDH an. So wurde bei 0,32 % (v/v) HNO_3 252 g Glucose kg^{-1} TDH-Stroh freigesetzt. Durch eine Zunahme der Salpetersäure-Konzentration stieg der Wert auf

292 g Glucose kg^{-1} TDH-Stroh an. Dies entsprach einer Steigerung um knapp 15 %. Eine weitere Zunahme der eingesetzten Säuremenge setzte knapp 306 g Glucose kg^{-1} TDH-Stroh frei. Die Xylose-Ausbeute hingegen sank mit zunehmender Säure-Konzentration ab. Wurde bei 0,32 % (v/v) noch knapp 100 g Xylose kg^{-1} TDH-Stroh freigesetzt, sank die Ausbeute bei 0,64 % bzw. 0,96 % (v/v) auf 75 bzw. 65 g Xylose kg^{-1} TDH-Stroh ab.

In Abb. 3.11 sind die Gesamtausbeuten an Glucose und Xylose im TDH- und enzymatischen Hydrolysat nach der TDH-Behandlung von Weizenstroh bei verschiedenen HNO_3 -Konzentrationen dargestellt. Die höchste Glucose-Ausbeute wurde nach einer TDH-Behandlung mit 0,96 % (v/v) HNO_3 erreicht. Mit sinkender Säure-Konzentration wurde die freigesetzte Glucose-Menge reduziert. Gleichzeitig konnten mit einer Erhöhung der Säure-Konzentration von 0,32 % (v/v) auf 0,96 % (v/v) signifikant höhere Mengen an Xylose im TDH- und enzymatischen Hydrolysat nachgewiesen werden.

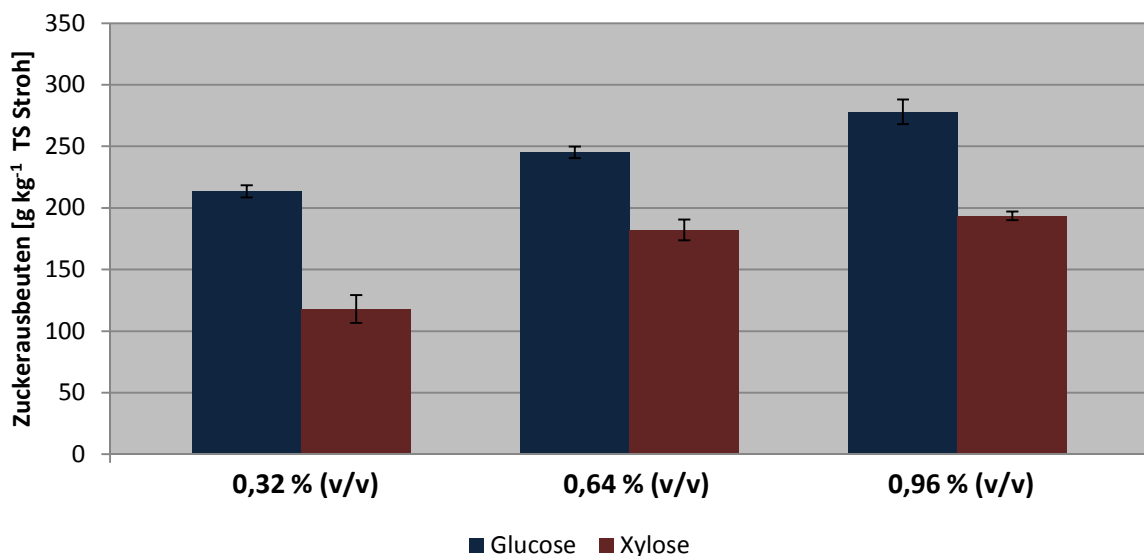


Abb. 3.11: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat vom prozentualen Anteil der HNO_3 in der TDH. Sonstige TDH-Parameter: T_{TDH} : 120 °C; t_{TDH} : 60 min; m_{TDH} : 15 % (v/v). Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g^{-1} TS. Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.

Bei 0,32 % (v/v) HNO_3 wurden knapp 210 g Glucose kg^{-1} Weizenstroh ins TDH- und enzymatische Hydrolysat freigesetzt. Durch eine Erhöhung der Säure-Konzentration auf 0,64 % (v/v) HNO_3 stieg die Ausbeute auf knapp 249 g Glucose kg^{-1} Weizenstroh. Die höchste Glucose-Ausbeute konnte bei einer Säure-Konzentration von 0,96 % (v/v) HNO_3 mit 278 g Glucose kg^{-1} Weizenstroh nachgewiesen werden. Bezogen auf die theoretische Glucose-Ausbeute

von 435 g Glucose kg^{-1} Weizenstroh stieg der Anteil von 49 % auf maximal 64 % bei einer Säure-Konzentration von 0,96 % (v/v) in der TDH an. Im Vergleich zu der TDH-Behandlung bei 150 °C und 0,32 % (v/v) HNO_3 (siehe Abschnitt 4.1.1) waren das allerdings knapp 12 % weniger. Hier wurden fast 329 g Glucose kg^{-1} Weizenstroh freigesetzt. Bei der Xylose-Ausbeute konnte ebenfalls eine Steigerung der Ausbeute durch erhöhte Säure-Konzentrationen nachgewiesen werden. So wurden bei 0,32 % (v/v) HNO_3 mit 118 g Xylose kg^{-1} Weizenstroh knapp 38 % der theoretischen Xylose-Menge aus der Hemicellulose gelöst. Eine Erhöhung der HNO_3 -Konzentration auf 0,64 % (v/v) setzte mit 182 g Xylose kg^{-1} knapp 58 % der Xylose frei. Dies war eine deutliche Steigerung. Die höchste Xylose-Ausbeute mit 193 g Xylose kg^{-1} Weizenstroh wurde bei einer Säure-Konzentration von 0,96 % (v/v) freigesetzt. Dies entsprach in etwa der Menge an Xylose, welche auch bei der TDH-Behandlung mit 150 °C und 0,32 % (v/v) HNO_3 freigesetzt wurden.

In Abb. 3.12 sind die Nebenprodukt-Ausbeuten im TDH-Hydrolysat nach der TDH-Behandlung von Weizenstroh bei verschiedenen HNO_3 -Konzentrationen aufgeführt. Die Nebenprodukte mit den höchsten Konzentrationen waren die Essigsäure und die phenolischen Verbindungen. Das HMF und Furfural konnte nur beim TDH-Aufschluss mit 0,96 % (v/v) HNO_3 in geringen Mengen nachgewiesen werden.

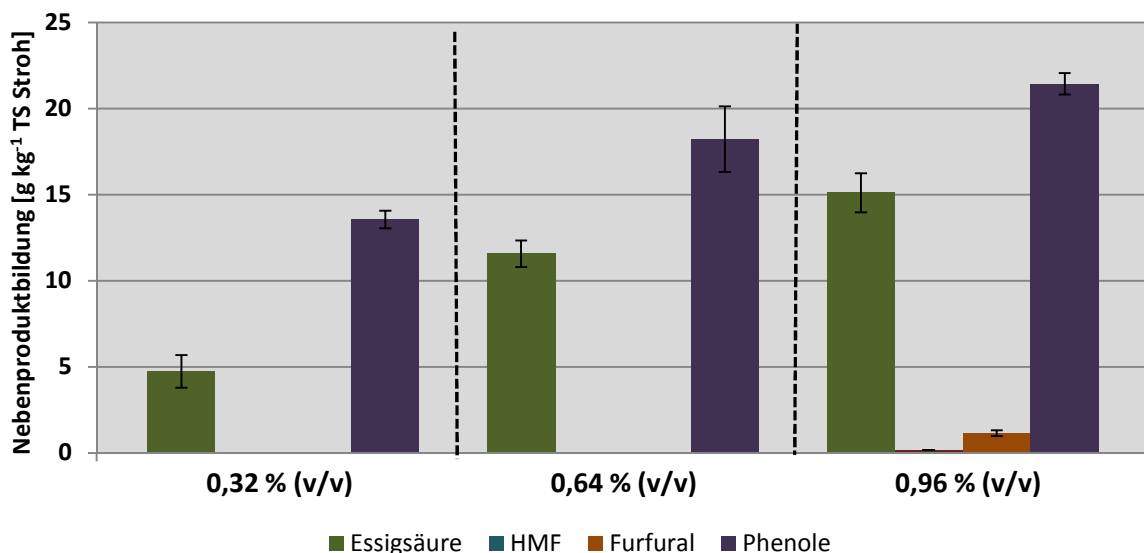


Abb. 3.12: Abhängigkeit der Nebenproduktausbeuten im TDH-Hydrolysat vom prozentualen Anteil der HNO_3 in der TDH. Sonstige TDH-Parameter: T_{TDH} : 120 °C; t_{TDH} : 60 min; m_{TDH} : 15 % (v/v).

Durch eine TDH-Behandlung bei 0,32 % (v/v) HNO_3 wurden 4,7 g Essigsäure kg^{-1} Weizen-

stroh ins TDH-Hydrolysat freigesetzt. Durch Erhöhung der eingesetzten HNO_3 auf 0,64 % (v/v) stieg die Freisetzung auf 12,5 g Essigsäure kg^{-1} Weizenstroh. Die höchste Essigsäure-Ausbeute wurde mit 15 g kg^{-1} bei einem prozentualen Säureanteil von 0,96 % (v/v) erreicht. Auch die Ausbeuten an phenolischen Verbindungen erhöhten sich mit zunehmender Säure-Konzentration. Wurden bei 0,32 % (v/v) HNO_3 knapp 13 g kg^{-1} freigesetzt, erhöhte sich die Ausbeute bei 0,64 bzw. 0,96 % (v/v) auf jeweils 18,5 bzw. 21,5 g kg^{-1} Weizenstroh. Die beiden Furane Furfural und HMF konnten kaum nachgewiesen werden. Einzig bei einer HNO_3 -Konzentration von 0,96 % (v/v) wurden geringe Mengen an Furfural bzw. an HMF freigesetzt.

3.1.3.2 Erhöhung der Säure-Konzentration bei gleichzeitiger Erhöhung der Behandlungstemperatur

Abb. 3.13 zeigt die Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat von der eingesetzten Menge an HNO_3 bei der TDH. Die Säure-Konzentrationen wurde auf 0,32 %, 0,64 % und 0,96 % (v/v) Salpetersäure eingestellt. Gleichzeitig wurde die TDH-Behandlungstemperatur auf 150 °C gesteigert. Es zeigte sich, dass mit steigender Säure-Konzentration die Freisetzung der Xylose ins TDH-Hydrolysat reduziert wurde. Die höchste Xylose-Ausbeute wurde bei einer Säure-Konzentration von 0,32 % (v/v) freigesetzt. Die Glucose-Ausbeute im TDH-Hydrolysat hingegen war in allen drei Ansätzen relativ ähnlich.

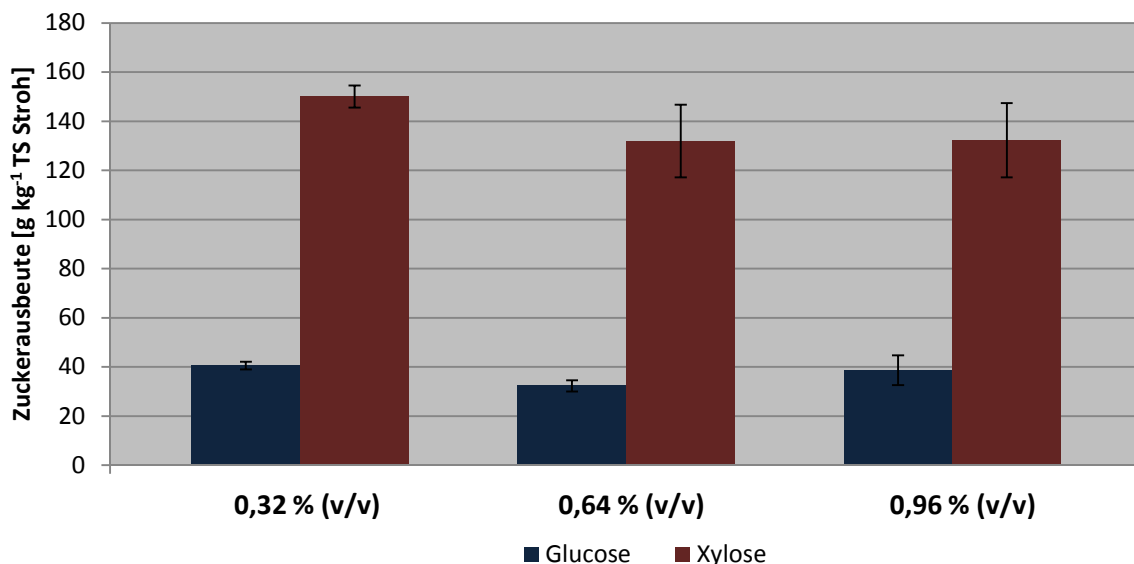


Abb. 3.13: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat vom prozentualen Anteil der HNO_3 in der TDH. Sonstige Prozessparameter bei der TDH: T_{TDH} 150 °C; t_{TDH} 60 min; c_{HNO_3} ; m_{TDH} 15 % (v/v).

Bei einer Säure-Konzentration von 0,32 % (v/v) wurde 142 g Xylose kg⁻¹ Weizenstroh ins TDH-Hydrolysat freigesetzt. Eine Steigerung der HNO₃-Konzentration auf 0,64 % (v/v) reduzierte die freigesetzte Menge auf 135 g Xylose kg⁻¹ Weizenstroh. Eine weitere Erhöhung der Säure-Konzentration führte zu einer Stagnation der Xylose-Ausbeute. Bezogen auf die Glucose-Ausbeute wurden sowohl bei 0,32 % als auch bei 0,96 % (v/v) knapp 40 g kg⁻¹ Weizenstroh freigesetzt. Salpetersäure-Konzentrationen von 0,64 % (v/v) führten zu einer Verringerung der Glucose-Ausbeute.

In Abb. 3.14 sind die Glucose- und Xylose-Ausbeuten im enzymatischen Hydrolysat in Abhängigkeit von der Säure-Konzentration bei der TDH-Behandlung. So konnte durch eine Erhöhung der HNO₃-Konzentration in TDH eine Steigerung der Freisetzung von Glucose ins enzymatische Hydrolysat erzielt werden. Die Unterschiede bei den Xylose-Ausbeuten im enzymatischen Hydrolysat waren hingegen nur gering.

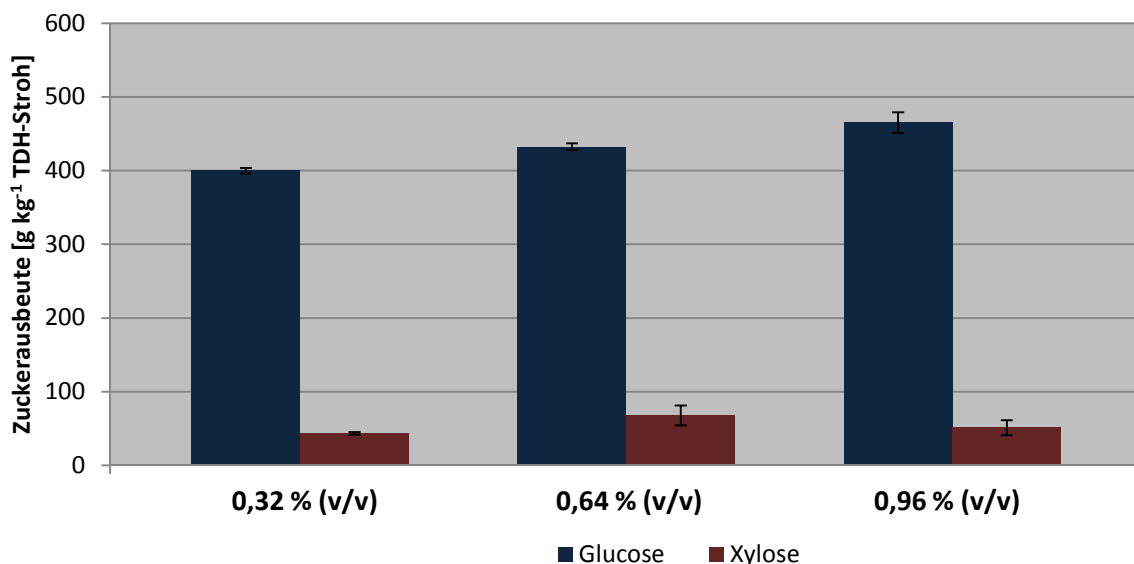


Abb. 3.14: Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat in Abhängigkeit vom prozentualen Anteil der HNO₃ bei der TDH. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. Sonstige TDH-Parameter: T_{TDH} 150 °C; t_{TDH}: 60 min; m_{TDH}: 15 % (v/v). Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.

So wurden bei 0,32 % (v/v) HNO₃ knapp 400 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh ins enzymatische Hydrolysat freigesetzt. Eine weitere Erhöhung der Salpetersäure-Konzentration auf 0,64 % (v/v) steigerte die Glucose-Konzentration auf 432 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh. Die höchste Glucose-Ausbeute wurde bei 0,96 % (v/v) HNO₃ mit 465 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh

nachgewiesen. Im Vergleich zur Behandlung mit 0,32 % (v/v) HNO₃ entsprach diesem eine Steigerung von knapp 16 % bei gleicher Konzentration an eingesetzter Enzym-Dosierung. Hinsichtlich der Xylose-Ausbeute konnten wiederum kaum signifikante Veränderung festgestellt werden. Wurden bei 0,32 % (v/v) Salpetersäure knapp 43 g Xylose kg⁻¹ TDH-Stroh freigesetzt, stieg dieser Wert bei 0,64 % (v/v) auf 70 g Xylose kg⁻¹ TDH-Stroh. Eine weitere Erhöhung der Säure-Konzentration reduzierte die freigesetzte Menge wieder auf knapp 50 g Xylose kg⁻¹ TDH-Stroh.

In Abb. 3.15 sind die Gesamtausbeuten an Glucose und Xylose aus dem TDH-Hydrolysat und dem enzymatischen Hydrolysat abgebildet. Es zeigte sich, dass durch eine Erhöhung der Säure-Konzentration während der TDH-Behandlung des Weizenstrohs die Glucose-Ausbeute leicht gesteigert werden konnten. Die höchste Glucose-Ausbeute wurde bei 0,32 % (v/v) und 0,64 % (v/v) Salpetersäure erreicht. Hinsichtlich der Xylose-Ausbeuten konnte keine eindeutige Abhängigkeit ausgemacht werden.

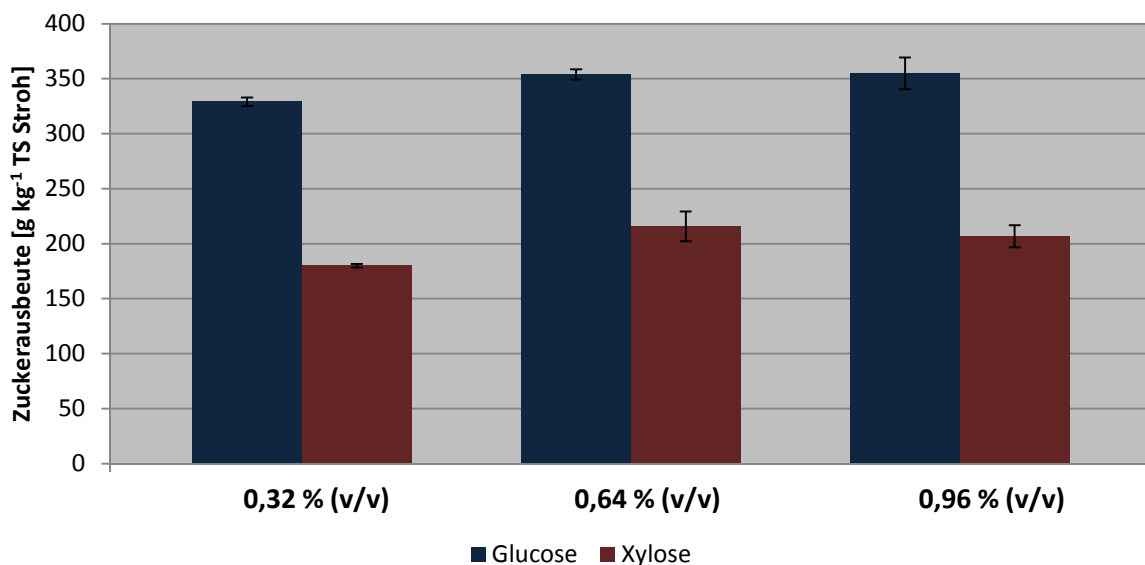


Abb. 3.15: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat vom prozentualen Anteil der HNO₃ in der TDH. Sonstige TDH-Parameter: T_{TDH}: 150 °C; t_{TDH}: 60 min; m_{TDH}: 15 % (v/v). Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS.

Wurden bei 0,32 % (v/v) HNO₃ mit 329 g Glucose kg⁻¹ Weizenstroh knapp 76 % der theoretisch enthaltenen Glucose freigesetzt, stieg die Ausbeute bei einer Säure-Konzentration von 0,64 % (v/v) auf 352 g Glucose kg⁻¹ Weizenstroh an. Dies entsprach einer theoretischen Glucose-Ausbeute von 82 %. Eine weitere Erhöhung der Säure-Konzentration auf 0,96 % (v/v)

führte zu keiner weiteren Steigerung der Glucose-Ausbeute. In Bezug auf die Xylose-Ausbeute wurde durch eine erhöhte Säure-Konzentration ebenfalls geringfügig mehr Xylose freigesetzt. So stieg die Xylose-Ausbeute von knapp 180 g Xylose kg⁻¹ Weizenstroh bei 0,32 % (v/v) Salpetersäure auf 215 g Xylose kg⁻¹ Weizenstroh bei 0,64 % (v/v). Bezogen auf die theoretische Xylose-Ausbeute entsprach dies einer Steigerung von 58 % auf 69 %. Eine weitere Steigerung der Xylose-Konzentration auf 0,96 % (v/v) verringerte die Xylose-Ausbeute wiederum auf knapp 206 g Xylose kg⁻¹ Weizenstroh. Dies entsprach einer Ausbeute von 66 % bezogen auf die theoretisch enthaltene Menge an Xylose.

3.1.4 Optimierung der Dampfzufuhr bei der TDH

Der Aufheizprozess in der TDH-Anlage erfolgte über die direkte Dampfeinleitung von superkritischem 160 °C heißen Dampfs in den unteren Teil des Druckreaktors. Um eine Übersteuerung des Aufheizprozesses zu vermeiden, erfolgte die Regelung der Dampfzufuhr über einen PI-Regler. Über die Variation des P- und I-Anteils lässt sich die Dampfzufuhr steuern. Je geringer der I-Anteil, desto schneller öffnet das Ventil und umso stärker strömt der Dampf in den Reaktorraum. Um die Dampfzufuhr zu optimieren, wurde der I-Anteil jeweils variiert. Für die folgenden Untersuchungen wurden drei verschiedene I-Werte von 2 ms (Millisekunden) bis 10 ms gewählt. Die Behandlungstemperatur wurde auf 150 °C eingestellt. Salpetersäure mit einer Endkonzentration von 0,32 % (v/v) wurde eingesetzt. Als Behandlungszeit wurde 60 min ausgewählt. Der Feststoffanteil betrug 15 %.

Abb. 3.16 zeigt den Einfluss der Heißdampfzufuhr auf die erzielten Glucose- und Xylose-Ausbeuten im TDH-Hydrolysat. Während die Glucose- und Xylose-Ausbeuten bei einem I-Anteil von 2 bzw. 40 ms fast gleich waren, wurden bei 10 ms geringfügig höhere Mengen an Xylose und Glucose freigesetzt.

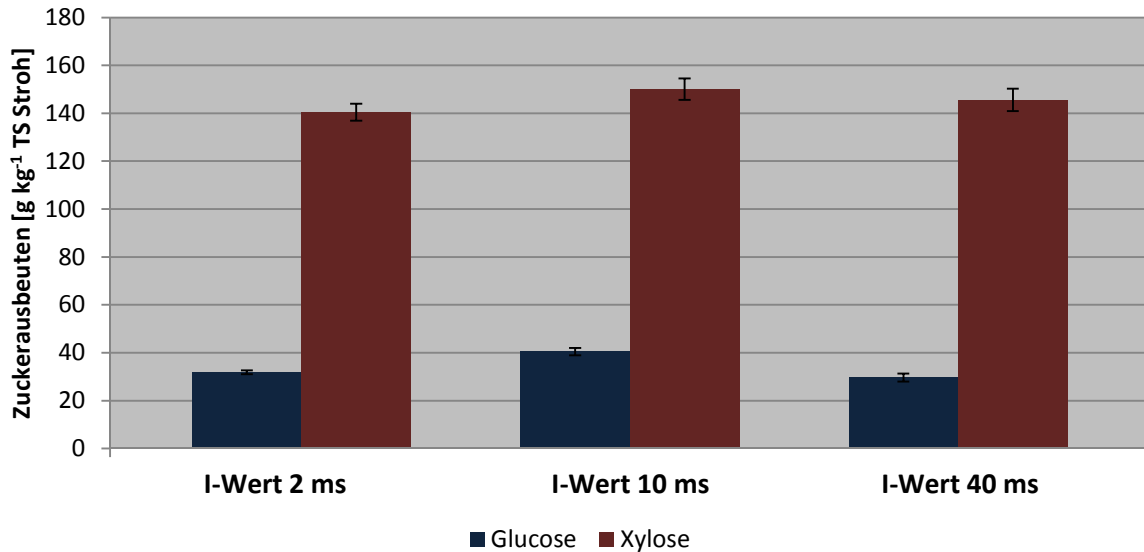


Abb. 3.16: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Heißdampf-Zufuhr bei der TDH über den I-Wert der PI-Steuerung. Sonstige Prozessparameter bei der TDH: T_{TDH} : 150 °C; t_{TDH} : 60 min; $CHNO_3$: 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).

Bei einem I-Anteil von 2 ms und 40 ms wurden 140 bzw. 142 g Xylose kg^{-1} Weizenstroh freigesetzt. Durch die Veränderung des I-Anteils auf 10 ms wurde die Xylose-Ausbeute leicht auf 150 g Xylose kg^{-1} Weizenstroh gesteigert. In Bezug auf die Glucose-Ausbeute wurde bei 2 ms knapp 31,1 g Glucose kg^{-1} Weizenstroh freigesetzt. Eine Erhöhung des I-Anteils auf 10 ms steigerte die Glucose-Ausbeute auf 40,2 g kg^{-1} Weizenstroh. Wurde der I-Anteil nochmals auf 40 ms erhöht, sank die Glucose-Ausbeute wiederum auf 29,1 g Glucose kg^{-1} .

Abb. 3.17 zeigt die Glucose- und Xylose-Ausbeuten im enzymatischen Hydrolysat bei verschiedenen I-Werten in der PI-Steuerung der Dampfungabe bei der TDH-Behandlung von Weizenstroh. Die höchste Glucose-Ausbeute wurde bei 10 ms erreicht. Eine Erhöhung bzw. Reduzierung des I-Anteils auf 40 bzw. 2 ms setzte geringfügig weniger Glucose frei. Bei einem I-Anteil von 40 bzw. 2 ms wurde deutlich mehr Xylose freigesetzt, als bei einem I-Anteil von 10 ms.

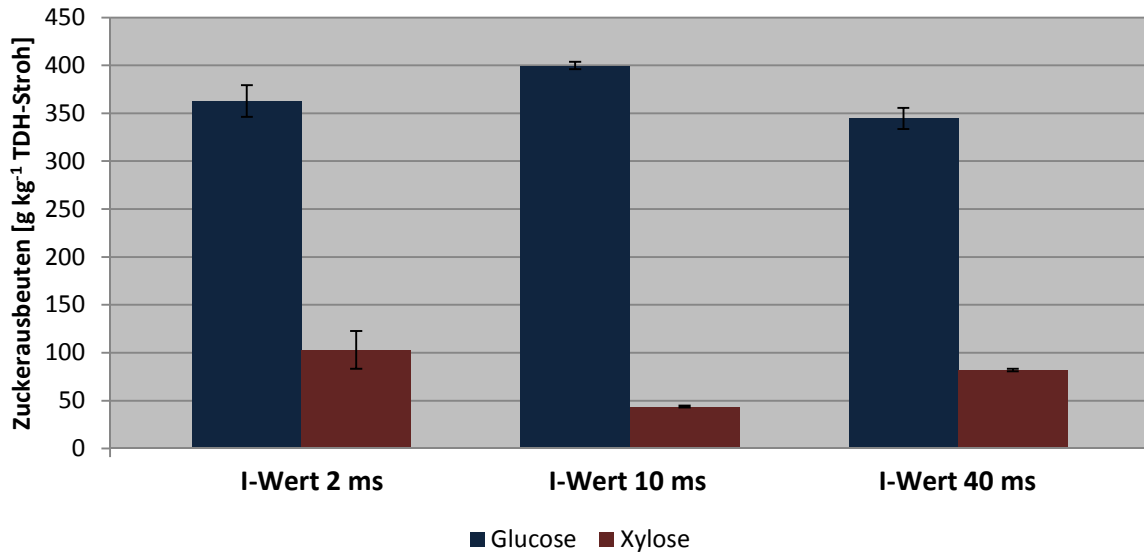


Abb. 3.17: Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat in von der Heißdampf-Zufuhr bei der TDH über den I-Wert der PI-Steuerung. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. Sonstige TDH-Parameter: T_{TDH} 150 °C; t_{TDH} : 60 min; C_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v). Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.

Die Glucose-Ausbeute bei einem I-Anteil von 2 ms lag bei 362 g kg⁻¹ TDH-Stroh im enzymatischen Hydrolysat. Die Änderung des I-Anteils auf 10 ms steigerte die Glucose-Ausbeute auf knapp 400 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh. Dies entsprach einer Steigerung von knapp 10,5 %. Eine weitere Steigerung des I-Anteils auf 40 ms reduzierte wiederum die freigesetzte Glucose-Menge auf 344 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh. In Bezug auf die Xylose-Ausbeute wurden bei einem I-Anteil von 2 ms knapp 100 g Xylose kg⁻¹ TDH-Stroh freigesetzt. Eine Erhöhung des I-Anteils auf 10 ms führte zu einem Rückgang der Xylose-Ausbeute auf 43 g Xylose kg⁻¹ TDH-Stroh. Dies entsprach einem Rückgang von fast 57 %. Eine Steigerung des I-Anteils auf 40 ms wiederum erhöhte die freigesetzte Menge an Xylose auf 82 g Xylose kg⁻¹ TDH-Stroh.

In Abb. 3.18 sind die Gesamtausbeuten von Glucose und Xylose nach der TDH im TDH-Hydrolysat und im enzymatischen Hydrolysat zusammengefasst. Es zeigte sich, dass die Variation der Dampfzufuhr nur einen geringen Einfluss auf die Freisetzung der Glucose und Xylose hatte. Vor allem die erzielten Ausbeuten an Xylose unterschieden sich kaum.

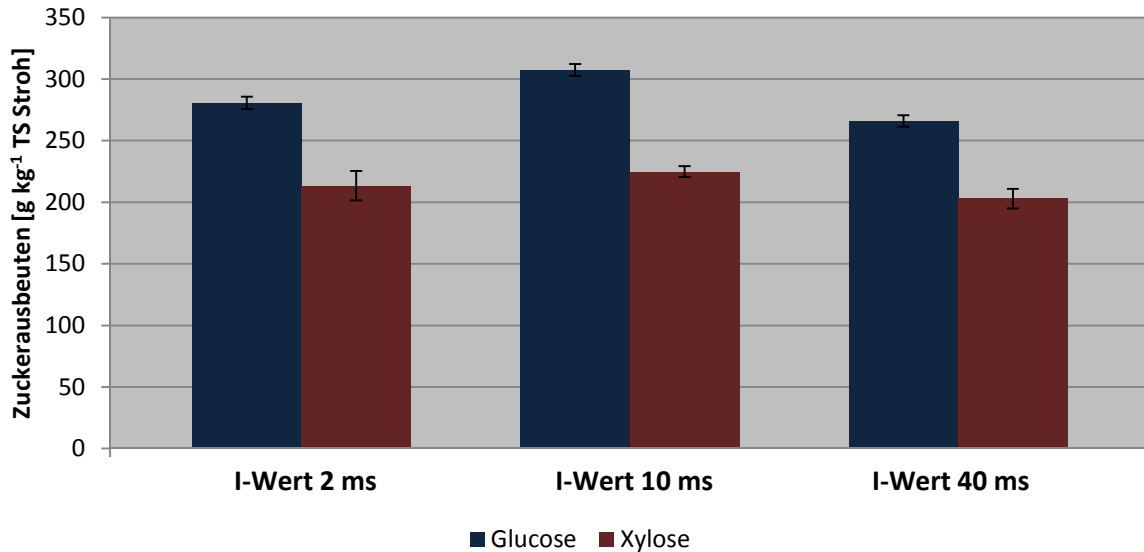


Abb. 3.18: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat von der Heißdampf-Zufuhr bei der TDH über den I-Wert der PI-Steuerung. Sonstige TDH-Parameter: T_{TDH} : 150 °C; t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v). Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.

So wurden bei einem I-Anteil von 2 ms knapp 280 g Glucose kg⁻¹ Weizenstroh freigesetzt. Dies entsprach einem Anteil von 66 % bezogen auf die theoretische Glucose-Ausbeute von 435 g kg⁻¹ Weizenstroh. Eine Steigerung des I-Anteils auf 10 ms steigerte die Glucose-Ausbeute auf 319 g Glucose kg⁻¹ Weizenstroh, was einem Glucose-Anteil von 77 % entspricht. Eine weitere Erhöhung des I-Anteils auf 40 ms reduzierte wiederum die freigesetzte Glucose-Menge auf 265 g Glucose kg⁻¹ Weizenstroh. In Bezug auf die Xylose-Ausbeute wurde bei 2 bzw. 40 ms 213 bzw. 205 g Xylose kg⁻¹ Weizenstroh freigesetzt. Bezogen auf den theoretischen Xylose-Anteil waren das 70 bzw. 67 %. Eine Reduzierung des I-Anteils auf 10 ms führte mit 224 g Xylose kg⁻¹ Weizenstroh zu einer verringerten Xylose-Ausbeute.

3.2 Vorbehandlung des Weizenstrohs in der 425 L TDH-Anlage

Im vorherigen Abschnitt wurden die Parameter für eine optimierte Vorbehandlung des Weizenstrohs in der 125 L TDH-Anlage bestimmt. Ziel im nächsten Schritt war die Implementierung des Vorbehandlungsprozesses in einen größeren Maßstab und die Verarbeitung von ganzen Ballen.

3.2.1 Vorbehandlung von Weizenstroh in der 425 L TDH-Anlage

Die Behandlungstemperatur wurde auf 150 °C eingestellt. Um die Nebenproduktbildung zu minimieren wurde die Behandlungszeit auf 30 min abgesenkt. Als Säure-Konzentration in der TDH wurden 0,64 % (v/v) Salpetersäure ausgewählt. Der Feststoffanteil betrug 15 %. Der I-Anteil beim Regelventil für die Dampfzufuhr wurde auf 10 ms gesetzt.

In Abb. 3.19 sind die Zuckerausbeuten nach der TDH und der enzymatischen Hydrolyse dargestellt. Zusätzlich ist die Gesamtbilanz für die Xylose- und Glucose-Ausbeute aufgeführt. Während nach der TDH nur relativ wenig Xylose und Glucose freigesetzt wurden, erhöhten sich die Ausbeuten nach der enzymatischen Hydrolyse deutlich.

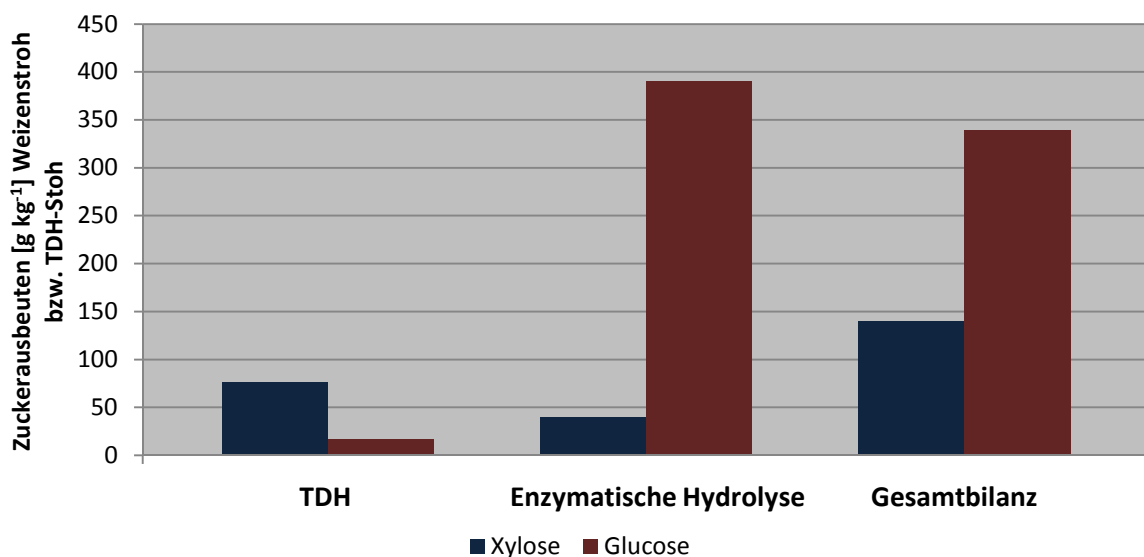


Abb. 3.19: Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat nach Vorbehandlung von losem Weizenstroh im 425 L TDH-Reaktor und anschließender enzymatischer Hydrolyse des TDH-Strohs. TDH-Parameter: T_{TDH} : 150 °C; t_{TDH} : 30 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (w/w). Enzymatische Hydrolyse: T_{EH} : 50 °C; t_{EH} : 24 h; W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.

Nach der TDH-Behandlung des Weizenstrohs wurden knapp 77 g Xylose kg⁻¹ Weizenstroh freigesetzt. Die Glucose-Ausbeute war mit 16 g kg⁻¹ Weizenstroh relativ niedrig. Infolge der enzymatischen Behandlung stieg die Glucose-Ausbeute auf 391 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh. Zusätzlich wurden 46 g Xylose kg⁻¹ TDH-Stroh freigesetzt. In der Gesamtbilanz bedeutet das

eine Xylose-Ausbeute von $145 \text{ g Xylose kg}^{-1}$ Weizenstroh und $347 \text{ g Glucose kg}^{-1}$ Weizenstroh. Bezogen auf die theoretischen Xylose und Glucose-Ausbeuten waren das 47 % bzw. 80 %.

3.2.2 Vorbehandlung eines kompletten Strohballens im 425 L-Reaktor

Nach der erfolgreichen Etablierung der Vorbehandlung von losem Weizenstroh in der 425 L TDH-Anlage wurde im nächsten Versuchsansatz ein kompletter gepresster Strohballen in der 425 L TDH-Anlage vorbehandelt und anschließend ein Teil des TDH-Strohs enzymatisch behandelt. Der Strohballen hatte eine Packdichte von $76,8 \text{ kg/ m}^3$ und wog $7,1 \text{ kg}$. Die Prozessparameter waren die gleichen wie im Abschnitt zuvor.

In Abb. 3.20 sind die Ausbeuten an Zucker nach der TDH, enzymatischen Hydrolyse und die Gesamtbilanz dargestellt.

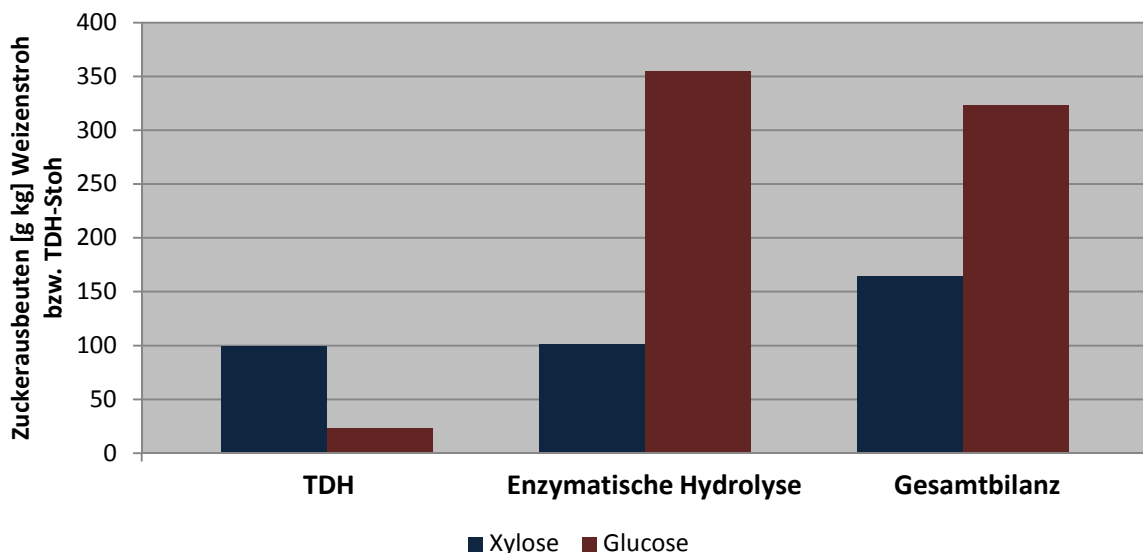


Abb. 3.20: Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat nach Vorbehandlung eines Weizenstrohballens im 425 L TDH-Reaktor und anschließender enzymatischer Hydrolyse des TDH-Strohs. TDH-Parameter: T_{TDH} : $150 \text{ }^\circ\text{C}$; t_{TDH} : 60 min ; c_{HNO_3} : $0,32 \text{ } \%$ (v/v); m_{TDH} : $15 \text{ } \%$ (w/w). Enzymatische Hydrolyse: T_{EH} : $50 \text{ }^\circ\text{C}$; t_{EH} : 24 h ; W_{EH} 200 rpm und U_{EH} $18,5 \text{ FPU g}^{-1} \text{ TS}$.

Mit knapp $100 \text{ g Xylose kg}^{-1}$ Weizenstroh wurden bei der Vorbehandlung eines ganzen Ballens 25 % höhere Xylose-Ausbeuten erreicht. Die Glucose-Ausbeuten waren mit $19 \text{ g Glucose kg}^{-1}$ Weizenstroh ähnlich gering wie bei Behandlung des losen Strohs. Durch die enzymatische Hydrolyse nach der TDH konnten $352 \text{ g Glucose kg}^{-1}$ TDH-Stroh freigesetzt werden.

Zusätzlich wurden weitere 100 g Xylose kg⁻¹ TDH-Stroh nachgewiesen. Die Gesamtausbeuten an Xylose und Glucose lagen bei 154 g kg⁻¹ bzw. 329 g kg⁻¹ Weizenstroh. Dies entsprach theoretischen Ausbeuten von 49 % für Xylose und 77 % für die Glucose.

In

Tab. 3.1 sind die Gesamtausbeuten nach der TDH und enzymatischen Hydrolyse für die Xylose und Glucose der Vorbehandlungen in der 424 L TDH-Anlage zusammengefasst. Sowohl die Glucose-, als auch die Xylose-Ausbeute war bei den Vorbehandlungen von loseem Stroh und ganzen Strohballen relativ ähnlich. Im Vergleich zur optimierten Vorbehandlung in der 125 L TDH-Anlage wurden ähnliche Ausbeuten bei der Freisetzung der Glucose erreicht. Die Xylose-Ausbeute war hingegen zum Teil deutlich höher.

Tab. 3.1: Vergleich der Glucose- und Xylose-Ausbeuten nach der TDH im 100 L und 425 L TDH-Reaktor mit anschließender enzymatischer Hydrolyse bezogen auf die theoretischen Ausbeuten (in % TS)

	Glucose	Xylose
425 L TDH-Anlage (lose)	80 %	47 %
425 L-TDH-Anlage (Ballen)	77 %	49 %

3.3 Energiebilanzierung im 125 L TDH-Reaktor

Der Energieverbrauch ist ein wichtiger Faktor bei der Vorbehandlung von Weizenstroh in der TDH. Neben der Energie für die mechanische Zerkleinerung des Weizenstrohs, verbraucht vor allem der Aufheizprozess eine große Menge an Energie. Auf eine weiter gehende mechanische Vorbehandlung wurde in dieser Arbeit verzichtet. So macht der Behandlungsprozess des Weizenstrohs in der TDH den größten Anteil am Energieverbrauch aus. Am Beispiel der optimierten Vorbehandlung in der 125 L TDH-Anlage wurde eine Energiebilanzierung durchgeführt. Hierbei wurden zwei Szenarien untersucht. Im ersten Szenario erfolgte die Aufheizung in zwei Schritten, im ersten wurde der Reaktor auf 120 °C aufgeheizt, dabei wurde mehrmals das Außenventil geöffnet, um den Aufheizprozess zu beschleunigen (die kalte Luft entweicht nach draußen). Durch das Öffnen des Außenventils entweicht allerdings auch ein Teil des Heißdampfes wieder. Im zweiten Szenario erfolgte der Aufheizprozess in einem Schritt bis zur Behandlungstemperatur von 150 °C ohne zwischenzeitliche Öffnung

des Außenventils.

3.3.1 Zweistufiger Aufheizprozess bei der TDH (Szenario 1)

Als Prozessparameter wurden die zuvor optimierten Behandlungsparameter für die Vorbehandlung von Weizenstroh in der 125 L TDH-Anlage gewählt. In Tab. 3.2 sind diese zusammengefasst. Zusätzlich zu den 5 L eingesetzten Leitungswasser erfolgte eine weitere Wasserzufuhr durch den eingeleiteten Heißdampf. Um die Menge bestimmen zu können, wurde am Ende der Behandlungsphase keine Druckentspannung nach außen durchgeführt. Bei der Abkühlung kondensierte der Dampf aus. Durch Auswiegen wurde das zusätzliche Volumen an Wasser bestimmt.

Tab. 3.2: Behandlungsparameter bei der Bestimmung der Energiebilanz in der 125 L TDH-Anlage.

Prozessparameter	Wert
Weizenstrohmenge	0,75 kg
Wasser	5 L
Temperatur	150 °C
Behandlungszeit	60 min
Säure-Konzentration	0,32 % (v/v)

Für die Energiebilanzierung wurde die hinzugefügte Salpetersäure aufgrund der geringen Menge vernachlässigt. Der Metallkorb, in welchen das Weizenstroh gefüllt wurde, hatte ein Leergewicht von 7,76 kg und bestand aus Edelstahl.

Das Auswiegen des Flüssigkeitsvolumens nach der TDH-Behandlung ergab 14,4 L Hydrolysat. Zusätzlich waren im TDH-Stroh noch 1,79 L als Flüssigkeit enthalten. Somit ergab sich eine Gesamtmenge von 16,2 L. Abzüglich der 5 L Leitungswasser, wurden 11,2 L Wasser bei der Dampferzeugung verbraucht.

In einem ersten Schritt wurde eine Energiebilanzierung für die 5 L Leitungswasser, die 0,75 kg Weizenstroh und den 7,76 kg Metallkorb aus Edelstahl. Zur Ermittlung der Energiemenge wurde die folgende Formel verwendet:

$$Q = c * m * \Delta T$$

Gleichung 12: Formel zur Berechnung der benötigten thermischen Energie bei der Erwärmung von Körpern, Flüssigkeiten oder Gasen mit dem Gewicht m (in kg) um eine bestimmte Temperaturdifferenz ΔT (in Kelvin). Für jede Substanz ergibt sich eine spezifische Wärmekapazität c (in kJ / kg * K). Hierbei ist m die eingesetzte Masse.

Q ist hierbei die thermische Energie, die der Materie zugeführt werden muss. Die Variable m ist die entsprechende Masse (z.B. des Leitungswassers), ΔT ist die Temperaturdifferenz angegeben in Kelvin und c bezeichnet die spezifische Wärmekapazität des jeweiligen Materials in kJ / kg K. In Tab. 3.3 sind die spezifischen Wärmekapazitäten für Wasser, Stroh und Edelstahl aufgelistet. Die Berechnung der Wärmemenge für das Weizenstroh und den Edelstahl war somit relativ trivial. Als Ausgangstemperatur wurden 25 °C gewählt. Für das Weizenstroh und den Edelstahlkolb ergab sich ein Wärmebedarf von 672,2 kJ für die Aufheizung auf 150 °C.

Tab. 3.3: Spezifische Wärmekapazitäten für die verwendeten Materialien.

Material	Spezifische Wärmekapazität
Wasser	4,184 kJ/ kg K
Weizenstroh	2,1 kJ/ kg K
Edelstahl	0,490 kJ/ kg K

Bei der Berechnung des Energiebedarfs für die Erwärmung des Wassers gilt es eine besondere Eigenschaft zu berücksichtigen. Bei Temperaturen über 100 °C verändert sich der Aggregatzustand von flüssigem Wasser in Wasserdampf. Die Energie, welche hierfür benötigt wird, wird auch als Verdampfungswärme bzw. Verdampfungsenergie bezeichnet. Bei Wasser beträgt diese 2257 kJ/ kg. Darüber hinaus galt es zu beachten, dass sich die spezifische Wärmekapazität von Wasserdampf gegenüber der von flüssigem Wasser unterscheidet und bei 1,87 kJ / kg K liegt. Hieraus ergibt sich ein Wärmebedarf von insgesamt 10.065 kJ für die Erhitzung des Wassers. Zusammen mit dem Stroh und dem Edelstahl ergibt sich ein Energiebedarf von 10736 kJ. Dies entspricht umgerechnet 2,98 kWh. Für die benötigte Wasser, bzw. Dampfmenge wurde ebenfalls der Energiebedarf berechnet. Um die 11,2 L Wasser in 150 °C heißen Dampf umzuwandeln wurden 30.030 kJ verbraucht. Dies waren umgerechnet

8,34 kWh. Der Gesamtenergieverbrauch betrug 40.766 kJ bzw. 1.132 kWh. In Abb. 3.21 sind die Energiemengen nochmals im Verhältnis zueinander aufgetragen. Wie schon erwähnt, machte vor allem die Energie, welche benötigt wurde um das flüssige Wasser in Heißdampf zu überführen einen großen Teil der verbrauchten Energie aus. In diesem Zusammenhang muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die Bilanzierung nicht ganz vollständig war. Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, erfolge der Aufheizvorgang in zwei Phasen. In der ersten Phase wurde die TDH auf 120 °C aufgeheizt. Nach Erreichen eines Innendrucks von 1,20 bar öffnete ein Ventil und wurde eine Druckentspannung durchgeführt. Die so entweichende Dampfmenge konnte nicht berechnet werden, muss aber bei der Bilanzierung mit eingerechnet werden.

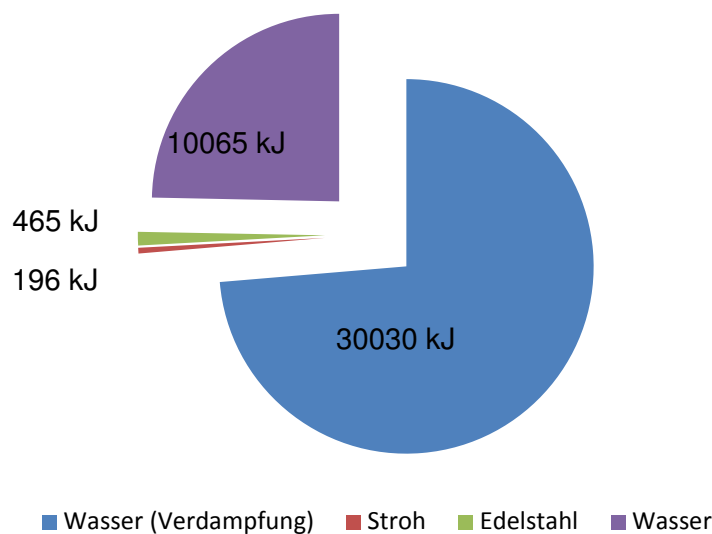


Abb. 3.21: Prozentuale Verteilung der benötigten Energiemengen beim zweistufigen Aufheizprozess auf 150 °C bei der TDH.

3.3.2 Einstufiger Aufheizprozess bei der TDH (Szenario 2)

Im vorherigen Szenario wurde der Aufheizprozess über zwei Phasen beschrieben. Im zweiten Szenario wurde die Aufheizphase an einem Stück durchgeführt. Die benötigte Wassermenge sank auf 9,6 L. Das waren fast 52 % weniger als zuvor. Der Energiebedarf für das Weizenstroh, den Edelstahl und die 5 L Leitungswasser war der gleiche wie bei der anderen Aufheizmethode. Der Energiebedarf für die Dampferzeugung reduzierte sich auf 25359 kJ, das waren knapp 44 % weniger. Der Gesamtenergiebedarf reduzierte sich auf 46724 kJ bzw. knapp 13 kWh.

In Abb. 3.22 **Abb. 3.22** ist die Verteilung der benötigten Energiemenge graphisch dargestellt. Wie zuvor nimmt auch die die Verdampfungsenergie den höchsten Anteil ein, allerdings deutlich weniger als zuvor.

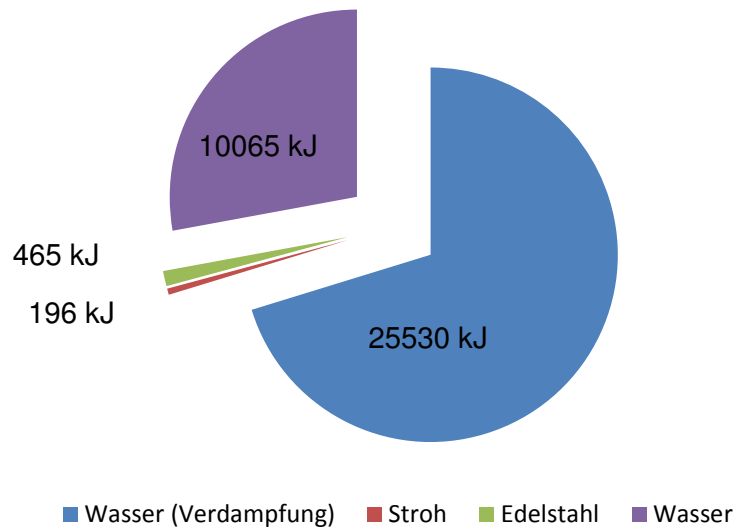


Abb. 3.22: Prozentuale Verteilung der benötigten Energiemengen beim einstufigen Aufheizprozess auf 150 C bei der TDH.

Um den Einfluss des Aufheizprozesses auf die erzielten Glucose- und Xylose-Ausbeuten nach der Vorbehandlung darzustellen, wurde das mit dem in Szenario 2 vorbehandelte Weizenstroh in einer enzymatischen Hydrolyse weiterbehandelt.

In Abb. 3.23 sind die Glucose- und Xylose-Ausbeuten im Hydrolysat nach der TDH-Behandlung, der enzymatischen Hydrolyse und eine Gesamtbilanz dargestellt.

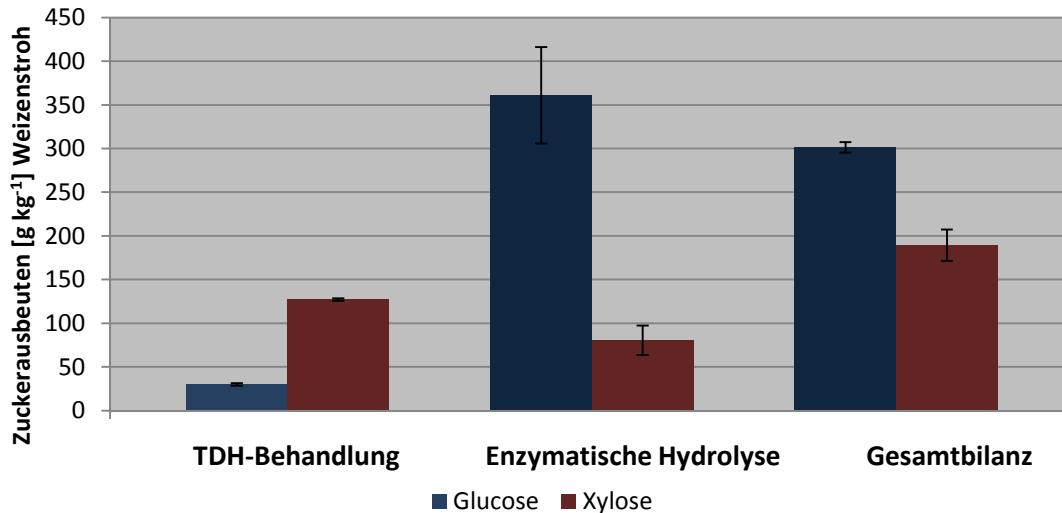


Abb. 3.23: Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat nach Vorbehandlung von Weizenstroh im 125 L TDH-Reaktor und anschließender enzymatischer Hydrolyse des TDH-Strohs. TDH-Parameter: T_{TDH} : 150 °C; t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (w/w). Enzymatische Hydrolyse: T_{EH} : 50 °C; t_{EH} : 24 h; W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.

Nach der TDH-Behandlung des Weizenstrohs wurden 30 g Glucose kg⁻¹ Weizenstroh und 127 g Xylose kg⁻¹ Weizenstroh freigesetzt. Im Vergleich zur TDH-Behandlung mit konventioneller Aufheizphase (Szenario 1, siehe Kapitel 4.1.1) wurde eine niedrigere Ausbeute erzielt. So wurden bei dem konventionellen Aufheizprozess 40 g Glucose kg⁻¹ Weizenstroh und 137 g Xylose kg⁻¹ TDH-Stroh nachgewiesen. Nach der enzymatischen Hydrolyse wurden 361 g Glucose und 80 g Xylose kg⁻¹ freigesetzt. Insgesamt wurden knapp 300 g Glucose kg⁻¹ Weizenstroh gelöst. Dies entsprach bezogen auf die theoretische Glucose-Ausbeute einer 69 % Freisetzung. Die Xylose-Ausbeute betrug 189 g Xylose kg⁻¹ Weizenstroh, was einer Freisetzung von knapp 61 % entsprach. Nach 48 h enzymatischer Hydrolyse stiegen die Glucose bzw. Xylose-Ausbeuten auf 322 bzw. 198 g kg⁻¹ Weizenstroh, was einer Freisetzung von 75 bzw. 63 % entsprach.

3.4 Verbesserung der enzymatische Hydrolyse des TDH-Strohs

Im Kapitel 4.1 konnte gezeigt werden, dass durch eine Optimierung der Vorbehandlung von Weizenstroh in der TDH bis zu 80 % der enthaltenen Glucose, bezogen auf das unbehandelte Weizenstroh, nach der enzymatischen Hydrolyse freigesetzt wurde. Bei einer separaten

Bilanzierung der enzymatischen Hydrolyse des TDH-Strohs zeigt sich allerdings, dass die Ausbeuten geringer ausfallen. Um dieses zu verdeutlichen, ist in Tab. 3.4 die Zusammensetzung des Weizenstrohs nach der Vorbehandlung in der TDH dargestellt. Die Vorbehandlung wurde bei 150 °C für 60 min mit einer Endkonzentration an Salpetersäure von 0,32 % (v/v) durchgeführt. Der Feststoffanteil lag bei 15 %. Die Analyse der Zusammensetzung erfolgte nach einem Verfahren der NREL von Sluiter et al. (2008). Zum Vergleich ist ebenfalls die Zusammensetzung des unbehandelten Weizenstrohs vor der TDH-Vorbehandlung aufgeführt.

Tab. 3.4: Zusammensetzung des Weizenstrohs nach einer TDH-Behandlung bei 150 °C mit 0.32 % (v/v) Salpetersäure für 60 min.

Fraktion	TDH-Stroh [%, w/w TS]	Weizenstroh [%, w/w TS]
Cellulose	51,2	39,5
Hemicellulose	13,8	28,9
Lignin	27,6	18,1

Basierend auf diesen Werten lagen die theoretischen Glucose-Ausbeuten für TDH-Stroh bei 563 g kg⁻¹ TDH-Stroh bzw. 435 g kg⁻¹ beim unbehandelten Weizenstroh (Berechnung siehe Kapitel 3.1.3). Hier wird deutlich, dass die zu erzielenden Zuckerausbeuten abhängig davon waren, welche Basis zur Berechnung hinzugezogen wurde. Bei der Optimierung der Vorbehandlung wurde diese auf Basis des unbehandelten Weizenstrohs vor der TDH-Behandlung gemacht. Hieraus ergaben sich auch die maximalen Glucose-Ausbeuten von 80 %. Bei einer Betrachtung der enzymatischen Hydrolyse des TDH-Strohs ergab sich allerdings eine andere Situation. Um dies zu verdeutlichen wurde eine enzymatische Hydrolyse des TDH-Strohs bei 50 °C und pH 5,5 durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 24 h. Die Enzym-Dosierung des Enzympräparats Cellic CTec 2 (Firma Novozymes) lag bei 18,5 FPU g⁻¹ TS TDH-Stroh. Die erzielte Glucose-Ausbeute lag bei 398 g kg⁻¹, was 70 % der theoretisch möglichen Glucose-Freisetzung entsprach. Um dieses zu bestätigen ist in Tab. 3.5 die Zusammensetzung des enzymatisch-abgereicherten Strohs nach der enzymatischen Hydrolyse dargestellt. Die Analyse erfolgte wiederum nach Sluiter et al. (2008). Mit knapp 31,6 % war immer noch ein signifikanter Anteil an Cellulose im enzymatisch-abgereicherten Stroh enthalten. Die Hemicellulose wurde nahezu vollständig abgebaut. Das Lignin bleibt nahezu vollständig zurück und macht dementsprechend den größten Anteil im enzymatisch-abgereicherten Stroh aus.

Tab. 3.5: Zusammensetzung des Weizenstrohs nach der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. TDH-Parameter: T_{TDH} : 150 °C; t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).

Bestandteil:	Anteil [%, w/w TS]
Cellulose	31,6
Hemicellulose	4,5
Lignin	60

3.4.1 Temperaturoptimierung der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh

Um die Problematik der Temperaturempfindlichkeit der verwendeten Enzym-Präparate zu verdeutlichen, wurden diese in drei Ansätzen zwischen 3 h und 24 h bei 50 °C im 0,2 M Natriumacetat-Puffer mit pH 5,5 inkubiert. Die Enzym-Dosierung lag bei 18,5 FPU g⁻¹ TS TDH-Stroh. Im Anschluss wurde das TDH-Stroh zugegeben. Das Stroh wurde zuvor bei 150 °C und 0,32 % (v/v) Salpetersäure für 60 min in der TDH vorbehandelt. Nach einer dreistündigen enzymatischen Hydrolyse wurde aus jedem Ansatz eine Probe entnommen. Als Referenz diente eine enzymatische Hydrolyse des TDH-Strohs ohne vorherige Inkubation der Enzyme bei 50 °C.

Abb. 3.24 zeigt die Glucose-Konzentrationen im enzymatischen Hydrolysat im Vergleich nach einer dreistündigen Hydrolyse von TDH-Stroh. Bereits nach einer dreistündigen Inkubation der Enzyme bei 50 °C in reinem Puffer wurde im Vergleich zu einer Referenz ohne Inkubation deutlich weniger Glucose in einer anschließenden enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh freigesetzt. Bei den Inkubationen über 12 h und 24 h wurde die erzielte Glucose-Ausbeute in der anschließenden enzymatischen Hydrolyse weiter reduziert.

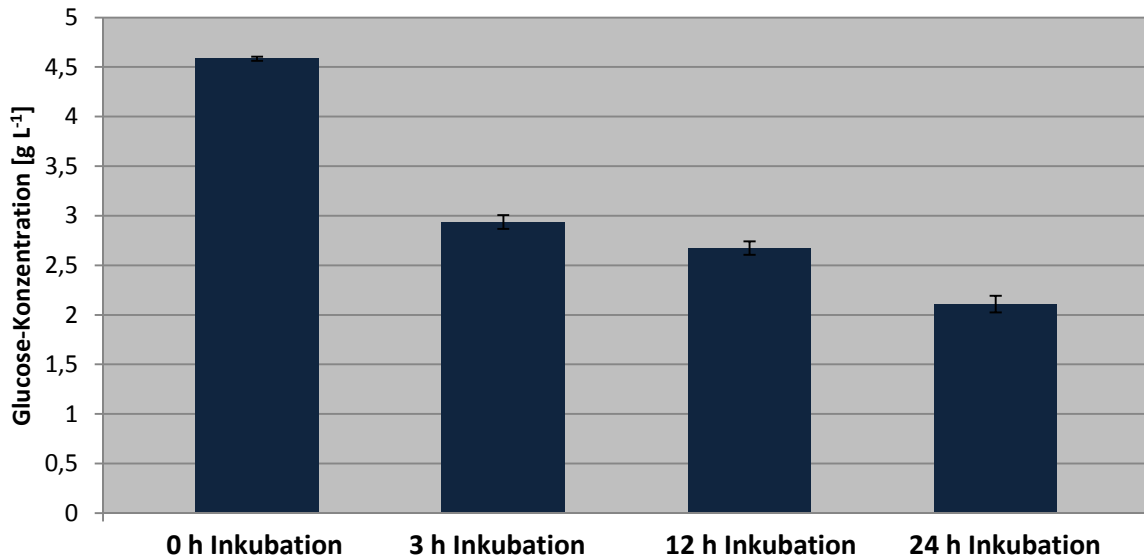


Abb. 3.24: Die Abhängigkeit der Glucose-Konzentration im enzymatischen Hydrolysat von der Inkubationszeit des Enzym-Präparats bei 50 °C im Natriumacetat-Puffer. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS.

Wurden bei der Referenzprobe nach dreistündiger enzymatischer Hydrolyse noch 4,6 g Glucose L⁻¹ freigesetzt, reduzierte sich die Konzentration auf 2,9 g L⁻¹ nach einer vorherigen dreistündigen Inkubation der Enzyme bei 50 °C. Dies entsprach einem Rückgang von 36 %. Eine weitere neunstündige Inkubation bei 50 °C verringerte die Konzentration in der anschließenden enzymatischen Hydrolyse auf 2,7 g L⁻¹. Dieses war nur noch ein geringfügiger Rückgang im Vergleich zu einer dreistündigen Inkubation. Nach 24 h Inkubation sank die Glucose-Konzentration in der anschließenden enzymatischen Hydrolyse auf 2,1 g L⁻¹. Im Vergleich zur Referenz-Hydrolyse waren es 54 % weniger.

Eine naheliegende Maßnahme, um die Aktivitätsverluste zu verringern und somit die Glucose-Ausbeuten nach der enzymatischen Hydrolyse insgesamt zu steigern wäre die Reduzierung der Inkubationstemperatur. In Abb. 3.25 ist das Ergebnis fünf verschiedener enzymatischer Hydrolysen bei unterschiedlichen Temperaturen zwischen 30 °C und 60 °C dargestellt. Entgegen der Erwartungen führte eine Reduzierung der Inkubationstemperatur zu keiner Steigerung der Glucose-Ausbeute, vielmehr verringerten sich die Ausbeuten teilweise sogar. Eine Steigerung der Temperatur auf 55 °C erhöhte die Glucose-Ausbeute nach einer 24 h-Inkubation deutlich. Eine weitere Steigerung auf 60 °C reduzierte die Ausbeuten wiederum, noch unter die Glucose-Ausbeuten bei 30 °C Inkubationstemperatur.

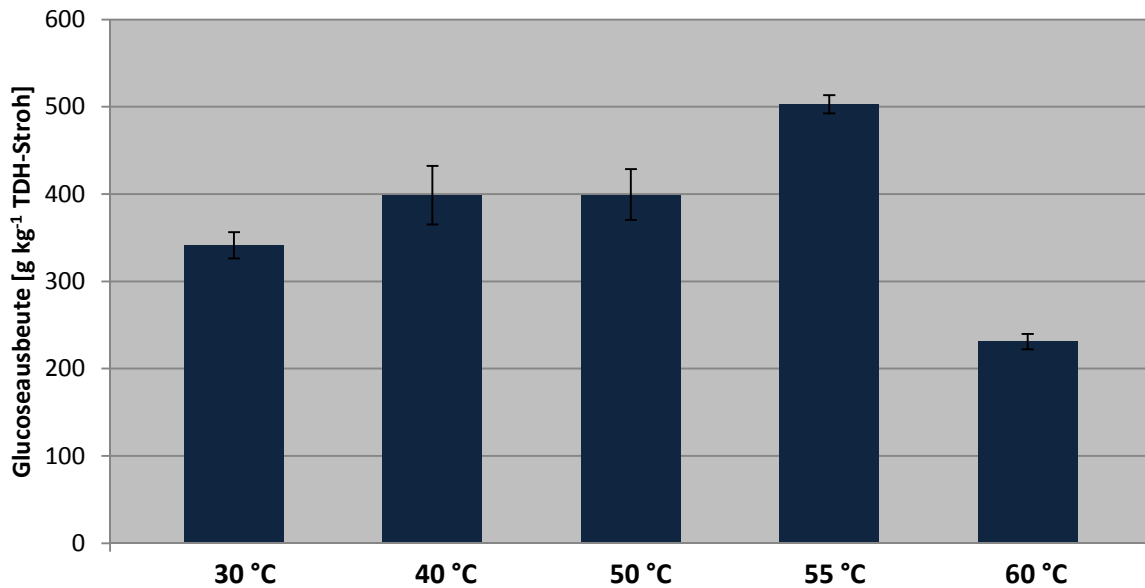


Abb. 3.25: Abhängigkeit der Glucose-Ausbeute im enzymatischen Hydrolysat von der Inkubationstemperatur bei der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh. Sonstige Parameter enzymatische Hydrolyse: t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).

Wurden bei 40 °C und 50 °C jeweils 398 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh freigesetzt, sank die Ausbeute bei 30 °C Inkubationstemperatur auf 341 g kg⁻¹ TDH-Stroh. Durch eine Steigerung der Inkubationstemperatur auf 55 °C konnten Ausbeuten bis zu 501 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh erzielt werden. Dies entsprach einer Steigerung um 25 % im Vergleich zu 40 °C oder 50 °C. Eine weitere Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 60 °C reduzierte die Ausbeute auf 231 g Glucose kg⁻¹. Bezogen auf die theoretische Glucose-Ausbeute konnte durch die Erhöhung der Inkubationszeit somit 90 % der enthaltenen Glucose freigesetzt werden.

3.4.2 Optimierung der Inkubationszeit und Enzym-Konzentration

Die Versuche im 125 L TDH-Reaktor und 425 LTDH-Reaktor zeigten die hohe Effizienz der Vorbehandlung von ganzen Weizenstrohballen auch ohne vorherige mechanische Vorbehandlung. Trotzdem konnten auch hier nur maximal 75 - 80 % der theoretisch enthaltenen Glucose nach 24 h freigesetzt werden. Über eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 55 °C konnte die Ausbeute auf 90 % gesteigert werden. Um zu testen, ob eine längere Inkubationszeit einen ähnlichen Effekt bei 50 °C hat wurde die Behandlungszeit von 24 h auf 72 h erhöht. In einem weiteren Ansatz wurde ebenfalls die eingesetzte Enzymmenge von

18.5 FPU g⁻¹ TS auf 37 FPU g⁻¹ TS verdoppelt. Die Inkubationstemperatur betrug 50 °C bei einem pH Wert von 5.0. Für die Hydrolyse wurde TDH-Stroh aus dem TDH-Aufschluss im 125 L TDH-Reaktor verwendet. Die Parameter bei der TDH-Behandlung waren 150 °C Behandlungstemperatur mit einer Säure-Konzentration von 0,32 % (v/v) Salpetersäure (technisch, 65 % (v/v)) bei 60 min Behandlungszeit. In Abb. 3.26 sind die Glucose-Ausbeute der beiden Ansätze über einen Zeitraum von 72 h dargestellt. Während in den ersten 24 h ein starker Anstieg beobachtet werden konnte, flachte dieser im restlichen Verlauf der enzymatischen Hydrolyse ab.

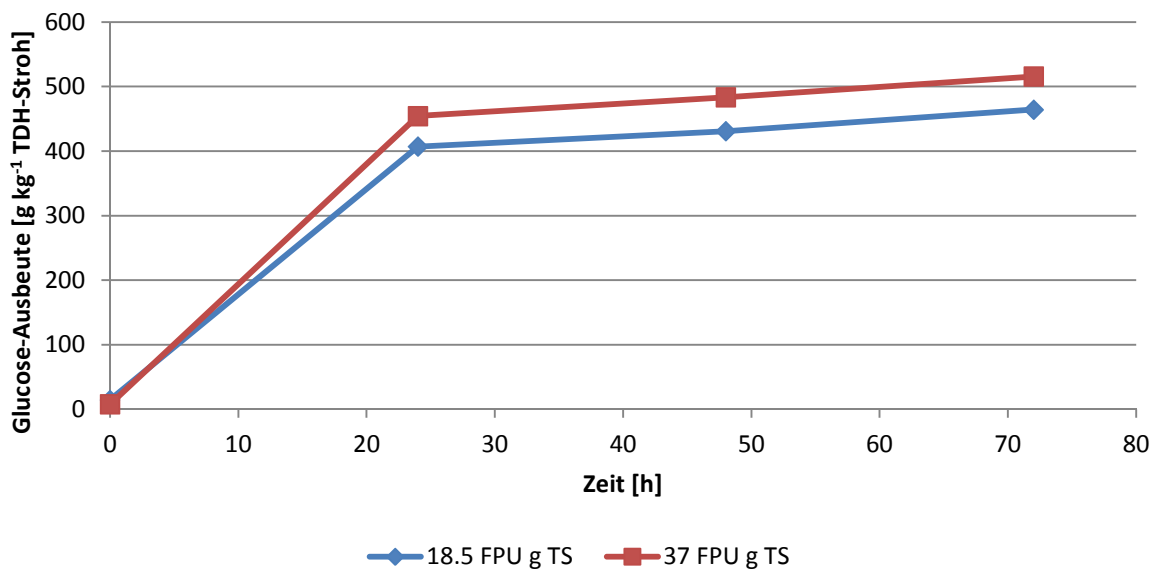


Abb. 3.26: Zeitlicher Verlauf der Glucose-Ausbeute bei der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh in Abhängigkeit von der Enzym-Dosierung. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).

So wurden nach 24 h bei einer Enzym-Dosierung von 18,5 FPU g⁻¹ TS knapp 400 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh freigesetzt. Eine Verdopplung der Enzym-Konzentration erhöhte die Ausbeute, allerdings nur um knapp 17 % auf 471 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh. Im weiteren Verlauf der enzymatischen Hydrolyse nahm die Glucose-Ausbeute nur noch geringfügig zu. Nach 48 h wurden bei 18,5 FPU g⁻¹ TS knapp 423 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh nachgewiesen. Durch die Verdopplung konnte der Wert auf annähernd 490 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh gesteigert werden und erreichte nach 72 h 510 g kg⁻¹ TDH-Stroh. Dies entsprach 95 % der theoretisch enthaltenen Glucose. Bei der einfachen Enzym-Dosierung wurde nach 72 h 475 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh freigesetzt, was wiederum 91 % der enthaltenen Glucose entsprach.

3.4.3 Optimierung des pH-Werts bei der enzymatischen Hydrolyse

Neben den verschiedenen Behandlungstemperaturen wurde auch der pH-Wert der enzymatischen Hydrolyse optimiert. Als Behandlungstemperatur wurde 50 °C gewählt. Drei verschiedene pH-Werte wurden ausgewählt (pH 4,5; 5,0 und 6,0). Die Hydrolyse erfolgte über 24 h im Schüttelwasserbad. In Abb. 3.27 sind die erzielten Glucose-Ausbeuten dargestellt. Im Gegensatz zur Inkubationstemperatur war der Einfluss des pH-Wertes deutlich geringer auf die erzielten Ausbeuten von Glucose und Xylose.

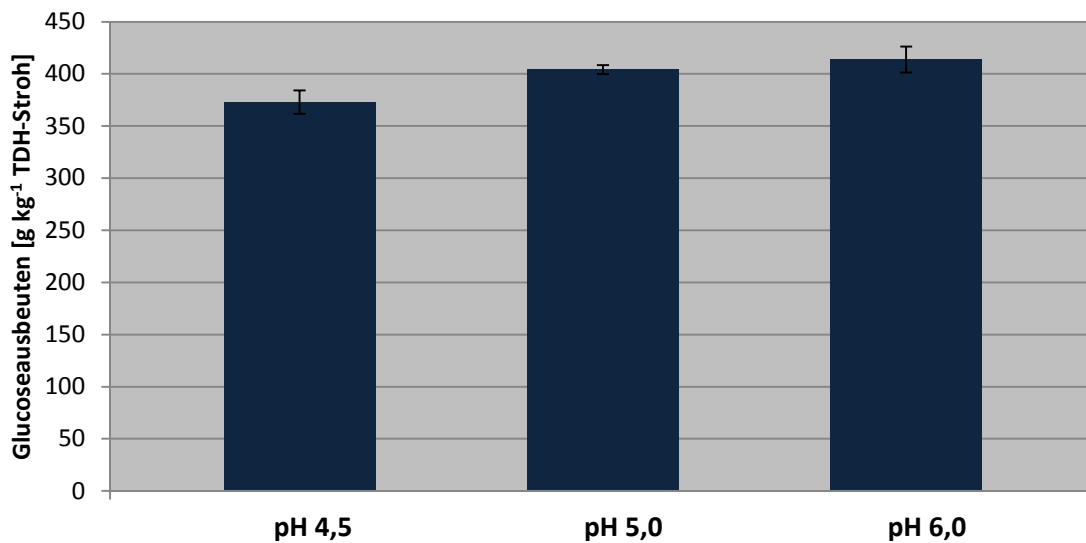


Abb. 3.27: Abhängigkeit der Glucose-Ausbeute im enzymatischen Hydrolysat vom pH-Wert bei der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh. Sonstige Parameter enzymatische Hydrolyse: t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).

Die Glucose-Ausbeute unterschied sich in den drei verschiedenen Versuchsansätzen nur marginal. Wurden bei einem pH-Wert von 4,5 knapp 329 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh freigesetzt, erhöhte sich der Wert auf 402 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh bei einem pH-Wert von 5,0 und 406 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh bei pH 6,0.

3.5 Enzymatische Hydrolyse im 100 L Rührreaktor

Nach einer erfolgreichen Etablierung der enzymatischen Hydrolyse im Schüttelkolben war der nächste Schritt die Durchführung der enzymatischen Hydrolyse im 100 L- Rührreaktor.

Abb. 3.28 zeigt eine Außen- und Innenansicht des Rührreaktors, welcher Teil der 125 L TDH-Anlage ist. Neben dem Propellerrührer befindet sich am Boden des Reaktors eine Druckluftlanze, mit der Druckluft in den Reaktor gegeben werden konnte. Außerdem konnte über eine Pumpe Flüssigkeit im Kreis gepumpt werden. Über einen Doppelmantel konnte der Reaktor geheizt und gekühlt werden. Da der Heizmantel durch Leitungswasser gefüllt wurde, konnten allerdings nur maximal 45 °C erreicht werden.



Abb. 3.28: 100 L Rührreaktor für die enzymatische Hydrolyse von TDH-Stroh (links Außenansicht und rechts Innenansicht) mit Propellerrührer und Druckluftlanze.

Für die enzymatische Hydrolyse wurde Weizenstroh verwendet, welches zuvor in der 125 L TDH-Anlage vorbehandelt wurde. Die Vorbehandlung wurde bei 150 °C und 0,32 % (v/v) HNO₃ für 60 min durchgeführt. Der Feststoffanteil lag bei 15 %.

Für die enzymatische Hydrolyse im 100 L Reaktor wurden 25 L Wasser vorgelegt und mit 3,7 kg TDH-Stroh vermischt. Das TDH-Stroh hatte einen TS-Gehalt von 17 %. Mit Natriumhydroxid-Plätzchen wurde ein pH-Wert von 5,0 eingestellt. Enzyme wurden mit einer Konzentration von 18,5 FPU g⁻¹ TS zugefügt. Die Rührerdrehzahl betrug 200 rpm. Nach drei Stunden hatte sich ein Teil des TDH-Strohs soweit zersetzt, so dass weitere 4,8 kg TDH-Stroh zugefügt werden konnten. Nach 25 h wurden weitere 1.4 kg TDH-Stroh zugefügt. Um den pH-Wert konstant zu halten wurde nach jeder Zugabe von TDH-Stroh der pH-Wert erneut auf pH 5,0 eingestellt. In Abb. 3.29 sind die Konzentrationen an freigesetzten Zuckern dargestellt. Vor allem in den ersten Stunden konnte eine deutliche Zunahme der Glucose- und Xylose-Ausbeuten beobachtet werden. Ab 24 h stagnierte die Freisetzung der Glucose. Zusätzlich wurden über fast den kompletten Zeitraum der enzymatischen Hydrolyse knapp 50 g Cellobiose kg⁻¹ TDH-Stroh im enzymatischen Hydrolysat nachgewiesen.

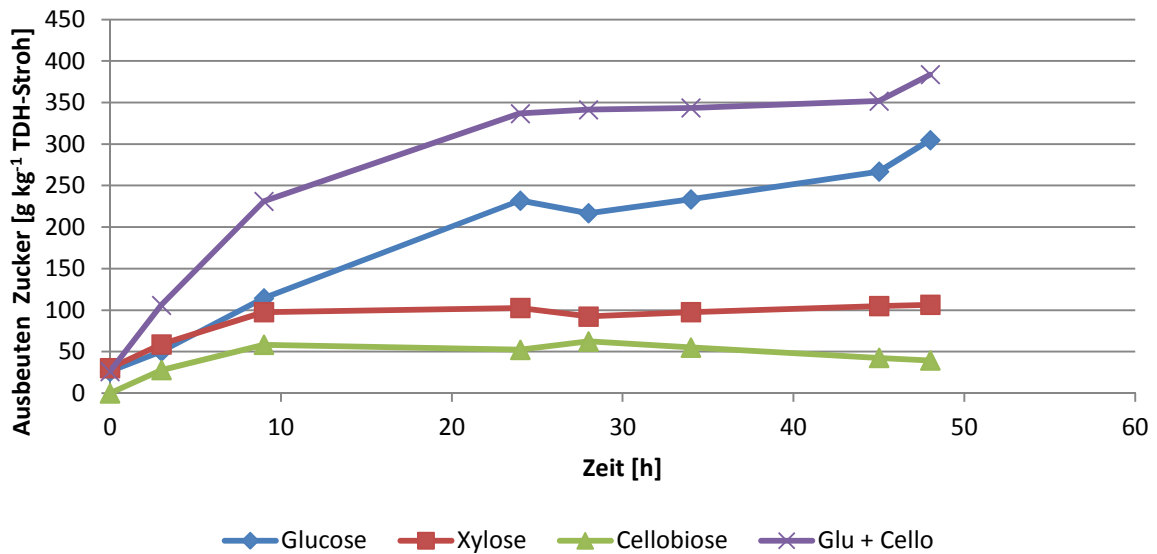


Abb. 3.29: Zeitlicher Verlauf der Zuckerausbeuten in dem enzymatischen Hydrolysat in der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh im 100 L Rührreaktor. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 45 °C; t_{EH} 48 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).

In der ersten Phase der enzymatischen Hydrolyse wurde die im TDH-Stroh verbliebene Hemicellulose abgebaut, wodurch in den ersten 9 h die Xylose-Konzentration anstieg und nach 48 h ca. 106 g Xylose kg⁻¹ TDH-Stroh freigesetzt wurde. Die Glucose-Ausbeute stieg ebenfalls über den gesamten Prozess und erreichte knapp 304 g Glucose kg⁻¹ TDH-Stroh. Darüber hinaus konnte eine signifikante Menge an Cellobiose über den gesamten Verlauf der Hydrolyse nachgewiesen werden. Nach 48 h betrug die Ausbeute knapp 39 g Cellobiose kg⁻¹. Wahrscheinlich war die Aktivität der β -Glucosidase im Enzym-Präparat zu gering, wodurch die entstehende Cellobiose nicht vollständig gespalten werden konnte. Ein Cellobiose-Molekül besteht aus zwei Glucose-Einheiten, somit ergäbe sich bei einer vollständigen Hydrolyse der Cellobiose eine Glucoseausbeute von 383 g Glucose kg⁻¹ behandeltes TDH-Stroh. Bezogen auf theoretische Glucose-Ausbeute waren das ca. 68 %. Im Vergleich zum Schüttelkolben konnten somit knapp 25 % weniger Glucose freigesetzt werden.

3.6 Ermittlung des Biogaspotentials der Reststoffe

Um die benötigte Energie für die Vorbehandlung bereitstellen zu können, sollen die anfallenden Reststoffe aus der enzymatischen Hydrolyse in einer Biogas-Anlage zur Produktion von Biogas eingesetzt werden. Um abschätzen zu können wie hoch das mögliche Biogas-

Potential ist, wurde dieses in statischen Gärtests (siehe Kapitel 2.6) ermittelt.

3.6.1 Bestimmung der Biogas-Ausbeuten

Im ersten Schritt wurde die Biogas-Ausbeute von unbehandeltem Stroh, TDH-Stroh und enzymatisch abgebautem Stroh bestimmt. Zusätzlich wurde in einem weiteren Versuch das Potential von TDH-Stroh zusammen mit dem TDH-Hydrolysat untersucht. In Abb. 3.30 sind die Ausbeuten an Biogas in NL kg^{-1} oTS über einen Versuchszeitraum von 30 Tagen angegeben. Mit Ausnahme von unbehandeltem Weizenstroh konnte in den anderen Versuchsansätzen eine starke Zunahme der Biogasproduktion in den ersten paar Tagen beobachtet werden. Die höchste Ausbeute konnte im Versuchsansatz mit TDH-Stroh und Hydrolysat nachgewiesen werden.

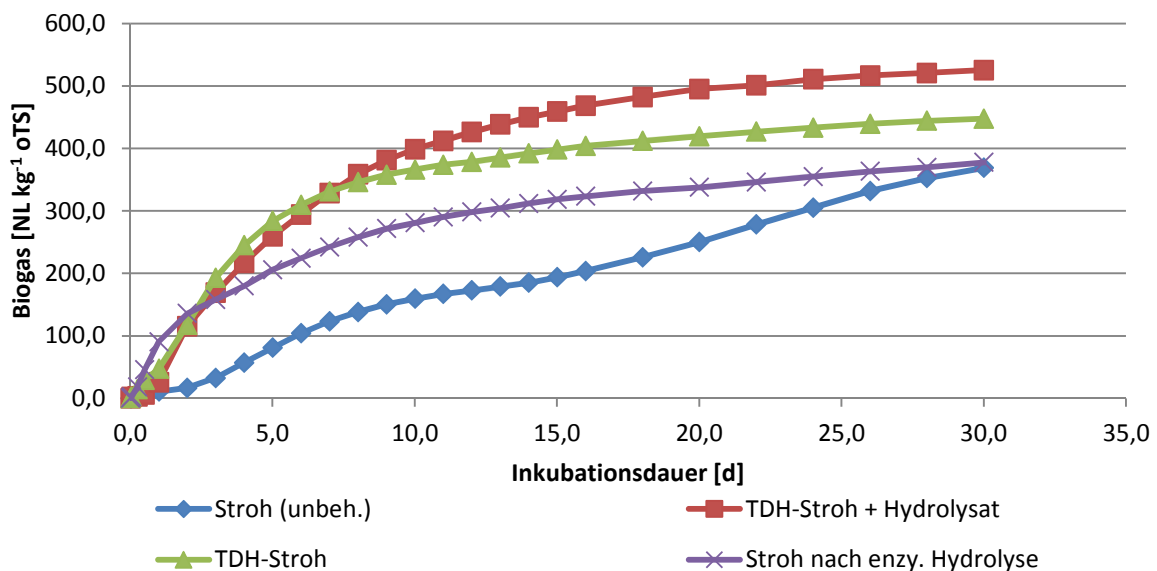


Abb. 3.30: Zeitlicher Verlauf der Gasausbeuten bei verschiedenen Substraten im statischen Gärtest über 4 Wochen mit Impfschlamm aus einer Biogasanlage.

So wurden nach 30 Tagen im TDH-Stroh mit dem TDH-Hydrolysat knapp $525 \text{ NL Biogas kg}^{-1}$ oTS erreicht. Im reinen TDH-Stroh hingegen wurden mit 447 NL kg^{-1} oTS knapp 15 % weniger Biogas produziert. Im enzymatisch-abgebauten und unbehandelten Stroh wurden nach 30 Tagen knapp 377 bzw. $368 \text{ NL Biogas kg}^{-1}$ oTS freigesetzt. Im Vergleich zu den anderen Verläufen wurde beim unbehandelten Weizenstroh in den ersten Tagen nur langsam Biogas gebildet. Erst nach 4 bis 5 Tagen stieg die Ausbeute signifikant an, flachte aber nach 10 Ta-

gen wiederum ab. Nach 18 Tagen kam es wieder zu einer deutlichen Steigerung in der Biogas-Produktion.

Neben den reinen Biogas-Ausbeuten spielen vor allem die Methananteile eine große Rolle bei der Biogas-Produktion. Methan macht den brennbaren Teil des Biogases aus. In Tab. 3.6 sind die Methangehalte und Ausbeuten nach 30 Tagen Inkubationszeit dargestellt. Neben dem Methan enthielt das Biogas auch Kohlendioxid bzw. in geringen Mengen Spurenelemente. Bei allen vier Versuchsansätzen waren die Methangehalte mit 50 – 55 Vol. % fast gleich. Wie zuvor bei den Biogas-Ausbeuten, so wurden auch bei dem Versuchsansatz mit dem TDH-Stroh und dem Hydrolysat zusammen die höchsten Methan-Ausbeuten erzielt.

Tab. 3.6: Methanausbeuten und Methangehalte im Biogas bei der Vergärung der 4 verschiedenen Substrate im statischen Gärtest nach 30 Tagen.

Substrat	Methanausbeute [NI kg ⁻¹ oTS]	Methangehalte in %
Unbehandeltes Stroh	185	50,3
TDH-Stroh+Hydrolysat	265	50,5
TDH-Stroh	237	53,0
Abgereichertes Stroh	205	54,4

3.7 Produktion von PHB in enzymatischen Hydrolysaten aus TDH-Stroh

3.7.1 Kultivierung von *Cupriavidus necator* DSM 545 im enzymatischen Hydrolysat

Im ersten Schritt wurde eine Kultivierung von *Cupriavidus necator* DSM 545 im reinen enzymatischen Hydrolysat (Bedingungen siehe Abschnitt 5.1.1) ohne Zugabe weiterer Nährstoffe durchgeführt. Um zu schauen, welche Nährstoffe im enzymatischen Hydrolysat enthalten waren, wurde eine Analyse der Zusammensetzung durchgeführt. Tab. 3.7 zeigt die Zusammensetzung des verwendeten enzymatischen Hydrolysats. Die beiden Zucker Glucose und Xylose machten dabei anteilmäßig die größte Fraktion aus. Darüber hinaus enthielt das Hydrolysat einen gewissen Anteil an Proteinen, welche durch die Zugabe der Enzympräparate zugefügt wurden. Hieraus resultierte auch der größte Teil des enthaltenen Stickstoffs. Ammoniumverbindungen wurden mit den zur Verfügung stehenden Analysemethoden (siehe Kapitel 3.6.5) nicht nachgewiesen. Auch der Phosphorgehalt war sehr gering, was darauf

schließen lässt, dass nur geringe Konzentrationen an Phosphatverbindungen enthalten waren.

Tab. 3.7: Zusammensetzung des bei der Kultivierung verwendeten enzymatischen Hydrolysats

Bestandteil	Konzentration [g L ⁻¹]
Glucose	12,8
Xylose	4,11
Proteine	0,77
Gesamtstickstoff	0,138
Phosphor	0,015

Die Analyse der Spurenelement-Zusammensetzung zeigte darüber hinaus nur geringe Mengen an Calcium, Kalium, Kobalt, Kupfer, Eisen, Magnesium, Mangan, Molybdän, Nickel und Zink an. Die Analyse wurde mittels eines ICP-MS durchgeführt (siehe Kapitel 3.6.6). Die resultierenden Werte lagen alle unterhalb der Nachweisgrenze für das hier verwendete Verfahren. In Tab. 3.8 sind die Spurenelemente mit den jeweiligen Nachweisgrenzen aufgelistet.

Tab. 3.8: Nachweisgrenzen des Verfahrens zur Quantifizierung von Spurenelementen mittels ICP-MS für eine Auswahl an relevanten Spurenelementen in einem enzymatischen Hydrolysat von TDH-Stroh.

Relevante Spurenelemente	Nachweisgrenze [mg L ⁻¹]
Calcium	3,0
Kalium	26
Kobalt	0,007
Kupfer	0,02
Eisen	3,7
Magnesium	7,0
Mangan	0,3
Molybdän	0,004
Nickel	0,013
Zink	0,2

Um zu testen, ob ein Wachstum im enzymatischen Hydrolysat möglich und PHB zu bilden, wurde eine Kultivierung über 70 h durchgeführt. In Abb. 3.31 sind die Biotrockenmasse (BTM)- und PHB-Konzentrationen zu den Zeitpunkten 30 h, 45 h und 70 h aufgeführt. Die

Ergebnisse zeigen, dass ein Wachstum von *Cupriavidus necator* im enzymatischen Hydrolysat war möglich, allerdings setzte die PHB-Bildung erst im letzten Drittel der Kultivierung ein.

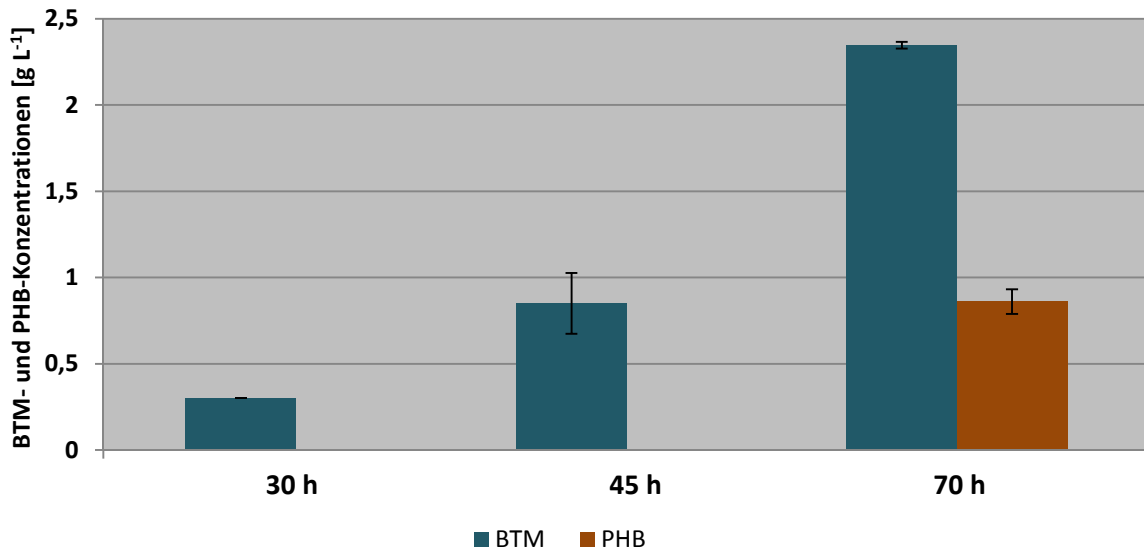


Abb. 3.31: Biotrockenmasse- und PHB-Konzentrationen zu bestimmten Zeitpunkten bei einer Kultivierung von *Cupriavidus necator* DSM 545 im Schüttelkolben mit einer Schüttelfrequenz von 121 rpm über 70 h bei 30 °C in enzymatischem Hydrolysat.

So wurden nach 30 h eine BTM-Konzentration von 0,3 g L⁻¹ nachgewiesen. Nach weiteren 15 h stieg die Konzentration auf 0,85 g L⁻¹ und erreichte nach 70 h eine Endkonzentration von 2,34 g L⁻¹ Biotrockenmasse. Die PHB-Konzentration lag bei 0,86 g L⁻¹. Dies entsprach einem Anteil an der Biotrockenmasse von 36,7 % (w/w). Das bedeutet, dass zwischen 45 h und 70 h 0,63 g L⁻¹ reine Biomasse gebildet wurden. Die Produktivität lag über den gesamten Prozess betrachtet bei 0,012 g / L h. Wird nur der Zeitraum zwischen 45 h und 70 h berücksichtigt, so lag die Produktivität bei 0,06 g / L h. In Abb. 3.32 ist der Glucose-Verbrauch zu den Zeitpunkten 30 h, 45 h und 70 h dargestellt. In den ersten 45 h wurde nur geringfügig Glucose verbraucht. So lag der Verbrauch nach 30 h bei 2,22 mM und stieg nach 45 h auf 3,33 mM an. Erst mit stärkerem Zellwachstum und einsetzender PHB-Bildung wurde deutlich mehr Glucose verbraucht. Nach 70 h waren 22,8 mM Glucose verbraucht. Das Verhältnis zwischen Glucose und PHB lag bei 0,21 g PHB g⁻¹ Glucose.

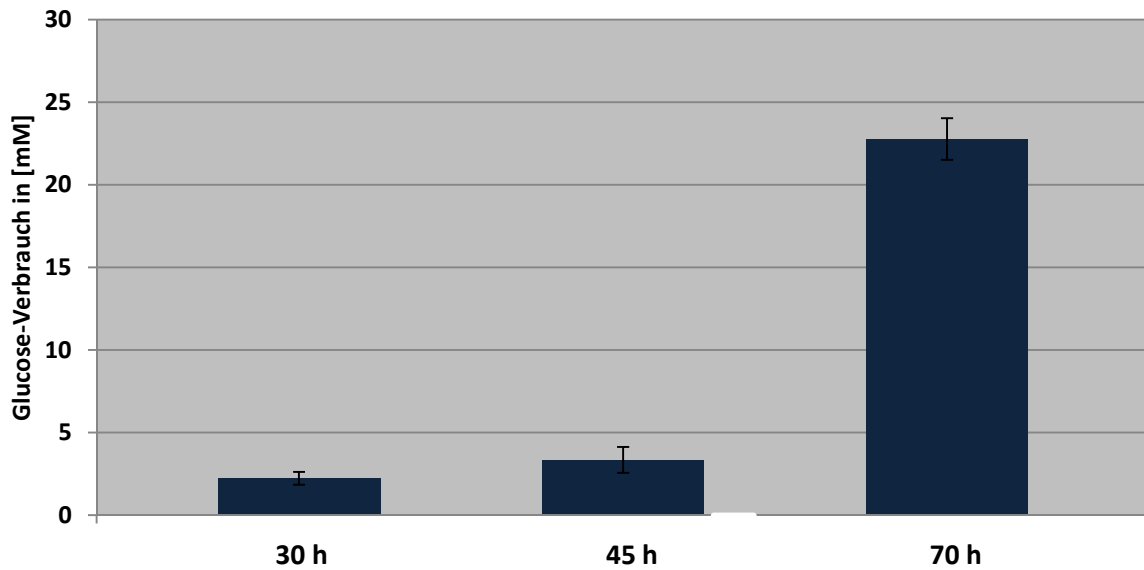


Abb. 3.32: Glucose-Verbrauch zu bestimmten Zeitpunkten während einer Kultivierung von *Cupriavidus necator* über 70 h bei 30 °C in reinem enzymatischem Hydrolysat. Die Kultivierung erfolgte im Schüttelinkubator bei 121 rpm.

3.7.2 Zugabe von Spurenelementen zum enzymatischen Hydrolysat

Nachdem es gelungen war PHB erfolgreich in reinem enzymatischem Hydrolysat zu produzieren, wurde dem Hydrolysat zusätzlich noch eine Spurenelement-Lösung nach Ramsay et al. (1990) zugefügt. Die chemische Analyse des enzymatischen Hydrolysats im vorherigen Abschnitt zeigte, dass vor allem kaum Spurenelemente vorhanden waren. Dem enzymatischen Hydrolysat wurde daher 1 mL L⁻¹ Spurenelement-Lösung 6 (siehe Medienverzeichnis 3.5.3) zugefügt. Um ausreichend Glucose vorzuhalten, wurden außerdem 4 mL einer 200 g L⁻¹ Glucose-Lösung zugesetzt. Als Bakterienstamm wurde wiederum *Cupriavidus necator* eingesetzt. Die Kultivierungen erfolgten bei 30 °C im Schüttelinkubator bei einer Schüttelfrequenz von 120 rpm über 70 h. In Abb. 3.33 sind die Biotrockenmasse- und PHB-Konzentrationen zu drei verschiedenen Zeitpunkten abgebildet. Wie bei der Kultivierung im reinen enzymatischen Hydrolysat ohne Zusätze, setzte die PHB-Produktion erst im letzten Drittel ein. Insgesamt waren die Verläufe sehr ähnlich.

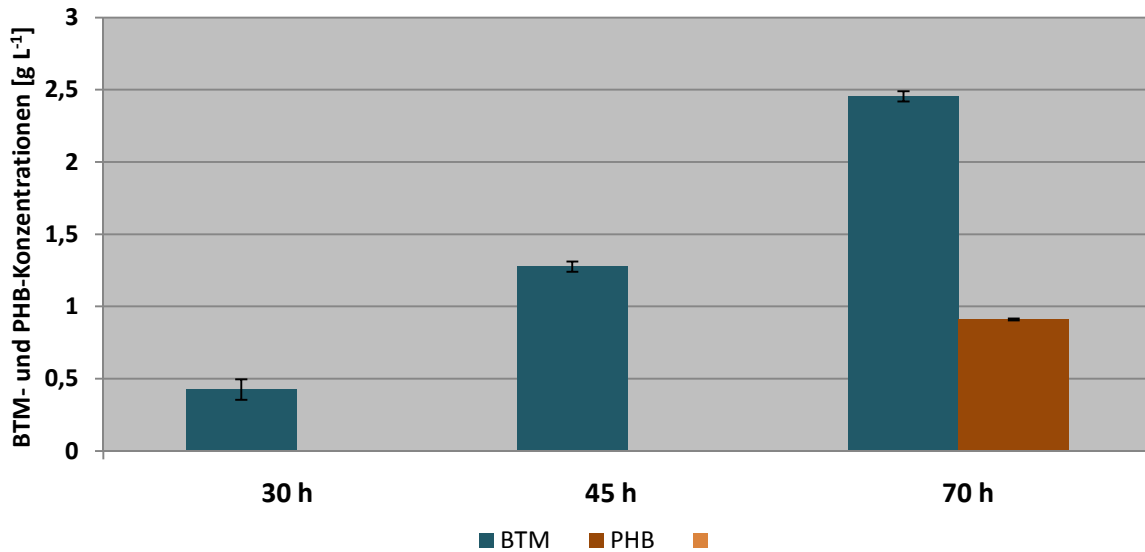


Abb. 3.33: Biotrockenmasse- und PHB-Konzentrationen zu bestimmten Zeitpunkten bei einer Kultivierung von *Cupriavidus necator* DSM 545 im Schüttelkolben mit einer Schüttelfrequenz von 121 rpm über 70 h bei 30 °C in reinem enzymatischem Hydrolysat.

So wurde nach 30 h eine BTM-Konzentration von 0,425 g L nachgewiesen. Nach 45 h stieg die Konzentration auf 1,3 g L⁻¹ und erreichte nach 70 eine BTM-Konzentration von 2,4 g L⁻¹. Die PHB-Produktion setzte erst im Zeitraum zwischen 45 h und 70 h ein und erreichte 0,92 g L⁻¹ nach 70 h. Dies entsprach einem PHB-Anteil von 37,2 %. In Abbildung 4.35 ist der Glucose-Verbrauch zu den drei Probezeitpunkten 30 h, 45 h und 70 h abgebildet.

3.7.3 Kultivierung im enzymatischen Hydrolysat mit zusätzlichen Nährstoffen

Um die Nährstoffbedingungen zu verbessern und unter Umständen höhere Ausbeuten an Biotrockenmasse und PHB zu erreichen, wurden dem enzymatischen Hydrolysat Bestandteile eines Mineralsalzmediums nach Ramsay (*Ramsay et al. 1990*) zugegeben. Zusätzlich wurde dem Hydrolysat Glucose beigefügt um sicherzustellen, dass das Kohlenstoff/Stickstoffverhältnis ausreichend hoch war. Die Start-Konzentration an Glucose lag bei 238 mM. Die Kultivierungen erfolgten bei 30 °C im Schüttelinkubator bei 121 rpm. Als Inokulum wurden 10 % einer frischen Vorkultur eingesetzt.

In Abb. 3.34 sind die Biotrockenmasse- und PHB-Konzentrationen über einen Zeitraum von 70 h aufgeführt. Während in den ersten 30 h kein PHB gebildet wurde, setzte zwischen 30 und 45 h die mikrobielle Synthese des PHB ein.

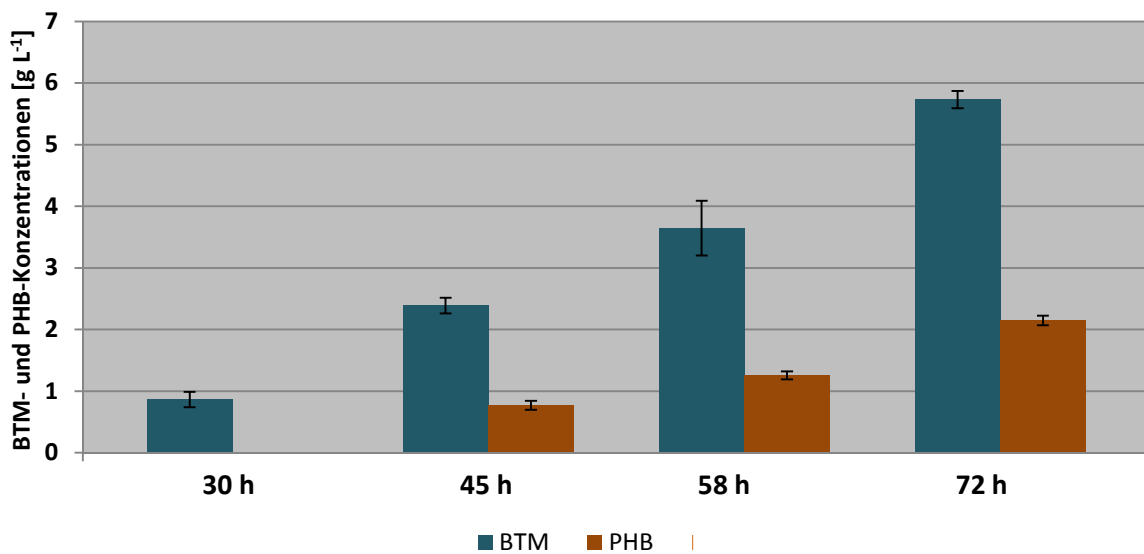


Abb. 3.34: Biotrockenmasse- und PHB-Konzentrationen zu bestimmten Zeitpunkten bei einer Kultivierung von *Cupriavidus necator* DSM 545 im Schüttelkolben mit 121 rpm über 70 h bei 30 °C in enzymatischem Hydrolysat mit Bestandteilen eines veränderten Mineralmediums nach Ramsay et al. (1990).

So wurden nach 45 h knapp 0,72 g PHB L⁻¹ gebildet. Nach 58 h stieg die PHB-Konzentration auf 1,25 g L⁻¹ und erreicht nach 70 h knapp 2,15 g L⁻¹. In den ersten 30 h wurde ausschließlich Biomasse aufgebaut. Auch in den folgenden 42 h nahm die Biomasse-Bildung weiter zu. Bezogen auf die Biotrockenmasse wurde nach 72 h ein PHB-Anteil von 37,44 % erreicht. Die Konzentration an reiner Biomasse, ohne den PHB-Anteil, stieg von 0,86 g L⁻¹ nach 30 h auf 3,48 g L⁻¹ nach 70 h. Insgesamt konnte in den ersten 30 h nur ein schwaches Biomassewachstum beobachtet werden. Die lag-Phase, die Zeit in der sich die Mikroorganismen an die Umgebungsbedingungen adaptieren, war extrem lang. Als Resultat war die Wachstumsrate μ mit 0,02 g h⁻¹ sehr niedrig. Im Verlauf der Kultivierung stieg diese nach 58 h auf 0,05 g h⁻¹ und erreichte nach 70 h mit 0,08 g h⁻¹ den vierfachen Wert der ersten 30 h. Die PHB-Bildungsraten schwankten zwischen 0,05 g h⁻¹ im Zeitraum zwischen 30 h und 45 h bis 0,06 g h⁻¹ zwischen 58 h und 72 h. Abb. 3.35 zeigt den Verbrauch an Glucose im Verlauf der Kultivierung von *Cupriavidus necator* im enzymatischen Hydrolysat. Während in den ersten 30 h der Kultivierung der Glucose-Verbrauch relativ niedrig war, stieg dieser in den folgenden Stunden stark an.

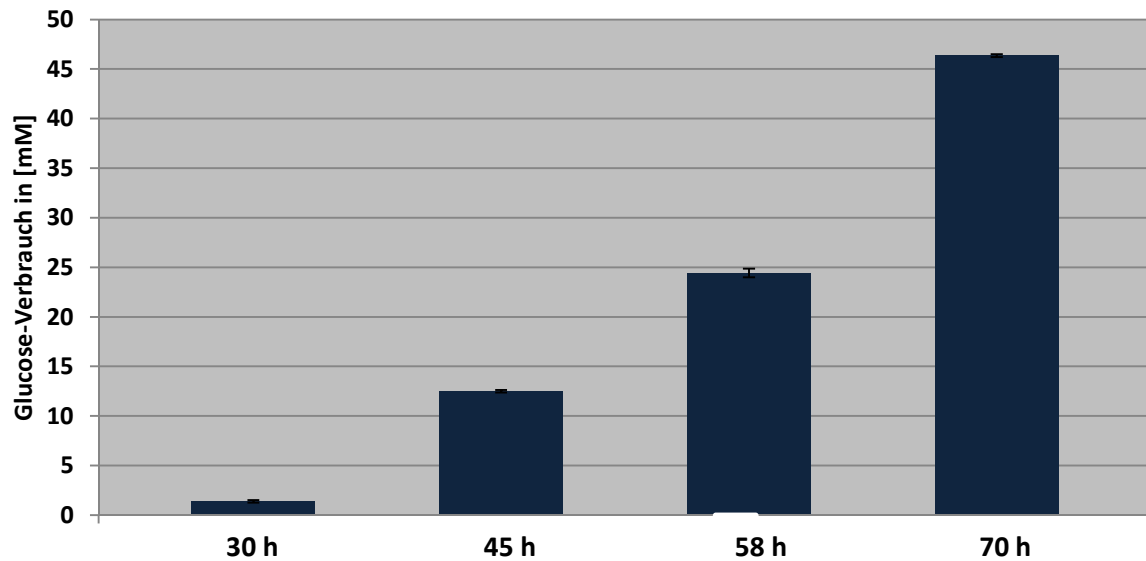


Abb. 3.35: Glucose-Verbrauch zu bestimmten Zeitpunkten während einer Kultivierung von *Cupriavidus necator* über 70 h bei 30 °C in enzymatischem Hydrolysat mit Bestandteilen eines veränderten Mineralsalzmediums nach Ramsay et al. (1990). Die Kultivierung erfolgte im Schüttelinkubator bei 121 rpm.

So wurde nach 30 h lediglich 1,38 mM Glucose verbraucht. In den folgenden 15 h stieg der Verbrauch auf 12,5 mM. Zum Zeitpunkt t_{58h} wurden 24,4 mM an Glucose verbraucht. Nach 70 h wurden durch das Zellwachstum und die PHB-Bildung 46,3 mM Glucose benötigt. Bezogen auf die $2,15 \text{ g L}^{-1}$ PHB nach 70 h wurde $0,25 \text{ g Glucose g}^{-1}$ PHB benötigt.

4. Diskussion

Dieser Teil der Arbeit ist in fünf Bereiche gegliedert. Zunächst wird der Optimierungsprozess der Vorbehandlung im 125 L TDH-Reaktor vergleichend zu anderen Studien diskutiert. Hier geht es vor allem um die Frage inwiefern sich der Verzicht auf die mechanische Vorbehandlung des Weizenstrohs hinsichtlich der erzielten Zuckerausbeuten auswirkt. Im nächsten Teil werden die Auswirkungen der TDH-Behandlung auf die anschließende enzymatische Behandlung erläutert. Hinsichtlich der erzielten Ausbeuten werden auch die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse vergleichend zu anderen Studien erläutert. Im dritten Teil wird auf das Up-Scaling eingegangen. Hier spielt die energetische Betrachtung eine wichtige Rolle, welche im vorletzten Abschnitt diskutiert wird. Im letzten Teil steht die PHB-Produktion im Vergleich mit anderen Studien im Vordergrund.

4.1 Vorbehandlung von Weizenstroh in der TDH

Eine effektive Vorbehandlung von Weizenstroh hat zum Ziel, die in der Hemicellulose und Cellulose enthaltenen Xylane bzw. Glucane zu spalten und abzubauen. Die strukturellen Unterschiede der Hemicellulose und der Cellulose beeinflussen diesen Prozess entscheidend (siehe **Abschnitt 2.3**). Hemicellulose besteht zum größten Teil aus dem C₅-Zucker (Pentose) Xylose, welcher in Form von Xylanen kettenförmig miteinander verknüpft ist. Diese Polysaccharide besitzen ein β -(1-4)-D-Xylopyranose Rückgrat und zusätzlich eine Vielzahl an verschiedenen Seitenketten (C. Wyman 2005). Diese Seitenketten verhindern die Ausbildung von kristallinen Strukturen, wodurch die Hemicellulose ausschließlich amorphe Strukturen ausbildet (Rotach 2000). Dieser Aspekt ist für die Vorbehandlung des Weizenstrohs in der TDH und die damit verbundene Freisetzung der Hemicellulose von entscheidender Bedeutung. Durch das Vorliegen als amorphe Strukturen können Wasser und andere Chemikalien in die Hemicellulose eindringen und eine Spaltung in einzelne Ketten bzw. in die Monomere bewirken. Vor allem die Wirkung von heißen verdünnten Säuren über eine Extraktion ist in der Literatur vielfach beschrieben (Hill 2005). Das durch die Zugabe von Säure freiwerdende H⁺-Ion fungiert hierbei als konjugierende Säure und spaltet die glycosidische Bindung zwischen den Xylose-Monomeren. Mittels eines zusätzlichen Wassermoleküls wird ein Xylose-Monomer oder eine kürzere Kette von Xylose-Molekülen und das H⁺-Ion freigesetzt. Häufig reicht bei der Vorbehandlung die freiwerdende Essigsäure um auch ohne Zugabe von zusätzlicher Säure einen Abbau der Hemicellulose zu bewirken. Allerdings ist die Effektivität stark limitiert und häufig liegt die Xylose in Form von Oligomeren vor (Heitz et al. 1991).

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zeigten, dass vor allem die Behandlungstemperatur und Behandlungszeit einen enormen Einfluss auf die Freisetzung der Hemicellulose hatten. Höhere Temperaturen bewirken eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit, was im Allgemeinen durch die Arrhenius-Gleichung beschrieben werden kann. So steigt durch Erhöhung der Temperatur die Aktivierungsenergie, was eine Beschleunigung der Reaktion zur Folge hat. (Marin and Yablonsky 2011). Um bei niedrigeren Temperaturen die gleichen Ausbeuten erzielen zu können, wären somit deutlich längere Behandlungszeiten notwendig. Dies würde wiederum die Produktivität senken, da somit die Verweildauer des Weizenstrohs in der Anlage steigen würde.

Durch eine Reduzierung der Behandlungszeit war es wiederum möglich die Ausbeuten an Xylose deutlich zu steigern. Eine Behandlung von Weizenstroh bei höheren Temperaturen in Kombination mit mineralischen Säuren führt zu einer Konversion der freigesetzten Xylose in Furfural (Dunlop 1948). Dies führte im Rahmen dieser Arbeit zu relativ hohen Xylose-Verlusten. Die Verluste waren wahrscheinlich noch höher, da Furfural leicht flüchtig ist und somit bei der Druckentspannung aus dem Reaktor entwichen ist.

Um die erzielten Zuckerausbeuten nach der Vorbehandlung von Weizenstroh in der TDH und der anschließenden enzymatischen Hydrolyse des TDH-Stroh beurteilen zu können, gilt es diese mit Ausbeuten aus anderen Studien zu vergleichen. In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte keine mechanische Vorbehandlung des Weizenstrohs, wodurch eine große Menge an Energie eingespart wurde. Wie in **Kapitel 3.2** beschrieben, wurden in einer Studie von Talebnia et al. bei der Zerkleinerung von Weizenstroh auf eine Partikelgröße von 0,8 bzw. 3,2 mm knapp 51,6 bzw. 11,4 kWh t⁻¹ Stroh verbraucht (Talebnia et al. 2010). So wurde bei Saha et al. (Saha et al. 2005) das Weizenstroh zuvor in einer Hammer- und Schneidmühle auf eine Partikelgröße von 1 – 2 mm zerkleinert. Das zerkleinerte Weizenstroh wurde bei 140 °C mit 0,5 % (v/v) Schwefelsäure für 60 min vorbehandelt. Die Ausbeute an Xylose nach der TDH lag bei 109 g Xylose kg⁻¹ Weizenstroh. Dies entsprach knapp 35 % der theoretischen Xylose-Ausbeute. In der vorliegenden Arbeit konnten durch die Vorbehandlung bei 150 °C und 0,32 % (v/v) HNO₃ 46 % der Xylose freigesetzt werden. Dieses waren zwar einerseits 10 °C weniger Behandlungstemperatur, allerdings wurde deutlich mehr Säure eingesetzt. Außerdem ist Schwefelsäure mit einem pK_s-Wert von -3 eine stärkere Säure als Salpetersäure mit einem pK_s-Wert von -1,3. Im Vergleich zu den hier durchgeführten Arbeiten wurde der TDH-Reaktor bei Saha et al. (2005) passiv von außen erhitzt, d.h. die Wärmezufuhr erfolgte über den Reaktormantel. Dies legt den Schluss nahe, dass durch die direkte Einwirkung des Heißdampfes auf das Weizenstroh eine größere Schädigung der Faserstruktur auftritt,

wodurch die Freisetzung der Hemicellulose deutlich begünstigt wird. Um dieses näher zu erläutern wird kurz auf eine andere Vorbehandlungsmethode zurückgegriffen. Eine dem hier verwendeten Prozess sehr ähnliche Technik der Vorbehandlung ist das Steam-Explosion-Verfahren. Hierbei wird über die Einleitung von Heißdampf in einen Reaktor ein sehr hoher Druck aufgebaut (siehe Abschnitt 1.4) und durch plötzliche Druckentspannung die Faserstruktur aufgebrochen. Auch hier findet eine direkte Einwirkung von Heißdampf statt. Und ähnlich wie beim Steam-Explosion-Verfahren wird in dem vorliegenden Verfahren am Ende des Prozesses eine Druckentspannung durchgeführt, um die fest und flüssige Phase voneinander zu trennen. Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass in der vorliegenden Arbeit der Druck im Behälter bis 2 bar abgebaut war und dann die Druckentspannung durchgeführt wurde. Beim Steam-Explosion findet die Druckentspannung in der Regel beim höheren Drücken statt, um die Wirkung auf die Faserstruktur zu verstärken. In einer Arbeit von Ballesteros et al. (*Ballesteros et al. 2006*) wurde ein solches Verfahren angewendet. Hierbei wurde das Weizenstroh in einer Hammermühle zerkleinert (genaue Größe nicht angegeben). Das Stroh wurde für 18 h bei 45 °C in 0,9 % (v/v) Schwefelsäure vor der Behandlung inkubiert. Dies erhöht natürlich wiederum die Verweilzeiten des Weizenstrohs erheblich. Das eingeweichte Material wurde filtriert und dem Steam-Explosion-Verfahren zugeführt. Dieses erfolgte bei 160 – 200 °C für 5 – 20 min. Durch die Behandlung im Steam-Explosion-Verfahren konnten bis zu 95 % der enthaltenen Hemicellulose aus dem Weizenstroh gelöst werden. Allerdings waren hierfür bis zu 200 °C notwendig. Um die Temperaturen zu erreichen sind hohe Mengen an Energie notwendig. Darüber hinaus muss eine Anlage bei höheren Betriebstemperaturen entsprechend ausgelegt werden. So liegt bei 150 °C der Dampfdruck von Wasser bei knapp 6 bar und steigt bei 200 °C auf 15,55 bar an. Entsprechend steigen auch die Kosten für die Errichtung einer solchen Anlage an. Darüber hinaus erhöht sich die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten durch die Konversion von Xylose zu Furfural, wodurch die erzielten Ausbeuten absinken. Außerdem wirken sich höhere Konzentrationen von Furfural negativ auf das Wachstum von Mikroorganismen aus.

Um nochmals den Einfluss der Zerkleinerung auf die Freisetzung von Hemicellulose zu zeigen wird eine Arbeit von Pedersen et al. (2011) hinzugezogen. Hier wurde das Weizenstroh vor der TDH-Behandlung ebenfalls mechanisch zerkleinert. In dem Fall auf eine Partikelgröße von 0,7 – 1,2 mm. Die Behandlungstemperatur betrug 140 °C. Die genaue Säurekonzentration war nicht angegeben, allerdings wurde das Wasser-Stroh-Gemisch auf einen pH-Wert von 1 eingestellt. Der Feststoffanteil im Reaktor lag bei 2 % (w/w) außerdem wurde das Wasser-Stroh-Gemisch zwecks besserer Durchmischung im Kreis gepumpt. Dieses erforderte natürlich noch weitere zusätzliche Energieleistung. Die Behandlungszeit wurde auf 10 min begrenzt. Im Vergleich zu der hier vorliegenden Arbeit konnten durch die Vorbehand-

lung fast 89 % der Xylose freigesetzt werden. Dies zeigt nochmal den Einfluss der Zerkleinerung der Biomasse vor der eigentlichen Behandlung. Allerdings ist in dem Zusammenhang der Prozess des Umpumpens nicht zu vernachlässigen. Hierdurch ist es in der Regel möglich eine noch viel gleichmäßigere Behandlung der Biomasse zu erreichen. Allerdings muss diese dazu entsprechend zerkleinert werden, was wiederum sehr viel Energie kostet.

Neben der Xylose wurden in den gewonnenen TDH-Hydrolysaten zum Teil auch signifikante Mengen an Glucose nachgewiesen. Mit erhöhter Xylose-Freisetzung in Folge von stärkerem Hemicellulose-Abbau stiegen in der Regel auch die Ausbeuten der Glucose im TDH-Hydrolysat. Hemicellulose enthält neben der Xylose auch eine Reihe von anderen Zuckern wie z.B. Glucose. Glucose liegt in Form von β -Glucanen oder Xyloglucanen in der Hemicellulose vor und spielt bei der Interaktion zwischen der Hemicellulose und Cellulose eine wichtige Rolle (*Whitney et al. 1999, Fujino et al. 2000*). Durch eine verstärkte Freisetzung der Hemicellulose bei höheren Behandlungstemperaturen wurden somit auch erhöhte Mengen an Glucose freigesetzt

Auf die Problematik der Nebenproduktbildung wurde an vorheriger Stelle schon mehrmals hingewiesen. Vor allem bei höheren Behandlungstemperaturen in Kombination mit langen Behandlungszeiten wurden große Mengen an Furanen aus der freiwerdenden Glucose und Xylose gebildet (siehe **Abbildung 19** und **23**). Hier ließ sich durch Verringerung der Behandlungszeiten und Temperatur (bei gleichzeitiger Erhöhung der Säure-Konzentrationen) eine deutliche Reduzierung feststellen. Neben den beiden Furanen wurden durch die Vorbehandlung von Weizenstroh in der TDH auch andere Nebenprodukte gebildet. Die Nebenprodukte mit den höchsten Konzentrationen waren die Essigsäure und die phenolischen Verbindungen, welche in zu hohen Konzentrationen für das Wachstum von Mikroorganismen toxisch sind (*Palmquist and Hahn-Hägerdal 2000a*). Mit steigender Hemicellulose-Freisetzung nahm auch die Menge der Essigsäure zu, welche im TDH-Hydrolysat nachgewiesen werden konnte. Hemicellulose enthält eine Reihe von Acetylgruppen, welche bei der Freisetzung in der TDH Essigsäure bilden (siehe **Kapitel 2.5.3**). Eine effektive Xylose-Freisetzung bedingt somit auch zwangsläufig die Bildung von Essigsäure und lässt sich somit kaum vermeiden. Neben der Essigsäure wurden auch große Mengen an phenolischen Verbindungen im TDH-Hydrolysat nachgewiesen. Diese stammen aus der Schädigung des Lignins durch die TDH-Behandlung des Weizenstrohs. Mit steigendem Hemicellulose-Abbau nahm auch die Konzentration der phenolischen Verbindungen zu. Durch die harscheren Bedingungen bei erhöhten Behandlungstemperaturen und Zeiten wurde gleichzeitig das Lignin stärker geschädigt, wodurch größere Mengen phenolischer Verbindungen frei wurden. Auch hier lässt sich die

Freisetzung nur schwer vermeiden, da eine bessere Vorbehandlung zwangsläufig zu höherer Schädigung des Lignins führt. Allerdings ist es möglich diese Verbindungen (wie auch die anderen Nebenprodukte) über eine Reihe von verschiedenen Detoxifizierungsmaßnahmen aus dem TDH-Hydrolysat zu entfernen. Verschiedene Methoden sind in der Literatur beschrieben. So lässt sich über den Einsatz alkalischer Substanzen wie Kalk oder NaOH ein Teil der Nebenprodukte ausfällen. Als ebenfalls sehr effektiv hat sich die Entfernung über den Einsatz von Aktivkohle erwiesen (*Larsson et al. 1999, Palmquist and Hahn-Hägerdal 2000a, Martinez et al. 2001*). In einer am Institut durchgeführten Diplomarbeit konnte dieses ebenfalls nachgewiesen werden (*Kamga 2012*). Die Problematik an der Aufreinigung der TDH-Hydrolysate ist allerdings der hohe Kosteneinsatz für die Aktivkohle, der einen Einsatz im großen Maßstab sehr aufwendig und teuer macht. Verbrauchte Aktivkohle kann nur bei sehr hohen Temperaturen wieder reaktiviert werden.

4.2 Auswirkungen der TDH auf die enzymatische Hydrolyse

Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen den engen Zusammenhang zwischen der Vorbehandlung des Weizenstrohs und der anschließenden enzymatischen Hydrolyse. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Vorbehandlung des Weizenstrohs nur knapp die Hälfte der Hemicellulose freigesetzt wurde. Ein Teil der Hemicellulose verbleibt somit noch im TDH-Stroh zurück. An dieser Stelle rückt die enzymatische Hydrolyse in den Vordergrund des Interesses. Neben der Glucose wurde durch die enzymatische Hydrolyse des TDH-Strohs auch Xylose freigesetzt. Kommerzielle Enzym-Präparate, wie z.B. das in der vorliegenden Arbeit verwendete Cellic CTec 2, enthalten eine Reihe von unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten. Hauptsächlich sind dies cellulolytische Aktivitäten, welche mit dem Abbau der Cellulose im Zusammenhang stehen. Daneben können aber auch andere enzymatische Aktivitäten, wie z.B. Xylanase-Aktivität enthalten sein (*Novozyme 2010*). Hierdurch wird die restliche Hemicellulose aus dem TDH-Stroh herausgelöst. In der Arbeit von Saha et al. (2005) konnte ein ähnliches Phänomen beobachtet werden. Auch hier war nach der Vorbehandlung des Weizenstrohs der größte Teil noch in der Lignocellulose verblieben. Durch die Behandlung mit cellulolytischen Enzymen konnte weitere Hemicellulose heraus gelöst werden. So konnten die Xylose-Ausbeuten von 109 g kg^{-1} Weizenstroh auf 198 g kg^{-1} Weizenstroh gesteigert werden.

Die Hauptaufgabe der enzymatischen Hydrolyse ist die Spaltung der Cellulose in die entsprechenden Glucose-Monomere. Während die Hemicellulose durch eine Behandlung in der

TDH theoretisch nahezu vollständig zu hydrolysieren war, konnte das bei der Cellulose nicht erreicht werden. Die kristallinen Strukturen der Cellulose verhinderten ein Eindringen von Wasser oder anderen Chemikalien, wodurch eine Spaltung durch Extraktion nicht möglich war. Nur an wenigen Stellen bilden sich amorphe Strukturen aus (Siehe **Kapitel 2.3**), wodurch eine größere Anzahl an Glucose-Oligomeren freigesetzt werden. Wie unter **Kapitel 2.6** beschrieben, sind für eine Spaltung der Cellulose drei verschiedene enzymatische Aktivitäten notwendig. β -(1-4)-Endoglucanasen spalten die Cellulose innerhalb der Glucose-Kette auf und erzeugen neue kleinere Glucose-Oligomere. Diese werden von den Enden an durch β -(1-4)-Exoglucanasen in Cellobiose-Einheiten gespalten. Je mehr Enden vorliegen, desto schneller können die β -(1-4)-Exoglucanasen die Cellulose in Cellobiose-Einheiten spalten. Durch eine gehäufte Spaltung der Cellulose in einzelne Glucose-Ketten in Folge der TDH-Behandlung liegen mehr freie Enden vor, womit eine effektive enzymatische Spaltung möglich war.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass hierbei Ausbeuten bis 90 % erreicht werden konnten. Dies war deutlich mehr, als in den zuvor erwähnten Studien. In der Studie von Saha et al. (2005) wurden nach der enzymatischen Hydrolyse mit 313 g Glucose kg^{-1} nur 56 % der enthaltenen Glucose freigesetzt. Bei Pedersen et al. (2011) wurden nach der enzymatischen Hydrolyse des zuvor behandelten Weizenstrohs sogar nur 25 % der Cellulose abgebaut. Um die Werte vergleichen zu können ist es wichtig zu gucken, wie hoch die entsprechende Enzym-Dosierung in den zuvor genannten Studien war. So wurde das Stroh bei Pedersen et al. bei 50 °C und pH 5,0 behandelt, was den in der vorliegenden Arbeit benutzten Parametern entspricht. Als Enzym wurde ein enzymatisches Präparat der Firma Novozymes (Cellic CTec 1) verwendet. Die Protein-Konzentration betrug 175 mg mL^{-1} . Die enzymatische Aktivität betrug 63,8 FPU mL^{-1} . Verschiedene Dosierungen zwischen 10 und 200 mg g^{-1} BTM wurden eingesetzt. Umgerechnet entsprach dieses einer Enzym-Dosierung von 3,64 bis 72,9 FPU g^{-1} TS. Im Vergleich zur höchsten, in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzym-Dosierung waren das knapp 50 % mehr. Die enzymatische Hydrolyse wurde 24 h durchgeführt. Im Vergleich zu den hier in der Arbeit erzielten Glucose-Ausbeuten, wurde deutlich weniger Glucose freigesetzt. Selbst bei einer Enzym-Dosierung von 72 FPU g^{-1} TS maximal 25 % der theoretischen Glucose-Menge. Zwar wurde das Weizenstroh zuvor auch nur für 10 min thermo-chemisch bei 140 °C und einem pH-Wert von 1 behandelt, aber selbst bei den hier durchgeführten TDH-Behandlungen von 5 bzw. 15 min wurden mit 54 bzw. 69 % (siehe Abb. 3.7) deutlich mehr Glucose freigesetzt. Bezogen auf die absolute Glucose-Mengen wurden bei Pedersen et al. (2011) 134 g Glucose kg^{-1} BTM und in der vorliegenden Arbeit 233 bzw. 260 g Glucose kg^{-1} TDH-Stroh nachgewiesen. Dies unterstreicht nochmals die hohe Wirksamkeit der durchgeführten TDH-Behandlung in der vorliegenden Arbeit (siehe

Kapitel 5.1). Vor allem unter dem Aspekt, dass auch die enzymatische Hydrolyse durch eine mechanische Zerkleinerung des Weizenstrohs vor der Behandlung begünstigt wird. In einer Arbeit von Ballesteros et al. (*Ballesteros et al. 2006*) wurde das Weizenstroh in einem Steam Explosion-Verfahren behandelt. Hierbei wurden Temperaturen zwischen 160 °C und 200 °C untersucht. Zusätzlich wurden geringe Mengen Schwefelsäure (bis 1 % (v/v)) eingesetzt. Das behandelte Weizenstroh wurde anschließend mit einem Enzym-Präparat von Novozymes (Celluclast 1.5L) behandelt. Die Enzym-Dosierung betrug 15 FPU g⁻¹ TS. Die Inkubationszeit betrug 72 h. Die Behandlungstemperatur lag bei 50 °C und der pH Wert betrug 4,8. Unter diesen Voraussetzungen konnten zwar bis zu 90 % der enthaltenen Glucose freigesetzt werden, allerdings waren die benötigten Vorbehandlungstemperaturen bei der Steam-Explosion deutlich höher.

Dass die Enzym-Dosierung allerdings nur bedingt eine Rolle bei der Effektivität beim Abbau der Cellulose spielt, zeigen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit. So konnte durch ein Verdopplung der Enzym-Dosierung nur eine geringfügige Steigerung der Glucose-Ausbeuten erreicht werden. Um dieses zu erklären muss nochmals auf den genauen Mechanismus der enzymatischen Spaltung eingegangen werden. Die Wirkung der cellulolytischen Enzyme findet in zwei Schritten statt, die Bindung an die Cellulose (über Adsorption) und die eigentliche Spaltung der Cellulose-Kette. Von Interesse in dem Zusammenhang ist vor allem der erste Schritt. Die meisten Cellulasen haben ein „Cellulose binding module“ (CBM). Dieses vermittelt die Bindung der Cellulase mit den kristallinen Strukturen. Wie in **Kapitel 2.6** schon beschrieben ist dieses CBM sehr wichtig für die Adsorption zwischen der Cellulase und der Cellulose. Allerdings folgt diese Adsorption häufig nicht einem simplen Langmuir Adsorptionisotherm (d.h. eine gleichmäßige Beladung der Oberfläche, es besteht ein Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption). Dies hängt damit zusammen, dass sich Bindungsstellen auf der Cellulose zum Teil überlappen (*Ståhlberg et al. 1991*). Dadurch ist es unter Umständen nicht möglich, dass selbst bei hohen Enzym-Dosierungen alle Enzyme eine Bindungsstelle besetzen. Somit sind nicht alle Enzyme gleichzeitig mit der Spaltung der Cellulose beschäftigt, was wiederum die geringen Unterschiede zwischen der einfachen und doppelten Enzym-Dosierung in **Abb. 3.26** erklären könnte. Auch können Exonucleasen nur von den Enden her die Cellulose abbauen und sind somit darauf angewiesen, dass durch Endonucleasen neue Ende erzeugt werden. Aus diesem Grund ist der enzymatische Abbau auch nicht prinzipiell als lineare Reaktion zu sehen (*Ghose 1987*). Aber auch andere Faktoren können die Aktivität der cellulolytischen Enzyme einschränken. Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt spielen die CBMs eine wichtige Rolle bei der Funktion der Cellulasen. Sie stellen die Verbindung zu der Cellulose her. Allerdings können diese Bindungsproteine auch den gegenteiligen Effekt hervorrufen. Bei einigen Cellulasen führen diese CBMs auch zu

einer unproduktiven Bindung mit der Cellulose, ohne anschließende Spaltung (*Pettersson et al. 1995*). Darüber hinaus binden Cellulasen auch irreversibel an freigelegte Ligninbestandteile, wodurch zusätzliche enzymatische Aktivität verloren geht (*Berlin et al. 2006a*). Die Ergebnisse in **Kapitel 4.4.1** bestätigten diese Effekte. Durch eine vorherige Inkubation mit TDH-Stroh ging ein Teil der enzymatischen Aktivität verloren, wodurch die erzielten Ausbeuten nach der Zugabe von frischem TDH-Stroh deutlich geringer waren, als in den Referenz-Hydrolysen. Bereits nach einer Inkubation von 3 h konnte dieser Effekt beobachtet werden (siehe **Abb. 3.24**). Dieses erklärt wahrscheinlich auch die sehr geringen Zunahmen der Glucose-Ausbeute zwischen 24 h und 72 h Inkubationszeit in **Abb. 3.26**. Zusätzlich zu den Verlusten durch unproduktive Bindung an Cellulose und Lignin geht ein Teil der enzymatischen Aktivität auch durch thermische Instabilität verloren. In Folge der Inkubation bei 50 °C denaturieren mit der Zeit die Enzyme und verlieren so die Aktivität. Geringere Inkubationstemperaturen verringern diesen Effekt, führen aber auch zu niedrigeren Zuckerausbeuten durch verringerte enzymatische Aktivität.

Neben der Spaltung der Cellulose-Ketten beeinflusst auch die Freisetzung der Hemicellulose die enzymatische Hydrolyse des TDH-Strohs. Durch die Entfernung der Hemicellulose nimmt sowohl die spezifische freiliegende Oberfläche der Cellulose, aber auch das zugängliche Porenvolumen zu (*Grethlein 1985*) (*Stone et al. 1969*). Hierdurch wird die Zugänglichkeit der Enzyme erhöht, was die Hydrolyse verbessern und somit zu höheren Glucose-Ausbeuten führt. Die Ergebnisse in **Abbildung 4.9** und **Abbildung 4.10** bestätigen dieses. So wurde durch eine Erhöhung der Säure-Konzentration bei einer TDH-Temperatur von 120 °C deutlich mehr Hemicellulose freigesetzt. Infolge dessen wurde in der anschließenden enzymatischen Hydrolyse des TDH-Stroh auch mehr Glucose freigesetzt. Dies bestätigt den Einfluss der Hemicellulose auf die Zugänglichkeit der Enzyme bei der enzymatischen Hydrolyse des TDH-Strohs.

Auch der Einfluss des Lignins auf den Abbau der Cellulose durch die enzymatische Hydrolyse in der Literatur beschrieben. Der Verbund zwischen der Cellulose und dem Lignin verhindert ein Anschwellen der Faser und limitiert somit den Zugang der Enzyme (*Mooney et al. 1998*). In einer Studie von Tanahashi et al. (1983) zeigten Aufnahmen von geplatzten Pflanzenzellen kleine Partikel einer öligen Substanz innerhalb und außerhalb der Zelle. Durch die Vorbehandlung wird das Lignin zuerst depolymerisiert und danach wieder repolymerisiert. Auch wenn durch das in der vorliegenden Arbeit angewendete Verfahren das Lignin nicht vollständig abgebaut wurde, so zeigte das verstärkte Auftreten von phenolischen Verbindungen im TDH-Hydrolysat bei höheren Behandlungstemperaturen und Behandlungszeiten (siehe **Abb. 3.8**) die erhöhte Schädigung des Lignins. Infolge dessen wurde die Zugänglichkeit der Enzyme verbessert, was wiederum zum Teil die verbesserte enzymatische Hydrolyse

von TDH-Stroh bei höheren TDH-Temperaturen und Behandlungszeiten erklärt. Durch eine Erhöhung der Säure-Konzentrationen konnte ein ähnlicher Effekt nicht nachgewiesen werden.

4.3 Up-Scaling des Vorbehandlungsprozesses in den 425 L TDH-Reaktor

Um den Prozess der Vorbehandlung ökonomisch sinnvoll durchführen zu können, ist ein Up-Scaling in den halbtechnischen Maßstab notwendig. So wurden die zuvor genannten Studien von Pedersen et al. (2011), Saha et al. (2005) oder Ballersteros et al. (2006) ausschließlich im Labormaßstab durchgeführt. Bei Pedersen et al. (2011) hatte der eingesetzte Reaktor ein Volumen von 0,6 L. In der Arbeit von Ballersteros et al. (2006) hatte der eingesetzte Steam-Explosion-Reaktor ein Volumen von 2 L. Dieses reduziert in beiden Fällen natürlich die Möglichkeit größere Mengen an Weizenstroh zu verarbeiten. Wie in Kapitel 1.4 beschrieben eignen sich die meisten Vorbehandlungsverfahren nur bedingt für eine Überführung in den halbtechnischen Maßstab. Hohe Drücke erfordern eine massive Bauweise, was die Kosten für die Errichtung einer Anlage in die Höhe treibt.

Eine Vergrößerung der Anlage führt zu einer Reihe von spezifischer Herausforderung. Der Vergleich der hier verwendeten 125 L TDH-Anlage und 425 L TDH-Anlage macht das deutlich. In beiden Fällen erfolgte die Dampfzufuhr über den Boden des Reaktors. Durch die Vergrößerung des Reaktorvolumens geht eine Steigerung der Reaktorgröße einher. Da ein Teil der Vorbehandlung auf die direkte Einwirkung des Heißdampfes auf das Weizenstroh basiert, nimmt natürlich die Wirkung mit der Höhe ab, d.h. Weizenstroh was im unteren Bereich des Reaktors ist, wird unter Umständen stärker geschädigt, als Material was weiter oben ist. Um dieses zu vermeiden, müsste der Dampf an mehreren Stellen gleichzeitig in den Reaktor geführt werden. Hierüber könnte die Wirkung des Dampfes über den ganzen Reaktor gleichmäßig verteilt werden. Neben der Dampfzufuhr muss bei größeren Anlagen auch die Zirkulation der verdünnten Säure beachtet werden. Auch hier gilt es durch Rezirkulation eine gleichmäßigere Verteilung über den gesamten Prozessverlauf zu erzielen. So waren die erzielten Xylose-Ausbeuten nach der TDH des Weizenstrohs in der 425 L Anlage und der anschließenden enzymatischen Hydrolyse deutlich niedriger. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Wirkung der heißen verdünnten Säure über den gesamten Reaktor ungleichmäßig war. Für den Abbau der Cellulose spielte dieses wiederum keine signifikante Rolle.

4.4 Energetische Betrachtung der TDH-Vorbehandlung

Der alles entscheidende Faktor bei der Beurteilung der Vorbehandlungsmethode ist der Kostenfaktor. Selbst technisch hochversierte Verfahren finden keine Anwendung über den Labormaßstab hinaus, wenn die Kosten für die Vorbehandlung der Biomasse den Gesamtprozess unrentabel machen. Je geringer die Gewinnspanne eines Endproduktes ist, desto stärker nimmt dieser Aspekt zu. In Tabelle 4.1 werden verschiedene Methoden zur Vorbehandlung am Beispiel der Ethanol-Herstellung miteinander verglichen. Ethanol gehört zu den low-cost Produkten und ist daher für eine allgemeine Betrachtung gut geeignet. Es zeigte sich das die Verfahren mit verdünnter Säure oder die alkalische Behandlung mit Kalk am günstigen waren.

Tabelle 4.1: Kapitalkosten für unterschiedliche Behandlungsmethoden (*Eggeman and Elander 2005*)

Behandlungs- methoden	Kosten für Aufschluss \$ MM	Gesamtkosten \$ MM	Ethanolproduktion [MM gal/Jahr]	Kosten für Ethanol in \$/gal
Verdünnte Säure	25,0	208,6	56,1	3,72
Hotwater-Verfahren	4,5	200,9	44,0	4,57
AFEX-Verfahren	27,7	211,5	56,8	3,72
ARP-Verfahren	28,3	210,9	46,3	4,56
Alkalische Behand- lung mit Kalk	22,3	163,6	48,9	3,35
Keine Behandlung	0	200,3	9,0	22,26

Ein wichtiger Faktor bei der Kostenabschätzung ist der zu erwartende Energieverbrauch. Dieser hängt maßgeblich von der einzusetzenden Energie ab. Hier spielt die Vorbehandlungsmethode eine sehr wichtige Rolle. Durch eine mechanische Zerkleinerung der Biomasse vor der eigentlichen Vorbehandlung steigt der Energieverbrauch abhängig von der Partikelgröße an. Eine Zerkleinerung in der Hammermühle auf eine Partikelgröße von 0,8 oder 3,2 mm benötigt 51,6 bzw. 11,4 kWh t⁻¹ (*Talebnia et al. 2010*). Bei sehr kleinen Partikelgrößen übertrifft dieser Energieaufwand den Energiegehalt der Biomasse, was eine wirtschaftliche Nutzung problematisch macht. In einer Studie der NREL (National Renewable Energy Laboratory, Colorado, USA) zur Herstellung von Bioethanol aus Lignocellulose wurde ein Drittel der benötigten Gesamtenergie des Herstellungsprozesses für die Zerkleinerung der Biomasse benötigt (*Selig et al. 2008*). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit auf eine solche

mechanische Zerkleinerung verzichtet werden. Trotzdem entstehen durch die Behandlung mit Heißdampf nicht zu vernachlässigende Energiekosten wie in Abschnitt 4.3 dargestellt wurde. Ein Teil der Energie lässt sich durch die Verwendung der anfallenden Reststoffe nach der enzymatischen Hydrolyse in einer Biogas-Anlage verwerten. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Biogaspotentiale lagen ungefähr in dem Bereich von Maissilage mit $0,23 - 0,36 \text{ Nm}^{-3} \text{ kg}^{-1} \text{ oTS}$ (*FNR 2008*). Ein Grund hierfür war sicherlich der noch relativ hohe Cellulose-Anteil nach der enzymatischen Hydrolyse. Wie die Ermittlung der Stroh-Zusammensetzung zeigte, enthielt das enzymatisch gespaltene TDH-Stroh nach 24 noch knapp 30 % Cellulose, welche zu Biogas abgebaut werden konnte. Allerdings muss in diesem Zusammenhang beachtet werden, dass durch eine verbesserte enzymatische Hydrolyse zwangsläufig weniger Cellulose für die Biogas-Erzeugung zur Verfügung stehen würde und somit die Biogas-Ausbeuten reduziert werden. Ein anderer wichtiger Faktor, welcher hohe Biogas-Erträge ermöglichte waren die Zucker, welche noch am TDH-Stroh hafteten. Diese konnten, im Vergleich zur Cellulose, sehr schnell von den Mikroorganismen verwertet werden. Aus diesem Grund waren die Zuwächse der Gaserträge in den ersten Tagen deutlich höher. Unbehandeltes Weizenstroh wurde nur sehr langsam abgebaut, da keine schnellverwertbaren Zucker zur Verfügung standen (siehe **Abb. 3.30**). Über den erzielten Methananteil lässt sich der Energieinhalt berechnen. Ein Kubikmeter Methan hat einen Energieinhalt von 9,97 kWh. So liegt der Energieinhalt durch die Vergärung des enzymatisch abgebauten TDH-Strohs bei 2,04 kWh pro kg oTS (*FNR 2008*). In Kombination mit der Wärmeenergie, welche bei der Stromerzeugung im BHKW frei wird, ist ein Potential vorhanden um die Energie für den TDH-Prozess zu liefern.

Trotzdem bleibt abzuwarten, ob die Nutzung von Heißdampf eine sinnvolle Lösung ist. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Heißdampf elektrisch in einem Dampferzeuger generiert. Dies verbraucht sehr viel Energie. Auch wenn ein Teil der Energie durch die Nutzung der Reststoffe in einer Biogas-Anlage erzeugt werden kann und durch die Nutzung von Wärmepumpen Prozesswärme zurückgewonnen werden könnte, bleibt der Energieverbrauch trotzdem noch sehr hoch. Eine Möglichkeit dieses Problem zu lösen wäre statt 150 °C heißen Dampfes, 150 °C heißes Wasser zu nutzen und das Weizenstroh damit zu behandeln. Das Wasser ließe sich über Thermoöle und Wärmetauschern auf die entsprechende Temperatur bringen

4.5 Mikrobielle Produktion von PHB

Ein wichtiger Aspekt im Rahmen der vorliegenden Arbeit war die fermentative PHB-

Produktion in den enzymatischen Hydrolysaten. Vor allem die Nutzung der enthaltenen Glucose zur Herstellung des PHB. Um den Prozess so wirtschaftlich wie möglich zu machen sollte auf eine erhöhte Zugabe von zusätzlichen Nährstoffen verzichtet werden. Eine Analyse der Zusammensetzung ergab allerdings, dass bis auf die beiden Zucker Glucose und Xylose nur wenige Nährstoffe enthalten waren. Dies ist nicht verwunderlich, da Weizenstroh beispielsweise nur wenig Stickstoff enthält. So beträgt das C/N-Verhältnis 100:1. Heu beispielsweise hat ein C/N-Verhältnis von 50:1 (*Heinreich and Hergst 1992*). Auch der Gehalt an Spurenelementen und Phosphaten im enzymatischen Hydrolysaten war sehr niedrig. Als Produktionsstamm wurde *Cupriavidus necator DSM 545* eingesetzt. Dieser Stamm ist in der Lage Glucose als Kohlenstoffquelle für das Wachstum und die PHB-Synthese zu nutzen. Die Xylose, als weiterer Bestandteil der enzymatischen Hydrolysate, können nicht verwertet werden. Dieses war allerdings nicht so problematisch, da das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit auf der Verwertung der Glucose lag. Der Stamm *Cupriavidus necator DSM 545* ist in der Lage bei Nährstoffmangel große Ausbeuten an PHB zu erzielen. Wie in Tabelle 2.6 zu sehen, kann der PHB-Anteil bezogen auf die Trockenbiomasse in *Cupriavidus necator DSM 545* (ehemals *Ralstonia eutrophus*) bis zu 80 % ausmachen (*Ryu et al. 1997*). Im Vergleich zu diesen Werten, wurde in der vorliegenden Arbeit ein PHB-Anteil von 40 % erreicht. Dies war deutlich weniger, als in der zuvor genannten Studie. Allerdings wurde in der genannten Studie ein reines synthetisches Medium auf Glucose-Basis verwendet. In einer Arbeit von Sandhya et al. (*Sandhya et al. 2013*) wurde enzymatisches Hydrolysat auf Basis von Reisstroh verwendet. Hier konnten 37 % PHB-Anteil erreicht werden. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten PHB-Erträge lagen im Maximum bei 2,2 g L⁻¹. Im Vergleich zu Werten aus der Literatur, welche zum Teil 38 g L⁻¹ im Batch-Verfahren mit *Cupriavidus necator* erreichen besteht hier noch Optimierungsbedarf (*Wang and Yu 2007*). Allerdings wurden diese Werte wiederum im synthetischen Medium erreicht. Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit noch keine weitreichenden Optimierungen durchgeführt. Vor allem über die Steigerung der Biomasse-Konzentrationen ließe sich eine enorme Steigerung erbringen. So waren die maximalen Biomasse-Konzentrationen mit 5,8 g L⁻¹ noch sehr niedrig. Über eine Fed-Batch-Kultivierung wären hier sicherlich Steigerungen zu erwarten.

Das im Rahmen der Arbeit verwendete enzymatische Hydrolysat enthielt neben den beiden Zucker-Monomeren geringe Konzentrationen an phenolischen Verbindungen. Diese stammen von der Oberfläche des TDH-Strohs und wurden, um Wasser zu sparen, vor der enzymatischen Hydrolyse nicht abgewaschen. Mikroorganismen reagieren unter Umständen schon auf geringe an phenolischen Verbindungen sehr empfindlich. Hier gilt je niedriger das Molekulargewicht desto toxischer. So können schon Konzentration von 0,1 g L⁻¹ wachstums-

hemmend wirken (*Palmquist and Hahn-Hägerdal 2000b*). Unter Umständen hemmen diese phenolischen Verbindungen bestimmte Vorgänge bei der PHB-Synthese. Andere Nebenprodukte aus der TDH wie Furane oder Essigsäure kommen nur in sehr geringen Konzentrationen vor, dass eine Hemmung eigentlich ausgeschlossen werden kann. In ersten Versuchen (Daten nicht angegeben) konnte zwar ein Wachstum in enzymatischen Hydrolysaten nachgewiesen werden, allerdings wurde nur wenig oder kaum PHB gebildet. Erst im späteren Verlauf konnte der PHB-Anteil auf 40 % gesteigert werden. Über die Ursache lässt sich allerdings nur spekulieren. Unter Umständen spielen die Enzyme als Stickstoffquelle eine Rolle. Allerdings konnte bei vergleichenden Untersuchungen im enzymatischen Hydrolysat keine Unterschiede bei der Gesamtstickstoffmenge gemacht werden. Die Gesamtstickstoffmengen waren sowohl bei den Kultivierungen mit einem PHB-Anteil von 12 % oder 40 % nahezu identisch. Eine andere Möglichkeit wäre ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Kultur. Im Verlauf der Untersuchungen konnte die Beobachtung gemacht werden, dass ältere Schrägager-Kulturen durchaus in der Lage waren anzuwachsen, aber kaum noch PHB produzieren. Auch wenn *Cupriavidus necator* nicht in der Lage ist Sporen zu bilden, so ist es vielleicht doch möglich, dass bestimmte Übergangsformen existieren, die ein Wachstum ermöglichen, aber keine PHB-Synthese forcieren.

Generell sollte sich das enzymatische Hydrolysat sehr gut für eine PHB-Produktion eignen, da beispielsweise stickstoffhaltige Verbindungen kaum vorhanden sind. So sind die Proteine die einzige nennenswerte Stickstoffquelle im Hydrolysat. Generell zeigte sich das ein Wachstum in reinem enzymatischen Hydrolysat möglich war. Allerdings konnten erst ausreichend hohe Zelldichten und auch PHB-Konzentrationen durch die Zugabe von weiteren Ammoniumverbindungen bzw. Spurenelementen erreicht werden. Vor allem durch die Zugabe von Spurenelementen setzte bereits nach knapp 36 h die PHB-Synthese ein (siehe **Abbildung 4.35**), während diese bei Kultivierungen im reinen enzymatischen Hydrolysat erst sehr viel später in der letzten Phase zwischen 52 h und 72 h einsetzte.

Trotz der im Vergleich zu Literaturwerten geringeren PHB-Ausbeute konnte gezeigt werden, dass es möglich war in enzymatischen Hydrolysaten ohne vorheriges Waschen des TDH-Stroh, mit 40 % PHB-Anteil hohe Ausbeuten an PHB zu bilden. Den enzymatischen Hydrolysaten mussten hierzu nur geringe Mengen an zusätzlichen Nährstoffen zugefügt werden, um auch ausreichend hohe Biomasse-Konzentrationen von 6 g L^{-1} zu erreichen. Um höhere PHB-Erträge zu erzielen sind allerdings höhere Biomass-Ausbeuten notwendig. Dieses kann unter anderem durch die Durchführung der Fermentationsversuche im geregelten Batch- oder Fed-Batch-Verfahren. Hierüber ließe sich der pH-Wert stabil halten und vor allem die Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Medium steigern. Zu geringe Sauerstoff-

Konzentrationen waren wahrscheinlich die Ursache für das relativ lange und geringfügige Wachstum der Kulturen. Für die eigentliche PHB-Synthese ist ein Sauerstoffmangel zwar förderlich, da hierdurch der TCA-Zyklus gestört wird und somit die PHB-Synthese verstärkt wird. Eine ausreichende Biomassenbildung setzt allerdings eine gute Sauerstoffversorgung voraus. Außerdem ließe sich durch eine Fed-Batch-Fütterung die Glucose-Konzentration generell niedrig halten, was eine mögliche Substrat-Hemmung reduziert.

5. Ausblick

In Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Vorbehandlung von Weizenstroh in der TDH gemacht mit anschließender enzymatischer Hydrolyse und mikrobieller Produktion von PHB in den enzymatischen Hydrolysaten. Dabei konnten nach der enzymatischen Hydrolyse bis zu 90 % der Glucose aus der Cellulose freigesetzt werden. Um dieses zu erreichen waren einerseits in der TDH 150 °C, 0,32 % (v/v) HNO₃ und 60 min Behandlungszeit notwendig, andererseits 50 °C, pH 5,0 und 72 h Behandlungszeit bei der enzymatischen Hydrolyse nötig. Die Enzym-Dosierung lag bei 18,5 FPU g TS. Allerdings musste der hierfür benötigte Dampf energieintensiv erzeugt werden. Dies ist auf die Dauer nicht wirtschaftlich, so dass für die Behandlung eine andere Lösung gefunden werden müsste. Hier böte sich die Nutzung von Thermoölen an. Über diese ließ sich das zu verwendende Wasser direkt auf 150 °C erhitzen und würde direkt in den Reaktor gegeben. Dies würde unter Umständen die Effektivität der Vorbehandlung sogar noch steigern, da das Weizenstroh unter Umständen noch stärker geschädigt werden würde. Hier wären weitere Untersuchungen notwendig, um dieses näher zu beleuchten. An der Stelle wäre es auch möglich die Biogas-Produktion aus den Reststoffen zu integrieren. Neben der Stromproduktion fällt durch das BHKW auch Wärme an, welche genutzt werden könnte um über Wärmetauscher die Thermoöle zu erhitzen, die wiederum die Hitze an das Wasser bzw. die verdünnte Säure weiter geben. Auch hier sind weitere Untersuchungen nötig, um die technische Realisierbarkeit zu überprüfen.

Ein anderer kostenintensiver Prozessschritt bei der Nutzung von Weizenstroh ist die enzymatische Hydrolyse. Die Kosten für die Bereitstellung der Enzyme sind zurzeit noch sehr hoch. Ein Ansatz um diese Kosten zu senken wäre die eigene Produktion von Enzymen. Das Weizenstroh nach der TDH würde sich gut eignen um mittels bekannter Produzenten von cellulolytischen Enzymen wie z.B. *Trichoderma reesei* die entsprechenden Enzyme herzustellen. Das TDH-Stroh enthält genügend freie Zucker in Form von Xylose, um ausreichende Wachstumsbedingungen zur Verfügung zu stellen. Im Rahmen eines anderen Forschungsprojektes ist geplant dieses hier am PFI durchzuführen. Hier gilt es u.a. herauszufinden welche Mengen an TDH-Stroh für die Enzym-Produktion notwendig sind, da dieses unmittelbare Auswirkungen auf die zu erzielenden Ausbeuten nach der enzymatischen Hydrolyse hat.

Die Vorbehandlungsversuche im 425 L TDH-Reaktor haben gezeigt, dass es möglich war auch ganze Ballen von Weizenstroh zu verwenden. Allerdings müsste unter Umständen das

Reaktor-Design verändert werden, so dass der Heißdampf bzw. die heiße verdünnte Säure gleichmäßiger verteilt in den Reaktor gelangt. So ließe sich das Weizenstroh noch besser vorbehandeln und die Zucker-Ausbeuten weiter steigern.

Hinsichtlich der PHB-Produktion muss die Konzentration an Biomasse deutlich gesteigert werden, um größere Mengen an PHB gewinnen zu können. Hier bietet sich vor allem die Kultivierung im Fed-Batch-Verfahren an. Dadurch lassen sich hohe Zellausbeuten erzielen, was gleichzeitig bei entsprechender Fütterungsstrategie hohe PHB-Erträge mit sich bringt. Durch den geringen Stickstoffanteil im enzymatischen Hydrolysat eignet sich dieses ideal für die Produktion von PHB. Einzig zur Bildung von genügend Biomasse müsste eine zusätzliche Ammoniumquelle wie Ammoniumchlorid oder –sulfat zugefügt. Darüber hinaus wäre es sinnvoll die Konzentration an Spurenelementen anzupassen.

Ein anderer Punkt im Zusammenhang mit der PHB-Produktion wäre die Nutzung der xylosehaltigen TDH-Hydrolysate. Die Untersuchungen in dieser Arbeit beschränkten sich ausschließlich auf die Produktion von PHB in den glucosehaltigen enzymatischen Hydrolysaten. Eine Reihe von PHB-Stämmen, wie z.B. *Bacillus circulans* ist in der Lage Xylose als Kohlenstoffquelle zu verwerten. Im Rahmen einer anderen Arbeit in diesem Projekt wurden hierzu vielversprechende Ergebnisse gemacht.

6. Referenzen:

- Abatzoglov, N., J. Bouchard, E. Chornet and R. Overend** (1986). "Dilute acid depolymerization of cellulose in aqueous phase: experimental evidence of the significant presence of soluble oligomeric intermediates." *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 64(5): 781-786.
- Adney, B. and J. Baker** (1996). "Measurement of Cellulase Activities." *Laboratory Analytical Procedure* 6.
- Ahn, W. S., S. J. Park and S. Y. Lee** (2000). "Production of Poly (3-Hydroxybutyrate) by Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli* with a Highly Concentrated Whey Solution." *Applied and environmental microbiology* 66(8): 3624-3627.
- Alizadeh, H., F. Teymouri, T. I. Gilbert and B. E. Dale** (2005). "Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX)." *Applied biochemistry and biotechnology* 124(1): 1133-1141.
- Alvira, P., E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros and M. J. Negro** (2010). "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review." *Bioresource technology* 101(13): 4851-4861.
- Asa-Spezialenzym** (2012). "Technische Enzyme Produktliste." von <http://www.asa-enzyme.de/produkte/technische/>.
- Azar, C. and E. D. Larson** (2000). "Bioenergy and land-use competition in Northeast Brazil." *Energy for sustainable development* 4(3): 64-71.
- Babel, W., J. U. Ackermann and U. Breuer** (2001). "Physiology, regulation, and limits of the synthesis of poly (3HB)." *Biopolyesters*: 125-157.
- Ballesteros, I., M. J. Negro, J. M. Oliva, A. Cabañas, P. Manzanares and M. Ballesteros** (2006). Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Twenty-Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Springer.
- Banerjee, N., R. Bhatnagar and L. Viswanathan** (1981). "Inhibition of Glycolysis by Furfural in *Saccharomyces cerevisiae*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 11: 226-228.
- Berlin, A., M. Balakshin, N. Gilkes, J. Kadla, V. Maximenko, S. Kubo and J. Saddler** (2006a). "Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations." *Journal of Biotechnology* 125(2): 198-209.
- Berlin, A., N. Gilkes, D. Kilburn, V. Maximenko, R. Bura, A. Markov, A. Skomarovsky, A. Gusakov, A. Sinitsyn and O. Okunev** (2006b). Evaluation of cellulase preparations for hydrolysis of hardwood substrates, Springer.
- Betancourt, A., A. Yezza, A. Halasz, H. Van Tra and J. Hawari** (2007). "Rapid microwave assisted esterification method for the analysis of poly-3-hydroxybutyrate in *Alcaligenes latus* by gas chromatography." *Journal of Chromatography A* 1154(1): 473-476.
- BGK** (2006). Methoden Buch zur Analyse organischer Düngemittel, Bodenverbesserungsmittel und Substrate. Köln, Bundesgütegemeinschaft Kompost e.V.

- Biely, P., J. Puls and H. Schneider** (1985). "Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems." *FEBS letters* 186(1): 80-84.
- Biogas, F.** (2010). Entwicklung der Anzahl Biogasanlagen und der gesamten installierten elektrischen Leistung in Megawatt Fachverband Biogas e.V. Biogas Branchenzahlen 2010, Entwicklung der Anzahl Biogasanlagen und der gesamten installierten elektrischen Leistung in Megawatt.
- BioPro, BASF AG, Fraunhofer IZM and S. AG** (2008). Biopolymere auf Basis von Polyhydroxyalkanoaten (PHA) – Verfahrensentwicklung für die wirtschaftliche Produktion.
- Bitra, V. S. P., A. R. Womac, N. Chevanan, P. I. Miu, C. Igathinathane, S. Sokhansanj and D. R. Smith** (2009). "Direct mechanical energy measures of hammer mill comminution of switchgrass, wheat straw, and corn stover and analysis of their particle size distributions." *Powder Technology* 193(1): 32-45.
- BMBF** (2012). "Erfolge der Förderung: Biosprit aus Stroh." von <http://www.bmbf.de/de/17786.php>.
- Braunegg, G., G. Lefebvre and K. F. Genser** (1998). "Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects." *Journal of Biotechnology* 65(2): 127-161.
- Braunegg, G., B. Sonnleitner and R. Lafferty** (1978). "A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass." *Applied microbiology and biotechnology* 6(1): 29-37.
- Brodeur, G., E. Yau, K. Badal, J. Collier, K. Ramachandran and S. Ramakrishnan** (2011a). "Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review." *Enzyme Research* 2011.
- Brodeur, G., E. Yau, K. Badal, J. Collier, K. B. Ramachandran and S. Ramakrishnan** (2011b). "Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review." *Enzyme Research* 2011: 17.
- Byrom, D.** (1987). "Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics." *Trends in Biotechnology* 5(9): 246-250.
- Byrom, D.** (1992). "Production of poly-[β]-hydroxybutyrate: poly-[β]-hydroxyvalerate copolymers." *FEMS Microbiology Letters* 103(2-4): 247-250.
- C. Wyman, S. D., M. Himmel, J. Brady, C. Skopec, L. Viikari** (2005). Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose.
- Chandal AK, S. N., Singh OV** (2011). "Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production." *Bernardes MAS (ed) Biofuel production-recent developments and prospects*: 21.
- Chandra, R., R. Bura, W. Mabee, A. Berlin, X. Pan and J. Saddler** (2007). "Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?" *Biofuels*: 67-93.
- Chang, V. S. and M. T. Holtzapple** (2000). "Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity." *Applied biochemistry and biotechnology* 84(1): 5-37.
- Cheng, J. J.** (2010). Biological process for ethanol production. Biomass to renewable energy processes. J. J. Cheng. *New York, CRC Press*: 229-234.

- Choi, J.-i., S. Y. Lee and K. Han** (1998). "Cloning of the *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*." *Applied and environmental microbiology* 64(12): 4897-4903.
- Chundawat, S. P. S., R. Vismeh, L. N. Sharma, J. F. Humpala, L. da Costa Sousa, C. K. Chambliss, A. D. Jones, V. Balan and B. E. Dale** (2010). "Multifaceted characterization of cell wall decomposition products formed during ammonia fiber expansion (AFEX) and dilute acid based pretreatments." *Bioresource technology* 101(21): 8429-8438.
- Conti, J. and P. Holtberg** (2013). International Energy Outlook 2013, US Energy Information Administration.
- Creagh, A. L., E. Ong, E. Jervis, D. G. Kilburn and C. A. Haynes** (1996). "Binding of the cellulose-binding domain of exoglucanase Cex from *Cellulomonas fimi* to insoluble microcrystalline cellulose is entropically driven." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(22): 12229-12234.
- Dornburg, V., B. G. Hermann and M. K. Patel** (2008). "Scenario projections for future market potentials of biobased bulk chemicals." *Environmental science & technology* 42(7): 2261-2267.
- Douglas, C., R. Allmaras, P. Rasmussen, R. Ramig and N. Roager** (1980). "Wheat straw composition and placement effects on decomposition in dryland agriculture of the Pacific Northwest." *Soil Science Society of America Journal* 44(4): 833-837.
- Dunlop, A. P.** (1948). "Furfural formation and behavior." *Industrial and Engineering Chemistry* 40(2): 204-209.
- DuPont** (2012). "Fuel Ethanol from Biomass. <http://biofuels.dupont.com/>"
- E. Knüppel, A. G., H. Hansen** (2013). Strohheizungsanlage Gülzow, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. Gülzow..
- Eberswalde, F.** (2010). Holzkunde. FH Eberswalde.
- Eggeman, T. and R. T. Elander** (2005). "Process and economic analysis of pretreatment technologies." *Bioresource technology* 96(18): 2019-2025.
- Endres, H. J. and A. Siebert-Raths** (2009). Technische Biopolymere, Hanser Verlag.
- Eriksson, Ö., D. Goring and B. Lindgren** (1980). "Structural studies on the chemical bonds between lignins and carbohydrates in spruce wood." *Wood science and technology* 14(4): 267-279.
- Esteghlalian, A. R., V. Srivastava, N. Gilkes, D. J. Gregg and J. N. Saddler** (2001). An overview of factors influencing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic feedstocks, ACS Publications.
- Rotach, E. P.,** (2000). Holzkunde II Teil 1 Holzchemie, ETH Zürich..
- Rotach, E. P.,** (2001). Holzkunde II Teil 2 Holzchemie ETH Zurich
- Fadel, M.** (2000). "Production physiology of cellulases and β -glucosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid state fermentation conditions." *Online Journal of Biological Sciences* 1(5): 401-411.
- FNR** (2008). Biogas Basisdaten Deutschland, Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe. Gützow.

- FNR** (2010). Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe. Gülzow.
- Fresenius, P. and K. Görlitzer** (1991). Organisch-chemische Nomenklatur: Grundlagen, Regeln, Beispiele, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Fritsche, W.** (2002). Mikrobiologie, Gustav Fischer. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Fujino, T., Y. Sone, Y. Mitsuishi and T. Itoh** (2000). "Characterization of cross-links between cellulose microfibrils, and their occurrence during elongation growth in pea epicotyl." *Plant and Cell Physiology* 41(4): 486-494.
- G. Reinhold, E. F.** (2012). Vergärung von Stroh -Stand und Perspektive. 2. *International Fachtagung Strohenergie*, Berlin, Fraunhofer IKTS, Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft.
- Ghose, T.** (1987). "Measurement of cellulase activities." *Pure Appl Chem* 59(2): 257-268.
- Gould, J. M.** (1984). "Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification." *Biotechnology and bioengineering* 26(1): 46-52.
- Grethlein, H. E.** (1985). "The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates." *Nature Biotechnology* 3(2): 155-160.
- Gruber, E.** (2000). "Stärke in Unterlagen zur Vorlesung „Makromolekulare Chemie, Ökologie und Ökonomie der Nachwachsenden Rohstoffe“."
- Håkansson, U., L. Fägerstam, L. G. Pettersson and L. Andersson** (1979). "A 1, 4-beta-glucan glucanohydrolase from the cellulolytic fungus *Trichoderma viride* QM 9414. Purification, characterization and preparation of an immunoadsorbent for the enzyme." *Biochemical Journal* 179(1): 141.
- Heinreich, D. and M. Hergst** (1992). Munksgaards atlas – økologi. *Kopenhagen*.
- Heitz, M., E. Capek-Menard, P. Koeberle, J. Gagne, E. Chornet, R. Overend, J. Taylor and E. Yu** (1991). "Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: Optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II technology." *Bioresource Technology* 35(1): 23-32.
- Herder** (2003). Herder Lexikon der Biologie. *Heidelberg*, Springer Verlag.
- Hill, J., E. Nelson, D. Tilman, S. Polasky and D. Tiffany** (2006). "Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(30): 11206-11210.
- Hill, M.** (2005). "Hemicellulose." *Encyclopedia of Science and Technology 5th Edition*
- Jacobsen, S. E. and C. E. Wyman** (2000). Cellulose and hemicellulose hydrolysis models for application to current and novel pretreatment processes. *Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Springer.
- Jacquel, N., C.-W. Lo, H.-S. Wu, Y.-H. Wei and S. S. Wang** (2007). "Solubility of polyhydroxyalkanoates by experiment and thermodynamic correlations." *AIChE Journal* 53(10): 2704-2714.
- Jendrossek, D., A. Schirmer and H. Schlegel** (1996). "Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids." *Applied microbiology and biotechnology* 46(5): 451-463.

- K. Schumacher, P. T.** (2012). "Zubau der Kapazitäten bei Biogasanlagen übertrifft 2011 die Vorjahre." von <http://www.dbfz.de/web/presse/pressemitteilungen-2012/zubau-der-kapazitaeten-bei-biogasanlagen-uebertrifft-2011-die-vorjahre.html>.
- Kaar, W. E. and M. T. Holtzapfle** (1998). "Benefits from Tween during enzymic hydrolysis of corn stover." *Biotechnology and bioengineering* 59(4): 419-427.
- Kaltschmitt M, H. H.** (2001). *Energie aus Biomasse - Grundlage, Techniken und Verfahren.* Springer-Verlag Berlin New York.
- Kaltschmitt, M., D. Merten, N. Fröhlich and M. Nill** (2003). *Energiegewinnung aus Biomasse. Externe Expertise für das WBGU-Hauptgutachten 2003" Welt im Wandel: Energiewende zur Nachhaltigkeit,* Springer Verlag, Berlin–Heidelberg–New York.
- Kamga, S.** (2012). Reduktion von Hemmstoffen in Hydrolysaten nach der chemisch-hydrothermischen Vorbehandlung ligninhaltiger Biomassen und Untersuchung der Fermentierbarkeit am Beispiel der Milchsäure-Produktion. Lehrstuhl für thermische Verfahrenstechnik, TU Kaiserslautern. Kaiserslautern. *Master.*
- Kim, B. S.** (2000). "Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates." *Enzyme and Microbial Technology* 27(10): 774-777.
- Kim, B. S., S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang and S. I. Woo** (1994). "Production of poly (3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control." *Biotechnology and bioengineering* 43(9): 892-898.
- Kim, S. and B. E. Dale** (2004). "Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues." *Biomass and Bioenergy* 26: 361-375.
- Kim, S. W., P. Kim, H. S. Lee and J. H. Kim** (1996). "High production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) from *Methylobacterium organophilum* under potassium limitation." *Biotechnology letters* 18(1): 25-30.
- König, H., L. Li and J. Fröhlich** (2013). "The cellulolytic system of the termite gut." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(18): 7943-7962.
- Kumar, R., G. Mago, V. Balan and C. E. Wyman** (2009). "Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies." *Bioresourcetechnology* 100(17): 3948-3962.
- Larsson, S., A. Reimann and L. Jönsson** (1999). "Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulosic hydrolysates of spruce." *Applied Microbiology and Biotechnology*: 91-103.
- Lemoigne, M.** (1926). "Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide β-oxobutyrique." *Bulletin de la Société de Chimie Biologique* 8: 12.
- Lichts, F. O.** (2011). "Industry Statistics: 2010 World Fuel Ethanol Production." von <http://www.ethanolrfa.org/pages/statistics#E>.
- Lichts, F. O.** (2012). *Innovation – 2012 Ethanol Industry Outlook,* Renewable Fuels Association
- Liu, F., W. Li, D. Ridgway, T. Gu and Z. Shen** (1998). "Production of poly-β-hydroxybutyrate on molasses by recombinant *Escherichia coli*." *Biotechnology letters* 20(4): 345-348.

- Liu, Z. L., P. J. Slininger, B. S. Dien, M. A. Berhow, C. P. Kurtzman and S. W. Gorsich** (2004). "Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran." *Microbiology Biotechnology* 31: 345-352.
- Lowe, S. E., M. Theodorou and A. Trinci** (1987). "Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan." *Applied and environmental microbiology* 53(6): 1216-1223.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall** (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J biol chem* 193(1): 265-275.
- M. Kaltschmitt, H. H.** (2009). Energie aus Biomassen - Grundlagen, Techniken und Verfahren. Springer Verlag Berlin und Heidelberg, H. Hofbauer.
- Madison, L. L. and G. W. Huisman** (1999). "Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(1): 21-53.
- Makkar, N. and L. Casida** (1987). "*Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.; a Nonobligate Bacterial Predator of Bacteria in Soil†." *International journal of systematic bacteriology* 37(4): 323-326.
- Mansfield, D. A., A. J. Anderson and L. A. Naylor** (1995). "Regulation of PHB metabolism in *Alcaligenes eutrophus*." *Canadian journal of microbiology* 41(13): 44-49.
- Mansfield, S. D., C. Mooney and J. N. Saddler** (2008). "Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis." *Biotechnology progress* 15(5): 804-816.
- Map, M.** "3 Stoffumwandlungen. (2010)"
- Marin, G. and G. S. Yablonsky** (2011). Kinetics of Chemical Reactions, Wiley. com.
- Martinez, A., M. E. Rodriguez, M. L. Wells, S. W. York, J. F. Preston and L. O. Ingram** (2001). "Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime." *Biotechnology progress* 17(2): 287-293.
- McAloon, A., F. Taylor, W. Yee, K. Ibsen and R. Wooley** (2000). Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks. National Renewable Energy Laboratory Report.
- McNaught, A. D.** (1996). "Nomenclature of Carbohydrates " *Pure & Appl. Chem* 68(10): 90.
- McParland, J., H. Grethlein and A. Converse** (1982). "Kinetics of acid hydrolysis of corn stover." *Solar Energy* 28(1): 55-63.
- Miller, E. N., L. R. Jarboe, P. C. Turner, P. Pharkya, L. P. Yomano, S. W. York, D. Nunn, K. Shanmugam and L. O. Ingram** (2009). "Furfural inhibits growth by limiting sulfur assimilation in ethanologenic *Escherichia coli* strain LY180." *Applied and environmental microbiology* 75(19): 6132-6141.
- Modig, T., G. Liden and M. J. Taherzadeh** (2002). "Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvat dehydrogenase." *Biochem J* 363: 769-776.
- Mooney, C. A., S. D. Mansfield, M. G. Touhy and J. N. Saddler** (1998). "The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods." *Bioresource Technology* 64(2):

113-119.

Münch, J. (2008). "Nachhaltig nutzbares Getreidestroh in Deutschland." *Positionspapier des Instituts für Energie- und Umweltforschung Heidelberg (IFEU) GmbH, Heidelberg.*

Mussatto, S. I. and I. C. Roberto (2004). "Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review." *Bioresource technology* 93(1): 1-10.

NAOO (2013). von <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/weekly.html>.

Neurotiker (2008). Structure of poly-(R)-3-hydroxybutyrate (P3HB). Poly-(R)-3-hydroxybutyrat.svg. Wikimedia.

Nikel, P. I., A. De Almeida, E. C. Melillo, M. A. Galvagno and M. J. Pettinari (2006). "New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly (3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by-products." *Applied and environmental microbiology* 72(6): 3949-3954.

Normung, E. K. f. (2010). Feste Biobrennstoffe - Terminologie, Definition und Beschreibungen. *EN 14588.*

Novozyme (2010). "Novozymes Cellic® CTec2. The first commercially viable enzyme for cellulosic ethanol production." von <http://www.bioenergy.novozymes.com/cellulosic-ethanol/cellic-product-information/>.

Novozymes (2012). "The Cellic® CTec legacy ".

Novozymes (2013). Retrieved 130801, 2013, von <http://bioenergy.novozymes.com/en/cellulosic-ethanol/CellicCTec3/product-description/Pages/default.aspx>.

O'Sullivan, A. C. (1997). "Cellulose: the structure slowly unravels." *Cellulose* 4(3): 173-207.

Ouyang, J., Z. Dong, X. Song, X. Lee, M. Chen and Q. Yong (2010). "Improved enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose (Avicel PH101) by polyethylene glycol addition." *Bioresource technology* 101(17): 6685-6691.

Overend, R., E. Chornet and J. Gascoigne (1987). "Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments [and discussion]." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* 321(1561): 523-536.

Pacan B and Dröge S. (2010). "Abschlussbericht zum Forschungsprojekt: Stoffliche und energetische Nutzung von Stroh.", FNR, Gülzow

Pacan, B. B. and S. Dröge "Abschlussbericht zum Forschungsprojekt: Stoffliche und energetische Nutzung von Stroh., FNR, Gülzow"

Palmquist, E. and B. Hahn-Hägerdal (2000a). "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification." *Bioresource Technology* 74: 17-24.

Palmquist, E. and B. Hahn-Hägerdal (2000b). "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition." *Bioresource Technology* 74: 25-33.

Palmqvist, E., H. Grage, N. Q. Meinander and B. Hahn-Hägerdal (1999). "Main and Interaction Effects of Acetic Acid, Furfural, and p-Hydroxybenzoic Acid on Growth and Ethanol Productivity of Yeast." *Biotechnology and bioengineering* 63: 46-55.

- Patnaik, P. R.** (2008). "Response coefficient analysis of a fed-batch bioreactor to dissolved oxygen perturbation in complementary cultures during PHB production." *Journal of biological engineering* 2(1): 4.
- Patwardhan, P. and A. Srivastava** (2004). "Model-based fed-batch cultivation of *R. eutropha* for enhanced biopolymer production." *Biochemical Engineering Journal* 20(1): 21-28.
- Pedersen, M., K. S. Johansen and A. S. Meyer** (2011). "Low temperature lignocellulose pretreatment: effects and interactions of pretreatment pH are critical for maximizing enzymatic monosaccharide yields from wheat straw." *Biotechnology for biofuels* 4(1): 1-10.
- Peisker, D.** (2007). Stand der Technik Strohverbrennung Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft Jena.
- Peoples, O. P., S. Masamune, C. Walsh and A. J. Sinskey** (1987). "Biosynthetic thiolase from *Zoogloea ramigera*. III. Isolation and characterization of the structural gene." *Journal of Biological Chemistry* 262(1): 97.
- Peoples, O. P. and A. J. Sinskey** (1989). "Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC)." *Journal of Biological Chemistry* 264: 15298 - 15303.
- Peter Sitte, Elmar Weiler, J. W., Kadereit, Andreas Bresinsky and C. Körner** (2002). Strasburger – Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. *Heidelberg*.
- Pettersson, G., M. Linder, T. Reinikainen, T. Drakenberg, M. L. Mattinen, A. Annala, M. Kontteli, G. Lindeberg and J. Ståhlberg** (1995). "Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I." *Protein Science* 4(6): 1056-1064.
- Polizeli, M. L. T. M., A. C. S. Rizzatti, R. Monti, H. F. Terenzi, J. A. Jorge and D. S. Amorim** (2005). "Xylanases from fungi: properties and industrial applications." *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 577-591.
- Puri, V. P.** (2004). "Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification." *Biotechnology and bioengineering* 26(10): 1219-1222.
- Ragauskas, A. J., C. K. Williams, B. H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C. A. Eckert, W. J. Frederick, J. P. Hallett, D. J. Leak and C. L. Liotta** (2006). "The path forward for biofuels and biomaterials." *science* 311(5760): 484-489.
- Ramsay, B., K. Lomaliza, C. Chavarie, B. Dube, P. Bataille and J. Ramsay** (1990). "Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids." *Applied and environmental microbiology* 56(7): 2093-2098.
- Reinecke, F.** (2005). Biosyntheseweg von Polyhydroxybuttersäure (PHB). PHB-Biosynthese.png, Frank Reinecke. Wikipedia.de.
- Roberto, I., L. Lacis, M. Barbosa and I. de Mancilha** (1991). "Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for ethanol production." *Process Biochem* 26: 15-21.
- Ryu, H. W., S. K. Hahn, Y. K. Chang and H. N. Chang** (1997). "Production of poly (3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation." *Biotechnology and bioengineering* 55(1): 28-32.

- Saeman, J. F.** (1945). "Kinetics of wood saccharification-hydrolysis of cellulose and decomposition of sugars in dilute acid at high temperature." *Industrial & Engineering Chemistry* 37(1): 43-52.
- Saha, B. C., L. B. Iten, M. A. Cotta and Y. V. Wu** (2005). "Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol." *Process Biochemistry* 40(12): 3693-3700.
- Sandhya, M., J. Aravind and P. Kanmani** (2013). "Production of polyhydroxyalkanoates from *Ralstonia eutropha* using paddy straw as cheap substrate." *International Journal of Environmental Science and Technology* 10(1): 47-54.
- Schmer, M. R., K. P. Vogel, R. B. Mitchell, L. E. Moser, K. M. Eskridge and R. K. Perrin** (2006). "Establishment stand thresholds for switchgrass grown as a bioenergy crop." *Crop science* 46(1): 157-161.
- Schmidt, A. S. and A. B. Thomsen** (1998). "Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw." *Bioresource Technology* 64(2): 139-151.
- Schober, C.** (2008). Untersuchungen zum Einsatz technischer und mikrobiell hergestellter Enzymsysteme zur Hydrolyse der Lignocellulose in Maissilage, Logos Verlag Berlin GmbH.
- Selig, M., N. Weiss and Y. Ji** (2008). "Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass." *National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42629*.
- Singleton, V. L., R. Orthofer and R. M. Lamuela-Raventos** (1999). "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent." *Methods in enzymology* 299: 152-178.
- Sluiter, A., B. Hames and R. Ruiz** (2008a). Determination of Ash in Biomass, NREL. Battelle.
- Sluiter, A., B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton and D. Crocker** (2008b). "Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass." *National Renewable Energy Laboratory(NREL/TP-510-42618)*.
- Sluiter, A., R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter and D. Templeton** (2008c). "Determination of extractives in biomass." *National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42619*.
- Smant, G., J. P. W. G. Stokkermans, Y. Yan, J. M. De Boer, T. J. Baum, X. Wang, R. S. Hussey, F. J. Gommers, B. Henrissat and E. L. Davis** (1998). "Endogenous cellulases in animals: isolation of β -1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(9): 4906-4911.
- Ståhlberg, J., G. Johansson and G. Pettersson** (1991). "A new model for enzymatic hydrolysis of cellulose based on the two-domain structure of cellobiohydrolase I." *Nature Biotechnology* 9(3): 286-290.
- Steinbüchel, A.** (1992). "Biodegradable plastics." *Curr. Opin. Biotechnol.* 3: 291.
- Steinbüchel, A. and H. E. Valentin** (1995). "Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids." *FEMS Microbiology Letters* 128(3): 219-228.
- Stone, J., A. Scallan, E. Donefer and E. Ahlgren** (1969). "Digestibility as a simple function of a molecule of similar size to a cellulase enzyme." *Adv. Chem. Ser* 95: 219-241.

Sun, X., R. Sun, P. Fowler and M. Baird (2004). "Isolation and characterisation of cellulose obtained by a two-stage treatment with organosolv and cyanamide activated hydrogen peroxide from wheat straw." *Carbohydrate polymers* 55(4): 379-391.

Sun, Y. and J. Cheng (2002a). "Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review." *Bioresource Technology* 83: 1-11.

Sun, Y. and J. Cheng (2002b). "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review." *Bioresource technology* 83(1): 1-11.

T. Seidel, H. R., J. Orasche, J. Schnelle-Kreis, H. Hartmann (2012). Emissionen kritischer anorganischer Elemente bei der Verbrennung von Holz und Stroh. Fachtagung "Chancen und Risiken der Bioenergie im Kontext einer nachhaltigen Entwicklung". Universität Göttingen.

Taherzadeh, M. J. and K. Karimi (2008). "Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review." *International journal of molecular sciences* 9(9): 1621-1651.

Takanashi, M., T. Shibahara, M. Shiraki and T. Saito (2004). "Biochemical and genetic characterization of a D (-)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase from *Acidovorax* sp. strain SA1." *Journal of bioscience and bioengineering* 97(1): 78-81.

Talebnia, F., D. Karakashev and I. Angelidaki (2010). "Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation." *Bioresource Technology* 101(13): 4744-4753.

Tanahashi, M., S. Takada, T. Aoki, T. Goto, T. Higuchi and S. Hanai (1983). "Characterization of Explosion Wood: 1. Structure and Physical Properties." *Wood research: bulletin of the Wood Research Institute Kyoto University* 69: 36-51.

Tilman, D., R. Socolow, J. A. Foley, J. Hill, E. Larson, L. Lynd, S. Pacala, J. Reilly, T. Searchinger and C. Somerville (2009). "Beneficial biofuels—the food, energy, and environment trilemma." *Science* 325(5938): 270.

Tsuge, T., K. Tanaka and A. Ishizaki (2001). "Development of a novel method for feeding a mixture of-lactic acid and acetic acid in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* for poly-3-hydroxybutyrate production." *Journal of bioscience and bioengineering* 91(6): 545-550.

Universal-Lexikon (2012). "Universal-Lexikon 2012." von http://universal_lexikon.deacademic.com/142359/Frequenzfaktor.

UNO (2012). World Population Prospects. The 2010 Revision. World Population change per year (thousands) Medium variant 1950–2050. *New York*, Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat.

Viola, E., M. Cardinale, R. Santarcangelo, A. Villone and F. Zimbardi (2008). "Ethanol from eel grass via steam explosion and enzymatic hydrolysis." *Biomass and Bioenergy* 32(7): 613-618.

Wagenführ, A. (2008). Taschenbuch der Holztechnik. *Carl Hanser Verlag GmbH und Co. KG*, F. Scholz.

Wandrey, C. and A. Aivasidis (1983). "Zur reaktionstechnik der anaeroben fermentation." *Chemie Ingenieur Technik* 55(7): 516-524.

Wang, F. and S. Y. Lee (1997). "Poly (3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation." *Applied and environmental microbiology* 63(9): 3703-3706.

Wang, J. and H.-Q. Yu (2007). "Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) and extracellular polymeric substances (EPS) by *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 in batch cultures." *Applied Microbiology and Biotechnology* 75(4): 871-878.

Ward, C., A. M. Nolan, K. O'Hanlon, T. McAree, N. Barron, L. McHale and A. P. McHale (1995). "Production of ethanol at 45 °C on starch containing media by a mixed culture of thermotolerant, ethanol producing yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 814.70 and a thermophilic filamentous fungus *Taloromyces emersonii*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 408-411.

Weiler, E. W. and L. Nover (2008). Allgemeine und molekulare Botanik, Georg Thieme Verlag.

Weirich, F. (2012). "Schnellpyrolyse von Biomasse." von <http://www.ikft.kit.edu/181.php>.

Whitney, S. E., M. G. Gothard, J. T. Mitchell and M. J. Gidley (1999). "Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls." *Plant Physiology* 121(2): 657-664.

Wood, T. M. (1985). "Properties of cellulolytic enzyme systems." *Biochem. Soc. Trans* 13(3): 31-38.

Wyman, C. E. (1999). "Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges." *Annual Review of Energy and the Environment* 24(1): 189-226.

Ximenes, E., Y. Kim, N. Mosier, B. Dien and M. Ladisch (2010). "Inhibition of cellulases by phenols." *Enzyme and Microbial Technology* 46(3-4): 170-176.

Yikrazuul (2009). Xylan. Wikipedia.de.

Young, F. K., J. R. Kastner and S. W. May (1994). "Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid from D-xylose and lactose by *Pseudomonas cepacia*." *Applied and environmental microbiology* 60(11): 4195-4198.

Zeitsch, K. J. (2000). The chemistry and technology of furfural and its many by-products, Elsevier Science.

Zeller, V., D. Thrän, M. Zeymer, B. Bürzle, P. Adler, J. Pontika, H. Postel, Franziska Müller Langer, Stefan Rönsch, Arne Gröngröft, Claudia Kirsten, N. Weller, Marian Schenker, Harald Wedwitschka, A. Vetter, C. Weiser, B. Wagner, P. Deumelandt, F. Reinicke, K. Henneberg and K. Wiegmann (2012). DBFZ Report Nr. 13, DBFZ. DBFZ, Leipzig.

Zhang, X., H. Yu, H. Huang and Y. Liu (2007). "Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culms." *International Biodeterioration & Biodegradation* 60(3): 159-164.

7. Anhang

7.1 Daten

Tab. 7.1: Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat nach der Behandlung von Weizenstroh bei verschiedenen TDH-Behandlungstemperaturen.

	105 °C	120 °C	135 °C	150 °C
Glucose [g kg ⁻¹ WS]	2,5	2,3	11,6	37
Xylose [g kg ⁻¹ WS]	10,2	22,3	88,7	137

Tab. 7.2: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat von der TDH-Behandlungstemperatur.

	105 °C	120 °C	135 °C	150 °C
Glucose [g kg ⁻¹ TDH-Stroh]	111	244	316	378
Xylose [g kg ⁻¹ TDH-Stroh]	48,2	102	125	41,3

Tab. 7.3: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat von der TDH-Behandlungstemperatur.

	105 °C	120 °C	135 °C	150 °C
Glucose [g kg ⁻¹ WS]	131	213	11,6	329
Xylose [g kg ⁻¹ WS]	68,9	114	88,7	180

Tab. 7.4: Abhängigkeit der Nebenproduktbildung im TDH-Hydrolysat von der TDH-Behandlungstemperatur.

	105 °C	120 °C	135 °C	150 °C
Essigsäure	2,65	4,74	12,2	22,6
Furfural	0	0	0,26	9,1
5-HMF	0	0	2,61	14,8
Phenolische Verbindungen	9,02	13,6	20,7	19,1

Tab. 7.5: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Behandlungszeit bei der TDH von Weizenstroh

	5 min	15 min	30 min	60 min
Glucose [g kg ⁻¹ WS]	14,2	20,5	29,3	40,6
Xylose [g kg ⁻¹ WS]	134	131	163	155

Tab. 7.6: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat von der TDH-Behandlungszeit

	5 min	15 min	30 min	60 min
Glucose [g kg ⁻¹ TDH-Stroh]	311	353	394	400
Xylose [g kg ⁻¹ TDH-Stroh]	56,4	70,8	45,7	38

Tab. 7.7: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat von der TDH-Behandlungszeit.

	5 min	15 min	30 min	60 min
Glucose [g kg ⁻¹ WS]	233	271	300	330
Xylose [g kg ⁻¹ WS]	231	181	202	180

Tab. 7.8: Abhängigkeit der Nebenproduktbildung im TDH-Hydrolysat von der TDH-Behandlungszeit.

	5 min	15 min	30 min	60 min
Essigsäure	11,8	14,6	20	21,5
Furfural	0	0,35	0,5	8,99
5-HMF	2,7	04,6	6,3	15,01
Phenolische. Verbindungen	3,68	6,63	11,1	19,01

Tab. 7.9: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Säure-Konzentration in der TDH bei 120 °C von Weizenstroh

	0,32 % (v/v)	0,64 % (v/v)	0,96 % (v/v)
Glucose [g kg ⁻¹ WS]	2,4	5,9	14,2
Xylose [g kg ⁻¹ WS]	23,4	83,6	101

Tab. 7.10: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat von Säure-Konzentration bei der TDH-Behandlung von Weizenstroh bei 120 °C.

	0,32 % (v/v)	0,64 % (v/v)	0,96 % (v/v)
Glucose [g kg ⁻¹ TDH-Stroh]	257	291	308
Xylose [g kg ⁻¹ TDH-Stroh]	107	76	66,7

Tab. 7.11: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat von der Säure-Konzentration bei der TDH-Behandlung von Weizenstroh bei 120 °C. .

	0,32 % (v/v)	0,64 % (v/v)	0,96 % (v/v)
Glucose [g kg ⁻¹ WS]	213	245	278
Xylose [g kg ⁻¹ WS]	118	182	193

Tab. 7.12: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Säure-Konzentration in der TDH bei 150 °C von Weizenstroh

	0,32 % (v/v)	0,64 % (v/v)	0,96 % (v/v)
Glucose [g kg ⁻¹ WS]	40,5	32,3	38,7
Xylose [g kg ⁻¹ WS]	130	132	132

Tab. 7.13: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat von Säure-Konzentration bei der TDH-Behandlung von Weizenstroh bei 150 °C.

	0,32 % (v/v)	0,64 % (v/v)	0,96 % (v/v)
Glucose [g kg ⁻¹ TDH-Stroh]	400	432	465
Xylose [g kg ⁻¹ TDH-Stroh]	43,5	68	51,3

Tab. 7.14: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat von der Säure-Konzentration bei der TDH-Behandlung von Weizenstroh bei 150 °C. .

	0,32 % (v/v)	0,64 % (v/v)	0,96 % (v/v)
Glucose [g kg ⁻¹ WS]	329	354	355
Xylose [g kg ⁻¹ WS]	180	215	206

Tab. 7.15: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat von dem I-Wert der PI-Steuerung zur Dampfzufuhr in den Reaktor

	2 ms	10 ms	40 ms
Glucose [g kg ⁻¹ WS]	31,9	40,5	29,7
Xylose [g kg ⁻¹ WS]	140	150	145

Tab. 7.16: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat von dem I-Wert der PI-Steuerung zur Dampfzufuhr in den Reaktor

	2 ms	10 ms	40 ms
Glucose [g kg ⁻¹ TDH-Stroh]	362	400	344
Xylose [g kg ⁻¹ TDH-Stroh]	103	44	82

Tab. 7.17: Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat von dem I-Wert der PI-Steuerung zur Dampfzufuhr in den Reaktor

	2 ms	10 ms	40 ms
Glucose [g kg ⁻¹ WS]	280	307	266
Xylose [g kg ⁻¹ WS]	214	244	203

Tab. 7.18: Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat und enzymatischen Hydrolysat bei der TDH von losem Weizenstroh in der 425 L TDH-Anlage.

	TDH-Hydrolysat	Enzym. Hydro. ²	Gesamt
Glucose [g kg ⁻¹ WS]	16,5	390	339
Xylose [g kg ⁻¹ WS]	76,9	40	140

Tab. 7.19: Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat und enzymatischen Hydrolysat bei der TDH eines Weizenstrohballens in der 425 L TDH-Anlage.

	TDH-Hydrolysat	Enzym. Hydro.	Gesamt
Glucose [g kg ⁻¹ WS]	23,2	355	323
Xylose [g kg ⁻¹ WS]	99,1	101	164

² Enzymatisches Hydrolysat, Zuckerangaben in g kg⁻¹ TDH-Stroh

Tab. 7.20: Energieverbrauch in kJ zum Aufheizen der TDH für die Behandlung von Weizenstroh auf 150 °C. Vergleich zweier Szenarien: 1.) Zweistufige Aufheizphase, 2.) Einstufige Aufheizphase

	Wasser (Verdampfungs-enthalpie)	Weizenstroh	Edelstahl	Wasser
Szenario 1	30030	196	475	10065
Szenario 2	25539	196	475	10065

Tab. 7.21: Abhängigkeit der Glucose-Konzentrationen bei einer dreistündigen enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh bei vorheriger Inkubation der Enzym-Dosierung bei 50 °C.

Inkubationszeit	0 h	3 h	12 h	24 h
Glucose-Konzentration [g L ⁻¹]	4,58	2,94	2,67	2,11

Tab. 7.22: Zeitlicher Verlauf der Glucose-Ausbeuten [g kg⁻¹ TDH-Stroh] bei zwei verschiedenen Enzym-Dosierungen in der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh.

	0 h	24 h	48 h	72 h
18,5 U	7,82	406	430	464
37 U	7,82	454	483	515

Tab. 7.23: Abhängigkeit der Glucose-Ausbeuten vom pH-Wert bei der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh nach 24 h.

	pH 4,5	pH 5	pH 6
Glucose-Konzentration [g L ⁻¹]	373	404	413

Tab. 7.24: Zeitlicher Verlauf der Zucker-Ausbeuten [g kg⁻¹ TDH-Stroh] bei der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh in einem 100 L Rührreaktor über 48 h.

	0 h	3 h	9 h	24 h	28 h	45 h	48 h
Glucose	26,2	78,1	114	232	216	266	304
Xylose	30,2	59,6	97,6	102	92,5	104	106
Cellobiose	0	27,9	58,1	52,4	62,3	45,1	39,4
Cellobiose + Glucose	26,4	105	231	336	341	351	383

Tab. 7.25: Zeitlicher Verlauf der BTM- und PHB-Konzentrationen bei der Kultivierung von *Cupriavidus necator* im enzymatischen Hydrolysat.

	30 h	45 h	70 h
BTM-Konzentration [g L ⁻¹]	0,3	0,85	2,34
PHB-Konzentration [g L ⁻¹]	0	0	0,86

Tab. 7.26: Zeitlicher Verlauf des Glucose-Verbrauchs bei der Kultivierung von *Cupriavidus necator* im enzymatischen Hydrolysat.

	30 h	45 h	70 h
Glucose-Verbrauch [mM]	2,22	3,33	22,8

Tab. 7.27: Zeitlicher Verlauf der BTM- und PHB-Konzentrationen bei der Kultivierung von *Cupriavidus necator* im enzymatischen Hydrolysat mit Zugabe von einer Spurenelement-Lösung.

	30 h	45 h	70 h
BTM-Konzentration [g L ⁻¹]	0,43	1,28	2,46
PHB-Konzentration [g L ⁻¹]	0	0	0,91

Tab. 7.28: Zeitlicher Verlauf der BTM- und PHB-Konzentrationen bei der Kultivierung von *Cupriavidus necator* im enzymatischen Hydrolysat mit Zugabe von einer Spurenelement-Lösung und Ammoniumchlorid.

	30 h	45 h	58 h	70 h
BTM-Konzentration [g L ⁻¹]	0,86	2,39	3,66	5,73
PHB-Konzentration [g L ⁻¹]	0	0,77	1,26	2,14

Tab. 7.29: Zeitlicher Verlauf des Glucose-Verbrauchs bei der Kultivierung von *Cupriavidus necator* im enzymatischen Hydrolysat.

	24 h	30 h	58 h	70 h
Glucose-Verbrauch [mM]	1,38	12,5	24,4	46,3

7.2 Symbole

Symbol	Einheit	Beschreibung
c_{HNO_3}	[% v/v]	Anteil Salpetersäure bei der TDH in Volumenprozent
m_{TDH}	[% w/w]	Feststoffanteil bei der TDH in Massenprozent
t_{EH}	[h]	Inkubationszeit bei der enzymatischen Hydrolyse
t_{TDH}	[h]	Behandlungszeit in der TDH
R	[J/mol K]	Allgemeine Gaskonstante
T_{EH}	[°C]	Inkubationstemperatur der enzymatischen Hydrolyse
T_{TDH}	[°C]	Behandlungstemperatur in der TDH
U_{EH}	[FPU g ⁻¹ TS]	Enzym-Dosierung in der enzymatischen Hydrolyse
W_{EH}	[rpm]	Schüttelfrequenz bei der enzymatischen Hydrolyse

7.3 Index

Glasübergangstemperatur	Temperatur beim Übergang von festem Glas in gummiartige bis zähflüssige Masse
Bruchdehnung	Bleibende Verlängerung einer Probe nach einem Bruch in Bezug auf die Ausgangsmessung

Abbildungsverzeichnis

- **Abb. 2.1:** Aufbau von Lignocellulose mit den drei Hauptbestandteilen Cellulose, Hemicellulose und Lignin (*Fritsche 2002*).
- **Abb. 2.2:** Aufbau der Cellulose-Ketten (*Gruber 2000*)
- **Abb. 2.3:**Beispiel eines Xylans mit verschiedenen Seitenketten (*Yikrazuul 2009*).
- **Abb. 2.4:** Grundbausteine der Ligninsynthese in Pflanzen (*Gruber 2000*).
- **Abb. 2.5:** Darstellung der wichtigsten Nebenprodukte bei der Vorbehandlung von Lignocellulose in der TDH (*Chandal AK 2011*).
- **Abb. 2.6:** Enzymatische Hydrolyse von Cellulose mittels der drei Enzymaktivitäten ENG, EXG und BG (*Cheng 2010*)
- **Abb. 2.7:** Biosynthese von PHB und die korrespondierenden Gene des phbCAB-Operons (*Madison and Huisman 1999*)
- **Abb. 2.8:** Biosyntheseweg von PHB (*Reinecke 2005*)
- **Abb. 2.9:** Allgemeine chemische Struktur von PHB (*Neurotiker 2008*)
- **Abb. 3.2:** 125 L TDH Anlage zur Thermodruckhydrolyse von Weizenstroh mit dem Flüssigkeitsbehälter (1), Druckbehälter (2) und Dampferzeuger (3).
- **Abb. 3.3:** 425 L TDH-Druckreaktorbehälter einer halbtechnischen TDH-Aufschlussanlage für Biomasse.
- **Abb. 4.1:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Behandlungstemperatur in der TDH. Sonstige Prozessparameter bei der TDH: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).
- **Abb. 4.2:** Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat in Abhängigkeit von der TDH-Behandlungstemperatur. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v). Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.
- **Abb. 4.3:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat von der TDH-Behandlungstemperatur. Sonstige TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v). Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.
- **Abb. 4.4:** Abhängigkeit der Nebenproduktausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Behandlungstemperatur in der TDH. Sonstige TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).

- **Abb. 4.5:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Behandlungszeit in der TDH. Sonstige Prozessparameter bei der TDH: T_{TDH} : 150 °C; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).
- **Abb. 4.6:** Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat in Abhängigkeit von der TDH-Behandlungszeit. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. Sonstige TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v). Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.
- **Abb. 4.7:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat von der TDH-Behandlungstemperatur. Sonstige TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v). Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.
- **Abb. 4.8:** Abhängigkeit der Nebenproduktausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Behandlungszeit in der TDH. Sonstige TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).
- **Abb. 4.9:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat vom prozentualen Anteil der HNO₃ in der TDH. Sonstige Prozessparameter bei der TDH: T_{TDH} 120 °C; t_{TDH} 60 min; c_{HNO_3} ; m_{TDH} 15 % (v/v).
- **Abb. 4.10:** Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat in Abhängigkeit vom prozentualen Anteil der HNO₃ bei der TDH. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. Sonstige TDH-Parameter: T_{TDH} 120 °C; t_{TDH} : 60 min; m_{TDH} : 15 % (v/v). Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.
- **Abb. 4.11:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat vom prozentualen Anteil der HNO₃ in der TDH. Sonstige TDH-Parameter: T_{TDH} : 120 °C; t_{TDH} : 60 min; m_{TDH} : 15 % (v/v). Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.
- **Abb. 4.12:** Abhängigkeit der Nebenproduktausbeuten im TDH-Hydrolysat vom prozentualen Anteil der HNO₃ in der TDH. Sonstige TDH-Parameter: T_{TDH} : 120 °C; t_{TDH} : 60 min; m_{TDH} : 15 % (v/v).
- **Abb. 4.13:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat vom prozentualen Anteil der HNO₃ in der TDH. Sonstige Prozessparameter bei der TDH: T_{TDH} 150 °C; t_{TDH} 60 min; c_{HNO_3} ; m_{TDH} 15 % (v/v).

- **Abb. 4.14:** Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat in Abhängigkeit vom prozentualen Anteil der HNO_3 bei der TDH. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g^{-1} TS. Sonstige TDH-Parameter: T_{TDH} 150 °C; t_{TDH} : 60 min; m_{TDH} : 15 % (v/v). Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.
- **Abb. 4.15:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat vom prozentualen Anteil der HNO_3 in der TDH. Sonstige TDH-Parameter: T_{TDH} : 150 °C; t_{TDH} : 60 min; m_{TDH} : 15 % (v/v). Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g^{-1} TS.
- **Abb. 4.16:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Heißdampf-Zufuhr bei der TDH über den I-Wert der PI-Steuerung. Sonstige Prozessparameter bei der TDH: T_{TDH} : 150 °C; t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).
- **Abb. 4.17:** Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat in von der Heißdampf-Zufuhr bei der TDH über den I-Wert der PI-Steuerung. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g^{-1} TS. Sonstige TDH-Parameter: T_{TDH} 150 °C; t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v). Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.
- **Abb. 4.18:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat von der Heißdampf-Zufuhr bei der TDH über den I-Wert der PI-Steuerung. Sonstige TDH-Parameter: T_{TDH} : 150 °C; t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v). Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g^{-1} TS. Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.
- **Abb. 4.19:** Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat nach Vorbehandlung von losem Weizenstroh im 425 L TDH-Reaktor und anschließender enzymatischer Hydrolyse des TDH-Strohs. TDH-Parameter: T_{TDH} : 150 °C; t_{TDH} : 30 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (w/w). Enzymatische Hydrolyse: T_{EH} : 50 °C; t_{EH} : 24 h; W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g^{-1} TS. Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.
- **Abb. 4.20:** Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat nach Vorbehandlung eines Weizenstrohballens im 425 L TDH-Reaktor und anschließender enzymatischer Hydrolyse des TDH-Strohs. TDH-Parameter: T_{TDH} : 150 °C; t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (w/w). Enzymatische Hydrolyse: T_{EH} : 50 °C; t_{EH} : 24 h; W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g^{-1} TS.

- **Abb. 4.21:** Prozentuale Verteilung der benötigten Energiemengen beim zweistufigen Aufheizprozess auf 150 °C bei der TDH.
- **Abb. 4.22:** Prozentuale Verteilung der benötigten Energiemengen beim einstufigen Aufheizprozess auf 150 C bei der TDH.
- **Abb. 4.23:** Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat nach Vorbehandlung von Weizenstroh im 125 L TDH-Reaktor und anschließender enzymatischer Hydrolyse des TDH-Strohs. TDH-Parameter: T_{TDH} : 150 °C; t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (w/w). Enzymatische Hydrolyse: T_{EH} : 50 °C; t_{EH} : 24 h; W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. Eingesetztes Enzympräparat Cellic CTec 2 von Novozymes.
- **Abb. 4.24:** Abhängigkeit der Glucose-Konzentration im enzymatischen Hydrolysat von der Inkubationszeit des Enzym-Präparats bei 50 °C im Natriumacetat-Puffer. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS.
- **Abb. 4.25:** Abhängigkeit der Glucose-Ausbeute im enzymatischen Hydrolysat von der Inkubationstemperatur bei der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh. Sonstige Parameter enzymatische Hydrolyse: t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).
- **Abb. 4.26:** Zeitlicher Verlauf der Glucose-Ausbeute bei der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh in Abhängigkeit von der Enzym-Dosierung. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).
- **Abb. 4.27:** Abhängigkeit der Glucose-Ausbeute im enzymatischen Hydrolysat vom pH-Wert bei der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh. Sonstige Parameter enzymatische Hydrolyse: t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).
- **Abb. 4.28:** 100 L Rührreaktor für die enzymatische Hydrolyse von TDH-Stroh (links Außenansicht und rechts Innenansicht) mit Propellerrührer und Druckluftlanze.
- **Abb. 4.29:** Zeitlicher Verlauf der Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat bei der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh im 100 L Rührreaktor. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 45 °C; t_{EH} 48 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. TDH-Parameter: t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).
- **Abb. 4.30:** Zeitlicher Verlauf der Gasausbeuten bei verschiedenen Substraten im statischen Gärtest über 4 Wochen mit Impfschlamm aus einer Biogasanlage.

- **Abb. 4.32:** Biotrockenmasse- und PHB-Konzentrationen zu bestimmten Zeitpunkten bei einer Kultivierung von *Cupriavidus necator* DSM 545 im Schüttelkolben mit einer Schüttelfrequenz von 121 rpm über 70 h bei 30 °C in enzymatischem Hydrolysat.
- **Abb. 4.33:** Glucose-Verbrauch zu bestimmten Zeitpunkten während einer Kultivierung von *Cupriavidus necator* über 70 h bei 30 °C in reinem enzymatischem Hydrolysat. Die Kultivierung erfolgte im Schüttelinkubator bei 121 rpm.
- **Abb. 4.34:** Biotrockenmasse- und PHB-Konzentrationen zu bestimmten Zeitpunkten bei einer Kultivierung von *Cupriavidus necator* DSM 545 im Schüttelkolben mit einer Schüttelfrequenz von 121 rpm über 70 h bei 30 °C in reinem enzymatischem Hydrolysat.
- **Abb. 4.35:** Biotrockenmasse- und PHB-Konzentrationen zu bestimmten Zeitpunkten bei einer Kultivierung von *Cupriavidus necator* DSM 545 im Schüttelkolben mit einer Schüttelfrequenz von 121 rpm über 70 h bei 30 °C in enzymatischem Hydrolysat mit Bestandteilen eines veränderten Mineralmediums nach Ramsay et al. (1990).
- **Abb. 4.36:** Glucose-Verbrauch zu bestimmten Zeitpunkten während einer Kultivierung von *Cupriavidus necator* über 70 h bei 30 °C in enzymatischem Hydrolysat mit Bestandteilen eines veränderten Mineralsalzmediums nach Ramsay et al. (1990). Die Kultivierung erfolgte im Schüttelinkubator bei 121 rpm.

Tabellenverzeichnis

- **Tab. 2.2:**Übersicht verschiedener Vorbehandlungsmethoden zur Behandlung von Biomassen mit Vor- und Nachteilen.
- **Tab. 2.4:**Preise verschiedener Enzympräparate für die enzymatische Hydrolyse von Lignocellulose (*Schober 2008*)
- **Tab. 2.5:** Durchschnittliche Zusammensetzung von Biogas. (*M. Kaltschmitt 2009*)
- **Tab. 2.6:** Vergleich wichtiger Parameter bei natürlichen und rekombinaten PHB-Produzenten (*Kim et al. 1994, Young et al. 1994, Kim et al. 1996, Ryu et al. 1997, Wang and Lee 1997, Choi et al. 1998, Ahn et al. 2000*).
- **Tab. 2.7:** Physikalische Eigenschaften verschiedener PHAs im Vergleich zu Polypropylen (PP).
- **Tab. 2.8:** Übersicht industrielle Produktion von PHB
- **Tab. 3.1:**Absorptionskonstanten für die Bestimmung des säure löslichen Lignin bei verschiedenen ausgewählten Biomasse-Typen (*Sluiter et al. 2008b*).
- **Tab. 3.2:**Zusammensetzung des Weizenstrohs (Hof Räder, Bad Kreuznach, Deutschland). Bestimmt nach einem Verfahren der NREL im dreifachem Ansatz (*Sluiter et al. 2008b*).
- **Tab. 4.1:**Vergleich der Glucose- und Xylose-Ausbeuten nach der TDH im 100 L und 425 L TDH-Reaktor mit anschließender enzymatischer Hydrolyse bezogen auf die theoretischen Ausbeuten (in % TS)
- **Tab. 4.3:** Behandlungsparameter bei der Bestimmung der Energiebilanz in der 125 L TDH-Anlage.
- **Tab. 4.4:** Spezifische Wärmekapazitäten für die verwendeten Materialien.
- **Tab. 4.5:**Zusammensetzung des Weizenstrohs nach einer TDH-Behandlung bei 150 °C mit 0.32 % (v/v) Salpetersäure für 60 min.
- **Tab. 4.6:**Zusammensetzung des Weizenstrohs nach der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh. Enzymatische Hydrolyse bei: T_{EH} 50 °C; t_{EH} 24 h, W_{EH} 200 rpm und U_{EH} 18,5 FPU g⁻¹ TS. TDH-Parameter: T_{TDH} : 150 °C; t_{TDH} : 60 min; c_{HNO_3} : 0,32 % (v/v); m_{TDH} : 15 % (v/v).
- **Tab. 4.10:** Methanausbeuten und Methangehalte im Biogas bei der Vergärung der 4 verschiedenen Substrate im statischen Gärtest nach 30 Tagen.
- **Tab. 4.11:** Zusammensetzung des bei der Kultivierung verwendeten enzymatischen Hydrolysats

- **Tab. 4.12:** Nachweisgrenzen des Verfahrens zur Quantifizierung von Spurenelementen mittels ICP-MS für eine Auswahl an relevanten Spurenelementen in einem enzymatischen Hydrolysat von TDH-Stroh.
- **Tabelle 2.3:** Kapitalkosten für unterschiedliche Behandlungsmethoden (*Eggeman and Elander 2005*)

- **Tab. 3.1:** Zusammenfassung der in der Arbeit verwendeten Geräte
- **Tab. 3.2:** Übersicht über die wichtigsten Verbrauchsmittel
- **Tab. 3.3:** Zusammenfassung der in der Arbeit verwendeten Arbeit
- **Tab. 8.1:** Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat nach der Behandlung von Weizenstroh bei verschiedenen TDH-Behandlungstemperaturen.
- **Tab. 8.2:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat von der TDH-Behandlungstemperatur.
- **Tab. 8.3:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat von der TDH-Behandlungstemperatur.
- **Tab. 8.4:** Abhängigkeit der Nebenproduktbildung im TDH-Hydrolysat von der TDH-Behandlungstemperatur.
- **Tab. 8.5:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Behandlungszeit bei der TDH von Weizenstroh
- **Tab. 8.6:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat von der TDH-Behandlungszeit
- **Tab. 8.7:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat von der TDH-Behandlungszeit.
- **Tab. 8.8:** Abhängigkeit der Nebenproduktbildung im TDH-Hydrolysat von der TDH-Behandlungszeit.
- **Tab. 8.9:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Säure-Konzentration in der TDH bei 120 °C von Weizenstroh
- **Tab. 8.10:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat von Säure-Konzentration bei der TDH-Behandlung von Weizenstroh bei 120 °C.
- **Tab. 8.11:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat von der Säure-Konzentration bei der TDH-Behandlung von Weizenstroh bei 120 °C. .
- **Tab. 8.12:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat von der Säure-Konzentration in der TDH bei 150 °C von Weizenstroh
- **Tab. 8.13:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat von

Säure-Konzentration bei der TDH-Behandlung von Weizenstroh bei 150 °C.

- **Tab. 8.14:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH- und enzymatischen Hydrolysat von der Säure-Konzentration bei der TDH-Behandlung von Weizenstroh bei 150 °C. .
- **Tab. 8.15:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat von dem I-Wert der PI-Steuerung zur Dampfzufuhr in den Reaktor
- **Tab. 8.16:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat von dem I-Wert der PI-Steuerung zur Dampfzufuhr in den Reaktor
- **Tab. 8.17:** Abhängigkeit der Zuckerausbeuten im enzymatischen Hydrolysat von dem I-Wert der PI-Steuerung zur Dampfzufuhr in den Reaktor
- **Tab. 8.18:** Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat und enzymatischen Hydrolysat bei der TDH von losem Weizenstroh in der 425 L TDH-Anlage.
- **Tab. 8.19:** Zuckerausbeuten im TDH-Hydrolysat und enzymatischen Hydrolysat bei der TDH eines Weizenstrohballens in der 425 L TDH-Anlage.
- **Tab. 8.20:** Energieverbrauch in kJ zum Aufheizen der TDH für die Behandlung von Weizenstroh auf 150 °C. Vergleich zweier Szenarien: 1.) Zweistufige Aufheizphase, 2.) Einstufige Aufheizphase
- **Tab. 8.21:** Abhängigkeit der Glucose-Konzentrationen bei einer dreistündigen enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh bei vorheriger Inkubation der Enzym-Dosierung bei 50 °C.
- **Tab. 8.22:** Zeitlicher Verlauf der Glucose-Ausbeuten [g kg⁻¹ TDH-Stroh] bei zwei verschiedenen Enzym-Dosierungen in der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh.
- **Tab. 8.23:** Abhängigkeit der Glucose-Ausbeuten vom pH-Wert bei der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh nach 24 h.
- **Tab. 8.24:** Zeitlicher Verlauf der Zucker-Ausbeuten [g kg⁻¹ TDH-Stroh] bei der enzymatischen Hydrolyse von TDH-Stroh in einem 100 L Rührreaktor über 48 h.
- **Tab. 8.25:** Zeitlicher Verlauf der BTM- und PHB-Konzentrationen bei der Kultivierung von *Cupriavidus necator* im enzymatischen Hydrolysat.
- **Tab. 8.26:** Zeitlicher Verlauf des Glucose-Verbrauchs bei der Kultivierung von *Cupriavidus necator* im enzymatischen Hydrolysat.
- **Tab. 8.27:** Zeitlicher Verlauf der BTM- und PHB-Konzentrationen bei der Kultivierung von *Cupriavidus necator* im enzymatischen Hydrolysat mit Zugabe von einer Spurenelement-Lösung.
- **Tab. 8.28:** Zeitlicher Verlauf der BTM- und PHB-Konzentrationen bei der Kultivierung von *Cupriavidus necator* im enzymatischen Hydrolysat mit Zugabe von einer

Spurenelement-Lösung und Ammoniumchlorid.

- **Tab. 8.29:** Zeitlicher Verlauf des Glucose-Verbrauchs bei der Kultivierung von *Cupriavidus necator* im enzymatischen Hydrolysat.

Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit der Genehmigung des Fachbereichs Biologie, vertreten durch Prof. Dr. H. König, in folgenden Beiträgen bereits vorab veröffentlicht:

Publikationen

Ballmann P., Müller M., Dröge S., König H. (2013): Improved pretreatment process of wheat straw with direct steam Injection. In: 21st European Union Biomass Conference & Exhibition, Kopenhagen, p. 1003 – 1009, DOI: 10.5071/21stEUBCE2013-2DV.2.6

Tagungsbeiträge

P. Ballmann, M. Müller, S. Dröge, H. König: Improved pretreatment process of wheat straw with direct steam injection (Poster), 21st European Union Biomass Conference & Exhibition, Kopenhagen, Juni 2013

P. Ballmann, E. Gasser, S. Dröge, H. König: Fermentative production of biopolymers based on wheat straw (Poster), Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) zusammen mit der Koninklijke Nederlandse Vereniging voor Microbiologie (KNVM), Bremen, März 2013

P. Ballmann, E. Gasser, S. Dröge, H. König: Stoffliche und energetische Nutzung von Weizenstroh zur Herstellung von Biopolymeren (Kurzvortrag und Poster), DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologie, Frankfurt, März 2013

P. Ballmann, E. Gasser, S. Dröge, B. Pacan, H. König: Stoffliche und energetische Nutzung von Weizenstroh zur PHB-Produktion (Vortrag), Gemeinsame Jahrestagung der DECHEMA und ProcessNet, Karlsruhe, September 2012

Danksagung

Meinem Doktorvater danke ich herzlich für die Übernahme der fachlichen Betreuung des Referats. Darüber hinaus danke ich ihm für die wissenschaftliche Unterstützung und Förderung dieser Arbeit, sowie die stete Bereitschaft zur fachlichen Diskussion.

Beim 2. Gutachter bedanke ich mich für die Bereitschaft zur Übernahme des Koreferats.

Dem Prüf- und Forschungsinstitut in Pirmasens danke ich für die Möglichkeit meine Arbeit in der Abteilung Biotechnologie anfertigen zu dürfen. In dem Zusammenhang gilt mein ganz besonderer Dank meinem Betreuer für die Betreuung vor Ort und die Bereitschaft zur fachlichen Diskussion.

Beim Ministerium für Wirtschaft, Klimaschutz, Energie und Landesplanung Rheinland Pfalz möchte ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes im Rahmen des „RWB-EFRE-Programm Rheinland Pfalz 2007 – 2013“ bedanken.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Biotechnologie & Mikrobiologie, sowie der Abteilung Forschungsanlagen.

Ein ganz besonders lieber Dank gilt meinen Eltern sowie meinem Bruder, die mich immer unterstützt und bestärkt haben. Ohne diese Unterstützung wäre ich wohl nie soweit gekommen, danke dafür.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass die Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die dem Sinn und Wortlaut anderen Quellen entnommen wurden, sind durch entsprechende Angaben kenntlich gemacht.

Patrick Ballmann