

# **Abschlussbericht**

**Integriertes Verfahren zur Gewinnung von Bioethanol aus nachwachsenden Rohstoffen:**

**Verwertung von Roggenganzpflanzen durch innovativen thermisch-enzymatischen Aufschluss bei gleichzeitiger Biokonversion zu Ethanol und vollständiger Nutzung des Ligninanteils**

**Bioethanol**

**AZ 13157-32**

Dr. Lutz Popper, Alexander Rohde, Stern-Enzym GmbH & Co. KG, Ahrensburg

Prof. Dr. Garabed Antranikian, Dipl.-Biol. Vera Bockemühl, Institut für Technische Mikrobiologie, TU Hamburg-Harburg

Prof. Dr.-Ing. Gerd Brunner, Prof. Dr.-Ing. Irina Smirnova, Dr.-Ing. Carsten Zetzl, Dr.-Ing. Tim Rogalinski, Dipl.-Ing. Thomas Ingram, Institut für Thermische Verfahrenstechnik, TU Hamburg-Harburg

Sigmar Mothes, Sigmar Mothes Hochdrucktechnik GmbH, Berlin

März 2009

06/02

**Projektkennblatt**  
der  
**Deutschen Bundesstiftung Umwelt**



|    |       |         |    |             |              |
|----|-------|---------|----|-------------|--------------|
| Az | 13157 | Referat | 32 | Fördersumme | 462.295,00 € |
|----|-------|---------|----|-------------|--------------|

**Antragstitel**      **Förderschwerpunkt Biotechnologie: Integriertes Verfahren zur Gewinnung von Bioethanol aus nachwachsenden Rohstoffen: Verwertung von Roggenganzpflanzen durch innovativen thermisch-enzymatischen Aufschluss bei gleichzeitiger Biokonversion zu Ethanol und vollständiger Nutzung des Ligninanteils**

**Stichworte**      Schwerpunkt-Biotechnologie, nachwachsende Rohstoffe  
Mikrobiologie, Verfahren, Umweltchemikalien

| Laufzeit           | Projektbeginn     | Projektende       | Projektphase(n) |
|--------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| <b>2 1/2 Jahre</b> | <b>01.07.2006</b> | <b>31.12.2008</b> |                 |

Zwischenberichte      nach 12 und 18  
Monaten[1]

|                              |                           |                                   |
|------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| <b>Bewilligungsempfänger</b> | Stern-Enzym GmbH & Co. KG | Tel 04102-202-400                 |
|                              |                           | Fax 04102-202-002                 |
|                              | Kurt-Fischer-Str. 55      | Projektleitung<br>Dr. Lutz Popper |
|                              | 22926 Ahrensburg          | Bearbeiter<br>Vera Bockemühl      |

**Kooperationspartner**      TU Hamburg-Harburg, Institut für Technische Mikrobiologie, 21073 Hamburg  
TU Hamburg-Harburg, Institut für Thermische Verfahrenstechnik, 21073 Hamburg  
Sigmar Mothes GmbH, 12489 Berlin

### **Zielsetzung und Anlass des Vorhabens**

Der Aufschluss von Biomasse erreicht mit den bisher industriell eingesetzten Enzymsystemen nur geringe Umsatzraten von Cellulose zu Glukose. Der in diesem Vorhaben eingeschlagene Weg sieht daher eine Kombination von thermischen und enzymatischen Verfahren vor und zwar unter Einbeziehung von neuen Enzymsystemen aus thermophilen Mikroorganismen und Pilzen. Durch Kopplung mit hydrothermischen Aufschlussverfahren lassen sich hohe Umsatzraten erzielen.

### **Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden**

Die Biomasse Roggenstroh wurde zunächst hydrothermisch durch hochoverhitztes Wasser (200 °C) bei 50 bar in einem Festbetreaktor aufgeschlossen. Dabei wurden keine weiteren Chemikalien (wie z. B. Schwefelsäure oder Natronlauge) verwendet, um Umweltbelastungen zu vermeiden. Außerdem war bei diesen Hydrolysebedingungen die Bildung toxischer Nebenprodukte wie Hydroxymethylfurfural (HMF) und Furfural stark herabgesetzt. Nach dieser hydrothermischen Behandlung lag die Hemicellulose in Form von Oligosacchariden (Xylane) in der wässrigen Phase gelöst vor. Die Cellulose befand sich im Feststoffrückstand. Um die Cellulose und Xylane weiter zu hydrolysieren, schloss sich ein enzymatischer Aufschluss mit neuartigen Enzymsystemen aus einer Mutante von *Penicillium janthinellum* V39 und *Aspergillus brasiliensis* an. Eine mechanische Zerkleinerung (z. B. Mahlvorgang) des Feststoffes, gleichbedeutend mit einem enormen Energieaufwand, war nicht notwendig. Der Xylanasekomplex aus *A. brasiliensis* wandelte die Xylane in Xylose um, während der Cellulasekomplex aus *P. janthinellum* V39 die Cellulose in Glukose umsetzte. Die entstandenen Einfachzucker konnten durch geeignete Hefen (z. B. *Pichia stipitis*) zu Ethanol vergoren werden.

Deutsche Bundesstiftung Umwelt ● An der Bornau 2 ● 49090 Osnabrück ● Tel 0541/9633-0 ● Fax 0541/9633-190 ● <http://www.dbu.de>

## Ergebnisse und Diskussion

Die thermische Hydrolyse des Substrates Roggenstroh wurde erfolgreich durchgeführt. Dabei hat die Temperatur den größten Einfluss auf die Verflüssigung des Substrats. Es zeigte sich, dass die Ausbeuten der Zuckermonomere bei Behandlungsintensitäten von 210-230°C am höchsten sind. Höhere Intensitäten führen zum Abbau von Glukose und Xylose zu unerwünschten Produkten wie Furfural und Hydroxymethylfurfural (HMF).

Ein Festbettreaktor wurde in Betrieb genommen, der eine optimale thermische Vorbehandlung gewährleistet.

Die Produktion cellulolytischer und xylanolytischer Enzymsysteme aus den mesophilen Pilzen *Penicillium janthinellum* V39 und *Aspergillus brasiliensis* wurde erfolgreich induziert. Es liegen thermoaktive Enzymkomplexe vor, die für die Umwandlung langkettiger Saccharide zu Monosacchariden (Glukose und Xylose) sehr gut geeignet sind. Die Umsatzraten liegen dabei bei 98,7% (Glukose aus Cellulose) bzw 99,7% (Xylose aus Hemicellulose).

Durch Fermentationen konnte gezeigt werden, dass die ausgewählten Pentose-fermentierenden Hefen Xylose zu Ethanol umsetzen. *Pichia stipitis* ist dabei am besten geeignet. Untersuchungen zum Abbau der Zuckermonomere zeigten, dass während der Co-Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae* mit den Xylose-fermentierenden Hefen Glukose und Xylose zu Ethanol fermentiert werden.

## Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

1. Brunner G, Albrecht T: Conversion of Lignocellulosic Materials and Model Compounds in Sub- and Supercritical Water, in: Proceedings of the 8th International Symposium on Supercritical Fluids, Kyoto, Japan, 5-8 Nov **2006**
2. Schacht C, Zetl C, Brunner G: Continuous Liquid-Hot-Water Treatment of Rice Bran and the Production of pure Ethanol by Means of Enzymatic Conversion and SFE, in: Proceedings of the 1st Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids, Iguassu, Brazil, 10-13 Apr **2007**
3. Zetl C, Patil V, Budich M, Brunner G: One Step Purification to Absolute Alcohol from Sugar Cane Molasse by Means of Supercritical CO<sub>2</sub>, in: Proceedings of the 1st Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids, Iguassu, Brazil, 10-13 Apr **2007**
4. Rogalinski T, Liu K, Albrecht T, Brunner G: Hydrolysis Kinetics of Biopolymers in Subcritical Water, in: Proceedings of the 5th International Symposium on High Pressure Process Technology and Chemical Engineering, Segovia, Spain, 24-27 June **2007**
5. Brunner G: From Plant Materials to Ethanol by Means of Supercritical Fluid Technology, in: Proceedings of the 5th International Symposium on High Pressure Process Technology and Chemical Engineering, Segovia, Spain, 24-27 June **2007**
6. Katzer M, Stößer N, Minow B, Antranikian G: Microbial community genomics (Microcomgenomics) for discovery of novel cellulases. Poster VAAM Tagung, Osnabrück, 01.-04. April **2007**
7. Piela B, Antranikian G: Novel thermoactive cellulases from the anaerobic thermophilic bacteria

*Anaerobranca gottschalkii* and *Fervidobacterium gondwanense*. Vortrag VAAM Tagung, Osnabrück, 01.-04 April **2007**

8. Bockemühl V, Rogalinski T, Ingram T, Popper L, Brunner G, Antranikian G: Bioconversion of rye straw at elevated temperatures. Poster VAAM Tagung, Frankfurt, 09.-11. März **2008** (VAAM Posterpreis)
9. Müller K, Piela B, Bockemühl V, Antranikian G: Bioethanol production from rye straw by *Pichia stipitis*. Poster VAAM Tagung, Frankfurt, 09.-11. März **2008**
10. Rogalinski T., Ingram T., Zetzl C., Bockemühl V., Antranikian G., Brunner G.: Aufschluss von Lignocellulose mit heißem Wasser, CO<sub>2</sub> und Enzymen (Lecture). High Pressure meets Advanced Fluids (DECHEMA), Aachen, Germany **2008**
11. Ingram T., Rogalinski T., Bockemühl V., Popper L., Antranikian G., Brunner G.: Combined Thermal and Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass (Poster). International Congress on Biocatalysis (Biocat), Hamburg, Germany **2008**
12. Rogalinski T, Ingram T, Zetzl C, Bockemühl V, Antranikian G, Brunner G: Aufschluss von Lignocellulose mit heißem Wasser, CO<sub>2</sub> und Enzymen. Poster ProcessNet-Jahrestagung, Karlsruhe 07.-09. Oktober **2008** (ProcessNet Posterpreis)
13. Rogalinski T., Ingram T., Brunner G.: Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass in Water under Elevated Temperatures and Pressures. Journal of Supercritical Fluids, Volume 47, Issue 1, Pages 54-63, November **2008**
14. Bockemühl V, Ingram T, Rogalinski T, Popper L, Brunner G, Antranikian G: Bioconversion of rye straw at elevated temperatures. Poster Biorefinica 2009, Osnabrück 27.-28. Januar **2009**
15. Bockemühl V, Ingram T, Hahn F, Popper L, Smirnova I, Brunner G, Antranikian G: Bioconversion of rye straw at elevated temperatures. Poster VAAM Tagung, Bochum, 08.-11. März **2009**
16. Ingram T., Rogalinski T., Bockemühl V., Antranikian G., Brunner G.: Semi-Continuous Liquid Hot Water Pretreatment of Rye Straw. Journal of Supercritical Fluids, Volume 48, Issue 3, Pages 238-246, April **2009**

#### **Fazit**

Die Meilensteine des Projekts konnten erfolgreich erarbeitet werden. Mit dem vorliegenden Verfahren und den eingesetzten Enzymsystemen konnte Roggenstroh effizient hydrolysiert und für die alkoholische Gärung eingesetzt werden.

Deutsche Bundesstiftung Umwelt ☐ An der Bornau 2 ☐ 49090 Osnabrück ☐ Tel 0541/9633-0 ☐ Fax 0541/9633-190 ☐ <http://www.dbu.de>

## Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildungsverzeichnis.....  | c  |
| Tabellenverzeichnis.....  | e  |
| 1 Zusammenfassung .....   | 1  |
| 2 Anlass und Zielsetzung des Projekts.....  | 3  |
| 3 Material und Methoden .....   | 5  |
| 3.1 Eingesetzte Substrate .....   | 5  |
| 3.2 Eingesetzte Enzyme .....  | 5  |
| 3.2.1 Mutagenese und Kultivierung von <i>Penicillium janthinellum</i> .....                   | 6  |
| 3.2.2 Aktivitätsmessung der cellulolytischen Enzyme aus <i>Penicillium janthinellum</i> ..... | 7  |
| 3.2.3 Kultivierung von <i>Aspergillus brasiliensis</i> .....                                  | 7  |
| 3.2.4 Aktivitätsmessung der xylanolytischen Enzyme aus <i>Aspergillus brasiliensis</i> .....  | 7  |
| 3.3 Experimenteller Aufbau.....   | 7  |
| 3.4 Analytik.....   | 13 |
| 4 Ergebnisse und Diskussion .....   | 15 |
| 4.1 Zusammensetzung verwendeter Substrate .....   | 15 |
| 4.2 Thermische Vorbehandlung .....  | 15 |
| 4.2.1 Roggenstroh .....   | 15 |
| 4.2.2 Roggensilage .....  | 24 |
| 4.3 Gleichzeitige und separate thermische und enzymatische Behandlung .....                   | 35 |
| 4.3.1 Bereitstellung thermoaktiver cellulolytischer Enzyme aus Pilzen und Bakterien .....     | 35 |
| 4.3.2 Kombinierte thermisch-enzymatische Hydrolyse.....                                       | 39 |
| 4.3.3 Separate thermische und enzymatische Hydrolyse .....                                    | 41 |
| 4.4 Ethanolische Gärung.....  | 43 |
| 4.4.1 Xylose-fermentierende Hefen.....  | 43 |
| 5 Ökologische Relevanz des Projekts .....   | 49 |

|    |                             |    |
|----|-----------------------------|----|
| 6  | Fazit .....                 | 52 |
| 7  | Soll/Ist-Vergleich .....    | 53 |
| 8  | Öffentlichkeitsarbeit ..... | 54 |
| 9  | Literatur .....             | 56 |
| 10 | Anlagen .....               | 57 |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abb. 1: Fließschema der kontinuierlichen Hydrolyseapparatur.....  | 9  |
| Abb. 2: Fließschema der diskontinuierlichen Hydrolyseapparatur.....   | 10 |
| Abb. 3: Fließschema des semikontinuierlich betriebenen Festbettreaktors (50 ml) .....   | 12 |
| Abb. 4: Fließschema des semikontinuierlich betriebenen Festbettreaktors (1000 ml) .....   | 13 |
| Abb. 5: Verflüssigungsgrad von einprozentiger Roggenstroh-Suspension im kontinuierlichen Betrieb bei 100 bar in Abhängigkeit der Behandlungsintensität.....   | 16 |
| Abb. 6: Konzentration der Zuckermonomere Xylose und Glukose bei der thermischen Behandlung von einprozentiger Roggenstrohsuspension im kontinuierlichen Betrieb bei 100 bar in Abhängigkeit der Behandlungsintensität.....  | 17 |
| Abb. 7: Konzentration der Abbauprodukte HMF und Furfural bei der thermischen Behandlung von einprozentiger Roggenstrohsuspension im kontinuierlichen Betrieb bei 100 bar in Abhängigkeit der Behandlungsintensität.....   | 19 |
| Abb. 8: Glukose-Ausbeute $c_i/c_{i,0}$ über der Zeit bei 210, 230, 250 und 270°C und 100 bar im kontinuierlichen Betrieb mit einprozentiger Roggenstrohsuspension; Messpunkte und Modellierungskurven .....   | 20 |
| Abb. 9: Arrhenius-Plots für die Bildung (oben) und den Zerfall (unten) von Glukose gemäß Tab. 2....   | 21 |
| Abb. 10: Verflüssigung von Roggenstroh im kontinuierlich betriebenen Rohrreaktor bei 100 bar in Abhängigkeit des $R_0$ -Wertes .....  | 22 |
| Abb. 11: Produktbildung aus Roggenstroh in Abhängigkeit des Stroh-Massenanteils in der Substratlösung im diskontinuierlichen Betrieb bei 200°C, 30 min und 100 bar $N_2$ -Druck.....  | 23 |
| Abb. 12: Verflüssigungsgrad von einprozentiger Roggensilage-Suspension im kontinuierlichen Betrieb bei 100 bar in Abhängigkeit der Behandlungsintensität.....   | 24 |
| Abb. 13: Konzentrationen von Glukose und Hydroxymethylfurfural (HMF) bei der thermischen Behandlung von einprozentiger Roggensilage-Suspension im kontinuierlichen Betrieb bei 100 bar in Abhängigkeit der Behandlungsintensität .....  | 25 |
| Abb. 14: Konzentrationen von Xylose und Furfural bei der thermischen Behandlung von einprozentiger Roggensilage-Suspension im kontinuierlichen Betrieb bei 100 bar in Abhängigkeit der Behandlungsintensität .....  | 26 |
| Abb. 15: Verfärbung des Substrats nach der thermischen Behandlung von einprozentiger Roggensilage-Suspension im kontinuierlichen Betrieb bei 100 bar und 2,1...2,7 min für verschiedene Temperaturen; v.l.n.r.: 190, 210, 250, 270, 290°C .....   | 27 |
| Abb. 16: Thermisches Elutionsprofil von Roggenstroh im Festbettreaktor (1000 ml) bei 100 bar. Die gestrichelte Linie trennt die Temperaturbereiche, in welchen die Hemicellulose (links) bzw. die Cellulose (rechts) verflüssigt werden. ....   | 28 |
| Abb. 17: HPLC Chromatogramme der flüssigen Proben bei 116°C (A), 190°C (B) und 255°C (C) entsprechend Abb. 16. Hauptpeaks: (A) Glukose (retention time 16.87 min), Fructose (18.04); (B) Xylose (18.75), Furfural (37.75); (C) Glukose (16.81), Fructose (18.09), HMF (31.96), Furfural (37.69) ..... | 29 |

---

|   |    |
|---|----|
| Abb. 18: Thermische Elutionsprofile von Roggenstroh im Festbettreaktor (50 ml) bei 50 bar und verschiedenen Temperaturen, $\tau_{H_2O} = 9$ min.....  | 31 |
| Abb. 19: Verflüssigung von Roggenstroh im Festbettreaktor (50 ml) bei 50 bar und verschiedenen Temperaturen, $\tau_{H_2O} = 9$ min, experimentelle Daten und Model.....   | 32 |
| Abb. 20: Arrhenius-Plot für den Zerfall von Roggenstroh in heißem Wasser für Temperaturen zwischen 160°C und 240°C.....   | 33 |
| Abb. 21: Maximale Verflüssigung von Roggenstroh aus mehreren Reaktorkonzepten bei verschiedenen Temperaturen.....   | 33 |
| Abb. 22: Zusammensetzung des Feststoffrückstands bei 50 bar und verschiedenen Temperaturen im Festbettreaktor (50 ml), $\tau_{H_2O} = 9$ min (Analyse der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft).....   | 35 |
| Abb. 23: Bestimmung der cellulolytischen Aktivitäten der Überstände von <i>T. emersonii</i> und <i>C. heterothallicus</i> , nachdem die thermophilen Pilze auf unterschiedlichen Substraten als alleinige Kohlenstoffquelle angezogen wurden. ....                            | 36 |
| Abb. 25: Bestimmung der cellulolytischen Aktivitäten der Überstände von <i>A. brasiliensis</i> nachdem der mesophile Pilz auf unterschiedlichen Substraten als alleinige Kohlenstoffquelle angezogen wurde.....   | 37 |
| Abb. 26: Bestimmung der cellulolytischen Aktivitäten der Überstände von <i>P. janthinellum</i> nachdem der mesophile Pilz auf unterschiedlichen Grünschnitt-Pellets als C-Quelle angezogen wurde, die mit verschiedenen Säuren (jeweils 25%) aufgeschlossen worden sind. .... | 38 |
| Abb. 27: Temperaturstabilität der $\beta$ -Glukosidase aus <i>P. janthinellum</i> V39.....  | 39 |
| Abb. 28: pH-Stabilität der $\beta$ -Glukosidase aus <i>P. janthinellum</i> V39.....   | 39 |
| Abb. 29: Restaktivität des Xylanasekomplexes aus <i>A. brasiliensis</i> in Abhängigkeit vom angelegten Druck. Eingesetzt wurden jeweils 32 U pro Ansatz.....  | 40 |
| Abb. 30: Glukose-Ausbeute [%] nach enzymatischem Abbau der thermisch aufgeschlossenen Cellulose-Fraktion mit dem Cellulase-Komplex aus <i>P. janthinellum</i> V39 (RT = Raumtemperatur).....  | 42 |
| Abb. 31: Chromatogramm: flüssige Fraktion des bei 200°C thermisch behandeltem Roggenstroh.....  | 43 |
| Abb. 32: Chromatogramm: flüssige Fraktion des bei 200°C thermisch behandeltem Roggenstroh nach enzymatischer Behandlung mit dem Xylanasekomplex aus <i>A. brasiliensis</i> .....  | 43 |
| Abb. 33: Wachstum der Hefen in Komplexmedium (2% Glukose, pH 5, 30°C).....  | 44 |
| Abb. 34: Wachstum der Hefen in Komplexmedium (2% Xylose, pH 5, 30°C).....   | 44 |
| Abb. 35: Grafische Darstellung der Parameter Wachstum, Zucker und Ethanol-Konzentration von <i>P. stipitis</i> in Komplexmedium (2% Glukose, pH 5, 30°C).....   | 45 |
| Abb. 36: Grafische Darstellung der Parameter Wachstum, Zucker und Ethanol-Konzentration von <i>P. stipitis</i> in Komplexmedium (2% Xylose, pH 5, 30°C).....  | 45 |
| Abb. 37: Grafische Darstellung der Parameter Wachstum, Zucker und Ethanol von <i>P. stipitis</i> in Komplexmedium (1% Glukose + 1% Xylose, pH 5, 30°C).....   | 46 |
| Abb. 40: Hefezellen von <i>S. cerevisiae</i> und <i>P. stipitis</i> in einer Co-Fermentation.....   | 47 |

**Tabellenverzeichnis**

|  |    |
|--|----|
| Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten Substrate (Analyse der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft).....   | 15 |
| Tab. 2: Einfluss von HMF und Furfural auf die Ethanolproduktion [13] .....   | 18 |
| Tab. 3: Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten $k_i^f$ und $k_i^d$ für die Bildung und den Abbau von Glukose und Xylose im kontinuierlichen Betrieb bei 210-270°C und 100 bar mit einprozentiger Roggenstrohsuspension..... | 20 |
| Tab. 4: Aktivierungsenergien EA und Stoßfaktoren A der kinetischen Betrachtung gemäß Tab. 3 .....  | 21 |
| Tab. 5: Zusammensetzung des Hydrolysats nach unterschiedlichen Vorbehandlungstemperaturen; NB: nicht bestimmt .....  | 34 |
| Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Pilze.....  | 35 |
| Tab. 7: Vergleich zwischen den cellulolytischen Aktivitäten der Kultur-Überstände des Wildtyps und der Mutanten von <i>P. janthinellum</i> .....   | 37 |
| Tab. 8: Übersicht über das Fermentationsverhalten der Hefen in Komplexmedium (1% Glukose + 1% Xylose, pH 5, 30°C), (Ausbeute = EtOH/ verbrauchten Zucker).....   | 47 |
| Tab. 9: Übersicht über das Co-Fermentationsverhalten der Hefen im definierten Medium mit 0,3% Hefeextrakt (1% Glc + 1% Xyl, pH 5, 30°C), (Ausbeute = EtOH/ verbrauchten Zucker) .....                                    | 48 |

## Zusammenfassung

Die Nutzung nachwachsender Rohstoffe zur Gewinnung von Bioethanol stellt eine wichtige Maßnahme zur Verringerung der Abhängigkeit von fossilen Rohstoffen und zur Reduktion des klimaschädigenden Treibhausgases CO<sub>2</sub> dar. Das in diesem Projekt verwendete Roggenstroh erscheint als viel versprechender nachwachsender Rohstoff.

Die Versuche zur thermischen Vorbehandlung der Substrate Roggenstroh und Roggensilage konnten im Institut für Thermische Verfahrenstechnik erfolgreich durchgeführt werden. Durch die Anpassung der Parameter Temperatur, Verweilzeit, Substratkonzentration und CO<sub>2</sub>-Sättigung sind verschiedene Betriebsbedingungen eingestellt worden. Den größten Einfluss auf die Verflüssigung des Substrats hatte dabei die Temperatur. Die Kinetik der Hydrolysereaktionen konnte durch ein vereinfachtes Reaktionsmodell erfolgreich beschrieben werden. Es hat sich gezeigt, dass bei mittleren Behandlungsintensitäten die Ausbeuten der fermentierbaren Zuckermonomere am höchsten waren (210-230°C). Bei höheren Intensitäten sind die Glukose- und Xylosemoleküle sehr schnell zu unerwünschten Produkten wie Furfural und Hydroxymethylfurfural abgebaut worden. Die Hemicellulose hat sich tendenziell etwas leichter hydrolysieren lassen als die Cellulose. Prozentual sind die Ausbeuten an Monomeren, bezogen auf die theoretisch möglichen, relativ gering. Da aber das Substrat an sich zu einem hohen Prozentsatz verflüssigt werden konnte, ist davon auszugehen, dass sich eine Vielzahl an Oligomeren in den Proben befindet. Diese Oligomere sind besser als Monomere vor thermischem Zerfall geschützt und können während der Gärung durch die zugegebenen Enzymkomplexe weiter monomerisiert werden; entscheidend hierbei ist, dass diese Moleküle durch die Verflüssigung aus dem Verbund der Lignocellulose gelöst und daher zugänglich sind. Um den Erfolg der Versuche anhand der Oligomerkonzentrationen der Hydrolysate beurteilen zu können, ist eine zuverlässige Oligomer-Analytik vonnöten, welche im Institut für Technische Mikrobiologie etabliert wurde.

Für die enzymatische Hydrolyse des hydrothermisch vorbehandelten Roggenstrohs wurde der mesophile Pilz *Penicillium janthinellum* mutagenisiert. Das Ziel war, durch spontan auftretende Mutationen, eine im Vergleich zum Wildtyp gesteigerte Produktion von extrazellulären Enzymen zu erreichen. Die Mutante V39 zeigt eine gesteigerte cellulolytische Aktivität, wobei vor allem die Aktivität der  $\beta$ -Glukosidase sehr hoch ist. Außerdem wurden die extrazellulären *Enzyme von Aspergillus brasiliensis* CBS 121619 verwendet.

*Penicillium janthinellum* V39 und *Aspergillus brasiliensis* wurden auf geeigneten Medien angezogen. Die Produktion cellulolytischer Enzyme konnte induziert werden indem *P. janthinellum* V39 in Minimalmedium mit Grünschnittpellets als alleinige Kohlenstoff-Quelle kultiviert wurde. Die Produktion des Xylanase-Komplexes von *A. brasiliensis* konnte durch eine An-

zucht in Minimalmedium mit 1% Birken-Xylan (Sigma) als einzige Kohlenstoff-Quelle induziert werden. Der Cellulase-Komplex von *P. janthinellum* V39 wurde erfolgreich für den Abbau der Cellulose genutzt während der Xylanase-Komplex von *A. brasiliensis* erfolgreich für den Abbau der Hemicellulose genutzt wurde. Die Temperatur-Optima der Enzymkomplexe betragen für *P. janthinellum* V39 50°C und für *A. brasiliensis* 75°C. Die pH-Optima liegen in beiden Fällen bei pH 5.0. Der Umsatz des Cellulose-Anteils zu Glukose durch den Cellulase-Komplex aus *P. janthinellum* V39 sowie der Umsatz des Xylan-Anteils zu Xylose durch den Xylanase-Komplex aus *A. brasiliensis* lag jeweils bei über 98%. Somit liegen thermoaktive cellulolytische und xylanolytische Enzymkomplexe vor, die eine hohe Aktivität auf hydrothermisch aufgeschlossenem Roggenstroh zeigen und für die Biokonversion sehr gut geeignet sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Xylanasekomplex aus *A. brasiliensis* durch Druck stabilisiert werden konnte und auch bei Temperaturen über 75°C nach einer Stunde noch aktiv war.

Die Vergärung der bei der Hydrolyse freigesetzten Zuckermonomere zu Ethanol wurde unter Einsatz verschiedener Hefen untersucht. Die Fermentationen zeigten, dass Glukose und Xylose von *Saccharomyces cerevisiae* und Pentose-fermentierenden Hefen zu Ethanol umgesetzt werden. Zusätzlich wurden Co-Fermentationen durchgeführt, die zeigten, dass *S. cerevisiae* das Wachstum der Xylose-fermentierenden Hefen nicht beeinflusst und auch keine Hemmung durch die Pentose-fermentierenden Hefen auf das Wachstum von *S. cerevisiae* zu beobachten ist. Die Hefen sind in der Lage, Glukose und Xylose während der Co-Fermentation zu Ethanol umzusetzen. Der analytische Nachweis für die Vergärung der Zuckermonomere zu Ethanol wurde erfolgreich etabliert.

## 1 Anlass und Zielsetzung des Projekts

In Anbetracht des tendenziell steigenden Rohölpreises, zukünftiger Ölverknappung, Abhängigkeit von ölfördernden Krisenregionen und vor allem der klimaschädlichen CO<sub>2</sub>-Emissionen aus fossilen Brennstoffen ist es notwendig geworden neue, regenerative Energiequellen zu erschließen. Einer dieser alternativen Kraftstoffe, der in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen hat, ist Bioethanol. Bioethanol, das aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen wird, lässt sich mit Benzin mischen und kann in herkömmlichen Ottomotoren mit einem Anteil von bis zu 20% verbrannt werden. Sogenannte Flexi-Fuel-Vehicles (FFV), die einen modifizierten Motor besitzen, können mit Ethanolgehalten von bis zu 95% betrieben werden, aber auch herkömmliches Benzin nutzen. Dazu wurde vom Europäischen Parlament eine Richtlinie erlassen, die seit 2006 einen zweiprozentigen Mindestanteil der Biokraftstoffe als Beimischung im Verkehrssektor vorsieht [2]. Bis 2010 sollen 5,75% erreicht sein. Diese Zahlen beziehen sich auf den Energieinhalt der Ersatzstoffe. Langfristig (bis 2020) wird eine 20%ige Substitution konventioneller durch alternative Kraftstoffe im Bereich des Straßenverkehrs angestrebt.

Da Bioethanol ein 100%ig biogener Kraftstoff ist, kann der CO<sub>2</sub>-Kreislauf als geschlossen angesehen werden. Beim Verbrennen von Bioethanol entsteht nur soviel Kohlendioxid, wie der pflanzliche Rohstoff während des Wachstums durch die Photosynthese gebunden hat. Im Vergleich zu fossilen Brennstoffen ist Ethanol aus Pflanzen klimaneutral und trägt nicht zum anthropogenen Treibhauseffekt bei.

Als Substrat für die Produktion kommen verschiedene Rohstoffe wie zum Beispiel Zuckerrüben, Mais, Kartoffeln oder auch Zuckerrohr in Frage. Zusätzlich eignen sich auch Abfälle aus der Landwirtschaft wie Stroh, Stängel, Halme oder auch Sägespäne und Mulch; Bioethanol aus letzteren Rohstoffen wird allgemein als Biokraftstoff der zweiten Generation bezeichnet und hat den Vorteil, nicht mit der Nahrungsmittelindustrie zu konkurrieren.

Im Rahmen des Projekts wird Roggenstroh als Substrat verwendet, da es im Vergleich zu anderen Substraten einige Vorteile aufweist. Zum einen ist Roggenstroh günstig, zum anderen verfügt es über einen relativ hohen Zuckergehalt, welcher wiederum nahezu ausschließlich auf Glukose (43,6%) und Xylose (20%) zurückgeht. Aus wirtschaftlicher Sicht bietet sich Roggenstroh ebenso an, da in Deutschland bereits eine gewisse Anbauerfahrung vorhanden ist und Roggen eine relativ anspruchslose Nutzpflanze ist, welche auch auf schwächeren Böden angebaut werden kann (z. B. durch „Direktsaat-Methoden“, die eine weitere Einsparung von Energie- und Arbeitsaufwand bedeuten würden). Ferner ist die Nachfrage in Deutschland niedriger als das Angebot.

Ziel des Projekts war es, Roggenstroh durch thermische und enzymatische Hydrolyse aufzuschließen. Die Verfahren werden im Folgenden kurz beschrieben.

*Thermische Vorbehandlung:* Die thermische Vorbehandlung des Substrats mit Wasser unter erhöhten Drücken und Temperaturen dient hauptsächlich zur Konditionierung der Biomasse für eine nachgeschaltete enzymatische Hydrolyse. Durch die Vorbehandlung wird eine Erhöhung der Porosität sowie der spezifischen Oberfläche des Substrats gewährleistet, so dass dieses für die folgende Enzymbehandlung leichter zugänglich ist.

*Enzymatische Konversion:* Für die enzymatische Umwandlung von thermisch vorbehandeltem Roggenstroh in die Monosaccharide Glukose und Xylose sollten geeignete Enzymsysteme gefunden werden, die einen hohen Umsatz der Cellulose und Hemicellulose bewerkstelligen.

*Thermisch-enzymatische Behandlung:* Als neuartiges Verfahren wurde der thermisch-enzymatische Aufschluss untersucht, indem aus thermophilen Mikroorganismen isolierte Enzymsysteme zum Einsatz kamen.

*Fermentation:* Durch Fermentationsversuche wurde gezeigt, dass die ausgewählten Pentose-fermentierenden Hefen Xylose zu Ethanol umsetzen. Eine Co-Fermentation von Pentose-fermentierenden Hefen und *S. cerevisiae* wurde etabliert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Eingesetzte Substrate

Für die thermische und thermisch-enzymatische Hydrolyse wurde als Substrat Roggenstroh verwendet, das von der Firma Cordes-Grasberg (Grasberg) bezogen wurde. Da es normalerweise als Streu für Pferdeställe verwendet wird, liegt es bereits gehäckselt vor. Das Roggenstroh wurde mit Hilfe einer Labor-Schneidmühle (Fa. IKA, MF 10 basic) auf eine Korngröße <500 µm zerkleinert. Das entstehende Mahlgut wurde anschließend mit einem Sieb in ein Feingut (<90 µm) und ein Grobgut (90-500 µm) aufgetrennt. Für die kontinuierlichen Hydrolyseversuche kam lediglich das Feingut zum Einsatz. Für einige diskontinuierliche Versuche wird auch auf das Grobgut zurückgegriffen.

Da die Zerkleinerung des Strohs einen erheblichen zeitlichen Aufwand bedeutet, wurde eine zweite Charge des Roggenstrohs bei der Firma Microtec, Bobingen, auf die gewünschte Partikelgröße fremdvermahlen.

In einigen Versuchen wurde außerdem Roggensilage eingesetzt (Bezugsquelle: Firma Maschinenring Harburg, Buchholz). Die Silage aus der Roggenganzpflanze stammte von einem Hof aus Welle und wird normalerweise als Tierfutter verwendet. Da die Roggensilage einen sehr hohen Feuchtegehalt aufwies, wurde sie zunächst für 24 h bei 60°C im Trockenschrank gelagert. Die getrocknete Silage wurde dann analog zum Roggenstroh gemahlen, gesiebt und das Feingut für die Versuche eingesetzt.

### 2.2 Eingesetzte Enzyme

Für die diskontinuierlichen Versuche zum thermisch-enzymatischen Aufschluss wurde eine käufliche Cellulase (Endoglucanase) aus dem thermophilen Mikroorganismus *Talaromyces emersonii* verwendet. Dieses Enzym hat sein Temperatur-Optimum bei 70°C und ein pH-Optimum von 4,5-4,6. Pro Versuch wurden 10 ml der Enzymlösung mit der Gesamtkonzentration von 1000 Units (nach BCA-Standard [3]) zur Roggenstrohsuspension hinzugegeben. Das Enzympräparat stammte von der Fa. Megazyme International Ltd., Irland.

Zudem wurden eigene Enzymsysteme eingesetzt, die aus Fermentationsüberständen im 2 L-Maßstab im Institut für Technische Mikrobiologie an der TU Hamburg-Harburg stammen. Dabei handelte es sich um Cellulasekomplexe aus den thermophilen Pilzen *Corynascus heterothallicus* (DSM-Nr.: 1807) und *Talaromyces emersonii* (DSM-Nr.: 2432) und aus den mesophilen Pilzen *Aspergillus brasiliensis* (CBS121619) sowie *Penicillium janthinellum* V39, der im Rahmen eines Unterauftrages zur Verfügung gestellt wurde.

Neben den nativen Enzymsystemen aus Pilzen wurden auch rekombinante Cellulasen aus Bakterien getestet. Dies geschah im Rahmen des DBU-Projektes „Identifizierung, Charakterisierung und Bereitstellung von thermostabilen Cellulasen zum Einsatz in einem kombinierten Verfahren zum thermisch-enzymatischen Aufschluss von Cellulose für die Bioethanolerzeugung“ (Thermocellulasen, AZ 13160).

Diese nativen Enzymkomplexe und rekombinanten Enzyme wurden auch für den zeitlich getrennten thermisch-enzymatischen Abbau des Roggenstrohs getestet.

### 2.2.1 Mutagenese und Kultivierung von *Penicillium janthinellum*

Die industrielle Herstellung cellulolytischer Enzyme erfolgt in erster Linie durch *Trichoderma*-, *Penicillium*- und *Aspergillus* Stämme. Cellulasen werden induktiv gebildet und als extrazelluläre Enzyme ins Kulturmedium abgegeben. Die vorliegenden Untersuchungen konzentrieren sich auf die Enzymbildung bei *P. janthinellum*.

Der mutierte Stamm von *Penicillium janthinellum* V39 wurde von der Fachhochschule Lausitz, Senftenberg, zur Verfügung gestellt und wurde durch Kombination von chemischer Mutagenese (Ethyl-Methyl-Sulfonate) und UV-Bestrahlung gewonnen [4].

Durch eine geeignete Kultivierung konnte die Cellulase-Produktion zusätzlich gesteigert werden. Als Induktoren dienen neben der Cellulose wahrscheinlich die Disaccharide Cellobiose und Sophorose, während Glukose zur Repression der Biosynthese führt. Aus Arbeiten von Schulz und Hirte [5] ist zudem bekannt, dass verschiedene in pflanzlichen Grünschnittpellets enthaltene Wirkstoffe die Enzymbildung fördern.

Die Kultivierung des Pilzes wurde wie in Schulz et al. beschrieben durchgeführt [5, 6]. Das dabei verwendete GAS-Medium (Grünmehl-Ammoniumsulfat) enthielt 1-3% Heweten 20 und 20 Vol% Grünmehlhydrolysat bei einem pH-Wert von 5,3. Während der Fermentation betrug die Temperatur im Kulturgefäß 28°C bei ca. 600 U/min. Der Kultivierungszeitraum betrug ca. 15 Tage. Beimpft wurde mit  $10^7$  Sporen einer 7 Tage alten Vorkultur. Die Inkubation der Stammkulturen erfolgte in Petrischalen auf Potato-Dextrose-Agar (PDA) (0,4% Potato-Extrakt, 2% Glukose, 1,5% Agar, pH 5,6). Die entsprechenden Grünschnittpellets (Klee, Luzerne, Mais, Wiesengras) wurden von Futtermittelwerken bezogen.

Die Enzympräparate wurden wie folgt aufgearbeitet. Nach Abschluss der Kultivierung wurde das Mycel, einschließlich Medienrückstände, durch Filtration vom Kulturüberstand separiert. Dieser Kulturüberstand wurde bei -80°C eingefroren und anschließend bei RT aufgetaut. Die Kulturbrühe wurde erneut filtriert und mittels Ultrafiltration um den Faktor 10 eingeeengt. Das Konzentrat wurde bei -80°C eingefroren und anschließend lyophilisiert.

Im Kulturüberstand, wie auch im Lyophilisat wurde auf folgende Art und Weise die Enzymaktivität bestimmt. Die Messung der Gesamtcellulase-Aktivität erfolgte nach Mandels et al. [7]. Die Bestimmung der  $\beta$ -Glukosidase erfolgte mittels 1,2 mM pNP-glucoopyranosid (4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoopyranosid,  $C_{12}H_{15}NO_8$  von Sigma Aldrich) in 50mM Na-Acetat Puffer pH 5,0. Als Stopplösung diente eine (1 M  $Na_2CO_3$  von Roth) Lösung. Die Reaktionen wurden jeweils mit 500 $\mu$ l 1 M  $Na_2CO_3$  gestoppt. Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurden zwei parallele Ansätze vorbereitet, die jeweils 200  $\mu$ l Enzymprobe und 800  $\mu$ l Substrat enthielten. Die Extinktionen wurden zum einen nach 2 Minuten bei 40°C Inkubation und zum anderen nach 12 Minuten bestimmt (Wellenlänge von  $\lambda = 405$  nm). Die Enzymaktivität der Exoglucanase erfolgte mittels 1,2 mM pNP-cellobiosid (4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobiosid,  $C_{18}H_{25}NO_{13}$  von Sigma Aldrich) in 50mM Na-Acetat Puffer pH 5,0. Als Stopplösung diente eine (1 M  $Na_2CO_3$  von Roth) Lösung. Die Reaktionen wurden jeweils mit 500 $\mu$ l 1 M  $Na_2CO_3$  gestoppt. Das Substrat wurde immer frisch hergestellt oder bei -20°C gelagert.

### 2.2.2 Aktivitätsmessung der cellulolytischen Enzyme aus *Penicillium janthinellum*

Die Messung der Cellulaseaktivität erfolgte zunächst im Filterpapiertest (FPU Assay according to Fermentation Commission, IUPAC, changed to Commission on Biotechnology, JUPAC, prepare a document prescribing standard assay procedures for cellulase enzyme system: Cellobiase Assay; Filter Paper Assay for Saccharifying Cellulase; Carboxymethyl Cellulase Assay for Endo-3-I, 4-gluconase; Additional Assay Procedure for Endoglucanase; Evaluation of Cellulase under Process Conditions [8]).

### 2.2.3 Kultivierung von *Aspergillus brasiliensis*

Die Anzucht von *A. brasiliensis* auf unterschiedlichen C-Quellen hat gezeigt, dass eine Anzucht in Minimalmedium mit 1% Birken-Xylan (Sigma) als alleinige C-Quelle die Produktion des Xylanase-Komplexes am stärksten induzierte (Abb. 24). Der Pilz wurde 6 Tage bei 28°C und 220 rpm kultiviert. Anschließend wurde durch Filtration das Pilzmycel vom Medium getrennt. Die im Medium befindlichen Enzyme wurden durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (30-90%) gefällt und konzentriert.

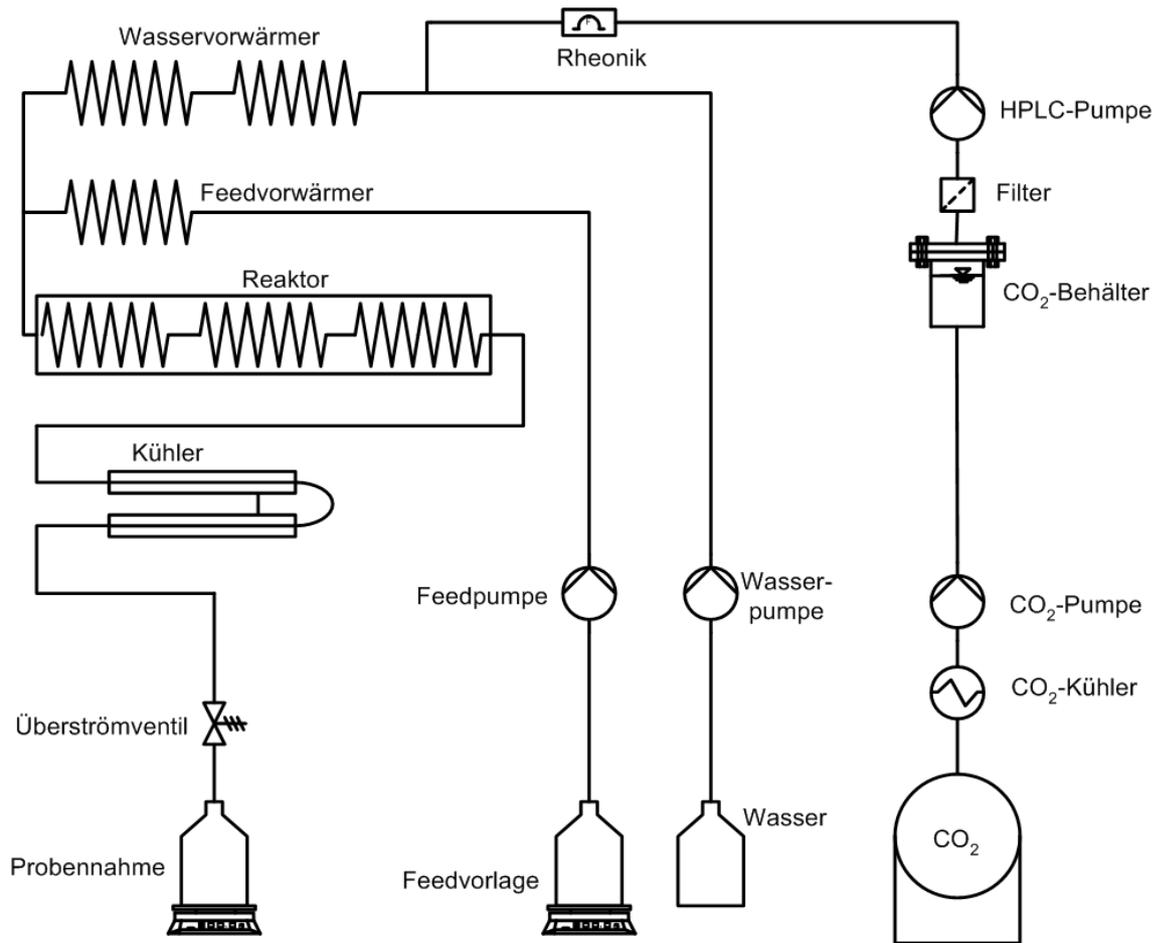
### 2.2.4 Aktivitätsmessung der xylanolytischen Enzyme aus *Aspergillus brasiliensis*

Die Messung der Units erfolgte nach BCA-Standard mit Birken-Xylan (Sigma) als Substrat [3].

## 2.3 Experimenteller Aufbau

*Kontinuierlich betriebener Rohrreaktor:* Für die Durchführung der kontinuierlichen Hydrolyseversuche mit heißem Wasser unter erhöhten Drücken und Temperaturen wurde eine neue

Apparatur aufgebaut, deren Fließschema Abb. 1 zu entnehmen ist. Mit dieser Anlage waren kontinuierliche Hydrolyseversuche mit verschiedenen Substraten möglich. Die kleingemahlene Substrate wurden zu diesem Zweck als Feedsuspension vorgelegt und mit Hilfe der Feedpumpe durch einen elektrisch beheizten Vorwärmer geleitet. Hierbei war darauf zu achten, dass das Feed nicht derart stark vorgewärmt wird, dass die Hydrolysereaktion bereits einsetzt. Am Mischpunkt traf das vorgeheizte Feed auf einen heißen Wasserstrom, welcher wiederum mittels der Wasserpumpe der Vorlage entnommen und durch zwei weitere elektrische Vorwärmer stark aufgeheizt wurde. Durch den Mischvorgang kam es zu einem schlagartigen Anstieg der Temperatur. Die Lösung durchlief dann den Reaktor, in dem die eigentliche Hydrolysereaktion stattfand. Der Reaktor war als kontinuierliches Strömungsrohr ausgelegt und bestand aus mehreren gewickelten Viertelzoll-Edelstahlrohren, welche über Hochdruckverschraubungen miteinander verbunden waren. Der Reaktor befand sich in einem Elektro-Ofen, um isotherme Reaktionsbedingungen gewährleisten zu können. Die gewünschte Verweilzeit im Strömungsreaktor konnte durch die Variation der Förderleistung der Pumpen und/oder durch den Ein- bzw. Ausbau einzelner Reaktorelemente angepasst werden und lag im Bereich zwischen wenigen Sekunden und ca. 15 Minuten. Nach dem Austritt aus dem Reaktor wurde das Reaktionsgemisch in einem wassergekühlten Doppelrohrwärmeübertrager auf Umgebungstemperatur abgekühlt, wodurch die Hydrolysereaktion zum Erliegen kam. Über das federbelastete Überströmventil wurde der gewünschte Betriebsdruck eingestellt. Nach dem Passieren des Ventils lag das Reaktionsgemisch drucklos vor, so dass das Hydrolysat aufgefangen und Proben zur weiteren Analyse gezogen werden konnten. Die auftretenden Massenströme wurden während des Betriebes mit Hilfe von Waagen und einer Stoppuhr gemessen und notiert. Die resultierende Verweilzeit im Reaktor konnte unter Berücksichtigung der Verdünnung am Mischpunkt, der Dichteänderung des Mediums unter Betriebsbedingungen, des Reaktorvolumens und der ermittelten Massenströme bestimmt werden.



**Abb. 1:** Fließschema der kontinuierlichen Hydrolyseapparatur

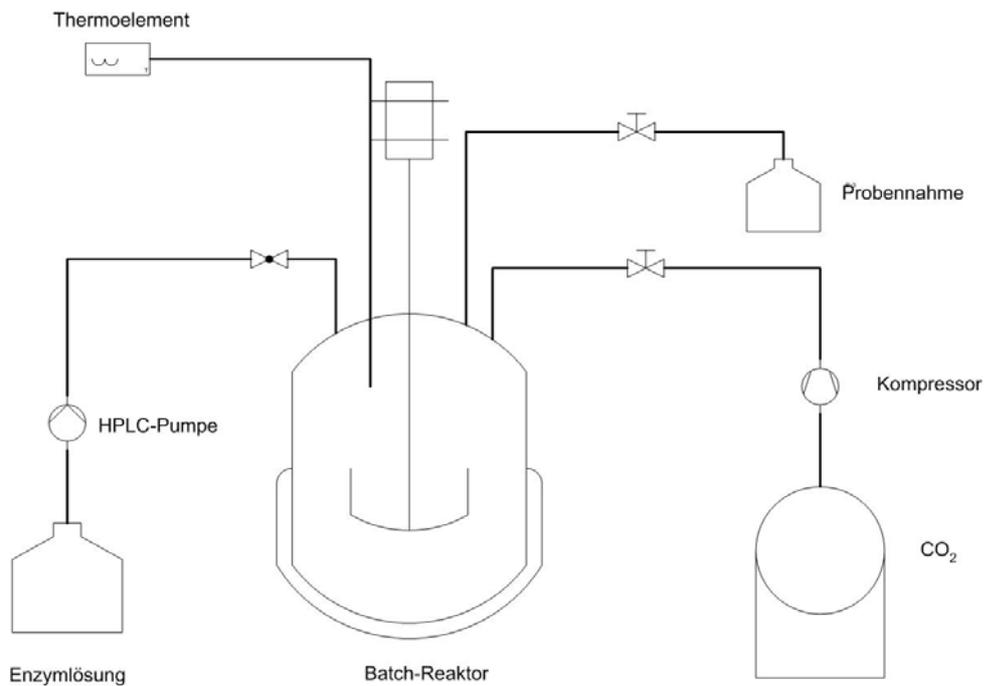
Über einen Mehrkanalregler ließen sich die gewünschten Temperaturen für den Reaktorofen sowie die drei elektrischen Vorwärmer einstellen. Die resultierenden Temperaturen innerhalb der Apparatur wurden während des Betriebes an diversen Stellen mit Hilfe von NiCr/Ni-Thermoelementen gemessen und über eine eigens entwickelte Software ausgegeben.

Sollte Kohlendioxid während der Versuchsdurchführung als Katalysator eingesetzt werden, so wurde dieses dem TUHH-internen Netz entnommen, verflüssigt und in einem CO<sub>2</sub>-Autoklaven vorgelegt. Mittels einer HPLC-Pumpe und eines Massendurchflussmessgeräts (Rheonik) ließ sich das CO<sub>2</sub> in der gewünschten Menge dem Heißwasserstrom zuspeisen.

Als Feedlösung wurden einprozentige (10 g Substrat in 1 L Wasser) Substratsuspensionen eingesetzt. Diese relativ stark verdünnten Lösungen war erforderlich, um eine pumpfähige Suspension gewährleisten zu können. Als Suspendierhilfe wurden der Feedlösung 0,05 g/l Triton-X beigemischt.

*Diskontinuierlich betriebener Rührkessel:* Der in Abb. 2 dargestellte Batchreaktor mit einem Innenvolumen von 250 mL wurde für die Durchführung der thermisch-enzymatischen Versuche verwendet. Der Reaktor bestand aus einem zylindrischen Stahlmantel mit einer heraus-

nehmbaren Teflonauskleidung. Der Deckel wurde mittels eines Kegelflanschverschlusses und zweier Griffschrauben befestigt. Der Reaktor konnte durch einen Heizmantel auf Temperaturen bis zu 240°C aufgeheizt werden. Im Deckel waren ein in den Reaktor hineinragender Temperaturfühler und ein Manometer angebracht. Ein weiterer Temperaturfühler befand sich im Heizmantel. Beide Temperaturfühler waren mit einer Temperaturregeleinheit verbunden.



**Abb. 2:** Fließschema der diskontinuierlichen Hydrolyseapparatur

Für die Homogenisierung des Reaktorinhaltes wurden ein Rührstäbchen und ein im Boden des Heizmantels integrierter Magnetrührer eingesetzt. Durch ein Deckelventil konnte der Behälter an eine Stickstoffflasche oder einen CO<sub>2</sub>-Kompressor angeschlossen werden, um den gewünschten Betriebsdruck im Inneren des Autoklaven (max. 100 bar) zu erreichen.

Zu Beginn des Versuches wurde der Behälter mit max. 200 mL entionisiertem Wasser und der gewünschten Menge Stroh sowie 0,05 g/L Triton-X befüllt. Die maximal einsetzbare Substratkonzentration betrug ca. 7%, da höhere Feststoffanteile nicht mehr dauerhaft rührbar sind.

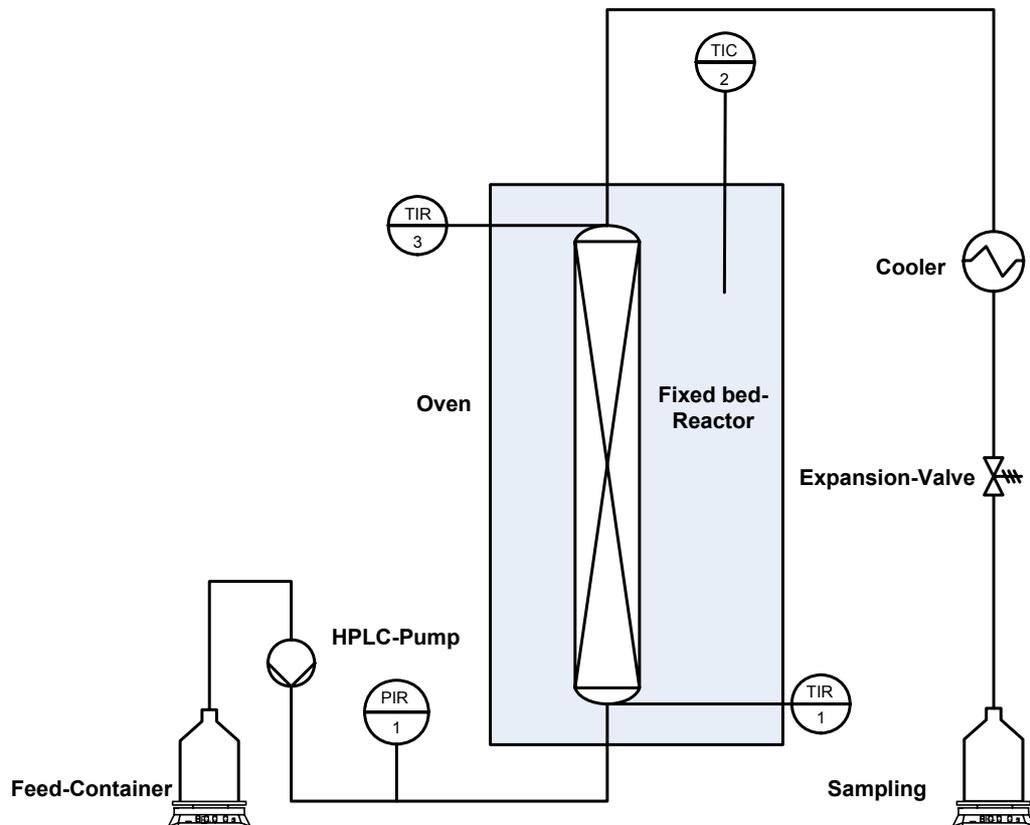
Durch Anziehen der Griffschrauben wurde der Reaktor verschlossen. Es wurde ein geringer Überdruck von einigen bar eingestellt, damit sich beim Aufheizen des Reaktors die Teflonauskleidung nicht verformt. Die gewünschte Temperatur wurde mit Hilfe der Regeleinheit eingestellt. Nach Erreichen der Zieltemperatur wurde der Druck durch langsame Zugabe von Stickstoff oder Kohlendioxid erhöht. In den meisten Fällen wurde CO<sub>2</sub> verwendet, um den

gewünschten Überdruck zu erzielen, da sich unter Betriebsbedingungen durch die Bildung von Kohlensäure ein pH-Wert von ca. 3 einstellt, der für die verwendeten Enzyme gut geeignet war [9].

Das Aufheizen auf Reaktionsbedingungen nahm je nach Zieltemperatur eine gewisse Zeit in Anspruch. Es wurde festgelegt, dass die Reaktionszeit dann beginnt ( $t = 0$ ), wenn der Reaktor die gewünschte Temperatur erreicht hat. Die Aufheizzeit wurde somit nicht als Bestandteil der Reaktionszeit angesehen. Bei der Durchführung thermisch-enzymatischer Versuche war dieser Effekt jedoch zu vernachlässigen, da die Enzymlösung erst nach Erreichen der gewünschten Betriebsbedingungen über eine HPLC-Pumpe in das System gespeist wurde.

Nach Ablauf der gewünschten Reaktionsdauer konnten über ein weiteres Deckelventil mittels eines Tauchrohrs aus der Flüssigphase Proben entnommen werden. Um die Reaktion abbrechen, wurden die Proben in einem Aceton-Trockeneis-Gemisch abgekühlt und bis zur Analyse im Kühlschrank aufbewahrt.

*Semi-kontinuierlich betriebener Festbettreaktor.* Aufbauend auf den Versuchsergebnissen, die mit dem diskontinuierlich betriebenen Rührkessel und dem kontinuierlich betriebenen Rohrreaktor gewonnen wurden, konnten zwei Festbettreaktoren in Betrieb genommen werden. Die semikontinuierliche Prozessführung des Festbettreaktors vereinte im Gegensatz zu den beiden anderen Reaktortypen wesentliche Vorteile. Einerseits waren lange Verweilzeiten der Biomasse leicht realisierbar, andererseits wurden gelöste Zucker aus dem Reaktor transportiert, ohne dass unerwünschte Abbauprodukte entstanden sind. Darüber hinaus musste die Biomasse nicht unnötig zerkleinert werden, so dass Substratkonzentrationen höher als 7% leicht erreicht werden konnten.



**Abb. 3:** Fließschema des semikontinuierlich betriebenen Festbettreaktors (50 ml)

Der in Abb. 3 dargestellte Labor Festbettreaktor hatte ein Volumen von 50 ml und konnte durch einen elektrischen Ofen auf bis zu 350°C aufgeheizt werden.

Das Reaktionsmedium, in diesem Fall reines Wasser, wurde durch den Festbettreaktor gepumpt und sofort nach dem Verlassen des Ofens gekühlt und entspannt. NiCr/Ni-Thermoelemente am Ein- und Ausgang des Reaktors erlaubten eine exakte Beschreibung des Temperaturverlaufs im Reaktor. Der Betriebsdruck wurde durch einen Vordruckregler (1 – 100 bar) nach der Kühleinheit eingestellt.

Ausgehend von den Ergebnissen des 50 ml Festbettreaktors wurde ein 1000 ml Festbettreaktor im Technikum der TU Hamburg-Harburg aufgebaut. Abb. 4 zeigt das Fließbild des Anlagenbaus. Beheizt wurde der Reaktor durch ein elektrisches Heizband das Temperaturen bis zu 300°C ermöglichte. Das Wasser konnte mit Hilfe eines Beypasses auf die gewünschte Temperatur erwärmt werden. Dazu wurde im Wesentlichen der experimentelle Aufbau des kontinuierlich betriebenen Rohrreaktors verwendet.

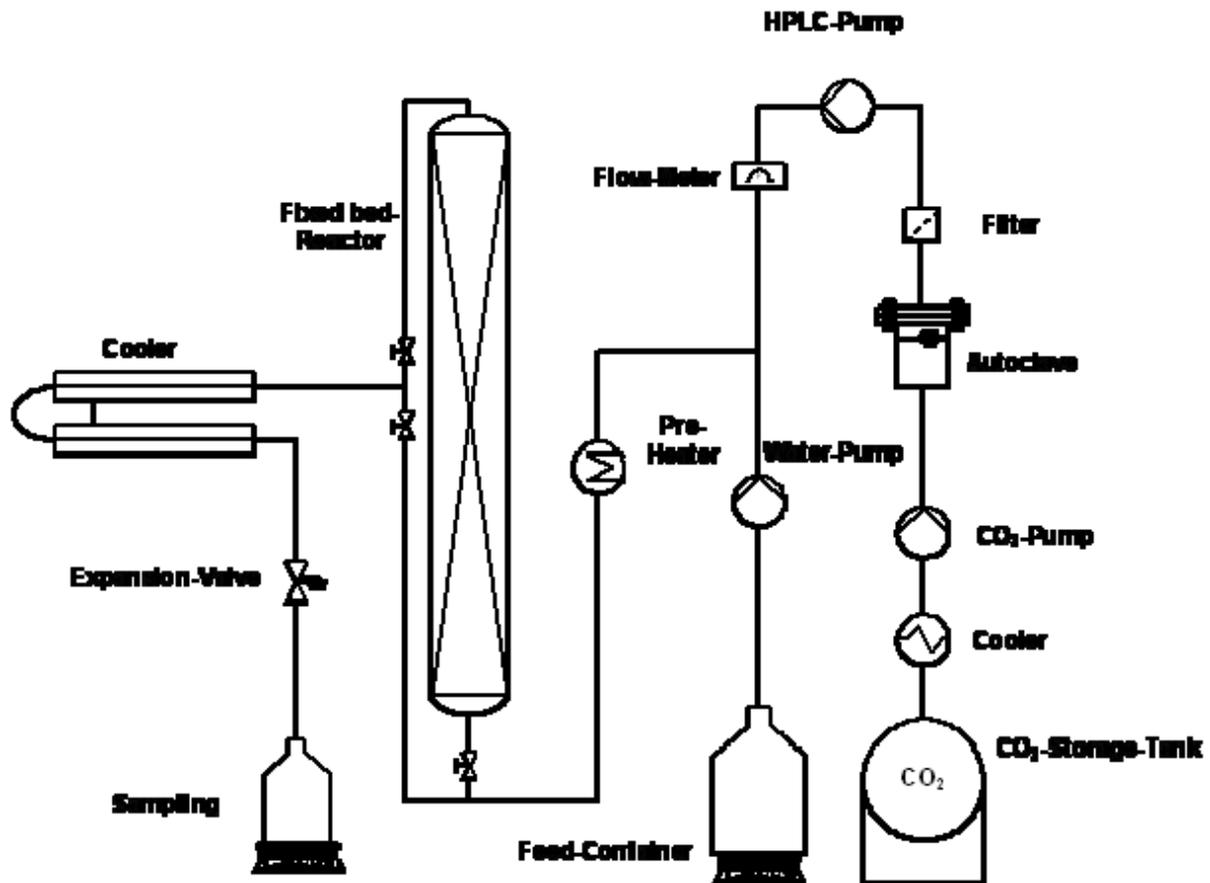


Abb. 4: Fließschema des semikontinuierlich betriebenen Festbettreaktors (1000 ml)

## 2.4 Analytik

Die Analytik der Hydrolysat-Zusammensetzungen wurde im Institut für Technische Mikrobiologie und im Zentrallabor der TU Hamburg-Harburg vorgenommen. Es wurden in der Regel drei verschiedene Analysen durchgeführt, welche im Folgenden kurz beschrieben werden sollen.

*HPLC-Kohlenhydrat-Analyse (Institut für Technische Mikrobiologie):* Die verwendete HPLC-Säule Aminex HPX-42A (BioRad) erlaubte den Nachweis aller relevanten Zuckermomere (Cellobiose, Xylobiose, Glukose, Xylose und Arabinose) sowie der Abbauprodukte HMF und Furfural. Zusätzlich ermöglichte sie den quantitativen Nachweis von Oligosacchariden bis zu einem Polymerisationsgrad von Dp 20.

*HPLC-Ethanol-Analyse (Institut für Technische Mikrobiologie):* Die für den Nachweis von Ethanol verwendete HPLC-Säule Aminex HPX-87H (BioRad) ermöglichte zusätzlich den Nachweis der Zuckermomere Glukose und Xylose.

*DOC-Bestimmung (Zentrallabor der TUHH):* Die Bestimmung des DOC (*dissolved organic carbon* = gelöster organischer Kohlenstoff) diente zur Berechnung der Substratverflüssigung (*f*) gemäß Gleichung (1).

$$f = \frac{DOC}{TOC} \quad (1)$$

wobei TOC = total organic carbon (gesamter organischer Kohlenstoff des Ausgangssubstrats, festgelegt über die Substratkonzentration (i.d.R. 1%), deren Trockenmasse (95,75%) sowie Kohlenstoffgehalt (498,9 g/kg)).

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Zusammensetzung verwendeter Substrate

In Tab. 1 ist die Zusammensetzung der Substrate Roggenstroh und Roggensilage aufgeführt. Das Roggenstroh verfügte über einen hohen Zuckergehalt (67%), welcher nahezu ausschließlich auf Xylose (20%) und Glukose (43,6%) zurückzuführen war. Der Gehalt von Lignin am Roggenstroh betrug 22%.

Die Roggensilage hatte eine ähnliche Zusammensetzung wie das Roggenstroh, jedoch war der Zuckergehalt 10 Prozentpunkte niedriger. Dies liegt darin begründet, dass ein Teil der Kohlenhydrate bereits zu Milchsäure umgewandelt wurde. Deswegen wurde der Großteil der Versuche mit Roggenstroh durchgeführt.

Die Zusammensetzung des Roggenstrohs zeigt, dass die Gehalte an Mannose und Galaktose im Vergleich zur Xylose nahezu vernachlässigbar sind.

Da der Gehalt an Arabinose ebenfalls gering war, wurde dieser Zucker in der Auswertung zunächst nicht berücksichtigt. Stattdessen wurden lediglich die Monomere Glukose und Xylose betrachtet.

**Tab. 1:** Zusammensetzung der verwendeten Substrate (Analyse der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft)

| Probe                      | Zuckerbestimmung [%]      |                      |                    |                     |                     |                       |                       |                     | Summe<br>[% abs.] |
|----------------------------|---------------------------|----------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|
|                            | Hydrolyse-<br>rückst. [%] | Σ Zucker<br>[abs. %] | Xylose<br>[% abs.] | Glukose<br>[% abs.] | Mannose<br>[% abs.] | Galactose<br>[% abs.] | Arabinose<br>[% abs.] | Ramnose<br>[% abs.] |                   |
| Roggenstroh<br>(1. Charge) | 22,0                      | 67,0                 | 20,0               | 43,6                | 0,4                 | 0,7                   | 2,4                   | –                   | 89,0              |
| Roggensilage               | 15,7                      | 57,1                 | 13,6               | 39,9                | 0,4                 | 0,5                   | 2,7                   | –                   | 72,9              |

#### 3.2 Thermische Vorbehandlung

##### 3.2.1 Roggenstroh

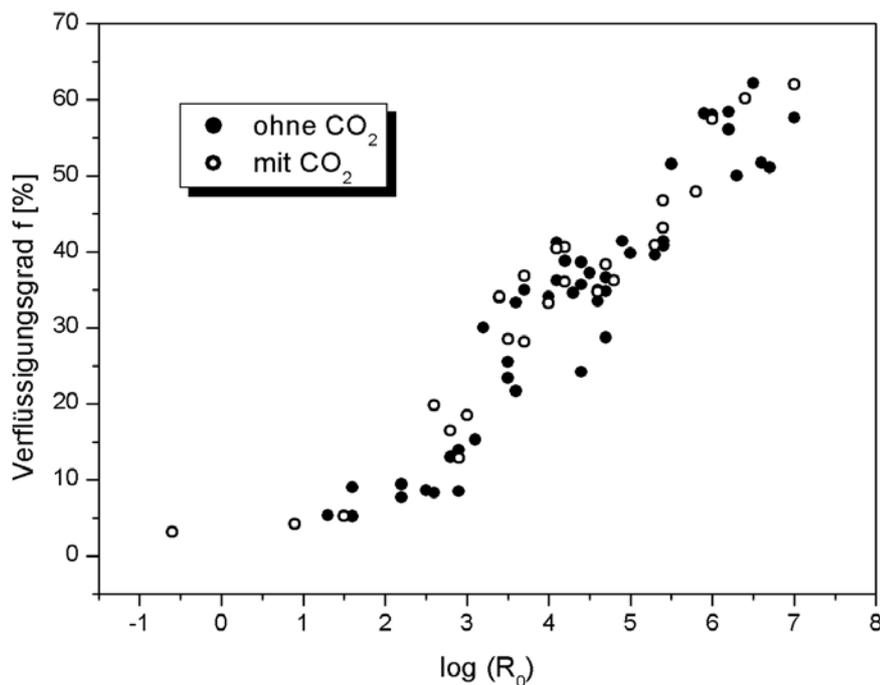
In Abb. 5 sind die Ergebnisse der kontinuierlichen Hydrolyseversuche von einprozentiger Roggenstrohsuspension in Abhängigkeit des Gewichtungsfaktors  $R_0$  aufgetragen. Die Substratverflüssigung bei der thermischen Hydrolyse nahm sowohl mit der Temperatur als auch mit der Reaktionszeit zu. Um die unterschiedlichen Kombinationen aus Temperatur und

Verweilzeit zu vereinheitlichen, konnte der Gewichtungsfaktor  $R_0$  (engl. *severity factor*) verwendet werden, der für eine reine Wasserbehandlung definiert ist als:

$$R_0 = t \cdot \exp\left(\frac{T - 100}{14,75}\right) \quad (2)$$

mit  $t$  = Reaktionszeit in min und  $T$  = Temperatur in °C [10].

Der Verflüssigungsgrad  $f$  nahm mit zunehmender Behandlungsintensität zu, da vermehrt intra- und intermolekulare Bindungen gespalten wurden. Eine zusätzliche Sättigung des Reaktionsmediums mit  $\text{CO}_2$  führte nicht zu einer signifikanten Steigerung der Verflüssigung.



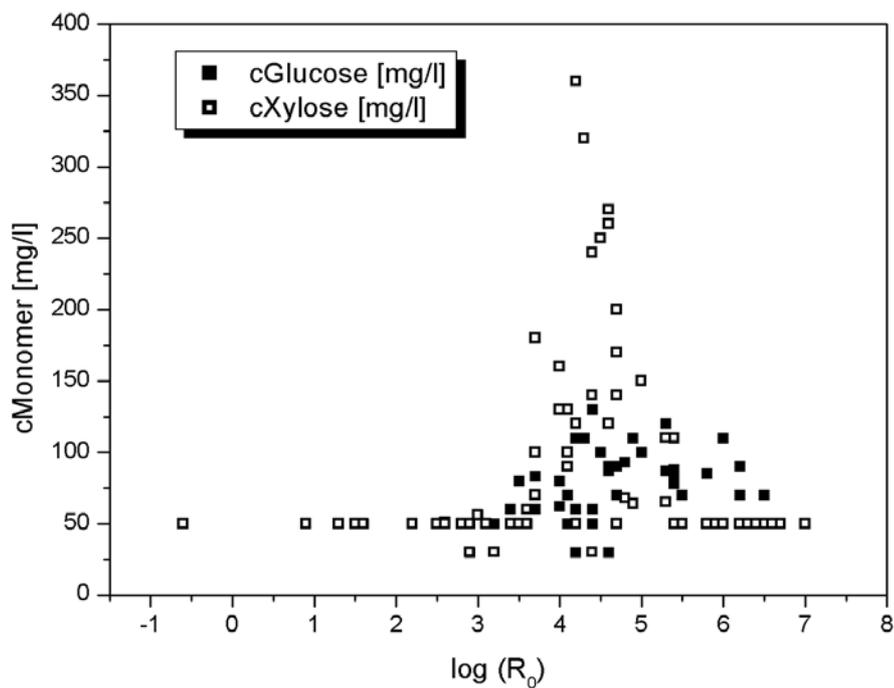
**Abb. 5:** Verflüssigungsgrad von einprozentiger Roggenstroh-Suspension im kontinuierlichen Betrieb bei 100 bar in Abhängigkeit der Behandlungsintensität

Theoretisch bewirkte das Einlösen von  $\text{CO}_2$  in das nahekritische Wasser eine Erniedrigung des pH-Wertes und somit eine Beschleunigung säurekatalysierter Hydrolyseschritte, jedoch war im untersuchten Druck- und Temperaturbereich kein katalytischer Effekt des Kohlendioxids zu beobachten. Auch anhand von Literaturdaten ließen sich keine einheitlichen Schlussfolgerungen bezüglich des Einflusses von  $\text{CO}_2$  als Katalysator der Hydrolysereaktion in heißem Wasser ziehen: Die Forschungsgruppe um van Walsum beschäftigte sich mit der thermischen Hydrolyse verschiedener Substrate im Batch-Betrieb und untersuchte den Einfluss von  $\text{CO}_2$  auf die Hydrolyse-Ergebnisse [11, 12]. Bei der Hydrolyse von Maisstroh ließen

sich die Xylose-Ausbeuten durch die Zugabe von CO<sub>2</sub> zum nahekritischen Wasser deutlich steigern [11]. Bei analogen Untersuchungen mit Espenholz als Substrat konnte jedoch kein positiver Effekt des Kohlendioxids auf die Hydrolysereaktion nachgewiesen werden [12].

Da sich bei den eigenen Untersuchungen kein positiver Effekt des Kohlendioxids zeigte, wurde in den folgenden Abbildungen auf eine Kennzeichnung der CO<sub>2</sub>-Versuche verzichtet.

Eine hohe Verflüssigungsrate des Substrats war nicht zwangsläufig gleichbedeutend mit den besten Versuchsergebnissen, wie ein Blick auf Abb. 6 verdeutlicht. In der Darstellung ist zu beachten, dass 50 mg/l die untere Nachweisgrenze der Monomeranalytik darstellte. Die Xylosekonzentration stieg ab einem  $\log(R_0)$ -Wert von 3,5 stark an, erreichte bei ca. 4 ein Maximum, um dann wieder stark abzufallen, während die Glukose in einem breiteren Bereich entstand, allerdings nicht so hohe Konzentrationen erreichte. Das ist damit zu erklären, dass die Hemicellulose wesentlich einfacher zu hydrolysieren war, während die Cellulose durch ihre kristallinen Bereiche nicht komplett monomerisiert werden konnte.



**Abb. 6:** Konzentration der Zuckermomere Xylose und Glukose bei der thermischen Behandlung von einprozentiger Roggenstrohsuspension im kontinuierlichen Betrieb bei 100 bar in Abhängigkeit der Behandlungsintensität

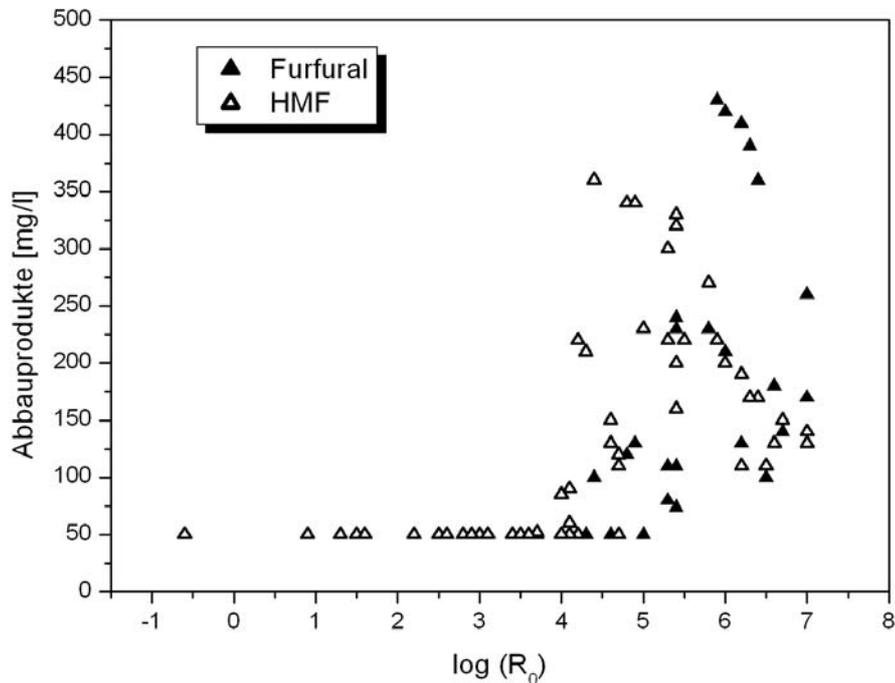
Der Rückgang beider Konzentrationen im Bereich der intensiveren Behandlung ist darauf zurückzuführen, dass auch die Zuckermomere ihrerseits Abbaureaktionen unterlagen. Die Xylose wurde u. a. zu Furfural, die Glukose zu Hydroxymethylfurfural (HMF) abgebaut. Abb. 7 zeigt die Entstehung dieser beiden Produkte in Abhängigkeit der Behandlungsintensität.

Die Entstehung der Abbauprodukte begann etwa bei  $\log(R_0)=4$  und erreichte einen Höhepunkt zwischen 4 und 5 (HMF) bzw. 6 (Furfural). Es zeigten sich zwei Maxima, die denen der Monomerbildung in Richtung stärkerer Behandlung folgten. Weiterhin nahm die Konzentration der Abbauprodukte bei noch größeren  $\log(R_0)$ -Werten ab, da auch diese zu anderen organischen Verbindungen abgebaut wurden, was die steigende Verflüssigung (Abb. 5) bestätigte. Die hohe Konzentration des aus Glukose entstehenden Hydroxymethylfurfurals im Vergleich zur Glukosekonzentration könnte daraus resultieren, dass die Glukose schon frühzeitig abgebaut wurde und das Abbauprodukt stabiler als die Glukose war und daher erst bei stärkerer Belastung selbst in andere organische Folgeprodukte zerfiel.

Aus Tab. 2 wird deutlich, dass bereits geringe Mengen der Hauptabbauprodukte HMF und Furfural die Ethanolproduktion aus den entsprechenden Zuckermonomeren deutlich hemmen [13]. Diese Zahlen beziehen sich auf den Stoffwechsel von *Saccharomyces cerevisiae* (Glukose) und *Pichia stipitis* (Xylose). Daher war die Bildung der Hemmstoffe Furfural und HMF zu vermeiden. Bei Behandlungsintensitäten von  $\log(R_0)<4$  ließ sich das Substrat bereits zu ca. 40% verflüssigen, ohne dass nennenswerte Konzentrationen an unerwünschten Abbauprodukten entstanden sind. Ein  $\log(R_0)$ -Wert von 4 entsprach etwa einer 1,5-minütigen Behandlung bei 230°C oder einer 6-minütigen Behandlung bei 210°C.

**Tab. 2:** Einfluss von HMF und Furfural auf die Ethanolproduktion [13]

|                 | Konzentration [g/l] | % Inhibition (EtOH) |        |
|-----------------|---------------------|---------------------|--------|
|                 |                     | Glukose             | Xylose |
| <b>Furfural</b> | 2                   | 89                  | 95     |
| <b>HMF</b>      | 5                   | 95                  | 91,4   |



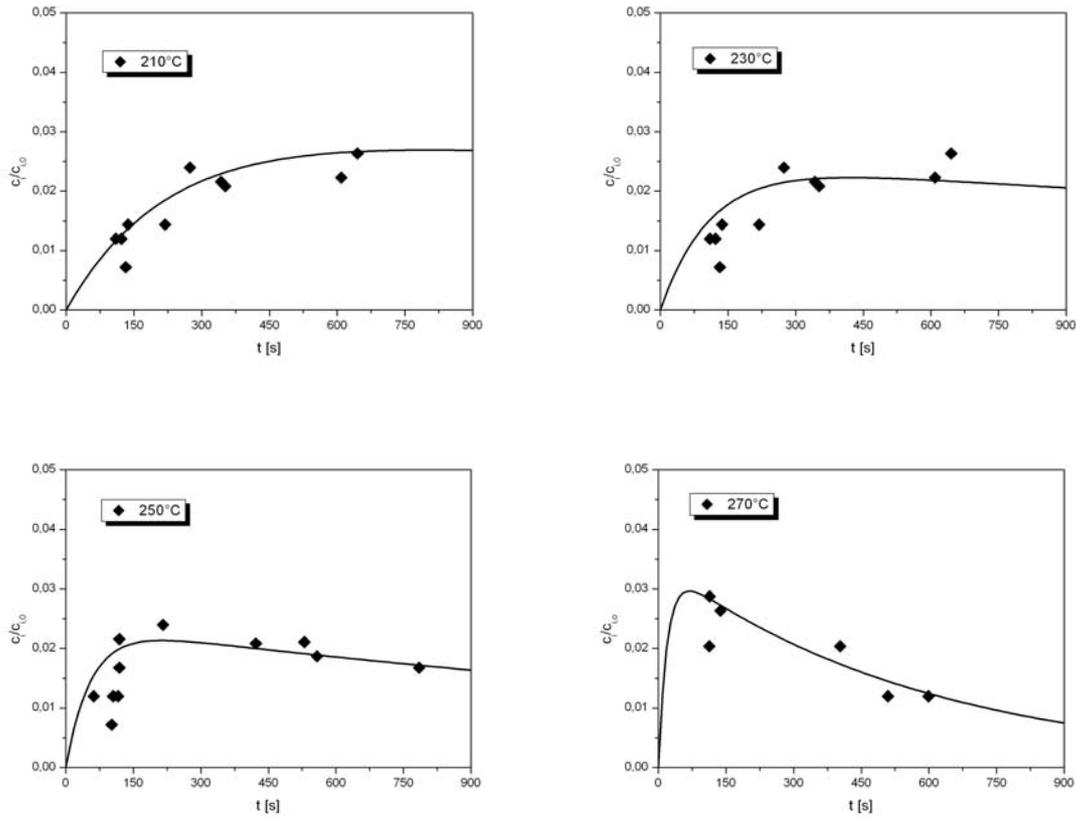
**Abb. 7:** Konzentration der Abbauprodukte HMF und Furfural bei der thermischen Behandlung von einprozentiger Roggenstros suspension im kontinuierlichen Betrieb bei 100 bar in Abhängigkeit der Behandlungsintensität

Wurden die Datenpunkte aus Abb. 6 für die verschiedenen untersuchten Temperaturen gegen die Verweilzeit aufgetragen, so ergaben sich charakteristische Kurvenverläufe, die am Beispiel von Glukose für vier verschiedene Temperaturen in Abb. 8 dargestellt sind. Es wird erneut ersichtlich, dass mit steigender Temperatur die Glukose schneller aus der Cellulose freigesetzt wurde, sie jedoch auch schneller wieder abgebaut wurde. Es ist weiterhin zu erkennen, dass die experimentell ermittelten Datenpunkte sich gut durch das verwendete Reaktionsmodell beschreiben lassen.

Das Reaktionsmodell beruht auf der Annahme zweier aufeinanderfolgender Reaktionen erster Ordnung gemäß Gleichung (3):



Gleichung (3) ist sowohl für die Glukose als auch für die Xylose anwendbar, wobei die entsprechenden Polymere Cellulose und Hemicellulose betrachtet werden müssen. Die jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Bildungs- ( $k_i^f$ ) und Zersetzungsreaktion ( $k_i^d$ ) werden durch Anpassen der Kurvenverläufe an die experimentellen Datenpunkte ermittelt und sind in Tab. 3 aufgeführt.



**Abb. 8:** Glukose-Ausbeute  $c/c_{i,0}$  über der Zeit bei 210, 230, 250 und 270°C und 100 bar im kontinuierlichen Betrieb mit einprozentiger Roggenstros suspension; Messpunkte und Modellierungskurven

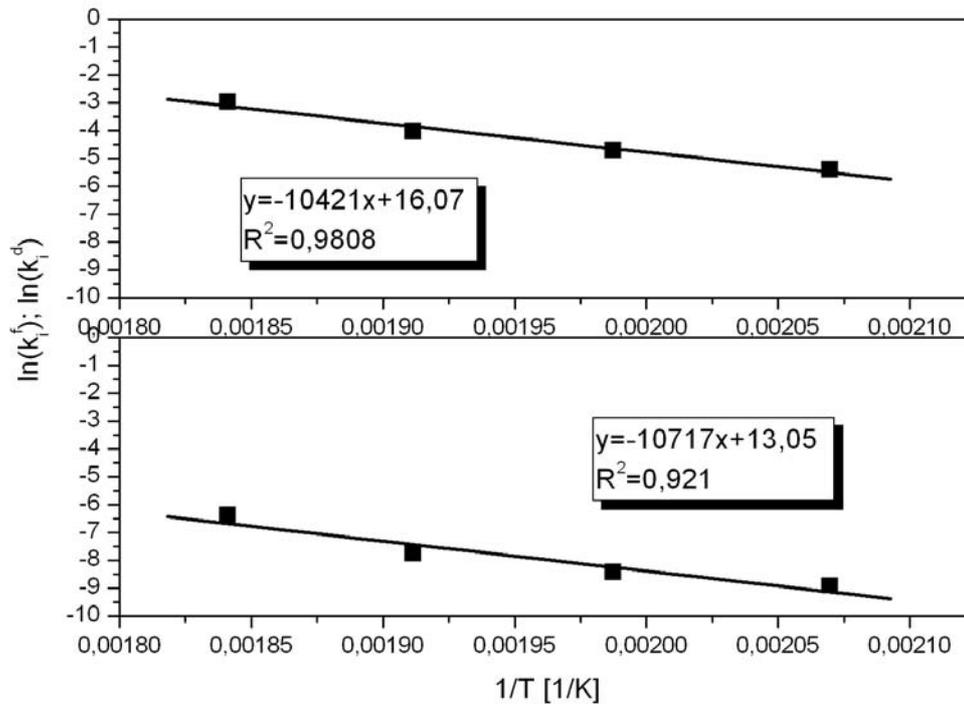
**Tab. 3:** Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten  $k_i^f$  und  $k_i^d$  für die Bildung und den Abbau von Glukose und Xylose im kontinuierlichen Betrieb bei 210-270°C und 100 bar mit einprozentiger Roggenstros suspension

| T [°C] | Glukose              |                     | Xylose              |                     |
|--------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|        | $k_i^f$ [1/s]        | $k_i^d$ [1/s]       | $k_i^f$ [1/s]       | $k_i^d$ [1/s]       |
| 210    | $1,35 \cdot 10^{-4}$ | $4,5 \cdot 10^{-3}$ | $4,8 \cdot 10^{-4}$ | $1,6 \cdot 10^{-3}$ |
| 230    | $2,2 \cdot 10^{-4}$  | $9,0 \cdot 10^{-3}$ | $8,3 \cdot 10^{-4}$ | $4,1 \cdot 10^{-3}$ |
| 250    | $4,2 \cdot 10^{-4}$  | $1,8 \cdot 10^{-2}$ | $3,5 \cdot 10^{-3}$ | $2,6 \cdot 10^{-2}$ |
| 270    | $1,7 \cdot 10^{-3}$  | $5,1 \cdot 10^{-2}$ | $3,6 \cdot 10^{-3}$ | $4,2 \cdot 10^{-2}$ |

Anhand der sogenannten Arrhenius-Auftragungen gemäß Gleichung (4) lassen sich für die jeweiligen Reaktionen die Aktivierungsenergien  $E_A$  und Stoßfaktoren A bestimmen.

$$\ln k = \ln A - \frac{E_A}{RT} \tag{4}$$

Die Arrhenius-Plots sind beispielhaft für Glukose in Abb. 9 dargestellt. Die linearen Zusammenhänge unterstützen die Annahme, dass es sich um zwei Reaktionen erster Ordnung handelt. Die resultierenden Aktivierungsenergien und Stoßfaktoren sind in Tab. 4 aufgeführt.



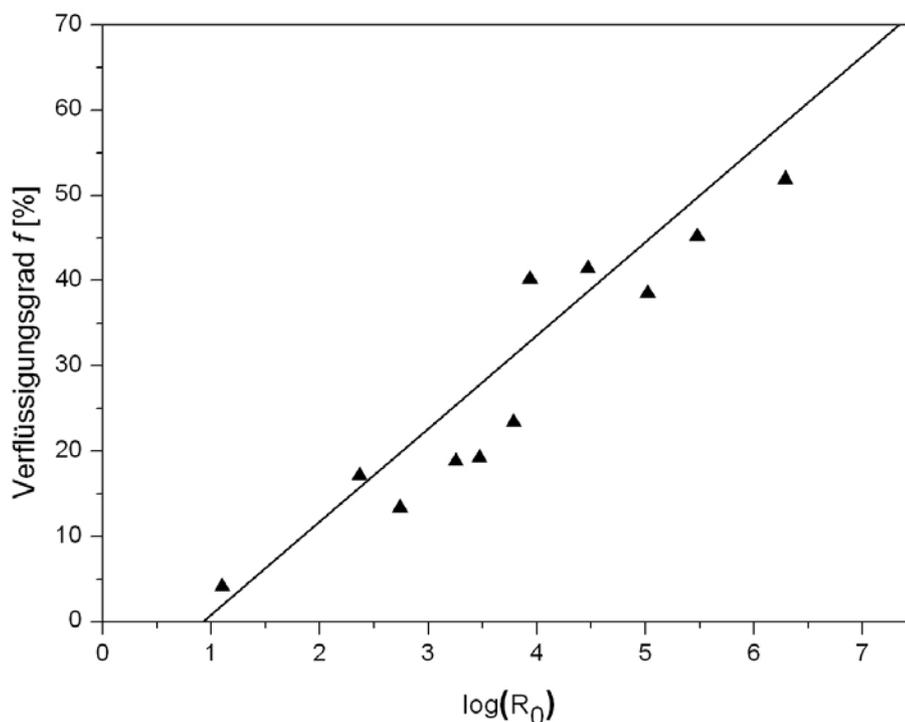
**Abb. 9:** Arrhenius-Plots für die Bildung (oben) und den Zerfall (unten) von Glukose gemäß Tab. 2

**Tab. 4:** Aktivierungsenergien EA und Stoßfaktoren A der kinetischen Betrachtung gemäß Tab. 3

|   | Glukose           |                   | Xylose            |                      |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
|   | $k_i^f$           | $k_i^d$           | $k_i^f$           | $k_i^d$              |
| <b>Stoßfaktor A [1/s]</b>                             | $4,67 \cdot 10^5$ | $9,53 \cdot 10^6$ | $3,44 \cdot 10^5$ | $8,95 \cdot 10^{10}$ |
| <b>Aktivierungsenergie<br/>E<sub>A</sub> [kJ/mol]</b> | 89,1              | 86,6              | 82,0              | 127,3                |

Unter den gegebenen Bedingungen waren im kontinuierlichen Betrieb nur Versuche mit ca. 1% Roggenstroh in Wasser möglich. Das in Wasser unlösliche Roggenstroh präzipitierte vor allem in den Ventilen und Pumpenköpfen, wodurch nach kurzer Zeit alle Versuche mit höheren Feststoffkonzentrationen abgebrochen werden mussten. Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse der 1%igen Suspensionen auch auf höhere Konzentrationen übertragen werden

können, wurden mehrere Versuchsreihen mit Guarkernmehl als Verdickungsmittel durchgeführt. Durch das Verdickungsmittel konnten 5%ige Roggenstrohsuspensionen im kontinuierlich betriebenen Rohrreaktor untersucht werden. Die gemessenen Verflüssigungen bei unterschiedlichen Temperaturen und Verweilzeiten sind in Abb. 10 dargestellt. Die Trendlinie verdeutlicht die Substratverflüssigung der 1%igen Suspension in Abhängigkeit des  $R_0$ -Wertes. Die Datenpunkte veranschaulichen, dass die Substratkonzentration keinen Einfluss auf die Substratverflüssigung hat. Die Ergebnisse an Hand der 1%igen Suspension sind somit übertragbar auf höhere Feststoffkonzentrationen.

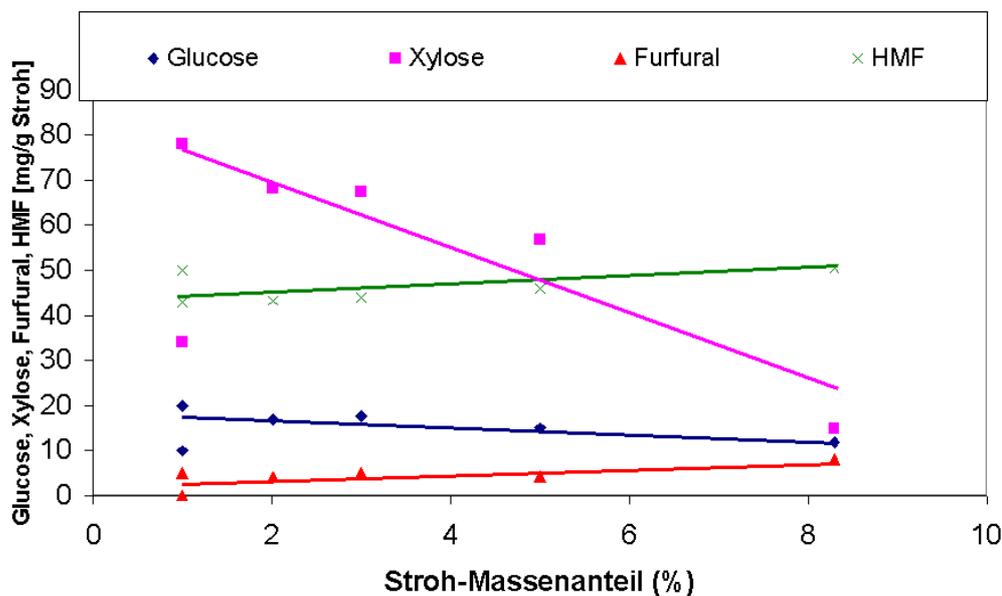


**Abb. 10:** Verflüssigung von Roggenstroh im kontinuierlich betriebenen Rohrreaktor bei 100 bar in Abhängigkeit des  $R_0$ -Wertes

Alternativ wurde zu Untersuchungen höher konzentrierter Strohsuspensionen ein Batch-Reaktor verwendet. Abb. 11 zeigt die Konzentrationen der entstandenen Produkte aus Roggenstroh im diskontinuierlichen Betrieb bei 200°C und 30 min für verschiedene Substratkonzentrationen. Da sich Suspensionen mit einem Feststoffgehalt von ca. 10% nicht mehr rühren ließen, war auch im Batch-Betrieb die maximale Substratkonzentration auf ca. 7% begrenzt.

Die Konzentration von Glukose nahm mit steigendem Feststoffgehalt leicht ab. Die Xylosekonzentration nahm sogar sehr deutlich ab, sofern der einzelne Datenpunkt bei 34 mg/g außer Acht gelassen wird. Die geringfügige Abnahme der Glukosekonzentration ging einher mit einer entsprechenden Zunahme der HMF-Konzentration, dem Hauptabbauprodukt der Glu-

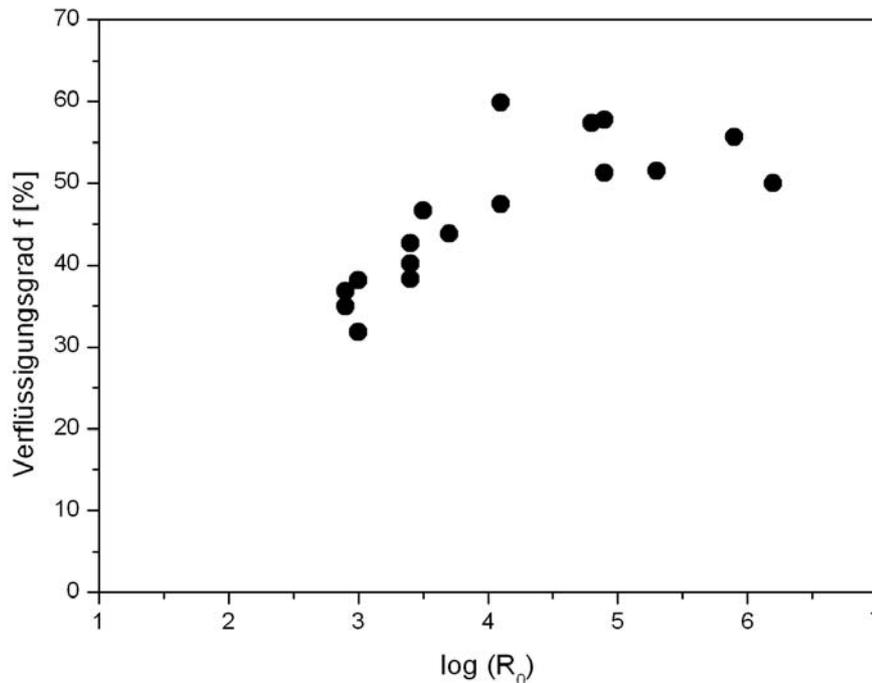
kose. Auch die Konzentration an Furfural (Hauptabbauprodukt der Xylose) nahm geringfügig zu, jedoch nicht in dem Maße, wie die Xylosekonzentration abnahm. Ferner war eine geringe Abnahme der Gesamt-Verflüssigung mit steigendem Feststoffanteil zu beobachten (Ergebnisse nicht dargestellt). Aus Literaturdaten[14-16] geht hervor, dass eine Erhöhung der Feststoffkonzentration bei vergleichbaren Experimenten stets zu einer Abnahme des pH-Wertes führt. Bezüglich des Einflusses auf die Bildung der einzelnen Produkte sind die Literaturangaben hingegen nicht einheitlich.



**Abb. 11:** Produktbildung aus Roggenstroh in Abhängigkeit des Stroh-Massenanteils in der Substratlösung im diskontinuierlichen Betrieb bei 200°C, 30 min und 100 bar N<sub>2</sub>-Druck

### 3.2.2 Roggensilage

Abb. 12 zeigt den Verflüssigungsgrad  $f$  in Prozent über dem Gewichtungsfaktor  $R_0$  für Versuche mit einprozentiger Roggensilage-Suspension im kontinuierlichen Betrieb:

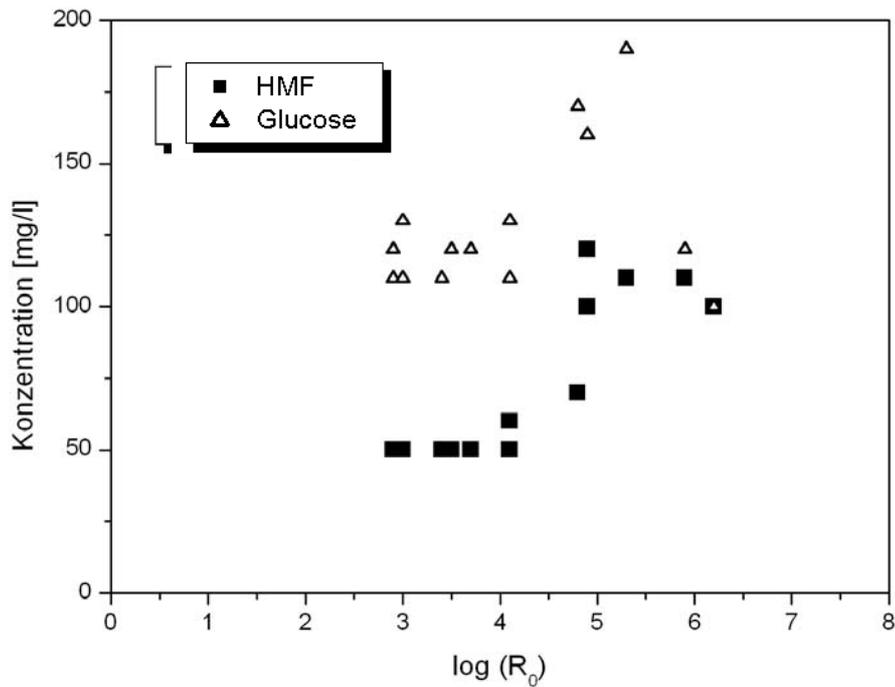


**Abb. 12:** Verflüssigungsgrad von einprozentiger Roggensilage-Suspension im kontinuierlichen Betrieb bei 100 bar in Abhängigkeit der Behandlungsintensität

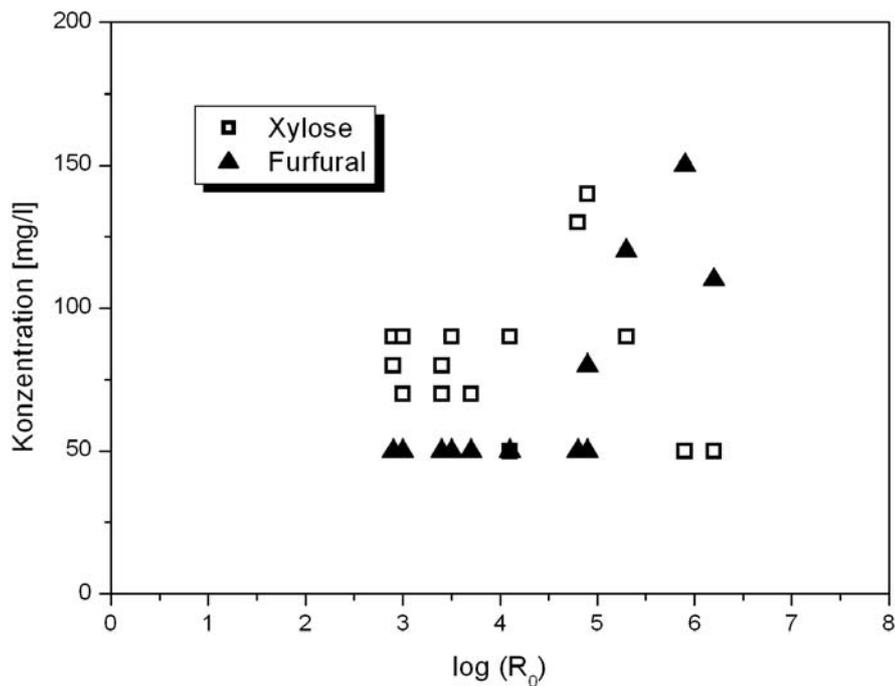
Der Verflüssigungsgrad stieg zunächst stark an, bis bei einem  $\log(R_0)$ -Wert von ca. 4,5 ein konstantes Niveau von etwa 55% erreicht wurde. Die Verflüssigung war, wie auch beim Stroh, auf das vermehrte Spalten von intra- und intermolekularen Bindungen mit steigender Behandlungsintensität zurückzuführen. Auch bei den Roggensilage-Versuchen war keine signifikante Steigerung des Verflüssigungsgrades durch Sättigung des Mediums mit  $\text{CO}_2$  festgestellt worden, weshalb auf eine entsprechende Kennzeichnung verzichtet wurde.

Die Entstehung der Zuckermonomere Xylose und Glukose sowie deren Abbauprodukte Furfural und Hydroxymethylfurfural sind in Abb. 13 und Abb. 14 dargestellt. Die Maxima der Abbauprodukte folgten denen der Zuckermonomere in Richtung stärkerer Behandlung (Xylose), bzw. fanden sich bei der gleichen Behandlungsintensität (Glukose). Allerdings zeigte sich hier ein Unterschied zu den Glukose-Ausbeuten der Roggenstroh-Versuche: Die Konzentration von HMF blieb unter der von Glukose, eine starke Glukose-Zersetzung wie bei den Strohversuchen blieb aus; insgesamt war so die Glukose-Ausbeute etwas höher. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass sich die Silage durch das anaerobe Ansäuern Laktatproduzierender Mikroorganismen leichter hydrolysieren ließ. Die Silage wies einen pH-Wert

von ca. 4 auf, was deutlich saurer war als das Substrat Stroh (pH 5). Weiterhin könnte der niedrigere pH-Wert durch Anwesenheit der organischen Säuren die Bildung der Abbauprodukte erschwert haben, wie es auch schon bei van Walsum & Shi unter Verwendung von Maisstroh beobachtet worden ist [11]. Die Konzentrationen von Xylose und Furfural waren in etwa gleich stark, jedoch wurde für beide Substanzen nicht das Niveau der Roggenstrohver-suche erreicht.



**Abb. 13:** Konzentrationen von Glukose und Hydroxymethylfurfural (HMF) bei der thermischen Behandlung von einprozentiger Roggensilage-Suspension im kontinuierlichen Betrieb bei 100 bar in Abhängigkeit der Behandlungsintensität



**Abb. 14:** Konzentrationen von Xylose und Furfural bei der thermischen Behandlung von einprozentiger Roggensilage-Suspension im kontinuierlichen Betrieb bei 100 bar in Abhängigkeit der Behandlungsintensität

Die erhöhte Substratverflüssigung mit steigender Behandlungsintensität war auch anhand der Färbung der Hydrolysate auszumachen. Abb. 15 zeigt einige thermisch vorbehandelte Substrate für verschiedene Temperaturen bei ansonsten konstanten Bedingungen. Während die Farbe nach einer relativ milden Vorbehandlung nahezu identisch mit der Farbe der eingesetzten Feedsuspension war, wurde das Hydrolysat mit steigender Vorbehandlungstemperatur immer klarer. Wie auch im Fall des Roggenstrohs musste eine erhöhte Verflüssigung aufgrund der Bildung der Nebenprodukte jedoch nicht zwangsläufig das optimale Versuchsergebnis darstellen. Auch bei der Roggensilage setzte die Bildung der unerwünschten Hemmstoffe bei einer Behandlungsintensität von ca.  $\log(R_0) > 4$  ein.

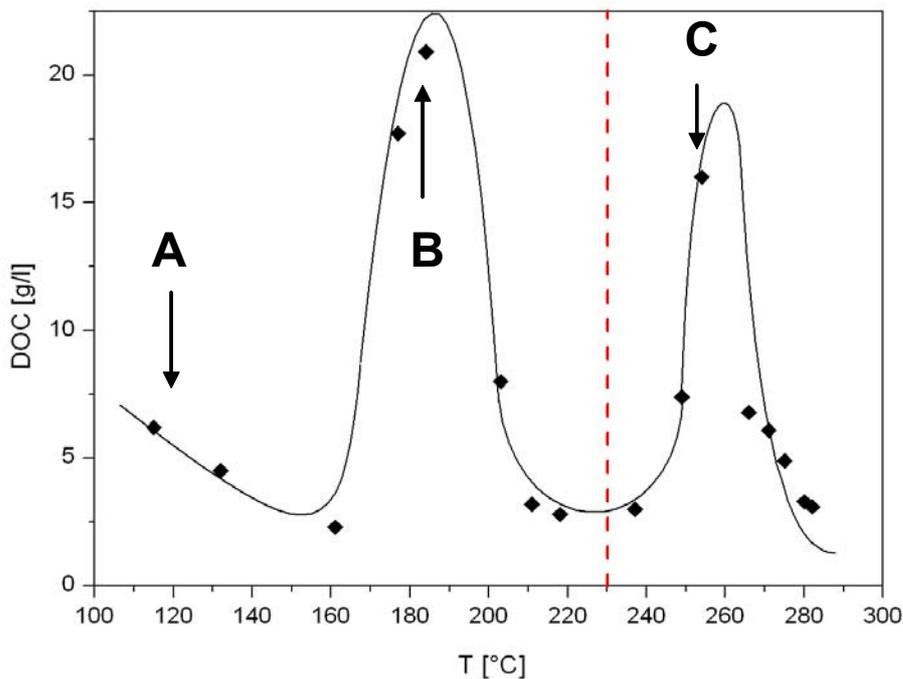


**Abb. 15:** Verfärbung des Substrats nach der thermischen Behandlung von einprozentiger Roggensilage-Suspension im kontinuierlichen Betrieb bei 100 bar und 2,1...2,7 min für verschiedene Temperaturen; v.l.n.r.: 190, 210, 250, 270, 290°C

### 3.2.3 Thermische Vorbehandlung von Roggenstroh im Festbettreaktor

Aufbauend auf den Versuchsergebnissen des vorhergehenden Abschnittes wurden zwei semikontinuierliche Festbettreaktoren entwickelt. Dieser Reaktoraufbau erlaubte eine zeitlich unbegrenzte Reaktionszeit der wasserunlöslichen Biomassefraktion. Gelöste Komponenten wurden durch das den Reaktor durchströmende Wasser aus der Reaktionszone transportiert. Der große Vorteil dieses Reaktoraufbaus war das hohe Biomasse zu Wasser Verhältnis sowie der Einsatz von ungemahlener Biomasse. Da keine rühr- bzw. pumpfähigen Dispersionen notwendig waren, konnte das ganze Stroh thermisch vorbehandelt werden.

*Thermisches Verhalten von Roggenstroh:* Lignocellulose setzt sich aus den drei Hauptbestandteilen Cellulose, Hemicellulose und Lignin zusammen. Jeder dieser drei Bestandteile zeigt ein eindeutiges thermisches Verhalten. Eine gute Übersicht über das thermische Verhalten der Modellsubstanzen Cellulose und Lignin geben Brunner et al. [17]. Jedoch spielen die Wechselwirkungen der drei Bestandteile in komplexer Biomasse eine entscheidende Rolle, daher wurde zunächst untersucht welcher Teil des Roggenstrohs bei einer bestimmten Temperatur verflüssigt werden konnte. In diesem Sinne wurde das in Abb. 16 dargestellte thermische Elutionsprofil von Roggenstroh bestimmt. Dazu wurde das ungemahlene Stroh mit konstantem Durchfluss von reinem Wasser durchströmt und die Temperatur schrittweise erhöht.

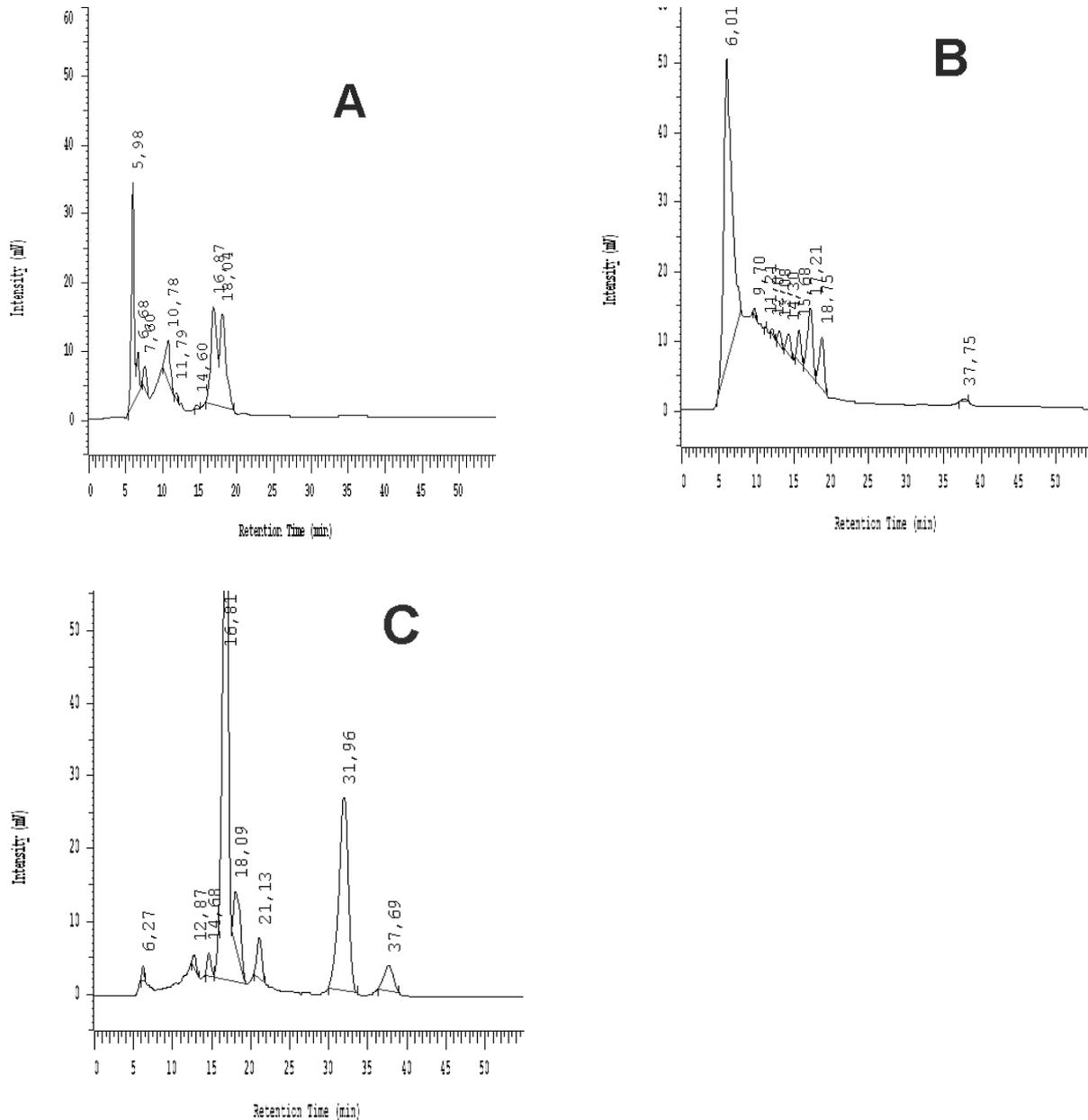


**Abb. 16:** Thermisches Elutionsprofil von Roggenstroh im Festbettreaktor (1000 ml) bei 100 bar. Die gestrichelte Linie trennt die Temperaturbereiche, in welchen die Hemicellulose (links) bzw. die Cellulose (rechts) verflüssigt werden.

Abb. 16 zeigt den gemessenen DOC am Ausgang des Reaktors bei unterschiedlichen Temperaturen. Die gelösten Bestandteile bei Temperaturen zwischen 110°C und 160°C waren auf leicht lösliche Komponenten im Stroh zurückzuführen. Das Chromatogramm der Probe A (Abb. 17.A) verdeutlicht, dass Kohlenhydrate wie Glukose und Fructose in der Probe vorhanden waren. Diese ließen sich auf Stärkereste oder freie Zucker zurückführen. Eine Hydrolyse-Reaktion war erst ab einer Temperatur von ca. 160°C zu beobachten. Die Zusammensetzung der Probe B (Abb. 17.B) verdeutlicht, dass bei einer Temperatur von 180°C ausschließlich verschiedene Xylane und Xylose in der Probe gelöst waren. Die Feststellung, dass in einem Temperaturbereich zwischen 170°C und 215 °C ausschließlich die Hemicellulose der Biomasse verflüssigt wurde, wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben [18, 19]. Neu war die Erkenntnis, dass Temperaturen bis 200°C nicht ausreichen um die gesamte Hemicellulose zu verflüssigen.

Der Celluloseanteil im Roggenstroh wurde erst bei Temperaturen über 250°C hydrolysiert. Die Zusammensetzung der Probe C bei 255°C ist in Abb. 17.C dargestellt. Im Gegenteil zu Probe B (190°C) konnten in Probe C (255°C) keine Oligomere detektiert werden. Probe C bestand nahezu ausschließlich aus Glukose und dem Abbauprodukt der Glukose HMF. Dieses Ergebnis stimmt mit Resultaten aus der Literatur überein. Bobleter et al. konnten zeigen, dass Cellobiose wesentlich instabiler in heißem Wasser ist als Glukose bzw. HMF[18]. Der

Feststoffrückstand am Ende dieser Versuche (maximale Temperatur 280°C) entsprach 10 bis 15% der ursprünglich eingesetzten Menge. Dieser Feststoffrückstand bestand zu 96,6% aus Klasonlignin und zu 0,3% aus Asche. Es konnten keine Zucker detektiert werden (Analyse der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Hamburg).



**Abb. 17:** HPLC Chromatogramme der flüssigen Proben bei 116°C (A), 190°C (B) und 255°C (C) entsprechend Abb. 16. Hauptpeaks: (A) Glukose (retention time 16.87 min), Fructose (18.04); (B) Xylose (18.75), Furfural (37.75); (C) Glukose (16.81), Fructose (18.09), HMF (31.96), Furfural (37.69)

*Verflüssigung der Hemicellulose:* Im vorhergehenden Abschnitt wurde die Verflüssigung der verschiedenen Fraktionen im Roggenstroh bei steigender Temperaturen beschrieben. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Verflüssigung des Celluloseanteils nur bei hohen Temperatu-

ren möglich war. Zusätzlich entstand ein nicht vernachlässigbarer Anteil an unerwünschten Abbauprodukten, die die Gesamtausbeute reduzierten. Bei milderen Bedingungen konnte nahezu die gesamte Hemicellulose verflüssigt werden, als fester Rückstand blieb ein cellulosereicher Feststoff. Vorversuche zeigten, dass sowohl die gelösten Xylane im Hydrolysat als auch der cellulosereiche Feststoffrückstand gute Substrate für einen enzymatischen Aufschluss darstellten.

Unter diesen Voraussetzungen wurde eine Reihe an Versuchen durchgeführt, mit dem Ziel einen möglichst hohen Anteil der Biomasse zu verflüssigen, die Menge an Abbauprodukten zu minimieren und gleichzeitig einen enzymatisch gut abbaubaren Feststoffrückstand zu erzeugen. Das eingesetzte Wasser zu Biomasse Verhältnis war 10:1.

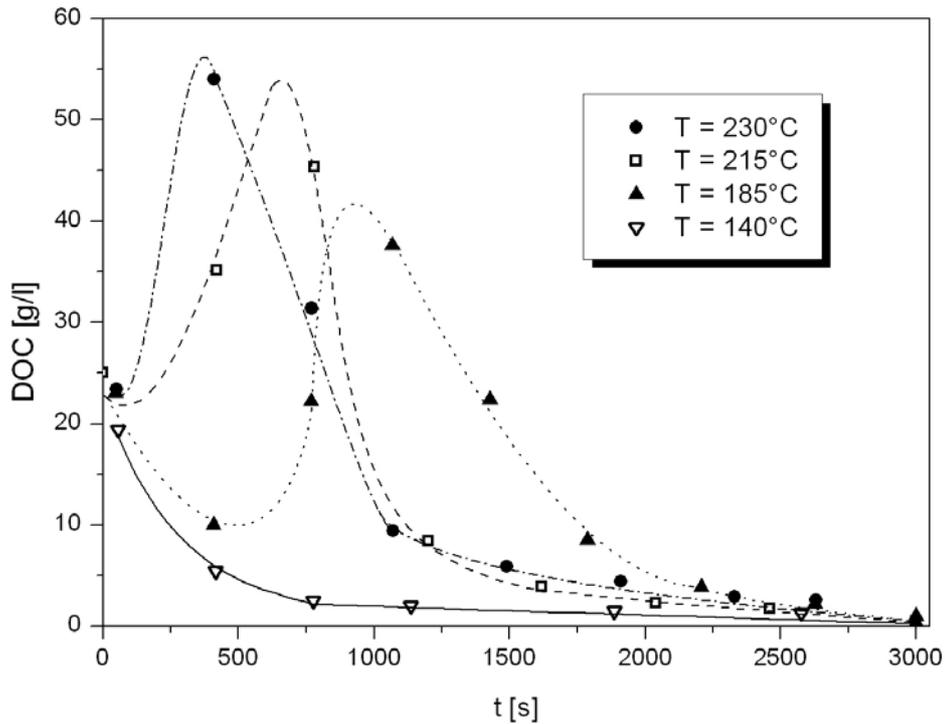
Abb. 18 zeigt die Konzentrationen an gelösten Kohlenstoffen (DOC) bei Versuchstemperaturen zwischen 140°C und 230°C am Ausgang des Reaktors. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass erst ab Temperaturen um 160°C eine Reaktion beobachtet werden konnte. Bei 140°C wurden lediglich wasserlösliche Komponenten im Stroh herausgewaschen. Mit zunehmender Temperatur begann und endete die Hydrolyse früher. Zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Verflüssigung  $f$  wurde folgendes Modell basierend auf einer Reaktion 1. Ordnung entwickelt, und auf die Ergebnisse an Hand des Laborfestbettreaktors übertragen.

$$f = \lambda_{\max} \cdot (1 - \exp(-k_i \cdot t)) \quad (3)$$

mit  $\lambda_{\max}$  = maximale Verflüssigung in s,

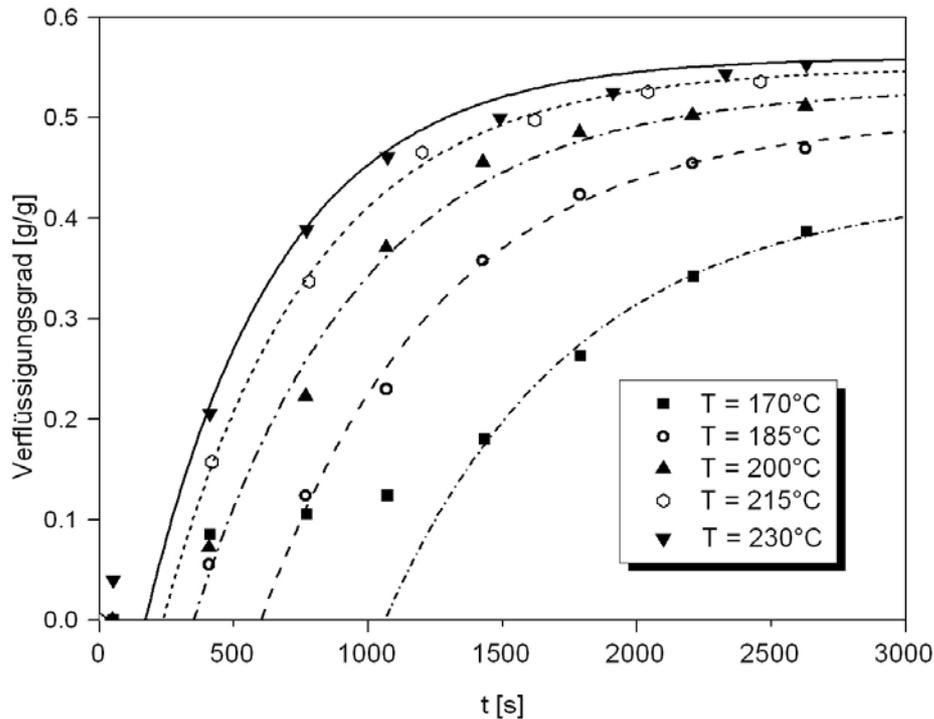
$k_i$  = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante in 1/s

$t$  = Reaktionszeit in min und  $T$  = Temperatur in °C.



**Abb. 18:** Thermische Elutionsprofile von Roggenstroh im Festbettreaktor (50 ml) bei 50 bar und verschiedenen Temperaturen,  $\tau_{\text{H}_2\text{O}} = 9$  min

Abb. 19 zeigt den Verflüssigungsgrad  $f$  in Abhängigkeit der Reaktionszeit und der Temperatur. Das entwickelte Model (3) kann die experimentellen Daten in einer zufriedenstellenden Genauigkeit darstellen. Die Annahme einer Reaktion erster Ordnung wird durch die Darstellung der ermittelten Reaktionskonstanten  $k_i$  im Arrheniusgraph bestätigt (vergl. Abb. 20). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass bei einer bestimmten Temperatur nur ein bestimmter Anteil der Biomasse verflüssigt werden konnte. Dieser Anteil wurde erstmals durch den in dieser Arbeit neu eingeführten Faktor  $\lambda_{\text{max}}$  beschrieben.

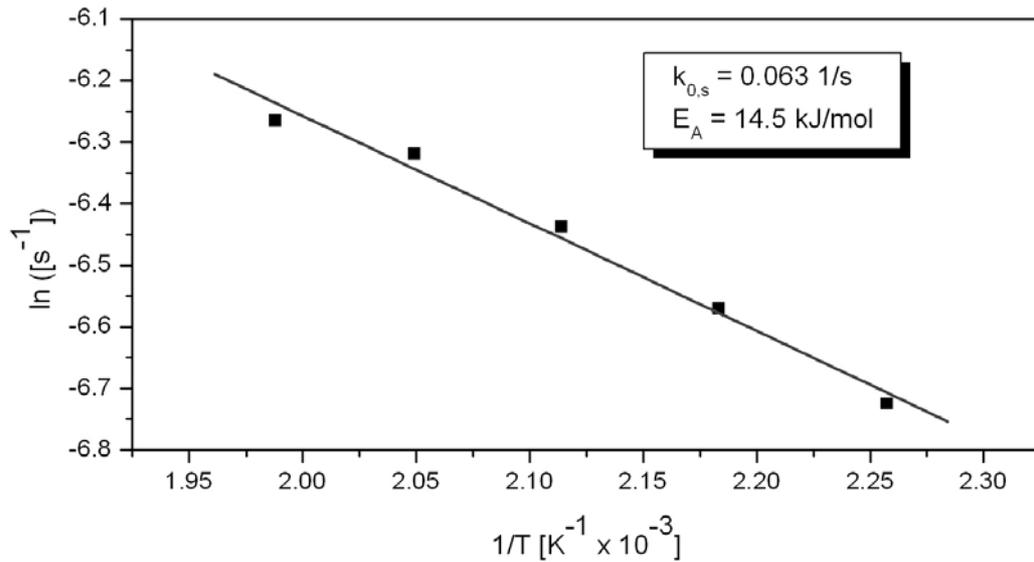


**Abb. 19:** Verflüssigung von Roggenstroh im Festbettreaktor (50 ml) bei 50 bar und verschiedenen Temperaturen,  $\tau_{H_2O} = 9$  min, experimentelle Daten und Model

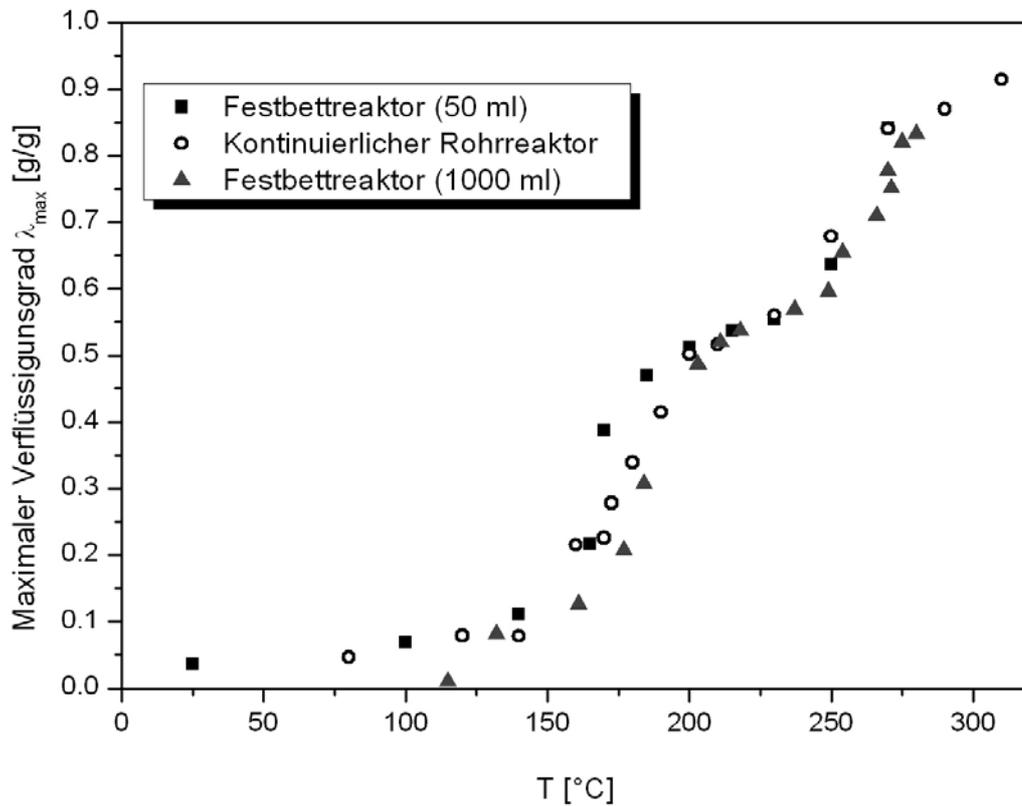
$$\lambda_{\max} = \frac{M_l}{M_0} \quad (4)$$

mit  $M_l$  = löslicher Anteil in g und  $M_0$  = gesamt Masse in g

$\lambda_{\max}$  beschreibt den Anteil der Biomasse, der bei einer bestimmten Temperatur maximal verflüssigt werden konnte. Sollte es sich dabei tatsächlich um einen festen Faktor handeln, sollte dieser auch durch die vorhergehenden Ergebnisse bestätigt werden. Abb. 21 zeigt den Anteil der Biomasse der maximal bei verschiedenen Temperaturen und verschiedenen Apparaturen gelöst werden konnte. Die gute Übereinstimmung verdeutlicht die Übertragbarkeit von  $\lambda_{\max}$  auf verschiedene Reaktorkonzepte.



**Abb. 20:** Arrhenius-Plot für den Zerfall von Roggenstroh in heißem Wasser für Temperaturen zwischen 160°C und 240°C



**Abb. 21:** Maximale Verflüssigung von Roggenstroh aus mehreren Reaktorkonzepten bei verschiedenen Temperaturen

*Zusammensetzung des Hydrolysats und des Feststoffrückstandes nach der thermischen Vorbehandlung:* In der Literatur werden mehrere Methoden zur Bestimmung der Gesamt-

menge an gelösten Zuckern (Mono- und Oligomere) beschrieben. Alle Methoden sind relativ ungenau, da bei einer sauren Hydrolyse sowohl Oligomere als auch Zucker abgebaut werden. Am weitesten verbreitet ist ein saurer Aufschluss mit  $H_2SO_4$ , eine Standard-Methode dazu ist durch die NREL<sup>1</sup> gegeben. Die Zuckermenge nach der sauren Hydrolyse wird mittels HPLC-Analysen bestimmt.

Die Zusammensetzungen der Hydrolysate nach Versuchen zwischen 230°C und 160°C sind in Tab. 5 dargestellt. Die Anteile von Glukose und Xylose sind in Gewichtsprozent bezogen auf die gesamt Zuckermenge im unbehandelten Stroh gegeben. Die Werte für HMF und Furfural beziehen sich auf die Gesamtmenge an Glukose und Xylose im Stroh. Der Anteil an Glukose im Hydrolysat kann durch Stärkereste im Roggenstroh und einen Glukoseanteil in der Hemicellulose erklärt werden. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass ab einer Temperatur von ca. 215°C die gesamte Hemicellulose verflüssigt werden kann. Die Abnahme der Xylosekonzentration bei 230°C lässt sich auf Abbaureaktionen zurückführen.

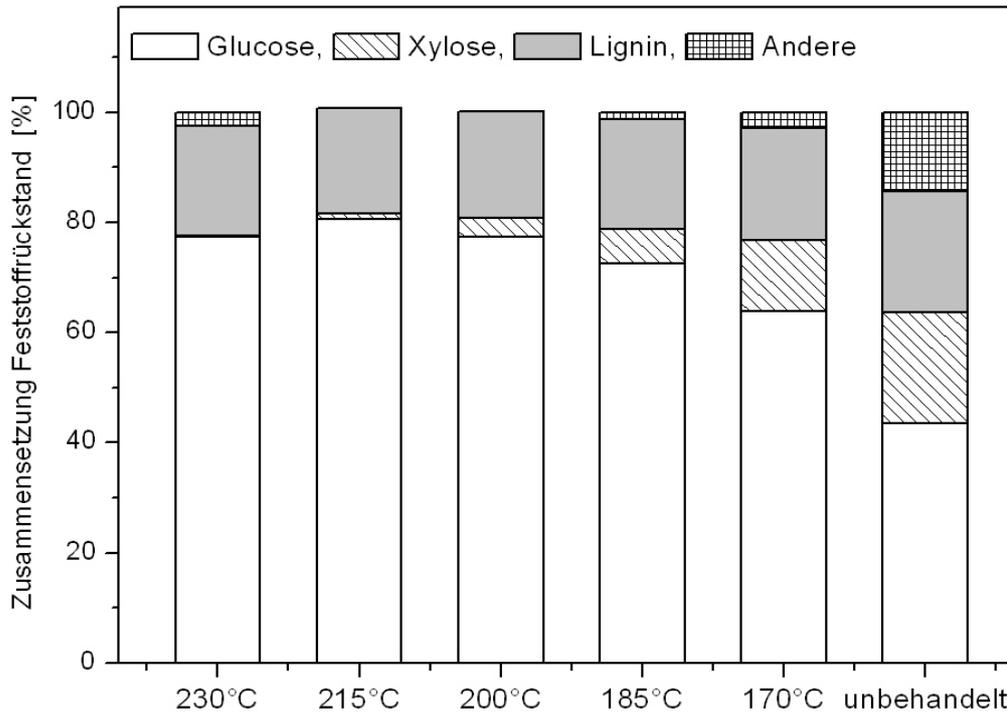
**Tab. 5:** Zusammensetzung des Hydrolysats nach unterschiedlichen Vorbehandlungstemperaturen; NB: nicht bestimmt

| T [°C] | 3.2.3.1.1.1 | Glukose [%] | Xylose [%] | HMF [%] | Furfural [%] | Zucker* [%] |
|--------|-------------|-------------|------------|---------|--------------|-------------|
| 230    | 7,4         | 80,2        | 4,4        | 3,6     | 32,6         |             |
| 215    | 7,9         | 98,0        | 2,4        | 1,2     | 37,8         |             |
| 200    | 7,0         | 91,5        | 1,6        | NB      | 35,5         |             |
| 185    | 6,7         | 90,8        | 0,9        | NB      | 34,6         |             |
| 170    | 10,6        | 56,7        | 0,2        | NB      | 29,2         |             |

\* (Beinhaltet Glukose, Xylose und Arabinose)

Die Analyse der Feststoffrückstände wurde in Form eines Fremdauftrags an der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft (Hamburg-Bergedorf) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 22 dargestellt. Bei einer Vorbehandlungstemperatur von 215°C erreichte der Anteil an Glukose im Feststoff ein Maximum von 81%, es konnte nahezu keine Xylose mehr nachgewiesen werden. Der Anteil an Lignin blieb nahezu konstant zwischen 20% und 25% bei allen untersuchten Feststoffproben.

<sup>1</sup> NREL: National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO (USA)



**Abb. 22:** Zusammensetzung des Feststoffrückstands bei 50 bar und verschiedenen Temperaturen im Festbettreaktor (50 ml),  $\tau_{H_2O} = 9$  min (Analyse der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft)

### 3.3 Gleichzeitige und separate thermische und enzymatische Behandlung

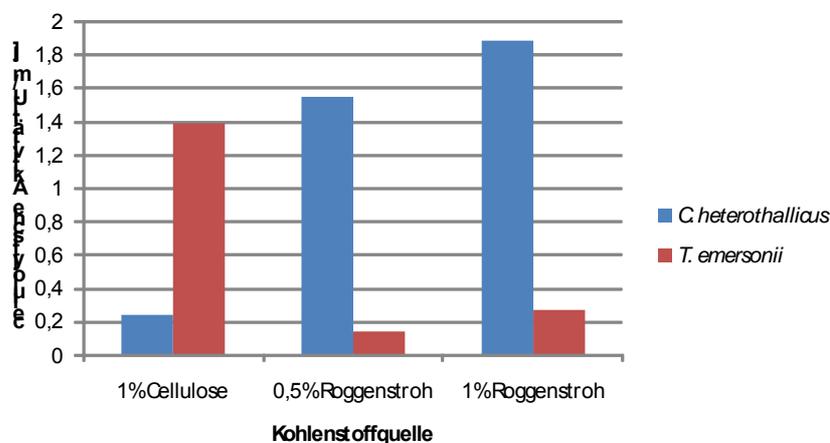
#### 3.3.1 Bereitstellung thermoaktiver cellulolytischer Enzyme aus Pilzen und Bakterien

Für den enzymatischen Aufschluss von Roggenstroh im Rahmen des Projektes wurden verschiedene cellulolytisch aktive thermophile und mesophile Pilze ausgewählt. Außerdem wurden im Rahmen des DBU-Projektes „Thermocellulasen“ AZ 13160-32 rekombinante thermostabile Enzyme getestet.

**Tab. 6:** Übersicht über die verwendeten Pilze

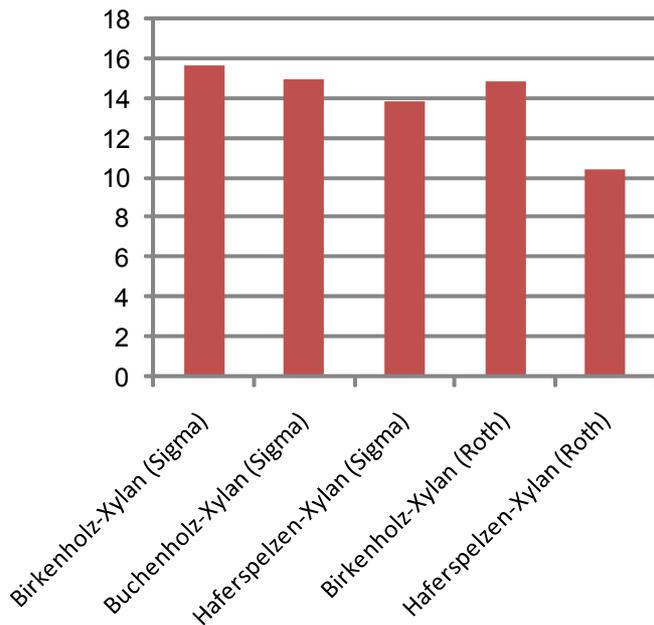
| Pilz                                | Identifikationsnummer | Optimale Kultivierungs-Temperatur | Optimale Temperatur der Enzymkomplexe |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Talaromyces emersonii</i>        | DSM 2432              | 45°C                              | 80°C                                  |
| <i>Corynascus heterothallicus</i>   | DSM 1807              | 45°C                              | 60°C                                  |
| <i>Aspergillus brasiliensis</i>     | CBS 121619            | 28°C                              | 75°C                                  |
| <i>Penicillium janthinellum V39</i> | -                     | 24°C                              | 50°C                                  |

Die cellulolytischen Enzymsysteme wurden charakterisiert. Dafür wurden die Pilzstämme *C. heterothallicus* und *T. emersonii* auf einem Minimalmedium bei 45°C und 220 rpm für 10 Tage kultiviert. Die alleinige Kohlenstoffquelle wurde hierbei variiert. Als Kohlenstoffquellen wurden sowohl lösliche Cellulosen (Carboxymethylcellulose und Hydroxyethylcellulose) als auch unlösliches Cellulosepulver und Roggenstroh verwendet. Die cellulolytischen Aktivitäten der extrazellulär vorliegenden Cellulase-Komplexe beider Pilze wurden mittels BCA-Assay bestimmt [3]. Beide Pilzstämme zeigten vergleichbar hohe cellulolytische Aktivitäten, allerdings wurden diese von unterschiedlichen Kohlenstoffquellen induziert. Während die Cellulase-Produktion von *T. emersonii* bei einem Wachstum auf 1%igem unlöslichen Cellulosepulver mit 1,05 U/ml Überstand am stärksten induziert wurde, zeigte *C. heterothallicus* die höchsten Aktivitäten von 1,4 U/ml Überstand bei einem Wachstum auf 1%igem Roggenstroh als alleinige Kohlenstoffquelle (Abb. 23). Das Wachstum beider Pilze und somit auch die Cellulase-Produktion auf den löslichen Cellulosen Carboxymethylcellulose und Hydroxyethylcellulose war minimal, was diese als geeignete Kohlenstoffquellen ausschloss. Die pH-Optima für die Cellulasesysteme beider Pilzstämme liegen bei pH 4,0, wobei die Temperatur-Optima im Falle von *T. emersonii* bei 80°C und im Falle von *C. heterothallicus* bei 60°C lagen.



**Abb. 23:** Bestimmung der cellulolytischen Aktivitäten der Überstände von *T. emersonii* und *C. heterothallicus*, nachdem die thermophilen Pilze auf unterschiedlichen Substraten als alleinige Kohlenstoffquelle angezogen wurden.

Der mesophile Pilz *A. brasiliensis* wurde ebenfalls 10 Tage in Minimalmedium auf unterschiedlichen Kohlenstoff-Quellen angezogen, allerdings sollte in diesem Fall die Xylanase-Produktion induziert werden. Dabei stellte sich heraus, dass eine Anzucht auf 1% Birkenholz-Xylan (Sigma) am produktivsten war (Abb. 24). Die Aktivitäten wurden mittels BCA-Test gemessen [3].



**Abb. 24:** Bestimmung der cellulolytischen Aktivitäten der Überstände von *A. brasiliensis* nachdem der mesophile Pilz auf unterschiedlichen Substraten als alleinige Kohlenstoffquelle angezogen wurde.

Der mesophile Pilz *P. janthinellum* wurde im Fachbereich Bio-, Chemie- und Verfahrenstechnik der Fachhochschule Lausitz im Rahmen eines Unterauftrages chemisch und physikalisch mutagenisiert. Ziel war es eine Mutante zu erhalten, die eine gesteigerte Cellulase-Produktion aufweist. Es entstanden 3 verschiedene Mutanten, von denen V39 die insgesamt höchsten Aktivitäten aufwies (Tab. 7).

Durch diese Mutante konnten Enzympräparate zur Verfügung gestellt werden, die die Ergebnisse von Schulz et al. sogar teilweise übertrafen (siehe unten). Insgesamt konnten Enzympräparate von mehr als 50 g mit dem zuvor beschriebenen Verfahren hergestellt werden.

**Tab. 7:** Vergleich zwischen den cellulolytischen Aktivitäten der Kultur-Überstände des Wildtyps und der Mutanten von *P. janthinellum*

| Stamm   | FPS-Aktivität [U/ml] | Endoglucanase | $\beta$ -Glukosidase |
|---------|----------------------|---------------|----------------------|
| Wildtyp | 0,6                  | 89            | 0,7                  |
| V16     | 2                    | 286           | 0,6                  |
| V39     | 2,3                  | 320           | 0,5                  |
| V41     | 2,3                  | 280           | 0,1                  |

Darstellung einzelner Enzymaktivitäten des hergestellten Präparates (die angegebenen Enzymaktivitäten beziehen sich auf ein Milligramm Lyophilisat):

**Cellulasekomplex:**

Präparat: 0,71 U/mg (Vergleichspräparat von Schulz et al.: 0,61 U/mg [5])

 **$\beta$ -Glukosidase:**

Präparat: 0,48 U/mg (Vergleichspräparat von Schulz et al.: 0,12 U/mg [5])

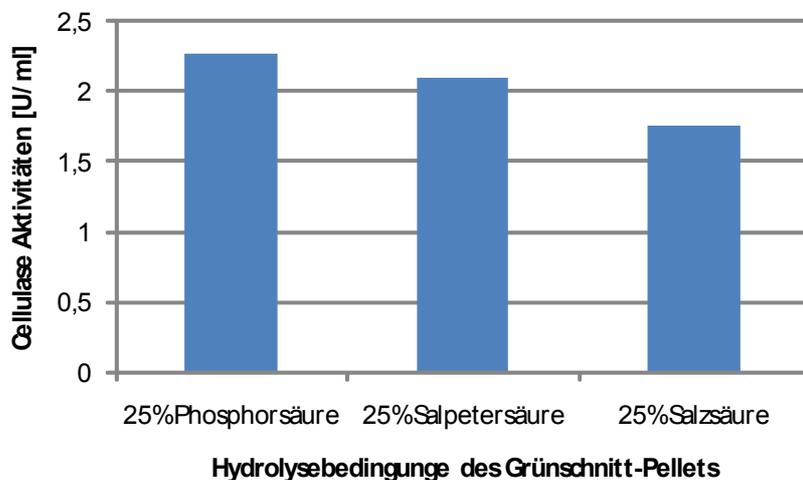
**Endoglucanase:**

Präparat: 23 U/mg (Vergleichspräparat von Schulz et al.: 21 U/mg [5])

**Exoglucanase:**

Präparat: 0,1 U/mg (Vergleichspräparat von Schulz et al.: 0,1 U/mg [5])

Auch *P. janthinellum* V39 wurde auf unterschiedlichen Substraten angezogen und zeigte die höchsten cellulolytischen Aktivitäten (2,25 U/mL) bei einer Kultivierung auf Grünschnitt-Pellets, die zuvor mit 25% Phosphorsäure aufgeschlossen wurden (Abb. 25).



**Abb. 25:** Bestimmung der cellulolytischen Aktivitäten der Überstände von *P. janthinellum* nachdem der mesophile Pilz auf unterschiedlichen Grünschnitt-Pellets als C-Quelle angezogen wurde, die mit verschiedenen Säuren (jeweils 25%) aufgeschlossen worden sind.

Besonderer Wert wurde auf eine durchgehend hohe Aktivität der  $\beta$ -Glukosidase gelegt, da sie das ausschlaggebende Enzym für die Umsetzung des Roggenstrohs zu Glukose ist. Die Aktivität (0,7 U/mL) der  $\beta$ -Glukosidase von *P. janthinellum* V39 wurde auf ihre Temperatur- und pH-Stabilität hin untersucht (Abb. 26 und Abb. 27)

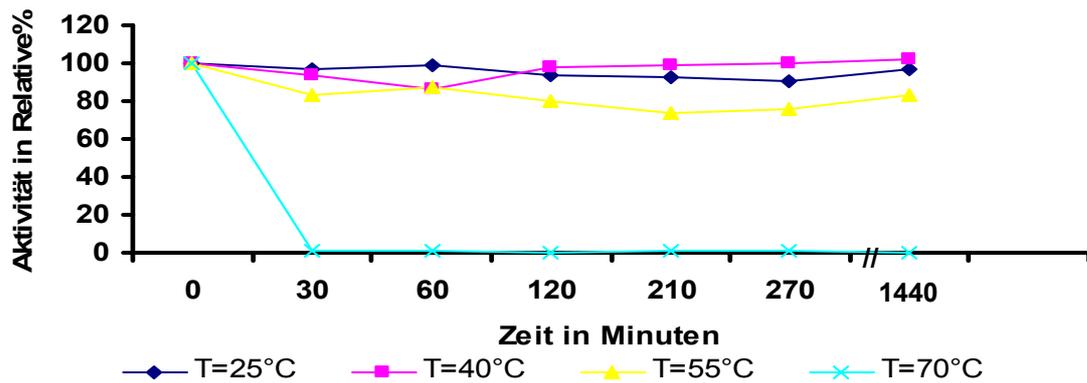


Abb. 26: Temperaturstabilität der  $\beta$ -Glukosidase aus *P. janthinellum* V39

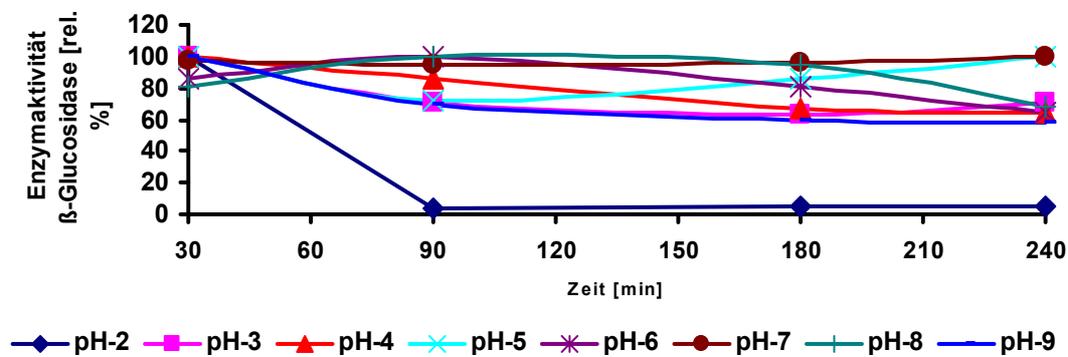


Abb. 27: pH-Stabilität der  $\beta$ -Glukosidase aus *P. janthinellum* V39

Die  $\beta$ -Glukosidase zeigte auch nach 24 Stunden bei Temperaturen bis 55°C fast keinerlei Aktivitätsverlust. Zudem war sie in einem sehr breiten pH-Spektrum von pH 3,0 bis pH 9,0 über einen Zeitraum von mindestens 4 Stunden aktiv. Bei einem pH-Wert von 4,0, bei dem die Hydrolyse von Roggenstroh stattfand, war nach 4 Stunden eine Restaktivität von ca. 70% vorhanden.

### 3.3.2 Kombinierte thermisch-enzymatische Hydrolyse

Für die thermisch-enzymatische Hydrolyse im Batch-Betrieb wurden die in den Kapiteln 2.2 und 3.3.1. beschriebenen Enzymsysteme verwendet. Es wurde eine Stabilisierung der Enzyme durch den angelegten Druck und somit ein höherer Umsatz erwartet [20, 21].

Bei dem käuflichen Enzym aus *Talaromyces emersonii* handelte es sich um eine Endoglucanase, die aus Cellulose Oligomere unterschiedlicher Polymerisationsgrade bildet. Die Oligomerreichen Hydrolysate wurden daher im Institut für Technische Mikrobiologie mit der HPLC-Analytik untersucht.

Die untersuchten Betriebsbedingungen erstreckten sich von 80 bis 140°C sowie 5 bis 60 min bei 100 bar CO<sub>2</sub>-Druck.

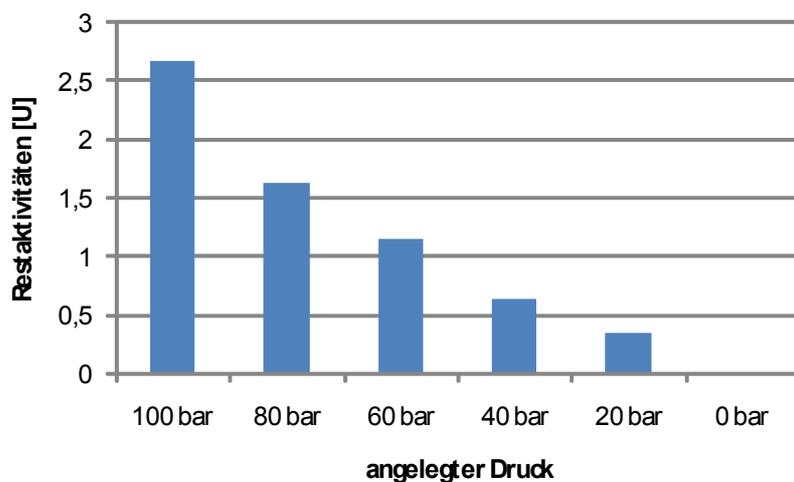
Wie die Versuche zeigten, konnten keine höheren Aktivitäten festgestellt werden als unter Atmosphären-Druck. Die Enzyme konnten durch den angelegten Druck nicht stabilisiert werden und zeigten bei Temperaturen über 100°C keine Aktivität mehr. Außerdem setzte die käufliche Endoglucanase keine Glukose-Monomere frei und ist deshalb ungeeignet. Ebenso konnte keiner der verwendeten Enzym-Komplexe eine höhere Aktivität im Druck-Reaktor aufweisen.

Bei Temperaturen über 100°C konnte bei keinem der anderen verwendeten Enzyme noch eine Aktivität festgestellt werden. Temperaturen unter 100°C sind wiederum zu niedrig, um das Roggenstroh thermisch aufzuschließen und für die Enzyme zugänglich zu machen.

Eine kombinierte thermisch-enzymatische Hydrolyse von Roggenstroh ist demnach mit den untersuchten Enzymsystemen nicht effizient.

Versuche mit den Xylanasen aus *Aspergillus brasiliensis* zeigten jedoch, dass es zu einer Stabilisierung der Enzyme und damit zu höheren Restaktivitäten kam, je höher der Druck ist. Dies führte jedoch nicht zu einem besseren Umsatz des Roggenstrohs (Abb. 28).

Dafür wurde im Batch-Reaktor in einem HPLC-Gefäß 1 mL Probe von Roggenstroh-Hydrolysat mit 32 U des Xylanase-Komplexes aus *Aspergillus brasiliensis* versetzt. Der Versuch lief 60 Minuten bei 80°C unter jeweils variierendem Druck. Anschließend wurde die Restaktivität des Xylanasekomplexes gemessen. Abb. 28 zeigt wie viel Restaktivität der Enzyme noch vorhanden war.



**Abb. 28:** Restaktivität des Xylanasekomplexes aus *A. brasiliensis* in Abhängigkeit vom angelegten Druck. Eingesetzt wurden jeweils 32 U pro Ansatz.

Es ist sehr deutlich zu erkennen, dass der Enzymkomplex mit Druck stabilisiert werden konnte. Je höher der angelegte Druck war, desto höher war auch die Restaktivität, die nach dem Versuch bestimmt wurde. Während bei 0 bar keine Aktivität mehr vorhanden war, konnten bei 100 bar noch 2,7 U gemessen werden (8,44% Restaktivität). Höhere Drücke konnten leider nicht untersucht werden, weil der Reaktor nur für einen Druck bis 100 bar ausgelegt war.

### 3.3.3 Separate thermische und enzymatische Hydrolyse

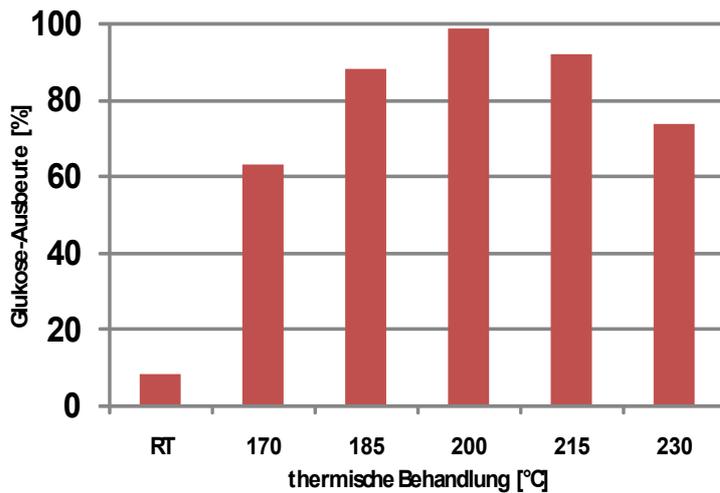
Es konnte gezeigt werden, dass eine thermische Hydrolyse mit anschließender enzymatischer Hydrolyse die höchste Ausbeute an Monosacchariden lieferte. Dafür wurde der Cellulase-Komplex aus *P. janthinellum* V39 für den Cellulose-Abbau verwendet und der Xylanase-Komplex aus *A. brasiliensis* für den Abbau der Hemicellulose.

Um die geeignetsten Bedingungen der thermischen Vorbehandlung zu ermitteln, wurde Roggenstroh bei Temperaturen von 170-230°C im Festbettreaktor thermisch aufgeschlossen. Bei diesen Temperaturen ging die Hemicellulose in Lösung während die Cellulose weiterhin als Feststoff vorlag (Abb. 16). Es entstanden demnach eine flüssige Fraktion, in der die Xylane der Hemicellulose gelöst vorlagen, und eine feste Fraktion, die die Cellulose enthielt. Abbauprodukte wie HMF oder Furfuraldehyd traten bei diesen Bedingungen nur in geringen, nicht bestimmbar Mengen (<50 mg/L) auf.

Die beiden Fraktionen wurden getrennt voneinander mit dem Enzym-System aus *Penicillium janthinellum* V39 behandelt. Die festen Fraktionen des thermisch aufgeschlossenen Roggenstrohs wurden in Universalpuffer mit einem pH von 4,0 aufgenommen und 30 Stunden bei 50°C mit dem Cellulasekomplex aus *P. janthinellum* inkubiert. Die flüssige Fraktion, die die gelösten Xylane enthielt, wurde unverändert eingesetzt. Der pH-Wert lag bei ca. 4,0.

Dabei stellte sich heraus, dass die Enzyme sehr gut für den Abbau der Cellulose geeignet sind (Abb. 29), auf den gelösten Xylanen der Hemicellulose zeigten sie jedoch wenig Aktivität. Es konnten nur 59% der Xylane umgesetzt werden. Deswegen wurde für den Hemicellulose-Abbau der Xylanase-Komplex von *Aspergillus brasiliensis* verwendet.

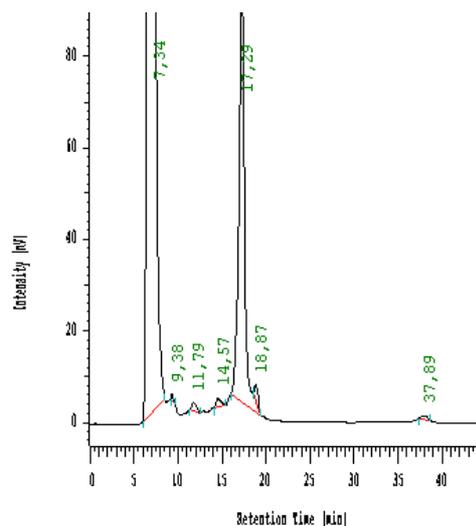
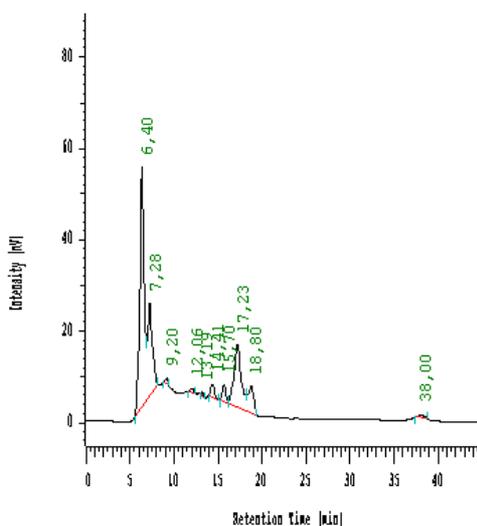
Abb. 29 zeigt, dass eine thermische Vorbehandlung von 200°C am besten geeignet war, um eine möglichst hohe Glukose-Ausbeute zu erzielen. Mit 98,7% konnte fast die komplette Cellulose in Glukose umgewandelt werden.



**Abb. 29:** Glukose-Ausbeute [%] nach enzymatischem Abbau der thermisch aufgeschlossenen Cellulose-Fraktion mit dem Cellulase-Komplex aus *P. janthinellum* V39 (RT = Raumtemperatur)

Im Vergleich zu der bei Raumtemperatur (RT) behandelten Probe ist zu erkennen, dass eine thermische Vorbehandlung unumgänglich ist.

Die flüssigen Fraktionen des thermisch aufgeschlossenen Roggenstrohs wurden mit dem Xylanase-Komplex aus *Aspergillus brasiliensis* bei 75°C für 20 Stunden inkubiert. Es stellte sich heraus, dass auch für die Xylose-Ausbeute eine Vorbehandlung von 200°C am geeignetsten ist. 99,7% der im Hydrolysat in Form von Oligosacchariden gelösten Xylose konnte nach der Behandlung als Monomer wiedergefunden werden (siehe Abb. 30 und Abb. 31). Die Xylose hat eine Retentionszeit von 17,23 Minuten in Abb. 30 und 17,29 Minuten in Abb. 31. Der starke Peak in Abb. 31 mit einer Retentionszeit von 7,34 Minuten ist auf das Protein (Enzym) zurückzuführen.



**Abb. 30:** Chromatogramm: flüssige Fraktion des bei 200°C thermisch behandeltem Roggenstroh

**Abb. 31:** Chromatogramm: flüssige Fraktion des bei 200°C thermisch behandeltem Roggenstroh nach enzymatischer Behandlung mit dem Xylanasekomplex aus *A. brasiliensis*

In Abb. 30 ist außerdem zu erkennen, dass eine thermische Behandlung bei 200°C einen sehr kleinen Peak bei einer Retentionszeit von 38,00 Minuten zeigt. Dabei handelt es sich um Furfural. Die Menge ist jedoch so gering (< 50 mg/L), dass sie analytisch nicht genau bestimmt werden konnte und stellt kein Problem für die weiteren Versuche dar.

Auf Grund der Tatsache, dass die Ausbeuten an Glukose (98,7%) und Xylose (99,7%) bei der Verwendung von nativen Enzymkomplexen aus *P. janthinellum* V39 und *A. brasiliensis* kaum noch zu steigern sind, konnte auf die Klonierung von Cellulasen und Xylanasen verzichtet werden.

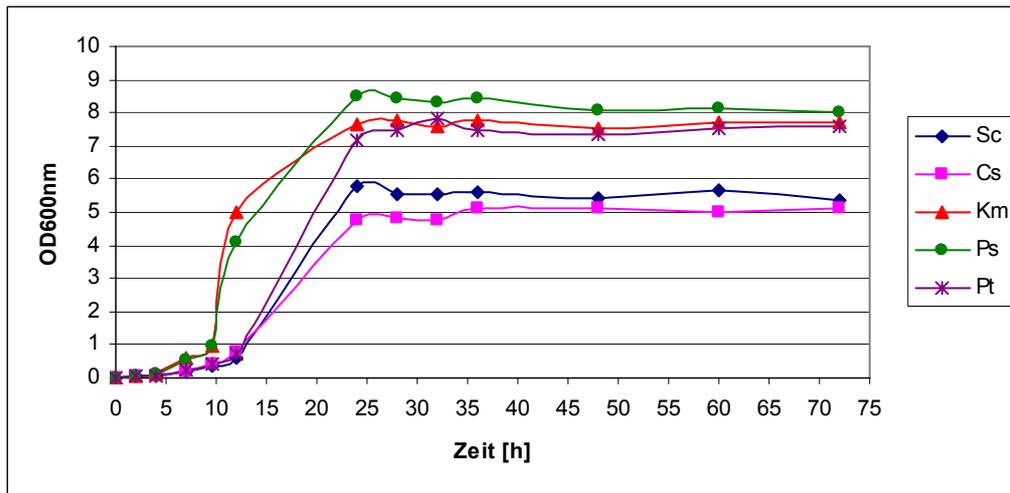
Insgesamt konnten 96% der Xylane und 92% der Glukane, die ursprünglich im Roggenstroh enthalten sind, zu den Monosacchariden Xylose und Glukose umgesetzt werden.

### 3.4 Ethanolische Gärung

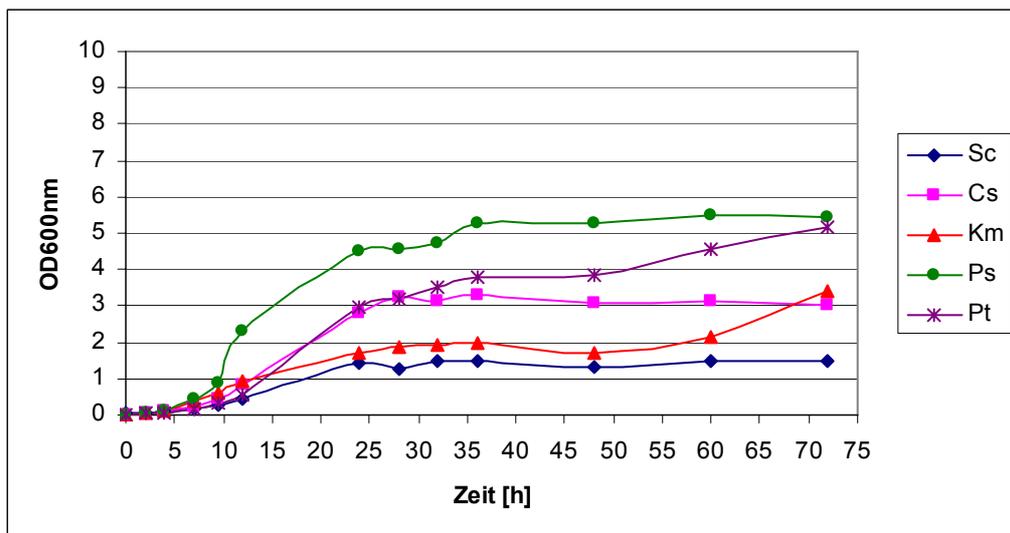
#### 3.4.1 Xylose-fermentierende Hefen

Bei der thermisch/enzymatischen Hydrolyse des Roggenstrohs wurde neben Glukose auch Xylose freigesetzt, die von Pentose-fermentierenden Hefen zu Ethanol umgesetzt werden kann. Da das Substrat Roggenstroh 20% Xylose enthält, wurde zur Steigerung der Ethanol-Ausbeute neben der Vergärung von Glukose durch *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) die Vergärung von Xylose durch Pentose-fermentierende Hefen im Institut für Technische Mikrobiologie untersucht. Für die Fermentation von Xylose wurden die Hefen *Pichia stipitis* (Ps), *Candida shehatae* (Cs), *Pachysolen tannophilus* (Pt) und *Kluyveromyces marxianus* (Km) ausgewählt und es wurde untersucht, ob diese Hefen neben Glukose auch Xylose für die Ethanolproduktion nutzen. Im Anschluss daran wurde getestet werden, ob die Xylose-fermentierenden Hefen durch eine Co-Fermentation mit *S. cerevisiae* die bei der thermischen bzw. thermisch-enzymatischen Hydrolyse freigesetzte Xylose zu Ethanol umsetzen können.

Fermentationen zur Untersuchung des Wachstums auf Glukose bzw. Xylose wurden im Labormaßstab durchgeführt und mittels photometrischen Messungen analysiert (Abb. 32 und Abb. 33). Vergleicht man die beiden Abbildungen, ist zu erkennen, dass alle fünf Hefestämme auf Glukose besser wuchsen als auf Xylose. *Pichia stipitis* zeigte sowohl auf Glukose als auch auf Xylose das beste Wachstum.

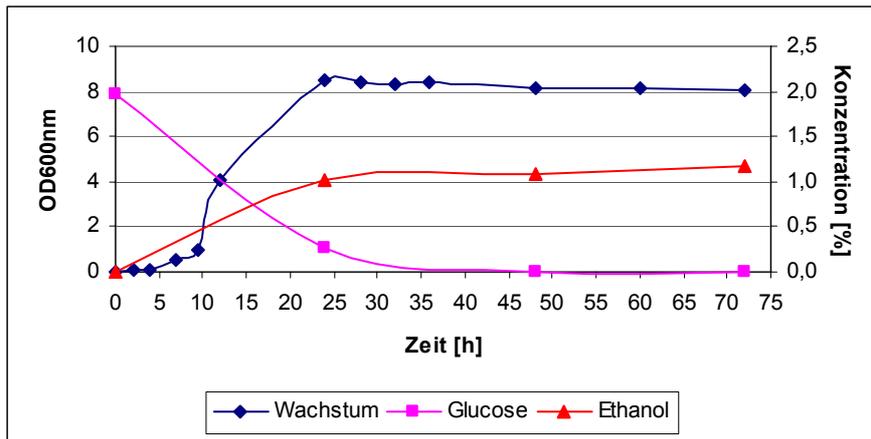


**Abb. 32:** Wachstum der Hefen in Komplexmedium (2% Glukose, pH 5, 30°C)

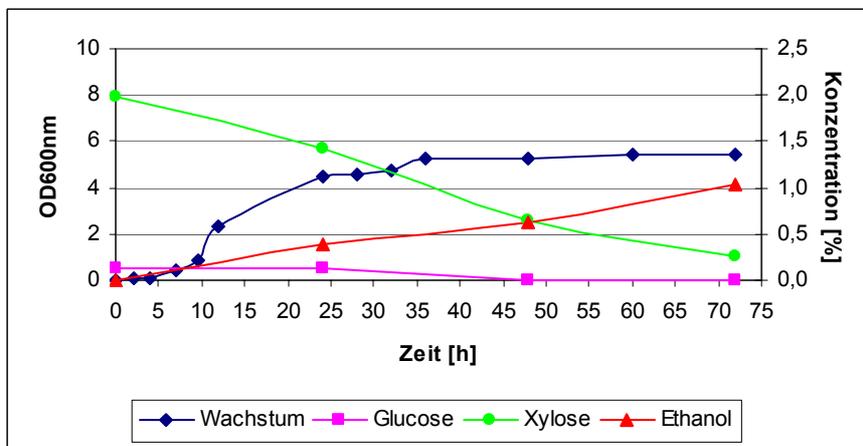


**Abb. 33:** Wachstum der Hefen in Komplexmedium (2% Xylose, pH 5, 30°C)

Des weiteren wurde die Vergärung von Glukose und Xylose und die Produktion von Ethanol durch *Pichia stipitis* untersucht und mittels HPLC analysiert (Abb. 34 und Abb. 35). Bei einer Anzucht auf Glukose wurde das Wachstumsmaximum nach ca. 24 Stunden erreicht und blieb dann konstant bei einem Wert von ca. 8 (Optische-Dichte-Messung bei  $\lambda = 600$  nm). Auch bei der Anzucht auf Xylose war nach ca. 24 Stunden das Wachstumsmaximum erreicht, allerdings lag dieses nur bei einem Wert von ca. 5,5 ( $OD_{600}$ ). Die Ethanolkonzentration lag bei einer Anzucht auf Glukose nach 24 Stunden bei ca. 1% und stieg nicht weiter an, auch bei der Anzucht auf Xylose konnte der Wert von 1% erreicht werden, allerdings erst nach 72 Stunden.



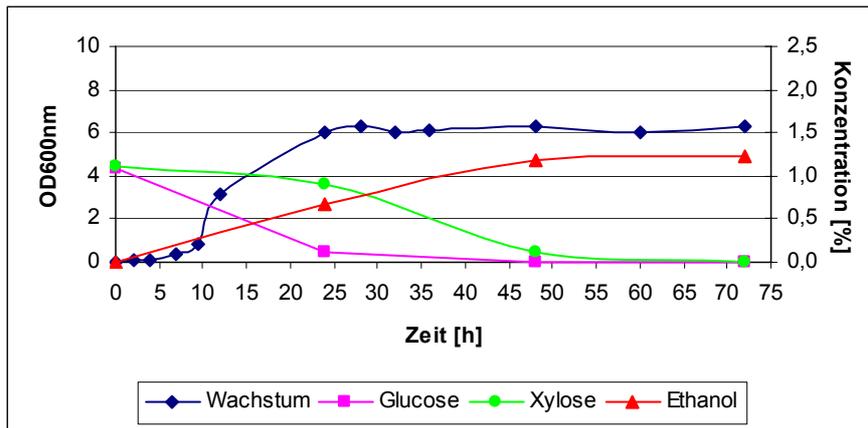
**Abb. 34:** Grafische Darstellung der Parameter Wachstum, Zucker und Ethanol-Konzentration von *P. stipitis* in Komplexmedium (2% Glukose, pH 5, 30°C)



**Abb. 35:** Grafische Darstellung der Parameter Wachstum, Zucker und Ethanol-Konzentration von *P. stipitis* in Komplexmedium (2% Xylose, pH 5, 30°C)

Es konnte gezeigt werden, dass *P. stipitis* Xylose effektiv zu Ethanol vergären kann. Dabei waren die Wachstumsraten sogar besser als die von *S. cerevisiae* und den anderen drei Hefestämmen.

In einem weiteren Gärungsversuch wurde *P. stipitis* in einem Medium angezogen, das sowohl Xylose als auch Glukose enthielt. In Abb. 36 ist zu sehen, dass erst Glukose abgebaut wurde und anschließend, wenn diese verbraucht ist, die Xylose umgesetzt wurde. *P. stipitis* ist demnach gut geeignet, die Monosaccharide Xylose und Glukose, die bei der Hydrolyse von Roggenstroh entstehen, zu Ethanol umzuwandeln.



**Abb. 36:** Grafische Darstellung der Parameter Wachstum, Zucker und Ethanol von *P. stipitis* in Komplexmedium (1% Glukose + 1% Xylose, pH 5, 30°C)

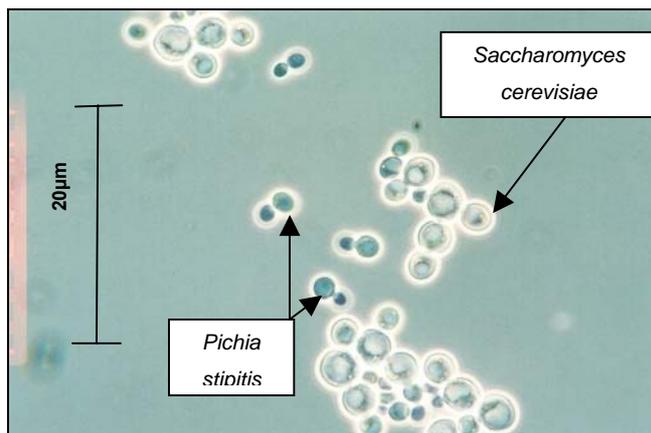
Auch das Fermentationsverhalten von vier weiteren Hefen wurde getestet (Tab. 8). Sowohl beim Wachstum als auch bei der Ethanolproduktion zeigte *Pichia stipitis* im Vergleich zu den anderen Hefe Stämmen die höchsten Werte, wenn 1% Glukose und 1% Xylose im Medium vorlagen (Werte gelb unterlegt)

**Tab. 8:** Übersicht über das Fermentationsverhalten der Hefen in Komplexmedium (1% Glukose + 1% Xylose, pH 5, 30°C), (Ausbeute = EtOH/ verbrauchten Zucker)

|                           | <i>S. cerevisiae</i>  |      |      |      | <i>C. shehatae</i> |      |      |      | <i>K. marxianus</i> |      |      |      |
|---------------------------|-----------------------|------|------|------|--------------------|------|------|------|---------------------|------|------|------|
| <b>Zeit [h]</b>           | 0                     | 24   | 48   | 72   | 0                  | 24   | 48   | 72   | 0                   | 24   | 48   | 72   |
| <b>OD<sub>600nm</sub></b> | 0,04                  | 3,71 | 3,44 | 3,65 | 0,03               | 4,02 | 4,12 | 4,53 | 0,04                | 4,79 | 5,00 | 5,01 |
| <b>Glukose-Konz. [%]</b>  | 1,08                  | 0    | 0    | 0    | 1,05               | 0    | 0    | 0    | 1,05                | 0    | 0    | 0    |
| <b>Xylose-Konz. [%]</b>   | 1,07                  | 1,05 | 0,91 | 0,86 | 1,06               | 1,02 | 0,80 | 0,76 | 1,06                | 1,06 | 0,85 | 0,84 |
| <b>Ethanol-Konz. [%]</b>  | 0                     | 0,68 | 0,60 | 0,58 | 0                  | 0,60 | 0,51 | 0,50 | 0                   | 0,53 | 0,43 | 0,43 |
| <b>Ausbeute</b>           | -                     | 0,62 | 0,48 | 0,45 | -                  | 0,55 | 0,39 | 0,37 | -                   | 0,51 | 0,34 | 0,34 |
|                           | <i>P. tannophilus</i> |      |      |      | <i>P. stipitis</i> |      |      |      |                     |      |      |      |
| <b>Zeit [h]</b>           | 0                     | 24   | 48   | 72   | 0                  | 24   | 48   | 72   |                     |      |      |      |
| <b>OD<sub>600nm</sub></b> | 0,03                  | 5,69 | 5,47 | 5,29 | 0,04               | 6,05 | 6,26 | 6,3  |                     |      |      |      |
| <b>Glukose-Konz. [%]</b>  | 1,06                  | 0    | 0    | 0    | 1,08               | 0,02 | 0    | 0    |                     |      |      |      |
| <b>Xylose-Konz. [%]</b>   | 1,06                  | 1,10 | 0,86 | 0,92 | 1,12               | 0,90 | 0,12 | 0    |                     |      |      |      |
| <b>Ethanol-Konz. [%]</b>  | 0                     | 0,61 | 0,48 | 0,51 | 0                  | 0,67 | 1,18 | 1,24 |                     |      |      |      |
| <b>Ausbeute</b>           | -                     | 0,6  | 0,38 | 0,43 | -                  | 0,52 | 0,56 | 0,56 |                     |      |      |      |

Es wurde getestet, ob eine Co-Fermentation mit *S. cerevisiae* und den Xylose-fermentierenden Hefen die Ausbeute an Ethanol erhöht.

In Abb. 37 sind Zellen von *P. stipitis* und *S. cerevisiae* in einer Co-Fermentation zu erkennen.



**Abb. 37:** Hefezellen von *S. cerevisiae* und *P. stipitis* in einer Co-Fermentation

In Tab. 9 sind die Ergebnisse der Co-Fermentationen zusammen gefasst. Beim Vergleich der Ethanol ausbeuten mit denen der Xylose-fermentierenden Hefen in der Einzelfermentation

Tab. 8) ist zu erkennen, dass diese vergleichbar sind.

**Tab. 9:** Übersicht über das Co-Fermentationsverhalten der Hefen im definierten Medium mit 0,3% Hefeextrakt (1% Glc + 1% Xyl, pH 5, 30°C), (Ausbeute = EtOH/ verbrauchten Zucker)

|                           | <i>S. cerevisiae/<br/>C. shehatae</i>    |      |      |      | <i>S. cerevisiae/<br/>K. marxianus</i> |      |      |      |
|---------------------------|--|------|------|------|--|------|------|------|
| <b>Zeit [h]</b>           | 0  | 24   | 48   | 72   | 0                                      | 24   | 48   | 72   |
| <b>OD<sub>600nm</sub></b> | 0,01                                     | 2,8  | 3,1  | 2,95 | 0,03                                   | 4,21 | 3,91 | 4,2  |
| <b>Glukose-Konz. [%]</b>  | 0,91                                     | 0    | 0    | 0    | 0,94                                   | 0,16 | 0    | 0    |
| <b>Xylose-Konz. [%]</b>   | 0,94                                     | 0,97 | 0,76 | 0,74 | 1,02                                   | 1,15 | 0,99 | 1,04 |
| <b>Ethanol-Konz. [%]</b>  | 0  | 0,6  | 0,5  | 0,48 | 0                                      | 0,45 | 0,45 | 0,51 |
| <b>Ausbeute</b>           | -  | 0,68 | 0,42 | 0,4  | -                                      | 0,69 | 0,46 | 0,55 |
|                           | <i>S. cerevisiae/<br/>P. tannophilus</i> |      |      |      | <i>S. cerevisiae/<br/>P. stipitis</i>  |      |      |      |
| <b>Zeit [h]</b>           | 0  | 24   | 48   | 72   | 0                                      | 24   | 48   | 72   |
| <b>OD<sub>600nm</sub></b> | 0,01                                     | 2,8  | 3,03 | 3,3  | 0,05                                   | 4,23 | 4,49 | 4,81 |
| <b>Glukose-Konz. [%]</b>  | 0,95                                     | 0    | 0    | 0    | 0,97                                   | 0    | 0    | 0    |
| <b>Xylose-Konz. [%]</b>   | 0,97                                     | 1,06 | 0,85 | 0,84 | 0,99                                   | 0,89 | 0,34 | 0,06 |
| <b>Ethanol-Konz. [%]</b>  | 0  | 0,59 | 0,51 | 0,55 | 0                                      | 0,69 | 0,89 | 1,17 |
| <b>Ausbeute</b>           | -  | 0,69 | 0,48 | 0,51 | -                                      | 0,65 | 0,55 | 0,62 |

Es konnte gezeigt werden, dass der Hefestamm *Pichia stipitis* sehr gut für die Fermentation von Glukose und Xylose geeignet ist. Sowohl bei Wachstum auf Glukose als auch bei der Ethanol-Ausbeute wies *P. stipitis* bessere Werte auf als *S. cerevisiae*, außerdem war *P. stipitis* in der Lage – nachdem Glukose abgebaut wurde – die komplette Xylose zusätzlich zu Ethanol umzusetzen. Eine Co-Fermentation mit *S. cerevisiae* brachte dabei keine Vorteile.

#### 4 Ökologische Relevanz des Projekts

Die ökologische und ökonomische Analyse des angestrebten Verfahrens wurde durch Herrn Prof. Dr.-Ing. Kaltschmitt vom Institut für Energetik und Umwelt (TUHH) durchgeführt (siehe Anhang).

Um die ökologischen Auswirkungen und Herstellungskosten einer Bioethanolproduktion aus Stroh zu untersuchen und einzuordnen, wurden 4 unterschiedliche Konzepte untersucht. Sie unterscheiden sich in den eingesetzten Rohstoffen (Melasse, Weizen und Stroh) und in der verfahrenstechnischen Ausgestaltung (u.a. Anlagengröße, Reststoffverwertung, Energiebereitstellung). Die Untersuchung hat gezeigt, dass innovative Verfahren zur Herstellung von Bioethanol aus Stroh gegenüber den heutigen Verfahren zwar noch keine ökonomischen Vorteile haben, sehr wohl jedoch den Aufwand an nichtregenerativer Primärenergie und die Treibhausgasemissionen verringern können. Dies geht auch aus Abb. 38 hervor, in der die THG-Emissionen der betrachteten Konzepte im Vergleich zu fossilen Kraftstoffen dargestellt sind. Auffällig sind die niedrigen THG-Emissionen aus dem Anlagenbetrieb für landwirtschaftliche (d.h. dezentrale) Produktion aus Weizen und das strohbasierte Konzept. Zu erklären ist dies mit dem Einsatz von regenerativer Energie aus Biomasse für die Prozessbereitstellung, während im Melasseverfahren und bei Weizenanlagen in industriellem Maßstab fossile Brennstoffe eingesetzt werden. So verringern sich die direkten betriebsbedingten THG-Emissionen. Wenn neben der Wärmebereitstellung für die Anlage auch Strom aus Kraft-Wärme-Kopplung ins Netz eingespeist wird, kann dies über eine Gutschrift berücksichtigt werden, die in Abb. 38 in gelb aufgetragen ist. Sie enthält auch Gutschriften für andere Nebenprodukte wie z.B. DDGS, die herkömmliche Produkte wie z.B. Soja-Futter teilweise ersetzen.

Neben fossilem Energieaufwand und Treibhausgasemissionen wurden noch versauernd wirkende Emissionen in  $\text{SO}_2$ -Äquivalenten berechnet. Die Bioethanolproduktion zeigt keine Vorteilhaftigkeit gegenüber fossilen Kraftstoffen, was vor allem mit der versauernden Wirkung der bei der Düngung zu erklären ist.

Insgesamt ist zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse einer Ökobilanz immer fallspezifisch sind und stark von den Gegebenheiten an der jeweiligen Anlage abhängen. So hat z.B. die Wahl von Kohle oder Erdgas für die Prozessenergiebereitstellung einen großen Einfluss auf das Ergebnis der Klimagasbilanz.

Aus der Analyse geht hervor, dass das Verfahren zur Herstellung von Bioethanol aus Stroh – gegenüber den heutigen Verfahren – die Klimabilanz stark verbessern kann. Die Klimagasemissionen bei der Herstellung von Bioethanol aus Stroh sind wesentlich niedriger verglichen mit denen aus Melasse oder Getreide. Die spezifische Klimagasemission in  $\text{CO}_2$ -

Äquivalenten liegt bei einer Verwendung von Stroh bei 8 kg/GJ, im Fall von Melasse werden 49 kg/GJ emittiert und bei einer Verwendung von Weizen sogar 85 kg/GJ.

Für eine ökonomische Vorteilhaftigkeit müssen die Kosten jedoch weiter gesenkt werden. Die Gestehungskosten der Ethanolproduktion aus Stroh liegen bei 0,64 € während der Produktpreis für Benzin (2007-05/2008) bei 0,40 € lag.



**Abb. 38:** Treibhausgasemissionen untersuchter Konzepte in CO<sub>2</sub>-Äquivalenten je GJ Kraftstoff

## 5 Technischer und wirtschaftlicher Nutzen

Für die Industriepartner haben sich die folgenden positiven Effekte aus dem Projekt ergeben:

SternEnzym (SE) war es durch das Projekt möglich, die Kompetenz im Bereich der Verwertung pflanzlicher Rohstoffe deutlich zu erhöhen. Gleichzeitig ergaben sich innerhalb der Projektgruppe Gelegenheiten zum „Networking“ mit Unternehmen, zu denen SE anderenfalls keinen Kontakt gefunden hätte. Während der Laufzeit des Projektes kam es ferner zur Anbahnung von Geschäften, bei denen Alkoholproduktionsanlagen unter Beteiligung von SE neu installiert werden bzw. verlagert werden sollen (letzteres ist noch in der Vorbereitung). Diesen Kunden sollen auch die Erkenntnisse des Projektes vorgestellt werden, um eine Prüfung eines Teils der Ergebnisse im industriellen Maßstab zu erreichen.

Die Firma Mothes hat bereits die Erfahrungen mit der Verarbeitung faseriger Rohstoffe in eine industrielle Hochdruckanlage, die derzeit errichtet wird, einfließen lassen.

Durch Publikationen aus dem Projekt hat sich die Außendarstellung der beteiligten Industriepartner verbessert, indem Kompetenz auf dem Gebiet der Lignocelluloseverwertung gezeigt wurde.

Die im Rahmen des Projektes entwickelte Cellulase aus *Penicillium janthinellum* übertrifft sowohl in den Haupt- als auch in den Nebenaktivitäten bisher verfügbare Vergleichspäparate sehr deutlich (z.B. ca. 2.5-fach bei der Cellulaseaktivität bei pH 4.5). Sie bietet damit das Potential zur Herstellung einer "eigenen" Cellulase für eine Reihe von Anwendungen auch außerhalb der „Bio-Ethanol“-Gewinnung:

- Trinkalkohol: Verringerung der Viskosität der Maischen und Ausbeuteerhöhung
- Biogas: Ausbeuteerhöhung
- Pulp & Paper: Glättung der Fasern, verbesserte Aufbereitung von Altpapier (Tonarentfernung)
- Textilverarbeitung, „Stonewashing“: Faserschonung im sauren pH-Bereich
- Silage: Beschleunigte Reifung, verbesserte Verdaulichkeit
- Stärkeindustrie: Verringerung der Viskosität, verbesserte Stärke- und Proteinextraktion
- Fruchtsaft: Erhöhung der Ausbeute, Trubstabilisierung
- Pflanzenextraktion (Sekundärmetabolite): Ausbeuteerhöhung
- Backen: Verbesserung der sensorischen Eigenschaften, insbesondere von Vollkorn-Dauerbackwaren; Verringerung der Wasseraufnahme und infolgedessen Energieeinsparung bei der Knäckebrot- und Waffelherstellung; sowie Verbesserung der Teig-

verarbeitungseigenschaften bei der Brot- und Brötchenherstellung („Teigtrocknung“ bei niedrigen Enzymzugabemengen)

Daher wird eine kommerzielle Herstellung in Eigenregie bei einem Kontraktpartner der SE geprüft.

## **6 Diskussion und Fazit**

Die Versuchsanlage für die kontinuierliche Hydrolyse in Wasser unter erhöhten Drücken und Temperaturen konnte im Institut für Thermische Verfahrenstechnik erfolgreich aufgebaut und betrieben werden. Am Beispiel von Roggenstroh und Roggensilage sind zahlreiche Versuche durchgeführt worden, deren Ergebnisse unverzichtbare Erkenntnisse bezüglich der weiteren Untersuchungen lieferten.

Die zeitlich getrennte thermische und enzymatische Hydrolyse liefert sehr gute Ergebnisse, wobei die Ausbeute an Glukose bei 98,7% und die Ausbeute an Xylose bei 99,7% liegt.

Die Enzymsysteme aus *Penicillium janthinellum* V39 und *Aspergillus brasiliensis* sind somit für den Abbau von Roggenstroh bestmöglich geeignet.

Damit konnte ein Verfahren erarbeitet werden, dass ohne den Einsatz von Chemikalien einen Umsatz der Polysaccharide des Roggenstrohs zu Monosacchariden zu fast 100% gewährleistet.

Die kombinierte thermisch-enzymatische Hydrolyse liefert keine Verbesserung der Enzymaktivitäten beim Abbau des Roggenstrohs. Zwar können die Enzyme durch Druck stabilisiert werden und zeigen Aktivität über einen längeren Zeitraum, der Abbau des Roggenstrohs ist jedoch schlechter als bei der zeitlich getrennten Hydrolyse. Der Grund hierfür sind die relativ niedrigen Temperaturen (< 100°C), die das Stroh nicht ausreichend zugänglich für die Enzyme machen und für die Enzyme teilweise schon zu hoch sind.

Die im Projektantrag vermerkten Meilensteine sind erreicht worden.

## 7 Soll/Ist-Vergleich

|  | Quartal |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|--|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
|  | 1       | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| <b>Hydrothermischer Aufschluss</b>   |         |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
| Analyse der Biomassezusammensetzung  | ✓       |   |   |   |   |   | ✓ | ✓ | ✓ | ✓  |
| Parametervariation (T, pH, p)  | ✓       | ✓ | ✓ | ✓ |   |   |   |   | ✓ | ✓  |
| Vergleich der bestehenden Verfahren  |         |   |   | ✓ |   |   |   |   |   |    |
| <b>Extremozym-Hochtemperatur-Verfahren</b>   |         |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
| Identifizierung geeigneter Enzymsysteme  | ✓       |   |   |   | ✓ | ✓ |   |   | ✓ | ✓  |
| Herstellung von thermostabilen Enzympräparaten                                       |         | ✓ | ✓ |   | ✓ | ✓ |   |   | ✓ | ✓  |
| Stabilitätsanalyse der Enzyme im Reaktor bei verschiedenen Bedingungen (T, p, pH, t) |         |   | ✓ | ✓ |   |   |   |   |   | ✓  |
| Parametervariation, Einsatz der Enzyme im Reaktor                                    |         |   |   | ✓ |   |   |   |   |   | ✓  |
| <b>Enzymatischer Aufschluss</b>  |         |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
| Testung des Enzymsystems aus <i>P. janthinellum</i> (Wildtyp und Mutanten)           | ✓       | ✓ | ✓ |   |   |   | ✓ | ✓ |   |    |
| Fermentationsoptimierung   |         | ✓ | ✓ | ✓ |   |   |   |   |   |    |
| Reinigung und Charakterisierung der Enzymkomponenten aus Pilzen                      | ✓       | ✓ | ✓ | ✓ |   |   |   |   | ✓ | ✓  |
| Bestimmung der optimalen Enzymmischung   |         |   |   | ✓ |   |   |   |   | ✓ | ✓  |
| <b>Ethanolische Gärung</b>   |         |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
| Testfermentation mit Hydrolysaten  |         |   | ✓ | ✓ |   |   |   |   |   |    |

## 8 Öffentlichkeitsarbeit

Die im Rahmen der Arbeit erzielten Ergebnisse wurden auf verschiedenen internationalen Tagungen in Form von Vorträgen oder Postern präsentiert. Diese Tagungsbeiträge stehen entweder im unmittelbaren Zusammenhang mit dem DBU-Projekt „Bioethanol“ oder gehören einem naheverwandten Themengebiet an.

Brunner G, Albrecht T: Conversion of Lignocellulosic Materials and Model Compounds in Sub- and Supercritical Water, in: Proceedings of the 8th International Symposium on Supercritical Fluids, Kyoto, Japan, 5-8 Nov **2006**

Schacht C, Zetzel C, Brunner G: Continuous Liquid-Hot-Water Treatment of Rice Bran and the Production of pure Ethanol by Means of Enzymatic Conversion and SFE, in: Proceedings of the 1st Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids, Iguassu, Brazil, 10-13 Apr **2007**

Zetzel C, Patil V, Budich M, Brunner G: One Step Purification to Absolute Alcohol from Sugar Cane Molasse by Means of Supercritical CO<sub>2</sub>, in: Proceedings of the 1st Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids, Iguassu, Brazil, 10-13 Apr **2007**

Rogalinski T, Liu K, Albrecht T, Brunner G: Hydrolysis Kinetics of Biopolymers in Subcritical Water, in: Proceedings of the 5th International Symposium on High Pressure Process Technology and Chemical Engineering, Segovia, Spain, 24-27 June **2007**

Brunner G: From Plant Materials to Ethanol by Means of Supercritical Fluid Technology, in: Proceedings of the 5th International Symposium on High Pressure Process Technology and Chemical Engineering, Segovia, Spain, 24-27 June **2007**

Katzer M, Stößer N, Minow B, Antranikian G: Microbial community genomics (Microcomgenomics) for discovery of novel cellulases. (Poster) VAAM Tagung, Osnabrück, 01.-04. April **2007**

Piela B, Antranikian G: Novel thermoactive cellulases from the anaerobic thermophilic bacteria *Anaerobranca gottschalkii* and *Fervidobacterium gondwanense*. (Vortrag) VAAM Tagung, Osnabrück, 01.-04 April **2007**

Bockemühl V, Rogalinski T, Ingram T, Popper L, Brunner G, Antranikian G: Bioconversion of rye straw at elevated temperatures. (Poster) VAAM Tagung, Frankfurt, 09.-11. März **2008** (VAAM Posterpreis)

Müller K, Piela B, Bockemühl V, Antranikian G: Bioethanol production from rye straw by *Pichia stipitis*. (Poster) VAAM Tagung, Frankfurt, 09.-11. März **2008**

Rogalinski T., Ingram T., Zetzl C., Bockemühl V., Antranikian G., Brunner G.: Aufschluss von Lignocellulose mit heißem Wasser, CO<sub>2</sub> und Enzymen (Lecture). High Pressure meets Advanced Fluids (DECHEMA), Aachen, Germany **2008**

Ingram T., Rogalinski T., Bockemühl V., Popper L., Antranikian G., Brunner G.: Combined Thermal and Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass (Poster). International Congress on Biocatalysis, Hamburg, Germany **2008**

Rogalinski T., Ingram T., Zetzl C., Bockemühl V., Antranikian G., Brunner G.: Aufschluss von Lignocellulose mit heißem Wasser, CO<sub>2</sub> und Enzymen. (Poster) ProcessNet-Jahrestagung, Karlsruhe 07.-09. Oktober **2008** (ProcessNet Posterpreis)

Rogalinski T., Ingram T., Brunner G.: Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass in Water under Elevated Temperatures and Pressures. Journal of Supercritical Fluids, Volume 47, Issue 1, Pages 54-63, November **2008**

Bockemühl V., Ingram T., Rogalinski T., Popper L., Brunner G., Antranikian G.: Bioconversion of rye straw at elevated temperatures. (Poster) Biorefinica 2009, Osnabrück 27.-28. Januar **2009**

Bockemühl V., Ingram T., Hahn F., Popper L., Smirnova I., Brunner G., Antranikian G.: Bioconversion of rye straw at elevated temperatures. (Poster) VAAM Jahrestagung, Bochum, 08.-11. März **2009**

Ingram T., Rogalinski T., Bockemühl V., Antranikian G., Brunner G.: Semi-Continuous Liquid Hot Water Pretreatment of Rye Straw. Journal of Supercritical Fluids, Volume 48, Issue 3, Pages 238-246, April **2009**

## 9 Literatur

- [1] (2006) DBU Projektantrag "Bioethanol", AZ 131157
- [2] Europäische Union Amtsblatt: Richtlinie 2003/30/EG des Europäischen Parlaments zur Förderung der Verwendung von Biokraftstoffen oder anderen erneuerbaren Kraftstoffen im Verkehrssektor.
- [3] Waffenschmidt, S. and Jaenicke, L. (1987) Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2'-bicinchoninate. *Analytical biochemistry* 165, 337-340.
- [4] Kayser, T. and Schulz, G. (1991) Electrophoretic karyotype of cellulolytic *Penicillium janthinellum* strains. *Current genetics* 20, 289-291.
- [5] Schulz, G. and Hirte, W. (1989) Phenotypic optimization studies on cellulase production by a selected *Penicillium janthinellum* strain. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 443-464.
- [6] Schulz, G., Hirte, W., Jacobplan, V. and Philipp, B. (1986) Sorption von Cellulase an Weizenstroh und seine Komponenten. *Acta Biotechnologica* 259-264.
- [7] Mandels, M., Andreotti, R. and Roche, C. (1976) Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and bioengineering symposium* 21-33.
- [8] Ghoste, T.K. (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.* 257-268.
- [9] Misch, B. (2001) Reinigung mischkontaminierter Bodenmaterialien und kontinuierliche Extraktion von Feststoffen mit überkritischen Fluiden. Dissertation, Technische Universität Hamburg-Harburg (2001).
- [10] Overend, R.P. and Chornet, E. (1987) Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. In: (London, P.T.o.t.R.S.o., Ed. Vol. pp. 523-536.
- [11] van Walsum, G.P. and Shi, H. (2004) Carbonic acid enhancement of hydrolysis in aqueous pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology* 217-226.
- [12] Mc Williams, R.C. and van Walsum, G.P. (2002) Comparison of Aspen Wood Hydrolysates Produced by Pretreatment with Liquid Hot Water and Carbonic Acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 109-121.
- [13] Gong, C.S., Cao, N.J., Du, J. and Tsao, G.T. (1999) Ethanol Production from Renewable Resources. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 207-241.
- [14] Jacobsen, S. and Wyman, C. (2002) Xylose monomer and oligomer yields for uncatalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse. *Industrial Engineering Chemistry Research* 1454-1461.
- [15] Allen, S.G., Kam, L.C., Zeman, A.J. and Antal, M.J. (1996) Fractionation of sugar cane with hot, compressed, liquid water. *Industrial Engineering Chemistry Research* 2709-2715.
- [16] Laser, M., Schulman, D., Allen, S.G., Lichwa, J., Antal, M.J. and R., L.L. (2002) A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology* 33-44.
- [17] Brunner, G. and Albrecht, T. (2006) Conversion of Lignocellulosic Materials and Model Compounds in Sub- and Supercritical Water. Kyoto, Japan.
- [18] Bobleter, O. (1994) Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in Polymer Science* 797-841.
- [19] Jacobsen, S. and Wyman, C. (2000) Cellulose and hemicellulose hydrolysis models for application to current and novel pretreatment processes. *Applied Biochemistry & Biotechnology* 80-96.
- [20] Guthmann, O. (1998) Aktivität und Stabilität von Enzymen unter hohem Druck und hoher Temperatur in Wasser und überkritischem Kohlendioxid.: Dissertation. In: Vol. Technische Universität Hamburg-Harburg.
- [21] Hei, D. and Clark, D. (1994) Pressure Stabilization of Protein from Extreme Thermophiles. *Applied and Environmental Microbiology* 932-939.

## 10 Anlagen

### **Conversion of Lignocellulosic Materials and Model Compounds in Sub- and Super-critical Water**

Gerd Brunner, Tobias Albrecht

Institute for Thermal and Separation Processes, Hamburg University of Technology

#### **Abstract**

The degradation of lignocellulosic biomass was studied with respect to the complete solubilisation of insoluble organic wastes in an aqueous medium. Background is the conversion of a model waste specified by the European Space Agency (ESA) in context with the development of a life support system for long-term manned missions.

Hydrothermal conversion of lignocellulosic biomass was investigated on the compounds cellulose, lignin, the complex waste specified by ESA, wheat straw, and indigestible residues from a methane reactor. Treatment was carried out continuously in a plug flow reactor at pressures from 15 to 25 MPa and at temperatures from 240 to 500°C with residence times ranging from a few seconds to three minutes. Pure lignin and lignocellulosic biomass could be liquefied by hydrolysis up to 70-80 %. Effluents were subsequently treated by biological degradation. Overall efficiency of COD removal increased to 90-95 %. No toxic effects on the microorganisms were observed. The oxidation of lignocellulose in near-critical water by hydrogen peroxide converted all carbonaceous material, mostly to gaseous products, only about 10 % of the initial carbon load remained in the aqueous phase, with the main product being acetic acid.

**Hydrolysis Kinetics of Biopolymers in Subcritical Water**

Rogalinski T., Liu K., Albrecht, T., and Brunner G.

Institute for Thermal and Separation Processes, Hamburg University of Technology

**Abstract**

The unique properties of water at elevated temperatures and pressures, namely the alterability of ionic product, dielectric constant, and density, make it an interesting and promising reaction medium. Several investigations have been made in order to obtain valuable products from biopolymers or, more general, biomass. Biopolymers can react with high temperature water in very short residence times and with high rates of conversion. The achievable products are manifold and can be varied to a large extent by changing the operating conditions. The possibilities of sub- and supercritical water can even be significantly expanded by adding a catalyst like carbon dioxide.

This work deals with the hydrolysis kinetics of different kinds of biopolymers, namely starch, cellulose (polysaccharides), and proteins (polypeptides). Kinetics was conducted over a broad range of experimental conditions using a continuous-flow reactor. In all three cases, the obtained experimental results could be described by a reaction model according to the approach of a single consecutive reaction following first order kinetics. The rate constants of the hydrolytic conversion were determined for the resulting monomers (glucose and amino acids), and the values were found to strongly depend on the type of bond. The peptide bonds in proteins exhibited a much higher stability compared to the  $\beta$ -1,4- and  $\beta$ -1,6-glycosidic linkages in cellulose and starch, respectively. The stability of the resulting monomers and their conversion to further degradation products were determined. The addition of carbon dioxide to water under hydrothermal conditions resulted in a significant increase in acid catalyzed reaction rates, which could be confirmed by the obtained rate constants.

**Semi-Continuous Liquid Hot Water Pretreatment of Rye Straw**

Thomas Ingram<sup>1</sup>, Tim Rogalinski<sup>1</sup>, Vera Bockemühl<sup>2</sup>, Garabed Antranikian<sup>2</sup>, Gerd Brunner<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hamburg University of Technology, Thermal Separation Processes,

<sup>2</sup>Hamburg University of Technology, Technical Microbiology

**Abstract**

This article is based upon the findings of our recent publication dealing with the liquid hot water (LHW) hydrolysis of lignocellulosic materials in different reactor types [1]. As an advancement of these results, semi-continuous fixed-bed reactors were constructed aiming at the efficient hydrolysis of rye straw at elevated temperatures as a pretreatment process for bioethanol production. The temperature range between 170°C and 230°C was found to be most suitable for the thermal pretreatment of rye straw. The resulting liquid hydrolyzates as well as the solid residues were enzymatically converted to monomeric sugars (xylose/glucose) using cellulases and xylanases from *Penicillium janthinellum*. 95% of the initial xylan and 92% of the glucan was converted using a pretreatment temperature of 200°C-215°C. The solubilization of the biomass in the fixed-bed reactor could be described by a reaction model following first-order kinetics. For that reason, the  $I_{max}$ -factor was introduced, which describes the maximum ratio of biomass that can be hydrolyzed at a certain temperature, related to the initial mass. The usage of a fixed-bed reactor combines several advantages compared to other reactor types, namely high solid-to-water-ratios, the prevention of degradation product formation, and considerable energy savings since no biomass comminution is necessary.

## **Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures**

Tim Rogalinski, Thomas Ingram, Gerd Brunner<sup>1</sup>

Hamburg University of Technology, Thermal Separation Processes

### **Abstract**

The hydrolysis of rye straw and rye silage in liquid previous termhot waternext term (LHW) as a pretreatment process for the utilization of lignocellulosic material (LCM) was investigated. Two different types of reactors, a batch autoclave (BA) and a continuous-flow (CF) apparatus, were used in this work. For both setups a certain time was needed to heat the reactor up to the desired temperature. The temperature profiles for both reactors were calculated and accurately predicted in order to assure comparable and defined operating conditions. For this purpose, a modified severity factor was used that accounted for the different temperatures during the heat-up phase in the reactors. The experimental results show that high degrees of biomass solubilization are possible using LHW, however, the yield of undesired degradation products increases with treatment severity as well. The particle size of the biomass and the substrate concentration seem to have no influence on the solubilization. The solubilization of rye silage seems to be easier compared to rye straw as parts of the protecting hemicellulose–lignin matrix have already been degraded by lactobacilli. The glucose formation and decomposition from rye straw were investigated using a simplified model according to the pattern of a single consecutive reaction following first-order kinetics and the results were compared to literature data dealing with the LHW treatment of starch as well as pure cellulose. Taking into consideration the advantages and disadvantages of the reactor types used, an optimal reactor concept is proposed for future investigations.

**Ethanol by Means of Supercritical Fluid Technology**

Brunner, G.

Institute for Thermal and Separation Processes, Hamburg University of Technology

**Abstract**

Plant materials, processed for recovery of valuable compounds consist of a major part of lignocellulosic material. In context with the investigation of better use of the plant material, conversion of this part to ethanol is one way to make better use of the solar energy incorporated. From the point of view of SFE technology several questions arise: Are there SFE related processes which can be applied? Can these processes be operated under commercial and competitive conditions? Do they contribute positively to the energy balance of processing plant materials? What are the target areas for application of those processes? For the target product of ethanol of > 99.8 wt. %, there are several plant material sources available. The carbohydrate compounds of these materials can be hydrolysed by near critical water. CO<sub>2</sub> dissolved in water may be used as catalyst. Hydrolysis can be favourably further enhanced by enzymatic catalysis. The product streams from the hydrolytic treatment are fermented. The resulting diluted ethanol solution is processed by multistage counter-current supercritical carbon dioxide extraction to ethanol of 99.8 wt.% concentration. Non-fermentable residues may be subjected to a second hydrolysis or transferred to a biogas production. Solid residues of the biogas reactor, in particular lignin containing fractions, can be oxidised with near and supercritical water to mainly gas and a smaller fraction of mainly short chain fatty acids, which can be reintroduced to the biogas reactor.

**Microbial Community Genomics (Microcomgenomics) for discovery of novel cellulases**

M. Katzer, N. I. Stößer, B. Minow and G. Antranikian

Institute of Technical Microbiology, Hamburg University of Technology, Hamburg, Germany

The use of microbial communities as source of genomic DNA for the construction of metagenomic libraries enables discovery of novel biocatalysts that are present in natural habitats. A combination of enrichment techniques and subsequent metagenomics of the enriched microbial community “Microcomgenomics” was carried out for the isolation of novel genes and the corresponding enzymes. This approach exploits the genetic diversity of mixed cultures when grown on selected carbon sources, such as cellulose and hemicellulose.

Water and soil samples from hot springs (60-90°C) were collected from Sao Miguel (Azores, Portugal) and enriched on different carbon sources including cellulose and xylan. The enrichment cultures were grown under aerobic as well as anaerobic conditions. Gene libraries were constructed using lambda ZAP<sup>®</sup> Vector (Stratagene) after isolation of DNA from the microbial community and screening was performed on AZCL HE-Cellulose and Xylan plates.

Two cellulase encoding genes were cloned with and without His-Tag in *E coli* Tuner<sup>™</sup> (DE3) cells. The gene *cel5* 2268 bp long encodes a protein with a molecular mass of 85 kDa (755 amino acids). The cellulase gene *cel5* exhibits 87 % identity to *cel D* from *Anaerocellum thermophilum*. Another gene *cel 3* (1614 bp long, molecular mass 59kDa) showed 87.5 % identity to the endoglucanase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

Both recombinant enzymes are active with carboxymethylcellulose and crystalline cellulose between 40 and 80°C and pH of 4-9. Maximal activity was measured at 60°C (Cel 3.2) and 70°C (Cel 5.1).

**Novel thermoactive cellulases from the anaerobic thermophilic bacteria *Anaerobranca gottschalkii* and *Fervidobacterium gondwanense***

Barbara Piela and Garabed Antranikian

Institute of Technical Microbiology, Hamburg University of Technology, Hamburg, Germany

Cellulose, the most abundant organic polymer in nature, is hydrolysed by the synergistic action of different enzymes including endoglucanases, exoglucanases and  $\beta$ -glucosidases. Aiming at finding robust thermoactive cellulases we focussed on two thermophilic anaerobic bacteria, the thermoalkaliphile *Anaerobranca gottschalkii* [1] and the extreme thermophile *Fervidobacterium gondwanense*.

The genome of *Anaerobranca gottschalkii* was found to contain two open reading frames, which were designated as *cel2* and *cel8*. The ORF *cel2* encodes the endoglucanase Cel2, which consists of 348 amino acids and has a molecular mass of 38 kDa. The amino acid sequence of Cel2 exhibits 49.6% identity to the sequence of an endoglucanase of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. The second endoglucanase Cel8 has a molecular mass of 36.1 kDa and consists of 327 amino acids. Analysis of the amino acid sequence of Cel8 revealed 58% identity to a cellulase of *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis*. Both open reading frames have been cloned and successfully expressed in *Escherichia coli*.

Furthermore, a thermoactive cellulase was found by screening the gene library of the extreme thermophile *Fervidobacterium gondwanense*. The cellulase encoding gene shows low similarities to other endoglucanases (36.3% identity to an endoglucanase of *Thermotoga maritima*).

Further information regarding substrate specificity and kinetic properties of the selected thermoactive cellulases will be presented.

[1] Prowe, SG. and Antranikian, G. (2001) *Anaerobranca gottschalkii* sp. nov., a novel thermoalkaliphilic bacterium that grows anaerobically at high pH and temperature. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51: 457-65.

**Bioconversion of rye straw at elevated temperatures**

Vera Bockemühl<sup>1</sup>, Thomas Ingram<sup>2</sup>, Tim Rogalinski<sup>2</sup>, Felix Hahn<sup>1</sup>, Lutz Popper<sup>3</sup>, Irina Smirnova<sup>2</sup>, Gerd Brunner<sup>2</sup> and Garabed Antranikian<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Technical Microbiology, Hamburg University of Technology, Hamburg, Germany

<sup>2</sup>Institute of Thermal Separation Processes, Hamburg University of Technology, Hamburg, Germany

<sup>3</sup>Research and Development, SternEnzym, Ahrensburg, Germany

**Abstract**

Due to the shortage of fossil resources the bioconversion of biomass to high value products such as fine chemicals and biofuels has recently attracted the interest of scientists from academia and industry. The choice of the most suitable substrate and the process will be crucial for the success of the future biobased industry. In mainstream processes large quantities of chemicals, such as sulfuric acid, are added to hydrolyze the cellulosic material in order to make it accessible for enzyme action. Here, we propose a novel process that allows the efficient conversion of rye straw to utilizable products without the use of chemicals. Liquid hot water treatment at elevated temperatures and a pressure of 50 bar is used to make the cellulosic material accessible for hydrolytic enzymes. The resulting liquid hydrolyzates as well as the solid residues were enzymatically converted to monomeric sugars (xylose/glucose) using mesophilic enzymes from *Penicillium janthinellum* (at 50°C and pH 4.0) and thermoactive enzymes from *Aspergillus brasiliensis* (at 75°C and pH 4.0). These enzyme systems contained endoglucanase, exoglucanase,  $\beta$ -glucosidase, endoxylanase and  $\beta$ -xylosidase activities. HPLC analysis showed that glucose, xylose and arabinose are the major products formed and 95% of the initial xylan and 92% of the glucan was converted to monomeric sugars using a pretreatment temperature of 200°C-215°C. The described process using a fixed-bed reactor combines several advantages compared to other reactor types, namely significant energy savings since no biomass comminution is necessary, high solid-to-water-ratios and reduces by-product formation.