

Technische Universität München

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

Miniaturisierte Rührreaktoren zur enzymatischen Hydrolyse von suspendierten Pflanzenmaterialien

Peter Riedlberger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Hartmut Spliethoff
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brück

Die Dissertation wurde am 07.03.2012 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 27.06.2012 angenommen.

„Dem schönen Tag sei es geschrieben!

Oft glänze dir sein heitres Licht“

(Johann Wolfgang von Goethe)

Vorwort

Diese Arbeit entstand während meiner Tätigkeit am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik an der Technischen Universität München. Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz bedanken, für die hervorragende Betreuung und für die Möglichkeit dieses sehr aktuelle interdisziplinäre Thema bearbeiten zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brück möchte ich für die Übernahme des Koreferates danken.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Hartmut Spliethoff möchte ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Der Süd-Chemie AG und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die finanzielle Förderung des Verbundforschungsvorhabens. Weiter möchte ich mich beim Wissenschaftszentrum Straubing sowie dem Fraunhofer Institut für chemische Technologie in Pfinztal für die Bereitstellung einzelner Rohstoffchargen bedanken.

Weiter danke ich meinen Studenten Diedrich Buck, David Schmidtke, Sarah Poschenrieder, Hendrik Hohagen, Waldemar Faber, Niklas Dieler, Kathrin Preuß, Eva Schußmann, Katharina Müller und Jonathan Ritscher.

Besonderer Dank gilt meinen Kollegen Martin Demler, Bernd Anselment, Michael Weiner, Michael Schmidt, Dirk Hebel, Benjamin Smejkal, Nils Janzen, Harald Krispin, Boqiao Sun, Yilei Fu, Ilka Sührer, Stefanie Brüning, Christina Kantzow, Anna Groher, Dr. Danielle Dennewald, Dr. Gabi Gebhardt, Dr. Tanja Kurzrock, Dr. Hannes Link, Dr. Clara Delhomme, Dr. Kathrin Hölsch, Dr. Torben Höfel, Dr. Michael Hofinger und Dr. Michael Braun am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik. Meinen Bürokollegen Dr. Ralf Hortsch, Dr. Dominik Maslak und Georg Faust danke ich für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Dr. Christoph Bendig danke ich für die interessanten Diskussionen zum Thema enzymatische Hydrolyse.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meiner Mutter Rita und meinem Vater Peter sowie meinen Brüdern Florian und Sebastian mit Elena.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG..... | 1 |
| 2 | PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG..... | 2 |
| 3 | THEORETISCHE GRUNDLAGEN | 6 |
| 3.1 | Verfahrenstechnische Charakterisierung von Rührreaktoren | 6 |
| 3.1.1 | Strömungsverhalten..... | 6 |
| 3.1.2 | Leistungseintrag | 8 |
| 3.1.3 | Mischzeit und Durchmischungskennzahl | 9 |
| 3.1.4 | Viskose Fluide..... | 12 |
| 3.1.5 | Feststoffhaltige Medien..... | 17 |
| 3.1.6 | Scheinbare Schergeschwindigkeit..... | 23 |
| 3.1.7 | Mittlere und lokale Energiedissipation | 24 |
| 3.2 | Bioreaktionssysteme | 25 |
| 3.3 | Pflanzenbasierte Substrate..... | 29 |
| 3.3.1 | Polysaccharide und Lignin..... | 30 |
| 3.3.2 | Zusammensetzung verschiedener Pflanzenmaterialien..... | 34 |
| 3.4 | Enzymatische Hydrolyse von Polysacchariden..... | 35 |
| 3.4.1 | Enzyme für den Abbau von Lignocellulose..... | 35 |
| 3.4.2 | Cellulosom | 37 |
| 3.4.3 | Cellulasen..... | 39 |
| 3.4.4 | Hemicellulasen..... | 46 |
| 3.4.5 | Weitere Enzyme | 48 |
| 3.4.6 | Limitierungen bei der enzymatischen Hydrolyse | 49 |
| 3.5 | Vorbehandlung von Biomasse zur enzymatischen Hydrolyse..... | 51 |
| 3.5.1 | Physikalische Vorbehandlungsmethoden..... | 53 |
| 3.5.2 | Chemische Vorbehandlungsmethoden..... | 54 |
| 3.5.3 | Physikalisch-chemische Vorbehandlungsmethoden | 58 |
| 3.5.4 | Biologische Vorbehandlungsmethoden | 61 |
| 3.5.5 | Vergleich der unterschiedlichen Substratvorbehandlungen..... | 62 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4 | MATERIALIEN UND METHODEN | 66 |
| 4.1 | Verwendete Reaktionssysteme | 66 |
| 4.1.1 | Schüttelkolbenversuche | 66 |
| 4.1.2 | Paralleles Rührkesselreaktorsystem | 66 |
| 4.1.3 | Labor-Rührkesselreaktor | 67 |
| 4.2 | Verfahrenstechnische Charakterisierung verschiedener Rührer | 69 |
| 4.2.1 | Mischzeit und Durchmischungskennzahl | 69 |
| 4.2.2 | Bestimmung des Leistungseintrags | 71 |
| 4.2.3 | Bestimmung der scheinbaren Schergeschwindigkeit | 73 |
| 4.2.4 | Bestimmung der maximalen lokalen Energiedissipation | 75 |
| 4.3 | Enzymatische Hydrolyse mikrokristalliner Cellulose | 76 |
| 4.4 | Enzymatische Hydrolyse von Biomassesuspensionen | 77 |
| 4.4.1 | Weizenstroh und Maisspindelgranulat | 77 |
| 4.4.2 | Substratvorbehandlung | 78 |
| 4.4.3 | Bedingungen für die enzymatische Hydrolyse | 79 |
| 4.5 | Optimierung der enzymatischen Hydrolyse | 81 |
| 4.5.1 | Verwendete Pflanzenmaterialien | 81 |
| 4.5.2 | Verwendete Vorbehandlungen | 81 |
| 4.5.3 | Empirische Optimierung..... | 82 |
| 4.6 | Analytik | 84 |
| 4.6.1 | Bestimmung der Biomassezusammensetzung | 84 |
| 4.6.2 | Bestimmung von Enzymaktivitäten..... | 89 |
| 4.6.3 | Bestimmung der Proteinkonzentration | 93 |
| 4.6.4 | Bestimmung von Monosacchariden und organischer Säuren..... | 94 |
| 4.6.5 | Bestimmung der Rheologie | 94 |
| 5 | ERGEBNISSE | 96 |
| 5.1 | Rührorgane zur Homogenisierung von Suspensionen und viskosen Medien | 96 |
| 5.1.1 | H-Rührer | 96 |
| 5.1.2 | S-Rührer..... | 97 |
| 5.2 | Rührercharakterisierung im Milliliter-Bioreaktor | 98 |
| 5.2.1 | Homogenisierung..... | 98 |
| 5.2.2 | Leistungseintrag..... | 103 |
| 5.2.3 | Scheinbare Schergeschwindigkeit | 110 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 5.3 | Milliliter-Rührreaktoren für die enzymatische Hydrolyse von suspendierten Pflanzenmaterialien | 112 |
| 5.3.1 | Auswahl des Reaktionssystems..... | 112 |
| 5.3.2 | Verfahrenstechnische Charakterisierung des S-Rührers in unbewehrten Reaktoren | 115 |
| 5.4 | Enzymatische Hydrolyse mikrokristalliner Cellulose in Milliliter-Rührreaktoren | 121 |
| 5.4.1 | Feststoffanteil | 121 |
| 5.4.2 | Enzymkonzentration und Produktinhibierung | 123 |
| 5.5 | Enzymatische Hydrolyse von Weizenstroh in Milliliter-Rührreaktoren ... | 125 |
| 5.5.1 | Einfluss von pH und Temperatur | 125 |
| 5.5.2 | Substratzusammensetzung, Partikelgröße und Feststoffgehalt | 127 |
| 5.5.3 | Substratvorbehandlung | 134 |
| 5.5.4 | Enzymkonzentration und Produktinhibierung | 137 |
| 5.5.5 | Mehrfache Enzymzugaben | 141 |
| 5.6 | Enzymatische Hydrolyse von Maisspindelgranulat in Milliliter-Rührreaktoren | 145 |
| 5.6.1 | Einfluss von pH und Temperatur | 145 |
| 5.6.2 | Partikelgröße und Feststoffanteil | 147 |
| 5.6.3 | Substratvorbehandlung | 151 |
| 5.6.4 | Enzymkonzentration und Produktinhibierung | 154 |
| 5.6.5 | Mehrfache Enzymzugaben | 156 |
| 5.7 | Enzymatische Hydrolysen in verschiedenen Reaktoren | 159 |
| 5.7.1 | Mikrokristalline Cellulose..... | 159 |
| 5.7.2 | Weizenstroh..... | 161 |
| 5.7.3 | Maisspindelgranulat | 164 |
| 5.8 | Optimierung der enzymatischen Hydrolyse in Milliliter-Rührreaktoren.. | 167 |
| 5.8.1 | Weizenstroh..... | 168 |
| 5.8.2 | Maisspindelgranulat | 180 |
| 6 | DISKUSSION | 189 |
| 6.1 | Rührorgane zur Homogenisierung von Suspensionen und viskosen Medien .. | 189 |
| 6.2 | Rührercharakterisierung im Milliliter-Rührreaktor | 190 |
| 6.2.1 | Homogenisierung | 190 |
| 6.2.2 | Leistungseintrag | 191 |
| 6.2.3 | Scheinbare Schergeschwindigkeit..... | 192 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 6.3 | Milliliter-Rührreaktoren für die enzymatische Hydrolyse von suspendierten Pflanzenmaterialien | 193 |
| 6.3.1 | Auswahl des Reaktionssystems | 193 |
| 6.3.2 | Verfahrenstechnische Charakterisierung der S-Rührer in unbewehrten Reaktoren..... | 193 |
| 6.4 | Enzymatische Hydrolyse mikrokristalliner Cellulose in Milliliter-Rührreaktoren | 195 |
| 6.5 | Enzymatische Hydrolyse von Weizenstroh und Maisspindelgranulat in Milliliter-Rührreaktoren | 197 |
| 6.5.1 | Einfluss von pH und Temperatur..... | 197 |
| 6.5.2 | Substratzusammensetzung, Feststoffgehalt und Partikelgröße | 197 |
| 6.5.3 | Substratvorbehandlung | 202 |
| 6.5.4 | Mehrfache Enzymzugaben | 203 |
| 6.6 | Enzymatische Hydrolysen in verschiedenen Reaktoren..... | 206 |
| 6.7 | Optimierung der enzymatischen Hydrolyse in Milliliter-Rührreaktoren .. | 207 |
| 7 | ZUSAMMENFASSUNG | 211 |
| 8 | AUSBLICK..... | 219 |
| 9 | LITERATUR..... | 220 |
| | ABKÜRZUNGEN UND FORMELZEICHEN..... | 239 |
| | ANHANG | 243 |

1 Einleitung

Monosaccharide, die aus Reststoffen der Agrar- und Forstwirtschaft für die Produktion von Biokraftstoffen (Ethanol, Butanol) oder zur Herstellung von Chemikalien zur stofflichen Nutzung gewonnen werden, stellen Wertstoffe aus nachwachsenden Rohstoffen dar. Um das von der Europäischen Union gesetzte Ziel einen Gesamtanteil an Biokraftstoffen von 10 % bis zum Jahr 2020 in der Europäischen Union zu erreichen und den Ausstoß von Treibhausgasen wie Kohlenstoffdioxid zu verringern, ist die Nutzung von Reststoffen wie beispielsweise Pflanzenmaterialien notwendig (Banse *et al.*, 2011). Bei der Nutzung von Reststoffen werden diese als „Biokraftstoffe der 2. Generation“ bezeichnet, da keine Wettbewerbssituation mit Nahrungsmitteln existiert. Zhang (2011) beziffert die Kosten für Getreidestroh auf etwa $0,06 \text{ \$ kg}^{-1}$ ($3,60 \text{ \$ GJ}^{-1}$). Ein Vergleich zu Kohle ($\approx 0,05 \text{ \$ kg}^{-1}$, $1,54 \text{ \$ GJ}^{-1}$) zeigt, dass eine Verbrennung zu Heizzwecken zwar den Ausstoß von Treibhausgasen verringert, jedoch ökonomisch nicht sinnvoll wäre. Im Vergleich zu Rohöl ($\approx 80 \text{ \$ barrel}^{-1}$, $15,04 \text{ \$ GJ}^{-1}$) sind cellulosebasierte Reststoffe günstig bewertet, wobei die effiziente Weiterverarbeitung zu hochwertigen Chemikalien oder Treibstoffen vorausgesetzt wird.

Die Dimensionierung einer Anlage ist für die kommerzielle Erzeugung von „Biokraftstoffen der 2. Generation“ von hoher Bedeutung. Nach Leboeiro und Hilaly (2011) ist diese abhängig von den örtlichen Gegebenheiten, der Infrastruktur für den Transport, von der Lagerung und vom Anreiz der Landwirte zur Bereitstellung von Pflanzenmaterialien. Die lignocellulosehaltigen Pflanzensubstrate müssen möglichst vollständig zu nutzbaren monomeren Zuckermolekülen umgesetzt werden, um die Ausbeute der Endprodukte erhöhen zu können. Dabei ist der enzymatische Abbau von Pflanzenmaterialien zu Hexosen und Pentosen immer noch eine große Herausforderung (Roche *et al.*, 2009a). Zudem besteht ein hoher Druck zur Effizienzsteigerung aufgrund der teuren Enzymgemische für die Hydrolyse (Lynd *et al.*, 2008; Klein-Marcuschamer *et al.*, 2012, Wyman *et al.*, 2011).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Um effiziente Verfahren für die enzymatische Hydrolyse von Pflanzenmaterialien zu entwickeln sind viele experimentelle Untersuchungen notwendig. Neben den Reaktionsverlauf beeinflussenden Reaktionsbedingungen wie Temperatur und pH sind Untersuchungen zu einer geeigneten Art der Substratvorbehandlung notwendig, um die lignocellulosehaltigen Pflanzenmaterialien enzymatisch bei möglichst geringer Enzymkonzentration mit hohen Monosaccharidausbeuten zu hydrolysieren. Des Weiteren haben die verwendeten Pflanzenmaterialien, aber auch die Umweltbedingungen während des Pflanzenwachstums Einfluss auf die enzymatische Hydrolyse, so dass ein parallelisierbares Reaktionssystem notwendig ist, um aus den vielen Einflussgrößen geeignete Reaktionsbedingungen effizient zu bestimmen.

Rührkesselreaktoren sind in der biotechnologischen Stoffproduktion weit verbreitet und werden häufig im Kubikmeter-Maßstab eingesetzt (Chmiel, 2011). Obwohl kleinere Rührkesselreaktoren für reaktionstechnische Untersuchungen im Liter-Maßstab existieren, führt das noch immer relativ große Reaktionsvolumen in der experimentellen Praxis zu hohem Substrat- und Enzymverbrauch. Dies erhöht die Kosten bei der Optimierung von Enzymgemischen für die Verzuckerung von Pflanzenmaterialien. Mit Rührkesselreaktoren im Liter-Maßstab ist nur begrenzt eine Parallelisierung möglich (4 - 8 Reaktoren) und somit ist der Zeitaufwand für die Untersuchung von verschiedenen Reaktionsbedingungen hoch.

Aufgrund der eingeschränkten Parallelisierbarkeit von Standard-Rührkesselreaktoren werden im Labor für die verfahrenstechnische und reaktionstechnische Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse von Pflanzenmaterialien Mikrotiterplatten oder Umbauten von Mikrotiterplatten mit bis zu 96 Kavitäten verwendet (Chundawat *et al.*, 2008; King *et al.*, 2009; Santoro *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2010; Studer *et al.*, 2010). Als nachteilig erweist sich allerdings das geringe Reaktionsvolumen bei Mikrotiterplatten, welches die Homogenisierung von Suspensionen mit hohem Feststoffanteil und großen Feststoffpartikeln verhindert. Teilweise wird deshalb versucht mit kleinen Magnetrührern eine gleichmäßige Durchmischung von Biomassesuspensionen in Mikrotiterplatten zu erreichen. In Mikrotiterplatten konnte dadurch die enzymatische Hydrolyse von suspendierten Pflanzenmaterialien parallelisiert und der Bedarf an teuren

Enzymen für reaktionstechnische Untersuchungen gesenkt werden. Der hydrolysierbare Feststoffanteil ist jedoch auf maximal 2 % und die Partikelgröße auf maximal 500 μm beschränkt (Song *et al.*, 2010), weshalb die Vergleichbarkeit mit Biomassesuspensionen in Rührkesselreaktoren im Kubikmeter-Maßstab sehr eingeschränkt ist. Häufig werden in diesen klassischen Rührkesselreaktoren Feststoffanteile von bis zu 20 % (w/w) Trockensubstanz mit Partikelgrößen bis in den Zentimeterbereich verwendet (Maache-Rezzoug *et al.*, 2011). Da der Feststoffanteil von Suspensionen und die Partikelabmessungen direkten Einfluss auf das Stofftransport- und Adsorptionsverhalten von Enzymen, aber auch auf mögliche Inhibierungen der Enzyme durch Substrate und Produkte haben, ist eine Skalierbarkeit der enzymatischen Hydrolyse von suspendierten Pflanzenmaterialien aus Mikrotiterplatten in den Liter- oder Kubikmeter-Maßstab auf geringe Feststoffanteile ($\leq 2\%$) und kleine Partikelgrößen ($\leq 500\ \mu\text{m}$) beschränkt.

Eine Möglichkeit der apparativen Lösung ist die Miniaturisierung und Parallelisierung von Rührkesselreaktoren, womit eine effektive Gewinnung von Prozessinformation für die Verfahrensentwicklung und -optimierung möglich ist (Weuster-Botz, 2005a).

Voraussetzung für die Miniaturisierung von Rührreaktoren ist die Sicherstellung der Skalierbarkeit zwischen unterschiedlichen Reaktionsmaßstäben. Die physikalische Vergleichbarkeit kann durch spezifische verfahrenstechnische Kenngrößen beschrieben werden, so dass im Milliliter-Maßstab vergleichbare physikalische Bedingungen zum Labor- oder Pilotmaßstab möglich sind (Weuster-Botz *et al.*, 2007).

Puskeiler *et al.* (2005a) entwickelte ein paralleles Bioreaktorsystem mit 48 parallel angeordneten Rührstellen im Milliliter-Maßstab. Die gasinduzierenden Rührorgane werden magnetisch-induktiv angetrieben und ermöglichen die Kultivierung von Mikroorganismen. Ein entscheidender Vorteil des Systems ist die verfahrenstechnische Ähnlichkeit zu klassischen Rührkesselreaktoren, vereint mit der kontrollierten Prozessführung eines miniaturisierten Parallelsystems. So konnte das 48-fache Reaktionssystem erfolgreich für die automatisierte und skalierbare Kultivierung von Mikroorganismen wie *Escherichia coli* (Puskeiler *et al.*, 2005b; Kusterer *et al.*, 2008), *Bacillus subtilis* (Knorr *et al.*, 2007; Vester *et al.*, 2009), *Saccharomyces cerevisiae* (Gebhardt, 2010), *Cupriavidus necator* (Hoefel *et al.*, 2010) und *Streptomyces tendae* (Hortsch *et al.*, 2010) mit gelösten Substraten eingesetzt werden.

Die Zielsetzung war daher die Entwicklung neuer Rührorgane für miniaturisierte Rührkesselreaktoren, die eine Homogenisierung von Feststoffsuspensionen im

Milliliter-Maßstab bei möglichst hohem Feststoffanteil und möglichst großen Biomassepartikeln ermöglichen und dadurch die Voraussetzung schaffen, enzymatische Hydrolysen vergleichbar zu Rührkesselreaktoren im Liter- oder Kubikmeter-Maßstab durchzuführen.

Zentrale Probleme zur industriellen Nutzung der enzymatischen Hydrolyse von Pflanzenmaterialien mit anschließenden Folgeprozessen stellen geringe Hydrolyseausbeuten und geringe Konzentrationen von Monosacchariden dar. Da für eine erfolgreiche Nutzung der enzymatischen Hydrolyse von Pflanzenmaterialien vor allem die hohen Kosten für die verwendeten Enzyme ausschlaggebend sind (Alvira *et al.*, 2011; Klein-Marcuschamer *et al.*, 2012), war eine weitere Zielsetzung, am Beispiel kommerziell verfügbarer Enzyme möglichst hohe Freisetzungen von Monosacchariden aus den Pflanzenmaterialien mit minimalem Enzymeinsatz unter erstmaliger Nutzung der neuen Rührorgane im Parallelansatz zu erreichen.

Für das Erreichen der Ziele waren folgende Arbeitsschritte erforderlich:

- Entwicklung neuer Rührorgane für die enzymatische Hydrolyse von suspendierten Pflanzenmaterialien mit möglichst hohem Feststoffanteil und großen Partikelabmessungen in Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab
- Untersuchung der Homogenisierung von viskosen Medien und Suspensionen mit neuen Rührorganen in bewehrten und unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren
- Bestimmung des Leistungseintrags und der Schergeschwindigkeit unter Verwendung der neuen Rührorgane
- Auswahl eines geeigneten Rührorgans und Milliliter-Bioreaktors mit oder ohne Strömungsbrecher für die enzymatische Hydrolyse anhand der verfahrenstechnischen Charakterisierung
- Enzymatische Hydrolyse von mikrokristalliner Cellulose in Milliliter-Rührreaktoren bei unterschiedlichen Feststoffanteilen und Enzymkonzentrationen mit Untersuchung der Produktinhibierung
- Enzymatische Hydrolyse von Weizenstroh in Milliliter-Rührreaktoren unter Variation von pH, Temperatur, Partikelgrößen, Feststoffanteilen, Substratvorbehandlungen, Enzymkonzentrationen und Produktinhibierung für Einfach- und Mehrfachzugaben von Enzymen

- Enzymatische Hydrolyse von Maisspindelgranulat in Milliliter-Rührreaktoren unter Variation von pH, Temperatur, Partikelgrößen, Feststoffanteilen, Substratvorbehandlungen, Enzymkonzentrationen und Produktinhibierung für Einfach- und Mehrfachzugaben von Enzymen
- Prüfen der Skalierbarkeit der enzymatischen Hydrolyse in Milliliter-Rührreaktoren durch Vergleich mit anderen Reaktoren an den Substraten mikrokristalline Cellulose, Weizenstroh und Maisspindelgranulat
- Maximierung der Freisetzung von Glucose und Xylose aus Weizenstroh und Maisspindelgranulat bei unterschiedlicher Substratvorbehandlung durch die Verwendung verschiedener kommerzieller Enzympräparate

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Verfahrenstechnische Charakterisierung von Rührreaktoren

3.1.1 Strömungsverhalten

In verfahrenstechnischen Produktionsanlagen ist der Rührkesselreaktor ein häufig eingesetzter Reaktortyp (Mersmann *et al.*, 1975). Die Homogenisierung des Rührmediums wird dabei durch eine rotierende Welle, an der Rührkörper angebracht sind, erreicht. Die Rührkörper, auch Rührorgane genannt, besitzen eine der Rühraufgabe entsprechende Geometrie. Zu den Grundaufgaben des Rührens zählen das Vermischen von löslichen Flüssigkeiten (Homogenisieren), das Verteilen von Feststoffen in einer Flüssigkeit (Suspendieren), das Zerteilen und Verteilen von Tröpfchen einer mehrerer ineinander unlöslicher Flüssigkeiten (Emulgieren) sowie das Begasen durch Zerteilen und Verteilen von Gasblasen in einer Flüssigkeit und eine optimierte Wärmeübertragung (Zlokarnik, 1967; Kipke, 1979). Häufig werden die Grundoperationen Emulgieren und Begasen unter dem Begriff des Dispergierens zusammengefasst.

Bei der Auswahl möglicher Rührergeometrien zeigte sich bis etwa 1965 eine nahezu unüberschaubare Anzahl an Bauformen. Erst durch das Bestreben, die Bauformen von Rührkörpern zu vereinheitlichen und die weitreichenden experimentellen Untersuchungen einzelner Rührkörper wie Scheiben-, Blatt-, Propeller-, Kreuzbalken-, und Wendelrührer, wurde die Normierung von Rührorganen (DIN 28 130 bis DIN 28 133) ermöglicht (Ulrich und Schreiber, 1967). Als wichtige Kenngrößen, die einen Rührvorgang charakterisieren, erweisen sich die vom Rührorgan eingebrachte Rührleistung und die erzielte Mischwirkung. Die Mischwirkung ist dabei in erster Linie abhängig vom induzierten Strömungsfeld. In Abbildung 3.1 ist ein mögliches hydrodynamisches Verhalten einer gerührten Flüssigkeit qualitativ veranschaulicht. Es wird zwischen den primär erzeugten Strömungsformen axial (Abbildung 1A), radial und tangential (Abbildung 1B) unterschieden.

Die gängigen Rührorgane Blatt-, Anker-, Gitter-, und Kreuzbalkenrührer zählen zu den tangential bis radial fördernden Rührern, während das Förderverhalten von Wendel-,

Schrauben- und Propellerrührern primär durch axiale Flüssigkeitsströmung entsteht (Zlokarnik, 1967).

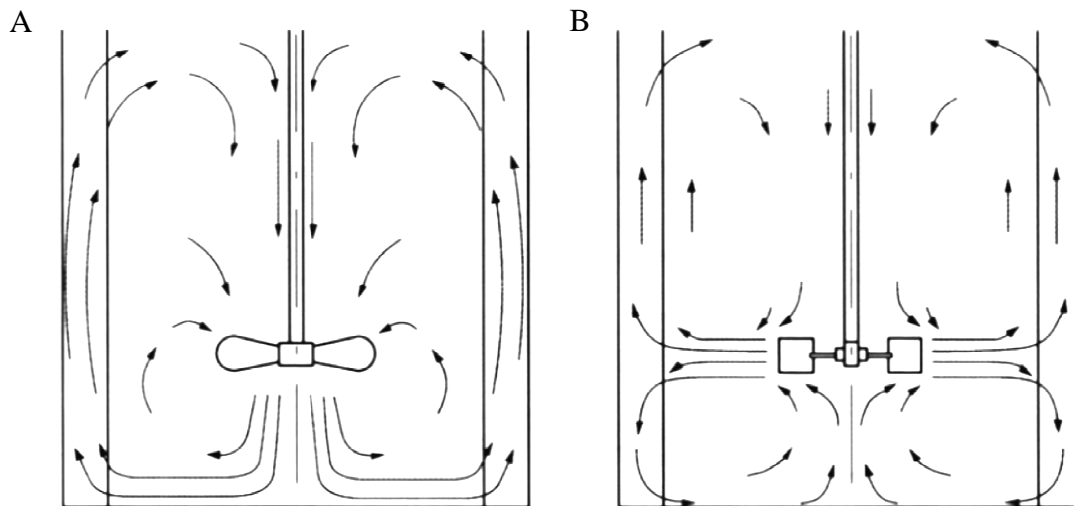


Abbildung 3.1: Hydrodynamik in Reaktoren mit Strömungsbrechern. Axial fördernder Propellerrührer (A) und radial fördernder Scheibenblattrührer (B) (Chmiel, 2006).

Das hydrodynamische Verhalten der Strömung im Rührkesselreaktor lässt sich in dimensionsloser Form durch die Reynoldszahl (Re) nach Gleichung 3-1 beschreiben:

$$Re = \frac{\rho \cdot n \cdot d^2}{\eta} \quad (3-1)$$

| | | |
|-----|--------|----------------------------------|
| Mit | n | Rührerdrehzahl / s^{-1} |
| | d | Rührerspitzendurchmesser / m |
| | ρ | Dichte / $kg\ m^{-3}$ |
| | η | die dynamische Viskosität / Pa s |

In Rührkesselreaktoren mit Strömungsbrechern kann bei $Re > 10^4$ von einem vollständig turbulenten Strömungszustand ausgegangen werden. Der Begriff turbulent bezieht sich auf örtlich instationäre, dreidimensionale Wirbelströmungen (Kraume, 2003), wobei sich die überlagernden Wirbel als Turbulenzbewegung nach Kolmogorov (1958) beschreiben lassen.

3.1.2 Leistungseintrag

Die Leistungskennzahl (Ne) nach Gleichung 3-2 ist ein Maß für die in den Reaktor eingebrachte Leistung. Diese wird auch Newtonzahl (Ne) genannt.

$$Ne = \frac{P}{\rho \cdot n^3 \cdot d^5} \quad (3-2)$$

| | | |
|-----|--------|---------------------------------------|
| Mit | n | Rührerdrehzahl / s ⁻¹ |
| | d | Rührerspitzendurchmesser / m |
| | ρ | Dichte / kg m ⁻³ |
| | P | eingetragene mechanische Leistung / W |

Die Newtonzahl kann als Funktion der Reynoldszahl, wie in Abbildung 3.2 dargestellt werden.

Laminarer Strömungsbereich

Es überwiegt der Einfluss der Zähigkeitskräfte, hervorgerufen durch die Viskosität des Rührmediums. Es gilt $Ne = \text{const} \cdot Re^{-1}$. Strömungsbrecher sind folglich nicht notwendig.

Turbulenter Strömungsbereich

Dieser Bereich ist in Abbildung 3.2 durch $Ne = \text{const}$. gekennzeichnet und wird häufig nur in Reaktoren mit Strömungsbrecher erreicht.

Übergangsbereich zwischen laminarer und turbulenter Strömung

Der Übergangsbereich ist abhängig von der Reaktorart. Strömungsbrecher verkleinern den Bereich und führen zu einer schnellen Ausbildung des turbulenten Strömungszustandes. Ohne Strömungsbrecher wird der turbulente Strömungsbereich möglicherweise gar nicht erreicht und die Newtonzahl nimmt auch bei hohen Reynoldszahlen weiter ab.

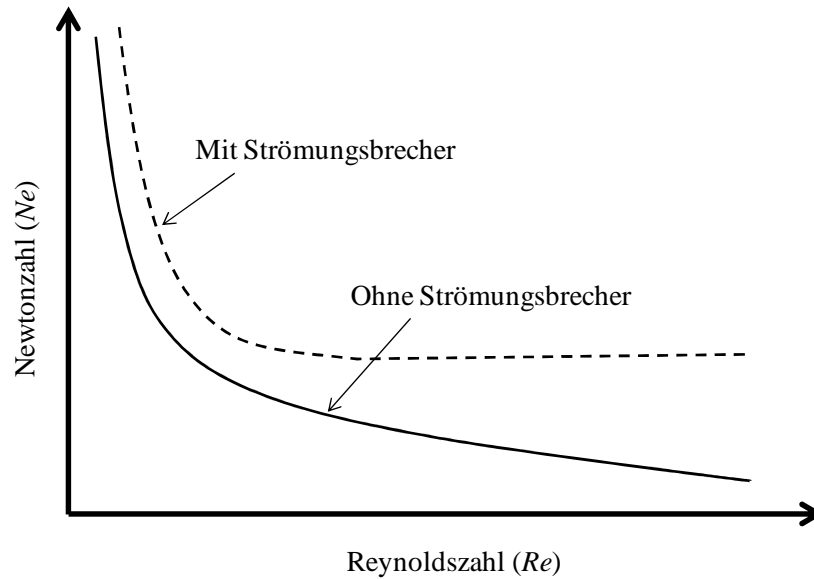


Abbildung 3.2: Die Leistungskennzahl (Ne) als Funktion der Reynoldszahl (Re) mit und ohne Strömungsbrecher nach Zlokarnik (1967).

3.1.3 Mischzeit und Durchmischungskennzahl

Das durch den Rührvorgang induzierte Strömungsfeld bewirkt eine Homogenisierung der Flüssigkeit und kann durch die Aufnahme von Mischzeitcharakteristiken quantifiziert werden. Zur Bestimmung von Mischzeiten, die den Zeitbedarf bis zum Erreichen eines bestimmten Homogenitätsgrads bei Mischprozessen angeben, existieren nach Hiby (1979) verschiedene Methoden. Sondenmethoden, zu denen auch Leitfähigkeitsmessungen zählen, haben den Vorteil einer quantitativen Auswertung durch eine kontinuierliche Aufzeichnung des Messsignals. Neben Leitfähigkeitsmessungen, die über die Zugabe von Salzen eine Bestimmung von Mischzeiten ermöglichen, kann die Temperatur oder die Lichtextinktion als Messgröße bei Sondenmethoden verwendet werden. Als weitere Methoden sind der Farbumschlag chemischer Indikatoren beschrieben, wobei zwischen den Methoden des letzten Farbumschlags, des fortschreitenden Farbumschlags und der Farbumschlagsmethode nach Danckwerts (1957) unterschieden wird. Aus der Literatur bekannt, sind auch Methoden die auf Entfärbungsreaktionen (Käppel, 1975) und der Temperaturzunahme aufgrund fortschreitender chemischer Reaktionen beruhen (Toor, 1962). Auch ist es möglich, den Mischvorgang schlierenoptisch oder über pH-Änderungen zu charakterisieren.

Die Mischzeit eines Rührorgans wird bei vernachlässigbaren Dichte- und Zähigkeitsunterschieden vom Durchmesser und der Drehzahl des Rührers sowie von der Viskosität des Rührmediums bestimmt.

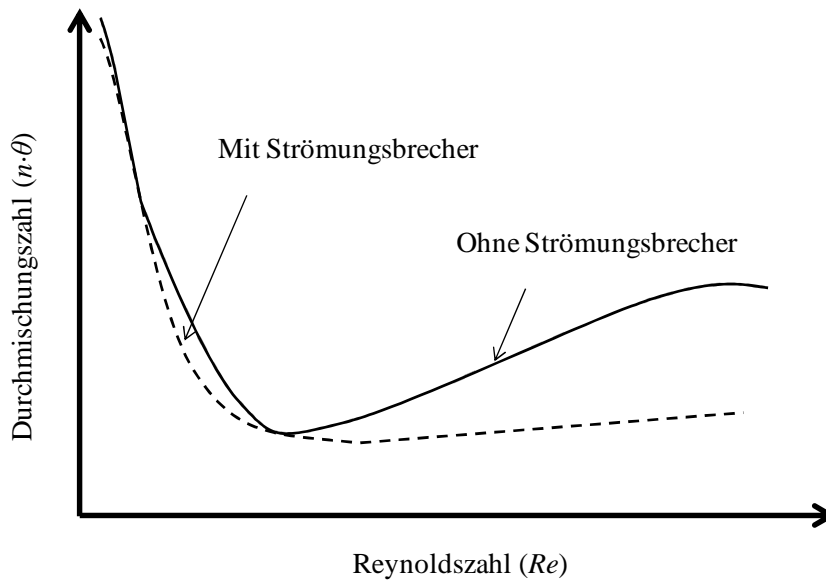


Abbildung 3.3: Mischzeitcharakteristik: Durchmischungszahl (wird auch als Durchmischungskennzahl und Mischzeitkennzahl bezeichnet, $n \cdot \theta$) als Funktion der Reynoldszahl (Re) nach Zlokarnik (1967).

Mit zunehmenden Reynoldszahlen steigt die Bedeutung der Massenkräfte im Verhältnis zu den Zähigkeitskräften stetig an und die eintretende Homogenisierung durch das Rührorgan wird stärker, wobei der Einfluss von Strömungsbrechern noch gering ist. Die lineare Abnahme der Mischzeitkennzahl in Abbildung 3.3 deutet auf laminare Strömungsverhältnisse hin (Kraume, 2003). Der beobachtbare Anstieg der Mischzeitkennzahl für Reaktoren, ohne oder mit Strömungsbrechern, beruht auf einer fortschreitenden Mischzeitabnahme, die Abnahme erfolgt jedoch weniger schnell, so dass das Produkt der Mischzeit und der Rührerdrehzahl zunimmt (Zlokarnik, 2001).

Die Reaktorgeometrie und Strömungsbrecher haben Einfluss auf die Mischzeitkennzahl. Während sich bei fehlender Bewehrung zunehmend tangentielle Strömungen einstellen, bewirken Strömungsbrecher eine dominierende axiale Durchmischung (Zlokarnik, 1967). Dieses Verhalten wurde für den Scheibenblatt-, Gitter- und Kreuzbalkenrührer beobachtet und lässt sich auf andere Rührertypen wie den Propellerrührer und Ankerrührer übertragen. Einzig für Wendelrührer wird eine Zwangsförderung auch bei niedrigen Reynoldszahlen ($Re < 100$) beobachtet, was sich an einer konstanten Mischzeitkennzahl erkennen lässt (Kipke, 1979).

Um nun eine vergleichende von Rührer- und Reaktorgeometrie auf die Rühraufgabe angepasste Beurteilung durchführen zu können, wird das vom Rührer zu erbringende Homogenitätskriterium an den Leistungseintrag gekoppelt. Dies erfolgt durch Bildung einer modifizierten Leistungskennzahl und Mischzeitkennzahl. Hierzu werden die Einflussfaktoren der Rührerdrehzahl und des Rührerspitzen­durchmessers durch die bekannte Größe des Reaktordurchmessers ersetzt. Ähnlichkeitstheoretisch ergibt sich nach Zlokarnik (1967) die modifizierte Durchmischungskennzahl (Mischzeitkennzahl) zu Gleichung 3-3:

$$n \cdot \theta \cdot Re^{-1} \cdot (D/d)^{-2} = \theta \cdot \eta \cdot D^{-2} \cdot \rho^{-1} \quad (3-3)$$

Wobei für die Leistungskennzahl Gleichung 3-4 gilt:

$$Ne \cdot Re^3 \cdot (D/d) = P \cdot D \cdot \rho^2 \cdot \eta^{-3} \quad (3-4)$$

| | | |
|-----|----------|---------------------------------------|
| Mit | Re | Reynoldszahl / - |
| | θ | Mischzeit / s |
| | n | Rührerdrehzahl / min^{-1} |
| | D | Reaktordurchmesser / m |
| | d | Rührerspitzen­durchmesser / m |
| | P | eingetragene mechanische Leistung / W |
| | ρ | Dichte / kg m^{-3} |
| | η | dynamische Viskosität / Pa s |

Mit Gleichung 3-3 und Gleichung 3-4 ist ein Vergleich der Reaktorsysteme möglich, da die modifizierten Kennzahlen außer den zuvor bekannten Größen, des Behälterdurchmessers und der Stoffwerte, nur die beiden Einstellgrößen der Mischzeit und des Leistungseintrags enthalten. Abbildung 3.4 zeigt die ideale Reaktor- und Rührerkombination hinsichtlich geforderter Homogenität bei minimalem Leistungseintrag für Flüssigkeiten.

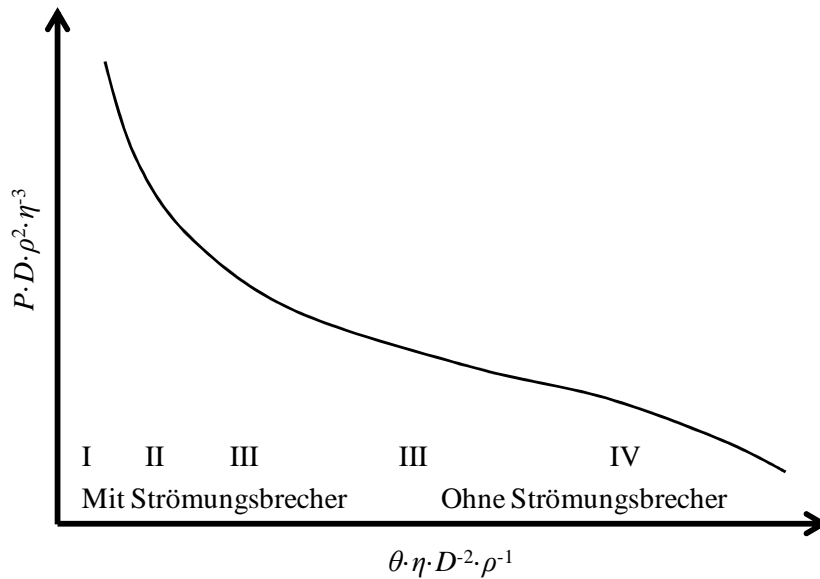


Abbildung 3.4: Kurve zur Bestimmung der Reaktorart und des Rührorgans bei minimaler Rührarbeit. Propellerrührer (I), Gitterrührer (II), Blattrührer (III) und Wendelrührer (IV) mit bevorzugter Reaktorart mit und ohne Strömungsbrecher nach Zlokarnik (1967).

3.1.4 Viskose Fluide

Abhängig vom rheologischen Verhalten der zu mischenden Substanz, ist die Auswahl eines geeigneten Systems bestehend aus Reaktor und Rührorgan zu treffen, um eine effektive Durchmischung bei möglichst geringer Rührarbeit gewährleisten zu können.

Die Rheologie beschreibt dabei das Verhalten einer Substanz unter Einfluss von Scherkräften. Diese äußeren Kräfte können Deformationen im Fluid erzeugen und elastischer Natur oder von Dauer, also plastischer Natur sein. Das Fließverhalten ist auch abhängig vom Betrag der Kraft und der Dauer der Kraftbeaufschlagung. Umgebungsfaktoren wie die Temperatur können Einfluss auf das rheologische Verhalten der Stoffe haben. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen Mikro- und Makro-Rheologie. Während die Mikro-Rheologie nach einer molekularen Begründung für das beobachtete Verhalten fragt, in dem Parameter wie Form, Größe, Wechselwirkung von Komponenten sowie deren statische und dynamische Mikrostrukturen evaluiert werden, wird in der Makro-Rheologie das gezeigte Verhalten bei Deformation von kontinuierlichen Fluiden messtechnisch erfasst (Rheometrie) und ausgewertet. Die beobachteten Phänomene werden mit Zustandsgleichungen und Modellen beschrieben (Herrmann, 2002).

Nach Tipler (2000) kann die Viskosität einer Flüssigkeit durch Betrachtung zweier paralleler Platten mit gleicher Fläche (A) beschrieben werden. Durch relative Bewegung der oberen zur unteren Platte, die zueinander den Abstand (y) besitzen, bewirkt die horizontale Kraft (F) eine Widerstandskraft benachbarter Flüssigkeitsschichten. Man erhält die Geschwindigkeit (v_y). Bei laminarer Strömung ist die Geschwindigkeit nahe der oberen Platte gleich v und nahe der unteren Platte gleich null (Abbildung 3.5). Zwischen den Platten ändert sich die Geschwindigkeit (v_y) von Flüssigkeitsschicht zu Flüssigkeitsschicht. Die Proportionalitätskonstante trägt den Namen dynamische Viskosität (η).

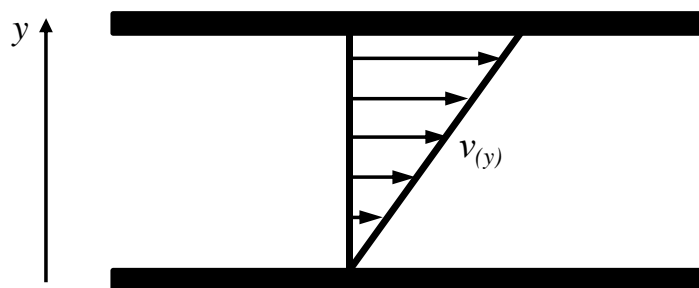


Abbildung 3.5: Zwei gleich große parallele Platten mit einer oberen Platte die relativ zur unteren Platte verschoben wird.

Für die Scherspannung (τ) gilt Gleichung 3-5:

$$\tau(\gamma) = \frac{F}{A} = \eta \cdot \frac{\partial v}{\partial y} \quad (3-5)$$

Wobei die Schergeschwindigkeit (Scherrate) (γ) definiert ist durch Gleichung 3-6:

$$\gamma = \frac{\partial v}{\partial y} \quad (3-6)$$

Weshalb für das Verhältnis aus Scherspannung (τ) und Schergeschwindigkeit (γ) Gleichung 3-7 gilt:

$$\eta = \frac{\tau}{\gamma} \quad (3-7)$$

Eine Scherratenabhängigkeit der Viskosität $\eta(\gamma)$ entspricht einem Nicht-Newtonschen Fluidverhalten.

Das Fließverhalten dieser Fluide lässt sich im Allgemeinen durch den Carreau-Ansatz beschreiben. Nach Henzler (2007) lässt sich dieser in modifizierter Form nach

Gleichung 3-8 darstellen. Grundsätzlich lassen sich rheometrisch unterschiedliche Verhaltensweisen beobachten. Dilatante Fluide weisen eine Zunahme der Viskosität mit ansteigender Schergeschwindigkeit auf (Abbildung 3.6). Bei strukturviskosen Fluiden, wie Carboxymethylcellulose (CMC) nimmt die Viskosität bei ansteigender Schergeschwindigkeit ab.

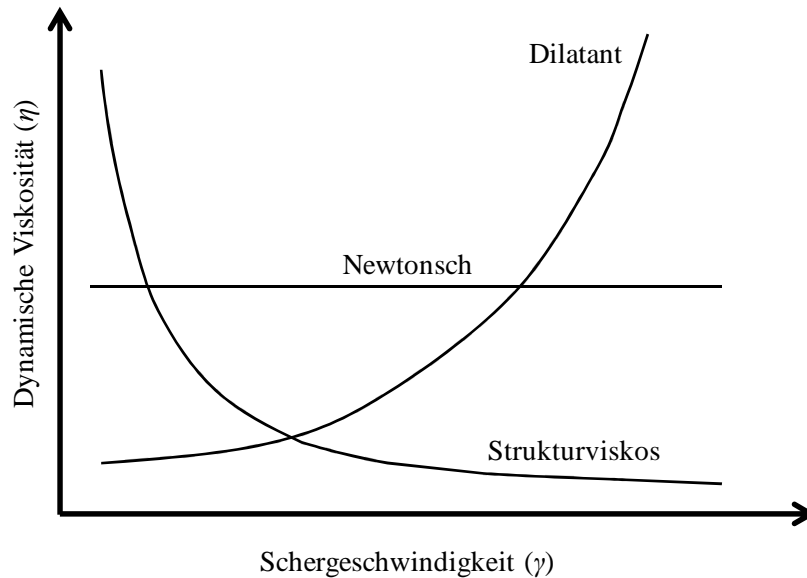


Abbildung 3.6: Fließverhalten unterschiedlicher Fluide unter Scherbeanspruchung.

$$\eta = \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{\sqrt{1 + \left(\frac{\gamma^{1/(1-m)}}{K/\eta_0}\right)^2}} + \eta_\infty \quad (3-8)$$

| | | |
|-----|---------------|---|
| Mit | η_∞ | dynamische Viskosität für $\gamma \rightarrow \infty$ / mPa s |
| | η_0 | dynamische Viskosität für $\gamma \rightarrow 0$ / mPa s |
| | K | Konsistenzindex / mPa s ^m |
| | m | Fließindex / - |
| | γ | Schergeschwindigkeit / s ⁻¹ |

Für die messtechnisch kaum darstellbaren Randbereiche sehr hoher und sehr niedriger Scherraten vereinfacht sich der modifizierte Carreau-Ansatz zu Gleichung 3-9.

$$\eta = K \cdot \dot{\gamma}^{m-1} \quad (3-9)$$

Diese mathematische Beziehung ist als Ostwald-de-Waele Gesetz bekannt. Für strukturviskose Fluide gilt $m < 1$ wohingegen dilatante Fluide durch $m > 1$ beschrieben werden. Ist der Fließindex gleich 1 ($m = 1$), handelt es sich um ein Newtonsches Fluid mit scherratenunabhängiger Viskosität (η). Mit diesem Ansatz lassen sich die meisten Nicht-Newtonschen Fluide beschreiben.

Binghamsche Fluide und Cassonsche Fluide zeigen eine Fließgrenze τ_y bevor das Fluid zu fließen beginnt (Tabelle. 3.1). Die Scherratenabhängigkeit der Viskosität kann auch mit einem Ansatz von Herschel und Bulkley (1926) beschrieben werden (Gleichung 3-10), dieser ist etwas allgemeiner formuliert als der Cassonsche und Binghamsche Modellansatz.

$$\eta = \frac{\tau_y^{HB} + K^{HB} \cdot \dot{\gamma}^{m_{HB}}}{\dot{\gamma}} \quad (3-10)$$

Für den Fließindex (m) ergibt sich für Werte zwischen 0 und 1 scherreduzierendes und für Werte größer 1 schererhöhendes Fließverhalten. Für einen Fließindex von 1 beschreibt Gleichung 3-10 ein Binghamsches Fluid.

Tabelle 3.1: Modelle zur Beschreibung von scherratenabhängigem Viskositätsverhalten nach Pimenova und Hanley (2004).

| | |
|-----------------------------|---|
| Ostwald-de-Waele | $\tau = K \cdot \dot{\gamma}^m$ |
| Bingham | $\tau - \tau_y^B = K^B \cdot \dot{\gamma}$ |
| Casson (1954) | $\tau^{0,5} = (\tau_y^C)^{0,5} + K^C \cdot (\dot{\gamma})^{0,5}$ |
| Herschel und Bulkley (1926) | $\tau = \tau_y^{HB} + K^{HB} \cdot \dot{\gamma}^{m_{HB}}$ |
| Mit | τ Scherspannung / N m ⁻² K Konsistenzindex / mPa s ^m m Fließindex / - $\dot{\gamma}$ Schergeschwindigkeit / s ⁻¹ |

Viskoelastisches Rheologieverhalten

Eine weitere Gruppe viskoser Fluide sind die viskoelastischen Flüssigkeiten, die durch eine Kombination aus viskosem und elastischem Verhalten gekennzeichnet sind und nach Maxwell mit Gleichung 3-11 beschrieben werden können (Todtenhaupt *et al.*, 1990).

$$\gamma = \frac{\tau}{\eta} + \frac{1}{G} \cdot \frac{\partial \tau}{\partial t} \quad (3-11)$$

| | | |
|-----|------------------------------------|---|
| Mit | τ | Scherspannung / N m ⁻² |
| | γ | Schergeschwindigkeit / s ⁻¹ |
| | η | dynamische Viskosität / Pa s |
| | G | Gleitmodul / Pa |
| | $\frac{\partial \tau}{\partial t}$ | differentielle Änderung der Scherspannung / N m ⁻² s ⁻¹ |

Folgende Grenzfälle charakterisieren Fluide mit viskoelastischem Verhalten: Stoffgruppen mit sehr hohen Viskositäten ($\eta \rightarrow \infty$) zeichnen einen ideal elastischen Festkörper aus, während für Substanzen mit sehr hohen Gleitmodulen (G) der Ansatz für Substanzen ohne viskoelastischem Einfluss verbleibt.

Neben einem scherratenabhängigen Verhalten viskoser Fluide, können diese eine zeitliche Abhängigkeit der Viskosität aufweisen. Das thixotrope Viskositätsverhalten zeichnet sich durch eine zeitliche Viskositätsabnahme aus, während rheopexe Fluide eine zeitabhängige Zunahme in der Viskosität aufweisen (Abbildung 3.7).

Grundsätzlich können Viskositätsänderungen reversibel oder irreversibel sein. Jedoch werden nur zeitlich reversible Viskositätsänderungen als Thixotropie bzw. Rheopexie beschrieben. Die makroskopischen Änderungen können dabei meist über mikrorheologische Veränderungen erklärt werden, beispielsweise durch veränderliche Molekülorientierungen in Polymerlösungen. Meist lassen sich Thixotropie und Rheopexie experimentell durch oszillierende Schubspannungsverläufe erkennen.

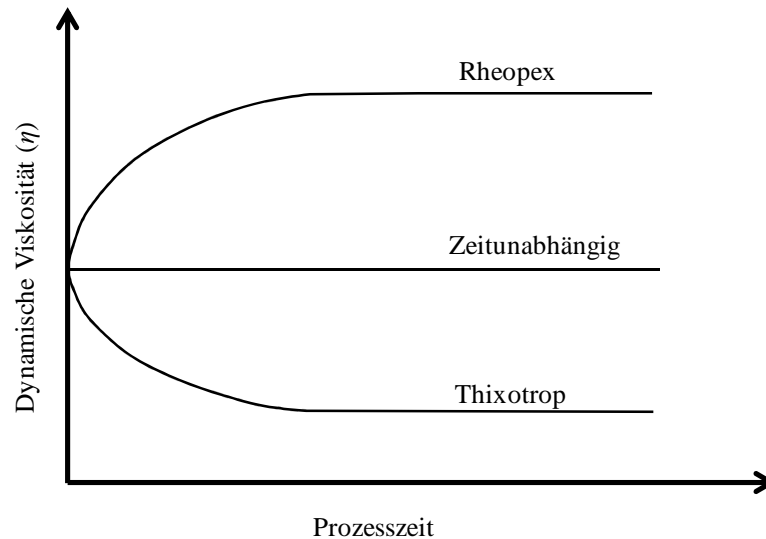


Abbildung 3.7: Fließverhalten unterschiedlicher Fluide in Abhängigkeit von der Zeit.

3.1.5 Feststoffhaltige Medien

In diesem Kapitel wird das rheologische Verhalten von feststoffhaltigen Medien, die Beschreibung der Hydrodynamik von Suspensionen, die Leistungscharakteristik von Suspensionen und die Einflüsse der dispersen Phase auf die Mischzeit und die Durchmischungskennzahl diskutiert.

Rheologisches Verhalten

Das rheologische Verhalten von Suspensionen kann über das Fließverhalten von Nicht-Newtonschen Fluiden beschrieben werden. So wurde das Fließverhalten von Maisstrohsuspensionen durch das Ostwald-de-Waele Gesetz mit einem Masseanteil von 5 % bis 30 % (w/w) erfolgreich abgebildet (Pimenova und Hanley, 2003). Erhardt *et al.* (2010) konnte das Bingham'sche Modell zur Beschreibung der Rheologie von säurevorbehandelten Maisstrohfasern (25 % w/w) anwenden. Viamajala *et al.* (2009) verwendete den Cassonschen Ansatz zur Beschreibung von säurevorbehandelten Maisstrohfasern mit einem Feststoffanteil zwischen 10 % und 40 % (w/w). Neben diesen erfolgreich eingesetzten Modellen, die aus der Beschreibung des Fließverhaltens von Nicht-Newtonschen Fluiden stammen, wurde von Einstein (1906) die modellmäßige Betrachtung rheologischer Phänomene für Suspensionen theoretisch hergeleitet. Während die bisher genannten Gleichungen sich auf die strukturelle Beschreibung bei konstanter Konzentration beziehen, führte Einstein (1906)

konzentrationsabhängige Modelle des Fließverhaltens ein (Gleichung 3-12). Aufgrund der vorhandenen sphärischen Teilchen kommt es zu einem Anstieg der Viskosität. Die veränderte Hydrodynamik durch umströmen von Partikeln führt zu einer zusätzlichen Energiedissipation, die wiederum die Viskosität erhöht (Herrmann, 2002).

$$\eta_s = \eta_f \cdot (1 + 2,5 \cdot \phi_t) \quad (3-12)$$

Mit ϕ_t Volumenkonzentration der dispersen Phase $\leq 0,03$ / -
 η_f Viskosität der Trägerflüssigkeit / Pa s
 η_s Viskosität der Suspension / Pa s

Gleichung 3-12 wurde in den folgenden Jahren um die hydrodynamischen Wechselwirkungen der Partikel für höhere Volumenkonzentrationen (ϕ_t) zu Gleichung 3-13 erweitert und eine maximale Packungsdichte (ϕ_{max}) eingeführt ($\phi_{max} = 0,74$). Werner und Mersmann (1995) stellen eine Kombination des Ostwald-de-Waele Gesetzes und der konzentrationsabhängigen Beschreibung der Viskosität von Suspensionen nach Eilers (1941) vor.

$$\eta_s = \eta_f \cdot \left[1 + \frac{2,5 \cdot \phi_t}{1 - \frac{\phi_t}{\phi_{max}}} + \left(\frac{1,25 \cdot \phi_t}{1 - \frac{\phi_t}{\phi_{max}}} \right)^2 \right] + K \cdot \gamma^{n-1} \quad (3-13)$$

$$\eta_s = f(\eta_f; \phi_{max}; \phi_t) + K \cdot \gamma^{n-1} \quad (3-14)$$

Mit η_s dynamische Viskosität der Suspension / Pa s
 η_f dynamische Viskosität der Trägerflüssigkeit / Pa s
 ϕ_{max} maximale Packungsdichte = 0,74 / -
 ϕ_t Volumenkonzentration der dispersen Phase / -

Vereinfachend könnte die Gleichung 3-13 auch als Gleichung 3-14 geschrieben werden.

$f(\eta_f; \phi_{max}; \phi_t)$ gibt dabei den Einfluss der Feststoffe auf die Viskosität wieder.

Für $f(\eta_f; \phi_{max}; \phi_t) = const.$

vereinfacht sich Gleichung 3-14 zu

$$\eta_s = K_1 + K_2 \cdot \gamma^{n-1} \quad (3-15)$$

Die Gleichung 3-15 zur Beschreibung der Viskosität von Suspensionen entspricht nun dem Ansatz von Herschel und Bulkley (1926) (Gleichung 3-10) für Nicht-Newtonsche Fluide. Eine detaillierte Beschreibung zu weiteren rheologischen Modellen für Suspensionen höherer Konzentration findet sich in Herrmann (2002) und Roche *et al.* (2009a).

Hydrodynamik von Suspensionen

Die Beschreibung der Strömungsverhältnisse von Suspensionen ist sehr komplex und soll hier nur kurz Erwähnung finden. Die Beschreibung der Hydrodynamik ist nicht nur von der Reaktor-Rührorgan Konfiguration abhängig, sondern auch vom gewählten Suspendierkriterium. So kann für das Suspendierkriterium 1 s, mit einer Minimaldauer der in schwebegehaltenen Partikel von 1 s, abhängig von der durchschnittlichen Partikelgröße (d_p) und dem Massenanteil an Partikeln nach Einenkel (1978) und Zlokarnik (2005) der mathematische Zusammenhang von Gleichung 3-16 bis Gleichung 3-18 für Propellerrührer angegeben werden. Wobei für die Exponenten gilt: a = 0,45 bis 0,6; b = -0,2 bis 0,25 und c = 0,25 bis 0,28.

$$Re_{1s} \propto Ar^a \cdot (d_p/d)^b \cdot \phi_m^c \quad (3-16)$$

Mit der Archimedeszahl (Ar)

$$Ar = Re^2 / Fr' \quad (3-17)$$

Wobei die

$$Fr' = Fr \cdot \frac{\rho}{\Delta\rho} = \frac{n^2 \cdot d}{g} \cdot \frac{\rho}{\Delta\rho} \quad (3-18)$$

| | | |
|-----|--------------|---|
| Mit | Ar | Archimedeszahl / - |
| | Fr | Froudezahl / - |
| | Fr' | modifizierte Froudezahl / - |
| | Re | Reynoldszahl / - |
| | ρ | Dichte / kg m ⁻³ |
| | $\Delta\rho$ | Dichtedifferenz der verschiedenen Phasen / kg m ⁻³ |
| | n | Rührerdrehzahl / min ⁻¹ |
| | d | Rührerspitzendurchmesser / m |
| | d_p | Partikeldurchmesser / m |
| | ϕ_m | Massenanteil der dispersen Phase / - |

Neben dem 1 s Kriterium existieren in der Literatur auch andere Suspendierkriterien, wie etwa das 90 % Kriterium, das besagt, dass sich 90 % der Teilchen in Schwebelage befinden. Die Schwarmsinkgeschwindigkeit (w_{ss}) lässt sich nach Zlokarnik (2005) über die Sinkgeschwindigkeit von Einzelpartikeln (w_s) mit Gleichung 3-19 bestimmen:

$$w_{ss} = w_s \cdot f(\phi_t) \quad (3-19)$$

Mit

| | |
|-------------|--|
| w_{ss} | Schwarmsinkgeschwindigkeit / m s^{-1} |
| w_s | Sinkgeschwindigkeit von Einzelpartikel / m s^{-1} |
| $f(\phi_t)$ | empirische mathematische Korrelation / - |

Häufig wird auch der minimale notwendige Leistungseintrag, um suspendierte Partikel bis zu einer Füllhöhe von 90 % des Reaktionsmediums zu verteilen, als mögliches Suspendierkriterium definiert (Kraume und Zehner, 1995; Zlokarnik, 2005). Die empirisch erzeugten Gleichungen 3-16 und 3-19 besitzen einen engen Gültigkeitsbereich und sind damit nicht auf andere Rührsysteme übertragbar.

Leistungscharakteristik von Suspensionen

Die Leistungskennzahl lässt sich für Suspensionen als Funktion der Reynoldszahl (Re), der Froudezahl (Fr) und des Feststoffanteils (Fe) wie in Gleichung 3-20 mit Gleichung 3-21 beschreiben. Der Feststoffanteil (Fe) gibt dabei das Verhältnis von Feststoffmasse zur Gesamtmasse der Suspension an.

$$Ne = f(Re; Fr; Fe) \quad (3-20)$$

Mit der Definition der Froudezahl:

$$Fr = \frac{n^2 \cdot d}{g} \quad (3-21)$$

Dadurch ergibt sich die Fragestellung nach dem minimalen Feststoffanteil (Fe), der für eine Erweiterung der gewohnten Definition der Reynoldszahl (Re) und Newtonzahl (Ne) nach Gleichung 3-1 und Gleichung 3-2 notwendig ist. Nach Weinspach (1969) können Suspensionen hinsichtlich des Leistungseintrages und der Hydrodynamik über die gewohnte Definition der Newton- und Reynoldszahl für homogene Gemische bis zu einem Volumenanteil von $\phi_t < 0,25$ bis 0,30 hinreichend beschrieben werden, wenn geeignete Stoffgrößen für die jeweiligen Suspensionen gewählt werden. Das Nicht-

Newtonsche Verhalten von Suspensionen nimmt mit zunehmendem Volumenanteil der dispersen Phase zu.

Mischzeit und Durchmischungskennzahl von Suspensionen

Ausgehend von Fluiden ohne Dichte- und Zähigkeitsunterschieden wird nachfolgend eine Ähnlichkeitstheoretische Formulierung für die Mischzeit von Suspensionen nach Zlokarnik (1970) und Zlokarnik (2005) aufgezeigt.

Die Geometrie des Rührers wie auch des Behälters bleibe konstant. Somit folgt für die Mischzeit und Durchmischungskennzahl (Gleichung 3-22 und Gleichung 3-23).

$$\theta = f(n; d; \rho; \nu; D; g) \quad (3-22)$$

| | | |
|-----|----------|--|
| Mit | θ | Mischzeit / s |
| | ρ | Dichte / kg m ⁻³ |
| | n | Rührerdrehzahl / min ⁻¹ |
| | D | Reaktordurchmesser / m |
| | d | Rührerspitzen­durchmesser / m |
| | g | Erdbeschleunigung / m s ⁻² |
| | ν | kinematische Viskosität / m ² s ⁻¹ |

In dimensionsloser Schreibweise ergibt sich Gleichung 3-23 für die dimensionslose Durchmischungskennzahl ($n \cdot \theta$):

$$n \cdot \theta = f(Re; Sc; Fr) \quad (3-23)$$

$$Re = \frac{n \cdot d^2}{\nu}$$

| | | |
|-------|----------------------|--------|
| Wobei | $Sc = \frac{\nu}{D}$ | (3-24) |
|-------|----------------------|--------|

$$Fr = \frac{n^2 \cdot d}{g}$$

| | | |
|-----|------|--|
| Mit | Re | Reynoldszahl / - |
| | Sc | Schmidtzahl / - |
| | Fr | Froudezahl / - |
| | D | Diffusionskoeffizient / m ² s ⁻¹ |

Nach Zlokarnik (1967) kann die Diffusionskonstante und die Trombenbildung hinsichtlich der Mischzeit vernachlässigt werden, so dass sich die Gleichungen 3-22 und 3-23 zu den Gleichungen 3-25 und 3-26 vereinfachen:

$$\theta = f(n; d; \rho; \nu) \quad (3-25)$$

Und

$$n \cdot \theta = f(Re) \quad (3-26)$$

Wird nun die Dichte und Viskosität einer zweiten Substanz mit einbezogen, muss die zweite Dichte (ρ_2) und kinematische Viskosität (ν_2) mit integriert sowie das Volumenverhältnis der beiden Phasen (ϕ_t) einbezogen werden. Die Erdbeschleunigung ist notwendig, wenn ein hinreichender Unterschied der Phasen hinsichtlich der Dichte besteht. Für die Mischzeit gilt folgedessen Gleichung 3-27:

$$\theta = f(n; d; \nu_1; \nu_2; \rho_1; \rho_2; \Delta\rho \cdot g; \phi_t) \quad (3-27)$$

Ähnlichkeitstheoretisch ergibt sich für die Durchmischungskennzahl zu Gleichung 3-28:

$$n \cdot \theta = f(Re_1; \nu_2/\nu_1; \rho_2/\rho_1; Ar_1; \phi_t) \quad (3-28)$$

Wobei

$$Re_1 = \frac{n \cdot d^2}{\nu_1} \quad (3-29)$$

$$Ar_1 = \frac{d^3 \cdot \Delta\rho \cdot g}{\nu_1^2 \cdot \rho_1}$$

In diesem Zusammenhang wird nach Zlokarnik (1970) nur die Reynoldszahl (Re) und die Archimedeszahl (Ar) der überwiegenden Mischungskomponente 1 mit einbezogen. Durch die Archimedeszahl werden Dichteunterschiede berücksichtigt und ρ_2/ρ_1 kann vernachlässigt werden.

Zlokarnik (1970) konnte weiter zeigen, dass sich nach der ersten Phase der groben Durchmischung, die weitere Vermischung in einem System abspielt, für die die Gesetze einer homogenen Mischung weiter Bestand haben. Es gilt Gleichung 3-30 und Gleichung 3-31. Dadurch vereinfachen sich Gleichung 3-27 und Gleichung 3-28 für ein Mischsystem aus zwei Komponenten zu Gleichung 3-32 und Gleichung 3-33.

$$\bar{\nu} = f(\nu_1; \nu_2; \phi_t) \quad (3-30)$$

$$\bar{\rho} = f(\rho_1; \rho_2; \phi_t) \quad (3-31)$$

$$\theta = f(n; d; \bar{v}; \bar{\rho}; \Delta\rho \cdot g) \quad (3-32)$$

$$n \cdot \theta = f(Re; Ar) \quad (3-33)$$

| | | |
|-----|------------------|---|
| Mit | θ | Mischzeit / s |
| | $n \cdot \theta$ | Durchmischungskennzahl / - |
| | Ar | Archimedeszahl / - |
| | Re | Reynoldszahl / - |
| | ρ | Dichte / kg m ⁻³ |
| | $\Delta\rho$ | Dichtedifferenz der verschiedenen Phasen / kg m ⁻³ |
| | n | Rührerdrehzahl / min ⁻¹ |
| | d | Rührerspitzendurchmesser / m |
| | g | Erdbeschleunigung / m s ⁻² |
| | ν | kinematischen Viskosität / m ² s ⁻¹ |
| | ϕ_t | Volumenkonzentration der dispersen Phase / - |

3.1.6 Scheinbare Schergeschwindigkeit

Die Einführung von scheinbaren Schergeschwindigkeiten (scheinbaren Scherraten), ermöglicht es einen mathematischen Zusammenhang mit der Rührerdrehzahl herzustellen. Mit Hilfe der scheinbaren Schergeschwindigkeit kann für Nicht-Newtonsche Fluide die Viskosität für ausgewählte Rührerdrehzahlen errechnet werden, beispielsweise um Leistungscharakteristiken von Mischsystemen zu bestimmen. Des Weiteren ist es möglich, zwischen Rührsystemen Maßstabsübertragungen anhand von ähnlichen scheinbaren Schergeschwindigkeiten vorzunehmen. Neben dem Begriff der scheinbaren Schergeschwindigkeit, finden sich in der Literatur auch Begriffe wie mittlere oder effektive Schergeschwindigkeit, die gleiche Bedeutung haben. Die meist empirisch entwickelten Zusammenhänge beruhen auf dem Konzept von Metzner und Otto (1957), der eine lineare Beziehung zwischen Rührerdrehzahl und scheinbarer Schergeschwindigkeit für den laminaren Strömungsbereich nach Gleichung 3-34 beschreiben konnte.

$$\gamma = k \cdot n \quad (3-34)$$

| | | |
|-----|----------|--|
| Mit | n | Rührerdrehzahl / s ⁻¹ |
| | γ | scheinbaren Schergeschwindigkeit / s ⁻¹ |
| | k | Metzner-Otto Konstante / - |

Die für das Rührsystem charakteristische Konstante ist unter dem Begriff der Metzner-Otto Konstanten (k) bekannt. Das Metzner-Otto Konzept wird häufig verwendet, der Geltungsbereich ist jedoch auf laminare Strömungen beschränkt. Der Betrag der Metzner-Otto Konstanten ist eine reaktorspezifische Größe. Metzner und Otto (1957) bestimmten für einen 6-Blatt Scheibenblattrührer $k = 13$. Ducla *et al.* (1983) bestimmte für einen Scheibenblattrührer $k = 11,5$. Alternative Rechenkonzepte und Modelle zur Ermittlung der scheinbaren Scherrate zeigt Hortsch (2011) auf.

3.1.7 Mittlere und lokale Energiedissipation

Nach Henzler und Biedermann (1996) folgt aus der Turbulenztheorie, dass Wirbel ähnlich groß wie die Partikel selbst, für die Partikelbeanspruchung und deren Zerstörung verantwortlich sind. Je nach Partikelgröße und dem Leistungseintrag sind die Partikel Beanspruchungen ausgesetzt. Ein Maß zur Quantifizierung der mittleren Energiedissipation (ε_ϕ) gibt Gleichung 3-35 wieder:

$$\varepsilon_\phi = \frac{P}{\rho \cdot V} \quad (3-35)$$

| | | |
|-----|--------|---------------------------------------|
| Mit | P | mechanischen Leistungseintrag / W |
| | ρ | Dichte / kg m ⁻³ |
| | V | Flüssigkeitsvolumen / m ⁻³ |

Durch ungleichmäßigen Leistungseintrag werden die durch die Flüssigkeitsströmung verteilten Partikel unterschiedlich großen Kräften ausgesetzt, die zudem abhängig sind von der Partikelgröße. Die maximale lokale Energiedissipation (ε_{max}) lässt sich nach Liepe *et al.* (1988) durch Gleichung 3-36 berechnen:

$$\varepsilon_{max} = \frac{c_D \cdot v_{Tip}^3}{h} \quad (3-36)$$

| | | |
|-----|-----------|---|
| Mit | c_D | Dissipationsbeiwert = 0,1 / - |
| | h | Länge des Turbulenzerzeugers senkrecht zur Hauptströmungsrichtung / m |
| | v_{Tip} | Rührerumfangsgeschwindigkeit / m s ⁻¹ |

Die Rührerumfangsgeschwindigkeit (v_{Tip}) kann nach Gleichung 3-37 berechnet werden:

$$v_{Tip} = d \cdot \pi \cdot n \quad (3-37)$$

Mit d Rührerspitzendurchmesser / m
 n Rührerdrehzahl / min^{-1}

Typische Werte für Labor-Rührkesselreaktoren ergeben für das Verhältnis aus maximaler zu mittlerer Energiedissipation ($\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi}$) Werte zwischen 10 und 30 (Liepe *et al.*, 1988, Kresta 1998, Kraume 2003). Für Schüttelkolben konnte Peter *et al.* (2006) $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi}$ zu 3 bis 6 bestimmen.

In gerührten Milliliter-Reaktoren war es Hortsch und Weuster-Botz (2010) möglich, für gasinduzierende Rührorgane ein $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi}$ -Verhältnis von 10 anzugeben. Besonders geringe maximale Energiedissipationen für einen Paddelrührer ergaben ein Energiedissipationsverhältnis von etwa 6 (Hortsch *et al.*, 2010).

3.2 Bioreaktionssysteme

Um neue Enzyme und Enzympräparate für die enzymatische Hydrolyse von lignocellulosehaltigen Materialien zu entwickeln, Enzymgemische in deren Zusammensetzung zu optimieren und dadurch höhere Monosacharidausbeuten mit geringen Enzymkonzentrationen möglich zu machen, ist eine Vielzahl von Versuchen notwendig.

Hier wirkt sich der Einsatz von Parallelsystemen besonders positiv aus, da nicht nur eine zügigere Durchmusterung von Versuchsbedingungen mit einer Vielzahl von gleichzeitig durchgeführten Reaktionen im Parallelansatz möglich wird, sondern auch die eingesetzten Enzymmengen für Durchmusterungsversuche durch miniaturisierte Reaktionsansätze reduziert werden können.

Typischerweise wird die Suche nach geeigneten Substratvorbehandlungen für die enzymatische Hydrolyse und die Optimierung von Enzymzusammensetzungen in Schüttelkolben durchgeführt (Hodge *et al.*, 2009; Roche *et al.*, 2009b).

Neben Schüttelkolbenexperimenten werden enzymatische Hydrolysen auch miniaturisiert in geschüttelten Eppendorfgefäßen (1,5 mL) durchgeführt (Selig *et al.*, 2009). Versuche, die enzymatische Hydrolyse im Parallelansatz durchzuführen, führten

zu einer weiteren Maßstabsverkleinerung. Mikrotiterformate (MTP) scheinen besonders geeignet, da ein hoher Parallelisierungsgrad mit 96 parallel betriebenen Reaktoren und die Integrierbarkeit in automatisierte Laborrobotersysteme gewährleistet ist (Tabelle 3.2). In den letzten Jahren wurde damit begonnen, einzelne Prozessschritte der enzymatischen Hydrolyse von pflanzlichen Materialien in deren monomere Bausteine zu automatisieren. Besonders anspruchsvoll ist dabei die Probennahme aus dem feststoffhaltigen Reaktionsgemisch, die sehr feine Feststoffpartikel und -beladungen notwendig macht. Die dargestellten Hochdurchsatzverfahren zeigen ein hohes Maß an Parallelisierbarkeit durch eine 96-fache Anordnung der miniaturisierten Reaktoren. Diese sind jedoch auf niedrige Feststoffanteile und geringe Partikelgrößen limitiert (Tabelle 3.2). Jäger *et al.* (2011a) führte parallelisierte Durchmusterungsversuche mit Cellulasen an amorpher und mikrokristalliner Cellulose mit einer Partikelgröße kleiner $70\ \mu\text{m}$ und einem Feststoffanteil von $2,5\ \text{g L}^{-1}$ mit geschüttelten Mikrotiterplatten durch. Chundawat *et al.* (2008) konnte die enzymatische Hydrolyse von Maisstroh automatisieren, in dem einzelne Mikrotiterplatten jeweils als Substratvorlagengefäß, Enzymvorlagengefäß und als Reaktionsgefäß verwendet wurden. Studer *et al.* (2010) entwickelte ein 96-fach parallelisiertes Reaktorsystem, das neben der enzymatischen Hydrolyse auch die davor notwendige Vorbehandlung im miniaturisierten Maßstab ermöglicht.

Santoro *et al.* (2010) machte deutlich, dass eine vollständige Automatisierung beginnend bei der gleichmäßigen Verteilung des Pflanzenmaterials über die Vorbehandlung des Substrats, den enzymatischen Abbau bis hin zur automatisierten Bestimmung der Monosaccharide, Glucose und Xylose möglich ist. Dieses Verfahren arbeitet jedoch mit einem Anteil der festen Phase von nur 0,18 %. Einen höheren Feststoffanteil konnte Song *et al.* (2010) mit 2 % (w/w) vorbehandeltem Maisstroh realisieren.

Wesentlich höhere Feststoffanteile ermöglicht Roche *et al.* (2009b) mit im Labor-Maßstab als Reaktoren eingesetzten rollenden Flaschen. Die Skalierbarkeit konnte vom 125 mL und 250 mL Maßstab in den 2000 mL Maßstab, für einen Feststoffanteil von 20 % säurevorbehandelten Maisstroh gezeigt werden.

Tabelle 3.2: Miniaturisierte Bioreaktionssysteme zur enzymatischen Hydrolyse von Pflanzenmaterialien. Nachbau einer Mikrotiterplatte mit anderen Abmessungen (*), nicht bekannt (NB).

| Reaktions-system | Literatur | Reaktor-anzahl | Natursubstrat | Reaktions-volumen | Feststoffanteil | Partikelgröße | Misch-system |
|--------------------|--------------------------------|----------------|----------------------------------|--------------------------|--------------------|---|--------------|
| Mikrotiter-platte | Chundawat <i>et al.</i> (2008) | 96 | Maisstroh | 250 - 1500 μL | 0,1 - 1 % Glucan | < 100 μm | gerührt |
| Mikrotiter-platte | King <i>et al.</i> (2009) | 96 | Maisstroh, Rutenhirse | 180 μL | 1 % (w/w) Substrat | 50 μm bei kristalliner Cellulose | gerührt |
| Mikrotiter-platte | Santoro <i>et al.</i> (2010) | 96 | verschiedene Pflanzenmaterialien | 800 μL | 0,18 % Substrat | 55 μm bei Maisstroh | NB |
| Mikrotiter-platte* | Studer <i>et al.</i> (2010) | 96 | Maisstroh | - 320 μL | 1 % (w/w) Substrat | 180 - 850 μm | geschüttelt |
| Mikrotiter-platte | Song <i>et al.</i> (2010) | 96 | Weizenstroh | 250 μL | 2 % (w/w) Substrat | 500 μm | gerührt |

Paralleles Rührkesselreaktorsystem

Einen neuen Ansatz für die Kultivierung aerober Mikroorganismen verfolgten Puskeiler *et al.* (2005a) und Weuster-Botz *et al.* (2005b) durch die 48-fache parallele Anordnung gerührter Reaktoren im Milliliter-Maßstab (Abbildung 3.8). Als Reaktoren kommen Einwegreaktoren, je nach Anwendungsbereich mit oder ohne Strömungsbrecher zum Einsatz (Kusterer *et al.*, 2008; Hortsch *et al.*, 2010). Diese sind aus Polystyrol gefertigt. Das Arbeitsvolumen beträgt 8 mL bis 15 mL.

Während bei Mikrotiterplatten nur wenige verfahrenstechnisch greifbare Informationen bekannt sind, konnten Hortsch und Weuster-Botz (2010) ausführlich über verfahrenstechnische Kenngrößen, wie dem volumenspezifischen Leistungseintrag und die maximale Energiedissipation in gerührten Milliliter Reaktoren berichten. So beträgt der Leistungseintrag bei 1800 min^{-1} etwa 5 W L^{-1} . Dies erleichtert die verfahrenstechnische Einordnung des Reaktionssystems und ermöglicht eine zuverlässige Skalierbarkeit in größere Maßstäbe. Ein vergleichbarer Leistungseintrag ist im Liter-Maßstab bereits bei 900 min^{-1} vorhanden. Des Weiteren konnte erfolgreich eine automatisierte Prozessüberwachung und -kontrolle anhand verschiedener Mikroorganismen gezeigt werden.



Abbildung 3.8: Rührkesselreaktorsystem bestehend aus 48 parallel betriebenen Rührreaktoren im Milliliter-Maßstab.

Kusterer *et al.* (2008) konnte die Automatisierung am Modellorganismus *Escherichia coli*, mit kontrollierten pH und pO_2 , zweier unverzichtbarer Parameter bei der aeroben Kultivierung von Mikroorganismen, darstellen. Die Überwachung der Parameter erfolgt dabei *online* und ermöglicht somit eine schnelle Korrektur bei abweichenden Werten.

Die *online* Messung kann durch am Reaktorboden immobilisierte chemische Sensoren für pH und pO_2 gewährleistet werden. Eine *atline* automatisierte Analytik von Biomassekonzentrationen und Substrat- oder Produktkonzentrationen konnten Knorr *et al.* (2007) und Vester *et al.* (2009) zeigen. So konnte das 48-fache Reaktionssystem in den letzten Jahren erfolgreich für die automatisierte Kultivierung weiterer Mikroorganismen *Bacillus subtilis* (Knorr *et al.*, 2007; Vester *et al.*, 2009), *Saccharomyces cerevisiae* (Gebhardt, 2010), *Cupriavidus necator* (Hoefel *et al.*, 2010) und *Streptomyces tendae* (Hortsch *et al.*, 2010), sowie für biokatalytische Umsetzungen (Dennewald *et al.*, 2012) eingesetzt werden.

3.3 Pflanzenbasierte Substrate

Um Pflanzen als Substrate für biotechnologische Anwendungen verwenden zu können, ist die Kenntnis zu deren Aufbau notwendig. Ding und Himmel (2008) berichten vom Aufbau der Maispflanze (*Zea mays L.*) und klassifizieren die Zellwand in einen primären und einen sekundären Teil. Die Bildung der primären Zellwand findet in der ersten Phase des Zellwachstums statt. Die primäre Zellwand enthält zu Beginn kein Lignin. Nach Beendigung der Wachstumsphase der Maiszelle bildet sich die sekundäre Zellwand aus. Diese besitzt einen hohen Ligninanteil. Meistens entsteht bei der Ausbildung der sekundären Zellwand eine teilweise Lignifizierung der primären Zellwand, wobei der Anteil des Lignins in der primären Zellwand variieren kann. Die sekundäre Zellwand ist dabei die stabilitätsverleihende Komponente (Delmer und Amor, 1995). Abbildung 3.9 veranschaulicht den Aufbau einer Pflanzenzelle. Die Cellulosestränge, auch Mikrofibrillen genannt, sind umgeben von Hemicellulose- und Ligninstrukturen und befinden sich geschützt im Inneren der Zellstruktur.

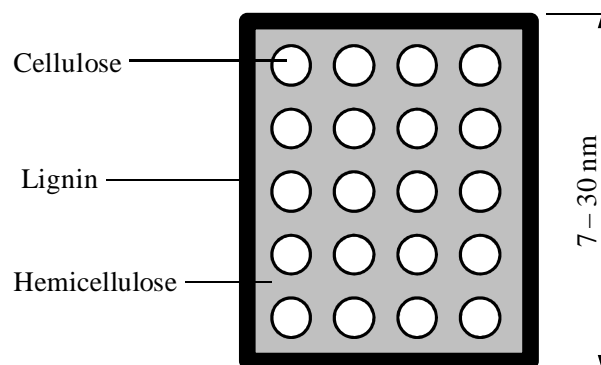


Abbildung 3.9: Schematischer Aufbau der Lignocellulose nach Zhang und Lynd (2004).

3.3.1 Polysaccharide und Lignin

Polysaccharide in der Zellwand lassen sich in Polymere mit hoher immer wiederkehrender Ordnung (Cellulose) und in quervernetzte, aus unterschiedlichen Monomeren aufgebaute Polymere einteilen. Darunter sind Polymere bestehend aus Glucan, Xylan, Mannan und Pectin zu verstehen. Im Folgenden werden die einzelnen Komponenten erläutert.

Cellulose

Die Cellulose wird als eines der häufigsten Polymere weltweit angesehen, da sie mit 35 % bis 50 % das Hauptprodukt der gebildeten Biomasse aus Pflanzen darstellt (Lynd *et al.*, 2002). In Abbildung 3.10 ist dazu ein Maisstrohhallen kurz nach dem Erntevorgang und vergrößert im Raster-Kraft-Mikroskop (AFM) veranschaulicht. Deutlich sind die einzelnen Cellulosestränge, die Mikrofibrillen zu erkennen.

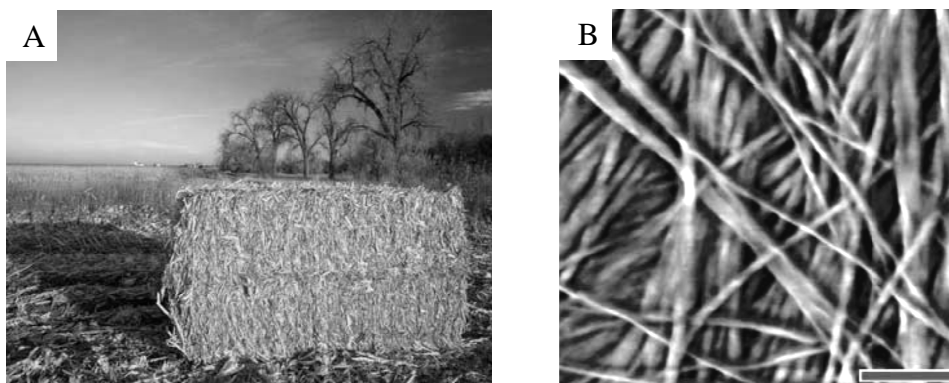


Abbildung 3.10: Maisstrohhallen geerntet im Norden von Colorado USA (A). Mikroskopische Aufnahme (AFM) von Maisoberflächen (B). Mikrofibrillen mit einem Durchmesser von 3 nm bis 5 nm. Maßstab 50 μm (Himmel *et al.*, 2007).

Zellen der häufig als Modellorganismus verwendeten Pflanze *Arabidopsis thaliana* bilden Cellulose-Synthase-Komplexe (CeIS) auch Rosetten genannt, die sich in einer hexagonalen Struktur anordnen und verantwortlich sind für die Bildung von Elementarfibrillen der Cellulose (Ding und Himmel, 2008). Der Cellulose-Synthase-Komplex besteht aus Untereinheiten den sogenannten Cellulose-Synthase-Proteinen (CesA), wobei mindestens drei verschiedene Untereinheiten existieren ($\alpha 1$, $\alpha 2$ und β). Aus den Untereinheiten werden Rosetten gebildet, wie in Abbildung 3.11 ersichtlich. Einzelne Rosetten gruppieren sich zu Rosettenfeldern, wobei für den Aufbau häufig die Zahl von 36 CesA-Proteinen genannt wird, die langkettige Elementarfibrillen bestehend

aus β -1,4-Glucanketten ausbilden und eine hochgeordnete Struktur besitzen (Himmel *et al.*, 2007).

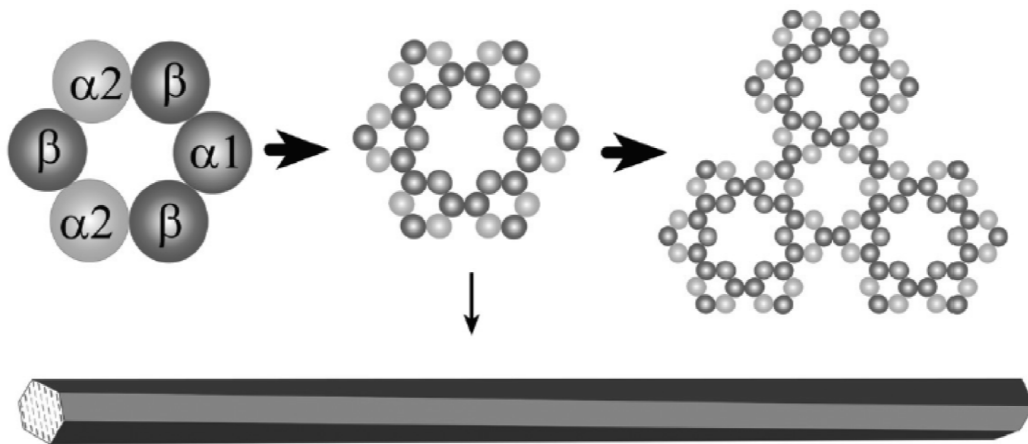


Abbildung 3.11: Modell für die Bildung von Cellulose Rosetten und der Synthese von Cellulose Mikrofibrillen pflanzlicher Zellwände (Ding und Himmel, 2008).

Durch die Gruppierung einzelner Mikrofibrillen entstehen letztlich Makrofibrillen. Makrofibrillen können einen Durchmesser von 50 nm bis 250 nm besitzen (Ding und Himmel, 2008). Hemicellulose wird innerhalb des Golgi-Apparats synthetisiert und umgibt die Mikrofibrillen der Cellulose. Cellulose entsteht in der Plasmamembran der Zelle (Delmer und Amor, 1995; Urbanowicz *et al.*, 2004).

Cellulosefibrillen besitzen einen hohen Ordnungsgrad und sind kristallin durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbindungen fixiert. Die langen, nicht quervernetzten kettenförmigen Polymere bestehen aus Cellobiose Untereinheiten. Cellobiose ist ein Disaccharid der Glucose, in der die beiden β -Glucopyranosen um 180° verdreht angeordnet sind.

Die dadurch entstehenden van-der-Waals Kräfte führen zu einer Stabilisierung des Polymers, wodurch das Molekül eine planare Struktur annimmt und kristalline Strukturen, die Mikrofibrillen entstehen (Mohan *et al.*, 2006; Mohnen *et al.*, 2008). Der Grad der Polymerisation von β -(1,4)-D-Glucopyranosen kann nach Harris und Stone (2008) bis zu 6000 Glucoseeinheiten in der primären Zellwand und bis zu 14000 Glucoseeinheiten in der sekundären Zellwand umfassen. Die Anzahl der Glucoseeinheiten variiert mit der Pflanzenart und liegt bei Holzprodukten zwischen 7000 und 10000. Bei Baumwolle können bis zu 15000 Glucoseeinheiten polymerisieren. Der Grad der Kristallinität wird durch den Kristallinitätsindex beschrieben, der abhängig von der Pflanzenart ist. Für Baumwollfasern beträgt dieser

etwa 0,7 und ist damit höher als für Holzfasern (Yu *et al.*, 2008). Für die Spaltung der β -(1,4)-glycosidischen Bindung sind hohe Temperaturen (240 °C bis 350 °C) und extreme pH-Bedingungen notwendig (Mohan *et al.* 2006).

Hemicellulose

Die Hemicellulose besteht aus verschiedenen Polysacchariden. Die monomeren Grundbausteine umfassen die Moleküle β -D-Glucose, β -D-Mannose, α -D-Galactose als 6-fach Zucker, sowie β -D-Xylose und α -L-Arabinose als 5-fach Zucker. Des Weiteren sind die Uronsäuren α -D-Glucuronsäure und α -D-Galacturonsäure enthalten (Gírio *et al.*, 2010). In geringer Konzentration können auch weitere Zuckermoleküle wie beispielsweise Rhamnose enthalten sein. Der Polymerisationsgrad von Hemicellulose ist mit 100 bis 200 deutlich kleiner als von Cellulose. Die Hemicellulose liegt in amorpher Form vor und kann dadurch leichter hydrolysiert werden (Yu *et al.*, 2008).

Harris und Stone (2008) geben eine Übersicht über die Bedeutung von Polysacchariden der Hemicellulose:

β -(1,3;1,4)-D-Glucane: Lineare nicht verzweigte Polymere mit β -D-Glucopyranosen. Vorkommen in Gräsern und verwandten Pflanzen in der sekundären Zellwand, in der primären Zellwand in geringerer Konzentration.

Heteroglucane/Xyloglucane: Mit Cellulosefibrillen verbunden. Vorkommen in der primären Zellwand von Pflanzen. Viele β -(1,4)-Glucopyranosyl mit α -(1,6)-Xylopyranosyl Verbindungen und Acetylgruppen

Heteroxylane: Hauptkomponente der Hemicellulose. β -(1,4)-D-Xylopyranosen mit zahlreichen Substituenten. Vorkommen in Gräsern in der primären und sekundären Zellwand. Im Weich- und Hartholz nur in der sekundären Zellwand. 4-O-Methyl- α -D-Glucuronsäure bei Harthölzern an etwa jedem zehnten Xylopyranosidrest. Bei vielen Grasarten mit L-Arabinofuranosyl-, D-Xylopyranosyl-, D-Galactopyranosyl- und L-Galactopyranosyl-Seitenketten. Ferula- und p-Coumar-

säure verestert nur in geringer Konzentration. Heteroxylyane in Gräsern wie Weizen-, Gersten- und Reisstroh enthalten etwa 50 % alkalisch instabile Substituenten, mit etwa 50 % bis 70 % Acetylgruppen (Chesson *et al.*, 1983).

Heteromannane: Besitzen eine lineare Kette aufgebaut aus β -(1,4)-D-Mannopyranosyl- und β -D-Glucopyranosylresten. α -D-Galactopyranosyl-Seitenketten über (1,6)-Bindungen mit den Mannopyranosen und Glucopyranosen verbunden.

Pectine: Komplexeste Gruppe von Polysacchariden. Meist in der primären Zellwand vorhanden. Aufbau durch (1,4)-verknüpfte Galacturonsäuren (O'Neill *et al.*, 1990; Mohnen *et al.*, 2008). Polysaccharidfamilie: Homogalacturonan, Rhamnogalacturonan I, Rhamnogalacturonan II, Xylogalacturonan und Apiogalacturonan. Es wird vermutet, dass an der Synthese von Pectinen mindestens 58 Enzyme beteiligt sind, darunter Methyltransferasen, Acetyltransferasen und viele Glycosyltransferasen (Mohnen, 2002).

Arabino-3,6-Galctane: Wasserlösliche Polysaccharide im Weich- und Hartholz.

Lignin

Davin *et al.* (2008) bezeichnet Lignine als eine der metabolisch wertvollsten Produkte, die Pflanzen synthetisieren und betrachtet es als eine Herausforderung des 21. Jahrhunderts, Lignine nutzbar zu machen. Die meisten Lignine stammen von den Monomeren, den Monolignolen p-Coumarylalkohol, Coniferylalkohol und dem Sinapylalkohol ab. Lignine werden als amorphe Phenylpropanoid Polymere angesehen. Sie sind hydrophob, schwer zu isolieren und in ihre Bestandteile zu überführen. Lignin reduziert die Zuckerausbeute aus dem Pflanzenmaterial während der enzymatischen Hydrolyse (Studer *et al.*, 2011). Eine Verringerung der Ligninanteile, geringeres hydrophobes Verhalten und ein Aufbrechen der vernetzten Ligninstrukturen sollten die Zuckerausbeute steigern (Grabber, 2005).

Interaktionen zwischen Cellulose, Hemicellulose und Lignin

In lignocellulosehaltigen Materialien existieren Interaktionen zwischen den enthaltenen Fraktionen Cellulose, Hemicellulose und Lignin (Harris und Stone, 2008). Neben den nicht kovalenten Bindungen, wie Wasserstoffbrücken-Bindungen und van-der-Waalsschen Wechselwirkungen, treten zwischen den einzelnen Fraktionen auch kovalente Bindungen auf. Kovalente Bindungen existieren zwischen den Polysacchariden, zwischen den Polysacchariden und dem Ligninpolymeren, den Polysacchariden und Zellwandproteinen und unter den Zellwandproteinen. Häufig sind die Polymere durch Esterverbindungen verknüpft. Bei Polysaccharid-Lignin Verknüpfungen treten auch Ester-Ether Bindungen unter Einbindung von Ligninmonomeren (Hydroxycinnamate) auf. Experimentell nachgewiesen wurde bei Lignin-Polysaccharid Verknüpfungen auch die Phenyl-Glycosidische Bindung (Koshijima und Watanabe, 2003; Joseleau und Kesraoui, 1986).

Das Lignin befindet sich hauptsächlich in der sekundären Zellwand von Pflanzen- und Holzmaterialien. Es überlagert die Mikrofibrillen der Cellulose sowie die Polysaccharide der Hemicellulose. Dabei schützen die ausgebildeten kovalenten Bindungen untereinander vor der Zersetzung der Lignocellulose. Wasserstoffbrücken-Bindungen treten vermehrt auch zwischen den Polysacchariden der Hemicellulose bzw. zwischen Polysacchariden der Hemicellulose und den Cellulosemikrofibrillen auf.

3.3.2 Zusammensetzung verschiedener Pflanzenmaterialien

Die anteilige Zusammensetzung der verschiedenen Fraktionen Cellulose, Hemicellulose und Lignin ist in der Tabelle 3.3 für Pflanzenmaterialien dargestellt. Die Cellulose als größte Fraktion liegt bei Holzarten mit bis zu 50 % anteilig etwas höher als bei Weizen- oder Maisstroh mit bis zu 45 %. Weizenstroh scheint mehr Lignin als Maisstroh zu besitzen. Die zweitgrößte Fraktion, die Hemicellulose, ist mit bis zu 30 % in Weichhölzern und bis zu 35 % in Maiskolben bzw. -körnern enthalten. Je nach Art des Weichholzes kann der Gehalt der Hemicellulose stark schwanken. Neben der Pflanzenart bestimmen besonders auch die Umweltbedingungen während des Wachstums die Zusammensetzung der Biomasse.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung verschiedener Pflanzenmaterialien

| Material | Cellulose / % (w/w) | Hemicellulose / % (w/w) | Lignin / % (w/w) | Literatur |
|-----------------|--------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Hartholz | 48 - 50 | 25 - 27 | 19 - 23 | Yu <i>et al.</i> (2008) |
| Weichholz | 41 - 45 | 20 - 30 | 26 - 28 | Yu <i>et al.</i> (2008) |
| Weizenstroh | 45 | 24 | 21 | Yu <i>et al.</i> (2008) |
| Maisstroh | 37 | 24 | 18 | Yu <i>et al.</i> (2008) |
| Maiskorn (a) | 15 ^a | 35 | 8 | Saha (2003) |
| Maiskolben | 45 | 35 | 15 | Saha (2003) |
| Reisstroh | 35 | 25 | 12 | Saha (2003) |
| Zuckerrohr | 40 | 24 | 25 | Saha (2003) |
| Rutenhirse | 45 | 30 | 12 | Saha (2003) |
| Bermudagrass | 25 | 35 | 6 | Saha (2003) |

a) enthält 20 % Stärke

3.4 Enzymatische Hydrolyse von Polysacchariden

Klempnauer *et al.* (2006) beschreibt Enzyme als makromolekulare Biokatalysatoren. Diese können dabei sowohl intrazellulär im Stoffwechsel, als auch extrazellulär katalytisch aktiv wirken. Zu den extrazellulären Enzymen zählen beispielsweise Hydrolasen wie Cellulasen. Die Einteilung der Enzyme in Enzymklassen erfolgt anhand der von ihnen katalysierten Reaktion. Die Enzyme werden in sechs Hauptklassen, die in Tabelle 3.4 dargestellt sind, eingeteilt. In der Hauptklasse 3 sind die Hydrolasen als die am häufigsten angewendete Enzymklasse eingruppiert (Jeromin und Bertau, 2005).

3.4.1 Enzyme für den Abbau von Lignocellulose

Für die Verzuckerung von Polysacchariden lignocellulosehaltiger Materialien sind verschiedene Enzyme notwendig. Diese wirken synergistisch zusammen, wodurch ein effektiver Abbau zu Monosacchariden erst möglich wird. In der Tabelle 3.5 ist eine Auswahl von Enzymen für die Hydrolyse von pflanzenbasierten Materialien zusammengefasst. Die Klassifizierung der Enzyme lässt sich an der (E.C.)-Nummer (*Enzyme Commission*-Nummer) erkennen.

Tabelle 3.4: Einteilung der Enzyme in Enzymklassen (IUB, 1992).

| Bezeichnung | Eigenschaften |
|--------------------|--|
| Hydrolasen | Hydrolyse von Glykosiden, Estern, Amiden, Laktonen, Laktamen, Epoxiden, Nitrilen, Anhydriden |
| Oxidoreduktasen | Oxidations- und Reduktionsreaktionen: Oxygenierung von C-H, C-C oder C=C-Bindungen bzw. Addition oder Entfernung von Wasserstoffatomäquivalenten |
| Transferasen | Übertragung funktioneller Gruppen: Aldehyd-, Keto-, Zucker-, Methyl-, Acryl-, Phosphorylgruppen |
| Lyasen | Eliminierung oder Addition kleiner Moleküle an C=C-, C=O- bzw. C=N- Bindungen |
| Isomerasen | Katalyse von Isomerisierungen (z. B. Razemisierung, Epimerisierung) |
| Ligasen | Bildung oder Spaltung von kovalenten C-O-, C-N-, C-S- bzw. C-C-Bindungen verbunden mit der Spaltung von Triphosphaten |

Tabelle 3.5: Auswahl von Enzymen, die an der Hydrolyse von Pflanzenmaterialien beteiligt sind (Decker *et al.*, 2008). * β -Glucanasen, ** β -Xylanasen, ***depolymerisierende Hydrolasen, ****Hydrolasen zum Abbau von Quervernetzungen.

| IUPAC | Name | Bevorzugte Substrate | Vorwiegendes Produkt | Verbindung |
|-----------------|--|---|--------------------------------|--|
| E.C. 3.2.1.4* | Cellulase | Cellulose, β -Glucan, β -Glucanverbindungen | Glucan-oligomere | β -(1,4)-D-Glucosyl |
| E.C. 3.2.1.6* | Endo- β -(1,3(4))-Glucosidase | β -Glucanverbindungen | Glucan Oligomere | β -(1,3(4))-D-Glucosyl |
| E.C. 3.2.1.21* | β -Glucosidase | Cellobiose, Glucan-oligomere | Glucose | β -(1,4)-D-Glucosyl |
| E.C. 3.2.1.74* | Glucan β -(1,4)-Glucosidase | Oligomere der Cellulose | Glucose | Exo- β -(1,4)-D-Glucosyl |
| E.C. 3.2.1.91* | Cellulose β -(1,4)-Cellobiohydrolase | Cellulose | Cellobiose | Nicht-reduzierendes Ende β -(1,4)-D-Glucosyl |
| E.C. 3.2.1.150* | Oligoxyloglucan Cellobiohydrolase | Xyloglucane | Cellobiose | Reduzierendes Ende β -(1,4)-D-Glucosyl |
| E.C. 3.2.1.8** | Endo- β -(1,4)-Xylanase | Xylan | Xylan Oligomere | β -(1,4)-D-Xylosyl |
| E.C. 3.2.1.32** | Xylan Endo- β -(1,3)-Xylosidase | β -(1,3)-Xylane | β -(1,3)-Xylan Oligomere | β -(1,3)-D-Xylosyl |
| E.C. 3.2.1.37** | Xylan β -(1,4)-Xylosidase | Xylan | Xylose | Reduzierendes Ende β -(1,4)-D-Xylosyl |

| IUPAC | Name | Bevorzugte Substrate | Vorwiegendes Produkt | Verbindung |
|-----------------------|---|---|---|--|
| E.C. 3.2.1.72** | Xylan β -(1,3)-Xylosidase | β -(1,3)-Xylane | Xylose | Nicht-reduzierendes Ende β -(1,4)-D-Xylosyl |
| E.C. 3.2.1.136** | Glucuronoarabinoxylan Endo- β -(1,4)-Xylanase | Glucuronofexan (Feruloylarabinoxylan) | Xylan | β -(1,4)-D-Xylosyl |
| E.C. 3.2.1.25*** | β -Mannosidase | Mannan, Mannan-oligomere | Mannose | Nicht-reduzierendes Ende β -(1,4)-D-Mannosyl |
| E.C. 3.2.1.78*** | Mannan Endo (1,4)- β -Mannosidase | Mannan, Glucomannan, Galactomannan | Mannan Oligomere | β -(1,4)-D-Mannosyl |
| E.C. 3.2.1.89*** | Arabinogalactan Endo- β -(1,4)-Galactosidase | Arabinogalactan, Pectin | Galactose Oligomere | β -(1,4)-D-Galactosyl |
| E.C. 3.2.1.99*** | Arabinan Endo- α -(1,5)-L-Arabinosidase | Arabinan | Arabinan Oligomere | α -(1,5)-L-Arabinosyl |
| E.C. 3.2.1.100*** | Mannan β -(1,4)-Mannobiosidase | Mannan | Mannobiose | Nicht-reduzierendes Ende β -(1,4)-D-Mannosyl |
| E.C. 3.2.1.145*** | Galactan β -(1,3)-Galactosidase | Arabinogalactan | Galactose | Nicht-reduzierendes Ende β -(1,3)-D-Galactosyl |
| E.C. 3.1.1.72**** | Acetylxylan-Esterase | O-Acetylxylan | Essigsäure | Xylose-O-Acetyl |
| E.C. 3.1.1.73**** | Ferulasäure-Esterase | Feruloyloxylan | Ferulasäure | Arabinose-O-feruloyl |
| E.C. 3.1.1.6**** | Acetyl-Esterase | O-Acetyl Xylane/Xylo-oligomere | Essigsäure | Xylose-O-Acetyl |
| E.C. 3.2.1.131**** | Xylan α -(1,2)-Glucuronosidase | 4-O-Methyl-Glucuronoxylan | Glucuronsäure, 4-O-Methyl Glucuronsäure | α -(1,2)-D-Glucuronosyl |
| E.C. 3.2.1.139**** | α -Glucuronidase | 4-O-Methyl-Glucuronoxylan | Glucuronsäure, 4-O-Methyl Glucuronsäure | α -(1,2)-D-Glucuronosyl |
| E.C. 3.2.1.55**** | α -L-Arabinofuranosidase | Arabinan, Arabinogalactan, Arabinoxylan | L-Arabinose | α -(1,3(5))-L-Arabinosyl |

3.4.2 Cellulosom

In der Natur erfolgt der Abbau von Cellulose mit einer Vielzahl an Mikroorganismen. Mit Bakterien und Pilzen kann dies auf unterschiedliche Weise geschehen. Während die wesentlichsten Merkmale bei den extrazellulär vorliegenden Enzymen das katalytische

Zentrum und die Cellulose-Bindungs-Domäne sind, zeigen Cellulasesysteme von anaeroben Mikroorganismen einen komplexen membrangebundenen Aufbau, das Cellulosom dargestellt in Abbildung 3.12. Das Cellulosom stellt einen Multienzymkomplex dar (Bayer *et al.*, 2008). Dieses wird auch als nicht-freie Cellulasen bezeichnet, was auf die Bindung des Cellulosoms an die Zellmembran hinweist. Im Jahr 1983 wurden die Cellulasen integriert in einen hochmolekularen Enzymkomplex identifiziert (Lamed *et al.*, 1983; Bayer *et al.*, 1998).

Das Cellulosom besteht aus unterschiedlichen Modulen, die dem strukturellen Aufbau und der katalytischen Wirksamkeit dienen. Die Gesamtmasse des Cellulosoms von *Clostridium thermocellum* wird auf über 2 MDa geschätzt (Bayer *et al.*, 2004; Doi und Kosugi, 2004). Zu den nicht katalytischen strukturellen Merkmalen zählen *scaffoldin* Untereinheiten. Diese binden die enzymatisch wirksamen Untereinheiten in den Multienzymkomplex durch *cohesin-dockerin* Interaktionen mit ein (Gerngross *et al.*, 1993; Fujino *et al.*, 1993; Shoseyov *et al.*, 1992; Poole *et al.*, 1992; Boraston *et al.*, 2004).

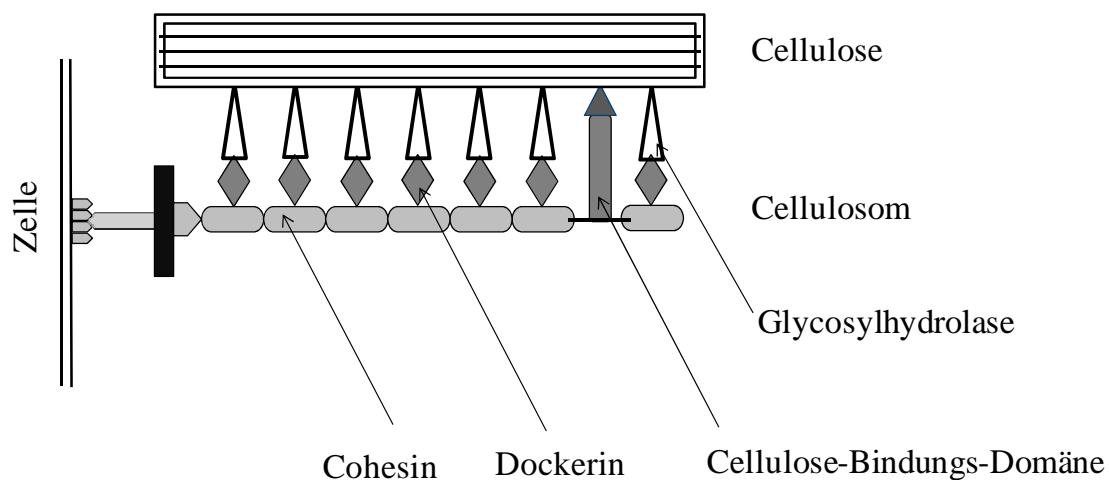


Abbildung 3.12: Aufbau eines bakteriellen Cellulosoms nach Kumar *et al.* (2008).

Der Aufbau und der Ablauf der enzymatischen Hydrolyse in einem Cellulosom wird häufig als besonders effizient unter den Cellulasesystemen von Mikroorganismen angesehen (Bayer *et al.*, 2004; Doi und Kosugi, 2004; Moraïs *et al.*, 2011; Schwarz, 2001).

Die meisten Cellulosome enthalten nicht nur Cellulasen, sondern auch viele andere Enzyme wie Pectinasen und Hemicellulasen. So enthält das Genom von anaeroben

Bakterien etwa zwischen 60 bis 170 *dockerin* Proteine, wobei die Mehrheit nicht cellulolytisch wirksam und auch nicht am Abbau von Pectin und Hemicellulose beteiligt ist.

Die Bindung des Cellulosoms an mikrokristalline Cellulose wird durch das Cellulose-Bindungs Modul (CBM) hervorgerufen (Shoseyov *et al.*, 1992; Poole *et al.*, 1992). Weiter erfolgt auch die Wechselwirkung mit amorpher Cellulose durch CBM. Die Bindung des Cellulosoms an Cellulose kann durch eine Verringerung der vorherrschenden Ionenstärke abnehmen (Lamed *et al.*, 1985). Ein hoher Salzgehalt erhöht hingegen die Bindungsfähigkeit der CBM an das Substrat. Zu hohe Salzkonzentrationen wirken negativ auf die enzymatische Aktivität.

Aktuelle Fragestellungen hinsichtlich des Cellulosoms beschäftigen sich u.a. mit der gezielten Veränderung des Cellulosoms, synthetische Cellulosome (Mitsuzawa *et al.*, 2009), wie beispielsweise der Synthese von *hybrid scaffoldin* Molekülen, die *cohesine* unterschiedlicher Bindungsspezifitäten aus verschiedenen Mikroorganismen enthalten, um letztlich Enzympräparate mit höherer Cellulaseaktivität zu erzeugen (Wilson, 2009). Des Weiteren wurden drei Endoxylanasen und eine β -Xylosidase aus dem Bakterium *Thermobifida fusca* in ein synthetisches Cellulosom integriert, wobei die Synergieeffekte der vier Xylanasen innerhalb des Cellulosoms größer waren als in ungebundener Form (Moraïs *et al.*, 2011).

3.4.3 Cellulasen

Für die Spaltung von Lignocellulose wie in Kapitel 3.3 beschrieben, sind aufgrund der heterogenen Struktur mehrere Enzyme notwendig. Bansal *et al.* (2009) beschrieb den Hydrolysevorgang von Cellulose folgendermaßen:

1. Adsorption der Cellulasen auf dem Substrat über eine Cellulase-Bindungs-Domäne (Ståhlberg *et al.*, 1991).
2. Erkennen einer möglichen Hydrolysestelle (Jervis *et al.*, 1997) wie beispielsweise freier Enden für Exocellulasen oder spaltbare Stellen für Endocellulasen.
3. Bildung eines Enzym-Substrat Komplexes (Divne *et al.*, 1998, Mulakala und Reilly, 2005).

4. Hydrolyse der β -glycosidischen Bindung und gleichzeitiges „wandern“ der Enzyme entlang der Cellulosefibrille (Divne *et al.*, 1998; Mulakala und Reilly, 2005).
5. Desorption der Cellulasen vom Substrat.
6. Hydrolyse der Cellobioseeinheiten in Glucose durch β -(1,4)-Glucosidase.

Weitere Einflussmöglichkeiten bestehen durch Produktinhibierung (Bezerra und Dias, 2005; Holtzapfle *et al.*, 1990; Xiao *et al.*, 2004) und weitere Veränderungen der Substratbeschaffenheit während der Hydrolyse.

Cellulasen bestehen aus Endo- und Exoglucanasen sowie β -(1,4)-Glucosidasen (de Vries und Visser, 2001). Diese Enzyme stammen historisch aus der Saft-, Wein- und Bierherstellung und sind bereits seit etwa 1930 bekannt (Bhat, 2000). Gemessen am Umsatz stellen Cellulasen das drittgrößte Enzymprodukt weltweit dar. Neben der Verwendung in der Saft- und Weinproduktion zählen die Baumwollindustrie sowie Anwendungen in der Altpapieraufarbeitung zu den Haupteinsatzfeldern von Cellulasen. Durch eine mögliche großtechnische Verwendung bei der Herstellung von Ethanol und Butanol als Treibstoff würden Cellulasen sicherlich zu den meist produzierten Enzymen weltweit zählen (Wilson, 2009).

Bei Cellulasen lassen sich generell zwei Wirkmechanismen unterscheiden (Abbildung 3.13). Ein wesentlicher Unterschied zwischen den *retaining* und den *invertig* wirksamen Enzymen stellt die Tatsache dar, dass Erstere eine Transglycosylierung katalysieren, während *invertig* mechanistische Enzyme dazu nicht in der Lage sind (Blanchard und Withers, 2001; Withers, 2001).

Der *invertig* Mechanismus beschreibt das Spalten der β -(1,4)-glycosidischen Bindung am anomeren C-Atom durch zwei Carboxylgruppen, die jeweils sauren und basischen Charakter besitzen. Durch einen nucleophilen Angriff kommt es zur Elektronenwanderung, wobei eine Carboxylgruppe als Elektronendonator und die jeweils andere Carboxylgruppe als Elektronenakzeptor fungiert. Entsprechend werden die C-1 und C-4 Enden hydrolysiert und die Sesselkonfiguration der Glucose (α -Form) gebildet. Der *retaining* Mechanismus beschreibt eine Carboxylgruppe, die eine Spaltung der β -(1,4)-glycosidischen Bindung und die Bildung eines kovalent gebundenen Intermediates bewirkt. Danach kann durch eine basisch wirkende Carboxylgruppe das Celluloseende hydrolysiert werden. Der *retaining* Mechanismus führt stets zur Wannenkongfiguration der Glucose (β -Form) (Withers, 2001).

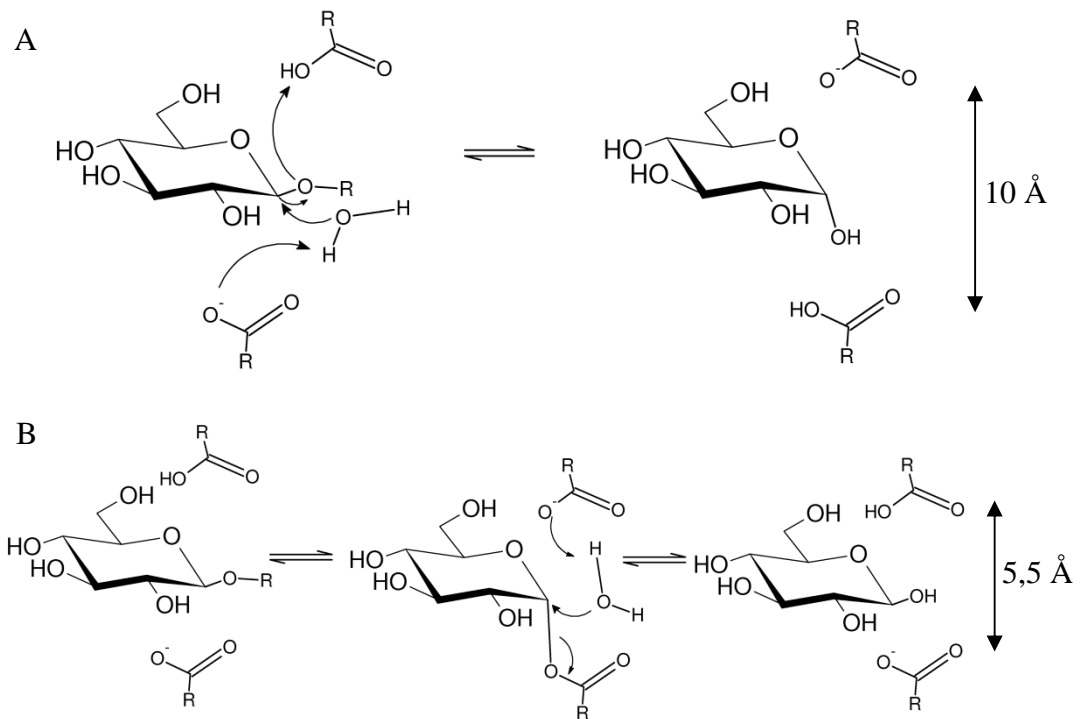


Abbildung 3.13: *Inverting* (A) und *retaining* Mechanismus (B) von Cellulasen nach Withers (2001).

Cellulose-Bindungs-Domäne

Cellulose-Bindungs-Domänen (CBM) nehmen nach Wilson (2008) bei Cellulasen eine wichtige Rolle ein, besonders dann, wenn die Cellulose in kristalliner Form vorliegt. Geringen bis gar keinen Effekt zeigen CBMs bei amorpher Cellulose, löslicher Carboxymethylcellulose oder löslichen Oligosacchariden (Shoseyov *et al.*, 2006). Die Hauptaufgabe von CBMs liegt in der hergestellten Verbindung zwischen Cellulase und dem unlöslichen Cellulosesubstrat. Die CBM ermöglicht Cellulasen spezifisch an die Regionen der Cellulose zu binden, an der sie besonders wirksam und aktiv sind (Boraston *et al.*, 2004). Dabei können manche CBMs auf der Cellulose gleiten, ohne zu dissoziieren und so die Wirkung der katalytischen Domäne effizienter gestalten (Jervis *et al.*, 1997). Neben CBMs existieren auch Xylan-Bindungs-Domänen und Mannose-Bindungs-Domänen. Enzyme mit diesen Domänen zeigen meist hohe Aktivität hinsichtlich unlöslicher Substrate. Die Größe der CBMs variiert stark und beträgt bei Cellulasen aus Pilzen etwa 30 Aminosäuren. Bei Bakterien ist sie mit 120 Aminosäuren meist größer.

Synergieeffekte zwischen den Enzymen

Zwischen den einzelnen Enzymen können Synergieeffekte beobachtet werden, die dazu führen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit für Enzymgemische höher liegt, als die Summe der Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Enzyme (Mansfield *et al.*, 1999). Die Anzahl der Einzelenzyme sowie deren Verhältnis hängen vom jeweiligen Mikroorganismus ab (Bhat und Bhat, 1997).

Extrazelluläre Cellulaseproduzenten

Häufig werden als Cellulaseproduzenten Pilze eingesetzt. Dazu zählen *Ascomyceten*, wie *Trichoderma reesei*, *Basidiomyceten* mit dem weißen Schimmelpilz *Phanerochaete chrysosporium*, dem braunen Schimmelpilz *Fommitopsis palustris* und anaerobe Vertreter wie *Orpinomyces sp.* (Dashtban *et al.*, 2009).

Am häufigsten werden Cellulasen durch Pilze wie *Trichoderma sp.*, *Aspergillus sp.* und *Penicillium sp.* hergestellt (Berlin *et al.*, 2006). *Trichoderma reesei* stellt seit vielen Jahren wohl einen der am häufigsten eingesetzten Cellulaseproduzenten dar (Tabka *et al.*, 2006; Jørgensen *et al.*, 2007a). Hohe extrazellulär vorliegende Cellulasekonzentrationen von etwa 130 g L^{-1} sind möglich und die spezifische Aktivität der Cellulasen hinsichtlich kristalliner Cellulose ist zufriedenstellend (Wilson, 2008). Das Cellulasesystem von *Trichoderma reesei* umfasst dabei fünf Endoglucanasen, zwei Exoglucanasen und zwei β -(1,4)-Glucosidasen (Foreman *et al.*, 2003). Bei der Exoglucanase Cel6A aus *Trichoderma reesei* existieren Vermutungen auf eine Endoaktivität, wodurch eine synergistische Wirkung mit der Exoglucanase Cel7A erklärt werden könnte (Boisset *et al.*, 2000).

Bei *Trichoderma reesei* bestehen die produzierten Cellulasen zu 60 % aus Cellobiohydrolase I (CBH I) und zu 20 % aus Cellobiohydrolyse II (CBH II). Der Endoglucanaseanteil beträgt 15 %. Der Anteil an β -Glucosidasen ist gering und liegt bei etwa 0,5 % (Merino und Cherry, 2007). Banerjee *et al.* (2010) präsentierte ein optimiertes synthetisches Enzymgemisch für die Glucosefreisetzung aus vorbehandeltem Maisstroh, bestehend aus 29 % Cellobiohydrolase I (CBH I), 5 % Cellobiohydrolase II (CBH II), 25 % Endoglucanase I, 14 % β -Glucosidase, 22 % Endoxyylanase III und 5 % β -Xylosidase.

Endoglucanasen

Endoglucanasen [E.C. 3.2.1.4] spalten wie in Abbildung 3.14 veranschaulicht, meist β -(1,4)-glycosidische Bindungen innerhalb des Cellulosepolymers. Die Lage des aktiven Zentrums befindet sich meist innerhalb einer spaltartigen Umgebung der Enzymstruktur (Warren, 1996). Die Endoglucanaseaktivität wird häufig über das Substrat Carboxymethylcellulose bestimmt (CMCase) (Zhang *et al.*, 2006). Endoglucanasen spalten bevorzugt amorphe Bereiche der Cellulose (Yoshida *et al.*, 2008) und produzieren so neue Celluloseenden, an denen Exoglucanasen angreifen und den enzymatischen Abbau der Cellulose weiter bewerkstelligen. Endoglucanasen von Pilzen treten als Monomere auf und zeigen einen geringen Anteil an Glycosylierung. Sie besitzen meist ein pH-Optimum zwischen pH 4,0 und pH 5,0 und ein Temperaturoptimum von 50 °C bis 70 °C (Dashtban *et al.*, 2009). Häufig produzieren Pilze nicht nur eine Endoglucanase, *Trichoderma reesei* beispielsweise produziert mindestens fünf Endoglucanasen, wohingegen aus *Phanerochaete chrysosporium* Medien drei Endoglucanasen isoliert werden konnten (Baldrian und Valaskova, 2008; Foreman *et al.*, 2003). Meistens besitzen Endoglucanasen CBMs. So weisen vier der fünf Endoglucanasen aus *Trichoderma reesei* eine CBM auf, nur die Endoglucanase III (EG III) besitzt keine CBM (Sandgren *et al.*, 2005; Dashtban *et al.*, 2009).

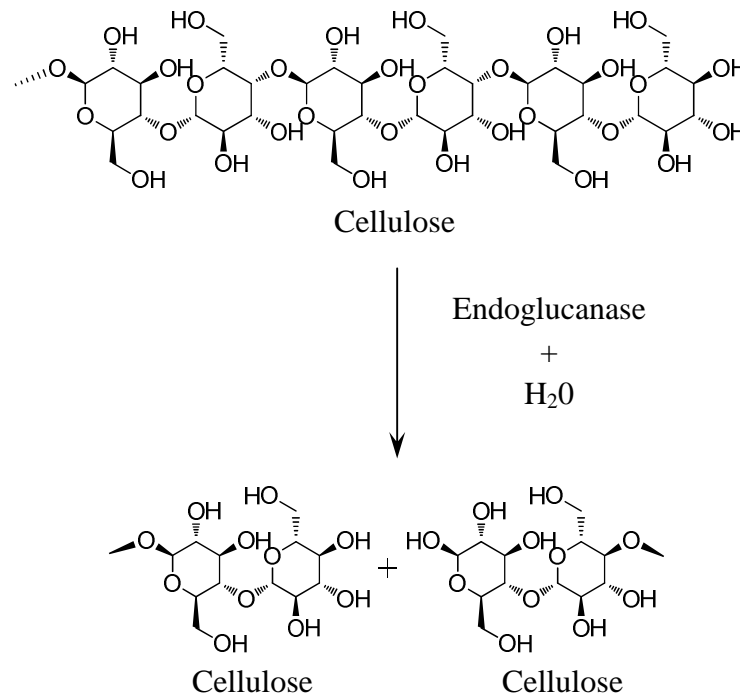


Abbildung 3.14: Hydrolyse von Cellulose durch Endocellulasen. Durch Hydrolyse eines Cellulosepolymers entstehen neue Cellulosepolymere mit geringerem Polymerisationsgrad.

Exoglucanasen

Exoglucanasen spalten, wie die Abbildung 3.15 zeigt, die Cellulosepolymere von den freien Enden des Cellulosepolymers meistens durch Freisetzung von Cellobioseuntereinheiten (Kumar *et al.*, 2008). Neben diesen Cellobiohydrolasen [E.C. 3.2.1.91] existieren auch Glucohydrolasen [E.C. 3.2.1.74], die einzelne Glucosemonomere von den Enden der Cellulose hydrolysieren (Bhat und Bhat, 1997). Es wird auch von der Abspaltung höherer Oligomere wie beispielsweise Cellotetraose berichtet (Irwin *et al.*, 1993).

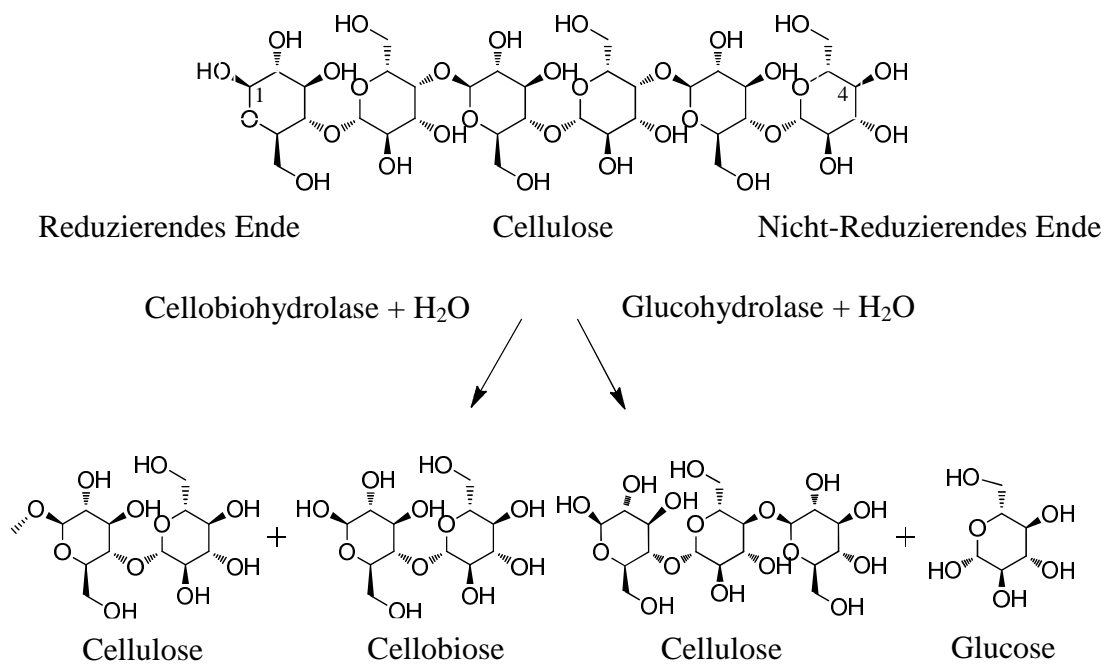


Abbildung 3.15: Hydrolyse von Cellulose zu Cellobiose und Glucose durch Cellobiohydrolasen und Glucohydrolasen.

Die Abbildung 3.16 veranschaulicht die Lage des katalytischen Zentrums innerhalb einer tunnelähnlichen Form (Divine *et al.*, 1994; Rouvinen *et al.*, 1990). Wie bei Endoglucanasen, liegt auch bei Exoglucanasen eine monomere Struktur mit geringer Glycosylierung vor. Das pH-Optimum liegt zwischen pH 4,0 und pH 5,0 und die optimale Temperatur zwischen 37 °C und 60 °C (Dashtban *et al.*, 2009). Die beiden Enden der Cellulose sind dabei nicht vollständig identisch, sondern zeigen ein reduzierendes und ein nicht-reduzierendes Ende auf. Das reduzierende Ende bezieht sich auf das Halbacetal des Kohlenstoffatoms C-1 der Ringstruktur. Das nicht-reduzierende Ende des Cellulosepolymers bezeichnet hingegen die am Kohlenstoffatom

C-4 gebundene Hydroxylgruppe. Die Cellobiohydrolase I (CBH I) setzt am reduzierenden Ende der Cellulose an, während die Cellobiohydrolase II (CBH II) am nicht-reduzierenden Ende hydrolytisch wirksam ist (de Vries und Visser, 2001). Beide Exoglucanasen aus *Trichoderma reesei* besitzen dabei eine CBM (Dashtban *et al.*, 2009).

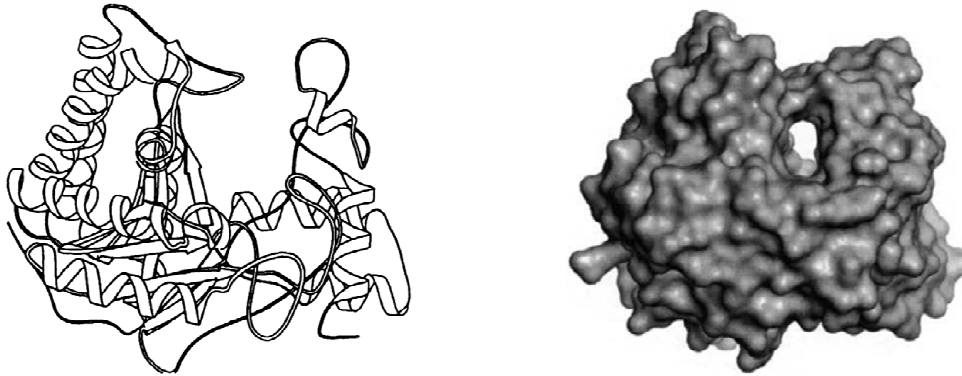


Abbildung 3.16: Dreidimensionale Struktur der Cellulase Cel6A (CBH II) aus *Trichoderma reesei* (Rouvinen *et al.*, 1990; Davies und Henrissat, 1995).

***β*-Glucosidasen**

β -Glucosidasen [E.C. 3.2.1.21] spalten Cellobioseeinheiten an β -(1,4)-glycosidischen Bindungen der Glucoseuntereinheiten. Die Abbildung 3.17 veranschaulicht den Mechanismus von β -Glucosidasen. Meist handelt es sich dabei um den *retaining* Mechanismus (siehe Abbildung 3.13). Neben Aktivitäten hinsichtlich Cellobiose werden auch Aktivitäten von β -Glucosidasen bei höheren Oligomeren beobachtet. Dies geschieht jedoch in geringem Ausmaß (Kumar *et al.*, 2008).

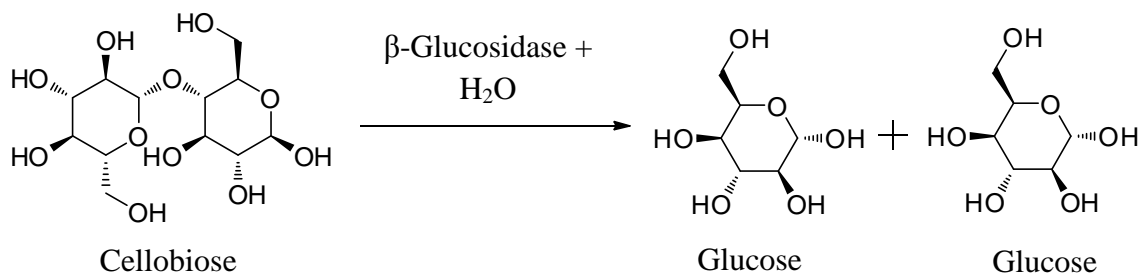


Abbildung 3.17: Hydrolyse von Cellobiose zu zwei Glucosemonomeren durch β -Glucosidasen.

Dashtban *et al.* (2009) beschrieb verschiedene oligomere Formen von β -Glucosidasen. Während eine einfache monomere Struktur eine Molekülmasse von etwa 35 kDa besitzt (Morais *et al.*, 2002), existieren auch dimere (Ishikawa *et al.*, 2005) und trimere Strukturen (Cao und Crawford, 1993) der β -Glucosidasen mit Molekülmassen von 146 kDa bzw. 450 kDa. Die meisten β -Glucosidasen sind stark glycosyliert. Optimale Reaktionstemperaturen liegen zwischen 45 °C und 75 °C (Dashtban *et al.*, 2009).

3.4.4 Hemicellulasen

Die Entwicklung und Bedeutung von Hemicellulasen wurde lange vernachlässigt, da die Hemicellulose häufig schon durch eine Vorbehandlung entfernt wurde (Jørgensen *et al.*, 2007a). Neben der Freisetzung von Monomeren aus der Hemicellulose, zeigen sich Hemicellulasen besonders bedeutsam für die enzymatische Glucosefreisetzung aus Cellulose, da Hemicellulose und Lignin eine schutzschichtähnliche Funktion hinsichtlich der Cellulose übernehmen (Hu *et al.*, 2011; McIntosh und Vancov 2011). So wurde eine Kombination aus Cellulasen, Xylanasen und Feruloyl-Esterasen eingesetzt, um die Ausbeute aus vorbehandeltem Weizenstroh zu optimieren (Tabka *et al.*, 2006). Hemicellulasen werden auch bei vorbehandeltem Maisstroh als notwendig erachtet, um hohe Glucose- und Xyloseausbeuten (> 80 % und > 70 %) zu erreichen (Gao *et al.*, 2011a).

Als Hemicellulasen werden Enzyme eingruppiert, die nicht am Abbau von Cellulose und von Pectinen im Pflanzenmaterial beteiligt sind. Es ist eine weitergehende Klassifizierung in Hemicellulasen möglich, die an der Spaltung der Hemicellulose im Sinne einer Depolymerisierung und im Sinne des Abbaus von Quervernetzungen innerhalb der Hemicellulose beteiligt sind (Decker *et al.* 2008).

Depolymerisierende Enzyme werden weiter klassifiziert in Endo- und Exohydrolasen. Endo- bezeichnet die Fähigkeit des Enzyms, innerhalb einer Polysaccharidkette bestehend aus vielen Monosacchariden, diese in zwei Teile zu schneiden. An diesen freien Enden finden Exohydrolasen Angriffspunkte, um weitere Saccharide abzuspalten. Die freigewordenen Oligomere werden durch Enzyme wie β -Glucosidasen [E.C. 3.2.1.21], β -Xylosidasen [E.C. 3.2.1.37] und β -Mannosidasen [E.C. 3.2.1.25] weiter zu Monosacchariden hydrolysiert.

Die Abbildung 3.18 weist exemplarisch einige der beteiligten Enzyme auf und veranschaulicht deren Wirkmechanismus am Beispiel eines Xylanpolymers. Verschiedene Enzyme sind nötig, um von der Xylankette störende Seitenketten abzutrennen, darunter eine α -Arabinosidase, α -Glucuronidase und Esterasen. Endoxylanasen spalten das Xylanpolymer und produzieren neue freie Xylanenden. Durch die Verwendung von β -Xylosidasen wird der monomere Zucker Xylose gewonnen.

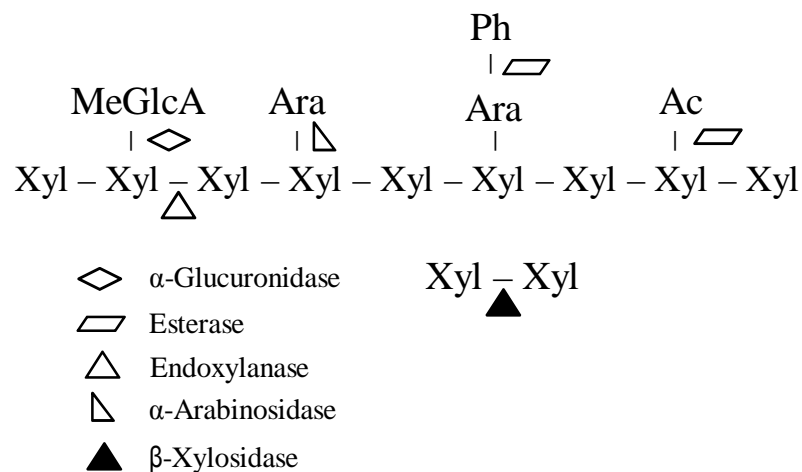


Abbildung 3.18: Schematische Darstellung der enzymatischen Hydrolyse von Hemicellulose am Beispiel eines Xylanpolymers durch ausgewählte Enzyme nach Decker *et al.* (2008). Xylose (Xyl), Arabinose (Ara), Acetylgruppe (Ac), phenolische Gruppe (Ph), Methylglucuronsäure (MeGlcA).

Depolymerisierende Hemicellulasen

Decker *et al.* (2008) untergliedert depolymerisierende Hemicellulasen. Endoxylanasen [E.C. 3.2.1.8] hydrolysieren die β -(1,4)-Verknüpfung des Xylans, wobei auch β -(1,3)-Bindungen hydrolysiert werden können [E.C. 3.2.1.32]. Diese Hydrolysereaktion führt in erster Linie zur Bildung von Xylobiose, Xylotriose oder Xylosylresten mit mehreren Substituenten. Dabei besitzen einige Endoxylanasen eine Cellulose-Bindungs-Domäne (Sakka *et al.*, 1993) und andere Endoxylanasen weisen eine Xylose-Bindungs-Domäne auf (Shareck *et al.*, 1991). Exoxylanasen [E.C. 3.2.1.37, E.C. 3.2.1.72, E.C. 3.2.2.156] zeigten eine hohe Aktivität bezüglich der Spaltung der β -(1-3)-Bindung. Filamentöse Pilze wie *Aspergillus niger*, *Humicola insolens*, *Termomonospora fusca*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum* und *Trichoderma koningii* sind interessante Xylanaseproduzenten, da sie extrazelluläre Hydrolasen bilden (Gírio *et al.*, 2010).

Mannanasen gehören wie Xylanasen zu den depolymerisierenden Hydrolasen. Die Mannanase aus *Trichoderma reesei* ähnelt cellulolytischen Enzymen und besitzt zudem eine Cellulose-Bindungs-Domäne (Tenkanen *et al.*, 1995). Endomannanasen [E.C. 3.2.1.78] spalten β -D-(1,4)-Mannopyranosylbindungen zwischen Mannosen aber auch Mannosebindungen mit anderen Polysacchariden.

Die freiwerdenden Oligomere der Mannose werden durch weitere Enzyme zu Monomeren hydrolysiert. Neben β -Mannosidasen [E.C. 3.1.1.25] sind auch β -Glucosidasen oder β -Xylosidasen daran beteiligt, um Mannose und Glucose oder Xylosereste vom nicht-reduzierenden Ende der Saccharide zu entfernen.

Auch β -Glucanasen können im Rahmen der Hemicellulasen aufgeführt werden, da diese Enzyme Kreuzaktivitäten mit Xyloglucanen aufweisen. Für den enzymatischen Abbau von Xyloglucan werden neben Endoglucanasen auch Endotransglycosylasen und Exoglycosidasen, wie α -Fucosidasen und β -Galactosidasen eingesetzt. Es wurde auch von Xyloglucanspezifischen Endoglucanasen berichtet (Grishutin *et al.*, 2004).

3.4.5 Weitere Enzyme

Seitenketten können beispielsweise bei der Hydrolyse von Xylan hinderlich sein, da die entstehenden freien Enden nur teilweise durch β -Xylosidasen in die monomeren Grundbausteine überführt werden.

Für die Abspaltung einzelner Seitenketten der Hemicellulose sind nach Gúrio *et al.* (2010) weitere Enzyme notwendig, die synergistisch mit den Hemicellulasen zusammenwirken. Dabei handelt es sich um α -Glucuronidase, α -L-Arabinofuranosidase und α -D-Galactosidase, die glycosidische Bindungen schneiden und Acetylxylan-Esterasen bzw. Feruloyl/Coumaroyl-Esterasen.

Die in Tabelle 3.6 gezeigten Eigenschaften werden bei diesen für die enzymatische Hydrolyse lignocellulosehaltiger Materialien ergänzenden Enzymen beobachtet.

Durch den Einsatz von Xylanasen verbunden mit ergänzenden Enzymen, wie α -L-Arabinofuranosidasen, konnte die Ausbeute an Monosacchariden gesteigert werden (Hu *et al.*, 2011; Alvira *et al.*, 2011). Die Verwendung von weiteren Enzymen, wie Pectinasen, wirkte sich positiv auf den Celluloseabbau von Maisstroh, Weich- und Harthölzern aus. Eine Übersicht zu Pectinasen findet sich in Jayani *et al.* (2005).

Tabelle 3.6: Weitere Enzyme zur Abspaltung einzelner Seitenketten der Hemicellulose.

| Enzym | Eigenschaften |
|------------------------------------|--|
| α -Glucuronidase | Katalysiert die Reaktion zur Freisetzung von Glucuronsäure oder 4-O-Methylglucuronsäure. |
| α -Arabinofuranosidase | Katalysiert die Freisetzung von Arabinoseresten. |
| α -D-Galactosidase | Katalysiert die Abspaltung von α -Galactosylresten. Besonders wichtig bei Weichhölzern mit hohem Mannangehalt, aufgrund des enthaltenen Galactomannans und Galactoglucomannans. |
| Acetylxylylan-Esterase | Katalysiert die Abspaltung von Acetylresten. |
| Feruloyl-/ p-Coumaroyl-Esterase | Katalysiert die Abspaltung der entsprechenden Phenolsäuren. |

Auch die Verwendung von nicht katalytisch aktiven Proteinen, wie *expansine* und *swollenin*, kann sich positiv auf die enzymatische Reaktion auswirken, in dem beispielsweise die Kristallinität des Substrats verringert wird (Jørgensen *et al.* 2007a). So konnte durch Vorbehandlung mit *swollenin* aus *Kluyveromyces lactis* die Partikelgröße des Substrats reduziert, die Kristallinität verringert, die Cellulase Adsorption erhöht und der Hydrolyseverlauf beschleunigt werden (Jäger *et al.*, 2011b).

3.4.6 Limitierungen bei der enzymatischen Hydrolyse

Als Phänomene unzureichenden enzymatischen Abbaus von Biomasse sind einerseits niedrige Umsätze zu monomeren Zuckern, andererseits niedrige Reaktionsraten bekannt. Jørgensen *et al.* (2007a) beschrieb als limitierende Einflussfaktoren auf die enzymatische Hydrolyse die Produktinhibierung durch Glucose und Cellobiose, das Binden von Exocellulasen an falsche Stellen der Cellulose, wie auch Wechselwirkungen der Cellulosefibrillen mit Hemicellulose und Lignin, die abschirmend wirken und störende Bindungen ausbilden. Lignin verringert nicht nur die Zugänglichkeit für die Enzyme (Mansfield *et al.*, 1999), auch Cellulasen können an Ligninoberflächen adsorbieren (Bernardez *et al.*, 1993). Die Interaktion zwischen Lignin und Lignin-Polysaccharid Bindungen mit Cellulasen und Hemicellulasen wirkt sich inhibierend auf diese Enzyme aus (Berlin *et al.*, 2006; Cullis und Mansfield, 2010). Das Entfernen des Lignins sollte somit den enzymatischen Hydrolyseverlauf positiv beeinflussen (Lynd *et al.*, 2002). Des Weiteren wird an neuen Enzymen mit einer geringeren Bindungsaffinität hinsichtlich des Lignins gearbeitet (Berlin *et al.*, 2005). β -Glucosidasen zeigen sich

besonders resistent gegen eine Inhibierung durch Lignin und ligninbasierenden Stoffen (Berlin *et al.*, 2006).

Eine Abnahme der Aktivität durch Proteasen oder eine Denaturierung des Enzyms aufgrund hoher Scherkräfte und mangelhafter Thermostabilität der Enzyme können den Verlauf der enzymatischen Hydrolyse beeinträchtigen (Jørgensen *et al.*, 2007a).

Vor allem bei hohen Substratanteilen treten zusätzliche, die Monosaccharidausbeute der enzymatischen Hydrolyse negativ beeinflussende Faktoren auf. Je höher der Substratanteil, desto höher sind die möglichen Produktkonzentrationen und die daraus resultierenden inhibierenden Einflüsse auf die enzymatische Hydrolyse (Jørgensen *et al.*, 2007a). Beispielsweise wirken hohe Glucosekonzentrationen inhibierend auf β -Glucosidasen (Yun *et al.*, 2001; Decker *et al.*, 2000). Dies führt zu einem Anstieg der Cellobiosekonzentration und zu einer Inhibition der Exoglucanasen (Holtzapfle *et al.*, 1990; Tolan und Foody, 1999). Eine auf den jeweiligen Prozess abgestimmte β -Glucosidasekonzentration ist notwendig, um hohe Glucoseausbeuten zu erreichen (Bommarius *et al.*, 2008). Einer Produktinhibierung der β -Glucosidase kann durch eine erhöhte β -Glucosidasekonzentration begegnet werden. Eine andere Möglichkeit wäre, β -Glucosidasen einzusetzen, die eine hohe Toleranz gegenüber hohen Glucosekonzentrationen aufzeigen. Jørgensen *et al.* (2007a) berichtete von β -Glucosidasen mit einer Inhibierungskonstante K_i von bis zu 1400 mmol L^{-1} (Decker *et al.*, 2000; Saha und Bothast, 1996), während ein K_i von 1 mmol L^{-1} bis 14 mmol L^{-1} Glucose für β -Glucosidasen üblich ist (Decker *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2001). Des Weiteren zeigen Zucker der Hemicellulose inhibierende Wirkung auf Cellulasen (Qing *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2011). Inhibierende oder inaktivierende Faktoren sind auch Abbauprodukte, die während der Vorbehandlung der Biomasse vor der enzymatischen Hydrolyse entstehen. Ameisensäure wirkt sich negativ auf die Aktivität von Cellulasen aus. Des Weiteren werden Cellulasen durch Milchsäure und Ethanol inhibiert (Jørgensen *et al.*, 2007a). Vanillinsäure, Syringasäure und Syringaaldehyd wirken inhibierend auf die Xylanaseaktivität (Panagiotou und Olsson 2007; Cantarella *et al.*, 2004; Jørgensen *et al.*, 2007a). Neben organischen Säuren, gelten Phenole und Furane (Furfural, Hydroxymethyl-Furfural) als inhibierend und/oder inaktivierend (Ximenes *et al.*, 2010a; Ximenes *et al.*, 2010b; Kim *et al.*, 2011).

3.5 Vorbehandlung von Biomasse zur enzymatischen Hydrolyse

Bei lignocellulosehaltigen Materialien ist die Ausbeute von Monosacchariden ohne zusätzliche Vorbehandlung auf bis zu 20 % beschränkt, wobei mit ausgewählter Vorbehandlung Ausbeuten von über 90 % erreichbar sind (Kumar *et al.*, 2009a). Der Vorbehandlung des pflanzenbasierten Substrates kommt somit eine entscheidende Bedeutung bei der Monosaccharid-Gewinnung zu. Die Vorbehandlungsmethoden unterscheiden sich stark in der Reaktionstemperatur, der Reaktionsdauer und den chemischen Randbedingungen.

Die Vorbehandlungsmethode beeinflusst die Zusammensetzung des Substrats (Heiss-Blanquet *et al.*, 2011). Während einige Vorbehandlungsmethoden eine veränderte Zusammensetzung des Substrats bewirken, weisen andere nur geringe Veränderungen der Hemicellulose und Ligninfraktion auf. Möglich sind auch veränderte chemische Strukturen, beispielsweise der Kristallinität der Cellulose, dem Molekulargewicht und der Zugänglichkeit der Cellulose. Die Vorbehandlung wirkt sich häufig auch auf die Porosität und die Partikelgröße des Pflanzenmaterials aus (Johnson und Elander, 2008). Eine Erhöhung der Porosität (Grethlein, 1985), eine Verringerung des Lignin- und Hemicelluloseanteils und der Kristallinität der Cellulose steigern die Ausbeute an Monosacchariden (McMillan, 1994). Die Abbildung 3.19 veranschaulicht den Effekt einer hydrothermischen Vorbehandlung am Beispiel von Weizenstroh. Nach erfolgter hydrothermischer Vorbehandlung ist die Struktur des Weizenstrohs zerstört und einzelne Faserstrukturen werden sichtbar.

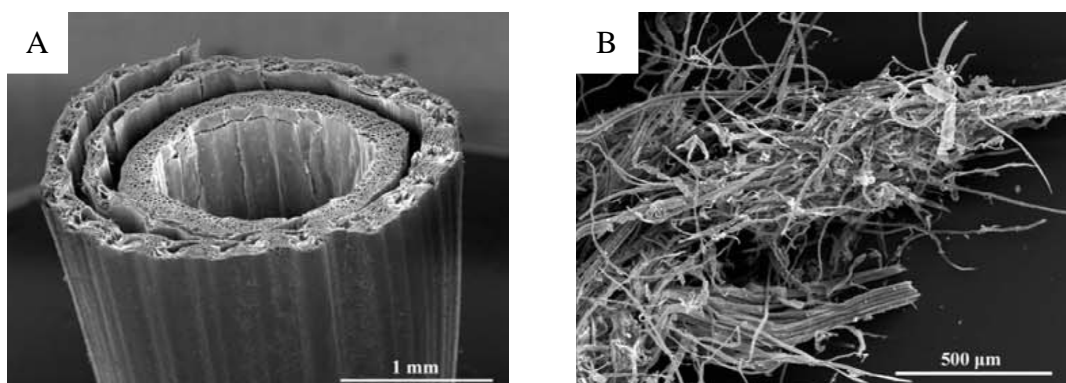


Abbildung 3.19: Strukturelle Veränderungen vor (A) und nach (B) einer hydrothermischen Vorbehandlung von Weizenstroh (Kristensen *et al.*, 2008).

Taherzadeh und Karimi (2007) berichteten von der Entwicklung der Substratvorbehandlungsverfahren. Vor allem hochkonzentrierte Säurebehandlungen bei moderaten Temperaturen (Sherrard und Kressman, 1945) und verdünnte Säurebehandlungen bei hohen Temperaturen (Saeman, 1945) wurden eingesetzt um Monosaccharide aus der Biomasse zu gewinnen. Dabei wurde Schwefelsäure meist als chemischer Katalysator eingesetzt (Harris *et al.*, 1945), aber auch Salzsäure wurde verwendet. Der Anteil konzentrierter Säure betrug zwischen 30 % bis 70 %, was Korrosions- und Umweltprobleme hervorrief. Die hohen Instandhaltungskosten, wie auch die hohen Anforderungen an die verwendeten Materialien machten eine kommerzielle Nutzung des Prozesses uninteressant (Jones und Semrau, 1984; Katzen *et al.*, 1995; Wyman, 1996). Des Weiteren war der „Verlust“ an Monosacchariden durch die Bildung von Zuckerabbauprodukten sehr hoch. Durch die Entwicklung von Cellulose abbauenden Enzymen kann die Säurebehandlung als eine reine Vorbehandlung des Pflanzenmaterials angesehen werden, um die Zugänglichkeit des Substrats durch hydrolytisch wirksame Enzyme zu ermöglichen (Johnson und Elander, 2008).

Substratvorbehandlungsverfahren sollten sich nach Yang und Wyman (2008) durch folgende Punkte auszeichnen:

- Der Bedarf an zusätzlichen Chemikalien sollte minimiert und kostengünstige Chemikalien ausgewählt werden. Diese sollten spätere Prozessschritte wie enzymatische Umsetzungen und mikrobiologische Kultivierungen nicht erschweren.
- Da der Mahlprozess zu kleinen Partikelgrößen energie- und kostenintensiv ist, sollten möglichst große Partikel einsetzbar sein.
- Zucker der Hemicellulose sollten möglichst vollständig für spätere Anwendungen verfügbar sein.
- Die generierten Monosaccharidausbeuten sollten möglichst hoch sein.
- Die verwendeten Reaktoren sollten möglichst kostengünstig sein. Auf korrosionsbeständige Materialien soll verzichtet werden. Der Prozessdruck soll möglichst niedrig gehalten werden.
- Die vorbehandelte Biomasse sollte für nachfolgende Prozessschritte (enzymatische Hydrolyse und Kultivierung) direkt genutzt werden und Zwischenschritte (Neutralisation, Entfernen von Inhibitoren) unnötig machen.

- Die vorbehandelte Cellulose sollte Glucoseausbeuten von 90 % und höher innerhalb von 3 bis 5 Tagen ermöglichen, wobei eine Cellulaseaktivität von 10 Filterpapiereinheiten (FPU) $\text{g}^{-1}_{\text{Cellulose}}$ ausreichen sollte.
- Lignin und andere Nebenprodukte sollten zu Wertstoffen weiterverarbeitet werden.
- Alle generierten Monosaccharide sollten in den folgenden Kultivierungen verwertbar sein.
- Der Energiebedarf für das Vorbehandlungsverfahren sollte möglichst gering sein und sich nach Möglichkeit in einen größeren Gesamtprozess integrieren lassen.

Wie bereits in Kapitel 3.4.6 erwähnt, existierten vielfältige Einflussfaktoren für die enzymatische Verzuckerung der Polysaccharide. Die Bedeutung der einzelnen Größen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Entscheidend für die Verzuckerung der Cellulose ist sicherlich die Zugänglichkeit der Mikrofibrillen und im Besonderen der β -glycosidischen Bindungen für die Cellulasen.

Nach Johnson und Elander (2008) sollte bei der Auswahl einer geeigneten Vorbehandlungsmethode folgendes berücksichtigt werden:

- Die Zusammensetzung des Substrats in natürlicher und vorbehandelter Form ist von den örtlichen Umgebungsbedingungen abhängig.
- Die gewählte Vorbehandlung kann die Cellulosestruktur erheblich verändern (kristalline und amorphe Regionen) und die Beschaffenheit von Mikrofibrillen der Cellulose beeinflussen.

3.5.1 Physikalische Vorbehandlungsmethoden

Zu den physikalischen Methoden zählt die mechanische Zerkleinerung von pflanzenbasierten Materialien. Grundsätzlich führt die Zerkleinerung von Biomasse zu einer Vergrößerung der spezifischen Oberfläche und damit zu verbesserter enzymatischer Zugänglichkeit des Substrats (Yeh *et al.*, 2010). Häufig wird auch ein geringerer Polymerisationsgrad und eine reduzierte Kristallinität des Pflanzenmaterials erreicht (Hendriks und Zeeman, 2009). Die notwendige Zerkleinerung hängt von der gewählten Vorbehandlungsmethode im Anschluss ab. Die mechanische Zerkleinerung ohne die Kombination mit einer weiteren Vorbehandlungsmethode führt nicht zu

hinreichend hohen Zuckerausbeuten (da Costa Sousa *et al.*, 2009). Für die mechanische Zerkleinerung werden häufig Schneid-, Hammer-, Kolloid- und Kugelmühlen eingesetzt (Sidiras und Koukios, 1989; Tassinari *et al.*, 1980; Alvo und Belkacemi, 1997; Alvira *et al.*, 2010). Mechanische Zerkleinerungsverfahren sind energieaufwändige Verfahren und damit ein bedeutender Kostenfaktor (Cadoche und Lopez, 1989).

3.5.2 Chemische Vorbehandlungsmethoden

Zu den chemischen Vorbehandlungsmethoden zählen lösungsmittelbasierte Vorbehandlungsmethoden wie der *organosolv* Prozess, die Phosphorsäure Fraktionierung und ionische Flüssigkeiten. Weiter sind oxidative Aufschlussverfahren beschrieben. Saure und alkalische Vorbehandlungsmethoden sind häufig eingesetzte Verfahren um Pflanzenmaterialien für Enzyme aufzuschließen und hohe Zuckerausbeuten durch die enzymatische Hydrolyse zu erreichen.

Lösungsmittelbasierende Vorbehandlungsmethoden

Zu den lösungsmittelbasierenden Vorbehandlungsverfahren zählen der *organosolv* Prozess, Phosphorsäure Fraktionierung und ionische Flüssigkeiten.

Organosolv Prozess

Im *organosolv* Prozess werden organische Lösungsmittel, meist Alkohole in Verbindung mit einer Säure als Katalysator (Pan *et al.*, 2006), bei Temperaturen zwischen 90 °C und 120 °C bei Gräsern und 155 °C bis 220 °C bei Holzprodukten eingesetzt. Mögliche Alkohole sind Methanol und Ethanol, wobei auch Aceton und Ethylenglycol, Triethylenglycol und Tetrahydrofurfuryl Alkohol verwendet werden (Chum *et al.*, 1988; Thring *et al.*, 1990; Johnson und Elander, 2008). Die Verweilzeit liegt zwischen 25 min und 100 min, wobei der Katalysatoranteil zwischen 0,83 % und 1,67 % sowie der Anteil der Alkohole von 25 % bis 74 % (v/v) betragen kann (da Costa Sousa *et al.*, 2009). Nach erfolgter Vorbehandlung besteht der Feststoff größtenteils aus Cellulose, die Flüssigphase hingegen enthält große Mengen von Lignin, Furfural, Xylose, Essigsäure und lyophile Komponenten. Durch geeignete Parameterwahl kann das Lignin in verhältnismäßig reiner Form abgetrennt werden (Zhao *et al.*, 2009). Das Lösungsmittel kann mittels Destillation wiedergewonnen und verwendet werden.

Phosphorsäure Fraktionierung

Phosphorsäure, Aceton und Wasser wird bei der Phosphorsäure Fraktionierung eingesetzt (Zhang *et al.*, 2007). Die Kristallinität der Substrate wird deutlich reduziert. Die Reaktionstemperatur beträgt etwa 50 °C, wobei die Lignocellulose in die Bestandteile amorphe Cellulose, Hemicellulose, Lignin und Essigsäure fraktioniert werden kann (da Costa Sousa *et al.*, 2009). Als vorteilhaft erweist sich die niedrige Temperatur und die Möglichkeit, die Methode bei Atmosphärendruck durchführen zu können (Moxley *et al.*, 2008). Nachteilig zeigt sich jedoch die Verwendung von Aceton und Phosphorsäure hinsichtlich der Umweltverträglichkeit der Methode, womit sich die Frage nach einer Aufarbeitung und einer Wiederverwertung der Chemikalien stellt.

Ionische Flüssigkeiten

Ionische Flüssigkeiten werden aufgrund der Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen mit Cellulose bei hohen Temperaturen zu bilden für Vorbehandlungen lignocellulosehaltiger Substrate erforscht. Der Grund für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken sind Anionen wie Chloride, Formiate und Alkyl-Phosphonate. Die Reaktionstemperaturen liegen zwischen 100 °C und 150 °C. Der Anteil der ionischen Flüssigkeiten beträgt etwa 10 % (w/w) der Trockensubstanz des Substrats (da Costa Sousa *et al.*, 2009). In einem zweiten Schritt erfolgt die Regenerierung der gelösten Biomasse mit Wasser, Methanol oder Ethanol, um Rückstände von ionischen Flüssigkeiten zu entfernen, da sich diese nachteilig auf Enzymaktivitäten und folgende Prozessschritte auswirken können (Turner *et al.*, 2003). Zudem ist ein Recycling ionischer Flüssigkeiten (Shill *et al.*, 2011) notwendig, um Abfallstoffe zu minimieren und Prozesskosten zu senken.

Oxidative Vorbehandlungsmethoden

Oxidierende Methoden führen zu einem Herauslösen des Lignins und der Hemicellulose aus dem Pflanzensubstrat, um die Zugänglichkeit der Cellulose und deren enzymatische Verzuckerung zu ermöglichen (Garcia-Cubero *et al.*, 2009). Nachteilig wirken sich neben dem Verlust großer Teile der Hemicellulosezucker auch die Bildung von Abbauprodukten wie aliphatische Aldehyde und aliphatische organische Säuren für nachfolgende Prozesse aus (da Costa Sousa *et al.*, 2009). Mögliche Prozessbedingungen

liegen zwischen 170 °C und 220 °C mit Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel (Martin und Thomsen, 2007; Gould, 1984). So beschreibt Klinke *et al.* (2002) als optimale Parameter für ein oxidatives Vorbehandlungsverfahren von Weizenstroh eine Reaktionstemperatur von 195 °C, mit einer Reaktionszeit von 10 min bei 12 bar Sauerstoff und 6,5 g L⁻¹ Natriumcarbonat. Carvalheiro *et al.* (2008) zeigte eine Kombination oxidierenden Sauerstoffs oder Wasserstoffperoxids mit einer alkalischen Vorbehandlung aus Natriumhydroxid oder Calciumhydroxid als ein besonders vielversprechendes Verfahren hinsichtlich dem Entfernen von Ligninstrukturen auf. Die Ozonolyse setzt Ozon als Oxidationsmittel ein und kann bei Raumtemperatur unter Umgebungsdruck eingesetzt werden, wodurch keine inhibierenden Stoffe entstehen (Alvira *et al.*, 2010).

Saure Vorbehandlungsverfahren

Vorbehandlungsmethoden mit verdünnter Säure werden unter der Maßgabe durchgeführt, große Anteile der Hemicellulose aus der Biomasse herauszulösen, den Abbau von Zuckern möglichst gering zu halten und somit eine möglichst große Zuckerausbeute in nachfolgenden Prozessabschnitten zu ermöglichen. Dabei kann die Verweilzeit stark schwanken und liegt je nach Substrat, Feststoffanteil und gewählter Reaktionstemperatur zwischen 30 min und 90 min. Der Anteil an Abbauprodukten von Monosacchariden, organischen Säuren und phenolytischen Komponenten des Lignins, die inhibierend oder deaktivierend auf Enzyme wirken können und die Zuckerausbeute verringern, ist stets geringer als bei einem Verfahren mit konzentrierter Säure (Alvira *et al.*, 2010). Neben Reststoffen der Landwirtschaft wie Weizen- und Maisstroh werden Weich- und Harthölzer als Substrate durch verdünnte Säure vorbehandelt. Die am häufigsten verwendete Säure ist die Schwefelsäure, die meist mit einem Anteil zwischen 0,05 % und 5 % bei einer Temperatur von 120 °C bis 220 °C eingesetzt wird. Weiter werden Salpeter-, Phosphor-, Salz- und Kohlensäure als saure Katalysatoren eingesetzt. Neben Satzverfahren existieren kontinuierliche Verfahren als Gegenstrom- und Gleichstrom-Applikationen, um den Wärmeübergang zwischen fester und flüssiger Phase optimal zu gestalten (Johnson und Elander, 2008).

Alkalische Vorbehandlungsmethoden

Alkalische Katalysatoren werden verwendet um pflanzenbasierende Materialien vorzubehandeln und die Zugänglichkeit der Polysaccharide für Enzyme zu erhöhen. Als alkalische Katalysatoren dienen Natriumhydroxid/Kaliumhydroxid, Ammoniak und Calciumhydroxid. Grundsätzlich vermindern alkalische Vorbehandlungen das Herauslösen der Hemicellulose aus den Pflanzenmaterialien, im Vergleich zu sauren und hydrothermischen Vorbehandlungsverfahren (Wyman *et al.*, 2005). Der Ligninanteil wird hingegen deutlich reduziert. Bei Reststoffen der Landwirtschaft zeigen sich alkalische Methoden wirksamer als bei Holzmaterialien (Kumar und Wyman, 2009).

Vorbehandlung mit Natriumhydroxid/Kaliumhydroxid

Die Vorbehandlung mit Natriumhydroxid wird verhältnismäßig selten eingesetzt und eignet sich in erster Linie bei Pflanzenmaterialien mit Ligninanteilen von bis zu 18 % (Bjerre *et al.*, 1996). Die Vorbehandlung führt zu einem Aufquellen des Substrats und damit zu einer Vergrößerung der spezifischen Oberfläche der Cellulose sowie zu einer Verringerung der Polymerisierung und der Kristallinität (Taherzadeh und Karimi, 2008). Alternativ kann auch Kaliumhydroxid verwendet werden.

Vorbehandlung mit Ammoniak

In einem Satzverfahren mit einem Anteil von bis zu 29 % (w/w) Ammoniumhydroxid beträgt der Feststoffanteil an Substrat zwischen 10 % und 50 %, wobei die Verweilzeit zwischen wenigen Stunden und einem Tag liegt. Die Reaktionstemperatur wird meist unter 90 °C gehalten, trotzdem wird das Lignin zu 80 % aus dem Weizenstroh und Maisstroh gelöst (Kim und Lee, 2005; Johnson und Elander 2008).

Vorbehandlung mit Calciumhydroxid

Auch bei der Vorbehandlung des Pflanzensubstrats mit Calciumhydroxid werden große Anteile des Lignins gelöst, nicht produktives Binden von Enzymen verringert und die Zugänglichkeit der Polysaccharide erhöht (Kim und Holtzapfel, 2006). Zudem werden Acetylgruppen reduziert und sterische Behinderungen der Enzyme verringert (Mosier *et*

al., 2005). Die Vorbehandlungstemperaturen liegen dabei meist zwischen 70 °C und 130 °C, die Verweilzeiten zwischen 1 h und 6 h, der Feststoffanteil zwischen 5 % und 20 % (w/w). Das Verfahren kann jedoch auch bei Raumtemperatur und entsprechend längerer Verweilzeit von mehreren Wochen durchgeführt werden. Der Anteil des Calciumhydroxids bezüglich des Feststoffes liegt zwischen 0,05 g g⁻¹ und 0,15 g g⁻¹ (Wyman *et al.*, 2005).

3.5.3 Physikalisch-chemische Vorbehandlungsmethoden

Hydrothermische Substratvorbehandlungen stellen Aufschlussmethoden dar, die ohne Zugabe von Chemikalien wirken. Expansionsverfahren mit Wasserdampf, wahlweise versetzt mit alkalischen und sauren Chemikalien können zudem eingesetzt werden. Die plötzliche Expansion des Substrats führt zu einer zusätzlichen Partikelzerkleinerung. Weiter besteht die Möglichkeit, Pflanzensubstrate durch Mikrowellenbehandlung aufzuschließen.

Hydrothermische Verfahren (Autokatalyse)

Der Vorteil von hydrothermischen Biomasse-Aufschlussverfahren liegt im Verzicht chemischer Zusätze. Chemische Katalysatoren wie Säure und Base werden nicht eingesetzt, was sich günstig auf die Materialanforderungen der Reaktoren auswirkt. Dies senkt die Kosten, da keine korrosionsbeständigen Anlagenteile verbaut werden müssen (Yang und Wyman, 2008). Bei hydrothermischen Verfahren erfolgt eine Temperierung der Biomassesuspension auf etwa 160 °C bis 240 °C (Alvira *et al.*, 2010). Während des Verfahrens sinkt der pH vom neutralen in den sauren Bereich von pH 5 bis pH 6 ab. Dies hat zwei Gründe: Einerseits verhält sich Wasser bei hohen Temperaturen wie eine Säure (pH 5,6 bei 200 °C im Vergleich zu pH 7,0 bei 25 °C), zum anderen werden Acetalbindungen der Hemicellulose gespalten, Säurereste der Hemicellulose freigegeben und Essigsäure oder Uronsäuren gebildet (Perez *et al.*, 2007; Weil *et al.*, 1998). Die Zugabe von Säure vor der Vorbehandlung erhöht die Löslichkeit der Hemicellulose durch zunehmende Depolymerisation. Eine angepasste Methode hinsichtlich der Reaktionstemperatur und der Verweilzeit des Substrats ist zu wählen, um die Bildung von inhibierenden oder inaktivierenden Abbauprodukten wie Furfural, Hydroxymethyl-Furfural, verschiedene Phenolen und organischen Säuren zu

minimieren (Kim *et al.*, 2011; Jing *et al.*, 2009; Tejirian *et al.*, 2011; Ximenes *et al.*, 2010a und 2010b) und zusätzliche entgiftende Verfahrensschritte unnötig zu machen. Die Verweilzeit des Substrats ist abhängig von der gewählten Reaktionstemperatur. Während bei ca. 200 °C nur wenige Minuten genügen, um eine gute Zugänglichkeit der Cellulose für die anschließende enzymatische Hydrolyse sicherzustellen, liegen die Verweilzeiten bei einer Reaktionstemperatur von 140 °C häufig bei mehreren Stunden. Grundsätzlich wird Hemicellulose aus der Biomasse entfernt, eine vollständige Extraktion ist jedoch kaum möglich und das Lignin verbleibt zu großen Teilen im Substrat (Jørgensen *et al.*, 2007a).

Im Durchflussverfahren/Festbettverfahren wird erhitztes Wasser durch ein Festbett an Biomasse gepresst. Die Wassertemperatur liegt dabei meist zwischen 180 °C und 220 °C und große Anteile der Hemicellulose und des Lignins werden gelöst, wobei sich der Abbau von Hemicellulose und Lignin mit ansteigender Temperatur verstärkt (Liu und Wyman, 2003; Walch *et al.*, 1992). Die Verweilzeit des Substrats liegt häufig zwischen 5 min und 20 min. Häufig werden der hohe Wasserverbrauch aufgrund geringerer Feststoffanteile und der hohe Energiebedarf als Nachteile von Durchflussmethoden genannt (Yang und Wyman, 2008; Wyman *et al.*, 2005).

Hydrothermische Verfahren gliedern sich somit in Satz- und kontinuierliche Verfahren. Kontinuierliche Prozesse werden im Gegenstrom oder Gleichstrom durchgeführt, um die Energieübertragung zwischen Substrat und wässriger Phase möglichst effektiv und effizient zu gestalten und gleichzeitig eine kontinuierliche Betriebsweise zu gewährleisten (Mosier *et al.*, 2005).

Dampf-Expansionsverfahren (Steam-Explosion)

Die Reaktionstemperatur des Expansionsverfahrens ist hoch und liegt im Bereich zwischen 140 °C und 260 °C. Die Verweilzeit der Biomasse (> 20 % w/w) vor der expansiven Entspannung ist kleiner als 20 min (Johnson und Elander, 2008). Das Verfahren ist bei unterschiedlichen Pflanzenmaterialien einsetzbar, wie Hart- und Weichhölzern oder Reststoffen der Landwirtschaft, wie Maisstroh und Weizenstroh. Durch die mechanische Entspannung auf Atmosphärendruck kommt es zu einer Zerkleinerung der Feststoffpartikel. Zu den Vorteilen eines Expansionsverfahrens zählt damit die Möglichkeit, größere Feststoffpartikel der Biomasse einzusetzen und deren energieintensive Zerkleinerung vor dem Aufschlussverfahren zu reduzieren. Hamelinck

et al. (2005) schätzte den Energiebedarf vor dem eigentlichen Vorbehandlungsverfahren auf bis zu ein Drittel des Gesamtprozesses. Als weitere Vorteile des Dampf-Expansionsverfahrens gelten die nicht zwingend notwendigen chemischen Katalysatoren und die dadurch resultierende geringere Beeinträchtigung der Umwelt bei gleichzeitig hohen Zuckerausbeuten. Die zudem verhältnismäßig geringen Investitionskosten führen dazu, dass Dampf-Expansionsverfahren zu den häufigsten Biomasse-Aufschlussverfahren zählen (Alvira *et al.*, 2010). Als zusätzliche Katalysatoren sind Schwefelsäure, Schwefeldioxid, Kohlendioxid, Natronlauge und Ammoniak möglich, um die Zuckerausbeute weiter zu steigern und Abbauprodukte von Monosacchariden, organische Säuren und phenolische Verbindungen zu verringern (Playne, 1984; Ewanick *et al.*, 2007; Sun und Cheng, 2002; Alvira *et al.*, 2010).

Expansionsverfahren mit Ammoniak (AFEX-Verfahren)

Im Gegensatz zu Dampf-Expansionsverfahren, ist der gewählte Temperaturbereich bei Verwendung von Ammoniak als Katalysator und anschließender plötzlicher Expansion des Substrats wesentlich niedriger. Die Reaktionstemperaturen liegen meist zwischen 60 °C und 140 °C. Die Konzentration des Ammoniaks liegt zwischen 0,3 g g⁻¹ und 2 g g⁻¹ Trockensubstanz an verwendetem Pflanzenmaterial. Die Verweilzeit bis zur Expansion beträgt zwischen 5 min und 45 min (da Costa Sousa *et al.*, 2009). Vorteilhaft beim Einsatz von Ammoniak ist die geringe Bildung von Inhibitoren für Enzyme und Mikroorganismen, wie beispielsweise organischen Säuren und Aldehyden (Alvira *et al.*, 2010). Analog zum Dampf-Expansionsverfahren kommt es bei Entspannung auf Umgebungsdruck zur Verdampfung der Ammoniakphase und zu einer mechanischen Zerkleinerung der Feststoffpartikel.

Bei einem AFEX-Verfahren werden zudem nur geringe Anteile der Hemicellulose während der Vorbehandlung gelöst, was die Verwendung von Hemicellulasen bei der enzymatischen Hydrolyse notwendig macht (Lau und Dale, 2009; Lau *et al.*, 2008; Sun und Cheng, 2002; Wyman *et al.*, 2005). Das AFEX-Verfahren verringert die Kristallinität der Cellulose und reduziert die Bindungen/Wechselwirkungen zwischen den Polysacchariden und Lignin (Laureano-Perez *et al.*, 2005). Zudem tritt eine Verringerung von Acetylgruppen durch das AFEX-Verfahren auf (Kumar *et al.*, 2009b). Besonders effektiv ist das AFEX-Verfahren bei Reststoffen der Landwirtschaft, wie

Weizen- und Maisstroh. Bei Holz- oder anderen Pflanzenmaterialien mit einem hohen Ligninanteil ist das Aufschlussverfahren von geringerer Bedeutung (Alvira *et al.*, 2010). Neben dem AFEX Vorbehandlungsverfahren existieren noch andere Verfahren mit Ammoniak. So wird im *Ammonia Recycle Percolation* ARP-Verfahren das Recycling der Ammoniaklösung möglich, wobei der hohe Energie- und Wasserbedarf einen wesentlichen Nachteil des Verfahrens darstellt.

Mikrowellen Vorbehandlung

Durch eine Vorbehandlung mit Mikrowellen können pflanzliche Zellstrukturen aufgebrochen, die Kristallinität der Cellulose gesenkt und lignocellulosehaltige Substrate für die enzymatische Hydrolyse verfügbar gemacht werden. Die Verweilzeiten liegen zwischen 5 min und 20 min (Alvria *et al.*, 2010). Mögliche chemische Zusätze sind alkalische Chemikalien, Natriumhydroxid im Besonderen (Zhu *et al.*, 2006). Diese Aufschlussmethode ist jedoch energie- und kostenintensiv.

3.5.4 Biologische Vorbehandlungsmethoden

Im Gegensatz zu thermischen und chemischen Vorbehandlungsmethoden, zeichnen sich biologische Methoden durch einen geringen Energiebedarf aus. Meist werden Weißschimmel *Basidiomyceten* (Dorado *et al.*, 1999) wie *Phanerochaete chrysosporium* (Singh *et al.*, 2011) und bestimmte *Actinomyceten* eingesetzt. Die produzierten Enzyme, die auch Lignin Peroxidasen und Laccasen enthalten, reduzieren den Ligningehalt der Pflanzensubstrate (Dashtban *et al.*, 2010; Singh und Chen, 2008). Als nachteilig erweist sich jedoch der hohe Zeitbedarf mikrobiologischer Methoden, sowie die anteilige Verstoffwechslung von Monosacchariden der Substrate (Balan *et al.*, 2008, da Costa Sousa *et al.*, 2009).

3.5.5 Vergleich der unterschiedlichen Substratvorbehandlungen

Es existieren zahlreiche unterschiedliche Vorbehandlungsmethoden von lignocellulosehaltigen Pflanzenmaterialien für die enzymatische Hydrolyse. Eine Übersicht ausgewählter Vorbehandlungsmethoden zeigt Tabelle 3.7. Allen Vorbehandlungsmaßnahmen gemeinsam ist eine verbesserte Zugänglichkeit der Polysaccharide für die Enzyme. So wird die zugängliche Oberfläche durch alle Aufschlussmethoden vergrößert und dadurch die Zugänglichkeit der Substrate für die Enzyme ermöglicht. Eine hohe Löslichkeit der Hemicellulose wird besonders durch saure Vorbehandlungsmethoden erreicht. Auch hydrothermische Verfahren lösen, wie Tabelle 3.7 zeigt, bedeutende Anteile an Hemicellulose aus dem Pflanzensubstrat.

Die Gefahr einer Inaktivierung oder Inhibierung von Enzymen durch Abbauprodukte, bei denen zwischen Zuckerabbauprodukten und Nicht-Zuckerabbauprodukten, wie Komponenten der Ligninfraktion, unterschieden wird, ist besonders bei sauren und hydrothermischen Vorbehandlungsverfahren gegeben.

Um die Bildung von inhibierenden oder inaktivierenden Abbauprodukten möglichst gering zu halten und hohe Zuckerausbeuten in der enzymatischen Hydrolyse zu erreichen, sind in Tabelle 3.8 optimierte Bedingungen für verschiedene Vorbehandlungsmethoden dargestellt (Wyman *et al.*, 2005). Nichtsdestotrotz ist zu beachten, dass Art und Beschaffenheit des Pflanzenmaterials vor dem Aufschlussverfahren beachtlichen Einfluss auf den Erfolg der Vorbehandlung haben können.

Tabelle 3.7: Einfluss verschiedener Vorbehandlungsmethoden auf Pflanzenmaterialien nach Hendriks und Zeeman (2009) und Alvira *et al.* (2010). Hoher Einfluss (+), mittlerer Einfluss (o), geringer Einfluss (-), nicht bekannt (NB).

| Methoden | Zugänglichkeit | Reduzierte Kristallinität | Hemicellulose | Löslichkeit Lignin | Abbauprodukte | Veränderte Ligninstruktur |
|---|----------------|---------------------------|---------------|--------------------|---------------|---------------------------|
| Mechanische Zerkleinerung | + | + | NB | NB | NB | NB |
| Dampf-Expansion | + | NB | + | - | + | + |
| Hydrothermisch Satzverfahren | + | NB | + | - | - | o |
| Hydrothermisch Festbettverfahren | + | NB | + | o | - | o |
| Saure Vorbehandlung | + | NB | + | - | + | + |
| Alkalische Vorbehandlung | + | NB | - | o | - | + |
| Oxidative Vorbehandlung | + | NB | NB | o | - | + |
| Saure-thermische Vorbehandlung | + | NB | + | o | - | + |
| Alk.-thermische Vorbehandlung | + | NB | - | o | - | + |
| Oxidativ thermische Vorb. | + | NB | - | o | - | + |
| Alk. oxidative thermische Vorb. | + | NB | - | o | - | + |
| AFEX | + | + | - | + | - | + |
| ARP | + | + | o | + | o | + |
| CO₂ Expansion | + | NB | + | NB | NB | NB |

Tabelle 3.8: Verschiedene Vorbehandlungsmethoden nach Wyman *et al.* (2005).

| Methode | Chemikalien | Temperatur / °C | Prozessdruck / atm | Reaktionszeit / min | Feststoffanteil / % (w/w) |
|---------------------------------------|---|--------------------|-----------------------|------------------------|------------------------------|
| Saure Vorbehandlung | 0,5 - 3,0 % H ₂ SO ₄ | 130 - 200 | 3 - 15 | 2 - 30 | 10 - 40 |
| Durchfluss Vorbehandlung | 0,0 - 0,1 % H ₂ SO ₄ | 190 - 200 | 20 - 24 | 12 - 24 | 2 - 4 |
| Hydrothermisch pH kontrolliert | Wasser | 160 - 200 | 6 - 14 | 10 - 30 | 5 - 30 |
| AFEX | 1,0 g _{NH3} g ⁻¹ _{TS} | 70 - 90 | 15 - 20 | < 5 | 60 - 90 |
| ARP | 0,10 - 0,15 g _{NH3} g ⁻¹ _{TS} | 150 - 170 | 9 - 17 | 10 - 20 | 15 - 30 |
| Ca(OH)₂ | 0,05 - 0,15 g _{Ca(OH)2} g ⁻¹ _{TS} | 70 - 130 | 1 - 6 | 1 - 6 h | 5 - 20 |
| Ca(OH)₂ und Luft | 0,05 - 0,15 g _{Ca(OH)2} g ⁻¹ _{TS} | 25 - 60 | 1 | 2 Wochen - 2 Monate | 10 - 20 |

Um den Einfluss der Vorbehandlung zu quantifizieren und die Güte der Vorbehandlung zu beurteilen, wurde ein Vorbehandlungsfaktor nach Gleichung 3-38 eingeführt (Overend *et al.*, 1987).

$$R_o = \int_a^b \exp\left(\frac{T_{(t)} - 100^\circ\text{C}}{14,75^\circ\text{C}}\right) dt = t_{Halt} \cdot \exp\left(\frac{T_{(t)} - 100^\circ\text{C}}{14,75^\circ\text{C}}\right) \quad (3-38)$$

Mit t_{Halt} Haltezeit / min
 T Temperatur / °C

Der Vorbehandlungsfaktor (R_o) beschreibt den Substrataufschluss in Abhängigkeit der Temperatur (T) und der Haltezeit (t_{Halt}) bei dieser Temperatur. Diese Einflussgrößen wurden als bestimmende Faktoren für die Güte der Vorbehandlung erachtet. Als Referenztemperatur wird 100 °C angenommen. Der Wert 14,75 °C stellt einen empirisch bestimmten Parameter dar, der die Aktivierungsenergie bei Annahme einer Reaktion pseudo erster Ordnung widerspiegelt (Chen *et al.*, 2007). Der Vorbehandlungsfaktor wird häufig in logarithmischer Schreibweise dargestellt ($\log(R_o)$), sodass sich für die Referenztemperatur von 100 °C und einer Haltezeit von 1 min $\log(R_o)$ von 0 ergibt. Durch die Einführung des Vorbehandlungsfaktors können

Vorbehandlungsverfahren miteinander verglichen werden. Einen Überblick zu häufig eingesetzten Vorbehandlungsverfahren mit Richtwerten zu Vorbehandlungsfaktoren gibt Tabelle 3.9 wieder.

Weiterführende Studien erweiterten Gleichung 3-38 und versuchen den Einfluss des pH während der Substratvorbehandlung zu integrieren (Martínez *et al.*, 1995, Pedersen und Meyer, 2010).

Tabelle 3.9: Vorbehandlungsmethode und Vorbehandlungsfaktor $\log(R_o)$ nach Pedersen und Meyer (2010).

| Vorbehandlungsmethode | Vorbehandlungsfaktor $\log(R_o)$ |
|--------------------------------------|--|
| Saures Vorbehandlungsverfahren | 1,9 - 2,7 (3,0 - 4,3 Expansionsverfahren) |
| Biologisches Verfahren | 2,4 - 2,8 |
| Hydrothermisches Expansionsverfahren | 2,8 - 4,0 |
| AFEX | 0,4 - 3,5 |
| Oxidationsverfahren | 3,2 - 4,0 |
| Ca(OH) ₂ | 2,1 - 3,9 |

4 Materialien und Methoden

4.1 Verwendete Reaktionssysteme

4.1.1 Schüttelkolbenversuche

Als Reaktoren wurden 500 mL Erlenmeyerkolben im Doppelansatz verwendet. Um Verdunstungseffekte während der Reaktion möglichst gering zu halten, wurden die mit Metallkappen verschlossenen Erlenmeyerkolben zusätzlich mit Parafilm M (Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, Deutschland) abgedichtet. Die Schüttelfrequenz im Schüttelinkubator (IBR Laborgeräte GmbH, Deutschland) betrug 200 min^{-1} .

4.1.2 Paralleles Rührkesselreaktorsystem

Verschiedene Rührorgane wurden zunächst als Prototypen nach technischer Zeichnung A1 und A2 im Anhang gefertigt. Als Fertigungsmaterial wurde Poly-Ether-Ether-Keton (PEEK) verwendet. Als Material für die Dauermagnete ($\varnothing 7 \times 3 \text{ mm}$) wurde $\text{Sm}_2\text{Co}_{17}$ von IBS Magnet (Berlin, Deutschland) gewählt. Die Rührorgane sind auf einer Achse gelagert. Verschleißeffekte konnten durch den Einsatz von austauschbaren Lagerbuchsen aus Zedex-530 (Fermetronic GmbH, München, Deutschland) vermindert werden.

Als Milliliter-Reaktionsgefäße kamen aus Polystyrol gefertigte Einwegreaktoren (2mag AG, München, Deutschland) zum Einsatz. Es wurden Milliliter-Reaktionsgefäße mit und ohne Strömungsbrecher verwendet.

Es wurde ein Rührkesselreaktorsystem (Weuster-Botz *et al.*, 2005b) bioREACTOR (2mag AG, München, Deutschland) mit 48 Rührorganen im Parallelbetrieb verwendet (Abbildung 4.1). Die Rührorgane wurden durch magnetische Induktion angetrieben, wobei die Rührerdrehzahl über ein Steuergerät eingestellt werden konnte (2mag AG, München, Deutschland).

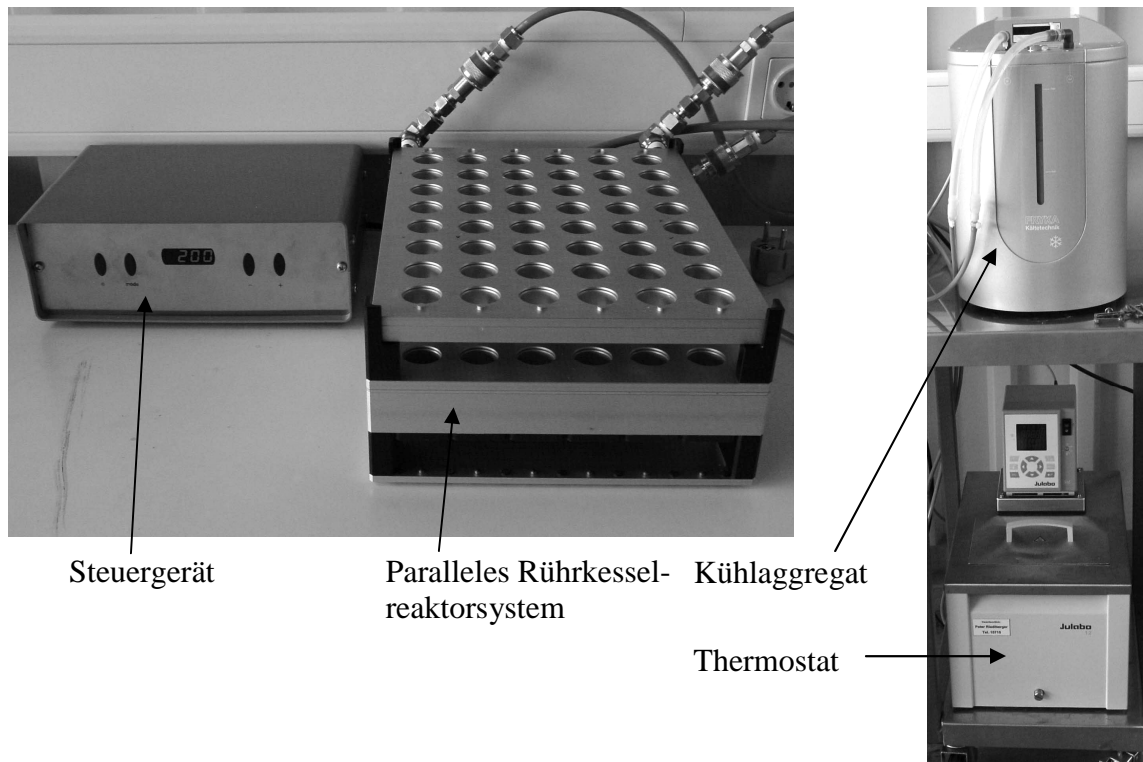


Abbildung 4.1: Rührkesselreaktorsystem bestehend aus 48 parallel betriebenen Rührreaktoren im Milliliter-Maßstab mit Steuergerät, Thermostat für die Temperierung der Reaktoren und Kühlaggregat für die Minimierung der Verdunstung durch eine Kopfraumkühlung der Reaktoren.

Manuelle Probenahmen aus dem Rührkesselreaktorsystem erfolgten über Spritzen mit Kanülen ($\varnothing 2 \times 100$ mm, mimed, Lausanne, Schweiz). Zugaben wurden mit einer handelsüblichen Pipette (Transferpette S, Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, Deutschland) und langen Spitzen mit 91 mm Länge durchgeführt. Die Temperierung des Reaktionsmediums, erfolgte mit einem Umwälzthermostaten (ME 12, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland). Um Verdunstungseffekte zu minimieren, erfolgte eine Kopfraumkühlung der Reaktoren bei 4°C durch ein Kühlaggregat (DLK 402, Fryka Kältetechnik GmbH, Esslingen, Deutschland).

4.1.3 Labor-Rührkesselreaktor

Als Referenzreaktor für verfahrenstechnische Messungen wurde ein Labor-Rührkesselreaktor (KLF 2000, Bioengineering AG, Wald, Schweiz) mit 3-fach angeordneten 6-Blatt Scheibenrührern mit einem Rührerspitzendurchmesser von 40 mm verwendet. Der Reaktorinnendurchmesser betrug 100 mm, so dass das Verhältnis von Rührerspitzendurchmesser zu Reaktordurchmesser bei 0,40 lag. Der Bodenabstand der

3-fach übereinander angeordneten 6-Blatt Scheibenrührer betrug 57 mm, 114 mm und 171 mm. Das Arbeitsvolumen betrug 1,7 L. Die Rührerdrehzahlen lagen zwischen 300 min^{-1} und 1700 min^{-1} .

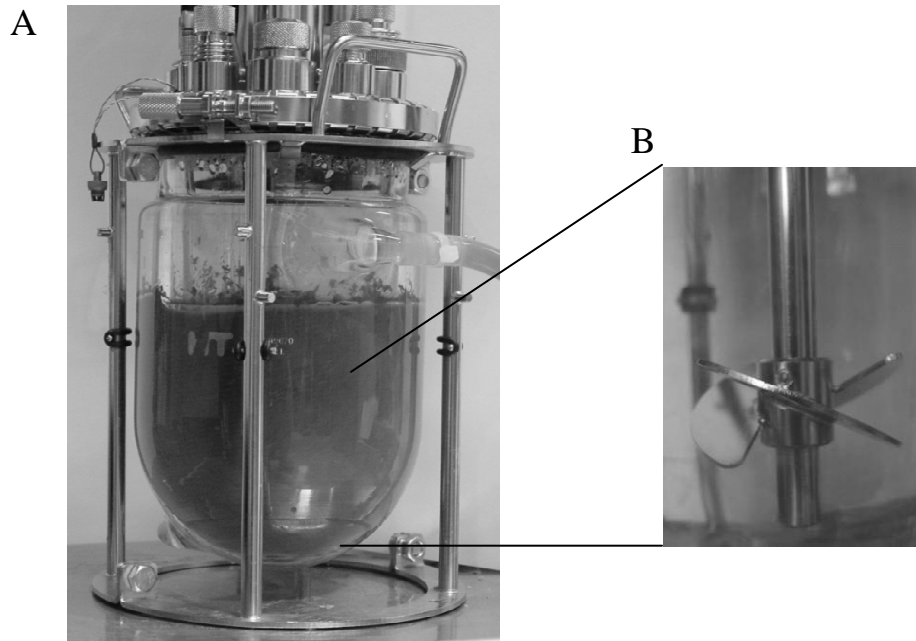


Abbildung 4.2: Labor-Rührkesselreaktor für die enzymatische Hydrolyse (A) mit Propellerrührer (B).

Als Referenzreaktor für die enzymatische Hydrolyse wurde ein 2 L Rührkesselreaktor (Labfors Reaktorinnendurchmesser 118 mm, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) mit Propellerrührer verwendet (Abbildung 4.2A). Der Propellerrührer hatte einen Spitzendurchmesser von 54 mm und eine Höhe von 12 mm. Die Rührblätter besitzen einen Neigungswinkel von 30° (Abbildung 4.2B). Das Größenverhältnis von Rührerspitzenradius zu Reaktordurchmesser betrug 0,46. Das Rührorgan wurde 157 mm unterhalb des Reaktordeckels montiert. Die Betriebsdrehzahl betrug 500 min^{-1} . Die Messung des pH erfolgte über eine pH-Sonde (405-DPAS-SC-K8S, Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland). Die Probennahme wurde mit einer 10 mL Pipette (Transferpipette S, Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, Deutschland) durchgeführt. Die Masse des eingesetzten Reaktionsmediums betrug 1 kg.

4.2 Verfahrenstechnische Charakterisierung verschiedener Rührer

4.2.1 Mischzeit und Durchmischungskennzahl

Mischzeitmessung

Die Homogenität im Milliliter-Rührreaktor wurde durch Mischzeitmessungen beurteilt. Da Enzyme während der enzymatischen Hydrolyse in erster Linie in der Flüssigphase verteilt werden, wurden Leitfähigkeitsmessungen in der Flüssigphase zur Mischzeitbestimmung durchgeführt. Die Methode zeichnet sich durch gute Reproduzierbarkeit im Milliliter-Maßstab und Liter-Maßstab aus. Zu Beginn jeder Messung wurde das elektronische Signal auf null gesetzt. 50 µL einer 4 M Kochsalzlösung (NaCl) wurden auf das gerührte Medium (10 g) gegeben. Über einen Sensor an der oberen Phasengrenze konnte der Zugabezeitpunkt bestimmt werden (Abbildung 4.3). Für die Quantifizierung der Medienhomogenität wurde die resultierende Änderung der Leitfähigkeit am Reaktorboden ebenfalls mit metallischen Sensoren gemessen. Um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, konnte eine elektronische Pipette (Transferpette, Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, Deutschland) für die Salzzugabe mit konstantem Zugabeimpuls eingesetzt werden. Der Endwert des Homogenitätszustandes (100 %) konnte durch ein konstant bleibendes Signal, wie in Abbildung 4.4 dargestellt, identifiziert werden. Der erreichte Homogenitätszustand wurde durch einen konstanten Leitfähigkeitswert nach zuvor gesteigerter Rührerdrehzahl überprüft (100 % Homogenität).

Die produzierten Signalverläufe wurden mit Labview 7.4 (National Instruments Corporation, Austin, USA) verarbeitet, dargestellt und dokumentiert. Der Antrieb des Rührorgans erfolgte analog dem Betrieb im Bioreaktorblock (Kapitel 4.1.2), durch magnetische Induktion. Dazu wurde das in Abbildung 4.3 dargestellte Einzelmesssystem, mit einem Steuergerät für die Kontrolle der Rührerdrehzahl verwendet (MIXcontrol 40 speed, 2mag AG, München, Deutschland). Die Position des Rührorgans entspricht der Position der Rührorgane im parallelen Rührkesselreaktorsystem. Es erfolgte jeweils eine 3-fach Bestimmung jeder Mischzeitmessung.

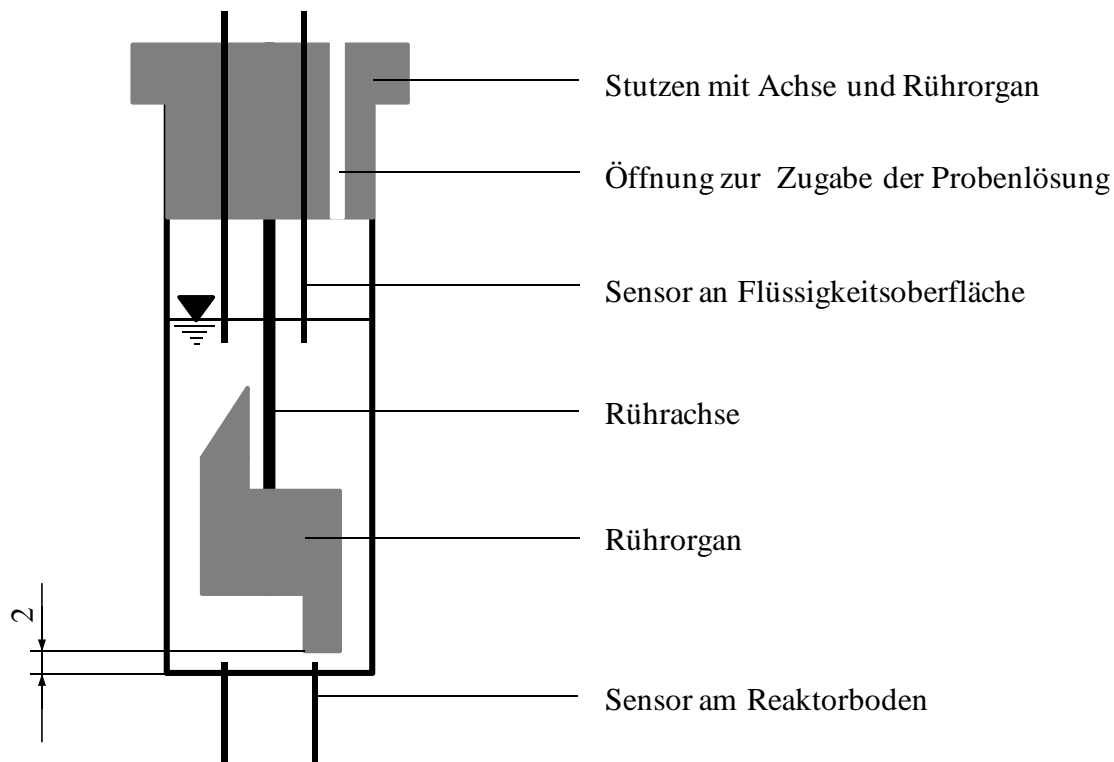


Abbildung 4.3: Schematischer Aufbau der Leitfähigkeitsmessung in Milliliter-Rührreaktoren. Der Antrieb des Rührorgans erfolgte magnetisch-induktiv (nicht dargestellt).

Bestimmung der Mischzeit und der Durchmischungskennzahl

Die Mischzeit wurde durch die Methode gleitender Mittelwerte bestimmt. Dazu wurden zehn Leitfähigkeitswerte zu einem gleitenden Mittelwert zusammengefasst. Die Methode gleitender Mittelwerte reduziert das Messrauschen bei gleichbleibender Anzahl an Datenpunkten. Die Abtastzeit der Leitfähigkeitsmessung betrug 0,1 s. Die Mischzeit ($\theta_{0,97}$) wurde dem Messsignal entsprechend zu 97 % Homogenität bestimmt (Abbildung 4.4). Dazu wurden der Zugabezeitpunkt der Salzlösung (θ_0) sowie die Zeitdauer bis zum Erreichen vollständiger Homogenität (100 %) (siehe Mischzeitmessung) aus den gleitenden Mittelwerten der Leitfähigkeit bestimmt. Anschließend konnte die Mischzeit ($\theta_{0,97}$) bis zum Erreichen einer 97 % Leitfähigkeit berechnet werden. Die Durchmischungskennzahl ergibt sich durch Multiplikation der Rührerdrehzahl mit der Mischzeit ($n \cdot \theta_{0,97}$).

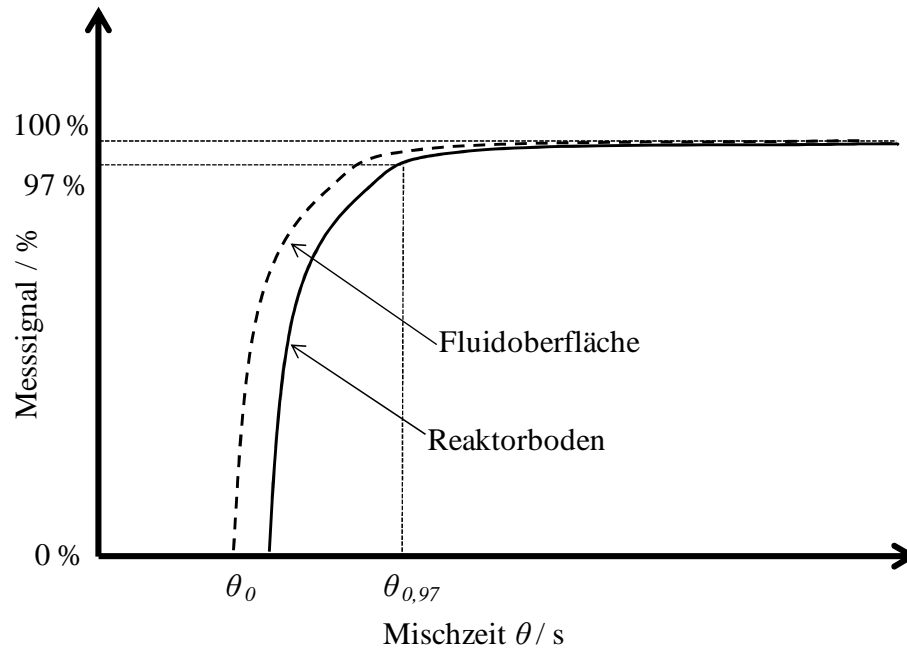


Abbildung 4.4: Prinzip der Mischzeitbestimmung aus dem Messsignal der Leitfähigkeit. Das Messsignal wurde vor Zugabe der Salzlösung zum Zeitpunkt θ_0 auf null gesetzt.

4.2.2 Bestimmung des Leistungseintrags

Über das gerührte Medium wurde auf die Reaktorwand des Milliliter-Rührreaktors ein Drehmoment übertragen. Dieses konnte mittels eines speziellen Drehmomentensensors (DG 1-3, Modia Mess- und Datentechnik GmbH, Neckargmünd, Deutschland) gemessen werden. Der Drehmomentensensor ermöglicht es, Drehmomente zwischen 0,01 mN m und 100 mN m zu messen. Die digitalen Werte werden mittels eines Analog-Digital Wandlers (M312.10, Modia Mess- und Datentechnik GmbH, Neckargmünd, Deutschland) in ein analoges Signal umgewandelt. Das analoge Signal wird am Messgerät nach dem Einstellen eines konstanten Wertes abgelesen.

Mit Hilfe der Winkelgeschwindigkeit (ω) konnte der Leistungseintrag (P) nach Gleichung (4-1) berechnet werden. Die Winkelgeschwindigkeit (ω) ist eine Funktion der Rührerdrehzahl (n) nach Gleichung (4-2).

$$P = M \cdot \omega \quad (4-1)$$

Mit der Winkelgeschwindigkeit

$$\omega = 2 \cdot \pi \cdot n \quad (4-2)$$

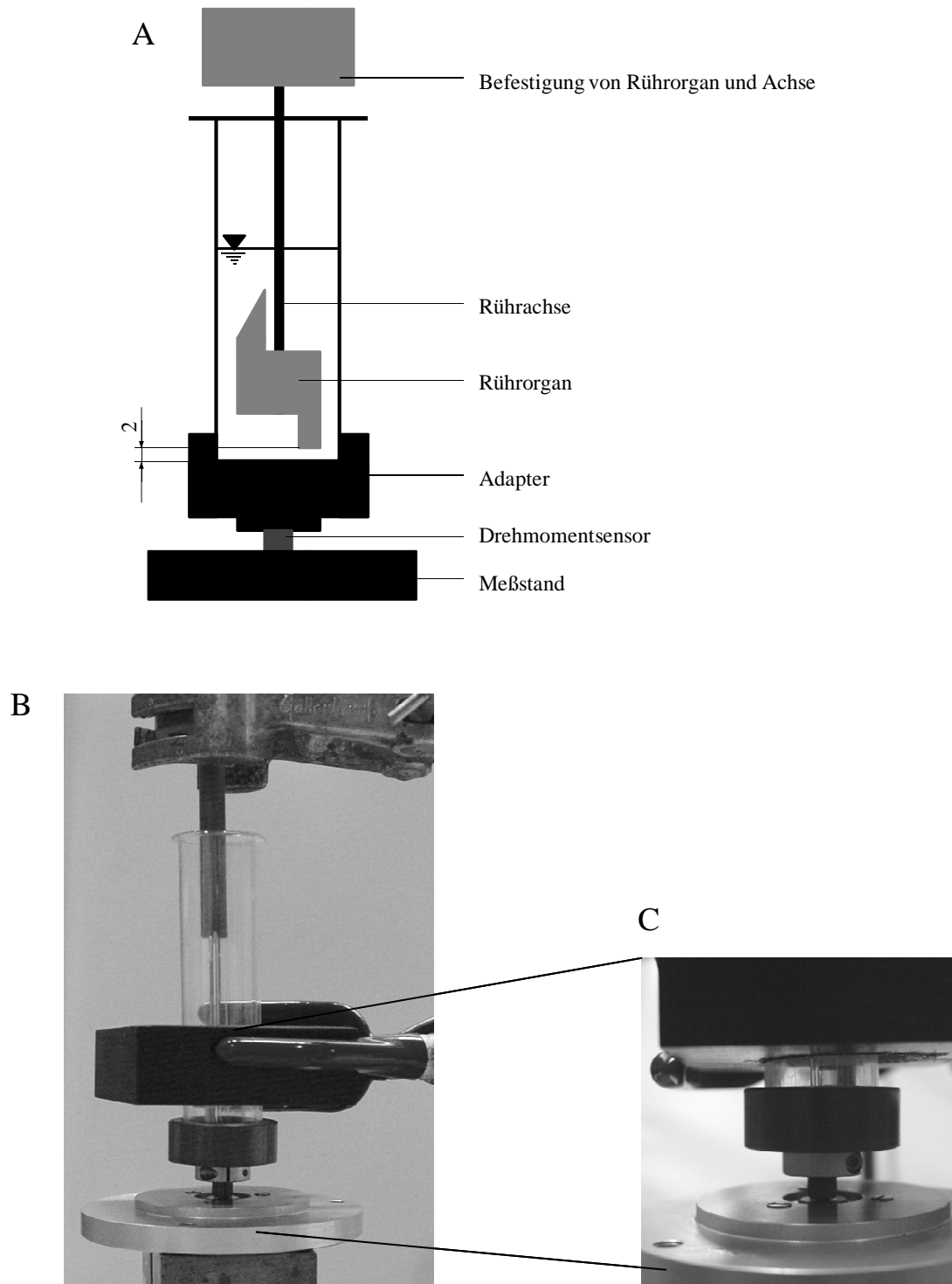


Abbildung 4.5: Schematischer Aufbau der Leistungseintragsmessung in Milliliter-Rührreaktoren (A). Der Antrieb des Rührorgans erfolgte magnetisch-induktiv (B) und das Drehmoment wurde über einen Adapter gemessen (C).

Für die Messungen wurde ein Einzelmesssystem wie in Abbildung 4.5 gezeigt, verwendet. Hierfür wurde der Milliliter-Rührreaktor, mit und ohne Strömungsstörer über einen Adapter mit dem Drehmomentensensor verbunden. Das gleitend gelagerte Rührorgan wurde verbindungslos zum Milliliter-Reaktionsgefäß befestigt. Der Antrieb

des Rührorgans erfolgte analog dem Betrieb im Bioreaktorblock (Kapitel 4.1.2) durch magnetische Induktion. Die Rührerdrehzahl wurde durch ein Steuergerät eingestellt (MIXcontrol 40 speed, 2mag AG, München, Deutschland). Die Betriebsposition des Rührorgans entspricht der im parallelen Rührkesselreaktorsystem.

4.2.3 Bestimmung der scheinbaren Schergeschwindigkeit

Die scheinbare Schergeschwindigkeit (scheinbare Scherrate) wurde für die untersuchten Rührorgane in Milliliter-Rührreaktoren (2mag AG, München, Deutschland) mit und ohne Strömungsbrecher in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl bestimmt. Hierfür wurde die Methode von Peter *et al.* (2004) zur Bestimmung der Metzner-Otto Konstanten (k) angewandt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Hypothese, dass wie in Abbildung 4.6 veranschaulicht, abhängig von der Rührerdrehzahl bei gleichen Leistungseinträgen und somit gleichen Newtonzahlen auch dieselbe scheinbare Viskosität in einem Newtonschen und einem Nicht-Newtonschen Fluid vorliegen muss (Metzner und Otto, 1957). Werden unterschiedlich viskose Zusammensetzungen der beiden Fluide untersucht, kann jeweils die Schergeschwindigkeit ($\dot{\gamma}$) in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl (n) aufgetragen werden und aus der resultierenden Geraden die Steigung als Metzner-Otto Konstante (k) ermittelt werden.

Als Newtonsche und Nicht-Newtonsche Modellfluide wurden Glycerin- (99,5 %, Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und Xanthan- (Xanthan Gum reinst, Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) Wasserlösungen verwendet. Die verwendeten Massenanteile an Glycerin können der Tabelle 4.1 entnommen werden. Die Konzentrationen der Xanthanlösungen betragen 4 g L^{-1} , 6 g L^{-1} und 8 g L^{-1} . Die Ansätze wurden auf $29 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert.

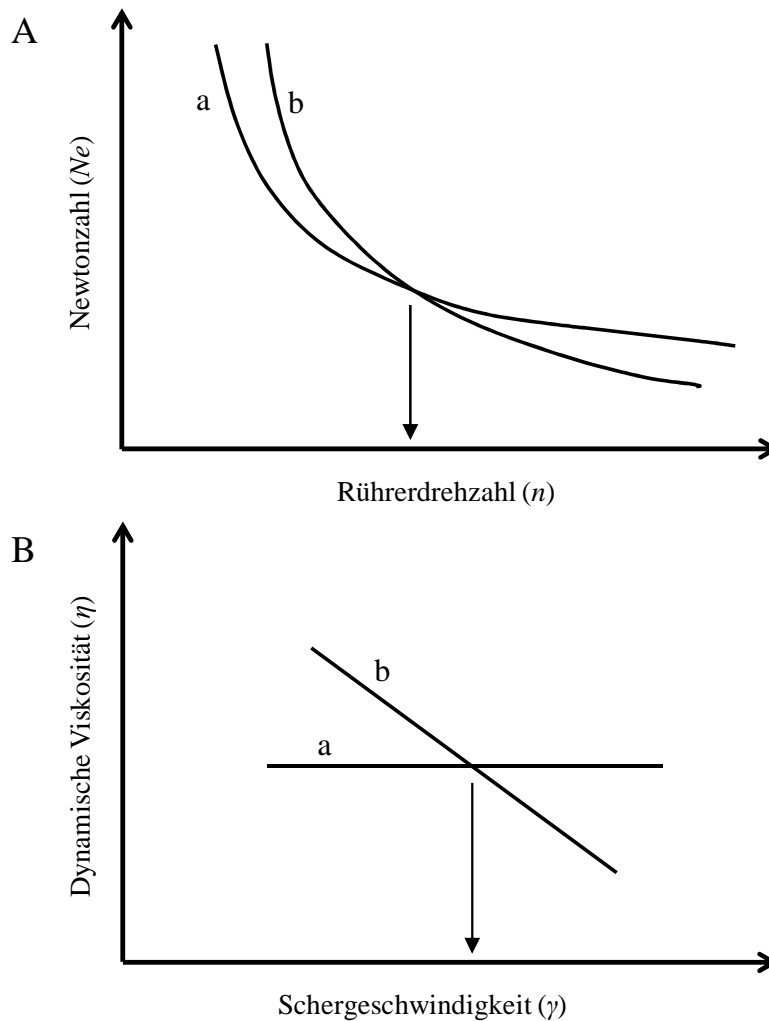


Abbildung 4.6: Schematische Abhängigkeit der Newtonzahl (Ne) von der Rührerdrehzahl (n) (A). Schematische Abhängigkeit der Viskosität (η) von der Schergeschwindigkeit (γ) (B). Prinzip der Ermittlung der Rührerdrehzahl (n) und der scheinbaren Schergeschwindigkeit (γ) für ein Newtonsches (a) und ein Nicht-Newtonsches Fluid (b) nach Metzner und Otto (1957).

Tabelle 4.1: Verwendete Glycerin-Wasser Lösungen als Newtonsches Modellfluid.

| Glycerinlösung | Glycerin / % (w/w) |
|----------------|--------------------|
| 1 | 80 |
| 2 | 90 |
| 3 | 93 |
| 4 | 95 |
| 5 | 100 |

4.2.4 Bestimmung der maximalen lokalen Energiedissipation

Die maximale lokale Energiedissipation wurde in Milliliter-Rührreaktoren ohne Strömungsbrecher, für ein neu entwickeltes Rührorgan bestimmt.

Als Referenzgefäß im Liter-Maßstab wurde ein Labor-Rührkesselreaktor (KLF 2000, Bioengineering AG, Wald, Schweiz) mit 3-fach angeordneten 6-Blatt Scheibenrührern verwendet. Für die Messungen ist ein Ton/Polymerflockensystem notwendig. Dazu wurde ein Blautonflockensystem nach Hoffmann *et al.* (1992) eingesetzt. Die Zusammensetzung betrug $0,5 \text{ g L}^{-1}$ Blauton (Witterschlicker Blauton HFF, WBB Fuchs GmbH und Co. KG, Ransbach-Baumbach, Deutschland) und 1 g L^{-1} Natriumchlorid (Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Anschließend wurde die Suspension für mindestens 1 h bei 1000 min^{-1} gerührt, um die Partikel auf die reproduzierbare Primärgröße zu reduzieren. Als Flockungsmittel wurde ein kationisches Polymer (Praestol 650BC, Ashland GmbH, Krefeld, Deutschland) in einer Konzentration von 5 g L^{-1} verwendet. Es wurde langsam untergerührt, bis eine Konzentration von $0,03 \text{ g L}^{-1}$ erreicht war.

Die Bestimmung der Partikelgröße erfolgte durch eine Lasersonde (3D-ORM-Lasersonde, MTS, Messtechnik Schwarz GmbH, Düsseldorf, Deutschland) mit dem Programm WinORM 5.1 (MTS, Messtechnik Schwarz GmbH, Düsseldorf, Deutschland), wobei Partikelgrößen zwischen $1 \mu\text{m}$ bis $1000 \mu\text{m}$ detektiert werden können. Um eine ausreichende Anzahl an Partikel (≥ 4000 Stück) zu detektieren und aussagekräftige Informationen über den Partikeldurchmesser zu erhalten, wurde das Messintervall auf 60 s eingestellt. Als charakteristischer Partikeldurchmesser konnte der Medianwert der Volumensummenverteilung ($d_{50,3}$) bestimmt werden. Im Labor-Rührkesselreaktor ist eine *online* Messung der Partikelgröße über einen DN19 Stutzen im Deckel des Reaktorgefäßes möglich.

Für die Messungen im Milliliter-Rührkesselreaktorsystem (2mag AG, München, Deutschland) diente der Labor-Rührkesselreaktor als Reservoirbehälter der Blautonsuspension für die mit 12 mL Blautonsuspension gefüllten unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren (2mag AG, München, Deutschland). Nach konstanter Beanspruchungsdauer von 40 min in einem Drehzahlbereich zwischen 1000 min^{-1} und 3000 min^{-1} , erfolgte die Bestimmung der Partikelgröße nach der Methode von Hortsch (2011). Dazu wurde ein Volumen von 50 mL Suspension in einem Becherglas aus drei Milliliter-Rührreaktoren vereinigt und mittels eines Magnetrührers (Länge: 24 mm,

Durchmesser: 8 mm) auf einer Magnetrührplatte (Variomag Monotherm, H+P Labortechnik, München-Oberschleißheim, Deutschland) weiter bei einer Drehzahl von 600 min^{-1} gerührt. Dadurch wird das Sedimentieren von gebildeten Flocken verhindert, jedoch auch eine Zerkleinerung der Flocken vermieden. Die Zerkleinerungskinetik wurde für jede Rührerdrehzahl im 3-fach Ansatz bestimmt.

4.3 Enzymatische Hydrolyse mikrokristalliner Cellulose

Für die enzymatische Hydrolyse mikrokristalliner Cellulose wurde Avicel PH 101 (Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, Deutschland) mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von $50 \mu\text{m}$ verwendet. Die Enzympräparate „Celluclast“ und „Novozym 188“ (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dänemark) wurden mit einer jeweiligen Beladung von $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ bzw. $45,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ sowie $5,7 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ eingesetzt. „Celluclast“ ist ein Cellulasepräparat, welches mit *Trichoderma reesei* hergestellt wurde. Nach Merino und Cherry (2007) besteht dieser aus 80 % Cellobiohydrolasen (60 % CBH I und 20 % CBH II), etwa 15 % Endoglucanasen und etwa 0,5 % β -Glucosidasen. „Novozym 188“ ist ein β -Glucosidasepräparat, welches mit dem Pilz *Aspergillus niger* hergestellt wurde. Die Proteinkonzentrationen der beiden Enzympräparate sind in Tabelle A4 im Anhang dargestellt.

Der Massenanteil an mikrokristalliner Cellulose betrug 5 %, 10 %, 15 % und 20 % (w/w TS). Der Feststoffanteil wurde mit einem 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,0) in den Milliliter-Rührreaktoren ohne Strömungsbrecher eingestellt (Füllgewicht 10 g).

4.4 Enzymatische Hydrolyse von Biomassesuspensionen

4.4.1 Weizenstroh und Maisspindelgranulat

Für die enzymatische Hydrolyse von lignocellulosehaltigen Pflanzenmaterialien wurde Weizenstroh und Maisspindelgranulat verwendet.

Weizenstroh

Das Weizenstroh wurde im Jahr 2008 in Süddeutschland angebaut und geerntet. Das Weizenstroh wurde von der Süd-Chemie AG (München, Deutschland) und dem Fraunhofer Institut für Chemische Technologie (Pfinztal, Deutschland) bereitgestellt. Die Weizenstrohfasern wurden mechanisch auf eine Partikelgröße kleiner 200 µm und kleiner 2 mm zerkleinert. Die vorbehandelte Weizenstrohfraction aus Tabelle 4.3c enthielt nach dieser mechanischen Zerkleinerung jedoch auch Partikel mit bis zu 15 mm Länge. Der Anteil an Restfeuchte zur Trockensubstanz (TS) betrug 9 % (w/w).

Maisspindelgranulat

Das verwendete Maisspindelgranulat wurde im Jahr 2006 (feine Fraktion) und 2009 (grobe Fraktion) im Südwesten Frankreichs angebaut und geerntet. Der Anteil an Restfeuchte betrug 9 % und 7 % (w/w TS) für die feine und grobe Fraktion an Maisspindelgranulat.

Die feine Fraktion an Maisspindelgranulat wurde auf eine Partikelgröße kleiner 0,25 mm (95 % der Partikel) zerkleinert (EU-GRITS -100). Die grobkörnigere Fraktion enthielt mindestens 45 % Partikel im Größenbereich von 0,71 mm bis 1,00 mm und bis zu 50 % Partikel von 0,56 mm bis 0,71 mm. Auf die Größenbereiche oberhalb von 1,00 mm sowie unterhalb von 0,56 mm entfiel der restliche Partikelanteil von 5 % des grobkörnigen Maisspindelgranulats (EU-GRITS 20). Das Maisspindelgranulat wurde von der Firma Freiherr von Haxthausen (Lichtenau, Deutschland) bezogen. Die Zusammensetzung von Maisspindelgranulat (EU-GRITS 20) ist in der Tabelle 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.2: Zusammensetzung von Maisspindelgranulat (EU-GRITS 20) laut Datenblatt (Firma Freiherr von Haxthausen, Lichtenau, Deutschland)

| Substratkomponente | Feststoffanteil / % (w/w) |
|---------------------------|----------------------------------|
| Cellulose | 47,1 |
| Hemicellulose | 37,3 |
| Pentosan | 36,5 |
| Lignin | 6,8 |
| Asche | 1,2 |

4.4.2 Substratvorbehandlung

Um die Ausbeute an Monosacchariden zu erhöhen wurden das Weizenstroh und das Maisspindelgranulat vor der enzymatischen Hydrolyse vorbehandelt. Neben einer hydrothermischen Vorbehandlung mit vollentsalztem Wasser, wurden für die Vorbehandlung der Pflanzenmaterialien verdünnte Schwefelsäure und Calciumhydroxid als saure und alkalische Aufschlussmethoden, wie in Tabelle 4.3 veranschaulicht, eingesetzt.

Das vorbehandelte Weizenstroh und Maisspindelgranulat wurde vom Flüssigkeitsüberstand getrennt, der Feststoff mit vollentsalztem Wasser gewaschen und in vollentsalztem Wasser resuspendiert. Der pH wurde vor dem Entfernen der Flüssigphase auf $\text{pH } 5,0 \pm 0,2$ eingestellt. Der Feststoff wurde anschließend manuell ausgepresst und der Flüssigphasenanteil des verbliebenen Feststoffes bestimmt. Dazu wurden fünf Feststoffproben in Eppendorfgefäßen (3810X, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Trockenofen (Steriliser, Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland), bis kein Massenverlust mehr feststellbar war, getrocknet. Der Trockensubstanzanteil wurde bestimmt, um den gewünschten Feststoffanteil an vorbehandeltem Pflanzenmaterial in den Reaktoren für die anschließende enzymatische Hydrolyse einzustellen. Die Lagerung des vorbehandelten Pflanzenmaterials erfolgte bei einer Temperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung. Kurze Zwischenlagerungen erfolgten bei einer Temperatur von $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Durch die Vorbehandlung wurde keine merkliche Veränderung der Partikelgröße von Weizenstroh und Maisspindelgranulat festgestellt.

Tabelle 4.3: Verwendete Substratvorbehandlungen für Weizenstroh- und Maisspindelgranulat. Trockensubstanz (TS).

| Methode | Katalysator | TS (w/w) | Temperatur | Haltezeit | Druck | Bemerkung |
|--------------------------------------|--------------------------|-------------|------------|-----------|------------|-----------|
| Hydrothermisch | destl. Wasser | 30 % | 135 °C | 1 h | 2,2 bar | a) |
| | destl. Wasser | 10 % | 140 °C | 3 h | 2,5 bar | b) |
| | destl. Wasser | 10 % | 160 °C | 1 h | 4,0 bar | c) |
| | destl. Wasser | 8 % | 190 °C | 10 min | 16 bar | d) |
| Sauer H ₂ SO ₄ | 0,5 % v/v | 10 % | 135 °C | 0,5 h | 2,2 bar | a) |
| | 1 % v/v | 10 % | 135 °C | 0,5 h | 2,2 bar | a) |
| | 3 % v/v | 30 % | 135 °C | 0,5 h | 2,2 bar | a) |
| Alkalisches Ca(OH) ₂ | 0,1 g g ⁻¹ TS | 30 % | 135 °C | 1 h | 2,2 bar | a) |

- a) Dampfautoklav mit Wasserkühlung, Aufheizzeit etwa 0,5 h: Varioklav, H+P Labortechnik, München, Deutschland
- b) Druckreaktor mit Wasserkühlung, Aufheizzeit etwa 0,5 h: Series 4534, Parr, Moline, USA (Durchgeführt durch Wissenschaftszentrum Straubing, Technische Universität München)
- c) Bereitgestellt durch Süd-Chemie AG, München, Deutschland
- d) Druckreaktor (Reaktorgefäß wassergekühlt), Aufheizzeit etwa 1,5 h: Highpreactor BR-100, Berghof, Eningen, Deutschland

4.4.3 Bedingungen für die enzymatische Hydrolyse

Die Versuche wurden im Satzverfahren durch einmalige Zugabe der Enzympräparate zu Beginn der enzymatischen Hydrolyse durchgeführt. Bei mehrfacher Zugabe von Enzympräparaten wurden diese in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,0) gelöst und in entsprechender Menge zugegeben. Als Enzympräparate wurden „Celluclast“ und „Novozym 188“ (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dänemark) verwendet. Die eingestellten anfänglichen Enzymbeladungen im Satzverfahren betragen 3,0 mg_{Protein} g⁻¹ TS; 7,0 mg_{Protein} g⁻¹ TS; 15,0 mg_{Protein} g⁻¹ TS; 30,0 mg_{Protein} g⁻¹ TS; 45,0 mg_{Protein} g⁻¹ TS für das Enzympräparat „Celluclast“ bzw. 1,9 mg_{Protein} g⁻¹ TS und 5,7 mg_{Protein} g⁻¹ TS für das Enzympräparat „Novozym 188“. Die Proteinkonzentrationen der verwendeten Enzympräparate sind in Tabelle A4 im Anhang dargestellt.

Die bestimmte Verdunstungsrate von $6 \mu\text{L h}^{-1}$ wurde vor der Entnahme von Proben durch Zugabe eines entsprechenden Volumens an destilliertem Wasser ausgeglichen. Bei Mehrfachzugaben an Enzymen wurde das zugegebene Volumen mit dem Verdunstungsausgleich kombiniert. Die Reaktionstemperatur betrug 50°C und 60°C . Um das Kontaminationsrisiko zu reduzieren, wurde Ampicillin (Ampicillin Natriumsalz, Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) mit einer Konzentration von $100 \mu\text{L mL}^{-1}$ in der Flüssigphase zugesetzt. Die angegebenen Monosaccharidfreisetzungen während der enzymatischen Hydrolyse beziehen sich auf das jeweils verwendete vorbehandelte Substrat.

Weizenstroh

Die zu Beginn der Reaktion eingestellten Feststoffanteile betragen 4 %, 8 % und 10 % (w/w TS) für die grobe Weizenstrohfraction. Die feine Weizenstrohfraction wurde bei einem Feststoffanteil von 8 % (w/w TS) enzymatisch hydrolysiert. Der Feststoffanteil wurde jeweils mit einem 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,0) eingestellt. Die Einwaage der Milliliter-Bioreaktoren betrug 10 g für hydrothermische Aufschlüsse und 12 g bei alkalischen und sauren Aufschlussverfahren.

Maisspindelgranulat

Die vor Beginn der Reaktion eingestellten Feststoffanteile waren 6 %, 8 %, 10 %, 14 % und 18 % (w/w TS) für die grobe Fraktionsgröße an Maisspindelgranulat. Das fein gemahlene Maisspindelgranulat wurde bei einem Feststoffanteil von 8 % (w/w TS) enzymatisch hydrolysiert. Der Feststoffanteil wurde mit einem 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,0) eingestellt. Die Einwaage der Milliliter-Bioreaktoren betrug 12 g.

Weitere Enzympräparate

Als weitere Enzympräparate wurden die Hemicellulasepräparate „Shearzyme (NS50030)“, „Pulpzyme (NS22012)“ und „NS22002“ sowie das Enzympräparat „NS50012“ verwendet (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dänemark). Die „Accellerase 1500“ (Genencor (DuPont AG), Leiden, Niederlande) ist ein Cellulase-, β -Glucosidase- und Xylanasegemisch, das aus einem modifizierten Stamm von *Trichoderma reesei*

hergestellt wurde. Verschiedene Enzympräparate von Erbslöh AG (Geisenheim, Deutschland) wurden wie in Tabelle 4.4 dargestellt, verwendet. Die Enzympräparate wurden jeweils mit einer Beladung von $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ für die enzymatische Hydrolyse von Weizenstroh und Maisspindelgranulat eingesetzt.

Tabelle 4.4: Verschiedene Enzympräparate mit Hauptaktivität der enthaltenen Enzyme (Erbslöh AG, Geisenheim, Deutschland). Nicht bekannt (NB).

| Markenname | Mikroorganismus | Enzyme |
|-----------------|------------------------------------|-------------------------------|
| Distizym BETA G | <i>Trichoderma longibrachiatum</i> | Cellulasen und Hemicellulasen |
| BG-Super | <i>Penicillium funiculosum</i> | Cellulasen |
| BG HK4 | <i>Talaromyces emersonii</i> | Cellulasen |
| Vegazym HC | NB | Hemicellulasen |

4.5 Optimierung der enzymatischen Hydrolyse

4.5.1 Verwendete Pflanzenmaterialien

Das für die Optimierung der enzymatischen Hydrolyse verwendete Weizenstroh wurde mechanisch auf eine Partikelgröße kleiner 2 mm zerkleinert. Weitere Informationen sind in Kapitel 4.4.1 dargestellt. Das Maisspindelgranulat wurde 2010 im Südwesten Frankreichs geerntet (EU-GRITS 20, siehe Kapitel 4.4.1). Der Anteil an Restfeuchte betrug 5,4 % (w/w TS).

4.5.2 Verwendete Vorbehandlungen

Für die Optimierung der enzymatischen Hydrolyse wurden unterschiedliche Substratvorbehandlungsmethoden durchgeführt (Tabelle 4.5). Dabei handelt es sich um alkalische, saure und hydrothermische Aufschlussverfahren der Substrate Weizenstroh und Maisspindelgranulat. Die angewandten Vorbehandlungsbedingungen waren für beide Substrate identisch. Die Vorgehensweise ist in Kapitel 4.4.2 beschrieben.

Tabelle 4.5: Verwendete Vorbehandlungen für Weizenstroh und Maisspindelgranulat. Trockensubstanzanteil (TS), Temperatur (T), Haltezeit (t_{Halt}), Betriebsdruck (p).

| Method | Zusätze | TS / (w/w) | $T / ^\circ\text{C}$ | $t_{\text{Halt}} / \text{h}$ | p / bar | Bemerkung |
|------------------------------------|-----------------------------------|------------|----------------------|------------------------------|------------------|-----------|
| Hydrothermisch | destl. Wasser | 10 % | 160 | 1 | 4,0 | a) |
| Sauer H_2SO_4 | 0,5 % v/v | 10 % | 135 | 0,5 | 2,2 | b) |
| Alkalisch $\text{Ca}(\text{OH})_2$ | 0,1 g $\text{g}^{-1}_{\text{TS}}$ | 10 % | 135 | 1 | 2,2 | b) |

a) Bereitgestellt durch Süd-Chemie AG, München, Deutschland

b) Dampfautoklav mit Wasserkühlung, Aufheizzeit etwa 0,5 h: Varioklav, H+P Labortechnik, München, Deutschland

4.5.3 Empirische Optimierung

Für die empirische Optimierung der Zielgrößen volumenspezifische Glucose- und Xyloseproduktivität bei der enzymatischen Hydrolyse wurde ein quadratischer Polynomansatz (RSM) gewählt (Khuri und Mukhopadhyay, 2010). Dabei wird durch die gezielte Wahl eingehender Variablen (gewählte Einflussgrößen), das Antwortverhalten durch ein Polynom 2. Ordnung nach Gleichung 4-3 beschrieben.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{j < i=1}^k \sum_{i=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 \quad (4-3)$$

Mit x Einflussgrößen
 β_{ij} Anpassungsparameter nullter, erster und zweiter Ordnung
 y Zielgröße oder Antwortgröße

Mit dieser empirischen Beschreibung ist es unter bestimmten Annahmen möglich, Interaktionen zwischen den untersuchten Einflussgrößen festzustellen und zu quantifizieren. Es wurden die fünf Einflussgrößen Temperatur, pH, Cellulasen-, β -Glucosidasen- und Hemicellulasenbeladung auf die Glucose- und Xyloseproduktivität innerhalb von 24 h Hydrolysedauer untersucht. Der Feststoffanteil zu Beginn der enzymatischen Hydrolyse betrug 8 % (w/w TS) an vorbehandeltem Weizenstroh und 18 % (w/w TS) an vorbehandeltem Maisspindelgranulat. Der Feststoffanteil konnte mit pH 5,0; pH 6,0 und pH 4,0 Natriumacetatpuffer der Konzentration 50 mM für Weizenstroh und 200 mM für Maisspindelgranulat eingestellt werden. Falls Korrekturen des pH notwendig waren, so erfolgten diese durch Titrations mit verdünnter Schwefelsäure oder verdünnter Natronlauge. Die Versuche wurden jeweils im 3-fach

Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren im Satzverfahren durchgeführt. Um das Kontaminationsrisiko zu senken wurde Ampicillin (Ampicillin Natriumsalz, Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) mit einer Konzentration von $100 \mu\text{L mL}^{-1}$ in der Flüssigphase der Suspension zugesetzt.

Folgende Betriebspunkte (Eingangs- oder Einflussgrößen) wurden betrachtet:

| | |
|--|---|
| <u>Temperatur:</u> | 40; 50; 60 ± 1 °C je Ansatz |
| <u>pH der Suspension:</u> | 4,0; 5,0; $6,0 \pm 0,2$ je Ansatz |
| <u>Cellulasepräparat:</u> | 15,0; 30,0; $45,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ |
| <u>β-Glucosidasepräparat:</u> | 1,0; 4,0; $7,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ |
| <u>Hemicellulasepräparat:</u> | 0; 15,0; $30,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ |

Als Cellulasepräparate wurden „Celluclast“ (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dänemark) und „Accellerase 1500“ (Genencor (DuPont AG), Leiden, Niederlande) verwendet. Als β -Glucosidasepräparat kam „Novozym 188“ (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dänemark) und als Hemicellulasepräparat „Shearzyme“, „Pulpzyme“ und „NS22002“ (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dänemark) zum Einsatz. Die Proteinkonzentrationen der jeweils verwendeten Enzympräparate sind in Tabelle A4 im Anhang dargestellt.

Zur Versuchsplanung wurde das *central composite design* (CCD), das auch unter der Box-Wilson Methode bekannt ist, eingesetzt. Dabei erfolgte eine Versuchsplanung nach der *faced*-Methode (CCF). Hierbei handelt es sich um einen mehrdimensionalen Würfel, dessen Kanten durch die Betriebspunkte in jeweils gleiche Teile separiert werden. Daraus ergibt sich ein innenliegender dreidimensionaler Stern, dessen Zentrum durch die mittleren Betriebspunkte gekennzeichnet ist. Zur Versuchsplanung wurde Matlab mit dem multilinenen Regressionsverfahren *regstats* zur Parameteridentifikation und dem Algorithmus *fmincon SQP* für die Identifikation der optimalen Zielgrößen (Mathworks, Natick, USA) verwendet. Die Einflussgrößen wurden entsprechend Gleichung 4-4 normiert.

$$Z = \frac{Z_{\max} + Z_{\min}}{2} + Z^* \cdot \frac{Z_{\max} - Z_{\min}}{2} \quad (4-4)$$

| | | |
|-----|------------|---|
| Mit | Z | Einflussgröße Temperatur (T), pH, Enzymbeladung (C_1, C_2, C_3) |
| | Z^* | codierte Einflussgröße |
| | Z_{\max} | maximaler Wert der Einflussgröße |
| | Z_{\min} | minimaler Wert der Einflussgröße |

Der maximale und minimale Wert der jeweiligen Einflussgrößen wird durch Z_{\max} und Z_{\min} repräsentiert. Die Signifikanz der einzelnen Parameter β_{ij} aus der Gleichung 4-3 wurde durch den p-Wert beurteilt.

4.6 Analytik

4.6.1 Bestimmung der Biomassezusammensetzung

Die Zusammensetzung des Weizenstrohs wurde untersucht. Dazu wurde eine Methode zur Bestimmung der Substratanalyse nach Sluiter *et al.* (2008) angewandt. Diese Methode untergliedert sich in folgende Teilbereiche, die auch in Abbildung 4.7 dargestellt sind.

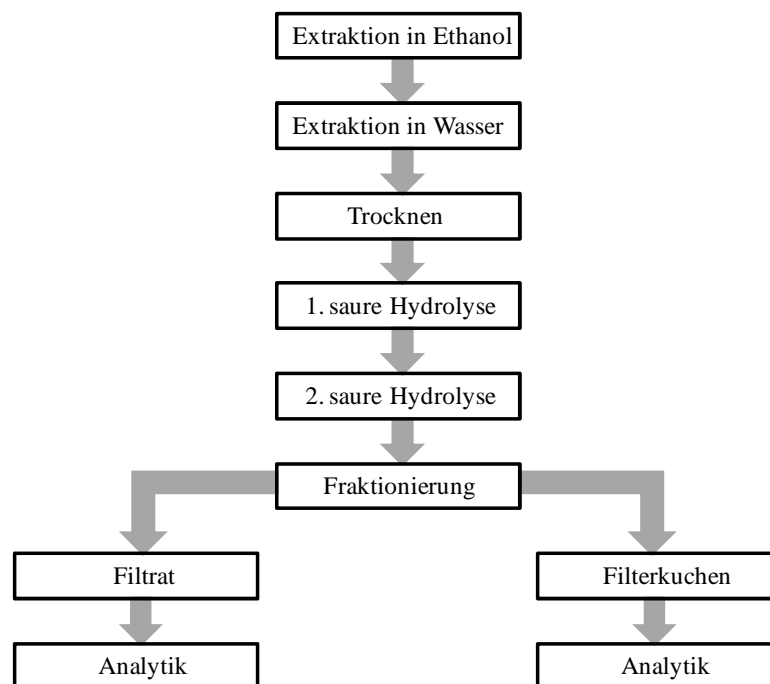


Abbildung 4.7: Teilschritte zur Bestimmung der Biomassezusammensetzung nach Sluiter *et al.* (2008).

Den eigentlichen Hydrolyseschritten wurden zwei Extraktionsschritte vorgeschaltet, um Extraktstoffe aus dem Weizenstroh zu lösen. Anschließend erfolgte die Trocknung des Probenmaterials. Im nachfolgenden Hydrolyseabschnitt wurde die Probensubstanz einer sauren katalytischen Zersetzung unterworfen. Durch Filtration wurde der Feststoffanteil von der Flüssigphase getrennt. Beide Fraktionen wurden anschließend analysiert.

Extraktion

Der erste Extraktionsschritt wurde mit Ethanol (97,5 % v/v) durchgeführt, um alkohollösliche Extraktstoffe zu entfernen. Dazu wurden 50 g des zur Analyse bestimmten Strohs in eine 1 L Glasflasche (Schott AG, Mainz, Deutschland) eingewogen und mit Ethanol aufgefüllt. Nach 24 h Rühren der Stroh-Ethanol Suspension wurde der Feststoff durch Vakuumfiltration von der Flüssigphase getrennt.

Mit Hilfe eines Filtertrichters mit Filterpapier (VWR GmbH, Ismaning, Deutschland) konnte der Feststoff von der Flüssigkeit abgetrennt werden. Um einen Unterdruck zu erzeugen, wurde eine Laboport Vakuumpumpe (KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland) verwendet.

Nach zweimaligem Waschen der festen Phase mit destilliertem Wasser, wurde in einem zweiten Extraktionsschritt der Feststoff für 24 h in einer wässrigen Suspension (1 L Glasflasche, Schott AG, Mainz, Deutschland) durch Rühren homogenisiert. Der Feststoff wurde wiederum von der Flüssigphase durch Filtration getrennt und abermals zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen.

Trocknungsphase

Um die Restfeuchte aus dem Feststoff zu entfernen, wurde dieser im Trockenofen (Steriliser, Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland) bei einer Temperatur von 70 °C über einen Zeitraum von 72 h getrocknet.

Säurebehandlung der festen Phase

Nach dem Trocknen der Feststoffe wurden die nun feuchte- und extraktstofffreien Strohfasern durch Säurebehandlung in die einzelnen Bestandteile überführt. Dazu wurden 300 mg von Strohfasern in 100 mL fassenden Flaschen (Duranflaschen, Sigma-

Aldrich GmbH, Schnelldorf, Deutschland) eingewogen. Dem Feststoff wurden 3,0 mL Schwefelsäure (72 % v/v) zugesetzt und gleichmäßig verteilt. Die Versuche wurden im 3-fach Ansatz durchgeführt.

Nach 30 min bei einer Temperatur von 30 °C im Trockenofen (Steriliser, Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland) wurden den Proben 84 mL destilliertes Wasser zugegeben und vermischt. Der Schwefelsäureanteil betrug nun 4 % (v/v). Die Proben wurden für weitere 120 min im Trockenofen (Steriliser, Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland) bei einer Temperatur von 121 °C inkubiert.

Fraktionierung

In den Proben sind nach der sauren Katalyse zwei Fraktionen enthalten, eine feste säureunlösliche Fraktion und eine säurelösliche Fraktion. Die feste Phase besteht aus säureunlöslichem Lignin (SUL, Klason Lignin) und Asche. Die flüssige Phase enthält unter anderem säurelösliches Lignin (SLL) und die gelösten Zuckermonomere. Beide Phasen werden durch Filtration voneinander getrennt. Im Filtertiegel, der eine maximale Porenweite von 10 µm bis 16 µm besitzt (VWR GmbH, Ismaning, Deutschland), verbleibt nach der Vakuumfiltration die feste Fraktion, die anschließend durch zweimaliges Waschen mit destilliertem Wasser von den löslichen Komponenten getrennt wird.

Säureunlösliches Lignin und Asche

Nach dem Trocknen der festen Phase im Trockenofen (Steriliser, Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland) bei einer Temperatur von 70 °C über einen Zeitraum von 72 h, wurden die Filtertiegel gewogen und anschließend bei 550 °C für 24 h gebrannt (K1252F, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland). Abermaliges Wiegen der auf Raumtemperatur abgekühlten Filtertiegel ermöglichte die Bestimmung des Ascheanteils der Strohfasern (X_{Asche}) nach Gleichung 4-5.

$$X_{Asche} = \frac{m_{\text{Filtertiegel, gebrannt}} - m_{\text{Filtertiegel}}}{m_{\text{Probe}}} \quad (4-5)$$

Der Anteil des säureunlöslichen Lignins (X_{SUL}) konnte nach Gleichung 4-6 bestimmt werden.

$$X_{SUL} = \frac{m_{\text{Filtertiegel, getrocknet}} - m_{\text{Asche}} - m_{\text{Filtertiegel}}}{m_{\text{Probe}}} \quad (4-6)$$

| | | |
|-----|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Mit | $m_{\text{Filtertiegel, getrocknet}}$ | Masse nach dem Trocknen bei 70 °C / g |
| | $m_{\text{Filtertiegel, gebrannt}}$ | Masse nach dem Brennen bei 550 °C / g |
| | $m_{\text{Filtertiegel}}$ | Masse des leeren Filtertiegels / g |
| | m_{Probe} | Trockengewicht der Probe / g |

Säurelösliches Lignin

Der Anteil des säurelöslichen Lignins wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurden die Flüssigphasen der Proben nach der Fraktionierung bei einer Wellenlänge von 320 nm im Photometer (Biomate 3, Harwardt Laborgeräte und Spezialelektronik, Weyarn, Deutschland) analysiert. Anschließend konnte der Anteil des säurelöslichen Lignins (X_{SLL}) mit Gleichung 4-7 berechnet werden.

$$X_{SLL} = \frac{UV_{\text{abs}} \cdot V_{\text{Filtrat}} \cdot f_{\text{Verdünnung}}}{\varepsilon \cdot m_{\text{Probe}}} \quad (4-7)$$

| | | |
|-----|-------------------------|--|
| Mit | UV_{abs} | Absorption der Probe bei 320 nm / cm^{-1} |
| | V_{Filtrat} | Volumen des Filtrats (87 mL) / mL |
| | $f_{\text{Verdünnung}}$ | Verdünnungsfaktor / - |
| | ε | Absorptionskonstante von säurelöslichem Lignin (30 L $\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$, Sluiter <i>et al.</i> , 2008) / L $\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ |
| | m_{Probe} | Trockengewicht der Probe / g |

Der Gesamtanteil des Lignins konnte folgedessen nach Sluiter *et al.* (2008) mit Gleichung 4-8 berechnet werden.

$$X_L = X_{SUL} + X_{SLL} = \frac{m_{\text{Filtertiegel, getrocknet}} - m_{\text{Asche}} - m_{\text{Filtertiegel}}}{m_{\text{Probe}}} + \frac{UV_{\text{abs}} \cdot V_{\text{Filtrat}} \cdot f_{\text{Verdünnung}}}{\varepsilon \cdot m_{\text{Probe}}} \quad (4-8)$$

| | | |
|-----|-----------|-----------------------------------|
| Mit | X_L | gesamter Ligninanteil / - |
| | X_{SUL} | säureunlöslicher Ligninanteil / - |
| | X_{SLL} | säurelöslicher Ligninanteil / - |

Zuckeranteil

Die Anteile der im Stroh enthaltenen Zuckermonomere wurden durch eine Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) Methode bestimmt. Dazu wurden die Proben durch langsame Zugabe von Calciumcarbonat neutralisiert. Die Methodik der Zuckeranalytik ist in Kapitel 4.6.4 detailliert beschrieben. Aus den erhaltenen Zuckerkonzentrationen konnten die Massenanteile nach Gleichung 4-9 berechnet werden.

$$X_{\text{Zucker}} = \frac{c_{\text{Zucker}} \cdot V_{\text{Filtrat}}}{m_{\text{Probe}}} \quad (4-9)$$

| | | |
|-----|----------------------|---|
| Mit | m_{Probe} | Trockengewicht der Probe / g |
| | c_{Zucker} | Zuckerkonzentration / g L ⁻¹ |
| | V_{Filtrat} | Volumen des Filtrats / L |

Die Masse der Polysaccharide ist geringer als die Masse der einzelnen Monomere, da Bindungen zwischen den Monomeren unter Abspaltung von H₂O ausgebildet werden. Um die Massenanteile der Polysaccharide zu erhalten, war eine Korrektur mit Anhydrokorrekturfaktoren nach Gleichung 4-10 notwendig.

$$X_{\text{Saccharid}} = f_{\text{Anhydrokorrektur}} \cdot X_{\text{Zucker}} \quad (4-10)$$

| | | |
|-----|-------------------------------|-----------------------|
| Mit | $f_{\text{Anhydrokorrektur}}$ | Umrechnungsfaktor / - |
| | X_{Zucker} | Zuckeranteil / - |
| | $X_{\text{Saccharid}}$ | Saccharidanteil / - |

Für C-6 Zuckermonomere, wie Glucose und Mannose beträgt der Faktor der Anhydrokorrektur 0,90. Bei C-5 Zuckermonomeren, wie Xylose oder Arabinose beträgt dieser 0,88. Für Cellobiose ist ein Faktor von 0,95 einzurechnen (Sluiter *et al.* 2008).

Acetatanteil

Um den Anteil von Acetat in der Zusammensetzung von Stroh zu quantifizieren, wurde wie zuvor bei der Bestimmung der Zuckermonomere eine HPLC-Methode angewandt. Die Methodik der Analytik organischer Säuren ist in Kapitel 4.6.4 detailliert

beschrieben. Aus der bestimmten Essigsäurekonzentration konnte der Massenanteil an Acetat im Stroh nach Gleichung 4-11 berechnet werden.

$$X_{\text{Acetat}} = \frac{c_{\text{Essigsäure}} \cdot V_{\text{Filtrat}} \cdot f_{\text{Umsatz}}}{m_{\text{Probe}}} \quad (4-11)$$

| | | |
|-----|-------------------------|---|
| Mit | m_{Probe} | Trockengewicht der Probe / g |
| | $c_{\text{Essigsäure}}$ | Zuckerkonzentration / g L ⁻¹ |
| | V_{Filtrat} | Volumen des Filtrats / L |
| | f_{Umsatz} | Umrechnungsfaktor / - |

Der Umrechnungsfaktor f_{Umsatz} von Essigsäure zu Acetat beträgt 0,683 (Sluiter *et al.*, 2008).

4.6.2 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Cellulaseaktivität in Filterpapiereinheiten (FPU) und die Cellobiaseaktivität (CBU), wurden nach der von Ghose (1987) beschriebenen IUPAC Methode durchgeführt. Weiter wurden p-Nitrophenyl-Saccharide für die Bestimmung von Enzymaktivitäten nach der Methode von Wood und Bhat (1988) verwendet.

Methode nach Ghose (1987)

Zunächst wurde eine Dinitrosalicylsäure (DNS) Lösung zur Bestimmung der Glucosekonzentration hergestellt. Die Möglichkeit, Glucose quantitativ durch die Zugabe einer DNS-Lösung zu bestimmen, beruht auf der reduzierenden Wirkung von Zuckermolekülen. 3,5-Dinitrosalicylsäure wird zu 3-Amino-5-Nitrosalicylsäure umgesetzt (Abbildung 4.8). Die Absorption von 3-Amino-5-Nitrosalicylsäure bei einer Wellenlänge von 540 nm ermöglicht eine quantitative Bestimmung.

Zusammensetzung der DNS-Lösung

2,5 g 3,5-Dinitrosalicylsäure (Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, Deutschland) in 20 mL deionisiertem Wasser lösen und unter ständigem Rühren 4 g Natriumhydroxid (≥ 99 %, Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) zugeben. Im Anschluss wurden 75 g Rochelle Salz (Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat, Carl-Roth

GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) langsam eingerührt. Natriumhydroxid und Rochelle Salz erhöht die Farbentwicklung (Miller, 1959). Die Feststoffe wurden durch weiteres Rühren bei 40 °C bis 45 °C vollständig gelöst. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit destilliertem Wasser auf 250 mL aufgefüllt und lichtgeschützt verwahrt.

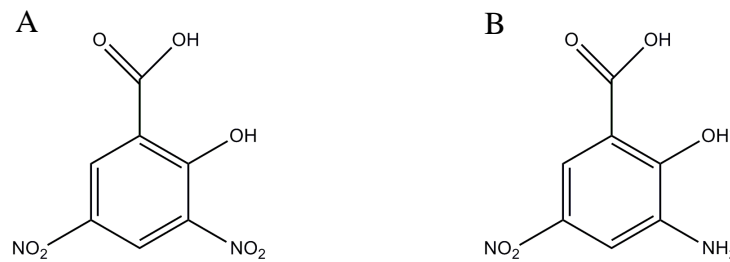


Abbildung 4.8: 3,5-Dinitrosalicylsäure (A) und 3-Amino-5-nitrosalicylsäure (B) zur photometrischen Bestimmung der Glucosekonzentration bei einer Wellenlänge von 540 nm.

Aktivitätsbestimmung Filterpapiereinheiten

Die Probenvorbereitung für die Aktivitätsbestimmung von Filterpapiereinheiten (FPU) umfasste die Herstellung von Standards mit $0,2 \text{ mg}_{\text{Glucose}} \text{ mL}^{-1}_{\text{Puffer}}$; $0,5 \text{ mg}_{\text{Glucose}} \text{ mL}^{-1}_{\text{Puffer}}$; $2,0 \text{ mg}_{\text{Glucose}} \text{ mL}^{-1}_{\text{Puffer}}$ und $5,0 \text{ mg}_{\text{Glucose}} \text{ mL}^{-1}_{\text{Puffer}}$. Als Puffer wurde 50 mM Natriumacetat (pH 5,0) eingesetzt. Es wurden jeweils 2 mL Standardlösung in 50 mL Reaktionsgefäße gefüllt.

Bei der Durchführung der Aktivitätsuntersuchungen wurden die Enzymlösungen zunächst in geeigneter Weise verdünnt. Dazu wurden 0,5 mL Enzymlösung mit 1,5 mL Puffer vermischt und zusammen mit einem gerollten Filterpapierstreifen (1 x 6 cm) in 50 mL Reaktionsgefäße gegeben. In gleicher Weise wurde mit dem Leerwert ohne Enzym mit 2,0 mL Puffer und einem Filterpapierstreifen verfahren. Die Reaktionsgefäße wurden geschüttelt, um eine hinreichende Benetzung des Substrats mit der Flüssigphase sicherzustellen. Anschließend wurden die Proben 60 min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Reaktion wurde das Reaktionsgefäß auf Eis gelagert. Es wurden 3,0 mL DNS-Lösung zu allen Proben gegeben und die Proben (Enzymlösungen, Leerwert und Standard) anschließend 5 min bei 100 °C gemeinsam gekocht. Auf diese Weise konnten identische Bedingungen für alle Proben gewährleistet werden. Die Proben wurden mit Eis auf Raumtemperatur gekühlt und mit 25 mL destilliertem Wasser verdünnt und durchmischt. Nach dem Absetzen der entstandenen Trübung,

wurde die Absorption der Proben bei 540 nm mit Hilfe eines Biomate 3 Photometers (ThermoFisher Scientific AG, Dreieich, Deutschland) bestimmt. Aus den Absorptionswerten der Standardproben wurde eine Kalibriergerade erstellt, mit deren Hilfe die produzierte Glucose der Proben in Milligramm ermittelt wurde. Jede Probe wurde im 3-fach Ansatz durchgeführt.

Für die Berechnung der Enzymaktivität ist die Enzymkonzentration, die zur Freisetzung von 2,0 mg Glucose führt notwendig. Hierzu wurde die Glucosemenge in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration durch eine logarithmische Funktion interpoliert. Die richtige Wahl der Enzymverdünnung ist entscheidend für die Güte der interpolierten Funktion. Dazu ist es notwendig, Glucosefreisetzungen ober- und unterhalb von 2,0 mg während der Reaktion zu erreichen. Die Enzymaktivität konnte nach Gleichung 4-12 berechnet werden:

$$\text{FPU} = \frac{0,37}{c_{\text{Enzym}}} \quad (4-12)$$

Mit der Enzymkonzentration (c_{Enzym}), die zur Freisetzung von 2,0 mg Glucose innerhalb einer Reaktionsdauer von 60 min führt.

Gleichung 4-12 gibt dabei die Aktivität in Filterpapiereinheiten (FPU) wieder, die folgendermaßen abgeleitet werden können:

Die Definition von Aktivitäten in internationalen Einheiten (IU) bezeichnet die Menge an Produkt (μmol), die innerhalb einer Minute gebildet wird. 1 μmol Glucose entspricht dabei 0,18 mg. Als kritische freigesetzte Glucosemasse definiert Ghose (1987) 2,0 mg. Das eingesetzte Enzymvolumen betrug 0,5 mL und die Reaktionszeit 60 min. Daraus ergibt sich in IU:

$$\frac{2,0/0,18}{0,5 \cdot 60} \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = 0,37 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = 0,37 \text{ U mL}^{-1}$$

Aktivitätsbestimmung β -Glucosidase

Die β -Glucosidaseaktivität (Cellobiaseaktivität, CBU) wurde am Substrat Cellobiose ($\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, Deutschland) untersucht. Es wurde eine 15 mmol L^{-1} Lösung an Cellobiose in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,0) als Substrat-Stammlösung hergestellt.

Das Enzym wurde in geeigneter Weise verdünnt und ein Volumen von 1,0 mL der verdünnten Enzymlösung in ein 15 mL fassendes Reaktionsgefäß gegeben. Die Inkubation erfolgte in einem Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 50 °C für 30 min. Im Anschluss wurden die Proben für 5 min auf 100 °C erhitzt. Jede Probe wurde im 3-fach Ansatz durchgeführt. Die Bestimmung der Glucosekonzentration erfolgte mittels einer HPLC. Eine Beschreibung der HPLC Zuckerquantifizierung ist in Kapitel 4.6.4 dargestellt.

Für die Berechnung der Cellobiaseaktivität wurde für die bestimmten Glucosemengen eine logarithmische Funktion in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymkonzentration aufgetragen und durch Interpolation diejenige Enzymkonzentration berechnet, die zur Freisetzung von 1,0 g Glucose führt. Die Cellobiaseaktivität wurde nach Gleichung 4-13 berechnet (Ghose, 1987):

$$\text{CBU} = \frac{0,0926}{c_{\text{Enzym}}} \quad (4-13)$$

Mit der Enzymkonzentration (c_{Enzym}), die zur Freisetzung von 1,0 mg Glucose innerhalb einer Reaktionsdauer von 30 min führt.

Methode nach Wood und Bhat (1988)

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten erfolgte nach der Methode von Wood und Bhat (1988) in Mikrotiterplatten (MTP) mit 96 Kavitäten (Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Als pNP-Saccharid-Substrate wurden p-Nitrophenyl-Glucosid oder p-Nitrophenyl-Cellobiosid verwendet (Abbildung 4.9). Diese wurden in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,0) bis zu einer Konzentration von 2 mM verdünnt. Es wurden 50 µL Probenlösung mit 50 µL pNP-Saccharid-Substrat (2 mM) versetzt. Die Proben wurden anschließend für 10 min bei 50 °C im Inkubationsschrank (Inkubator 1000, Heidolph GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland) temperiert. Im Anschluss wurden die Proben 5 min auf Eis gekühlt und mit 100 µL 1 M Natriumcarbonatpuffer versetzt. Die photometrische Messung erfolgte direkt im Anschluss bei einer Wellenlänge von 405 nm an einem MTP-Photometer (Infinite M200, Tecan AG, Männedorf, Schweiz).

Als Leerwert wurden 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,0) anstelle der Substratzugabe eingesetzt. Als Standard für die Aktivität wurde p-Nitrophenol (Sigma-Aldrich GmbH,

Schnelldorf, Deutschland) in definierten Konzentrationen verwendet. Es wurden 100 μL p-Nitrophenol anstelle von 50 μL 2 mM p-Nitrophenyl-Saccharid und 50 μL Probenlösung eingesetzt. Die Versuche wurden im 2-fach Parallelansatz durchgeführt.

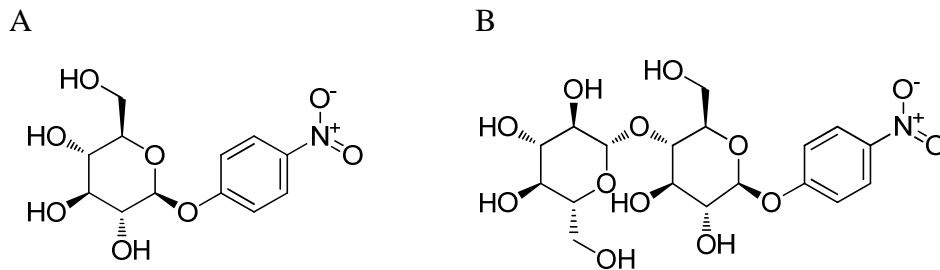


Abbildung 4.9: p-Nitrophenyl-Glucosid (A) und p-Nitrophenyl-Cellobiosid (B).

4.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Pierce-BCA Methode

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach der BCA-Methode (ThermoFisher Scientific AG, Dreieich, Deutschland) in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten (Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Zunächst musste das Arbeitsreagenz hergestellt werden.

25 μL Probenlösung wurden mit 200 μL Arbeitsreagenz versetzt und für 30 min bei 37 °C im Inkubationsschrank (Inkubator 1000, Heidolph GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland) temperiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur (25 °C) wurden die Ansätze photometrisch (Infinite M200, Tecan AG, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt.

Als Leerwert wurden 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,0) anstelle der Probenlösung eingesetzt. Als Standard zur Bestimmung des Proteingehalts wurde Bovines Serum Albumin (BSA) eingesetzt und entsprechend den Probenlösungen behandelt. Die Versuche wurden mindestens im 2-fach Parallelansatz durchgeführt.

Bradford Methode

Durch die Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassieblau bei saurem pH ist eine Bestimmung der Proteinkonzentration möglich. Das eingesetzte Bradford Reagenz (Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, Deutschland) zeigt ein veränderliches

Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 465 nm das sich zu 595 nm verschiebt. Die Proteinkonzentration wurde mit BSA als Standard bei 595 nm bestimmt.

4.6.4 Bestimmung von Monosacchariden und organischer Säuren

Die Proben wurden für die HPLC Analytik vorbereitet, zentrifugiert (Haraeus Biofuge stratos, ThermoFisher Scientific AG, Dreieich, Deutschland) und die erhaltenen Überstände nach der Filtration (Spritzenvorsatzfilter, 0,2 μm , ThermoFisher Scientific AG, Dreieich, Deutschland) analysiert.

Für die Analyse von Zuckern wurde eine HPLC eingesetzt. Die Analyse erfolgte über den RI-Detektor (RI Plus Detector, ThermoFisher Scientific AG, Dreieich, Deutschland) bei 50 °C. Zur Zuckerquantifizierung wurde eine Chromatographiesäule Metacarb 87P, Pb^{2+} -Form (Varian AG, Walnut Creek, USA) verwendet. Die Säulenofentemperatur betrug 80 °C und die Flussrate 0,3 mL min^{-1} bis 0,4 mL min^{-1} . Als Laufmittel wurde entionisiertes Wasser verwendet.

Eine weitere Chromatographiesäule Aminex HPX 87H (Bio-rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurde ebenfalls für die Zuckeranalyse und für die Analyse von organischen Säuren eingesetzt. Die Säulenofentemperatur betrug 45 °C bis 55 °C. Die Flussrate des Laufmittels aus verdünnter Schwefelsäure (0,005 M) betrug 0,6 mL min^{-1} bis 0,7 mL min^{-1} . Die Detektion der organischen Säuren erfolgte in einem *Diodenarraydetektor* (PDA Plus, ThermoFisher Scientific AG, Dreieich, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 210 nm.

4.6.5 Bestimmung der Rheologie

Für die Bestimmung der Rheologie wurde das Rheometer (Messsystem 0/115, Rheomat 115, Contraves, Zürich, Schweiz) verwendet. Als Messsystem kam eine Doppelspaltapparatur zweier Messzylinder zum Einsatz. Die Einstellung der Schergeschwindigkeiten konnte intervallweise im Bereich von 0,226 s^{-1} bis 3430 s^{-1} variiert werden. Dabei sind bis zu 30 unterschiedliche Positionen im Gerät einstellbar. Für die Messung wurden 15 mL Messmedium mit einer 10 mL Pipette (Transferpette S, Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, Deutschland), mit manuell geweiteten Spitzen bei Suspensionen, in den Doppelspalt gefüllt. Das bei der Rotation des oberen Zylinders entstehende Bremsmoment wird im Messkopf durch Verformung des Federelementes

(Torsionsstab) bestimmt und über einen Umrechnungsfaktor (η -Faktor) aus dem Bremsmoment die dynamische Viskosität berechnet. Die Messtemperatur konnte über ein Thermostat geregelt werden.

5 Ergebnisse

5.1 Rührorgane zur Homogenisierung von Suspensionen und viskosen Medien

5.1.1 H-Rührer

Für die Homogenisierung von Suspensionen mit möglichst hohem Feststoffgehalt sowie für viskose Medien wurde angelehnt an die Geometrie industrieller Rührorgane (Gitter- und Blattrührer) der H-Rührer für magnetisch-induktiv angetriebene Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab entwickelt. Ein würfelförmiger Grundkörper, der zwei zylindrische Dauermagnete ($\varnothing 7,0 \times 3,0$ mm, Material: $\text{Sm}_2\text{Co}_{17}$) für den magnetisch-induktiven Antrieb enthält, bildet zwei blattförmige Paddel ober- und unterhalb des Grundkörpers aus (siehe Abbildung 5.1). Das Rührorgan zeichnet sich weiter durch eine zentrische Lagerung auf einer Rührachse aus. Um das Volumen des Reaktionsraums durch die Bauform des Rührorgans nicht unnötig zu verringern, wurde der zylindrische Grundkörper durch weitere Materialabtragung zu einer quaderförmigen Struktur mit abgerundeten Kanten und einem Durchmesser von 14,4 mm verkleinert. Die Rührachse ist mit dem Deckel des Bioreaktorsystems über eine Steckverbindung verbunden. Um Verschleißeffekte zu verringern, ist das Gleitlager des Rührorgans mit einer Lagerbuchse aus dem Verbundmaterial ZEDEX versehen. Das Rührorgan befindet sich zentrisch im Milliliter-Rührreaktor. Die äußeren Abmessungen des H-Rührers wurden so gewählt, dass Milliliter-Rührreaktoren mit und ohne Strömungsbrecher verwendet werden können. Die genauen Abmessungen des H-Rührers sind der technischen Zeichnung A1 im Anhang zu entnehmen. Die Höhe der unteren Paddel vom Reaktorboden beträgt im Ruhezustand bis zu 1 mm. Im Betriebszustand wird der H-Rührer durch das induzierte Magnetfeld auf etwa 2 mm über dem Reaktorboden angehoben. Wie in Abbildung 5.1B veranschaulicht, konnten mit *computational fluid dynamics* (CFD)-Simulationen die Strömungsgeschwindigkeiten visualisiert werden.

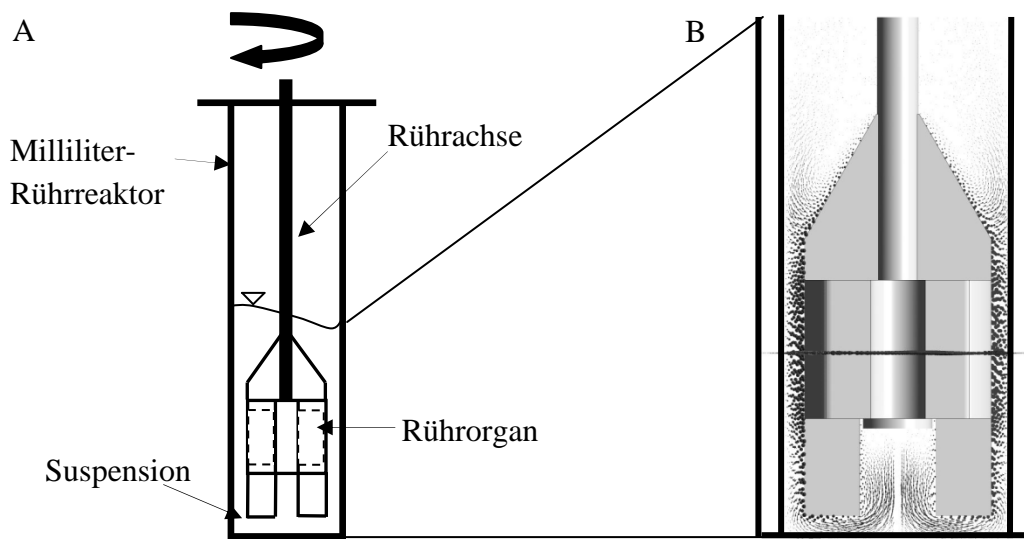


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des H-Rührers gleitend gelagert auf einer Rührachse (A). Die Positionen der Dauermagnete sind durch gestrichelte Linien erkennbar. Strömungsverhältnisse im Milliliter-Rührreaktor mit Strömungsbrecher bei 500 min^{-1} einer Newtonschen Flüssigkeit mit einer Viskosität von 33 mPa s . CFD-Simulation der Strömungsgeschwindigkeit (B) (Simulation: Brüning, 2012).

5.1.2 S-Rührer

Der S-Rührer ist eine Weiterentwicklung des H-Rührers, der sich wie aus Abbildung 5.2A hervorgeht, im Wesentlichen durch die asymmetrische Anordnung der blattförmigen Paddel ober- und unterhalb des Grundkörpers unterscheidet. Durch die asymmetrische Anordnung der Paddel soll im Rührbetrieb zusätzlich zur tangentialen Förderung eine axiale Förderung und somit die Durchmischung von Rührmedien mit viskosen Eigenschaften und feststoffhaltigen Suspensionen effektiver gestaltet werden. Die CFD-Simulation in Abbildung 5.2B zeigt beispielhaft die Strömungsgeschwindigkeiten bei einer Rührerdrehzahl von 500 min^{-1} und die zunehmende Ausbildung von Strömungswirbeln durch den S-Rührer bei einer 33 mPa s viskosen Newtonschen Lösung.

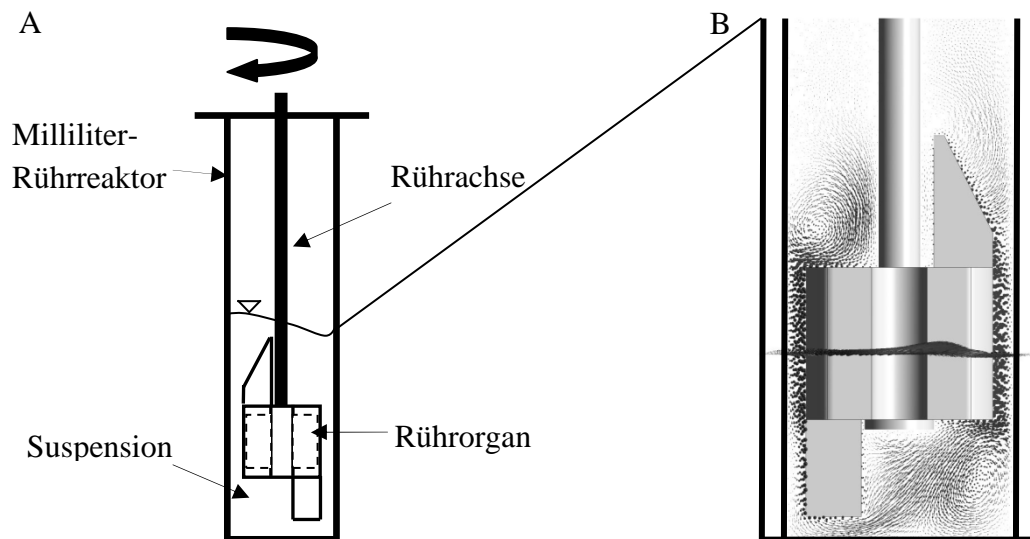


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des H-Rührers gleitend gelagert auf einer Rührachse. Die Positionen der Dauermagnete sind durch gestrichelte Linien erkennbar (A). Strömungsverhältnisse im Milliliter-Rührreaktor mit Strömungsbrecher bei 500 min^{-1} einer Newtonschen Flüssigkeit mit einer Viskosität von 33 mPa s . CFD-Simulation der Strömungsgeschwindigkeit (B) (Simulation: Brüning, 2012).

5.2 Rührercharakterisierung im Milliliter-Bioreaktor

5.2.1 Homogenisierung

Die Durchmischung bei Verwendung der H- und S-Rührer konnte für Milliliter-Rührreaktoren mit und ohne Strömungsbrecher durch die Bestimmung von Mischzeiten charakterisiert werden. Unter der Mischzeit wird die Zeitdauer bis zum Erreichen der Homogenität im Rührmedium verstanden. Als geforderte Durchmischungsgüte ist ein Homogenitätsgrad von 97 % üblich. Neben einer Newtonschen Glycerinlösung ist besonders auch der Einfluss von Nicht-Newtonschen Fluiden und Suspensionen auf das Mischverhalten von Interesse. Als Nicht-Newtonsche Fluide wurden strukturviskose Xanthanlösungen, sowie eine Suspension mikrokristalliner Cellulose mit einem Feststoffanteil von 20 % (w/w TS) und einer mittleren Partikelgröße von $50 \mu\text{m}$ untersucht. Bei strukturviskosen Medien ist die Viskosität keine konstante Stoffgröße, sondern in gerührten Reaktoren zusätzlich abhängig von der induzierten Schergeschwindigkeit durch das rotierende Rührorgan.

Bewehrter Milliliter-Rührreaktor

Das Mischzeitverhalten in Milliliter-Rührreaktoren mit Strömungsbrecher ist in Abbildung 5.3A veranschaulicht. Eine Newtonsche Glycerinlösung (80 % w/w, $\eta = 33 \text{ mPa s}$) als gerührtes Medium führte zu einer stetigen Abnahme der Mischzeit auf bis zu $16,4 \pm 5,8 \text{ s}$ bei Verwendung des H-Rührers und $5,8 \pm 0,7 \text{ s}$ beim S-Rührer. Während der Unterschied bei einer Rührerdrehzahl von 1000 min^{-1} zwischen den Rührorganen nur etwa 10 s betrug, war bei einer geringeren Drehzahl von 300 min^{-1} eine höhere Zeitdifferenz zu beobachten. Beim S-Rührer betrug die Mischzeit $19,6 \pm 3,6 \text{ s}$, während beim H-Rührer $110,6 \pm 16,2 \text{ s}$ bis zum Erreichen einer 97 % Homogenität notwendig waren.

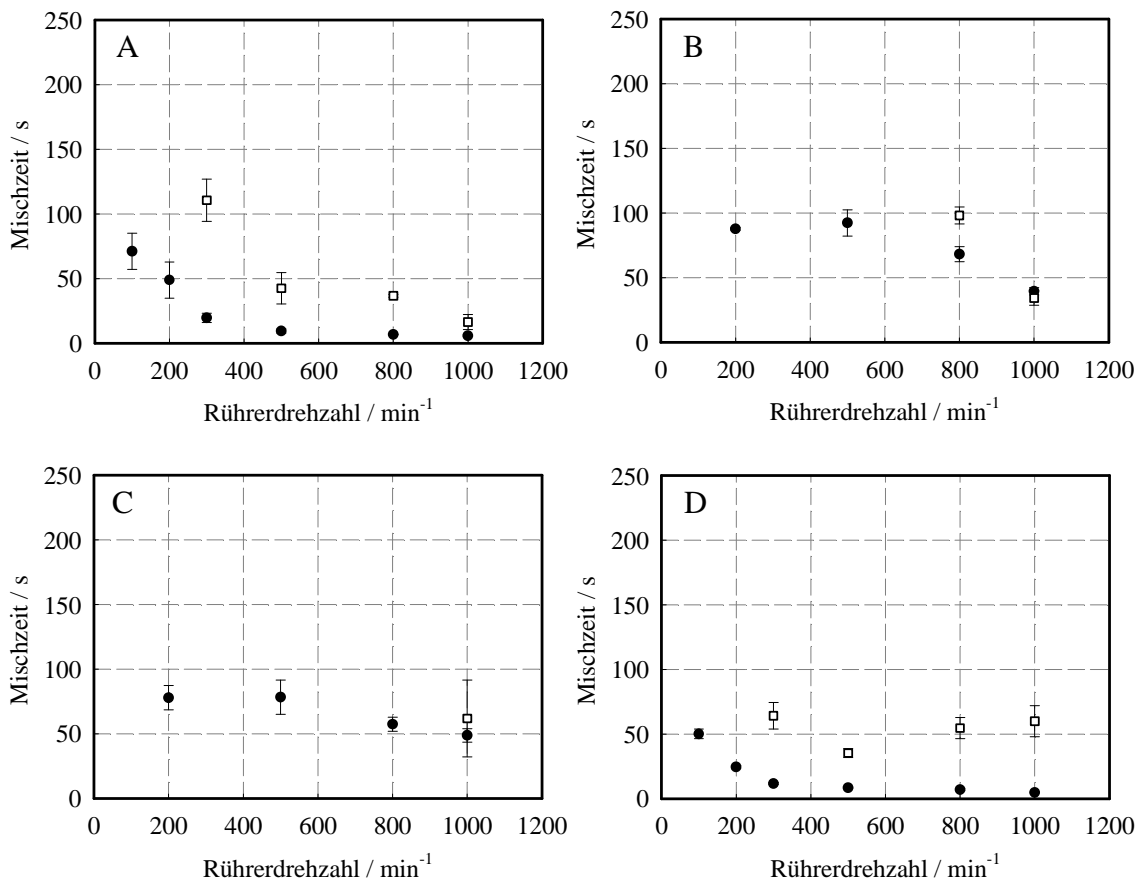


Abbildung 5.3: Vergleich von Mischzeiten in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl. Für den H-Rührer (□) und S-Rührer (●) in bewehrten Milliliter-Rührreaktoren mit den Rührmedien Glycerin 80 % (w/w) (A), Xanthan 0,4 %, 0,5 % (w/w) (B, C) und mikrokristalliner Cellulose 20 % (w/w TS) (D). 10 mL Füllvolumen. Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen von einem 3-fach Ansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

Neben dem Newtonschen Rührmedium (Glycerinlösung) ist in Abbildung 5.3B und Abbildung 5.3C das Mischzeitverhalten von strukturviskosen Xanthanlösungen mit 0,4 % (w/w) und 0,5 % (w/w) Xanthan veranschaulicht. Auch für die Xanthanlösung (0,4 % w/w, Abbildung 5.3B) war eine Abnahme der Mischzeit mit zunehmender Rührerdrehzahl zu erkennen. Bei einer Rührerdrehzahl von 1000 min^{-1} konnte eine Mischzeit von $34,2 \pm 5,6 \text{ s}$ für den H-Rührer und $39,5 \pm 2,8 \text{ s}$ für den S-Rührer bis zum Erreichen des Homogenitätskriteriums von 97 % beobachtet werden. Geringere Drehzahlen führten zu einem deutlichen Anstieg der Mischzeit auf $92,4 \pm 10,2 \text{ s}$ bei 500 min^{-1} (S-Rührer). Für den H-Rührer betrug die Mischzeit bereits bei einer Rührerdrehzahl von 800 min^{-1} $98,1 \pm 6,6 \text{ s}$. Eine Erhöhung des Xanthananteils von 0,4 % auf 0,5 % (w/w) führte bei Verwendung des H-Rührers zu höheren Mischzeiten, die zudem unterhalb der Drehzahl von 1000 min^{-1} nicht reproduzierbar waren (Abbildung 5.3C). Bei einer Drehzahl von 1000 min^{-1} betrug die Mischzeit des H-Rührers $61,9 \pm 29,6 \text{ s}$. Die erzielten Mischzeiten für den S-Rührer lagen hingegen auf demselben Niveau wie zuvor bei Verwendung einer Lösung mit 0,4 % (w/w) Xanthananteil und betragen $78,0 \pm 9,4 \text{ s}$ für eine Rührerdrehzahl von 200 min^{-1} .

Neben den homogenen Glycerin- und Xanthanlösungen ist in Abbildung 5.3D das Mischzeitverhalten für eine Suspension mit 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose dargestellt. Die erreichten Mischzeiten lagen für den S-Rührer deutlich unter denen der Xanthanlösung. So betrug die Mischzeit mit dem S-Rührer bei einer Drehzahl von 100 min^{-1} $50,0 \pm 3,8 \text{ s}$ und nahm auf $8,4 \pm 0,4 \text{ s}$ bei einer Drehzahl von 500 min^{-1} ab. Eine weitere Erhöhung der Rührerdrehzahl auf 1000 min^{-1} führte zu einer Mischzeit von $4,9 \pm 0,2 \text{ s}$. Der H-Rührer wies gleichbleibend hohe Mischzeiten von $60,0 \pm 12,1 \text{ s}$ bei 1000 min^{-1} auf.

Unbewehrter Milliliter-Rührreaktor

Neben Milliliter-Rührreaktoren mit Strömungsbrechern besteht die Möglichkeit, Milliliter-Rührreaktoren ohne Strömungsbrecher zu verwenden. Das Mischzeitverhalten in Milliliter-Rührreaktoren ohne Strömungsbrecher ist für die Newtonschen Glycerinlösungen mit den Anteilen 70 %, 80 % und 90 % (w/w) ($\eta = 14 \text{ mPa s}$, 33 mPa s und 90 mPa s) sowie für strukturviskose Xanthanlösungen mit 0,4 % und 0,5 % (w/w) und einer Suspension bestehend aus 20 % (w/w) mikrokristalliner Cellulose in Abbildung 5.4 veranschaulicht.

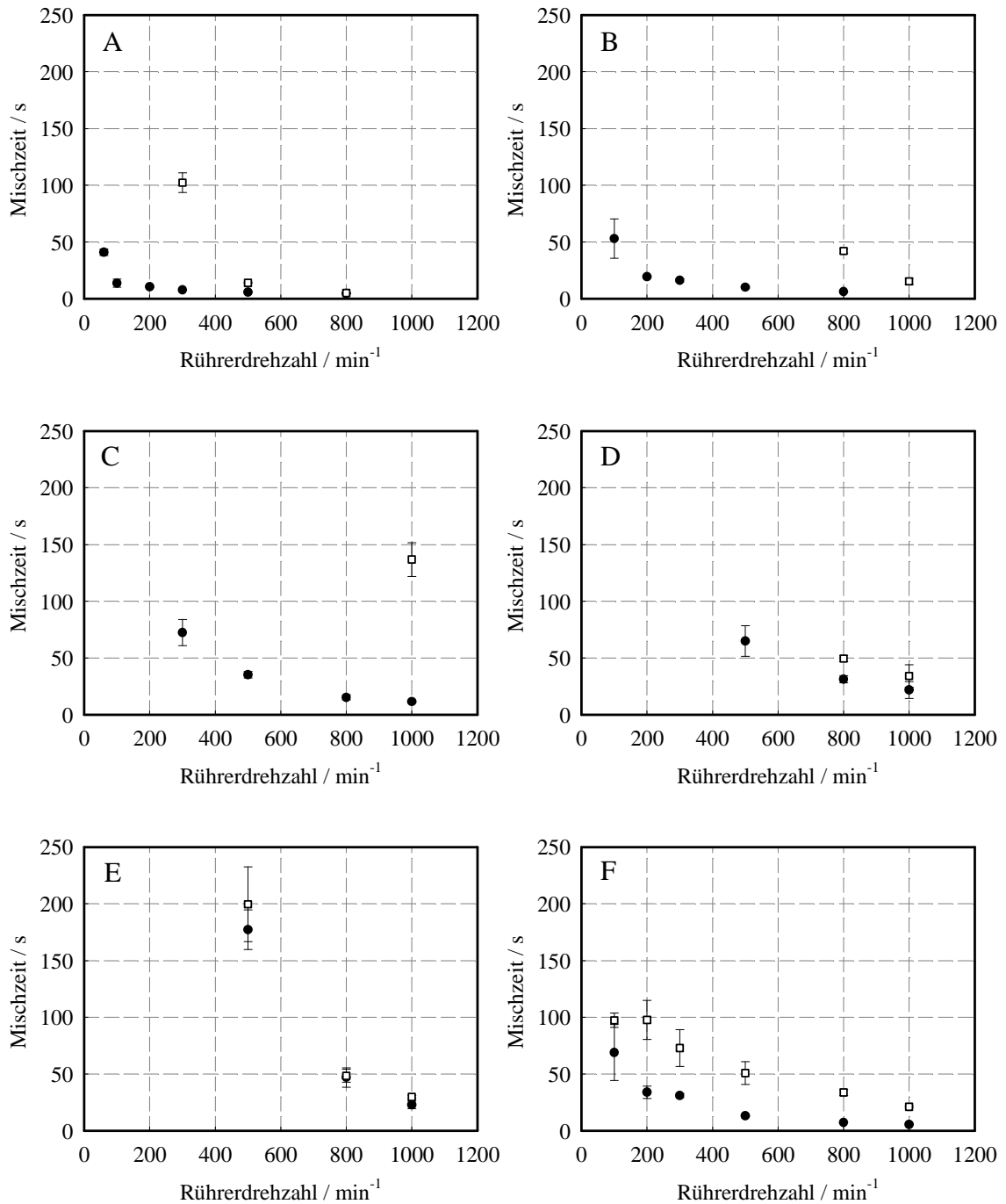


Abbildung 5.4: Vergleich von Mischzeiten in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl. Für den H-Rührer (□) und S-Rührer (●) in unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren mit den Rührmedien Glycerin 70 %, 80 %, 90 % (w/w) (A, B, C), Xanthan 0,4 %, 0,5 % (w/w) (D, E) und mikrokristalliner Cellulose 20 % (w/w TS) (F). 10 mL Füllvolumen. 10 g Füllgewicht (F). Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen von einem 3-fach Ansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

Für die Newtonschen Glycerinlösungen war jeweils eine Abnahme der Mischzeit mit ansteigender Rührerdrehzahl ersichtlich (Abbildungen 5.4A, B, C). Mit beiden Rührorganen war es möglich, bei 70 %, 80 % oder 90 % (w/w) Glycerinanteil, homogene Zustände (97 % Homogenität) zu erreichen. Die Mischzeiten lagen für den S-Rührer stets unterhalb von 100 s. Bei Verwendung des H-Rührers wurden zwar homogene Zustände erreicht, häufig konnte dies aber nur bei hohen Rührerdrehzahlen ab 800 min^{-1} und 1000 min^{-1} , wie für die Lösungen mit 80 % und 90 % (w/w) Glycerinanteil in Abbildung 5.4B und Abbildung 5.4C dargestellt, erreicht werden. Die Mischzeiten des S-Rührers waren jedoch stets geringer als die des H-Rührers. Für einen Feststoffanteil an Glycerin von 70 % wurde der geforderte Homogenitätszustand bei niedrigen Drehzahlen von 300 min^{-1} zwar erreicht, jedoch ist die Mischzeit mit $102 \pm 9 \text{ s}$ vergleichsweise hoch. Wurde der Anteil an Glycerin auf 90 % (w/w) erhöht, konnte der geforderte Homogenitätsgrad von 97 % bei Einsatz des S-Rührers auch bei geringer Drehzahl von 300 min^{-1} mit $72 \pm 12 \text{ s}$ erreicht werden. Die relative Standardabweichung einer 3-fach durchgeführten Messung betrug 17 %. Wurde die Rührerdrehzahl des S-Rührers auf 500 min^{-1} erhöht, reduzierte sich die Mischzeit bei Verwendung einer 90 % (w/w) Glycerinlösung auf $35 \pm 3 \text{ s}$, wobei die relative Standardabweichung 9 % betrug.

Strukturviskose Xanthanlösungen mit 0,4 % und 0,5 % (w/w) Xanthananteil wiesen, wie die Abbildungen 5.4D und 5.4E verdeutlichen, für den H- und S-Rührer ähnliche Mischzeitverläufe auf. Bei einer Drehzahl von 1000 min^{-1} lagen die Mischzeiten zwischen 20 s und 30 s, wobei die Mischzeiten des H-Rührers höher waren als bei Verwendung des S-Rührers.

Für eine Suspension mit 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose aus Abbildung 5.4F ist jedoch ein deutlicher Unterschied ersichtlich und die erreichten Mischzeiten für den H-Rührer waren stets größer als die des S-Rührers. So konnte bei Verwendung des S-Rührers und einer Drehzahl von 200 min^{-1} bereits nach $34 \pm 5 \text{ s}$ ein homogener Zustand (97 %) nachgewiesen werden. Beim H-Rührer wurde dieser Homogenitätsgrad erst nach $98 \pm 17 \text{ s}$ erreicht.

5.2.2 Leistungseintrag

Der volumenspezifische Leistungseintrag stellt eine wichtige verfahrenstechnische Größe bei der Skalierung von bioverfahrenstechnischen Prozessen in Milliliter-Rührreaktoren in größere Maßstäbe dar. Nachfolgend sind der Leistungseintrag und die Leistungscharakteristik in dimensionsloser Form einer Newton-Reynolds Charakteristik für die Rührmedien Wasser und Glycerin-Wasser (80 % w/w, $\eta = 33 \text{ mPa s}$) dargestellt. Des Weiteren wurden Suspensionen von 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose mit $50 \mu\text{m}$ durchschnittlicher Partikelgröße und 5 % (w/w TS) gemahlenes Weizenstroh für die Fraktionsgrößen kleiner $0,7 \text{ mm}$ und $0,7 \text{ mm}$ bis $2,0 \text{ mm}$ Partikelgröße hinsichtlich des volumenspezifischen Leistungseintrags untersucht.

Rührmedium Wasser

Für den untersuchten Drehzahlbereich bis 2100 min^{-1} war mit ansteigender Drehzahl ein zunehmender Leistungseintrag zu beobachten. Der Leistungseintrag war abhängig von den Strömungsbrechern in Milliliter-Rührreaktoren und vom gewählten Rührorgan. So betrug der Leistungseintrag $1,0 \text{ W L}^{-1}$ wie die Abbildungen 5.5E und 5.5G für den S-Rührer veranschaulichen, bei Verwendung von Strömungsbrechern und einer Drehzahl von 1000 min^{-1} , während ohne Strömungsbrecher nur etwa der halbe Leistungseintrag gemessen wurde ($\approx 0,5 \text{ W L}^{-1}$). Mit weiter ansteigender Rührerdrehzahl wurde der Unterschied im Leistungseintrag noch deutlicher und betrug für den H-Rührer teilweise mehr als das 4-fache von Milliliter-Rührreaktoren ohne Strömungsbrecher (Abbildung 5.5A und Abbildung 5.5C). Der Leistungseintrag sollte unabhängig vom gewählten Rührvolumen sein, weshalb unterschiedliche Füllvolumina evaluiert wurden. Die Abbildung 5.5 zeigt den Leistungseintrag für die Füllvolumina der Milliliter-Rührreaktoren von 10 mL , 12 mL und 14 mL . Während ohne Strömungsbrecher nahezu identische Leistungseinträge zu beobachten waren, betrug der Unterschied des Leistungseintrags bei bewehrten Rührreaktoren bis zu $1,8 \text{ W L}^{-1}$. Dabei war eine betragsmäßige Zunahme mit ansteigenden Rührerdrehzahlen zu verzeichnen. Dies wurde vor allem ab einer Drehzahl von 1500 min^{-1} deutlich. Als mögliche Ursache konnte zunehmender Gaseintrag über die Flüssigkeitsoberfläche bei den geringeren Füllvolumina identifiziert werden.

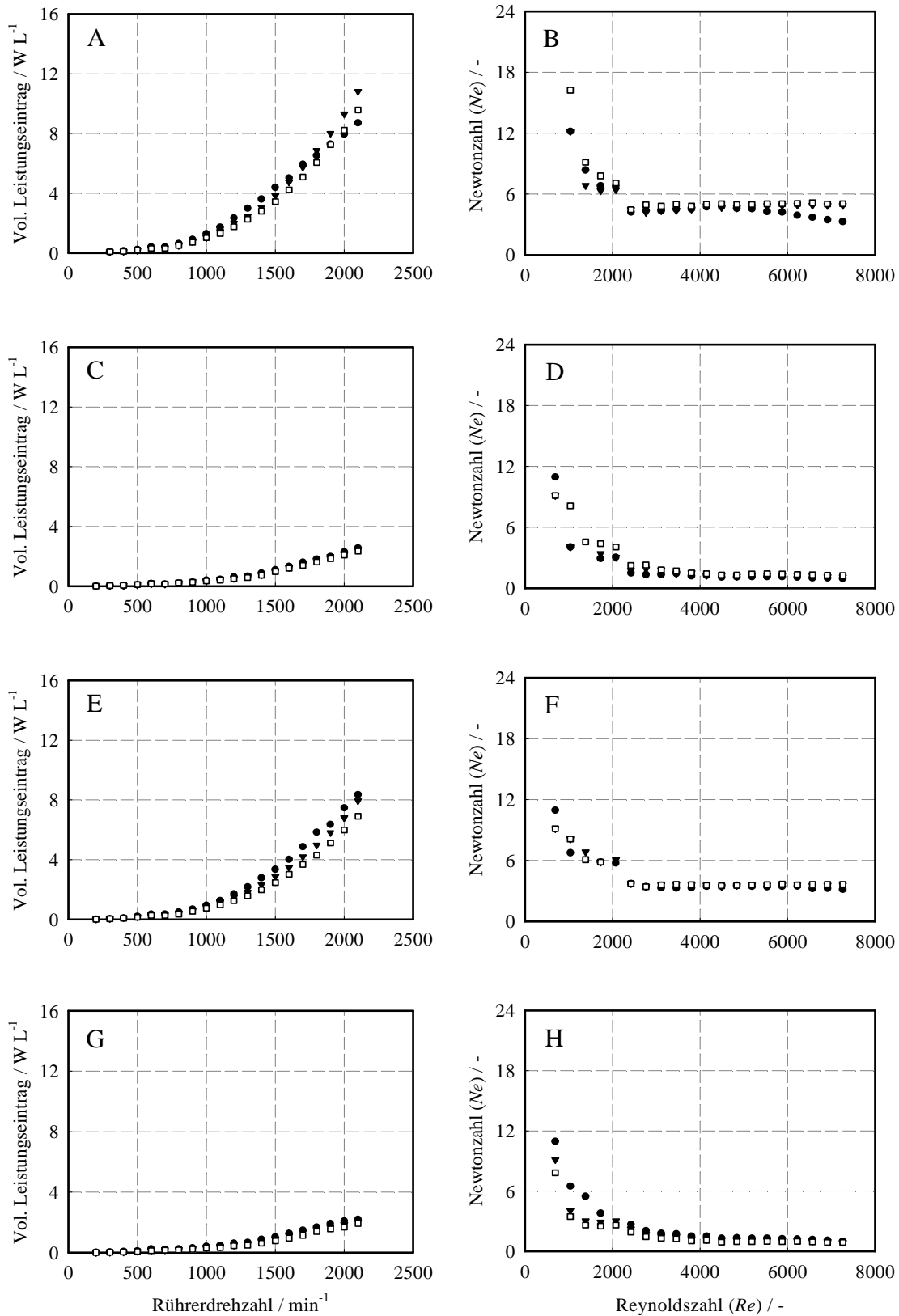


Abbildung 5.5: Volumenspezifischer Leistungseintrag (P/V) und Newton-Reynolds Charakteristik in Milliliter-Rührreaktoren für H-Rührer (A, B, C, D) und S-Rührer (E, F, G, H) mit Strömungsbrecher (A, B, E, F) und ohne Strömungsbrecher (C, D, G, H) mit dem Rührmedium Wasser. 10 mL (●), 12 mL (▼) und 14 mL (□) Füllvolumen.

In Abbildung 5.5 ist zudem die Leistungskennzahl (Ne) in Abhängigkeit von der Strömungskennzahl (Re) dargestellt. Der Drehzahlbereich war identisch zum Leistungseintrag mit bis zu 2100 min^{-1} . Zunächst wurde eine deutliche Abnahme der Newtonzahl (Ne) bis zu Reynoldszahlen (Re) von etwa 2000 beobachtet. Abbildung 5.5B und Abbildung 5.5F zeigen für hohe Reynoldszahlen eine konstante Newtonzahl (Ne). Für Reaktoren ohne Strömungsbrecher war bei $Re > 2000$ eine geringere Abnahme der Newtonzahl zu verzeichnen (Abbildung 5.5D und Abbildung 5.5H). Im hohen Drehzahlbereich ab 1800 min^{-1} war bei Verwendung des H-Rührers mit bewehrten Rührreaktoren und einem Füllvolumen von 10 mL eine deutlichere Abnahme der Leistungskennzahl ersichtlich. Dies lag an einem geringeren Leistungseintrag (Abbildung 5.5B). Das bei Rührreaktoren mit Strömungsbrechern registrierte Plateau wird gekennzeichnet durch eine konstante, von der Strömungskennzahl unabhängigen Leistungskennzahl. Die Newtonzahl betrug beim S-Rührer 3,8 (Abbildung 5.5F). Beim H-Rührer lag die Newtonzahl bei 5,0 (Abbildung 5.5B).

Rührmedium 80 % (w/w) Glycerinlösung

Der Einfluss einer viskosen Glycerin-Wasser Lösung ($\eta = 33 \text{ mPa s}$) mit einem Glycerinanteil von 80 % (w/w) auf den volumenspezifischen Leistungseintrag und die Newton-Reynolds Charakteristik, ist in Abbildung 5.6 veranschaulicht. Der Leistungseintrag war bei Rührreaktoren mit Strömungsbrechern wesentlich höher als bei Reaktoren ohne Strömungsbrecher. So betrug der maximale Leistungseintrag 15 W L^{-1} für eine Rührerdrehzahl von 2100 min^{-1} in bewehrten Milliliter-Rührreaktoren (Abbildung 5.6A). Bei Reaktoren ohne Strömungsbrecher lag der maximale Wert des Leistungseintrags, wie in Abbildung 5.6C dargestellt, bei 9 W L^{-1} . Die Leistungseinträge des H-Rührers waren dabei höher als die des S-Rührers von maximal 13 W L^{-1} für bewehrte (Abbildung 5.6E) und maximal 8 W L^{-1} für unbewehrte Milliliter-Rührreaktoren (Abbildung 5.6G).

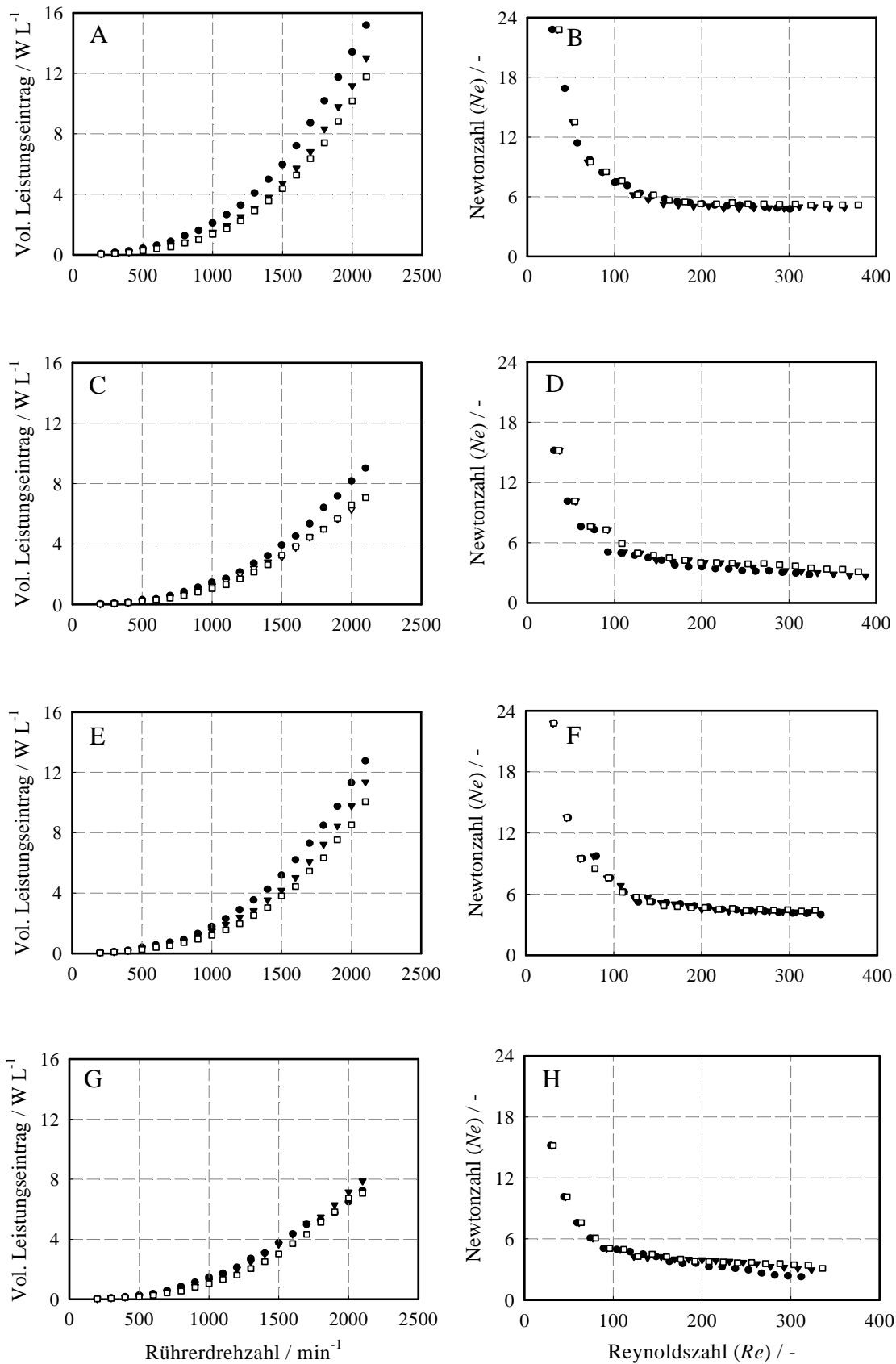


Abbildung 5.6: Volumenspezifische Leistungseinträge (P/V) und Newton-Reynolds Charakteristik in Milliliter-Rührreaktoren mit (A, B, E, F) und ohne Strömungsbrecher (C, D, G, H) und H-Rührer (A, B, C, D) oder S-Rührer (E, F, G, H). Rührmedium 80 % (w/w) Glycerinlösung. 10 mL (●), 12 mL (▼) und 14 mL (□) Füllvolumen.

Da der Leistungseintrag unabhängig vom Füllvolumen sein sollte, konnte durch Variation des Füllstandes von Milliliter-Rührreaktoren auch die Genauigkeit der Messmethode für viskose Rührmedien mit einem Glycerinanteil von 80 % (w/w) untersucht werden. So waren bei Verwendung des H-Rührers Abweichungen von bis zu 4 W L^{-1} zwischen Füllvolumina von 10 mL, 12 mL und 14 mL zu beobachten (Abbildung 5.6A). Dabei ist allerdings neben der zuvor für das Rührmedium Wasser beobachteten Oberflächenbegasung die Temperaturabhängigkeit der Viskosität von Glycerin mit zu berücksichtigen. Bei ansteigender Temperatur nimmt diese ab. Als wahrscheinlichste Ursache für die höheren Abweichungen zwischen einzelnen Leistungseinträgen aus unterschiedlichen Füllständen aber gleicher Rührerdrehzahl gilt eine Erwärmung der gemessenen Glycerinlösung durch den magnetisch-induktiven Antrieb des Einzel-Messstandes.

Wird die Newton-Reynolds Charakteristik einer 80 % (w/w) Glycerinlösung im Drehzahlbereich bis zu 2100 min^{-1} betrachtet, so konnte ab einer Reynoldszahl von 200 eine nahezu konstante Newtonzahl von 5 bei Verwendung des H-Rührers und eine Newtonzahl von 4 bei Verwendung des S-Rührers in Milliliter-Rührreaktoren mit Strömungsbrechern beobachtet werden (Abbildung 5.6B und Abbildung 5.6F). Bei Rührreaktoren ohne Strömungsbrecher nahm die Newtonzahl weiter auf 3 bis 4 ab (Abbildung 5.6D und Abbildung 5.6H).

Feststoffhaltige Rührmedien

Nach den volumenspezifischen Leistungseinträgen für homogene Lösungen, ist nachfolgend der Leistungseintrag für feststoffhaltige Rührmedien dargestellt. Neben 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose und einer durchschnittlichen Partikelgröße von 50 μm in den Abbildungen 5.7A bis 5.7D, geht aus den Abbildungen 5.7E bis 5.7H der Leistungseintrag von 5 % (w/w TS) gemahlenen Weizenstrohs der Partikelgrößen kleiner 0,7 mm und 0,7 mm bis 2,0 mm für bewehrte und unbewehrte Rührreaktoren mit dem H- und S-Rührer hervor.

Besonders auffällig in Abbildung 5.7 sind bei einer vergleichenden Betrachtung von bewehrten (A, C, E, G) und unbewehrten Reaktoren (B, D, F, H) die wesentlich höheren Leistungseinträge in bewehrten Rührreaktoren. So betrug der Leistungseintrag des S-Rührers in einer Suspension mit 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose bei einer Rührerdrehzahl von 2000 min^{-1} etwa 8 W L^{-1} bei Verwendung von Strömungsbrechern und bis zu 5 W L^{-1} ohne Strömungsbrecher. Bei einer Suspension aus Weizenstrohfaser (5 % w/w TS, < 0,7 mm) betrug der Unterschied des Leistungseintrags für den S-Rührer bei bewehrten Milliliter-Rührreaktoren (Abbildung 5.7G und Abbildung 5.7H) bis zu 2 W L^{-1} . Beim Einsatz des H-Rührers sind in Abbildung 5.7E und Abbildung 5.7F zwischen bewehrtem und unbewehrtem Rührreaktor etwa 4 W L^{-1} ($n = 2000 \text{ min}^{-1}$) erkennbar. Mit ansteigender Rührerdrehzahl nahmen die Unterschiede im Leistungseintrag bei beiden Rührern weiter zu. Die Genauigkeit der Leistungseintragsmessung wurde in Abbildung 5.7C und Abbildung 5.7D bei konstanter Rührerdrehzahl für das Füllgewicht 10 g, 12 g und 14 g mit einer Suspension bestehend aus 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose und dem S-Rührer untersucht. Signifikante Abweichungen zwischen dem Leistungseintrag wurden nur bei bewehrten Reaktoren ab einer Rührerdrehzahl von 1500 min^{-1} sichtbar (Abbildung 5.7C). Wie in den Abbildungen 5.7F und 5.7H zu beobachten ist, erhöhte der Einsatz einer grobfasrigen Weizenstrohfraction (0,7 mm bis 2,0 mm) den Leistungseintrag des H- und S-Rührers in Milliliter-Rührreaktoren deutlich von 2,5 W L^{-1} auf 6,0 W L^{-1} und von 2,1 W L^{-1} auf 5,1 W L^{-1} .

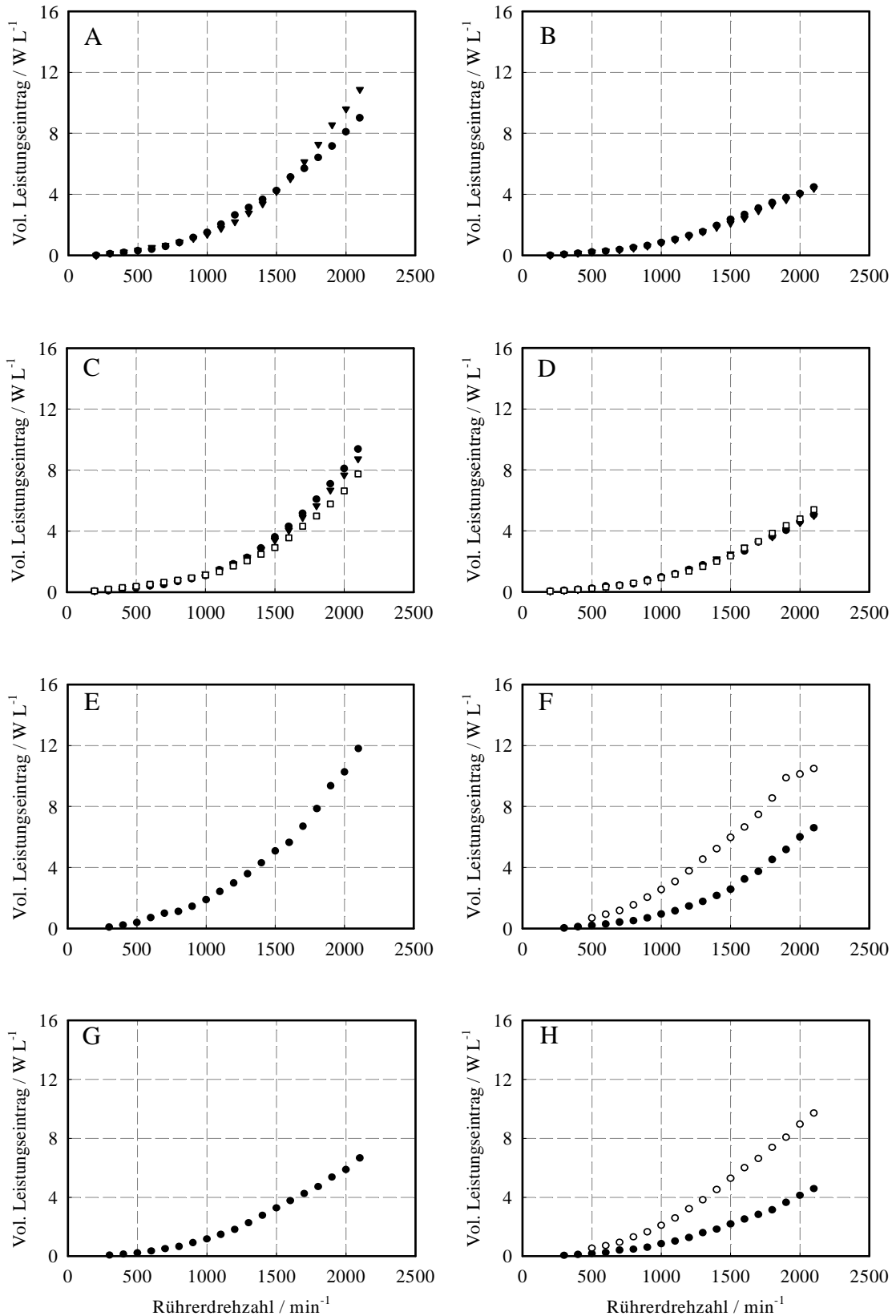


Abbildung 5.7: Volumenspezifischer Leistungseintrag (P/V) in Milliliter-Rührreaktoren mit (A, C, E, G) und ohne (B, D, F, H) Strömungsbrecher mit 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose (A, B, C, D) und 5 % (w/w TS) Weizenstroh (E, F, G, H) und H-Rührer (A, B, E, F) oder S-Rührer (C, D, G, H). Weizenstroh kleiner 0,7 mm (●) und 0,7 mm bis 2,0 mm (○). 10 g (●, ○), 12 g (▼) und 14 g (□) Füllgewicht.

5.2.3 Scheinbare Schergeschwindigkeit

Die Bestimmung scheinbarer Schergeschwindigkeiten, auch effektive Schergeschwindigkeiten genannt, eröffnete die Möglichkeit einen für das Rührsystem charakteristischen mathematischen Zusammenhang mit der Rührerdrehzahl wie in Kapitel 3.1.6 beschrieben, herzustellen. Jede Rührerdrehzahl wurde durch eine scheinbare Schergeschwindigkeit, wie aus den Abbildungen 5.8C bis 5.8E ersichtlich, beschrieben.

Jeder Datenpunkt spiegelt dabei zwei Fluide mit Newtonschem (Glycerin-Wasser Lösung) und Nicht-Newtonschem (Xanthanlösung) Verhalten wieder. Dabei zeigten die Fluide identische Leistungseinträge und dadurch gleiche Newtonzahlen in Abbildung 5.8A sowie identische dynamische Viskositäten, wie in Abbildung 5.8B beispielhaft für den S-Rührer in Milliliter-Rührreaktoren ohne Strömungsbrecher dargestellt ist. Die entsprechende scheinbare Schergeschwindigkeit lag dann vor, wenn das Newtonsche Fluid (90 % w/w Glycerin) und das Nicht-Newtonsche Fluid (0,6 % w/w Xanthan) identische dynamische Viskosität besaßen (Abbildung 5.8B). Die Rührerdrehzahl mit entsprechender scheinbarer Schergeschwindigkeit lag vor, wenn das Newtonsche Fluid (90 % w/w Glycerin) und das Nicht-Newtonsche Fluid (0,6 % w/w Xanthan) identische Leistungseinträge und dadurch gleiche Newtonzahlen aufzeigten (Abbildung 5.8A).

Wie die Abbildungen 5.8C bis 5.8F für die untersuchten Rührsysteme zeigen, konnte eine lineare Beziehung zwischen der scheinbaren Schergeschwindigkeit und der Rührerdrehzahl bestimmt werden. Die Steigung der resultierenden Geraden ist systemspezifisch und damit vom verwendeten Rührorgan und der Art des Milliliter-Rührreaktors abhängig. Die jeweils ermittelten Geradensteigungen sind in Tabelle 5.1 dargestellt.

Tabelle 5.1: Metzner-Otto Konstanten (k) für Milliliter-Rührreaktoren mit und ohne Strömungsbrecher.

| Rührorgan | H-Rührer | H-Rührer | S-Rührer | S-Rührer |
|--------------------------------|----------|-----------|----------|-----------|
| mL-Reaktor | bewehrt | unbewehrt | bewehrt | unbewehrt |
| Metzner-Otto Konstante (k) | 9,0 | 8,3 | 11,8 | 9,8 |

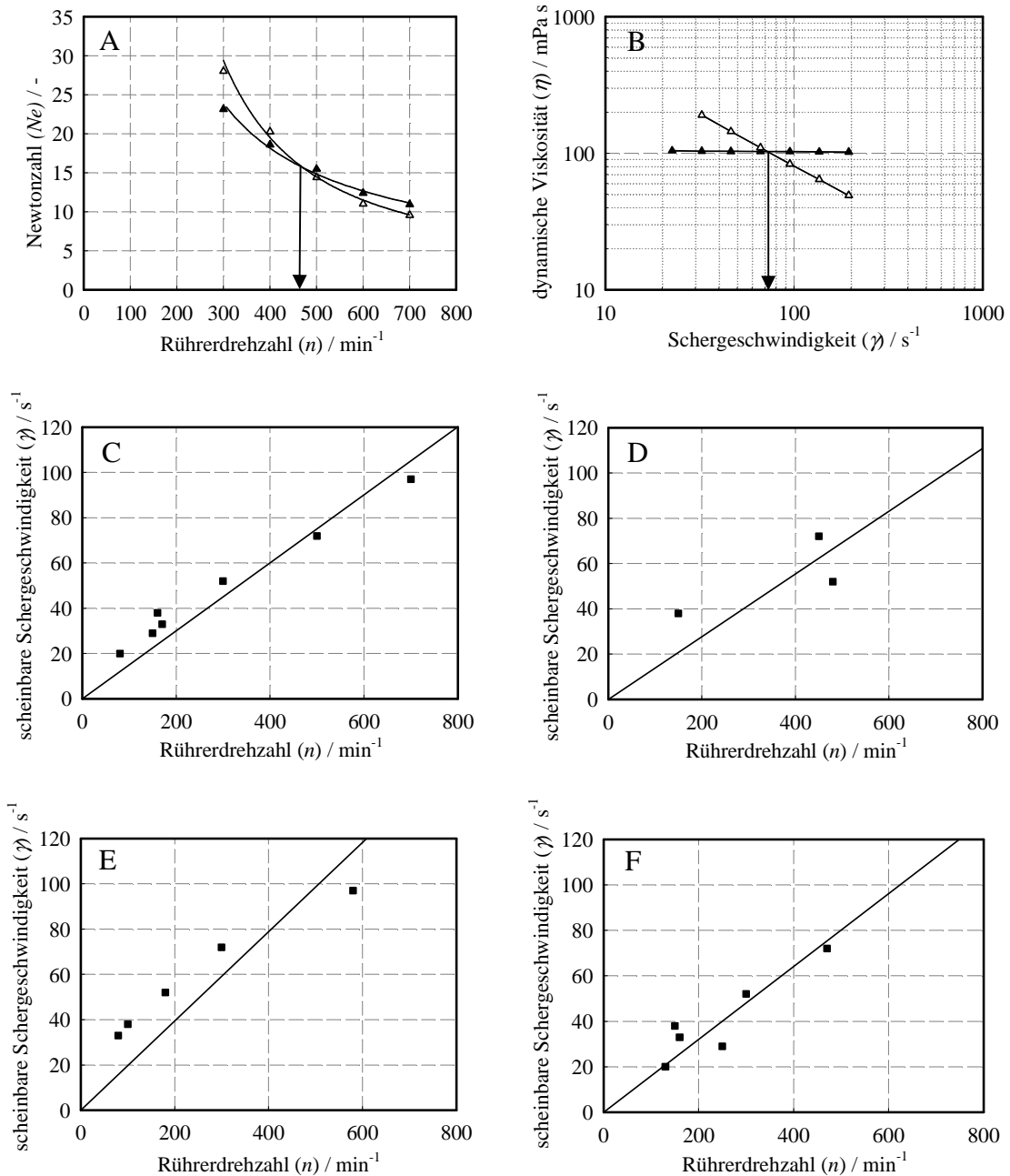


Abbildung 5.8: Newtonzahl in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl (A). Dynamische Viskosität in Abhängigkeit von der Schergeschwindigkeit (B). S-Rührer in unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren für ein Newtonsches Fluid (90 % w/w Glycerin) und Nicht-Newtonisches Fluid (0,4 % w/w Xanthan) (A und B). Bestimmung der Metzner-Otto Konstante (k) anhand der Steigung aus der scheinbaren Schergeschwindigkeit und der Rührerdrehzahl für den H-Rührer (C und D) und S-Rührer (E und F) in Milliliter-Rührreaktoren mit Strömungsbrecher (C und E) und ohne Strömungsbrecher (D und F).

Die Geradensteigungen in Abbildung 5.8 implizieren die Scherintensitäten der Rührsysteme und werden als Metzner-Otto Konstanten bezeichnet. Für Milliliter-Rührreaktoren in H-Rührer Konfiguration betrug die Metzner-Otto Konstante, wie in Tabelle 5.1 dargestellt, 9,0 (bewehrt) und 8,3 (unbewehrt). Bei Milliliter-Rührreaktoren in S-Rührer Konfiguration betrug diese 11,8 (bewehrt) und 9,8 (unbewehrt). Die S-Rührer Konfiguration erweist sich durch die höheren Metzner-Otto Konstanten von 11,8 und 9,8, verglichen mit 9,0 und 8,3, als scherintensiver als die H-Rührer Konfiguration. Die ermittelten Metzner-Otto Konstanten von Milliliter-Rührreaktoren mit Strömungsbrecher sind mit Werten von 11,8 oder 9,0 größer als von unbewehrten Reaktoren mit Werten von 9,8 oder 8,3.

5.3 Milliliter-Rührreaktoren für die enzymatische Hydrolyse von suspendierten Pflanzenmaterialien

5.3.1 Auswahl des Reaktionssystems

Anhand eines einfachen Beispielprozesses in der Anfangsphase der enzymatischen Hydrolyse von Maisspindelgranulat, soll die Eignung von bewehrten und unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren evaluiert werden. Die Versuche wurden jeweils im 3-fach Parallelansatz, bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C und einem pH von 5,0 durchgeführt.

Rheologie einer Suspension von Maisspindelgranulat

Eine Suspension an fein gemahlenem Maisspindelgranulat (Partikelgröße < 250 µm, 6 % w/w TS) zeigte strukturviskoses Verhalten, das sich nach dem Ostwald-de-Waele Gesetz nach Gleichung 3-9 beschreiben lässt, wobei der Konsistenzindex $K = 3111 \text{ mPa s}^m$ und der Fließindex $m = 0,21$ ist. Durch die in Kapitel 5.2.3 in Tabelle 5.1 für die jeweils verwendete Reaktor-Rührer Konfiguration beschriebene Metzner-Otto Konstante, ist es möglich, jeweils Rührerdrehzahlen zu ermitteln, bei denen ein Zustand gleicher scheinbarer Viskosität in den Milliliter-Rührreaktoren vorliegt. Aus der gewählten scheinbaren Viskosität von 33 mPa s und der aus Kapitel 5.2.3 bekannten Metzner-Otto Konstanten für die Rührorgane, können die Rührerdrehzahlen 2020 min^{-1} und 1540 min^{-1} für den H-Rührer und den S-Rührer in Milliliter-Rührreaktoren mit

Strömungsbrechern und 1860 min^{-1} für den S-Rührer in Milliliter-Rührreaktoren ohne Strömungsbrecher nach Gleichung 3-9 und Gleichung 3-34 zugeordnet werden.

Enzymatische Hydrolyse von suspendiertem Maisspindelgranulat

Für die enzymatische Hydrolyse wurde das Enzympräparat „Accellerase 1500“ mit einer Beladung von $33,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ verwendet, wobei die Lösung des verwendeten Enzympräparats „Accellerase 1500“ eine Proteinkonzentration von $98,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ mL}^{-1}$ enthielt.

Der Konzentrationsverlauf der Monosaccharide Glucose und Xylose ist für die am Reaktorboden entnommenen Proben der 40 min andauernden enzymatischen Hydrolyse in Abbildung 5.9 dargestellt. Um die Strömung im Reaktor nicht zu beeinflussen, wurden die Milliliter-Rührreaktoren am unteren Ende seitlich angebohrt und Probenlösung über eine Kanüle vom Reaktorboden entnommen.

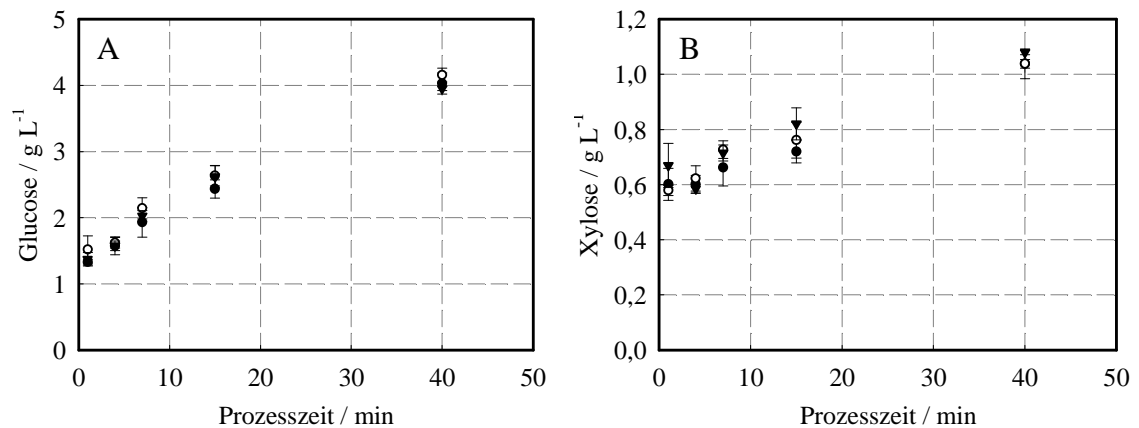


Abbildung 5.9: Glucose- (A) und Xylosetreisetzung (B) während der enzymatischen Hydrolyse bei einer scheinbaren Viskosität von $33 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ für eine strukturviskose Suspension an Maisspindelgranulat mit 6% (w/w TS). ($T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5,0$, Enzymbeladung $33,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Accellerase 1500“). H-Rührer in bewehrten (▼), S-Rührer in bewehrten (●,○) und unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren. Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen von einem 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

Für die drei Rührsysteme bestehend aus Milliliter-Rührreaktoren mit und ohne Strömungsbrecher jeweils ausgestattet mit dem S-Rührer, sowie dem H-Rührer in bewehrten Milliliter-Rührreaktoren, kann ein nahezu linearer Anstieg der Glucose- und Xylosekonzentration mit fortschreitender Prozesszeit beobachtet werden. Die Glucose- und Xylosekonzentrationen zwischen den Rührsystemen waren nahezu identisch, so

dass kein merklicher Einfluss der gewählten Reaktor-Rührer Konfiguration zu erkennen ist.

Anstelle der Nicht-Newtonschen Suspension mit 6 % (w/w TS) Maisspindelgranulat, wurde eine Newtonsche Glycerin-Wasser Lösung mit 0,5 % (w/w TS) Maisspindelgranulat ($\eta = 36 \text{ mPa s}$) verwendet und die Rührerdrehzahl auf 100 min^{-1} abgesenkt. Die Probenahme erfolgte in gleicher Weise wie zuvor vom Reaktorboden, ohne die Strömung im Reaktor zu beeinflussen. Die Konzentration der freigesetzten Zucker nach einminütiger Einwirkdauer der Enzymlösung „Accellerase 1500“ ist in Abbildung 5.10 dargestellt. Die kurze Einwirkzeit wurde gewählt, da detektierbare Einflüsse der Reaktor-Rührer Konfiguration besonders in der ersten Phase des Hydrolyseverlaufs auftreten sollten. Wie Abbildung 5.10 zeigt, wies die Konfiguration des S-Rührers in bewehrten Milliliter-Rührreaktoren die höchste Glucose- und Xylosekonzentration auf und wurde deshalb auf 100 % gesetzt. Der unbewehrte Milliliter-Rührreaktor erzielte 82 % bzw. 50 % der Glucose- bzw. Xylosekonzentration des bewehrten Rührkesselreaktors. Der H-Rührer zeigte geringere Monosaccharidkonzentrationen und erreichte etwa 55 % der Glucose- und 30 % der Xylosekonzentration des S-Rührers.

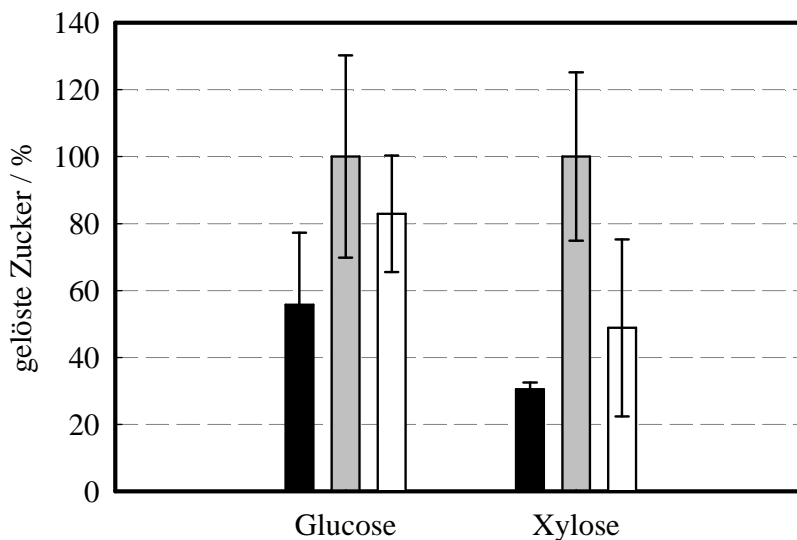


Abbildung 5.10: Glucose (A) und Xylosefreisetzung (B) während der enzymatischen Hydrolyse bei einer Viskosität von 36 mPa s für eine Glycerinlösung mit Maisspindelgranulat (0,5 % w/w TS, $T = 50 \text{ °C}$, $\text{pH } 5,0$, $n = 100 \text{ min}^{-1}$ Enzymbeladung $33,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Accellerase 1500“). H-Rührer in bewehrten (■), S-Rührer in bewehrten (▒) und S-Rührer in unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren (□) jeweils im 3-fach Parallelansatz.

Es wurde daher der entwickelte S-Rührer 48-fach, wie in Abbildung 5.11 dargestellt, nach der technischen Zeichnung A2 im Anhang für den S-Rührer mit Kappe gefertigt und als Gebrauchsmuster geschützt (Riedlberger und Weuster-Botz, 2010). Da Strömungsbrecher in Milliliter-Rührreaktoren die Partikelgröße der Substrate einschränken, wurden Milliliter-Rührreaktoren ohne Strömungsbrecher für die weitergehende Quantifizierung der enzymatischen Hydrolyse von Pflanzenmaterialien verwendet. Dazu ist zunächst eine genauere verfahrenstechnische Charakterisierung des identifizierten Milliliter-Reaktorsystems notwendig, um eine spätere Übertragung in den Liter-Maßstab gewährleisten zu können.



Abbildung 5.11: 48-fach gefertigte S-Rührer mit individuellem Milliliter-Rührreaktor ohne Strömungsbrecher im Vordergrund am Deckel des parallelen Rührkesselreaktorsystems.

5.3.2 Verfahrenstechnische Charakterisierung des S-Rührers in unbewehrten Reaktoren

Neben einer Bestimmung der maximalen lokalen Energiedissipation, wird die Homogenisierung und Mischzeitcharakteristik in unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren untersucht, um notwendige verfahrenstechnische Grundlagen für eine erfolgreiche Skalierung in den Liter-Maßstab zu erhalten.

Maximale lokale Energiedissipation

Die maximale lokale Energiedissipation (ε_{max}) ist eine wichtige Größe zur Bewertung der Partikelbeanspruchung in Reaktionssystemen. Hierfür wurde ein Ton/Polymerflockensystem nach Hoffmann *et al.* (1992) für die Bestimmung der maximalen Energiedissipation verwendet. Zuvor war es notwendig, die Partikelbeanspruchung im Liter-Maßstab zu untersuchen.

Abbildung 5.12A und Abbildung 5.12B veranschaulichen die im Liter-Volumen erhaltene Zerkleinerungskinetik der geflockten Partikel in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl und der maximalen lokalen Energiedissipation nach Gleichung 3-36. Als charakteristischer Parameter wurde der Median der Volumensummenverteilung ($d_{50,3}$) gewählt, da die gemessene Partikelgrößenverteilung in erster Näherung einer logarithmischen Normalverteilung entspricht. Mit ansteigender Rührerdrehzahl wurde eine zunehmende Zerkleinerung der Partikel bis auf $44,9 \pm 0,8 \mu\text{m}$ bei $n = 1100 \text{ min}^{-1}$ registriert. Eine Rührerdrehzahl von 300 min^{-1} , führte hingegen zu einem wesentlich größeren Endpartikeldurchmesser mit einem $d_{50,3}$ von $122,2 \pm 13,2 \mu\text{m}$. Aus Abbildung 5.12B konnte ein mathematischer Zusammenhang zwischen der Partikelgröße und der maximalen lokalen Energiedissipation erstellt werden. Der ermittelte mathematische Zusammenhang ist gültig für den im Labor-Rührkesselreaktor in Abbildung 5.12A und Abbildung 5.12B validierten Bereich der Endpartikelgröße von $44,9 \mu\text{m}$ bis $122,2 \mu\text{m}$.

Wird nun die Flockenzerkleinerung im Milliliter-Rührreaktor in Abbildung 5.12C mit dem S-Rührer betrachtet, so ergab sich abhängig von der gewählten Rührerdrehzahl ein Endpartikeldurchmesser von $73,2 \mu\text{m}$ bis $161,4 \mu\text{m}$. Aus dem zuvor für den Labor-Rührkesselreaktor erhaltenen Zusammenhang aus Abbildung 5.12B, konnte wie in Abbildung 5.12D erfolgt, die maximale lokale Energiedissipation (ε_{max}) im Milliliter-Rührreaktor durch den Endpartikeldurchmesser abgeschätzt werden. Die Endpartikeldurchmesser außerhalb des im Labor-Rührkesselreaktor validierten Gültigkeitsbereichs sind in Abbildung 5.12C und Abbildung 5.12D mit grau markiert. Dies betrifft die Rührerdrehzahlen im Milliliter-Rührreaktor bis 1500 min^{-1} . Mit Hilfe der mittleren Energiedissipation (ε_{ϕ}) nach Gleichung 3-35 konnte das Verhältnis der maximalen lokalen Energiedissipation zur mittleren Energiedissipation ($\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi}$) von 7,4 für den S-Rührer in Milliliter-Rührreaktoren ohne Strömungsbrecher berechnet werden.

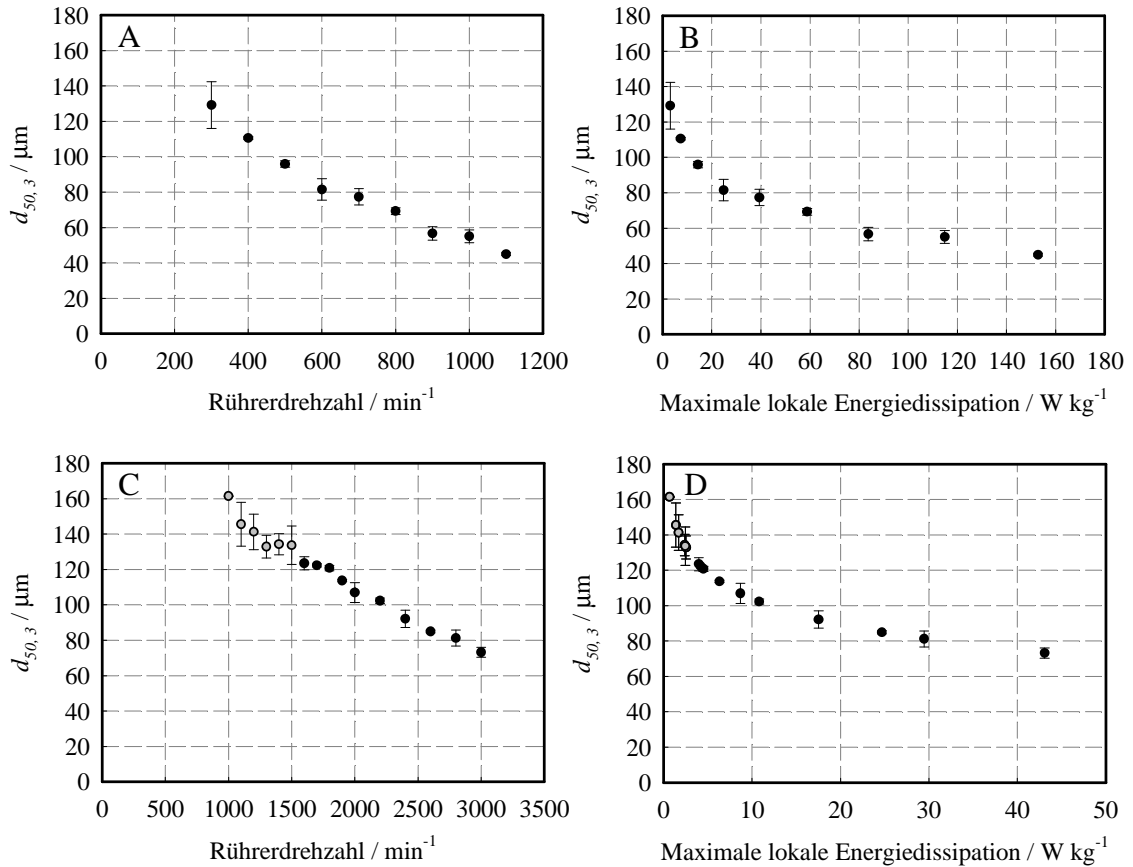


Abbildung 5.12: Verlauf des mittleren Partikeldurchmessers ($d_{50,3}$) in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl und der maximalen lokalen Energiedissipation für den Labor-Rührkesselreaktor (A und B) und unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren mit S-Rührer (C und D).

Die Rührerdrehzahl und die dimensionslose Reynoldszahl (Re) konnten nun in Abhängigkeit von der maximalen lokalen Energiedissipation wie in Abbildung 5.13 dargestellt werden. Die grau hinterlegten Messpunkte symbolisieren Messwerte, die außerhalb des validierten Gültigkeitsbereichs von Gleichung 5-1 liegen. Der Drehzahlbereich bis 1500 min^{-1} wurde nicht in die Bestimmung der maximalen lokalen Energiedissipation von Gleichung 5-1 einbezogen.

Mit Hilfe von Gleichung 5-1 war es nun möglich, die maximale lokale Energiedissipation im Milliliter-Rührreaktor ohne Strömungsbrecher für den S-Rührer abzuschätzen. Der Gültigkeitsbereich von 1600 min^{-1} bis 3000 min^{-1} sollte beachtet werden.

$$\varepsilon_{max} = \exp\left(\frac{n - 884,3 \text{ min}^{-1}}{550,3 \text{ min}^{-1}}\right) \text{ W kg}^{-1} \quad (5-1)$$

Mit n Rührerdrehzahl / min^{-1}
 ε_{max} maximale lokale Energiedissipation / W kg^{-1}

Die zur Homogenisierung (Kapitel 5.2.1) durch den S-Rührer in unbewehrten Reaktoren notwendigen Drehzahlen sind kleiner als 1600 min^{-1} . Die maximale lokale Energiedissipation beträgt nach Abschätzung durch Gleichung 5-1 $0,3 \text{ W kg}^{-1}$ für eine Rührerdrehzahl von 200 min^{-1} und $0,5 \text{ W kg}^{-1}$ bei einer Rührerdrehzahl von 500 min^{-1} .

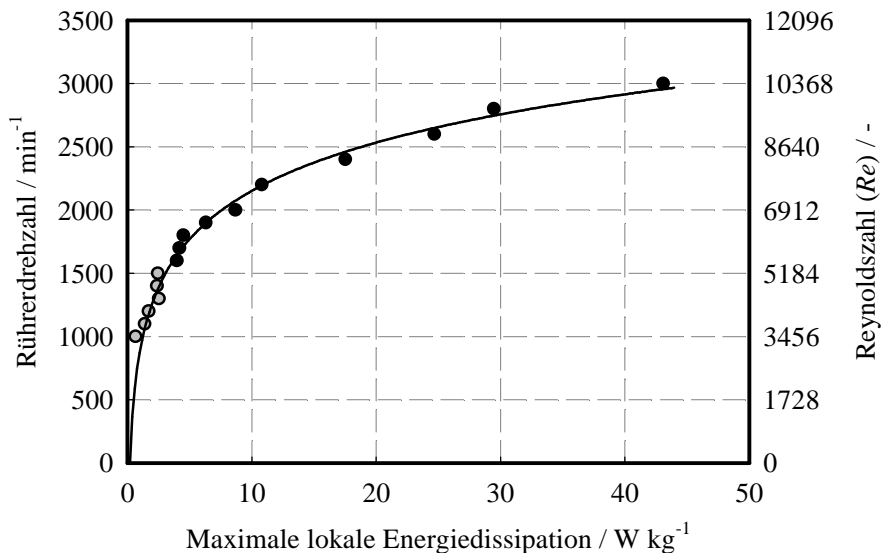


Abbildung 5.13: Maximale lokale Energiedissipation des S-Rührers in unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren als Funktion von Rührerdrehzahl und Reynoldszahl.

Homogenisierung und Leistungseintrag

Die effektive Homogenisierung von Suspensionen pflanzlichen Materials bei definierten volumenspezifischen Leistungseinträgen ist wesentlicher Bestandteil einer erfolgreichen Skalierbarkeit der enzymatischen Hydrolyse. Ein möglichst geringer Leistungseintrag wird vor allem angestrebt, um die Skalierbarkeit bei möglichst geringer Mischarbeit gewährleisten zu können und damit Energie einzusparen.

Grundsätzlich erhöhen Feststoffe in wässriger Lösung den Leistungseintrag, wie Abbildung 5.14A verdeutlicht. Der Leistungseintrag ist dabei abhängig vom Feststoffanteil und von der Partikelgröße. Abbildung 5.14B zeigt jedoch, dass für

niedrige Leistungseinträge ($< 1,5 \text{ W L}^{-1}$) und geringe lokale Energiedissipationen ($\leq 1 \text{ W kg}^{-1}$, nach Gleichung 5-1) eine Homogenisierung in Milliliter-Rührreaktoren möglich war und veranschaulicht den Verlauf der Mischzeit bis zum Erreichen einer 97 % Homogenität in Abhängigkeit des Leistungseintrags.

Die Mischzeiten wurden als Funktion der Rührerdrehzahl bestimmt und sind in Abbildung 5.14B für Wasser, eine Suspension mit 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose und eine Suspension aus Weizenstrohfasern (5 % w/w TS) als Funktion des Leistungseintrags dargestellt. Die Mischzeiten nahmen mit ansteigendem Leistungseintrag (Rührerdrehzahl) bis auf ein Minimum von 2 s ab. Eine weitere Zunahme des Leistungseintrags zeigte allerdings keine signifikant geringeren Mischzeiten. Für Mischzeiten über 4 s war der Leistungseintrag in Milliliter-Rührreaktoren abhängig von der verwendeten Suspensionsart. Reines Wasser und die wässrige Weizenstrosuspension (5 % w/w TS) führten zu einem ähnlichen Verhalten der Mischzeit. Ein Leistungseintrag von nur $0,1 \text{ W L}^{-1}$ resultierte in einer Mischzeit von 4 s. Eine Suspension aus 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose benötigte einen Leistungseintrag von $0,5 \text{ W L}^{-1}$ für die gleiche Mischzeit.

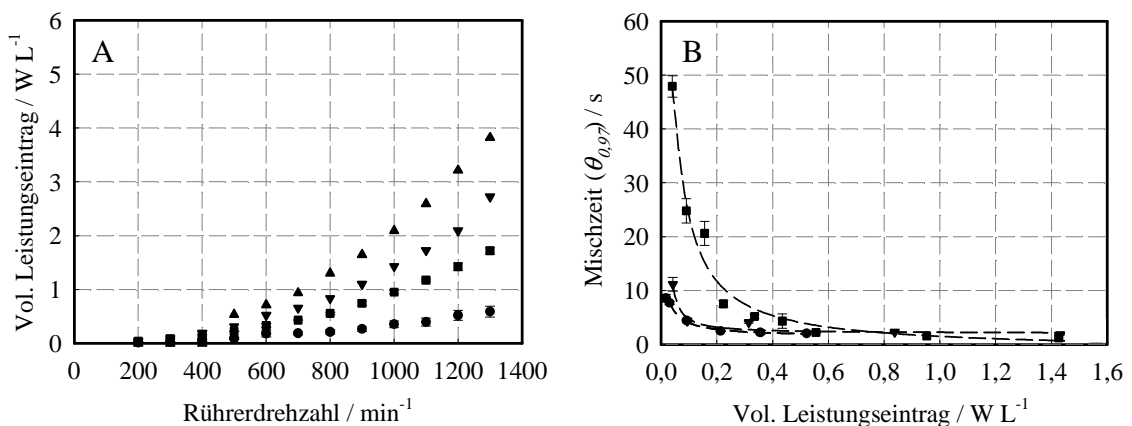


Abbildung 5.14: Volumenspezifischer Leistungseintrag (P/V) als Funktion der Rührerdrehzahl (A). Mischzeit $\theta_{0,97}$ in Abhängigkeit des volumenspezifischen Leistungseintrages (P/V) (B). Für Wasser (●), 20 % (w/w TS) mikrokristalline Cellulose (■) und 5 % (w/w TS) Weizenstroh ($d_{50,3} = 100 \mu\text{m}$ (▼) und 0,7 mm bis 2,0 mm (▲)). Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus einer 3-fach Bestimmung.

Mischzeitcharakteristik

Die Durchmischungskennzahl ($n \cdot \theta_{0,97}$) in Abbildung 5.15 steht für die Anzahl an Rührerumdrehungen (n), die notwendig sind, um den geforderten Homogenitätszustand von 97 % zu erreichen.

Die scheinbare Reynoldszahl (Re_{app}) konnte mit Gleichung 3-1 in Abhängigkeit von der scheinbaren dynamischen Viskosität (η_{app}) beschrieben werden, wobei die scheinbare dynamische Viskosität nach Gleichung 3-9 als Funktion des Konsistenzindex (K) und des Fließindex (m) berechnet wurde. Der Konsistenzindex wurde zu 8674 mPa s^m für die 5 % (w/w TS) Weizenstrohsuspension und zu 1615 mPa s^m für die Suspension mit 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose berechnet. Der Fließindex beträgt entsprechend 0,04 für die 5 % (w/w TS) Weizenstrohsuspension und 0,39 mPa s^m für die Suspension mit 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose.

Führt man eine doppellogarithmische Auftragung der Durchmischungskennzahl und der scheinbaren Reynoldszahl zur Beschreibung der Unterschiede evaluierter Suspensionen, wie in Abbildung 5.15 dargestellt, ein, so zeigen sich linear abnehmende Verläufe der Durchmischungskennzahl, deren Steigung von der untersuchten Suspension abhängt. Für eine Suspension mit 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose betrug die Geradensteigung -0,69, hingegen konnte für eine 5 % (w/w TS) Weizenstrohsuspension eine Steigung von -0,12 beobachtet werden. Ergänzend soll angemerkt sein, dass die grau hinterlegten Symbole als Ausreißer betrachtet wurden und somit nicht in vorige Berechnung mit eingingen.

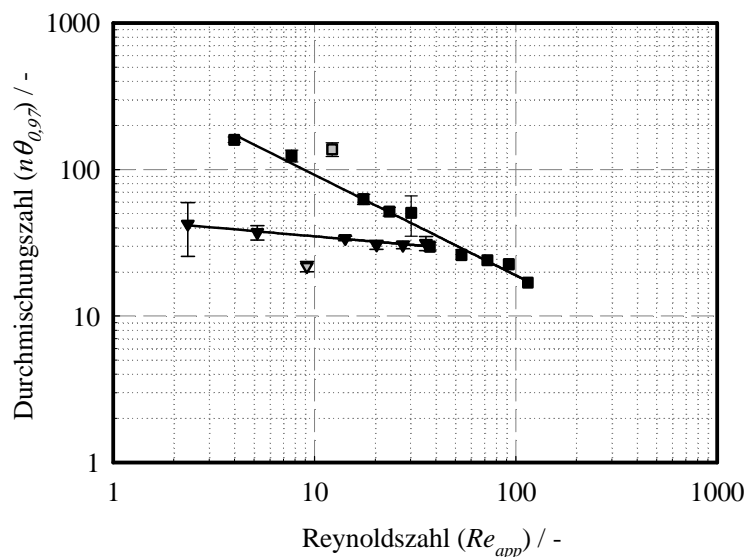


Abbildung 5.15: Durchmischungskennzahl ($n \cdot \theta_{0,97}$) als Funktion der scheinbaren Reynoldszahl (Re_{app}) für eine Suspension mit 5 % (w/w TS) Weizenstrohfaser (\blacktriangledown) und 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose (\blacksquare). Fehlerbalken symbolisieren jeweils die Standardabweichungen aus einer 3-fach Bestimmung.

5.4 Enzymatische Hydrolyse mikrokristalliner Cellulose in Milliliter-Rührreaktoren

5.4.1 Feststoffanteil

Da die Einflussfaktoren auf die enzymatische Hydrolyse vielfältig sein könnten, wurde zunächst reine Cellulose untersucht. Zur besseren Einordnung des Feststoffanteils ist in Abbildung 5.16A die Höhe der Flüssigphase auf den Partikeln, relativ zum gesamten Füllstand der Suspension in Milliliter-Rührreaktoren ohne Strömungsbrecher dargestellt. Grundsätzlich sind hohe Feststoffanteile anzustreben, da sich dadurch höhere Zuckerkonzentrationen erzeugen lassen. Mikrokristalline Cellulose wurde mit einem Anteil von 5 %, 10 %, 15 % und 20 % (w/w TS) enzymatisch zu Glucose hydrolysiert. Mit steigendem Feststoffanteil nimmt der Flüssigkeitsüberstand stetig ab und lässt sich durch die lineare Beziehung in Abbildung 5.16B abschätzen. Wird die entstandene Gerade für besonders hohe Feststoffanteile extrapoliert, so ergibt sich ein maximaler Feststoffanteil von 30 % (w/w TS) als Grenzzustand zwischen einer Suspension, in welcher die Feststoffe in flüssiger Phase dispergiert sind und einem Haufwerk aus feuchten Cellulosepartikeln.

Einfluss der festen Phase auf die Glucoseproduktion

Die Enzymbeladung wurde dabei konstant bei $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ für die Enzympräparate „Celluclast“ und „Novozym 188“ gehalten. Die Reaktionstemperatur betrug $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bei pH 5,0. Mit zunehmender Reaktionsdauer erhöhte sich die freigesetzte Glucosemenge abhängig vom Feststoffanteil mikrokristalliner Cellulose (Abbildung 5.16C).

Nach 9 h enzymatischer Hydrolyse der im 4-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren durchgeführten Reaktion, betrug die freigesetzte Glucose für einen Feststoffanteil von 5 % (w/w TS) bereits $394 \pm 25 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Nach 24 h lag die Glucose bei $640 \pm 26 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und erreichte nach 72 h einen Maximalwert von $858 \pm 67 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$, bei einer gelösten Glucosekonzentration von $45 \pm 4 \text{ g L}^{-1}$. Wurde nun der Feststoffanteil sukzessive auf 20 % (w/w TS) mikrokristalline Cellulose erhöht, so sank die maximal gelöste Glucose auf $492 \pm 29 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ ab, wobei eine Glucosekonzentration von $123 \pm 7 \text{ g L}^{-1}$ gebildet wurde.

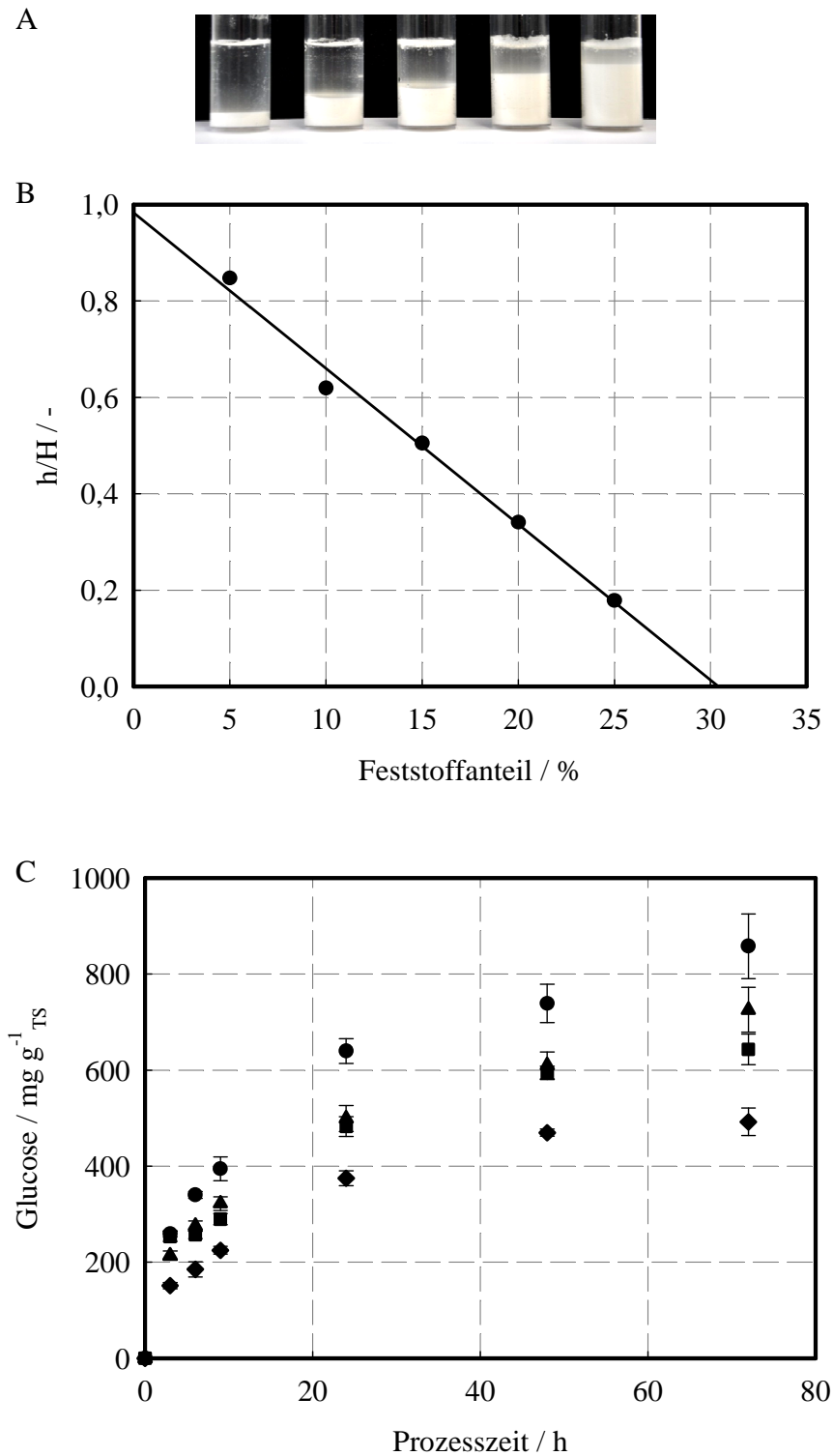


Abbildung 5.16: Suspension mikrokristalliner Cellulose mit 5 %, 10 %, 15 %, 20 % (w/w TS) (A). Quotient der Höhe der Flüssigkeitssäule (h) und der Gesamthöhe der Suspension (H) in Abhängigkeit vom Feststoffanteil (B). Enzymatische Hydrolyse mikrokristalliner Cellulose mit 5 % (●), 10 % (▲), 15 % (■) und 20 % (◆) (w/w TS) Feststoffanteil (C). Enzymbeladung: $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Celluclast“ und $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Novozym 188“, $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5,0$, $n = 200 \text{ min}^{-1}$. Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus einem 4-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

5.4.2 Enzymkonzentration und Produktinhibierung

Der Einfluss der Enzymkonzentration und des gebildeten Produkts auf die enzymatische Hydrolyse mikrokristalliner Cellulose konnte durch Veränderung der Enzymbeladung und der Vorlage von Glucose bereits zu Beginn der Reaktion untersucht werden. Die Glucosekonzentration zu Beginn der Reaktion lag zwischen 0 g L^{-1} und 160 g L^{-1} . Für eine Enzymbeladung von $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $45,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ mit $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $5,7 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ für die Enzympräparate „Celluclast“ und „Novozym 188“ ist in Abbildung 5.17 die zeitlich abhängige Glucosefreisetzung aus der Cellulose dargestellt. Als Reaktionstemperatur wurde $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bei einem pH von 5,0 gewählt.

Mit ansteigender Konzentration der vorgelegten Glucose nahm die gebildete Glucose ab, so dass bei einer maximalen Vorlagenkonzentration von 160 g L^{-1} Glucose nach 72 h Reaktionsdauer nur $139 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose erreicht wurden.

Wurde die Enzymbeladung von $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ auf $45,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ erhöht, so erhöhte sich auch die freigesetzte Glucose. Die Glucoseausbeute betrug ohne Produktvorlage nach 24 h, $691 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ im Vergleich zu $410 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei einer Enzymbeladung von $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$. Nach 72 h enzymatischer Reaktion betragen die entsprechenden Glucosewerte $858 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $656 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Durch die Bestimmung einer mittleren Glucosefreisetzung aus allen betrachteten Vorlagekonzentrationen, konnte eine Erhöhung von 52 % nach 48 h und von 47 % nach 72 h Reaktionsdauer für eine Verdreifachung der Enzymkonzentration bestimmt werden.

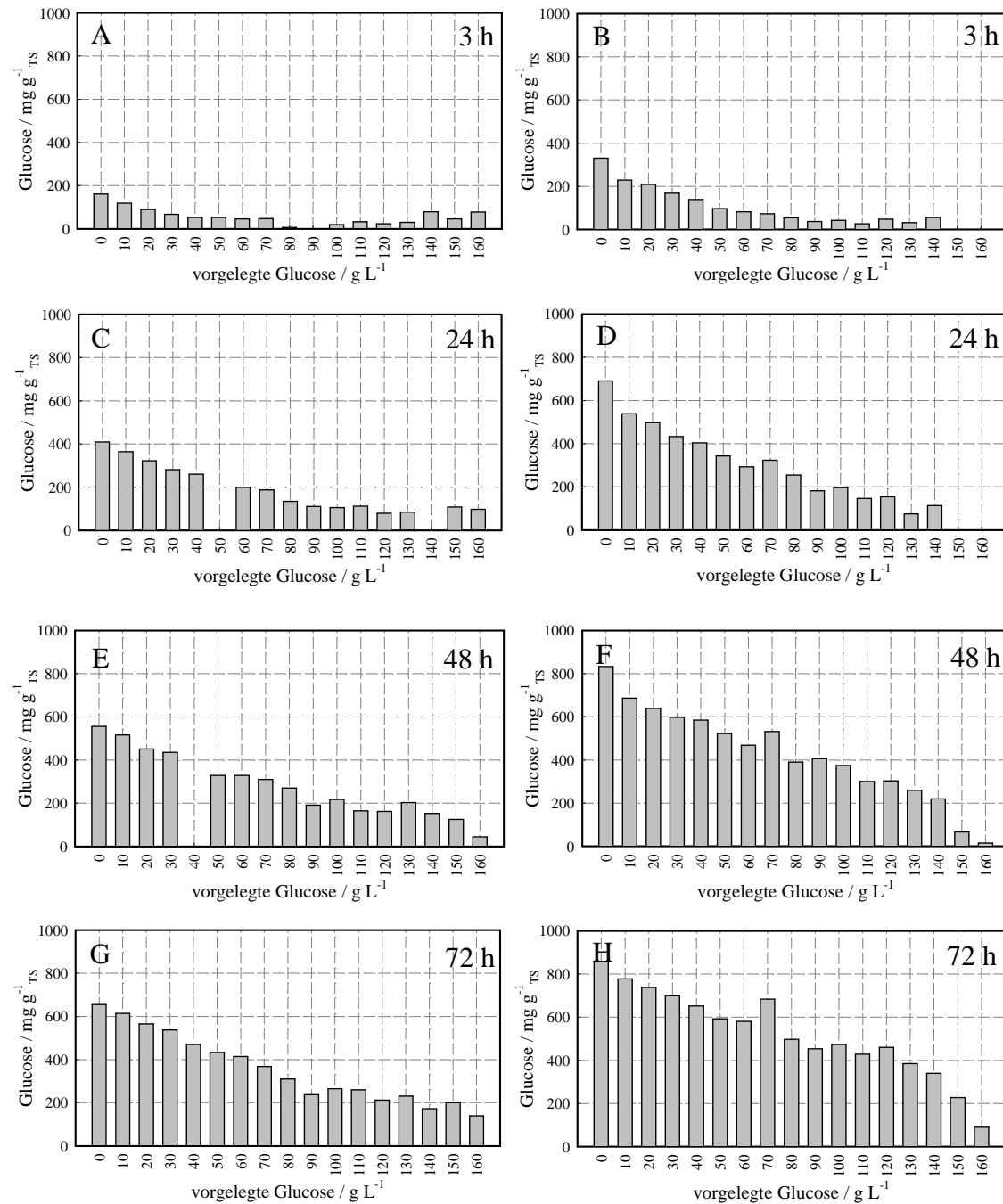


Abbildung 5.17: Glucosefreisetzung nach 3 h (A, B), 24 h (C, D), 48 h (E, F) und 72 h (G, H) enzymatischer Hydrolyse von 8 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose in Abhängigkeit der Konzentration an vorgelegter Glucose. Enzymbeladung: 15,0 mg_{Protein} g⁻¹ TS (A, C, E, G) und 45,0 mg_{Protein} g⁻¹ TS (B, D, F, H) „Celluclast“ mit jeweils 1,9 mg_{Protein} g⁻¹ TS und 5,7 mg_{Protein} g⁻¹ TS „Novozym 188“ ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 5,0, $n = 500\text{ min}^{-1}$).

5.5 Enzymatische Hydrolyse von Weizenstroh in Milliliter-Rührreaktoren

Die enzymatische Hydrolyse von Weizenstroh unterscheidet sich von mikrokristalliner Cellulose vor allem durch den heterogenen Aufbau des Pflanzenmaterials. Die angegebenen Monosaccharidfreisetzungen wurden jeweils auf das vorbehandelte Substrat bezogen.

5.5.1 Einfluss von pH und Temperatur

Umgebungsfaktoren wie die Reaktionstemperatur und der pH der Weizenstros suspension sollten die enzymatische Hydrolyse wesentlich beeinflussen. Der Effekt des pH und der Temperatur könnte zudem vom Enzympräparat abhängen, weshalb im Folgenden zwei unterschiedliche Enzympräparate, „Celluclast“ und „Accellerase 1500“, untersucht werden. Die Beladung mit den beiden Enzympräparaten betrug $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$. Die Beladung mit dem β -Glucosidasepräparat „Novozym 188“ lag jeweils bei $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$. Die Reaktionstemperatur betrug $50 \text{ }^\circ\text{C}$ oder $60 \text{ }^\circ\text{C}$, wobei der pH zwischen pH 3,5 und pH 5,0 bei einem Feststoffanteil von 8 % (w/w TS) variiert wurde.

Einfluss der Temperatur

Die anteilige Freisetzung von Glucosemonomeren aus vorbehandeltem Weizenstroh (1 % v/v H_2SO_4 , $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 0,5 h) nahm mit fortschreitender Reaktionsdauer zu. Diese Beobachtung war unabhängig vom betrachteten Enzympräparat, wobei die Glucosefreisetzung in der zweiten Hälfte der Reaktion jeweils geringer war als zu Beginn der enzymatischen Hydrolyse, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit abnahm. Wie aus Abbildung 5.18A ersichtlich, wurden die höchsten Glucosefreisetzungen mit $456 \pm 30 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei einer Reaktionstemperatur von $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und dem Enzympräparat „Celluclast“ erreicht. Bei Verwendung von „Accellerase 1500“ betrug die maximal gelöste Glucose $301 \pm 4 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$.

Eine Reaktionstemperatur von $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ist in Abbildung 5.18B veranschaulicht. Diese reduzierte die Glucosefreisetzung des 8-fach Parallelansatzes in Milliliter-Rührreaktoren auf $256 \pm 16 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei Verwendung des Enzympräparats „Celluclast“

und $212 \pm 12 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ beim Einsatz des Enzympräparats „Accellerase 1500“, weshalb im Folgenden eine Hydrolysetemperatur von $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ verwendet wurde.

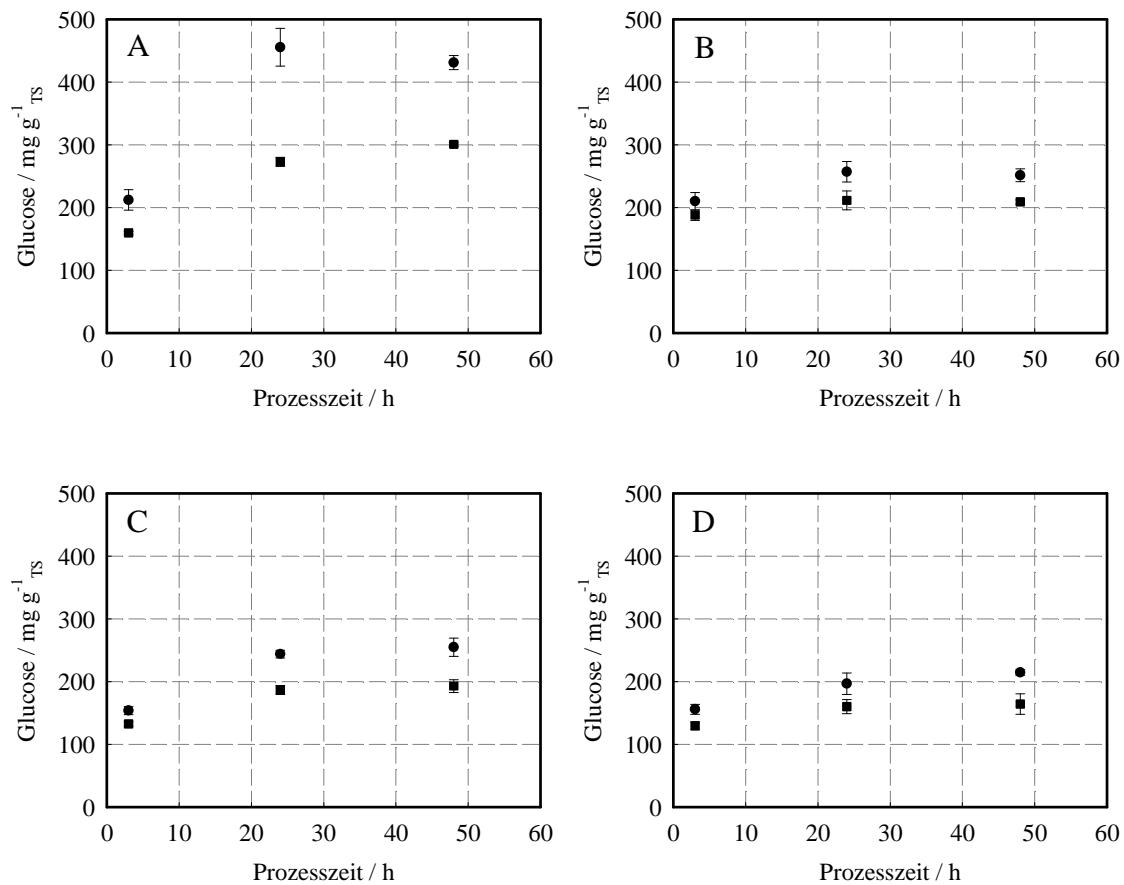


Abbildung 5.18: Enzymatische Hydrolyse von 8 % (w/w TS) vorbehandeltem Weizenstroh (1 % v/v H_2SO_4 , $135 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,5 h). Reaktionstemperatur $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (A) und $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (B) jeweils bei pH 5,0, pH 4,0 (C) und pH 3,5 (D) bei jeweils einer Reaktionstemperatur von $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Enzymbeladung $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Celluclast“ (●) und „Accellerase 1500“ (■) mit jeweils $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Novozym 188“. Die dargestellten Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus mindestens einem 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren ($n = 500 \text{ min}^{-1}$).

Einfluss des pH

Neben der Reaktionstemperatur ist der pH ein wesentlicher Prozessparameter enzymatischer Reaktionen. Wie in Abbildung 5.18A dargestellt, betrug die freigesetzte Glucose $456 \pm 30 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ nach 24 h Reaktionsdauer mit dem Enzympräparat „Celluclast“ bei einem pH von 5,0. Eine Erhöhung des pH auf 6,7 führte zu einer geringen Glucosefreisetzung von etwa $80 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ (Ergebnisse nicht dargestellt). Ein niedriger pH während der enzymatischen Hydrolyse von pH 4,0 und pH 3,5 führte, wie Abbildung 5.18C und Abbildung 5.18D aufzeigen, nach 48 h Reaktionsdauer zu einer

mittleren Glucosefreisetzung von $255 \pm 15 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $215 \pm 4 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ der 3-fach im Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren durchgeführten enzymatischen Hydrolyse. Der Einsatz des Enzympräparats „Accellerase 1500“ zeigte eine entsprechende Glucosefreisetzung von $193 \pm 10 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $164 \pm 16 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$.

Eine Reduzierung des pH der Weizenstrosuspension von pH 5,0 auf pH 4,0 und pH 3,5 verringerte die Glucosefreisetzung deutlich. Das Maximum an freigesetzter Glucose wurde, wie Abbildung 5.18A veranschaulicht, bei pH 5,0 mit $456 \pm 30 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für „Celluclast“ und $301 \pm 4 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für „Accellerase 1500“ als untersuchtes Enzympräparat erzielt. Es wurde im Folgenden ein pH von 5,0 bei einer Reaktionstemperatur von $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ verwendet.

5.5.2 Substratzusammensetzung, Partikelgröße und Feststoffgehalt

Die Substratzusammensetzung, die Partikelgröße und der Feststoffgehalt der Suspension von Weizenstrohfasern sind einflussnehmende Größen, die im Folgenden quantifiziert werden.

Substratzusammensetzung

Im Vergleich zu mikrokristalliner Cellulose, die ausschließlich aus Cellulose besteht, besitzen natürliche Substrate eine komplexe Zusammensetzung. Neben Cellulose sind Hemicellulose und Lignin als Hauptkomponenten im Weizenstroh enthalten.

Die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen ist in Abbildung 5.19 dargestellt. Das Weizenstroh bestand danach aus (w/w TS) $37,8 \pm 3,5 \%$ Glucan, $22,3 \pm 3,7 \%$ Xylan, $2,2 \pm 0,5 \%$ Arabinan, $1,5 \pm 0,3 \%$ Acetat, $20,5 \pm 0,8 \%$ Lignin und $5,7 \pm 0,3 \%$ Asche. Das Lignin enthält einen säurelöslichen Anteil von etwa $1,2 \pm 0,1 \%$ und einen säureunlöslichen Anteil von $19,3 \pm 0,7 \%$.

Generell war es möglich, die Substratzusammensetzung durch eine Vorbehandlung zu verändern. Nach Gleichung 3-38 können die Vorbehandlungsverfahren einer Kennzahl entsprechend bewertet werden. Bei einer Temperatur von $140 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und einer Verweildauer von 3 h beträgt die Kennzahl $\log(R_o) = 3,4$. Für ein thermisches Aufschlussverfahren bei $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$ für 1 h ist $\log(R_o) = 3,5$.

Thermische Vorbehandlungsmethoden erhöhten den Glucananteil im Substrat, wie Abbildung 5.19 zeigt. Der Xylangehalt nahm dabei etwas ab. Nach 3 h bei einer Temperatur von 140 °C betrug der Glucananteil der Weizenstrohfaser 43,1 ± 4,7 %, während ein Xylananteil von 16,5 ± 0,3 % und das Lignin zu 19,5 ± 0,4 % enthalten war. Der Ligninanteil war nahezu konstant geblieben. Der Anteil an Xylan wurde jedoch merklich reduziert. Arabinan war nicht nachweisbar. Der Acetatgehalt des thermisch behandelten Weizenstrohs betrug 1,2 ± 0,1 %. Der relative Aschegehalt wurde mit 3,3 ± 0,1 % bestimmt. Bei einer Vorbehandlungstemperatur von 160 °C und gleichzeitiger Verkürzung der Verweildauer auf 1 h, erhöhte sich der Glucananteil weiter auf 43,7 ± 4,8 %. Der Xylangehalt verharrte allerdings auf hohem Niveau von 20,6 ± 0,3 %. Der Arabinangehalt betrug weiter 1,6 ± 0,1 %, während der Ligningehalt auf 16,2 ± 0,4 % abnahm. Acetat wurde mit 1,4 ± 0,2 % und Asche mit 5,0 ± 0,4 % bestimmt.

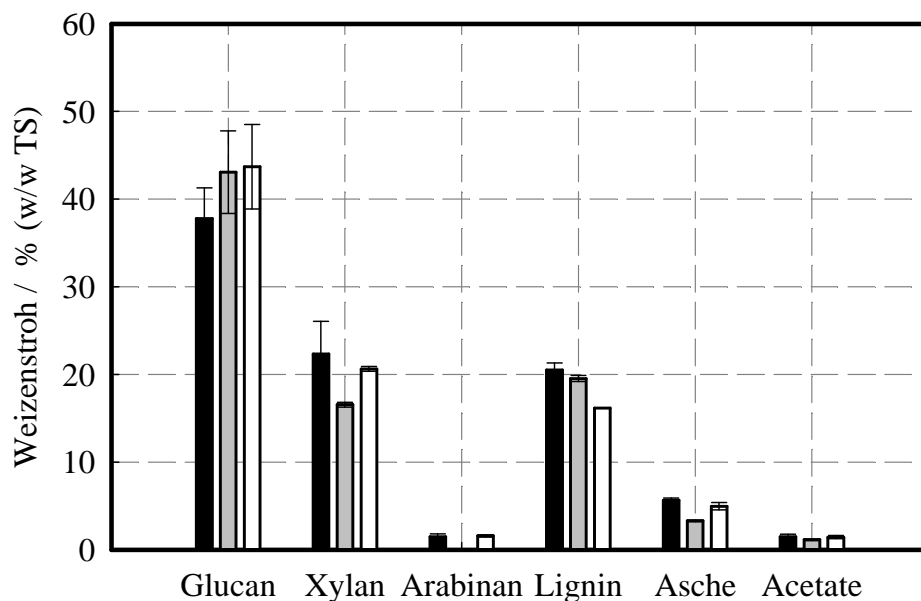


Abbildung 5.19: Bestimmung der Zusammensetzung von Weizenstroh nach der Methode von Sluiter *et al.* (2008). Für gemahlenes Weizenstroh ($< 2\text{ mm}</math>, ■) und hydrothermisch vorbehandeltes Weizenstroh (140 °C, 3 h (□) und 160 °C, 1 h (□)). Die dargestellten Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus einem 3-fach Ansatz.$

Partikelgröße

Wird Weizenstroh zur enzymatischen Hydrolyse eingesetzt, so ist die Zerkleinerung des Substrates ein wichtiger Kostenfaktor. Der Einfluss der Zerkleinerung von Weizenstrohfasern soll nachfolgend bei einem Feststoffanteil von 8 % (w/w TS) untersucht werden.

In Abbildung 5.20A ist die anteilige Glucosefreisetzung aus thermisch vorbehandeltem Weizenstroh (135 °C, 1 h) für zwei unterschiedliche Partikelgrößenverteilungen bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C und einem pH von 5,0 dargestellt. Neben einer Weizenstrohfraction mit Partikel von bis zu 2 mm Länge, ist eine Weizenstrohfraction mit einer Partikelgröße von kleiner 200 µm über eine Reaktionsdauer von 48 h in Abbildung 5.20 dargestellt. Die 10-fach im Parallelansatz mit einer Enzymbeladung von 15,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} und 1,9 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} für „Celluclast“ und „Novozym 188“ durchgeführte Reaktion zeigte eine maximale Glucosefreisetzung nach 48 h von 128 ± 8 mg g⁻¹_{TS} für die fein gemahlene Weizenstrohfraction (< 200 µm). Wurde die maximale Faserlänge des Weizenstrohs um das 10-fache erhöht (< 2 mm), sank die freigesetzte Glucose auf 93 ± 17 mg g⁻¹_{TS} ab. Größtenteils verläuft die Glucosefreisetzung während den ersten 9 h der betrachteten Reaktionsdauer. Die freigesetzte Glucose betrug 97 ± 5 mg g⁻¹_{TS} und bei der grobfasrigen Fraction 77 ± 4 mg g⁻¹_{TS}.

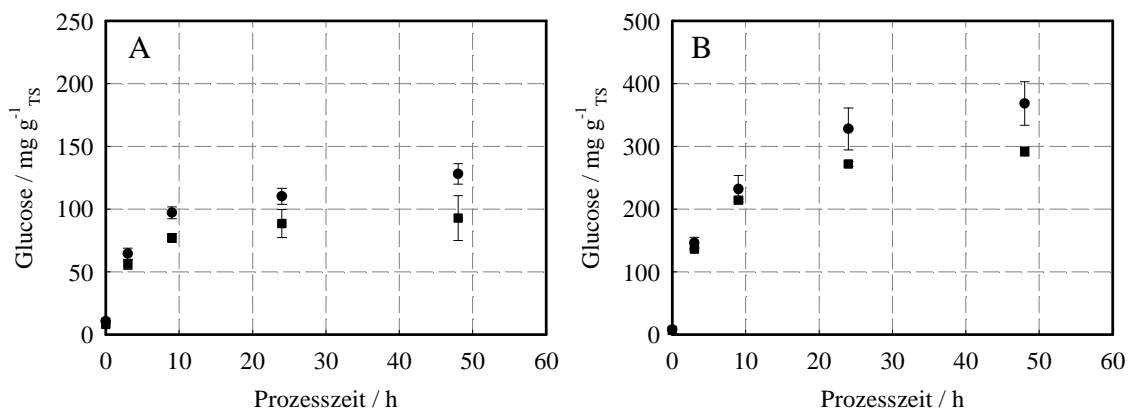


Abbildung 5.20: Einfluss der Partikelgröße kleiner 200 µm (●) und kleiner 2 mm (■) auf die Freisetzung von Glucose aus hydrothermisch (135 °C, 1 h) (A) und sauer (1 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) (B) vorbehandeltem Weizenstroh (8 % w/w TS, Enzymbeladung: 15,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} „Celluclast“ und 1,9 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} „Novozym 188“, T = 50 °C, pH 5,0, n = 200 min⁻¹). Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus einem 10-fach (A) und 4-fach (B) Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

Analog zu einer hydrothermischen Substratvorbehandlung ist in Abbildung 5.20B die Glucosemenge nach der enzymatischen Hydrolyse eines mit 1 % (v/v) Schwefelsäure (H₂SO₄) angesäuerten Aufschlussverfahrens aus einem 4-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren dargestellt. Mit fortschreitender Reaktionsdauer war ein Anstieg der Glucosekonzentration auf maximal $32 \pm 3 \text{ g L}^{-1}$ für die feingemahlene Weizenstrohfraction (< 200 μm) ersichtlich. Die erreichte Glucosefreisetzung aus dem Substrat betrug $368 \pm 35 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Die gröbere Weizenstrohfraction (< 2 mm) erreichte eine Glucosekonzentration von $25 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$ und eine entsprechende Glucosefreisetzung von $292 \pm 7 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Es konnte somit von einem signifikanten Einfluss der Partikelgröße ausgegangen werden. Trotzdem konnten auch mit grobfasrigem Weizenstroh hohe Glucosefreisetzungen erreicht werden, so dass weitergehende Untersuchungen der enzymatischen Hydrolyse in Milliliter-Rührreaktoren mit groben Feststoffpartikeln durchgeführt wurden.

Feststoffanteil

Wird nun das gemahlene Weizenstroh (< 2 mm) zur Bewertung des Feststoffanteils einer Suspension in unbewehrte Milliliter-Rührreaktoren eingewogen, so kann ein linearer Zusammenhang zwischen der jeweiligen Flüssigkeitssäule über den Weizenstrohfäsern und dem Füllstand vom Feststoffanteil grobfasriger Weizenstrohpartikel ermittelt werden (Abbildung 5.21A und Abbildung 5.21B). Bei einem Weizenstrohanteil von 10 % (w/w TS) war nahezu kein Flüssigkeitsüberstand auf den Feststofffasern messbar. Durch die Extrapolation der Geraden ergibt sich ein maximaler Feststoffanteil von 11 % (w/w TS) als Grenzzustand zwischen einer Suspension in welcher die Feststoffe in flüssiger Phase dispergiert sind und einem Haufwerk aus feuchten Partikeln.

Einfluss der festen Phase auf die Glucoseproduktion

Der Einfluss des Feststoffanteils auf die Bildung von Glucose ist in Abbildung 5.21C für thermisch vorbehandeltes Weizenstroh (< 2 mm, 140 °C, 3 h) in jeweils acht Milliliter-Rührreaktoren im Parallelansatz dargestellt. Die Beladung mit dem Cellulasepräparat „Celluclast“ betrug $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$. Die Beladung mit dem β -Glucosidasepräparat „Novozym 188“ lag bei $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$.

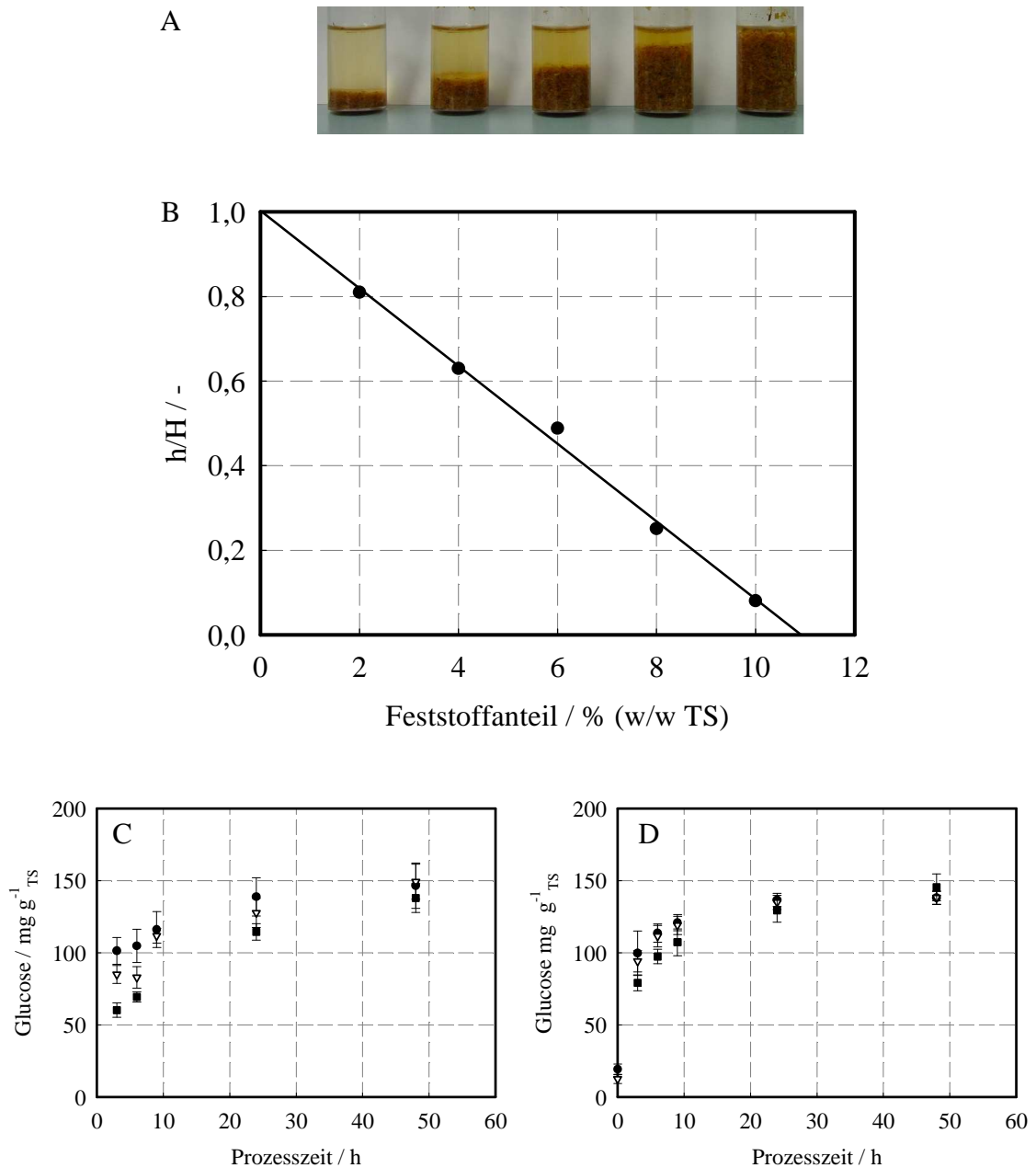


Abbildung 5.21: Weizenstrohsuspension mit 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 % (w/w TS) (A). Quotient der Höhe der Flüssigkeitssäule (h) und der Gesamthöhe der Suspension (H) in Abhängigkeit vom Feststoffanteil (B). Enzymatische Hydrolyse von 4 % (●), 8 % (▽) und 10 % (w/w TS) (■) hydrothermisch vorbehandelten Weizenstrohs (140 °C, 3 h, (C) und 160 °C, 1 h, (D)) zu Glucose. Enzymbeladung: 15,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} „Celluclast“ und 1,9 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} „Novozym 188“, $T = 50$ °C, pH 5,0, $n = 200$ min⁻¹. Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus einem 8-fach (C) und 10-fach (D) Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

Eine deutliche Abhängigkeit vom Feststoffanteil war besonders während den ersten 24 h der enzymatischen Hydrolyse zu erkennen. Die Ausbeuten nach 3 h und 6 h zeigten erkennbare Unterschiede in der generierten Glucose entsprechend der Feststoffanteile an vorbehandeltem Weizenstroh auf. Je niedriger der Feststoffanteil, desto höher die Glucoseausbeute. So differiert die gebildete Glucose nach 3 h zwischen $60 \pm 5 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für 10 % (w/w TS) und $101 \pm 9 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für 4 % (w/w TS). Nach 48 h enzymatischer Reaktion betragen die ermittelten Glucosewerte von den untersuchten Feststoffanteilen 4 %, 8 % und 10 % (w/w TS) $138 \pm 10 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bis $149 \pm 12 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und unterscheiden sich somit nur geringfügig voneinander.

Wird die thermische Vorbehandlung von Weizenstroh mit reduzierter Vorbehandlungsdauer (1 h) und erhöhter Temperatur ($160 \text{ }^{\circ}\text{C}$) hinsichtlich der Glucoseproduktion in Abbildung 5.21D betrachtet, so konnte eine maximale Glucosefreisetzung von $145 \pm 9 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für 10 % (w/w TS) aus zehn Milliliter-Rührreaktoren im Parallelansatz erreicht werden. Auffällig im Vergleich zu Abbildung 5.21C bei einer Reaktionstemperatur von $140 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ist, dass nahezu keine Unterschiede in der gebildeten Glucose zwischen Ansätzen verschiedenen Feststoffgehalts existieren. Anstelle von $60 \pm 5 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ wurden bei einem Feststoffanteil von 10 % (w/w TS) in den ersten 3 h der Reaktion $79 \pm 6 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose gelöst. Nach 48 h Reaktionsdauer betragen die Glucosefreisetzungen $138 \pm 10 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bis $145 \pm 9 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und sind nahezu identisch mit der gebildeten Glucose bei einer Vorbehandlung von $140 \text{ }^{\circ}\text{C}$ für 3 h. Die maximale Glucosekonzentration wurde bei einem Feststoffanteil von 10 % (w/w TS) gemessen und betrug $16 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$. Signifikante Konzentrationen von Milchsäure oder eine Veränderung der Acetatkonzentration wurden nicht beobachtet.

Aktivität hydrolytischer Enzyme während der Reaktion

Um den Verlauf der enzymatischen Hydrolyse und der Glucosefreisetzung zu bewerten, ist das Aktivitätsverhalten der hydrolytischen Enzyme während der Reaktion im wässrigen Milieu wichtig. Die Aktivität der Enzymstammlösungen ergab eine Filterpapieraktivität von $0,8 \text{ FPU mg}^{-1}_{\text{Protein}}$ und eine Cellobiaseaktivität von 19 CBU mL^{-1} , wobei die Stammlösung von „Celluclast“ $139 \text{ g}_{\text{Protein}} \text{ L}^{-1}$ enthielt. Für „Novozym 188“ betrug die Cellobiaseaktivität 1105 CBU mL^{-1} , bei einer Proteinkonzentration von $120 \text{ g}_{\text{Protein}} \text{ L}^{-1}$. Die Beladung des hydrothermisch behandelten

Weizenstrohs mit „Celluclast“ betrug $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$. Die Beladung mit „Novozym 188“ lag bei $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$.

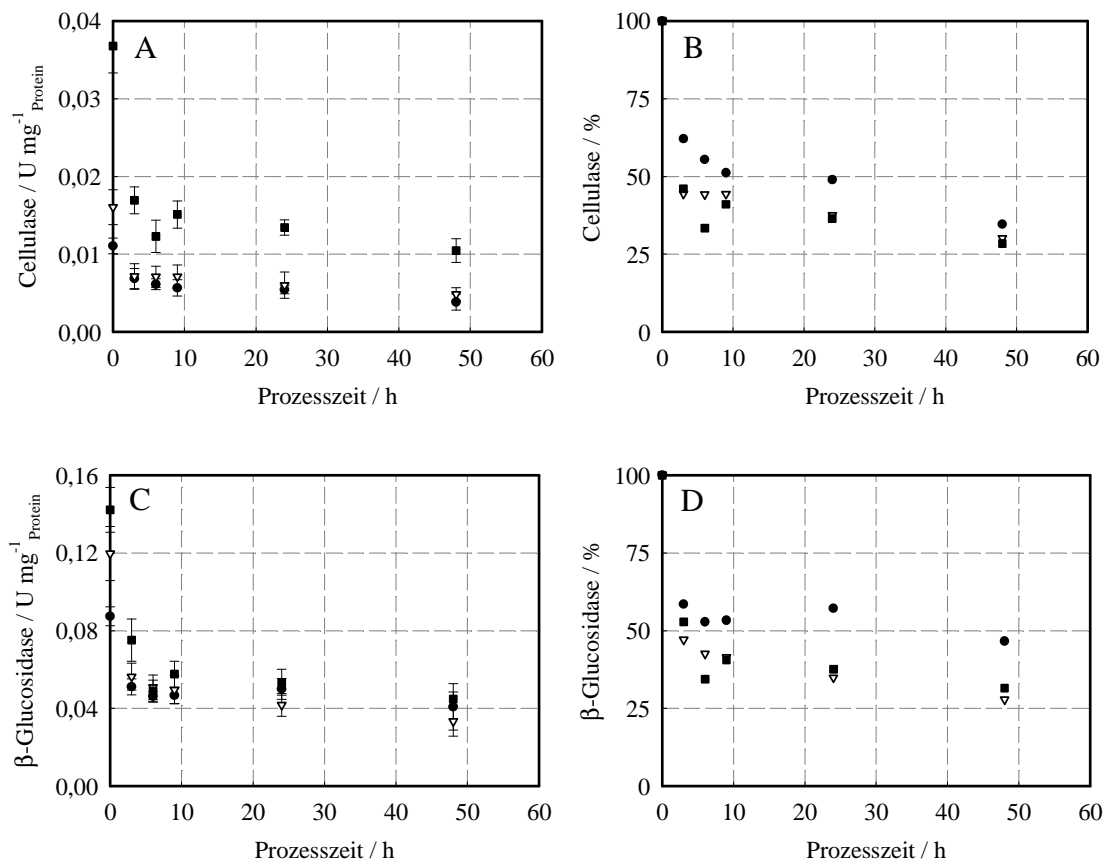


Abbildung 5.22: Enzymatische Aktivität der Suspensionslösung während der Reaktion hinsichtlich der Substrate p-Nitrophenyl-Cellobiosid (A, B) und p-Nitrophenyl-Glucosid (C, D) nach Wood und Bhat (1988). Die Proteinkonzentration wurde mit der Pierce-BCA-Methode bestimmt. Aktivitäten bei verschiedenen Feststoffanteilen an hydrothermisch ($160 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h) vorbehandeltem Weizenroh 4 % (●), 8 % (▽) und 10 % (w/w TS) (■) (A, C). Entsprechend auf die Aktivität zu Beginn der Reaktion normierte relative Aktivitäten (B, D). Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus einem 10-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

In Abbildung 5.22 ist die Aktivität hydrolytisch wirksamer Enzyme aus der Flüssigphase der Weizenstrohsuspension ($160 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h) ersichtlich. Die Enzymaktivität bezüglich der synthetischen Substrate p-Nitrophenyl-Cellobiosid ist in Abbildung 5.22A und Abbildung 5.22B und für p-Nitrophenyl-Glucosid in Abbildung 5.22C und Abbildung 5.22D dargestellt. Die proteinspezifische Aktivität zeigte zu Beginn der Reaktion den jeweils höchsten Wert. Anschließend nahm die Aktivität deutlich ab. Auffällig ist, dass bei hohem Feststoffanteil von 10 % (w/w TS) auch die höchsten spezifischen Aktivitäten gemessen wurden. Diese betragen zu Beginn

$0,037 \pm 0,004 \text{ U mg}^{-1}_{\text{Protein}}$ p-Nitrophenyl-Cellobiosid (Abbildung 5.22A) und $0,142 \pm 0,012 \text{ U mg}^{-1}_{\text{Protein}}$ p-Nitrophenyl-Glucosid (Abbildung 5.22C). Im zeitlichen Verlauf der Reaktion waren die Enzymaktivitäten in den Ansätzen mit hohem Feststoffanteil (10 % w/w TS) höher als bei geringem Feststoffanteil (4 % w/w TS). Die Unterschiede waren jedoch geringer und wie aus Abbildung 5.22C ersichtlich für die Glucosidaseaktivität innerhalb einer Standardabweichung der im 10-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren durchgeführten enzymatischen Reaktion. In einer auf den Anfangswert normierten Darstellung der Aktivitäten konnte eine abnehmende Enzymaktivität hinsichtlich der beiden synthetischen Substrate auf etwa 30 % nach 48 h registriert werden. Wie Abbildung 5.22B und Abbildung 5.22D veranschaulichen, war die relative enzymatische Aktivität für einen Feststoffanteil von 4 % (w/w TS) am höchsten. Die β -Glucosidaseaktivität aus Abbildung 5.22D nach 48 h Hydrolysedauer betrug anstelle von 30 % nun 47 %.

5.5.3 Substratvorbehandlung

Die Vorbehandlung hat Einfluss auf die Zusammensetzung des Weizenstrohs und könnte die Monosaccharidausbeute während der enzymatischen Hydrolyse beeinflussen. Aus diesem Grund wurden verschiedene Vorbehandlungsmethoden hinsichtlich der enzymatischen Glucose- und Xylosetreisetzung aus Weizenstroh in Milliliter-Rührreaktoren evaluiert (Abbildung 5.23). Neben hydrothermischen Vorbehandlungsverfahren sind chemisch-thermische Kombinationsverfahren der Substratvorbehandlung veranschaulicht. Die Beladung mit dem Enzympräparat „Celluclast“ betrug $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$. Die Beladung mit „Novozym 188“ lag jeweils bei $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$. Der Feststoffanteil betrug stets 8 % (w/w TS).

Glucose als Produkt

Die Menge gebildeter Glucose ist abhängig von der gewählten Vorbehandlungsmethode. Durch eine Vorbehandlung im sauren Milieu (3 % v/v H_2SO_4 , 135 °C, 0,5 h) und anschließender enzymatischer Hydrolyse wurde wie in Abbildung 5.23F veranschaulicht, eine mittlere Glucosefreisetzung von $460 \pm 28 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ mit einem 10-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren erreicht. Dabei zeigten die Weizenstrohsubstrate aus einer Vorbehandlung mit verdünnter Schwefelsäure

(1,0 % v/v H₂SO₄, 10 % w/w TS und 3,0 % v/v H₂SO₄, 30 % w/w TS) einen vergleichbaren Verlauf der enzymatischen Glucosefreisetzung auf (Abbildung 5.23E und Abbildung 5.23F). Da die Konzentration der festen Phase während der Vorbehandlung mit Schwefelsäure (3 % v/v) von 10 % auf 30 % (w/w TS) erhöht wurde, ist die Säurekonzentration hinsichtlich des Weizenstrohs konstant geblieben, was einen vergleichbaren Verlauf der Glucosefreisetzung während der enzymatischen Hydrolyse verständlich erscheinen und einen geringen Einfluss des Feststoffanteils während der Vorbehandlung vermuten lässt.

Der Glucoseverlauf in Abbildung 5.23D unterscheidet sich durch die Reduzierung des Schwefelsäureanteils auf 0,5 % (v/v) deutlich vom Ansatz mit 1 % (v/v) Schwefelsäure und war gekennzeichnet durch eine verlangsamte Glucosefreisetzung. So betrug die erzeugte Glucose, wie Abbildung 5.23D zeigt, nach 24 h $322 \pm 33 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Nach 48 h enzymatischer Hydrolyse wurde eine Glucosefreisetzung von $405 \pm 35 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ erreicht. Im Gegensatz dazu konnten, wie in Abbildung 5.23E verdeutlicht, bei Verwendung von Schwefelsäure (1 % v/v) $456 \pm 30 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose nach 24 h gebildet werden. Dies entspricht einer Glucosekonzentration von $40 \pm 3 \text{ g L}^{-1}$. Nach den sauren Vorbehandlungsmethoden führte, wie Abbildung 5.23 zeigt, das alkalische Verfahren zu hohen Glucoseausbeuten von bis zu $321 \pm 23 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Hydrothermische Methoden waren weniger effektiv, jedoch weisen diese eine hohe Abhängigkeit von der gewählten Reaktionstemperatur auf. Die erzeugte Glucose betrug demnach $93 \pm 18 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $243 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für eine Vorbehandlungstemperatur von 135 °C, dargestellt in Abbildung 5.23A und 190 °C dargestellt in Abbildung 5.23B. Die hohen Glucosefreisetzungen nach erfolgter saurer Vorbehandlung beruhen auch auf der Tatsache, dass während dem Aufschlussverfahren bereits hohe Mengen von Xylose freigesetzt wurden ($\approx 264 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$), während Glucose kaum gelöst wurde ($\approx 28 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$, siehe Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Freisetzung von Glucose und Xylose während der Substratvorbehandlung aus einem 4-fach Ansatz.

| Vorbehandlung | Glucose / $\text{mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ | Xylose / $\text{mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ |
|--|--|---|
| 0,5 % v/v H ₂ SO ₄ , 135 °C, 0,5 h | $27,8 \pm 3,1$ | $263,6 \pm 13,9$ |
| 0,1 g g ⁻¹ Ca(OH) ₂ , 135 °C, 1 h | $4,0 \pm 0,2$ | $2,4 \pm 0,2$ |

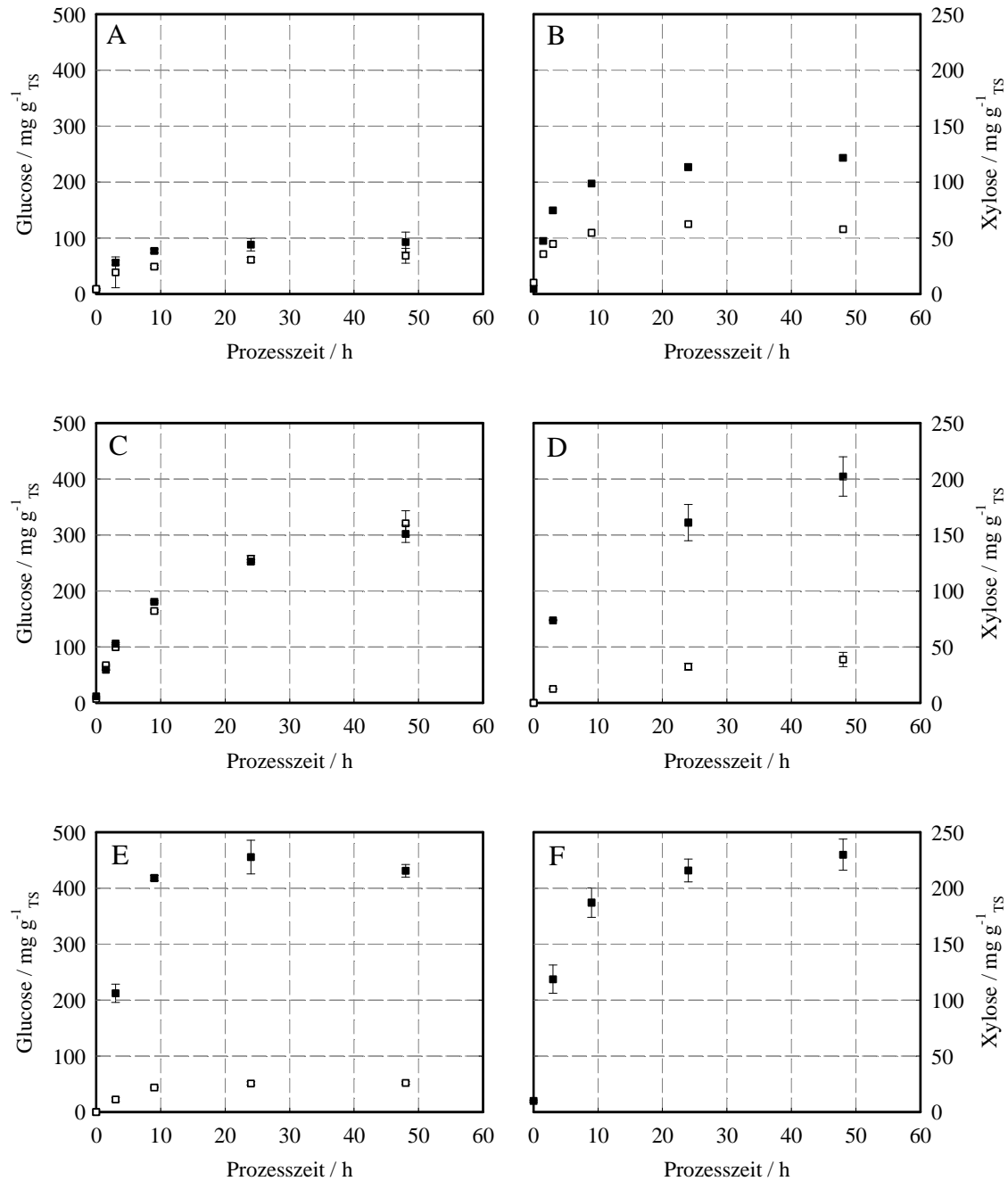


Abbildung 5.23: Einfluss der Vorbehandlung von Weizenstroh auf die Produktbildung von Glucose (■) und Xylose (□). Vorbehandlungsmethoden: Hydrothermische (135 °C, 1 h, (A)) 190 °C, 10 min (B), alkalische (0,1 g g⁻¹ Ca(OH)₂, 135 °C, 1 h, (C)) und saure Vorbehandlungen (0,5 %, 1 % und 3 % (v/v) H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h (D, E, F)). Feststoffanteil: 8 % w/w TS, Enzymbeladung: 15,0 mg_{Protein} g⁻¹ TS „Celluclast“ und 1,9 mg_{Protein} g⁻¹ TS „Novozym 188“, $T = 50$ °C, pH 5,0, $n = 500$ min⁻¹. Die dargestellten Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus mindestens einem 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

Xylose als Produkt

Eine geringe Freisetzung von $4,0 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose und $2,4 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Xylose wurde hingegen für die alkalische Vorbehandlungsmethode beobachtet (Tabelle 5.2). Deutlich unterschiedliche Konzentrationsprofile ergaben sich folgedessen während der enzymatischen Hydrolyse für Xylose. Die höchsten Werte an Xylose sind für die gewählte alkalische Vorbehandlungsmethode in Abbildung 5.23C ersichtlich. Xylose konnte mit $151 \pm 8 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ aus dem vorbehandelten Substrat gelöst werden. Alle anderen untersuchten Methoden der Weizenstrohvorbehandlung zeigten deutlich geringere Freisetzungen von Xylose, wobei die hydrothermische Methode bei einer Reaktionstemperatur von $190 \text{ }^{\circ}\text{C}$ mit etwa $62 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ höhere Ausbeuten aufwies als bei $135 \text{ }^{\circ}\text{C}$ mit $34 \pm 7 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Xylose (Abbildung 5.23B und Abbildung 5.23A). Weizenstroh nach einer Säurevorbehandlung besaß nur eine geringe Restmenge an Xylose, da der Großteil während der Vorbehandlung bereits herausgelöst wurde ($\approx 264 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$, Tabelle 5.2).

Die maximal erzeugten Xylosetreisetzungen betragen $26 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei Vorbehandlung mit 1 % (v/v) Schwefelsäure und $39 \pm 6 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ mit 0,5 % (v/v) Schwefelsäure (Abbildung 5.23E und Abbildung 5.23D). In den Ansätzen mit einer Vorbehandlung durch 3 % (v/v) Schwefelsäure konnte keine Xylose während der enzymatischen Hydrolyse detektiert werden.

5.5.4 Enzymkonzentration und Produktinhibierung

Die zu einer Suspension mit vorbehandeltem Weizenstroh zugegebene Enzymmenge könnte die Freisetzung von Zuckermonomeren beeinflussen. Um diesen Einfluss hinsichtlich der gebildeten Glucose zu quantifizieren und eine mögliche Inhibierung der Reaktion durch das Produkt Glucose während der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandeltem Weizenstroh zu untersuchen, wurden unterschiedliche Enzymbeladungen des Enzympräparats „Celluclast“ und verschiedene Konzentrationen an vorgelegter Glucose im Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren für 8 % (w/w TS) Weizenstroh evaluiert.

Einfluss der Enzymkonzentration

In Abbildung 5.24 ist die freigesetzte Glucose nach 24 h und 48 h enzymatischer Hydrolyse bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C und einem pH von 5,0 für säurevorbehandeltes Weizenstroh (1 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) dargestellt.

Innerhalb der ersten 24 h enzymatischer Umsetzung wurden $187 \pm 8 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$, $241 \pm 6 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$, $456 \pm 30 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $510 \pm 32 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose für eine ansteigende Enzymbeladung an „Celluclast“ von $3,0 \text{ mg}_{\text{Protein g}^{-1}_{\text{TS}}}$, $7,0 \text{ mg}_{\text{Protein g}^{-1}_{\text{TS}}}$, $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein g}^{-1}_{\text{TS}}}$ und $30,0 \text{ mg}_{\text{Protein g}^{-1}_{\text{TS}}}$ freigesetzt. In den folgenden 24 h enzymatischer Reaktion nahm die weitere Glucosefreisetzung in allen Ansätzen deutlich ab (Abbildung 5.24). Die im 8-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren mit einer Enzymbeladung von $30,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ erhaltene maximale Glucosefreisetzung betrug $546 \pm 24 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei einer Glucosekonzentration von $47 \pm 2 \text{ g L}^{-1}$.

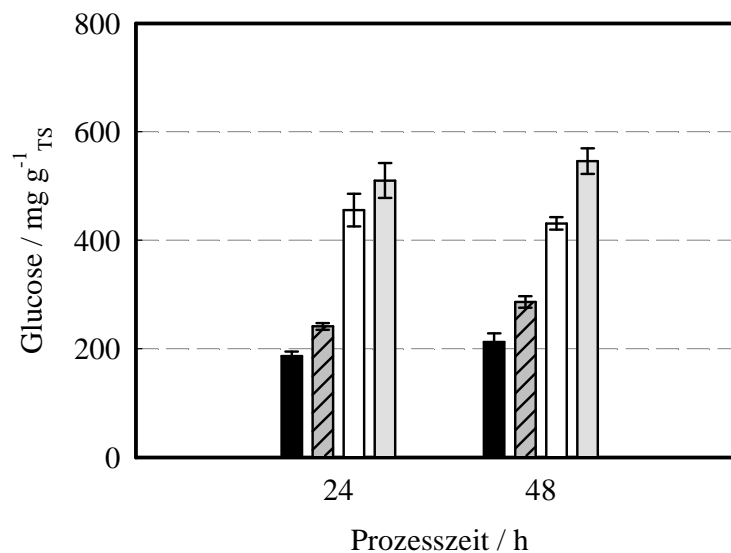


Abbildung 5.24: Einfluss der Enzymbeladung von 8 % (w/w TS) Weizenstroh (1 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) auf die Produktbildung von Glucose nach 24 h und 48 h enzymatischer Hydrolyse bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C und einem pH der Reaktionslösung von 5,0. Enzymbeladungen mit $3,0 \text{ mg}_{\text{Protein g}^{-1}_{\text{TS}}}$ (■), $7,0 \text{ mg}_{\text{Protein g}^{-1}_{\text{TS}}}$ (▨), $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein g}^{-1}_{\text{TS}}}$ (□), $30,0 \text{ mg}_{\text{Protein g}^{-1}_{\text{TS}}}$ (◻) „Celluclast“ mit jeweils $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein g}^{-1}_{\text{TS}}}$ „Novozym 188“. Die dargestellten Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus mindestens 3-fach Parallelansätzen in Milliliter-Rührreaktoren ($n = 500 \text{ min}^{-1}$).

Produktinhibierung durch Glucose

Die freigesetzte Glucose nach 3 h, 24 h, 48 h und 72 h ist für eine säurevorbehandelte Weizenstros suspension (1 % v/v H_2SO_4 , 135 °C, 0,5 h) mit 8 % (w/w TS) Feststoffanteil in Abhängigkeit der Konzentration an vorgelegter Glucose mit bis zu 160 g L^{-1} in Abbildung 5.25 veranschaulicht. Bei einer Enzymbeladung von $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Celluclast“ und $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Novozym 188“ wurden nach 72 h Reaktionsdauer $371 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose gebildet. Bei einer Enzymbeladung von $45,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Celluclast“ und $5,7 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Novozym 188“ wurden im gleichen Zeitraum $479 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose gebildet. Betrug die Glucosekonzentration der Suspension bereits zu Beginn der Reaktion 100 g L^{-1} , konnten im selben Zeitraum nur etwa $207 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose oder bei höherer Enzymkonzentration entsprechend $343 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose gebildet werden. Bei Zugabe von 160 g L^{-1} Glucose wurden nur $105 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $128 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose entsprechend der beiden Enzymbeladungen freigesetzt. Ein deutlicher Einfluss der Glucosekonzentration auf die enzymatische Freisetzung von Glucosemonomeren aus vorbehandelten Weizenstrohfaser n (1 % v/v H_2SO_4 , 135 °C, 0,5 h) ist somit erkennbar. Mit einer Verdreifachung der Enzymzugabe von $16,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ auf $50,7 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ war eine Erhöhung der Glucosekonzentration möglich. Durch die Bestimmung einer mittleren Glucosefreisetzung aus allen betrachteten Konzentrationen vorgelegter Glucose konnte ein Anstieg der Ausbeute von 37 % nach 48 h und 32 % nach 72 h Reaktionsdauer im Vergleich zu $16,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ beobachtet werden.

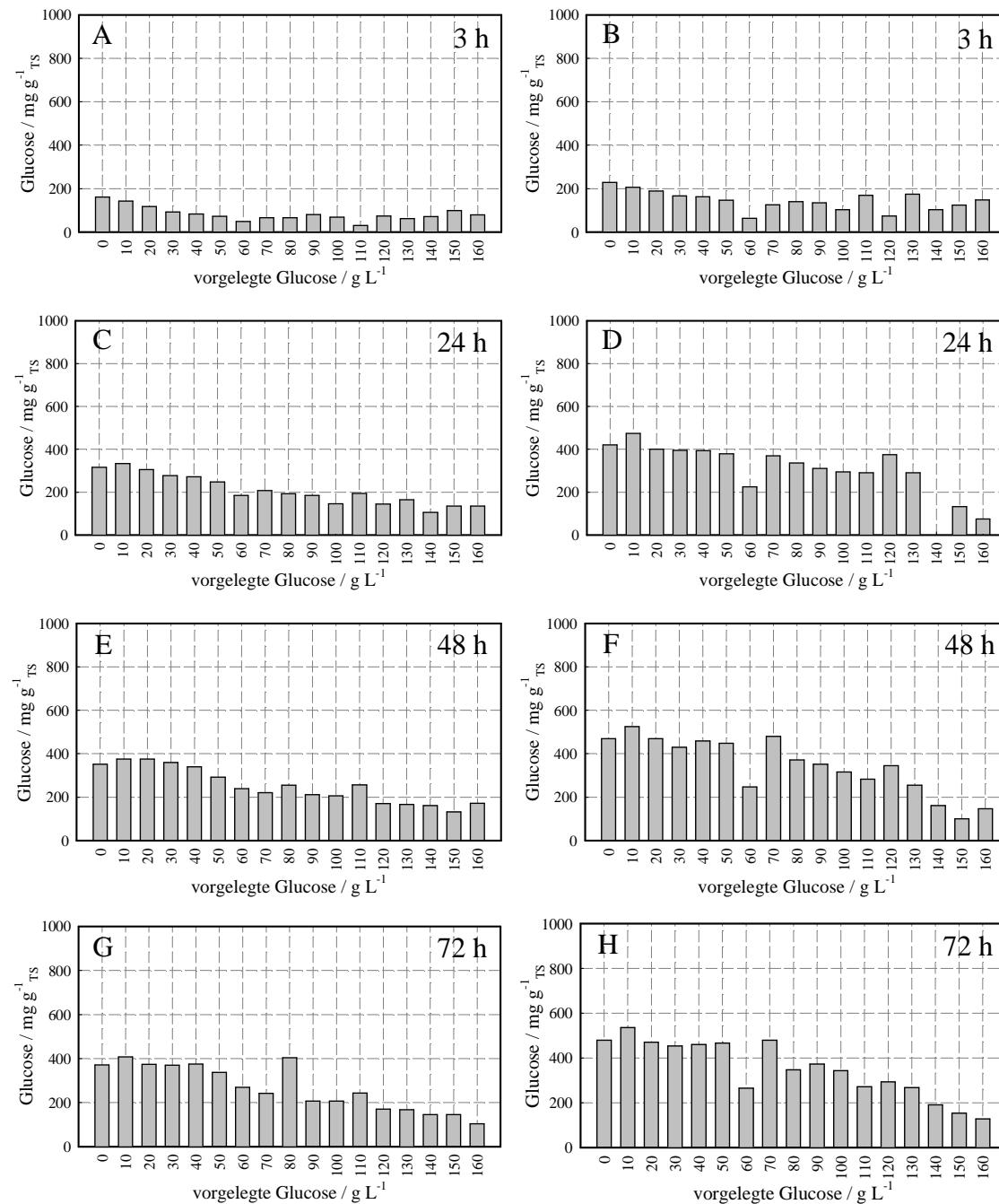


Abbildung 5.25: Glucosefreisetzung nach 3 h (A, B), 24 h (C, D), 48 h (E, F) und 72 h (G, H) enzymatischer Hydrolyse von 8 % (w/w TS) vorbehandeltem Weizenstroh (1 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) in Abhängigkeit der Konzentration an vorgelegter Glucose. Enzymbeladung: 15,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} (A, C, E, G) und 45,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} (B, D, F, H) „Celluclast“ mit jeweils 1,9 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} und 5,7 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} „Novozym 188“ ($T = 50\text{ °C}$, $\text{pH } 5,0$, $n = 500\text{ min}^{-1}$).

5.5.5 Mehrfache Enzymzugaben

Aufgrund der heterogenen Zusammensetzung von lignocellulosehaltigen Substraten ist es wahrscheinlich, dass die Bildung von Monosacchariden aus vorbehandeltem Weizenstroh vom verwendeten Enzympräparat abhängt. Um dies näher zu untersuchen, wurde der Einfluss von Hemicellulasepräparaten und weiteren kommerziellen Enzympräparaten auf die Freisetzung von Glucose- und Xylosemonomeren aus Weizenstrohfasern nach saurer oder alkalischer Vorbehandlung durch selektive Enzymzugaben untersucht. Des Weiteren wurden die Enzympräparate sequentiell zugegeben.

Selektive Enzymzugabe

In den Versuchen, dargestellt in den Abbildungen 5.26A bis 5.26I, wurde Weizenstroh, das zuvor mit Schwefelsäure (1 % v/v) für 0,5 h bei 135 °C behandelt wurde, einer selektiven enzymatischen Hydrolyse durch zeitlich getrennte Zugabe von verschiedenen Enzympräparaten unterworfen. Analog zu einer Substratvorbehandlung mit verdünnter Säure wurde in Abbildung 5.26J alkalisch vorbehandeltes Weizenstroh ($0,1 \text{ g g}^{-1} \text{ Ca(OH)}_2$, 135 °C, 1 h) bei einem Feststoffanteil von 8 % (w/w TS) verwendet. Dazu wurden zunächst drei verschiedene Enzympräparate mit hohem Anteil an Xylanasen mit einer Beladung von $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ verwendet. Nach 48 h wurden weitere Enzympräparate mit hohem Cellulaseanteil und das β -Glucosidasepräparat „Novozym 188“ mit einer jeweiligen Beladung von $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ für die Cellulasepräparate und $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ für das β -Glucosidasepräparat zugegeben. Die Reaktionstemperatur betrug 50 °C. Der pH lag bei 5,0. Die Versuche wurden im 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren durchgeführt.

Vorbehandlung mit Hemicellulasepräparaten

Während den ersten 48 h der enzymatisch hydrolytischen Reaktion zeigten die Weizenstrosuspensionen der Hemicellulasepräparate „Shearzyme“ und „Pulpzyme“ nur eine geringe Nebenproduktbildung an Glucose (Abbildung 5.26A und Abbildung 5.26B). Wie in Abbildung 5.26C veranschaulicht, führte die Verwendung des Enzympräparats „Vegazym HC“ jedoch zu einer erheblichen Produktivität von Glucose. $186 \pm 3 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose wurden innerhalb von 24 h gebildet. Nach 48 h betrug die

Glucosefreisetzung $206 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Durch die Zugabe von „Celluclast“ nach 48 h Reaktionsdauer wurde auch in den beiden anderen Reaktionssystemen vermehrt Glucose freigesetzt. Nach 96 h war in allen betrachteten Reaktionssystemen eine Glucosefreisetzung von $347 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bis $363 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ zu verzeichnen (Abbildung 5.26A bis Abbildung 5.26C). Ein merklicher Einfluss der verwendeten Hemicellulasen auf die Produktion von Glucose war nicht zu erkennen. Die Xylosefreisetzungen befanden sich zwischen $45 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $57 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Für weitergehende Charakterisierungen wurde das Enzympräparat „Shearzyme“ ausgewählt, da es wie Abbildung 5.26A verdeutlicht, nur eine geringe Glucosebildung während der ersten 48 h enzymatischer Hydrolyse zeigte.

Variation der zugegebenen Enzympräparate

Die Enzympräparate „Accellerase 1500“, „NS50012“, „NS22002“ sowie „Distizym Beta G“, „BG Super“ und „BG HK4“ (Abbildung 5.26D bis Abbildung 5.26I) zeigten nach deren Zugabe bei 48 h unterschiedliche Glucosefreisetzungen. So variierte diese nach 96 h Reaktionsdauer und es lagen Glucosemassen von $181 \pm 15 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei Verwendung von „NS50012“ und $391 \pm 15 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei Verwendung von „Accellerase 1500“ im 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren vor. Die Xylosefreisetzung erreichte ein Maximum von $73 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ beim Enzympräparat „Distizym Beta G“, was darauf hindeutet, dass dieses Enzympräparat einen höheren Anteil an Xylanasen und Xylosidasen enthält.

Neben einer sauren Vorbehandlung mit verdünnter Schwefelsäure (1 % v/v, $135 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,5 h) konnte das Substrat alkalisch mit Calciumhydroxid ($0,1 \text{ g g}^{-1}_{\text{TS}}$, $135 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h) vorbehandelt werden. Wie aus Abbildung 5.26J ersichtlich ist, konnten nach 48 h enzymatischer Umsetzung mit dem Enzympräparat „Shearzyme“ kaum monomere Glucosebausteine ($3,6 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$) detektiert werden. Die gebildete Xylose betrug $37 \pm 3 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Nach Zugabe des Enzympräparats „Celluclast“ erhöhte sich die gelöste Glucose aus einem 3-fach Parallelansatz auf $379 \pm 11 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und die Xylose auf $164 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$.

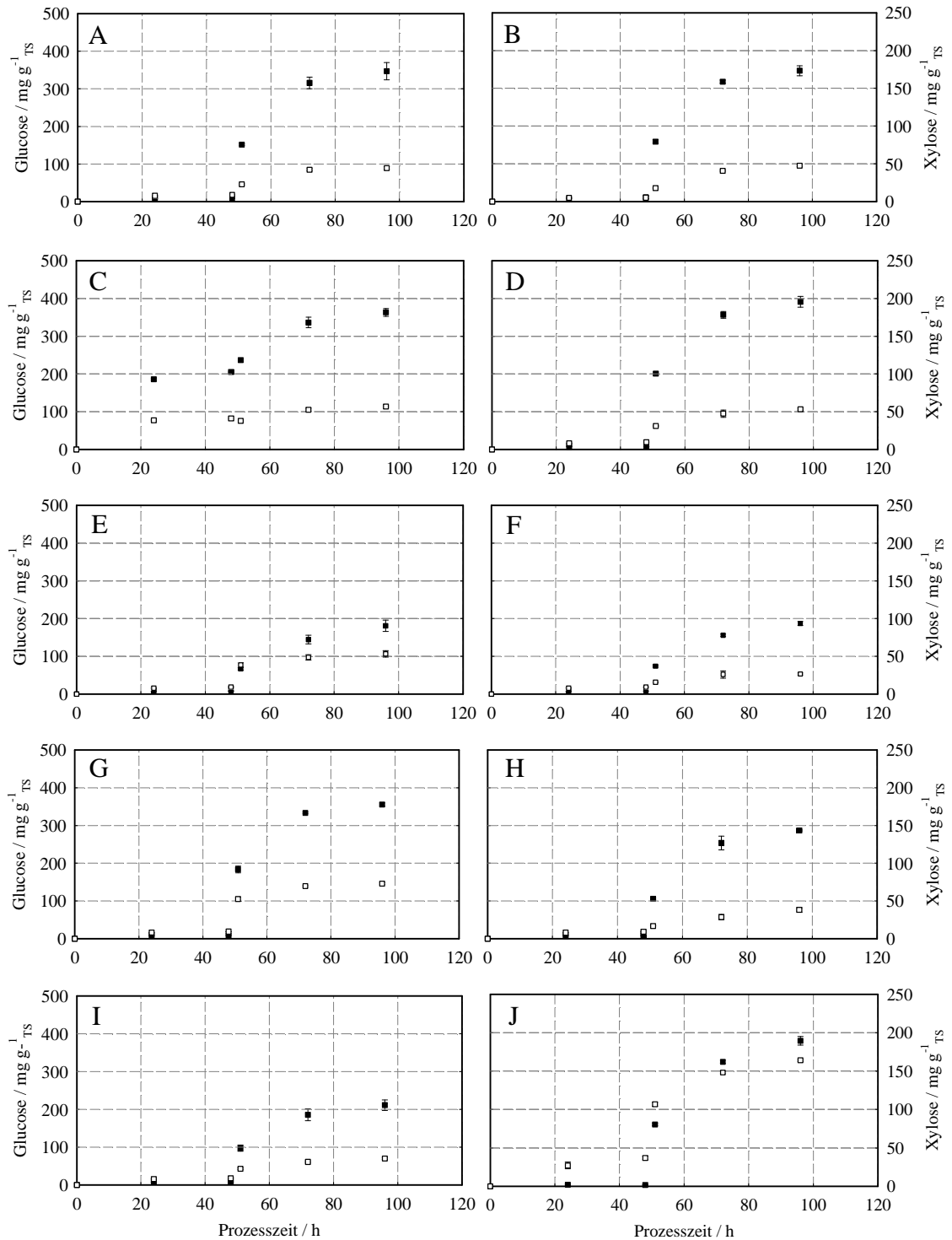


Abbildung 5.26: Selektive enzymatische Hydrolyse zu Glucose (■) und Xylose (□) aus 8 % (w/w TS) saurer (1 % v/v H_2SO_4 , 135 °C, 0,5 h) (A bis I) und alkalischer Vorbehandlung ($0,1 \text{ g g}^{-1} \text{Ca}(\text{OH})_2$, 135 °C, 1 h) (J). 48 h enzymatische Reaktion mit $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{TS}$ „Shearzyme“ (A), „Pulpzyme“ (B), „Vegazyme HC“ (C) und weitere 48 h mit $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{TS}$ „Celluclast“ und $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{TS}$ „Novozym 188“. Nach 48 h mit $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{TS}$ „Shearzyme“ weitere 48 h enzymatische Hydrolyse mit $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{TS}$ „Accellerase 1500“ (D), „NS50012“ (E), „NS22002“ (F), „Distizym Beta G“ (G), „BG Super“ (H), „BG HK4“ (I) und „Celluclast“ (J) mit je $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{TS}$ „Novozym 188“ ($T = 50 \text{ °C}$, $\text{pH } 5,0$, $n = 500 \text{ min}^{-1}$). Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen eines 3-fach Parallelansatzes in Milliliter-Rührreaktoren.

Sequentielle Enzymzugabe

Die Hydrolyseergebnisse mit den Enzympräparaten „Celluclast“, „Accellerase 1500“ und „BG Super“ mit sequentiellen Zugaben von $3,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$, veranschaulicht in Abbildung 5.27A und $7,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$, in Abbildung 5.27B, wurden jeweils im 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren durchgeführt. „Novozym 188“ wurde jeweils mit einer Beladung von $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ zugegeben. Die Reaktionstemperatur betrug $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und der pH lag bei 5,0. Die freigesetzte Glucose nahm, wie in Abbildung 5.27 dargestellt, nahezu linear über einen Zeitraum von 72 h zu und es wurden bis zu $562 \pm 62 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose bei Verwendung von „Accellerase 1500“ erreicht. Die maximale Zugabe der Enzympräparate „Celluclast“, „Accellerase 1500“ und „BG Super“ betrug $42,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$. Bei einer Mehrfachzugabe von $3,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ betrug die maximale Enzymbeladung $18,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$, wobei bis zu $420 \pm 26 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose mit „Celluclast“ erreicht wurden (Abbildung 5.27A). Während „Accellerase 1500“ und „Celluclast“ vergleichbar hohe Glucoseausbeuten ermöglichten, zeigte das Enzympräparat „BG Super“ eine etwas geringere Glucosefreisetzung aus dem vorbehandelten Weizenstroh ($1 \text{ } \%$ v/v H_2SO_4 , $135 \text{ }^\circ\text{C}$, $0,5 \text{ h}$) von maximal $359 \pm 63 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $305 \pm 11 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für die sequentiell zugegebenen Enzymbeladungen von $7,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $3,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$.

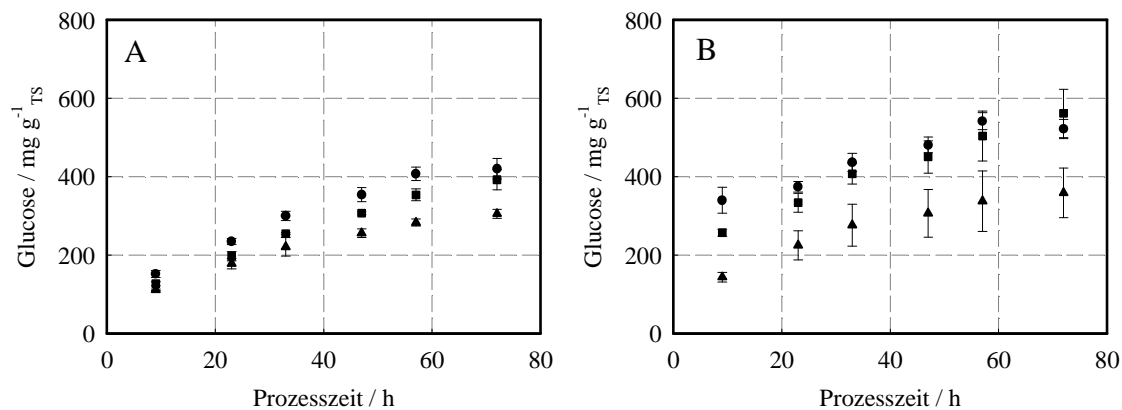


Abbildung 5.27: Freigesetzte Glucose aus 8 % (w/w TS) vorbehandeltem Weizenstroh ($1 \text{ } \%$ v/v H_2SO_4 , $135 \text{ }^\circ\text{C}$, $0,5 \text{ h}$). Verwendete Enzympräparate: $3,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ (A) oder $7,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ (B), „Celluclast“ (●), „Accellerase 1500“ (■) und „BG Super“ (▲) mit jeweils $1,9 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Novozym 188“ zugegeben zu Beginn und jeweils nach 9 h, 23 h, 33 h, 47 h und 57 h (A und B). ($T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 5,0, $n = 500 \text{ min}^{-1}$) Die dargestellten Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus einem 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

5.6 Enzymatische Hydrolyse von Maisspindelgranulat in Milliliter-Rührreaktoren

Im folgenden Kapitel wurde die enzymatische Hydrolyse von Maisspindelgranulat untersucht. Die angegebenen Monosaccharidfreisetzungen wurden jeweils auf das vorbehandelte Substrat bezogen.

5.6.1 Einfluss von pH und Temperatur

Die Reaktionstemperatur und der pH konnte wie Kapitel 5.5.1 für Weizenstroh zeigt die enzymatische Reaktion beeinflussen. Der Einfluss auf Suspensionen aus Maisspindelgranulat ist für einen Feststoffanteil von 8 % (w/w TS) mit drei unterschiedlichen Cellulasepräparaten dargestellt. Die Enzymkonzentration blieb stets konstant und betrug für die Enzympräparate „Celluclast“, „Accellerase 1500“ und „BG Super“ jeweils $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$. Das β -Glucosidasepräparat „Novozym 188“ wurde den zuvor beschriebenen Enzympräparaten mit $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ zugesetzt.

Einfluss der Temperatur

Es wurden die Reaktionstemperaturen $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bei einem pH von 5,0 der Suspension betrachtet. Mit fortschreitender Reaktionsdauer nahm die enzymatisch erzeugte Glucosemenge zu. Während bei einer Reaktionstemperatur von $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Abbildung 5.28A) noch deutliche Glucosefreisetzung im zweiten Reaktionsabschnitt erkennbar war, zeigen die in Abbildung 5.28B für eine Reaktionstemperatur von $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ veranschaulichten Glucosemassen einen Rückgang der Hydrolyserate. In den zweiten 24 h der Reaktion wurden kaum neue Glucosemonomere gebildet und die Glucosefreisetzung aus den 4-fach Parallelansätzen in Milliliter-Rührreaktoren verblieb bei $368 \pm 13 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $366 \pm 37 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für „BG Super“ und „Accellerase 1500“ sowie $540 \pm 35 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für das Enzympräparat „Celluclast“.

Die höchsten Glucosefreisetzungen wurden bei einer Reaktionstemperatur von $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ mit $594 \pm 43 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für „Celluclast“ und $585 \pm 54 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für das Enzympräparat „Accellerase 1500“ erreicht. Das Enzympräparat „BG Super“ führte zu einer maximalen Glucosefreisetzung von $543 \pm 23 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$.

Eine Reaktionstemperatur von 60 °C reduzierte die Glucosefreisetzung aus vorbehandeltem Maisspindelgranulat erheblich, weshalb im Folgenden eine Reaktionstemperatur von 50 °C verwendet wurde.

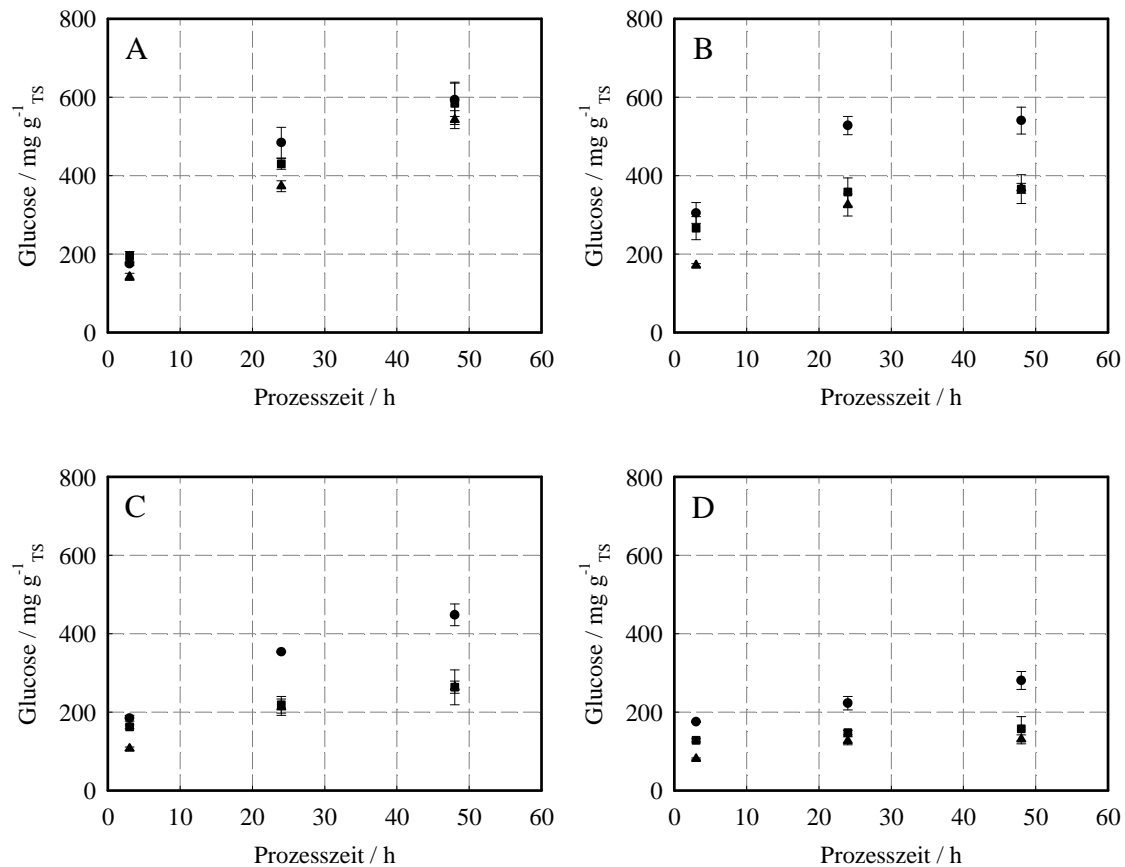


Abbildung 5.28: Enzymatische Hydrolyse von 8 % (w/w TS) vorbehandeltem Maisspindelgranulat (1 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h). Reaktionstemperatur 50 °C (A) und 60 °C (B) jeweils bei pH 5,0, pH 4,0 (C) und pH 3,5 (D) bei jeweils einer Reaktionstemperatur von 50 °C. 15,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} der Enzympräparate „Celluclast“ (●), „Accellerase 1500“ (■) und „BG Super“ (▲) mit jeweils 1,9 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} „Novozym 188“ ($n = 500 \text{ min}^{-1}$). Die dargestellten Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus mindestens 3-fach Parallelansätzen in Milliliter-Rührreaktoren.

Einfluss des pH

Neben der Reaktionstemperatur wurde der pH im 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren untersucht. Das Enzympräparat „Celluclast“ zeigte bei einem pH von 5,0 die höchste freigesetzte Glucose von $594 \pm 43 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Wie Abbildung 5.28C und Abbildung 5.28D veranschaulichen, führte ein pH von 4,0 und ein pH von 3,5 nach 48 h

Reaktionsdauer zu $448 \pm 28 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $281 \pm 23 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose, so dass die Glucosefreisetzung zu pH 5,0 deutlich reduziert wurde.

Wird der pH der Suspension bei den Enzympräparaten „Accellerase 1500“ und „BG Super“ zwischen pH 3,5, pH 4,0 und pH 5,0 variiert, so konnte ein ähnliches Verhalten wie zuvor für das Enzympräparat „Celluclast“ beschrieben werden und die freigesetzte Glucose war mit $585 \pm 54 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei pH 5,0 und $264 \pm 45 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei pH 4,0 sowie $158 \pm 31 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei pH 3,5 deutlich geringer. Für das Enzympräparat „BG Super“ wurde ein Rückgang vom Maximalwert $542 \pm 23 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose auf $263 \pm 16 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $131 \pm 11 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose beobachtet. Somit kann der pH als ein wichtiger Prozessparameter für die Bildung von Glucose während der enzymatischen Hydrolyse bezeichnet werden.

Es wurde im Folgenden ein pH von 5,0 der Biomassesuspension verwendet, da bei Evaluierung von pH 3,5, pH 4,0 und pH 5,0 die höchste Glucosefreisetzung aus dem vorbehandelten Maisspindelgranulat bei pH 5,0 zu beobachten war.

5.6.2 Partikelgröße und Feststoffanteil

Der Einfluss der Partikelgröße und des Feststoffanteils der Suspensionslösung an Maisspindelgranulat wurde für eine ausgewählte Enzymbeladung von $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ für die Enzympräparate „Celluclast“ und „Accellerase 1500“ untersucht. Das β -Glucosidasepräparat „Novozym 188“ wurde den zuvor beschriebenen Enzympräparaten mit $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ zugegeben. Die Reaktionstemperatur betrug $50 \text{ }^\circ\text{C}$, wobei der pH bei 5,0 lag.

Partikelgröße

Wird Maisspindelgranulat verschiedener Partikelgröße verwendet, so ändert sich die spezifische Oberfläche der Feststoffpartikel während der enzymatischen Hydrolyse. In Abbildung 5.29A ist die anteilige Glucosefreisetzung aus unterschiedlich fein gemahlenem Maisspindelgranulat veranschaulicht.

Die maximale Glucosefreisetzung von $177 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ aus den gemahlenden Maisspindelgranulaten konnte bei der feinen Partikelgröße ($< 250 \text{ }\mu\text{m}$) nach 24 h beobachtet werden. Wurde die maximale Partikelgröße um das 4-fache erhöht ($< 1 \text{ mm}$), so sank die freigesetzte Glucose auf $91 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ ab. Größtenteils war die

Glucosefreisetzung während den ersten 3 h zu beobachten, die Glucosemasse bezogen auf die Einwaage an Maisspindelgranulat betrug bereits $152 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und für die grobkörnige Fraktion $82 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$.

Für das in Abbildung 5.29B dargestellte Maisspindelgranulat erfolgte eine zusätzliche Substratvorbehandlung mit verdünnter Schwefelsäure (1 % v/v H_2SO_4 , $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 0,5 h). Die Rührerdrehzahl während der enzymatischen Hydrolyse wurde von 200 min^{-1} auf 500 min^{-1} erhöht. Die Glucosefreisetzung aus einem 4-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren erreichte $530 \pm 26 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ innerhalb einer Reaktionsdauer von 24 h. Dabei war der Einfluss der Partikelgröße mit einer maximalen Glucosefreisetzung von $485 \pm 39 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für das grobdisperse Maisspindelgranulat ($< 1 \text{ mm}$) weniger ausgeprägt, als ohne chemisch-thermische Vorbehandlung des Maisspindelgranulats.

Ohne zusätzliche Vorbehandlung betrug die Erhöhung der Glucosefreisetzung zwischen der grobdispersen und der feinen Fraktion an Maisspindelgranulat 94,5 %. Bei saurer Vorbehandlung des Maisspindelgranulats (1 % v/v H_2SO_4 , $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 0,5 h) und erhöhter Rührerdrehzahl von 500 min^{-1} konnte der Einfluss der Partikelgröße auf 9 % begrenzt werden und ist nur unwesentlich größer als die Standardabweichung von 8 % der vier im Parallelansatz verwendeten Milliliter-Rührreaktoren, so dass fortan mit Maisspindelgranulat ($< 1 \text{ mm}$) gearbeitet wurde.

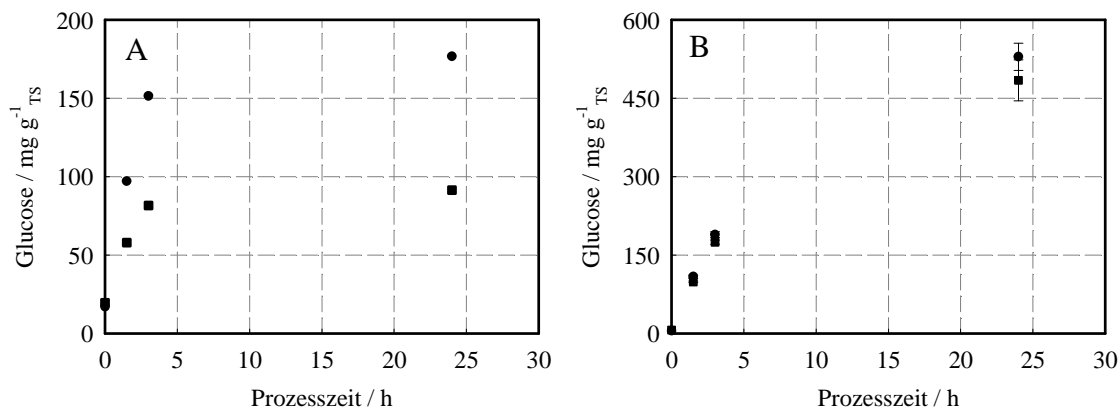


Abbildung 5.29: Freigesetzte Glucose durch enzymatische Hydrolyse von 8 % (w/w TS) gemahlenem Maisspindelgranulat (A) und säurevorbehandeltem Maisspindelgranulat (1 % v/v H_2SO_4 , $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 0,5 h) (B) für verschiedene Partikelgrößen ($< 250 \mu\text{m}$ (●) und $< 1 \text{ mm}$ (■)). Reaktionsbedingungen: $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Celluclast“, und $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Novozym 188“ ($T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 5,0, $n = 200 \text{ min}^{-1}$ (A) und $n = 500 \text{ min}^{-1}$ (B)). Die dargestellten Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus einem 4-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

Feststoffanteil

Wird nun das gemahlene Maisspindelgranulat ($< 1 \text{ mm}$) zur Bewertung des Feststoffanteils einer Suspension aus Maisspindelgranulat in unbewehrte Milliliter-Rührreaktoren eingewogen, so konnte eine lineare Abhängigkeit zwischen der jeweiligen Flüssigkeitssäule auf dem Maisspindelgranulat und dem Füllstand vom Feststoffanteil der Suspension ermittelt werden (Abbildung 5.30A und Abbildung 5.30B). Für einen Feststoffanteil von 22 % (w/w TS) war wie Abbildung 5.30B zeigt nahezu kein Flüssigkeitsüberstand auf den Feststofffasern messbar. Durch eine Extrapolation der Regressionsgeraden für hohe Feststoffanteile ergab sich ein maximaler Feststoffanteil von 23 % (w/w TS) als Grenzzustand zwischen einer Suspension, in welcher die Feststoffe in flüssiger Phase dispergiert sind und einem Haufwerk aus feuchtem Maisspindelgranulat.

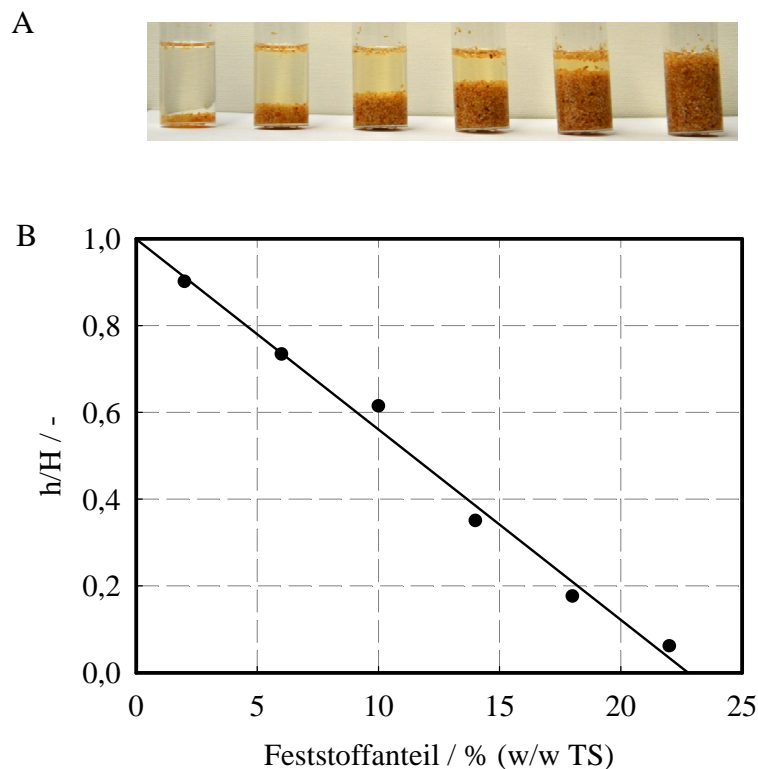


Abbildung 5.30: Suspension gemahlener Maisspindelgranulats mit einer Partikelgröße von bis zu 1 mm und den Feststoffanteilen 2 %, 6 %, 10 %, 14 %, 18 % und 22 % (w/w TS) (A). Quotient der Höhe der Flüssigkeitssäule (h) und der Gesamthöhe der Suspension (H) in Abhängigkeit vom Feststoffanteil (B).

Einfluss des Feststoffanteils auf die Freisetzung von Glucose und Xylose

Der Feststoffanteil von Maisspindelgranulat beeinflusst das Strömungs- und Stofftransportverhalten der Suspension, weshalb die enzymatische Hydrolyse von hydrothermisch vorbehandeltem Maisspindelgranulat (135 °C, 1 h) für die Feststoffanteile 6 %, 10 %, 14 % und 18 % (w/w TS) untersucht wurde. Die verwendeten Enzympräparate „Accellerase 1500“ und „Novozym 188“ wurden mit einer Beladung von $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C und einem pH von 5,0 verwendet.

Der Feststoffanteil an Maisspindelgranulat wurde stufenweise von 6 % (w/w TS), dargestellt in Abbildung 5.31A, bis auf 18 % (w/w TS), dargestellt in Abbildung 5.31D, erhöht. Mit Zunahme der festen Phase der 3-fach im Parallelansatz durchgeführten Reaktion konnte eine Abnahme an freigesetzter Glucose und Xylose beobachtet werden. Betrug die maximal gelöste Glucose bei einem Feststoffanteil von 6 % (w/w TS) $225 \pm 13 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$, so sank diese auf $134 \pm 8 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei 18 % (w/w TS) ab. Wie Abbildung 5.31A bis Abbildung 5.31D zeigen, verringerte sich die gelöste Xylose von $130 \pm 5 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ stufenweise auf $76 \pm 9 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Auffällig in Abbildung 5.31A bis Abbildung 5.31D ist, dass die produzierte Xylose während der gesamten Prozessdauer und für die untersuchten Feststoffanteile stets etwa halb so hoch war wie die bestimmte Glucosemasse.

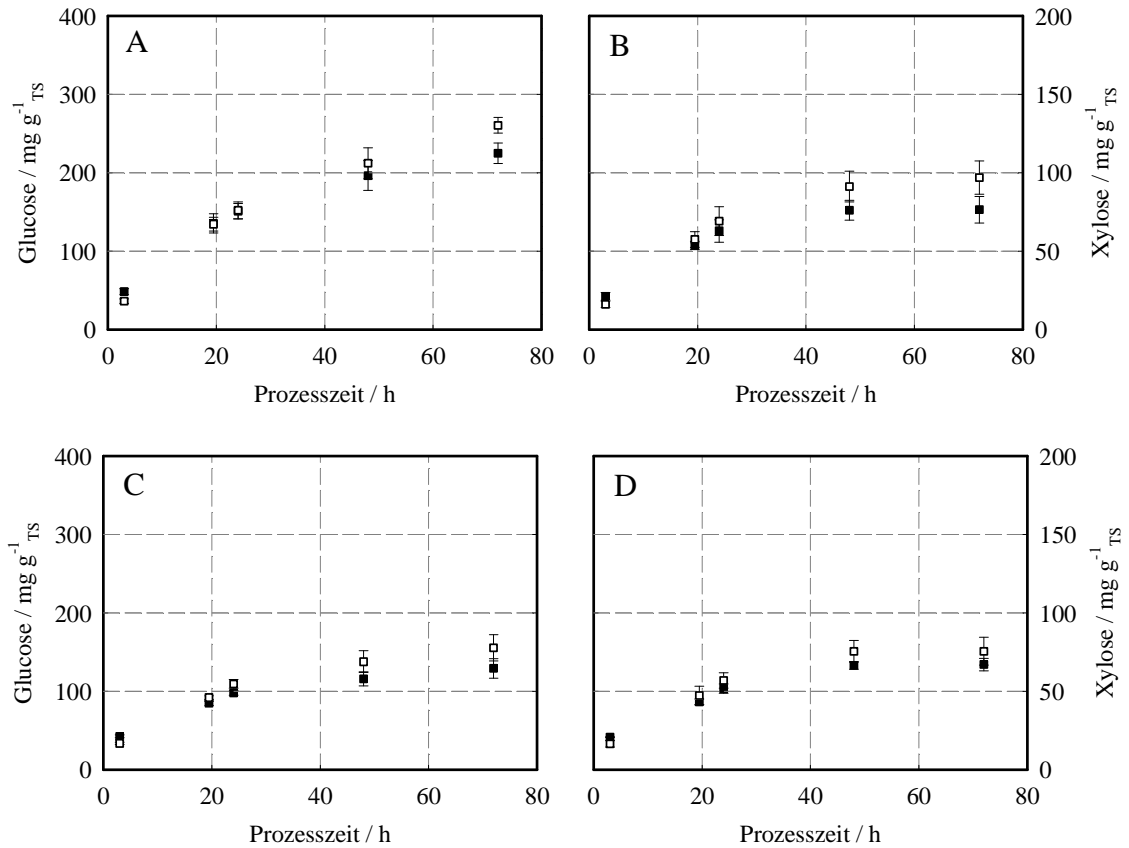


Abbildung 5.31: Enzymatische Hydrolyse verschiedener Feststoffanteile hydrothermisch vorbehandelten Maisspindelgranulats (135 °C, 1 h) zu Glucose (■) und Xylose (□). 6 % (A), 10 % (B), 14 % (C), 18 % (D) (w/w TS) Feststoffanteil. 15,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} mit 1,9 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} der Enzympräparate „Accellerase 1500“ und „Novozym 188“ ($T = 50\text{ °C}$, $\text{pH } 5,0$, $n = 500\text{ min}^{-1}$). Dargestellte Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus einem 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

5.6.3 Substratvorbehandlung

Es wurden unterschiedliche Vorbehandlungsverfahren von Maisspindelgranulat anhand der enzymatischen Freisetzung von Glucose und Xylose mit dem Enzympräparat „Celluclast“ für einen Feststoffanteil von 8 % (w/w TS) evaluiert. Neben hydrothermischen Vorbehandlungsverfahren, sind chemisch-thermische Kombinationsverfahren zur Substratvorbehandlung in Abbildung 5.32 veranschaulicht. Die Beladung mit dem Enzympräparat „Celluclast“ betrug 15,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS}. Die Beladung mit „Novozym 188“ lag jeweils bei 1,9 mg_{Protein} g⁻¹_{TS}.

Glucose als Produkt

Die Glucosefreisetzung (siehe Abbildung 5.32) war abhängig von der gewählten Vorbehandlungsmethode. Durch eine Vorbehandlung (135 °C, 0,5 h) in saurer Umgebung und anschließender enzymatischer Hydrolyse wurde, wie aus Abbildung 5.32C ersichtlich ist, Glucose mit bis zu $659 \pm 34 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ aus dem vorbehandelten Maisspindelgranulat herausgelöst. Die Glucoseausbeute bei einem Schwefelsäureanteil von 0,5 % (v/v) lag mit $594 \pm 43 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose nach 48 h Reaktionsdauer etwas höher als die Glucoseausbeute des mit 1,0 % (v/v) Schwefelsäure vorbehandelten Maisspindelgranulats (Abbildung 5.32D).

Neben den sauren Vorbehandlungsmethoden ist in Abbildung 5.32B eine enzymatische Hydrolyse alkalisch vorbehandelten Maisspindelgranulats ($0,1 \text{ g g}^{-1}_{\text{TS}}$ Ca(OH)_2 , 135 °C, 1 h) mit einer Glucosefreisetzung von bis zu $317 \pm 19 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ dargestellt. Bei hydrothermischer Vorbehandlung (135 °C, 1 h) konnten, wie Abbildung 5.32A zeigt, $225 \pm 13 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose generiert werden, wobei die relative Standardabweichung aus dem 4-fach Parallelansatz 6 % betrug.

Die hohen Glucosefreisetzungen nach erfolgter saurer Vorbehandlung beruhen auch auf der Tatsache, dass während dem Aufschlussverfahren bereits hohe Mengen von Xylose freigesetzt wurden ($\approx 341 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$), während Glucose kaum gelöst wurde ($\approx 32 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$, siehe Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3: Freisetzung von Glucose und Xylose während der Substratvorbehandlung aus einem 4-fach Ansatz.

| Vorbehandlung | Glucose / $\text{mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ | Xylose / $\text{mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ |
|--|--|---|
| 0,5 % v/v H_2SO_4 , 135 °C, 0,5 h | $31,9 \pm 1,8$ | $340,8 \pm 5,5$ |
| $0,1 \text{ g g}^{-1}$ Ca(OH)_2 , 135 °C, 1 h | $14,9 \pm 0,2$ | $12,0 \pm 0,3$ |

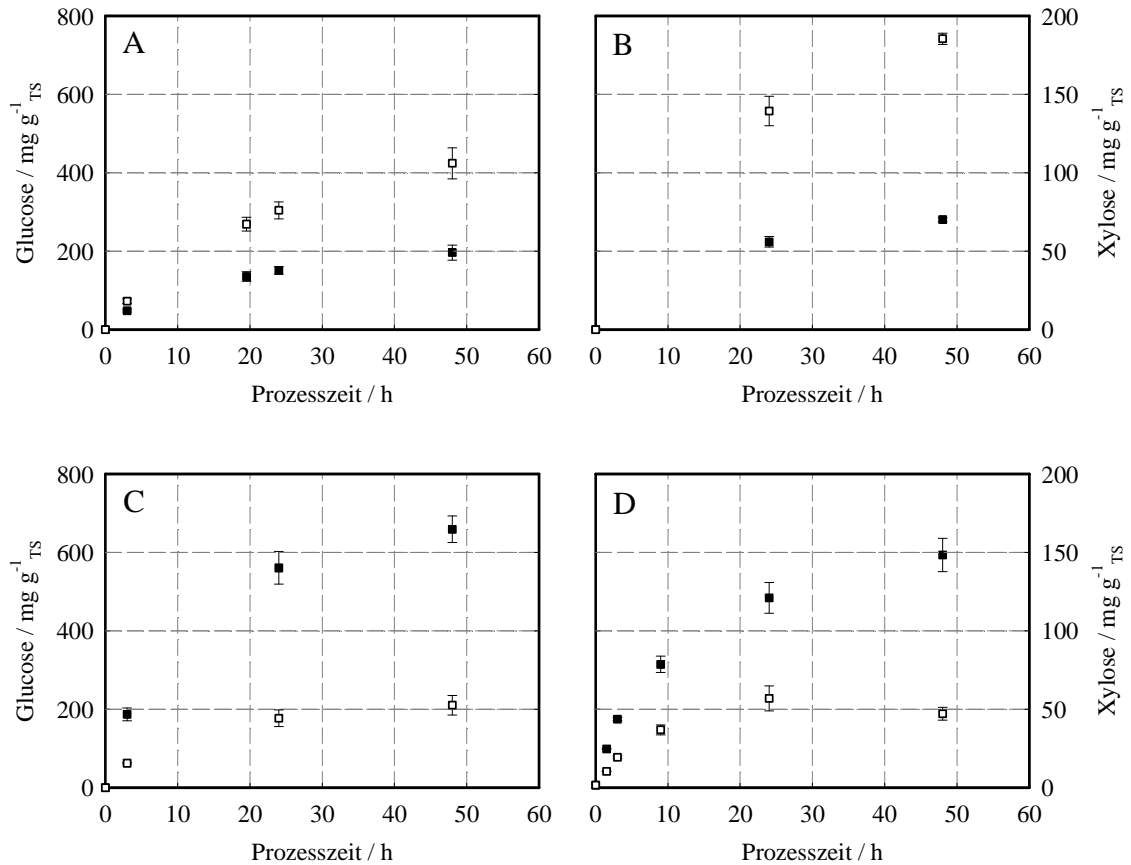


Abbildung 5.32: Einfluss der Vorbehandlung von 8 % (w/w TS) Maisspindelgranulat (< 1 mm) auf die Produktbildung von Glucose (■) und Xylose (□) während der enzymatischen Hydrolyse. Hydrothermische 135 °C, 1 h (A), alkalische 0,1 g g⁻¹ Ca(OH)₂, 135 °C, 1 h (B) und saure 0,5 % (v/v) (C) oder 1 % (v/v) H₂SO₄ (D) Vorbehandlungsmethoden bei 135 °C für 0,5 h. Enzymbeladung: 15,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} „Celluclast“ und 1,9 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} „Novozym 188“, T = 50 °C, pH 5,0, n = 500 min⁻¹. Dargestellte Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus mindestens 3-fach Parallelansätzen in Milliliter-Rührreaktoren.

Xylose als Produkt

Eine geringe Freisetzung von $14,9 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose und $12,0 \pm 0,3 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Xylose wurde hingegen für die alkalische Vorbehandlungsmethode beobachtet (Tabelle 5.3). Deutlich andere Konzentrationsverläufe ergaben sich folgedessen für das Monosaccharid Xylose. Die höchsten Werte an Xylose durch die enzymatische Hydrolyse konnten, wie Abbildung 5.32B zeigt, durch die alkalische Vorbehandlung mit $220 \pm 13 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ erzielt werden. Andere Methoden zum Aufschluss von Maisspindelgranulat zeigten während der enzymatischen Hydrolyse geringere Xylosetreisetzen. Bei hydrothermischer Vorbehandlung wurden bis zu $148 \pm 8 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Xylose erzeugt (Abbildung 5.32A). Wesentlich geringere

Xylosefreisetzungen waren für die enzymatische Hydrolyse nach saurer Vorbehandlung (0,5 % und 1 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) mit bis zu 57 mg g⁻¹_{TS} Xylose darstellbar. Substratvorbehandlungen mit verdünnter Säure führten zu einer geringen enzymatischen Xylosefreisetzung, da während der Vorbehandlung ein Großteil gelöst wurde ($\approx 341 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$, siehe Tabelle 5.3).

5.6.4 Enzymkonzentration und Produktinhibierung

Enzyme wirken als Katalysatoren bei der Bildung von Zuckermonomeren. Der Einfluss der Katalysatorkonzentration auf die Bildung von Glucose und die Produktinhibierung durch Glucose wurden daher im Folgenden untersucht.

Enzymkonzentration

Um den Einfluss auf die Glucosebildung aus vorbehandeltem Maisspindelgranulat (1 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) zu untersuchen, wurde das Enzympräparat „Celluclast“ mit den Beladungen 3,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS}, 7,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS}, 15,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} und 30,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} verwendet.

Wie aus Abbildung 5.33 ersichtlich, wurden innerhalb von 48 h enzymatischer Reaktion bei einer Temperatur von 50 °C und einem pH von 5,0 $377 \pm 20 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose bei einer minimalen Enzymbeladung von 3,0 mg g⁻¹_{TS} freigesetzt. Für die maximal eingesetzte Enzymbeladung von 30,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} wurde mit acht im Parallelansatz eingesetzten Milliliter-Rührreaktoren die maximale Glucosefreisetzung von $889 \pm 23 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ nach 48 h Reaktion erreicht, wobei die relative Standardabweichung 3 % betrug. Die entsprechende Glucosekonzentration betrug $77 \pm 2 \text{ g L}^{-1}$. Der Großteil der Produktbildung war in den ersten 24 h Reaktionsdauer zu beobachten. So betragen die Glucosefreisetzungen $376 \pm 69 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für eine Enzymmenge von 3,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} und $831 \pm 16 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei einer Enzymzugabe von 30,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS}. Die Enzymbeladungen von 7,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} und 15,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} führten jeweils zu einer Glucosefreisetzung, die zwischen der minimalen Enzymbeladung von 3,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} und maximalen Enzymbeladung von 30,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} liegt (Abbildung 5.33).

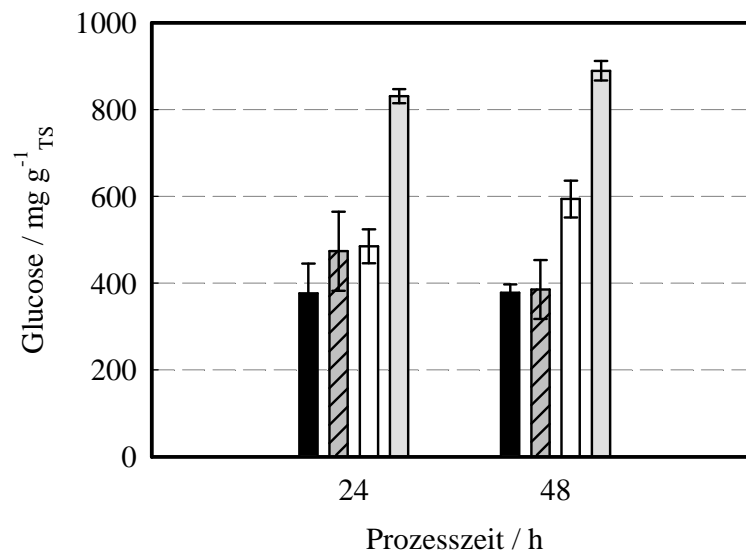


Abbildung 5.33: Einfluss der Enzymbeladung von 8 % (w/w TS) Maisspindelgranulat (1 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) auf die Produktbildung von Glucose nach 24 h und 48 h enzymatischer Hydrolyse. Enzymbeladungen mit „Celluclast“ 3,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} (■), 7,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} (▨), 15,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} (□), 30,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} (□) mit jeweils 1,9 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} „Novozym 188“ ($T = 50\text{ °C}$, $\text{pH } 5,0$, $n = 500\text{ min}^{-1}$). Dargestellte Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus mindestens 3-fach Parallelansätzen in Milliliter-Rührreaktoren.

Produktinhibierung

Die Produktinhibierung durch Glucose konnte durch gezielte Produktvorlage bestimmter Glucosekonzentrationen zu Reaktionsbeginn untersucht werden.

In Abbildung 5.34 ist die Glucosefreisetzung nach 3 h, 24 h, 48 h und 72 h enzymatischer Hydrolyse für eine Suspension aus vorbehandeltem Maisspindelgranulat mit einem Feststoffanteil von 8 % (w/w TS) dargestellt. Bei einer Enzymbeladung von 15,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} an „Celluclast“ und 1,9 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} an „Novozym 188“ wurden innerhalb von 72 h Reaktion 689 mg g⁻¹_{TS} Glucose gebildet. Betrug die Glucosekonzentration bereits zu Beginn der enzymatischen Hydrolyse 110 g L⁻¹, konnten im selben Zeitraum nur 276 mg g⁻¹_{TS} Glucose freigesetzt werden. Ein deutlicher Einfluss der Glucose auf die enzymatische Freisetzung von Glucosemonomeren aus dem mit 0,5 % (v/v) Schwefelsäure vorbehandelten Maisspindelgranulat ist somit erkennbar. Bei hohen Konzentrationen an vorgelegter Glucose ab 90 g L⁻¹ war eine abnehmende Glucosefreisetzung mit fortschreitender Reaktionsdauer zu beobachten.

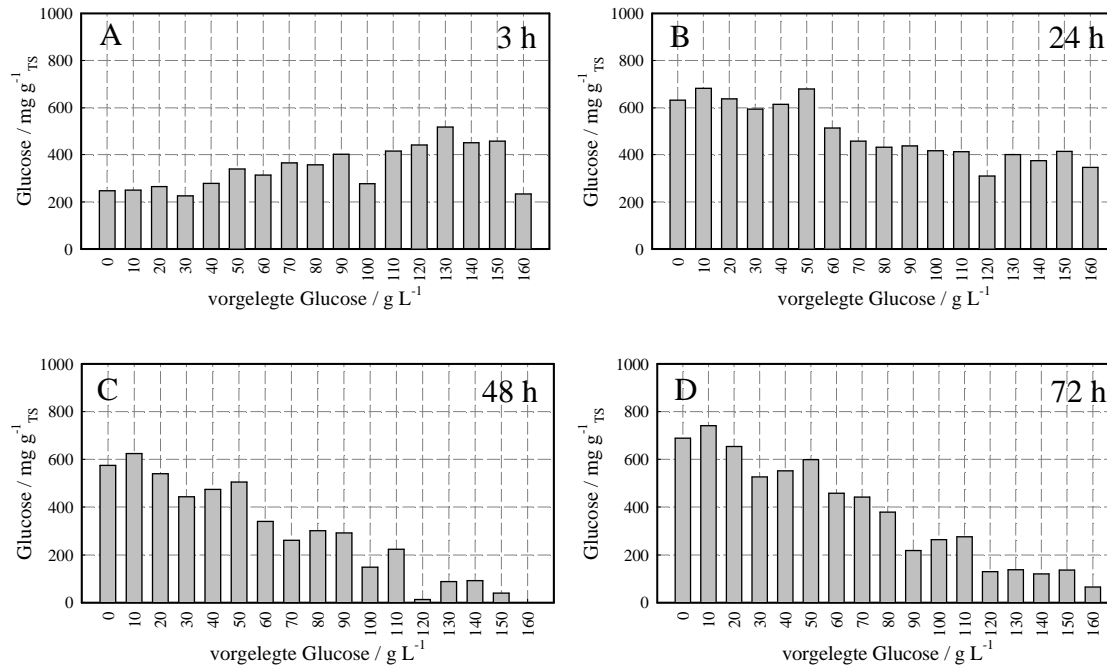


Abbildung 5.34: Glucosefreisetzung nach 3 h (A), 24 h (B), 48 h (C) und 72 h (D) enzymatischer Hydrolyse von 8 % (w/w TS) vorbehandeltem Maisspindelgranulat (0,5 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) in Abhängigkeit von zu Beginn der Reaktion vorgelegter Glucose. Enzymbeladung: 15,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} „Celluclast“ und 1,9 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} „Novozym 188“ ($T = 50$ °C, pH 5,0, $n = 500$ min⁻¹).

5.6.5 Mehrfache Enzymzugaben

Das reaktionstechnische Verhalten von Enzymen, das Verständnis über die katalysierten Reaktionen, deren Produkte und die Existenz von Inhibierungen sind entscheidende Einflussgrößen für die Optimierung von enzymatischen Prozessen. Neben sequentiellen Enzymzugaben erfolgte eine selektive Zugabe von Cellulasepräparaten und Hemicellulasepräparaten.

Selektive Enzymzugabe

Zu Beginn der Reaktion wurde nur das Hemicellulasepräparat „Shearzyme“ (15,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS}) zugegeben. Nach 48 h Reaktionsdauer wurde das Cellulasepräparat „Celluclast“ (15,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS}) und β -Glucosidasepräparat „Novozym 188“ (1,9 mg_{Protein} g⁻¹_{TS}) zugegeben. In Abbildung 5.35 ist der Verlauf der Glucose- und Xylosebildung während einer Prozesszeit von 96 h mit Milliliter-Rührreaktoren im 3-fach Parallelansatz dargestellt. Für die beiden untersuchten Substratvorbehandlungsverfahren, einem sauren (0,5 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h,

Abbildung 5.35A) und einem alkalischen ($0,1 \text{ g g}^{-1}_{\text{TS}} \text{ Ca(OH)}_2$, $135 \text{ }^\circ\text{C}$, $0,5 \text{ h}$, Abbildung 5.35B) Verfahren, wurde während den ersten 48 h der enzymatischen Reaktion kaum Glucose aus den Substraten gelöst. Nach alkalischer Vorbehandlung wurde jedoch bis zu $100 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Xylose enzymatisch aus 8 % (w/w TS) vorbehandeltem Maisspindelgranulat freigesetzt. Nach der Zugabe von „Celluclast“ bei 48 h erhöhte sich die Glucose- und Xylosekonzentration deutlich. In den folgenden 48 h enzymatischer Reaktion wurden bis zu $735 \pm 25 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose bei saurer Substratvorbehandlung und bis zu $441 \pm 14 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose bei alkalischer Vorbehandlung gebildet. Die Xylosemasse bei saurer Vorbehandlung betrug nur $58 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Im gleichen Zeitraum konnten $317 \pm 11 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ alkalisch vorbehandeltes Maisspindelgranulats zu Xylose hydrolysiert werden.

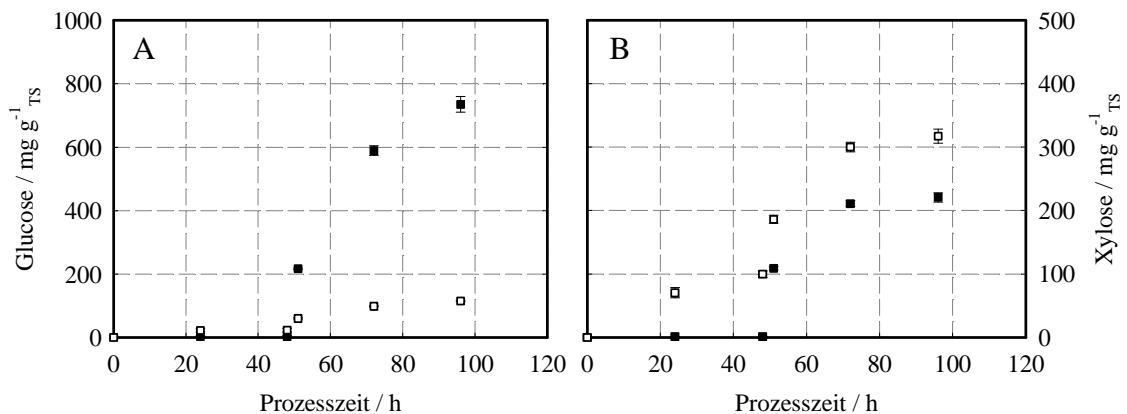


Abbildung 5.35: Selektive enzymatische Hydrolyse zu Glucose (■) und Xylose (□) mit 8 % (w/w TS) vorbehandeltem Maisspindelgranulat saure ($0,5 \text{ } \%$ v/v H_2SO_4 , $135 \text{ }^\circ\text{C}$, $0,5 \text{ h}$ (A)) und alkalische Vorbehandlung ($0,1 \text{ g g}^{-1} \text{ Ca(OH)}_2$, $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h (B)). 48 h Vorbehandlung mit jeweils $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Shearzyme“ und im Anschluss weitere 48 h enzymatische Hydrolyse mit jeweils $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ der Enzympräparate „Celluclast“ und „Novozym 188“ ($T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5,0$, $n = 500 \text{ min}^{-1}$). Dargestellte Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus einem 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

Sequentielle Enzymzugabe

Neben dem Enzympräparat „Celluclast“ ist die enzymatische Hydrolyse mit den Enzympräparaten „Accellerase 1500“ und „BG Super“ mit Enzymzugaben von $3,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $7,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ auf 8 % (w/w TS) vorbehandeltem Maisspindelgranulat ($1 \text{ } \%$ v/v H_2SO_4 , $135 \text{ }^\circ\text{C}$, $0,5 \text{ h}$) in Abbildung 5.36 dargestellt. Für die Untersuchung der sequentiellen Enzymzugabe wurden jeweils drei Milliliter-Rührreaktoren im Parallelansatz verwendet. Die maximal zugegebene Enzymbelastung betrug je $21,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ für die Enzympräparate „Celluclast“, „Accellerase 1500“

und „BG Super“. Bei einer Mehrfachzugabe von $3,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ betrug die maximale Beladung mit den entsprechenden Enzympräparaten $9,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$. „Novozym 188“ wurde mit einer Beladung von jeweils $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ den Zugaben der Enzympräparate beigemischt. Die freigesetzte Glucose nahm wie in Abbildung 5.36 dargestellt, nahezu linear über einen Zeitraum von 33 h zu und es wurde bis zu $890 \pm 62 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose freigesetzt. Am effektivsten für die Freisetzung von Glucosemonomeren war das Enzympräparat „Celluclast“. Bei Verwendung der Enzympräparate „Accellerase 1500“ und „BG Super“ betrug die Glucosemassen bis zu $781 \pm 31 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $540 \pm 61 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für eine sequentielle Enzymzugabe von $7,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Für eine sequentielle Enzymzugabe von $3,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ konnten entsprechend $738 \pm 30 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$, $537 \pm 22 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $490 \pm 21 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose aus vorbehandeltem Maisspindelgranulat (1 % v/v H_2SO_4 , $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 0,5 h) gelöst werden.

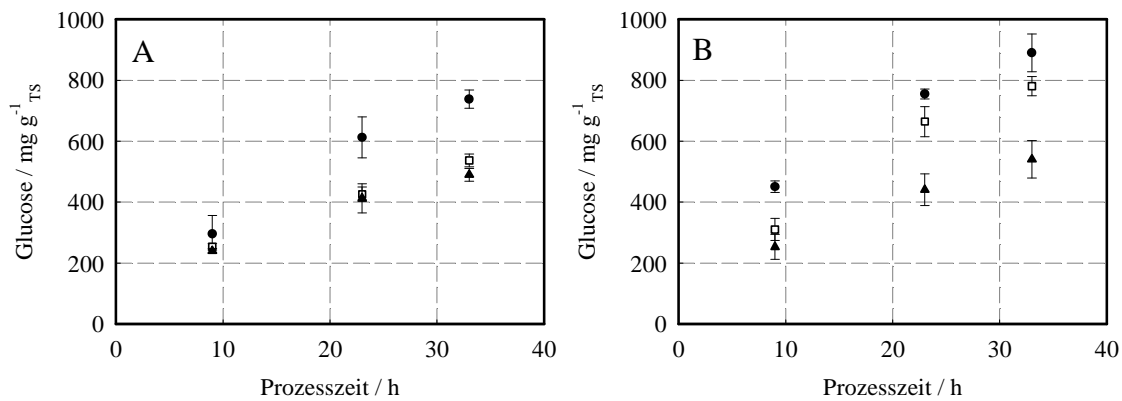


Abbildung 5.36: Freigesetzte Glucose mit 8 % (w/w TS) vorbehandeltem Maisspindelgranulat (1 % v/v H_2SO_4 , $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 0,5 h). Verwendete Enzympräparate sind: $3,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ (A) oder $7,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ (B) „Celluclast“ (●), „Accellerase 1500“ (□) und „BG Super“ (▲) mit jeweils $1,9 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Novozym 188“. Diese wurden zu Beginn und jeweils nach 9 h bzw. 23 h zugegeben ($T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5,0$, $n = 500 \text{ min}^{-1}$). Die dargestellten Fehlerbalken symbolisieren Standardabweichungen aus einem 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

5.7 Enzymatische Hydrolysen in verschiedenen Reaktoren

Die Skalierbarkeit der enzymatischen Hydrolyse von Milliliter-Rührreaktoren in verschiedene Reaktoren wie beispielhaft einen Liter-Rührkesselreaktor ist eine wesentliche Anforderung an die 48-fach parallel angeordneten Milliliter-Rührreaktoren. Nachfolgend wurde neben Vergleichsuntersuchungen in Schüttelkolben die Skalierbarkeit in den 100-fach größeren Labor-Rührkesselreaktor untersucht.

5.7.1 Mikrokristalline Cellulose

Für die Skalierbarkeit wurden neben einem Labor-Rührkesselreaktor auch Schüttelkolben als mögliche Reaktoren für die enzymatische Hydrolyse von mikrokristalliner Cellulose untersucht. Als Enzympräparate wurden „Celluclast“ mit einer Enzymbeladung von $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und „Novozym 188“ mit einer Enzymbeladung von $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei einer Reaktionstemperatur von $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und einem pH von 5,0 verwendet. Die Rührerdrehzahl im unbewehrten Milliliter-Rührreaktor betrug wie die Schüttelfrequenz der Schüttelkolben 200 min^{-1} . Im unbewehrten Labor-Rührkesselreaktor lag eine Rührerdrehzahl von 500 min^{-1} vor.

Enzymatische Hydrolyse einer Suspension mit 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose

Eine Suspensionslösung aus 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose wurde enzymatisch hydrolysiert. Wie aus Abbildung 5.37A ersichtlich, wurde eine maximale Glucosefreisetzung von $492 \pm 29 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ im 4-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren erreicht. Dies entspricht einer Glucosekonzentration von etwa $123 \pm 7 \text{ g L}^{-1}$. Im Referenzreaktor mit einem 100-fach in den Liter-Maßstab vergrößerten Reaktionsvolumen, wurde eine maximale Glucosekonzentration von 107 g L^{-1} und damit $429 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose erreicht. Zudem ist in Abbildung 5.37A die enzymatische Hydrolyse im Schüttelkolben dargestellt. Im Schüttelkolben betrug die Glucosekonzentration 94 g L^{-1} , so dass eine Glucosemenge von $374 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ gelöst wurde. Die freigesetzte Glucose war damit geringer als in den gerührten Ansätzen.

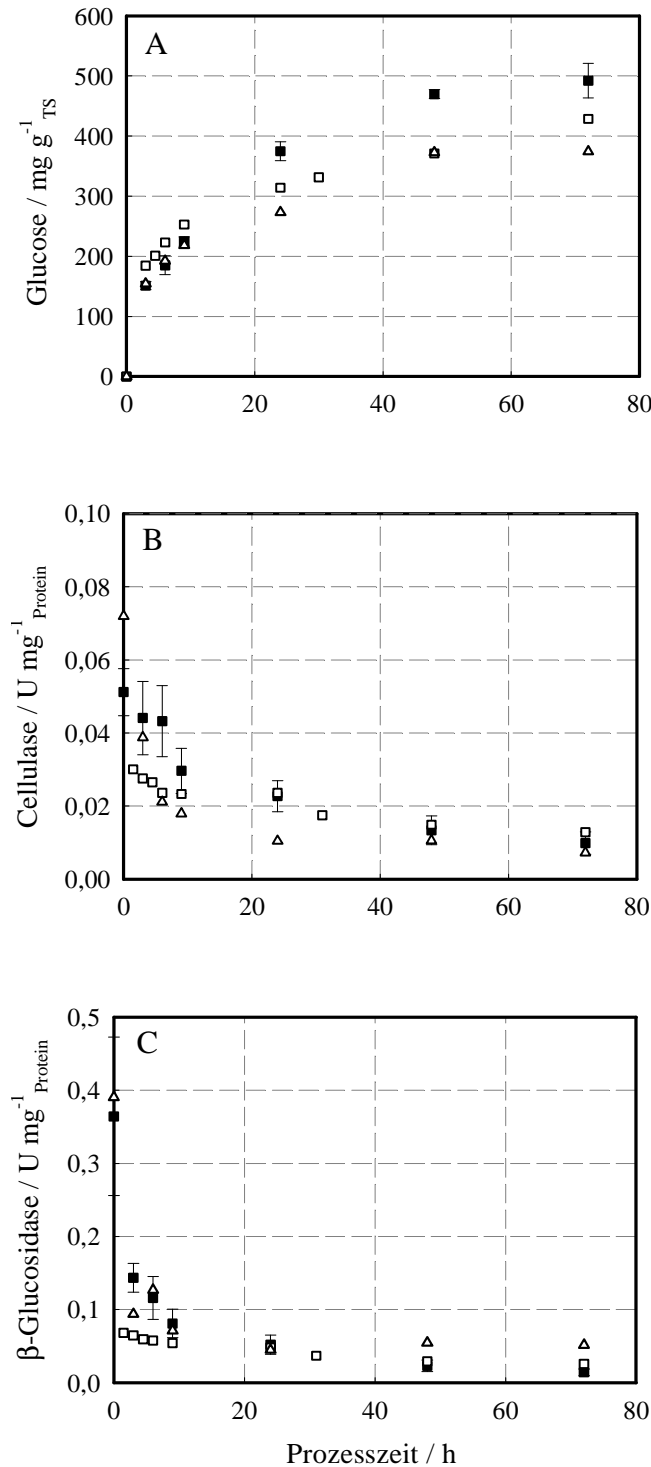


Abbildung 5.37: Enzymatische Hydrolyse mit 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose in Milliliter-Rührreaktoren (■, $n = 200 \text{ min}^{-1}$), Labor-Rührkesselreaktor (□, $n = 500 \text{ min}^{-1}$) und Schüttelkolben (Δ, $n = 200 \text{ min}^{-1}$). Als Enzympräparate wurden „Celluclast“ mit einer Enzymbeladung von $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und „Novozym 188“ mit $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ verwendet ($T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5,0$) (A). Enzymatische Aktivität der Suspensionslösung während der Reaktion hinsichtlich der Substrate p-Nitrophenyl-Cellobiosid (B) und p-Nitrophenyl-Glucosid (C). Die Aktivitäten wurden mit der Methode nach Wood und Bhat (1988) und die Proteinkonzentrationen mit der Pierce-BCA-Methode bestimmt. Die Fehlerbalken symbolisieren für die Milliliter-Rührreaktoren die Standardabweichungen aus einem 4-fach Parallelansatz.

Aktivität hydrolytischer Enzyme während der Reaktion

Werden nun die Enzymaktivitäten aus der Flüssigphase der untersuchten Reaktionssysteme hinsichtlich der synthetischen Substrate p-Nitrophenyl-Cellobioside und p-Nitrophenyl-Glucoside bestimmt, so konnte für den Milliliter- und Liter-Rührkesselreaktor ein jeweils ähnlicher Aktivitätsverlauf beobachtet werden (Abbildung 5.37). Allerdings war bei geschüttelter Verfahrensweise während den ersten 24 h der Reaktion eine deutlichere Abnahme der Enzymaktivität auf p-Nitrophenyl-Cellobioside mit $0,011 \text{ U mg}^{-1}_{\text{Protein}}$ verglichen mit $0,023 \pm 0,004 \text{ U mg}^{-1}_{\text{Protein}}$ in Milliliter-Rührreaktoren erkennbar (Abbildung 5.37B).

Die Glucosefreisetzung nach 24 h enzymatischer Hydrolyse betrug bei den Schüttelkolbenansätzen $273 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$, während in Milliliter-Rührreaktoren bereits $375 \pm 16 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ vorlagen. Wie Abbildung 5.37C aufzeigt, sind die gemessenen β -Glucosidaseaktivitäten in den untersuchten Reaktorsystemen nach 24 h nahezu identisch und lagen zwischen $0,045 \text{ U mg}^{-1}_{\text{Protein}}$ und $0,052 \text{ U mg}^{-1}_{\text{Protein}}$.

5.7.2 Weizenstroh

Im Folgenden wurde der Einfluss des Reaktionssystems auf die produzierte Glucose aus hydrothermisch vorbehandeltem Weizenstroh ($160 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h) untersucht. Neben Rührreaktoren im Milliliter- und Liter-Maßstab wurden Schüttelkolben eingesetzt. Als Enzympräparate wurden „Celluclast“ mit einer Enzymbeladung von $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und „Novozym 188“ mit einer Enzymbeladung von $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei einer Reaktionstemperatur von $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und einem pH von 5,0 verwendet. Die Rührerdrehzahl im unbewehrten Milliliter-Rührreaktor betrug wie die Schüttelfrequenz der Schüttelkolben 200 min^{-1} . Im unbewehrten Labor-Rührkesselreaktor lag eine Rührerdrehzahl von 500 min^{-1} vor.

Enzymatische Hydrolyse einer Suspension mit 8 % (w/w TS) hydrothermisch behandeltem Weizenstroh

Die 10-fach im Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren durchgeführte Reaktion führte zur Freisetzung von Glucose. Diese betrug $12,0 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$ Glucose nach 48 h enzymatischer Hydrolyse bei einem Feststoffanteil von 8 % (w/w TS). Dadurch konnte, wie in Abbildung 5.38A dargestellt, eine maximale Glucosefreisetzung von

$138 \pm 4 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ erreicht werden. Als Vergleich zum Reaktionsverlauf im Milliliter-Maßstab wurde die Reaktion im 100-fach größeren Liter-Maßstab im Labor-Rührkesselreaktor ohne Strömungsbrecher durchgeführt. Die erzeugte Glucosekonzentration betrug nach 48 h $11,6 \text{ g L}^{-1}$, was einer Glucosefreisetzung von $134 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ entspricht. Aus der Suspensionslösung des Schüttelkolbenansatzes konnte maximal $8,2 \text{ g L}^{-1}$ Glucose und somit eine Glucosefreisetzung von $94 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ nachgewiesen werden. Während die Reaktion zu Beginn nahezu identisch verlief, konnte nach 9 h Reaktionsdauer bereits eine deutlich unterschiedliche Glucosemenge von $86 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ aus den Schüttelkolbenansätzen, $109 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ im Labor-Rührkesselreaktor und $119 \pm 6 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ in den Milliliter-Rührreaktoren festgestellt werden.

Aktivität hydrolytischer Enzyme

Der Verlauf der untersuchten Enzymaktivitäten hinsichtlich der Substrate p-Nitrophenyl-Cellobioside und p-Nitrophenyl-Glucoside (Abbildung 5.38B und Abbildung 5.38C) war hingegen in allen drei Reaktorarten annähernd identisch, so dass die aus der Flüssigphase der Suspension bestimmten Enzymaktivitäten keine Erklärung für die geringere Glucosekonzentration in Schüttelkolben zulassen.

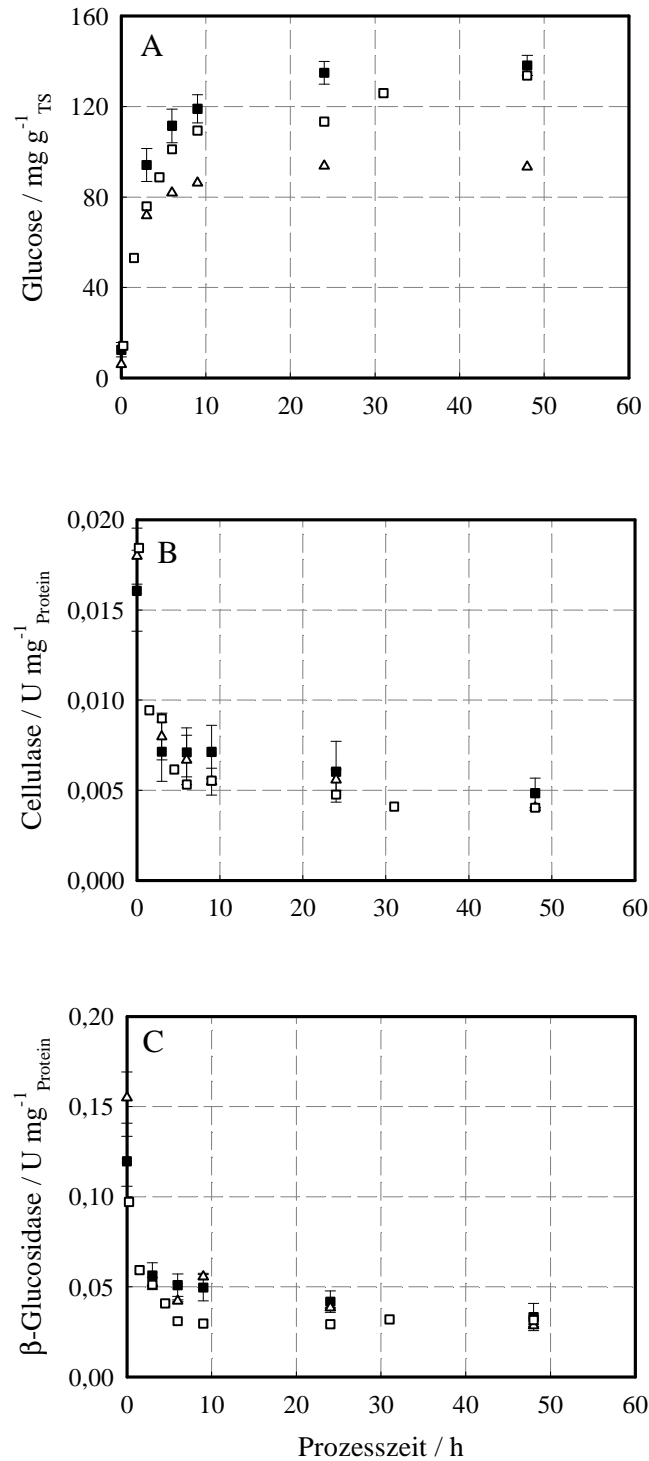


Abbildung 5.38: Enzymatische Hydrolyse mit 8 % (w/w TS) hydrothermisch (160 °C, 1 h) vorbehandeltem Weizenstroh in Milliliter-Rührreaktoren (■, $n = 200 \text{ min}^{-1}$), Labor-Rührkesselreaktor (□, $n = 500 \text{ min}^{-1}$) und Schüttelkolben (△, $n = 200 \text{ min}^{-1}$). Als Enzympräparate wurden „Celluclast“ mit einer Enzymbeladung von $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{ TS}$ und „Novozym 188“ mit $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{ TS}$ verwendet ($T = 50 \text{ °C}$, pH 5,0) (A). Enzymatische Aktivität der Suspensionslösung während der Reaktion hinsichtlich der Substrate p-Nitrophenyl-Cellobiosid (B) und p-Nitrophenyl-Glucosid (C). Die Aktivitäten wurden mit der Methode nach Wood und Bhat (1988) und die Proteinkonzentrationen mit Pierce-BCA bestimmt. Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus einem 10-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

5.7.3 Maisspindelgranulat

Die enzymatische Hydrolyse von vorbehandeltem Maisspindelgranulat mit einem Feststoffanteil von 8 % oder 18 % (w/w TS) ist für die gerührten Reaktionssysteme verschiedenen Maßstabs in Abbildung 5.39 und Abbildung 5.40 veranschaulicht. Als Enzympräparate wurden „Accellerase 1500“ mit $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und „Novozym 188“ mit $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei einer Reaktionstemperatur von $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und einem pH von 5,0 verwendet. Neben Glucose als monomere Hauptkomponente des Maisspindelgranulats ist Xylose der zweithäufigste monomere Baustein des Maisspindelgranulats. Die Rührerdrehzahl im unbewehrten Milliliter-Rührreaktor betrug 500 min^{-1} . Im unbewehrten Labor-Rührkesselreaktor lag diese ebenfalls bei 500 min^{-1} .

Skalierbarkeit einer Suspension mit 8 % (w/w TS) Maisspindelgranulat nach saurer Vorbehandlung

Nach einer sauren Vorbehandlung des Maisspindelgranulats ($0,5 \text{ } \%$ v/v H_2SO_4 , $135 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,5 \text{ h}$), dessen Glucosefreisetzung während der enzymatischen Hydrolyse in Abbildung 5.39A veranschaulicht ist, konnten bis zu $54,7 \pm 1,8 \text{ g L}^{-1}$ Glucose mit einer maximalen Freisetzung von $629 \pm 21 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ aus dem Substrat erzeugt werden. Die relative Standardabweichung der zehn Milliliter-Rührreaktoren im Parallelansatz betrug nur 3 %. Die während der Reaktionsdauer erzeugte Xylose ist in Abbildung 5.39B dargestellt und betrug $3,4 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$. Dies entspricht einer Xylosetreisetzung von $39 \pm 5 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Der Reaktionsverlauf im Liter-Maßstab war mit dem Milliliter-Maßstab vergleichbar (Abbildung 5.39A), wobei der Milliliter-Rührreaktor geringfügig niedrigere Glucose- und Xyloseausbeuten ermöglichte. So wurden im Labor-Rührkesselreaktor bis zu $59,2 \text{ g L}^{-1}$ Glucose bei einer Glucosemenge von $681 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ innerhalb von 72 h freigesetzt. Die Xylosekonzentration betrug $3,9 \text{ g L}^{-1}$, wobei die gelöste Xylosemasse bei $45 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ lag.

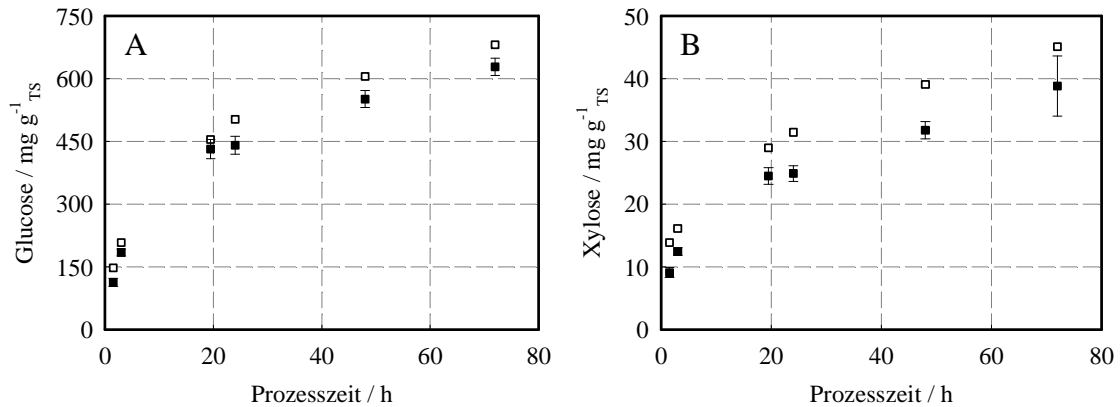


Abbildung 5.39: Enzymatische Hydrolyse mit 8 % (w/w TS) vorbehandeltem Maisspindelgranulat (0,5 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) in Milliliter-Rührreaktoren (■, $n = 500 \text{ min}^{-1}$) und einem Labor-Rührkesselreaktor (□, $n = 500 \text{ min}^{-1}$) dargestellt für die Glucose- (A) und Xylosetreisetzung (B). Als Enzympräparate wurden „Accellerase 1500“ mit $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und „Novozym 188“ mit $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ verwendet ($T = 50 \text{ °C}$, $\text{pH } 5,0$). Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus einem 10-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

Skalierbarkeit einer Suspension mit 18 % (w/w TS) Maisspindelgranulat nach alkalischer Vorbehandlung

Wurde der Feststoffanteil wie in Abbildung 5.40 dargestellt von 8 % auf 18 % (w/w TS) vorbehandeltes Maisspindelgranulat erhöht, so konnte bei alkalischer Vorbehandlung ($0,1 \text{ g g}^{-1}_{\text{TS}} \text{ Ca(OH)}_2$, 135 °C , 1 h) bis zu $35,3 \pm 1,6 \text{ g L}^{-1}$ Glucose innerhalb einer Reaktionsdauer von 96 h freigesetzt werden. Die anteilige Freisetzung von Glucose aus einem 8-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren betrug, wie Abbildung 5.40A veranschaulicht, $161 \pm 7 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Die gemessene Xylosekonzentration lag bei $17,5 \pm 1,7 \text{ g L}^{-1}$ und somit wurden wie Abbildung 5.40B zeigt, $80 \pm 8 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Xylose freigesetzt. Die Freisetzung von Xylose entspricht dabei in etwa der Hälfte der gebildeten Glucose. Der Verlauf der Glucose- und der Xylosetreisetzung im Milliliter-Rührreaktor war identisch mit dem Labor-Rührkesselreaktor (Abbildung 5.40A und Abbildung 5.40B). Im Liter-Maßstab lag die maximale Freisetzung bei $153 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für Glucose und $80 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für Xylose.

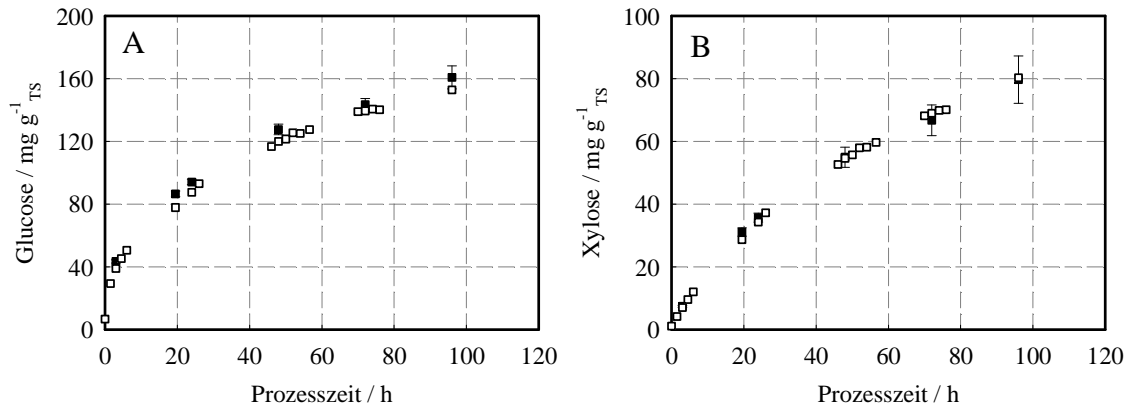


Abbildung 5.40: Enzymatische Hydrolyse mit 18 % (w/w TS) vorbehandeltem Maisspindelgranulat ($0,1 \text{ g g}^{-1}_{\text{TS}} \text{ Ca(OH)}_2$, $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h) in Milliliter-Rührreaktoren (■, $n = 500 \text{ min}^{-1}$) und einem Labor-Rührkesselreaktor (□, $n = 500 \text{ min}^{-1}$) dargestellt für die Glucose- (A) und Xylosefreisetzung (B). Als Enzympräparate wurden „Accellerase 1500“ mit $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und „Novozym 188“ mit $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei einer Reaktionstemperatur von $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem pH 5,0 verwendet. Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus einem 8-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

5.8 Optimierung der enzymatischen Hydrolyse in Milliliter-Rührreaktoren

Wie in Kapitel 5.5 und Kapitel 5.6 für vorbehandeltes Weizenstroh und Maisspindelgranulat gezeigt werden konnte, kann durch veränderte Vorbehandlungsverfahren, geänderte Enzymzugaben und durch die Zusammensetzung der Enzymgemische die enzymatische Hydrolyse beeinflusst werden. Der Einfluss der Enzymkonzentration und der Zusammensetzung von Enzymgemischen sowie der Reaktionstemperatur und des pH wurde untersucht. Dazu wurde mit kommerziell erhältlichen Enzympräparaten für die Substrate Weizenstroh und Maisspindelgranulat die Abhängigkeit der Glucose- und Xyloseproduktivität nach 24 h enzymatischer Hydrolyse im Satzverfahren von der Temperatur, pH, Beladung des Cellulase-, β -Glucosidase- und Hemicellulasepräparats mit einem quadratischen Polynomansatz empirisch beschrieben. Hierzu wurde basierend auf der Box-Wilson Methode ein Versuchsplan mit 27 Experimenten jeweils im 3-fach Parallelansatz durchgeführt.

Der Feststoffanteil der vorliegenden Suspensionen wurde möglichst hoch gewählt und betrug 8 % (w/w TS) für Weizenstroh und 18 % (w/w TS) für Maisspindelgranulat. Für die zuvor beschriebenen fünf wesentlichen Einflussgrößen der enzymatischen Hydrolyse wurden Randbedingungen gewählt, die deutliche Unterschiede im Antwortverhalten der gemessenen Glucose- und Xylosekonzentration erwarten lassen.

Der Bereich der Reaktionstemperatur betrug 40 °C bis 60 °C und der pH lag zwischen pH 4,0 und pH 6,0. Die Enzymbeladungen lagen für die Cellulasepräparate „Celluclast“ und „Accellerase 1500“ zwischen $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $45,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$, für das β -Glucosidasepräparat „Novozym 188“ zwischen $1,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $7,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und für die Hemicellulasepräparate „NS22002“, „Shearzyme“ und „Pulpzyme“ zwischen $0,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $30,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$.

Anschließend wurden durch multilinare Regression die Modellparameter identifiziert und die Zielgrößen des quadratischen Polynomansatzes bestimmt.

Als Referenzbedingung wurde eine Enzymbeladung von $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ für die verwendeten Cellulasepräparate und $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ für das β -Glucosidasepräparat bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C und einem pH der Suspensionslösung von pH 5,0 verwendet. Im Folgenden soll die Glucose- und Xyloseproduktivität nach 24 h

Reaktionsdauer für die Substrate Weizenstroh und Maisspindelgranulat untersucht werden.

5.8.1 Weizenstroh

Die anteilmäßige Zusammensetzung von Cellulose, Hemicellulose und Lignin in Weizenstrohfasern (< 2 mm) kann durch ausgewählte Vorbehandlung beeinflusst werden. Die Abhängigkeit der Glucose- und Xyloseproduktivität vom jeweils verwendeten Enzymgemisch wurde im Folgenden für die einzelnen Substratvorbehandlungen, die hydrothermische (160 °C, 1 h), die alkalische (0,1 g g⁻¹_{TS} Ca(OH)₂, 135 °C, 1 h) und eine saure Aufschlussmethode (0,5 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) untersucht.

In Tabelle 5.4 sind die untersuchten variablen Einflussgrößen der Reaktionstemperatur, des pH und die Enzymbeladungen mit dem Cellulase- (C_1), β -Glucosidase- (C_2) und dem Hemicellulasepräparat (C_3) mit den jeweils erreichten Glucose- und Xyloseproduktivitäten für verschiedene Vorbehandlungsverfahren des Weizenstrohs aufgelistet. Ein deutlicher Einfluss der einzelnen Enzymgemische auf die Glucose- und Xyloseproduktivität wurde beobachtet. Besonders hohe Produktivitäten sind in der Tabelle 5.4 in blauer Farbe für die jeweiligen Vorbehandlungsmethoden hervorgehoben. Auffallend niedrige Produktivitäten sind mit roter Farbe markiert dargestellt. Hohe Produktivitäten wurden häufig bei Temperaturen von 50 °C und einem pH der Reaktionslösung von 5,0 erreicht. Hohe Enzymbeladungen steigerten zudem die Produktivität von Glucose und Xylose. Aus Weizenstroh nach saurem Vorbehandlungsverfahren konnte Xylose nur in geringer Konzentration enzymatisch gelöst werden.

Tabelle 5.4: Experimentelle Versuchsplanung mit fünf variablen Einflussgrößen (x): Temperatur (T , °C), pH, Cellulase-, β -Glucosidase-, u. Hemicellulasepräparat (C_1 , C_2 , C_3 , mg_{Protein} g⁻¹_{TS}). „Celluclast“, „Novozym 188“, „NS22002“ (a), „Accellerase 1500“, „Novozym 188“, „NS22002“ (b), „Celluclast“, „Novozym 188“, „Shearzyme“ (c), „Celluclast“, „Novozym 188“, „Pulpzyme“ (d). Bestimmte Produktivität nach 24 h für Glucose u. Xylose [g L⁻¹d⁻¹]. Weizenstrohvorbehandlung: Thermisch (Therm., 160 °C, 1 h), alkalisch (alk., 0,1 g g⁻¹_{TS} Ca(OH)₂, 135 °C, 1 h) u. saurer (0,5 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h). 2,0 mg g⁻¹_{TS} ≤ C_2 ≤ 6,0 mg g⁻¹_{TS} (*). Referenz (Ref.). Validierung (Val.). Die drei jeweils höchsten Zuckerkonzentrationen sind mit blauer Farbe und die drei jeweils geringsten Konzentrationen mit roter Farbe markiert.

| Methode | x | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | Ref. | Val. Ref. | |
|-----------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----------|----|
| | T | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 40 | 60 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | |
| | pH | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 5,0 | 5,0 | 4,0 | 6,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | |
| | C_1 | 15,0 | 15,0 | 45,0 | 45,0 | 15,0 | 15,0 | 45,0 | 45,0 | 15,0 | 15,0 | 45,0 | 45,0 | 15,0 | 15,0 | 45,0 | 45,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 15,0 | 45,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 15 | 15 |
| | C_2 | 1,0 | 7,0 | 1,0 | 7,0 | 1,0 | 7,0 | 1,0 | 7,0 | 1,0 | 7,0 | 1,0 | 7,0 | 1,0 | 7,0 | 1,0 | 7,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 1,0 | 7,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 1,9 | 1,9 | |
| | C_3 | 30,0 | 0 | 0 | 30,0 | 0 | 30,0 | 30,0 | 0 | 0 | 30,0 | 30,0 | 0,0 | 30,0 | 0 | 0 | 30,0 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 0 | 30,0 | 15,0 | 0 | 0 | |
| Glucose Enzyme | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Therm.* | a | 11,1 | 10,4 | 11,1 | 12,1 | 8,5 | 13,7 | 13,2 | 10,0 | 7,2 | 11,2 | 10,8 | 9,0 | 9,8 | 5,6 | 5,8 | 10,2 | 12,3 | 12,9 | 12,2 | 11,6 | 13,6 | 15,0 | 13,4 | 14,9 | 11,0 | 16,5 | 13,8 | 8,1 | 10,8 | |
| | a | 12,9 | 16,4 | 19,0 | 20,2 | 10,4 | 18,4 | 19,1 | 18,8 | 8,7 | 11,5 | 15,0 | 14,0 | 11,9 | 5,4 | 7,3 | 18,5 | 22,2 | 17,0 | 20,1 | 20,7 | 20,9 | 25,7 | 21,2 | 25,7 | 20,6 | 24,8 | 24,3 | 15,4 | 18,6 | |
| Alk. Vorb. | b | 16,3 | 10,0 | 15,7 | 25,0 | 9,6 | 21,5 | 24,3 | 18,5 | 5,5 | 10,9 | 15,1 | 9,9 | 12,4 | 4,8 | 7,5 | 18,6 | 24,0 | 15,5 | 18,7 | 20,4 | 20,0 | 24,4 | 21,4 | 23,1 | 18,4 | 21,2 | 22,9 | 13,8 | 15,8 | |
| | c | 24,4 | 18,6 | 24,1 | 34,1 | 12,5 | 26,9 | 21,5 | 25,4 | 7,3 | 14,4 | 20,5 | 13,7 | 9,0 | 8,3 | 11,2 | 24,2 | 34,3 | 31,3 | 28,2 | 35,2 | 36,3 | 38,5 | 35,5 | 38,9 | 29,6 | 39,1 | 38,6 | 24,1 | 24,1 | |
| Saure Vorb. | a | 16,7 | 23,5 | 27,9 | 25,9 | 18,1 | 21,7 | 22,3 | 27,9 | 10,1 | 10,6 | 17,0 | 15,6 | 14,3 | 13,3 | 15,3 | 19,0 | 25,5 | 21,5 | 21,7 | 21,6 | 23,8 | 27,2 | 22,4 | 28,7 | 28,0 | 26,3 | 26,6 | 24,3 | 28,3 | |
| | b | 15,9 | 17,2 | 25,5 | 26,3 | 16,5 | 20,9 | 23,8 | 28,1 | 7,5 | 9,3 | 15,2 | 12,3 | 14,2 | 9,9 | 16,0 | 20,5 | 24,7 | 19,9 | 20,0 | 28,3 | 23,4 | 31,2 | 28,4 | 28,3 | 28,7 | 26,1 | 28,2 | 22,5 | 26,7 | |
| | d | 21,3 | 23,9 | 28,1 | 26,8 | 17,9 | 17,6 | 18,1 | 26,9 | 1,9 | 11,9 | 8,9 | 7,3 | 7,5 | 9,2 | 1,0 | 14,5 | 27,7 | 20,4 | 26,4 | 25,9 | 27,1 | 31,0 | 28,9 | 30,9 | 36,2 | 28,6 | 32,0 | 30,1 | 28,3 | |
| Xylose Enzyme | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Therm.* | a | 4,0 | 3,4 | 3,9 | 4,8 | 2,2 | 3,9 | 4,6 | 3,2 | 1,6 | 4,1 | 4,5 | 2,6 | 5,0 | 0,7 | 0,9 | 5,0 | 5,1 | 6,2 | 4,1 | 4,8 | 4,8 | 5,7 | 5,4 | 5,6 | 2,7 | 6,0 | 5,2 | 1,7 | 2,5 | |
| | a | 6,0 | 8,9 | 10,4 | 8,2 | 5,1 | 6,8 | 7,0 | 7,7 | 5,0 | 5,6 | 7,6 | 7,9 | 7,1 | 3,0 | 3,5 | 9,1 | 8,3 | 8,6 | 9,3 | 8,7 | 9,0 | 10,7 | 9,7 | 10,2 | 9,3 | 10,6 | 10,0 | 7,5 | 10,0 | |
| Alk. Vorb. | b | 7,4 | 4,1 | 6,0 | 8,8 | 1,9 | 8,9 | 9,4 | 5,2 | 2,1 | 4,4 | 5,4 | 5,6 | 8,7 | 2,6 | 2,4 | 11,3 | 8,9 | 8,9 | 6,8 | 8,5 | 8,9 | 9,4 | 8,7 | 9,1 | 6,6 | 9,0 | 9,2 | 4,0 | 4,7 | |
| | c | 12,7 | 11,5 | 14,1 | 16,1 | 7,5 | 12,7 | 11,8 | 11,3 | 4,8 | 8,8 | 11,7 | 9,3 | 9,1 | 5,3 | 5,6 | 12,9 | 15,7 | 15,2 | 15,1 | 15,6 | 16,1 | 17,8 | 17,1 | 17,2 | 14,4 | 17,0 | 17,4 | 12,4 | 12,4 | |
| Saure Vorb. | a | 1,2 | 1,8 | 2,3 | 2,1 | 1,4 | 1,6 | 1,8 | 2,2 | 0,5 | 0,6 | 1,3 | 1,1 | 0,7 | 0,9 | 1,7 | 2,0 | 1,6 | 1,8 | 1,7 | 1,9 | 2,3 | 2,0 | 2,4 | 2,4 | 2,2 | 2,2 | 1,9 | 2,2 | 2,9 | |
| | b | 1,0 | 1,2 | 2,0 | 1,6 | 0,8 | 1,5 | 1,8 | 1,9 | 0,3 | 0,3 | 0,6 | 0,9 | 1,3 | 0,4 | 0,8 | 1,7 | 1,7 | 1,3 | 1,2 | 2,2 | 1,7 | 2,4 | 2,1 | 2,1 | 2,1 | 2,1 | 2,0 | 1,4 | 1,7 | |
| | d | 1,4 | 1,8 | 2,4 | 2,3 | 1,4 | 1,5 | 1,4 | 2,1 | 0,5 | 0,8 | 1,3 | 1,2 | 0,6 | 0,3 | 0,3 | 0 | 2,2 | 1,3 | 2,2 | 1,9 | 2,1 | 2,7 | 2,4 | 2,6 | 3,0 | 2,3 | 2,7 | 2,3 | 2,2 | |

Bestimmung und Bewertung der Modellparameter β_{ij}

Die Modellparameter wurden nach Gleichung 4-3 identifiziert und deren Signifikanz mit Hilfe des p-Wertes bewertet (siehe Anhang A5). Die zur Beschreibung der Glucose- und Xyloseproduktivität notwendigen mathematischen Parameter β_{ij} wurden für jede Substratvorbehandlung einzeln bestimmt (Tabelle 5.5). Die als nicht signifikant, also durch einen hohen p-Wert gekennzeichneten Parameter β_{ij} , wurden aus dem quadratischen Modellansatz entfernt und in Tabelle 5.5 mit einem X gekennzeichnet. Bei signifikanten Interaktionen zwischen den Variablen (Einflussgrößen) und bei quadratischen Interaktionen durch gleiche Variablen, wurden die Parameter β_{ij} aus den linearen Abhängigkeiten grundsätzlich beibehalten. Nach Änderungen am Modell wurden die Parameter β_{ij} neu bestimmt.

In der Tabelle 5.5 sind für die thermische (160 °C, 1 h), die alkalische (0,1 g g⁻¹TS Ca(OH)₂, 135 °C, 0,5 h) und die saure Vorbehandlungsmethode (0,5 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) die erhaltenen Parameter β_{ij} dargestellt. Die Indizes $i = 1$ stehen für den Temperatureinfluss, $i = 2$ für den Einfluss des pH, $i = 3$ für den Einfluss der Cellulasepräparate „Celluclast“ und „Accellerase 1500“, $i = 4$ für den Einfluss des β -Glucosidasepräparats „Novozym 188“ und $i = 5$ für den Einfluss der Hemicellulasepräparate „NS22002“, „Shearzyme“ und „Pulpzyme“. Werte mit hohem Einfluss auf die Zielgrößen der Glucose- und Xyloseproduktivität sind in Tabelle 5.5 blau markiert dargestellt.

Der Betrag der normierten Parameter β_{ij} gibt den Einfluss jedes einzelnen Parameters β_{ij} auf die Bildung des betrachteten Monosaccharids wieder. Werden nun die zur Beschreibung der Glucosefreisetzung notwendigen Parameter β_{ij} unter diesem Gesichtspunkt für die jeweils durchgeführten Vorbehandlungsmethoden aus Tabelle 5.5 entnommen, so zeigten bei hydrothermischer Substratvorbehandlung vor allem die quadratischen Terme der Temperatur (β_{11}) und des pH (β_{22}) auffallend hohe Beträge von 0,102 und 0,145. Da auch die Parameter der entsprechenden linearen Terme β_1 und β_2 als signifikant erkannt wurden, konnte von einem hohen Einfluss der Temperatur und des pH der Suspensionslösung ausgegangen werden. Die Notwendigkeit von „NS22002“ für die Glucosefreisetzung konnte am hohen Wert des Parameters β_5 von 0,101 abgelesen werden. Die weiteren linearen Parameter β_3 und β_4 von „Celluclast“ und „Novozym 188“ zeigten annähernd identische Werte mit 0,020 und 0,021. Des Weiteren wurden interagierende Einflussgrößen der Reaktionstemperatur mit dem pH,

sowie des pH mit der Konzentration von „NS22002“ identifiziert und anhand der Parameter β_{12} und β_{25} in Tabelle 5.5 beschrieben.

Bei alkalischer und saurer Substratvorbehandlung waren mit Ausnahme der Verwendung des Enzympräparats „Accellerase 1500“ alle linearen Terme und damit die Parameter β_1 bis β_5 für die mathematische Beschreibung der Glucoseproduktivität notwendig. Ein Vergleich von „NS22002“ (β_5) für die alkalische und saure Vorbehandlung des Weizenstrohs zeigte für β_5 eine Abnahme von 0,077 auf -0,011 und damit einen rückläufigen Effekt auf die Glucosefreisetzung. Interagierende Einflussgrößen wurden, wie Tabelle 5.5 zeigt, selten beobachtet und sind meist von geringer Bedeutung. Während der Einfluss des Cellulasepräparats (β_3) und des β -Glucosidasepräparats (β_4) bei hydrothermischer Behandlung nahezu identisch war, konnte bei alkalischer und saurer Vorbehandlung eine deutlich höhere Gewichtung des Cellulasepräparats für die Freisetzung von Glucose festgestellt werden.

Besonderen Einfluss hatte das Cellulasepräparat auch auf die Freisetzung von Xylose, wie die blau markierten Bereiche in Tabelle 5.5 zeigen. Zudem führte die Evaluierung der für die Xylosefreisetzung notwendigen mathematischen Parameter β_{ij} zu einer häufigen Interaktion der Einflussfaktoren. Wie Tabelle 5.5 für das Enzymgemisch aus „Celluclast“, „Novozym 188“ und „NS22002“ und alkalischer Substratvorbehandlung auflistet, wurden fünf signifikante Interaktionsparameter der Einflussgrößen beobachtet. Neben der Interaktion des pH mit „Celluclast“ (β_{23}), „Novozym 188“ (β_{24}) und „NS22002“ (β_{25}) wurden Interaktionen zwischen der Temperatur und NS22002 (β_{15}) sowie zwischen „Celluclast“ und „Novozym 188“ (β_{34}) beobachtet. Besonderen Einfluss hat der Interaktionsparameter von „NS22002“. $\beta_{25} = 0,087$ und $\beta_{15} = 0,077$ verweist auf den Einfluss des pH der Suspensionslösung und der Reaktionstemperatur mit „NS22002“ für die Freisetzung von Xylose. Die Zahlenwerte für Parameter β_4 deuten auf einen geringeren Einfluss von „Novozym 188“ hin ($\beta_{24} = 0,017$ und $\beta_{34} = 0,023$). Die Verwendung des Hemicellulasepräparats „Shearzyme“ anstelle von „NS22002“ reduzierte den Einfluss von „Celluclast“ für die Glucose- und die Xylosebildung, da die Werte der Parameter β_3 abnahmen und die Werte der Parameter β_5 von „Shearzyme“ zunahmen. So betrug $\beta_5 = 0,090$ für Glucose und $\beta_5 = 0,091$ für Xylose. Dieser ist höher als $\beta_3 = 0,079$ für Glucose und $\beta_3 = 0,069$ für Xylose (Tabelle 5.5). Der Einfluss des Hemicellulasepräparats „Shearzyme“ wurde durch die Signifikanz der quadratischen Parameter $\beta_{55} = 0,133$ für die Glucose- und $\beta_{55} = 0,122$ für die Xylosefreisetzung bestätigt.

Tabelle 5.5: Modellparameter β_{ij} mit C_{norm} (höchste Produktivität je Ansatz) für die Normierung verwendete Glucose- und Xyloseproduktivität. Hydrothermisch (160 °C, 1 h), alkalisch (0,1 g g⁻¹_{TS} Ca(OH)₂, 135 °C, 1 h) und saure (0,5 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) Vorbehandlung von Weizenstroh (< 2 mm). Feststoffanteil während der enzymatischen Hydrolyse 8 % (w/w TS). „Celluclast“, „Novozym 188“, „NS22002“ (a), „Accellerase 1500“, „Novozym 188“, „NS22002“ (b), „Celluclast“, „Novozym 188“, „Shearzyme“ (c), „Celluclast“, „Novozym 188“, „Pulpzyme“ (d), 2,0 mg g⁻¹_{TS} ≤ „Novozym 188“ ≤ 6,0 mg g⁻¹_{TS} (*). Parameter β_{ij} mit i = 1 für den Temperatureinfluss, i = 2 für den Einfluss des pH, i = 3 für den Einfluss der Cellulasepräparate „Celluclast“ und „Accellerase 1500“, i = 4 für den Einfluss des β -Glucosidasepräparats „Novozym 188“ und i = 5 für den Einfluss der Hemicellulasepräparate „NS22002“, „Shearzyme“ und „Pulpzyme“. Blau eingefärbte Ziffern markieren die sechs bedeutendsten Modellparameter. Als nicht signifikant erkannte Parameter sind mit X gekennzeichnet.

| Glucose | Enzyme | β_0 | β_1 | β_2 | β_3 | β_4 | β_5 | β_{12} | β_{13} | β_{14} | β_{15} | β_{23} | β_{24} | β_{25} | β_{34} | β_{35} | β_{45} | β_{11} | β_{22} | β_{33} | β_{44} | β_{55} | $C_{norm} / \text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ |
|---------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--|
| Therm. Vorb.* | a | 0,853 | -0,067 | -0,023 | 0,020 | 0,021 | 0,101 | -0,029 | X | X | X | X | X | 0,035 | X | X | X | -0,102 | -0,145 | X | X | X | 16,5 |
| | a | 0,918 | -0,107 | -0,019 | 0,097 | 0,053 | 0,077 | X | X | X | X | X | X | 0,050 | X | X | X | -0,194 | -0,163 | X | X | X | 25,7 |
| | b | 0,897 | -0,144 | 0,023 | 0,106 | 0,032 | 0,145 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | -0,107 | -0,118 | X | X | -0,108 | 25,0 |
| Alk. Vorb. | c | 0,983 | -0,116 | -0,016 | 0,079 | 0,055 | 0,090 | X | X | X | X | X | 0,042 | X | X | X | X | -0,172 | -0,201 | X | X | -0,133 | 39,1 |
| | a | 0,911 | -0,141 | 0,009 | 0,089 | 0,043 | -0,011 | X | X | X | 0,038 | X | X | X | X | X | X | -0,098 | -0,162 | X | X | X | 28,7 |
| | b | 0,894 | -0,132 | 0,052 | 0,114 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | -0,196 | -0,137 | X | X | X | 31,2 |
| Saure Vorb. | d | 0,861 | -0,193 | -0,027 | 0,038 | 0,055 | 0,004 | 0,037 | X | X | 0,063 | X | X | X | X | X | X | -0,247 | -0,189 | X | X | X | 36,2 |
| | Xylose | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Therm. Vorb.* | a | 0,878 | -0,041 | -0,025 | 0,050 | X | 0,186 | X | X | X | 0,085 | X | X | 0,058 | X | X | X | -0,156 | -0,170 | X | X | X |
| a | | 0,936 | -0,054 | -0,053 | 0,085 | 0,027 | 0,040 | X | X | X | 0,077 | -0,023 | 0,017 | 0,087 | 0,023 | X | X | -0,177 | -0,125 | X | X | X | 10,7 |
| b | | 0,805 | -0,046 | 0,041 | 0,071 | 0,039 | 0,181 | 0,047 | X | X | X | X | X | 0,099 | 0,044 | X | X | -0,146 | -0,136 | X | X | X | 11,3 |
| Alk. Vorb. | c | 0,981 | -0,096 | -0,039 | 0,069 | 0,033 | 0,091 | 0,033 | X | X | 0,030 | X | X | 0,025 | X | X | X | -0,137 | -0,141 | X | X | -0,122 | 17,8 |
| | a | 0,917 | -0,159 | 0,015 | 0,110 | 0,035 | 0,013 | 0,042 | X | X | 0,074 | X | X | 0,046 | X | X | X | -0,157 | -0,175 | X | X | X | 2,4 |
| | b | 0,862 | -0,136 | 0,082 | 0,120 | X | 0,032 | X | X | X | X | X | X | 0,080 | X | X | X | -0,241 | -0,151 | X | X | X | 2,4 |
| Saure Vorb. | d | 0,862 | -0,193 | -0,086 | 0,063 | 0,012 | -0,021 | X | -0,032 | -0,037 | 0,032 | -0,054 | X | X | X | -0,028 | X | -0,272 | -0,178 | X | X | X | 3,0 |

Tabelle 5.6: Statistische Parameter für die empirische Modellierung der Zielgrößen Glucose- und Xyloseproduktivität nach 24 h aus vorbehandeltem Weizenstroh. Weizenstrohvorbereitung: Thermisch (160 °C, 1 h), alkalisch (0,1 g g⁻¹_{TS} Ca(OH)₂, 135 °C, 1 h) u. saurer (0,5 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h). „Celluclast“, „Novozym 188“, „NS22002“ (a), „Accellerase 1500“, „Novozym 188“, „NS22002“ (b), „Celluclast“, „Novozym 188“, „Shearzyme“ (c), „Celluclast“, „Novozym 188“, „Pulpzyme“ (d). 2,0 mg g⁻¹_{TS} ≤ „Novozym 188“ ≤ 6,0 mg g⁻¹_{TS} (*).

| Glucose | Enzyme | R² | R²_{angepasst} | p-Wert |
|---------------------------|---------------|----------------------|--|------------------------|
| Thermische Vorbehandlung* | a | 0,9380 | 0,9052 | 1,54·10 ⁻⁸ |
| | a | 0,9628 | 0,9463 | 2,69·10 ⁻¹¹ |
| Alkalische Vorbehandlung | b | 0,9645 | 0,9488 | 1,77·10 ⁻¹¹ |
| | c | 0,9586 | 0,9367 | 5,30·10 ⁻¹⁰ |
| Saure Vorbehandlung | a | 0,9242 | 0,8906 | 1,46·10 ⁻⁸ |
| | b | 0,9256 | 0,9079 | 3,84·10 ⁻¹¹ |
| | d | 0,9424 | 0,9120 | 8,29·10 ⁻⁹ |
| Xylose | | | | |
| Thermische Vorbehandlung* | a | 0,9370 | 0,9091 | 2,87·10 ⁻⁹ |
| | a | 0,9774 | 0,9581 | 2,14·10 ⁻⁹ |
| Alkalische Vorbehandlung | b | 0,9654 | 0,9437 | 9,01·10 ⁻¹⁰ |
| | c | 0,9618 | 0,9338 | 1,29·10 ⁻⁸ |
| Saure Vorbehandlung | a | 0,9620 | 0,9382 | 1,88·10 ⁻⁹ |
| | b | 0,9035 | 0,8680 | 2,28·10 ⁻⁸ |
| | d | 0,9766 | 0,9566 | 2,73·10 ⁻⁹ |

Die statistischen Parameter sind in Tabelle 5.6 zusammengefasst, wobei die Werte des R², R²_{angepasst} und der p-Werte eine hinreichende Genauigkeit der einzelnen Korrelationen zeigen.

Beispielhaft wurde das alkalische Vorbereitungsverfahren (0,1 g g⁻¹_{TS} Ca(OH)₂, 135 °C, 1 h) bei Verwendung des Hemicellulasepräparats „Shearzyme“ aus Tabelle 5.6 betrachtet. Die Abbildung 5.41A und Abbildung 5.41B veranschaulicht das Ergebnis der empirischen Modellierung mit der Referenzbedingung und deren Validierung sowie den optimalen Zielgrößen für die Produktivität von Glucose und Xylose durch eine Paritätsdarstellung. Es konnte eine gute Übereinstimmung zwischen Experiment und Simulation erreicht werden. Die statistischen Parameter betragen für Glucose für

$R^2 = 0,9586$, für $R^2_{\text{angepasst}} = 0,9367$ und einem p-Wert von $5,30 \cdot 10^{-10}$. Für Xylose ergaben sich die statistischen Parameter zu $R^2 = 0,9618$, $R^2_{\text{angepasst}} = 0,9338$ und einem p-Wert von $1,29 \cdot 10^{-8}$. Weitere Paritätsdarstellungen zu den empirischen Modellierungen sind im Anhang A6 bis A8 zu finden.

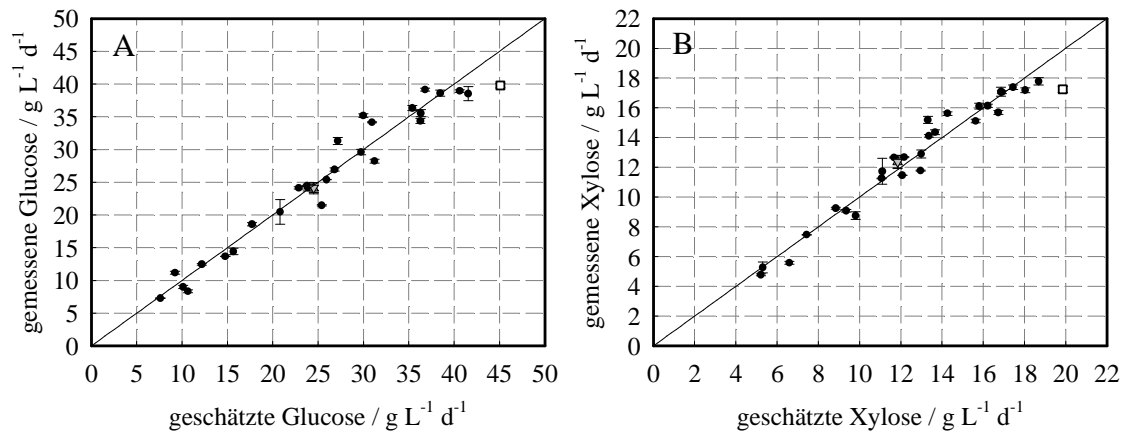


Abbildung 5.41: Paritätsdarstellung für das Enzymgemisch aus den kommerziellen Enzympräparaten „Celluclast“ (Cellulasepräparat), „Novozym 188“ (β -Glucosidasepräparat) und „Shearzyme“ (Hemicellulasepräparat) bei alkalischer Vorbehandlung ($0,1 \text{ g g}^{-1}_{\text{TS}} \text{ Ca(OH)}_2$, $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h) des Weizenstrohs ($< 2 \text{ mm}$) mit einem Feststoffanteil von 8% (w/w TS). Dargestellt ist die Glucose- und Xyloseproduktivität nach 24 h (\bullet) enzymatischer Hydrolyse. Referenzbedingung (\blacktriangledown) $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Celluclast“, $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Novozym 188“, $0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Shearzyme“ mit Validierung (\blacktriangle) und optimaler Produktivität (\square). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen aus einem 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

Der Einfluss der Modellparameter für die Beschreibung der Reaktionstemperatur (β_1) und des pH der Suspension (β_2) ist laut Tabelle 5.5 wesentlich für eine zuverlässige Beschreibung des Antwortverhaltens. In Abbildung 5.42A und Abbildung 5.42B ist die Glucose- und Xyloseproduktivität nach 24 h enzymatischer Hydrolyse veranschaulicht. Die bestimmten Maxima sind durch rote Einfärbung des Antwortverhaltens erkennbar. So betrug die geschätzte Glucoseproduktivität $45,1 \text{ g L}^{-1} \text{d}^{-1}$. Die im 3-fach Parallelansatz validierte optimale Glucoseproduktivität betrug $39,8 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($T = 46,6 \text{ }^\circ\text{C}$). Für Xylose wurde eine maximale Xyloseproduktivität von $19,9 \text{ g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ geschätzt. Das bestimmte Maximum bei der Validierung betrug $17,2 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ Xylose ($T = 46,7 \text{ }^\circ\text{C}$).

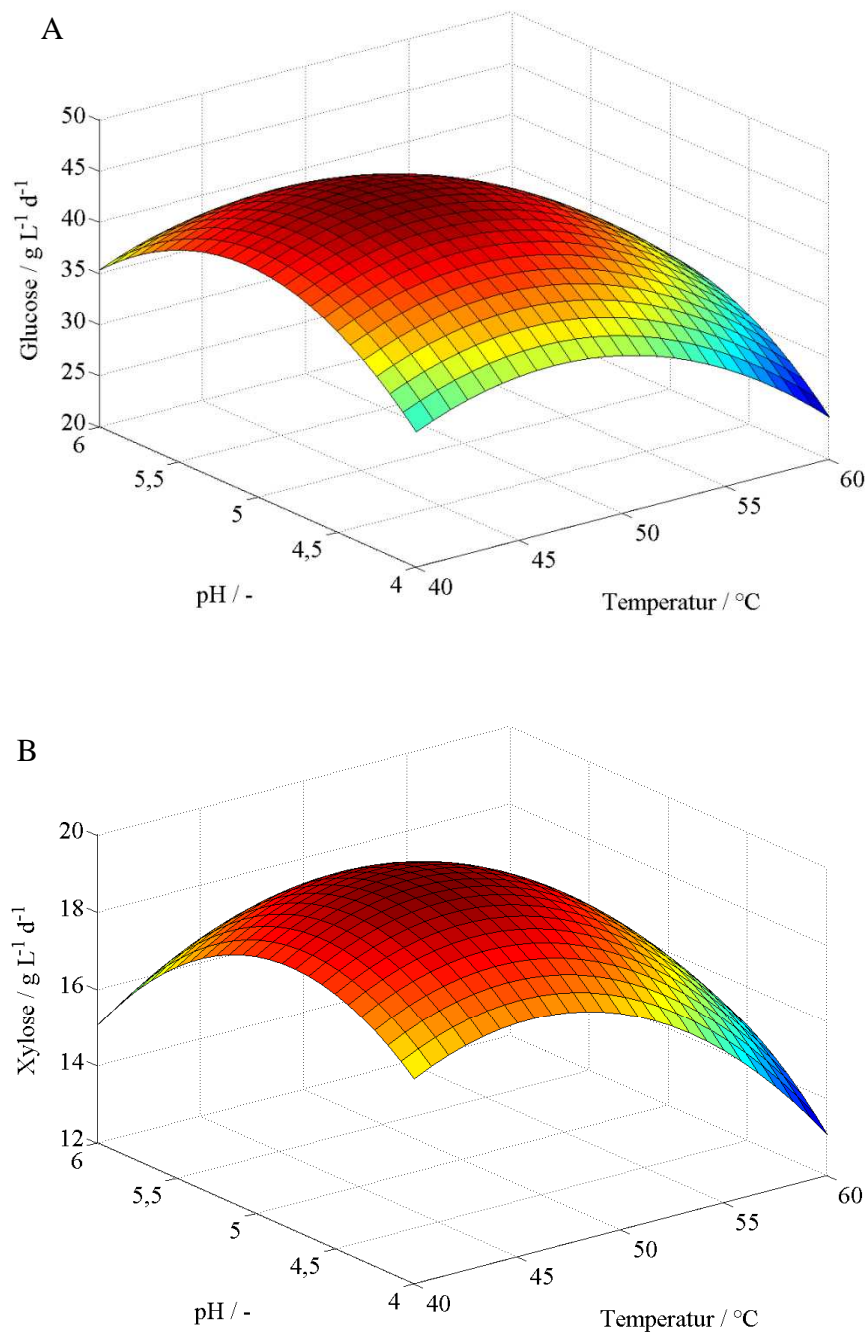


Abbildung 5.42: Glucose- und Xyloseproduktivitäten (A und B) nach 24 h in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur und des pH der Suspensionslösung. 8 % (w/w TS) Feststoffanteil an alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh ($0,1 \text{ g g}^{-1}_{\text{TS}}$ $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $135 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h). Die anderen Einflussgrößen wurden bei den bestimmten Optima fixiert. $45,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Celluclast“, $7,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Novozym 188“, $20,1 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Shearzyme“ (A) und $19,8 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Shearzyme“ (B).

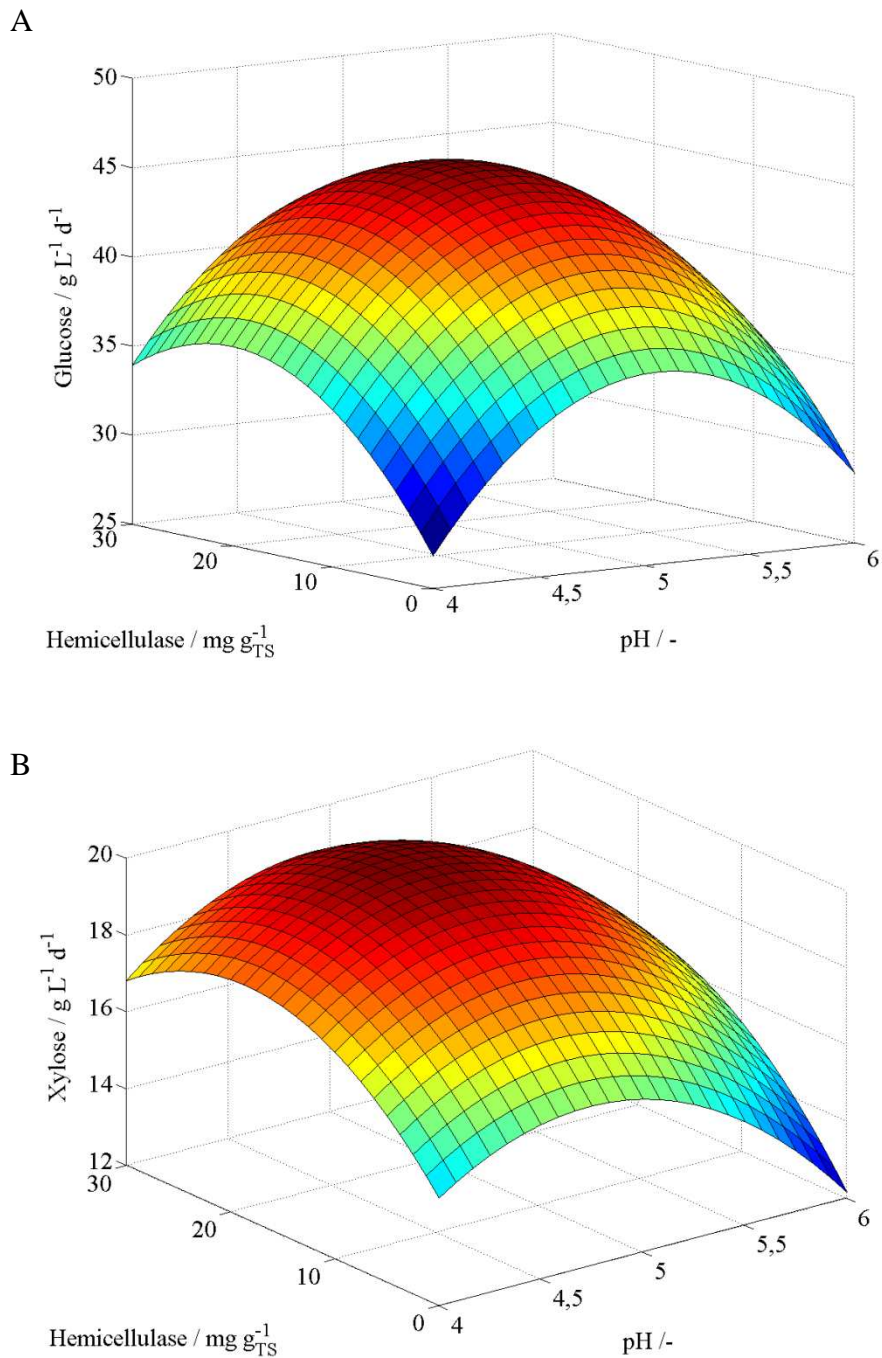


Abbildung 5.43: Glucose- und Xyloseproduktivitäten (A und B) nach 24 h in Abhängigkeit des Hemicellulasepräparats „Shearzyme“ und des pH der Suspensionslösung. 8 % (w/w TS) Feststoffanteil von alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh ($0,1 \text{ g g}_{\text{TS}}^{-1} \text{ Ca(OH)}_2$, $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h). Die anderen Einflussgrößen wurden bei den bestimmten Optima fixiert. Temperatur $46,6 \text{ }^\circ\text{C}$ (A) und $46,7 \text{ }^\circ\text{C}$ (B) mit jeweils $45,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ „Celluclast“ g}_{\text{TS}}^{-1}$ und $7,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}_{\text{TS}}^{-1}$ „Novozym 188“.

Bei einer alkalischen Vorbehandlung des Weizenstrohs und der Verwendung des Hemicellulasepräparats „Shearzyme“ zeigten die hohen Werte des Parameters β_5 mit 0,090 für Glucose und 0,091 für Xylose, die Interaktionsparameter β_{15} und β_{25} sowie der quadratische Parameter β_{55} in Tabelle 5.5 den Einfluss von „Shearzyme“ auf die Glucose- und Xyloseproduktivität an. Dazu ist in Abbildung 5.43 das Hemicellulasepräparat „Shearzyme“ in Abhängigkeit des pH der vorbehandelten Weizenstrohsuspension dargestellt. Die Optima für die Glucose- und Xyloseproduktivität wurden bei pH 5,1 und pH 4,9 für $20,1 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Shearzyme“ und $19,8 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Shearzyme“ mit $45,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Glucose und $19,9 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Xylose bestimmt (Abbildung 5.43A und Abbildung 5.43B).

Validierte Reaktionsbedingungen

Die optimale Reaktionstemperatur für die Freisetzung von Glucose aus vorbehandeltem Weizenstroh lag, wie Tabelle 5.7 zeigt, zwischen $40,9 \text{ }^\circ\text{C}$ und $46,6 \text{ }^\circ\text{C}$ für das Enzymgemisch aus „Celluclast“, „Novozym 188“ und „NS22002“ bei einer sauren Substratvorbehandlung. Die optimale Reaktionstemperatur von $46,6 \text{ }^\circ\text{C}$ lag bei vier von sieben Modellierungen der Glucoseproduktivität vor. Die optimierte Reaktionstemperatur für die Bildung von Xylose lag zwischen $40,0 \text{ }^\circ\text{C}$ und $50,7 \text{ }^\circ\text{C}$ (Tabelle 5.7). Der optimale pH der Suspensionslösung betrug pH 4,9 bis pH 5,1 für die Glucosefreisetzung und pH 4,6 bis pH 5,5 für die Xylosefreisetzung.

Während die optimalen Konzentrationen an Cellulase- und β -Glucosidasepräparaten meist das Maximum des untersuchten Bereiches an Enzymbeladung abbildeten, zeigten die optimierten Beladungen der Hemicellulasepräparate Unterschiede abhängig vom betrachteten Monosaccharid und der Substratvorbehandlung auf. Für die Glucosefreisetzung konnten häufig optimale Beladungen mit dem Hemicellulasepräparat innerhalb des betrachteten Konzentrationsbereiches festgestellt werden. Hemicellulasepräparate waren vor allem bei thermischer und alkalischer Vorbehandlung des Weizenstrohs für die Maximierung der Glucosefreisetzung notwendig. Die zur Glucosefreisetzung optimale Beladung des Enzymgemisches aus „Celluclast“ und „Novozym 188“ mit „Shearzyme“ betrug $20,1 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$, wodurch eine Glucoseproduktivität von $39,8 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ nach 24 h und eine Freisetzung von $458 \pm 5 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ erreicht wurde.

Eine optimale Freisetzung nach 24 h wurde bei alkalischer Vorbehandlung für eine Beladung mit dem Enzympräparat „Shearzyme“ von $19,8 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ mit $198 \pm 2 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Xylose und einer Xyloseproduktivität von $17,2 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ erreicht. Für das Enzymgemisch aus „Celluclast“, „Novozym 188“ und „NS22002“ wurde für die Glucose- und Xylosetreisetzung die maximal mögliche Beladung mit „NS22002“ von $30,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ erkannt und es konnte eine Glucoseproduktivität von $34,2 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ sowie eine Xyloseproduktivität von $14,9 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ erreicht werden.

Für ein saures Vorbehandlungsverfahren war zur Maximierung der Glucose- und Xylosetreisetzung das Hemicellulasepräparat „NS22002“ nicht notwendig ($33,9 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ Glucose und $2,9 \pm 0 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ Xylose). Für die hydrothermische Vorbehandlung der Weizenstrohfasern konnte bei Verwendung von „NS22002“ bei der Xylosetreisetzung eine optimale Enzymbeladung von $22,5 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ bestimmt werden. Bei der Produktion von Glucose lag das bestimmte Optimum mit $30,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ an der oberen Grenze des Variablenbereiches. Dadurch konnte eine Glucoseproduktivität von $14,8 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ sowie eine Xyloseproduktivität von $4,3 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ erreicht werden.

Tabelle 5.7: Geschätzte optimale Reaktionsbedingungen für die Glucose- und Xyloseproduktivität aus hydrothermisch (160 °C, 1 h), alkalisch (0,1 g g⁻¹_{TS} Ca(OH)₂, 135 °C, 1 h) und sauer (0,5 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) vorbehandeltem Weizenstroh (< 2 mm). Feststoffanteil während der enzymatischen Hydrolyse 8 % (w/w TS). Geschätzte und gemessene maximale Glucose- und Xyloseproduktivität nach 24 h. Maximale Produktivität (C_{max}) mit Validierung und der Produktivität der Referenzbedingung C_{ref} ($T = 50$ °C, pH 5,0, 15,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} Cellulase-, 1,9 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} β-Glucosidase- und 0 mg g⁻¹_{TS} Hemicellulasepräparat) mit Standardabweichungen aus einem 3-fach Parallelansatz (ΔC_{max}) und (ΔC_{ref}). „Celluclast“, „Novozym 188“, „NS22002“ (a), „Accellerase 1500“, „Novozym 188“, „NS22002“ (b), „Celluclast“, „Novozym 188“, „Shearzyme“ (c), „Celluclast“, „Novozym 188“, „Pulzyme“ (d), 2,0 mg g⁻¹_{TS} ≤ „Novozym 188“ ≤ 6,0 mg g⁻¹_{TS} (*). Referenz (Ref.). Validierung (Val.).

| Glucose | Enzyme | Temperatur / °C | pH | Cellulase / mg g ⁻¹ _{TS} | β-Glucosidase / mg g ⁻¹ _{TS} | Hemicellulase / mg g ⁻¹ _{TS} | C_{max} geschätzt / g L ⁻¹ d ⁻¹ | C_{max} Val. / g L ⁻¹ d ⁻¹ | ΔC_{max} Val. / g L ⁻¹ d ⁻¹ | C_{ref} / g L ⁻¹ d ⁻¹ | ΔC_{ref} / g L ⁻¹ d ⁻¹ |
|---------------------------|--------|-----------------|-----|--|--|--|---|--|---|---|--|
| Thermische Vorbehandlung* | a | 46,6 | 5,1 | 45,0 | 6,0 | 30,0 | 16,6 | 14,8 | 1,0 | 10,8 | 0,7 |
| | a | 46,6 | 5,1 | 45,0 | 7,0 | 30,0 | 29,9 | 34,2 | 0,1 | 18,6 | 0,3 |
| Alkalische Vorbehandlung | b | 43,3 | 5,1 | 45,0 | 7,0 | 25,1 | 28,3 | 32,1 | 0,3 | 15,8 | 1,1 |
| | c | 46,6 | 5,1 | 45,0 | 7,0 | 20,1 | 45,1 | 39,8 | 0,4 | 24,1 | 0,7 |
| Saure Vorbehandlung | a | 40,9 | 5,0 | 45,0 | 7,0 | 0,0 | 32,6 | 33,9 | 0,2 | 28,3 | 0,8 |
| | b | 46,6 | 5,2 | 45,0 | 4,0 | 15,0 | 32,3 | 30,4 | 1,0 | 26,7 | 1,9 |
| | d | 44,7 | 4,9 | 45,0 | 7,0 | 0,0 | 36,8 | 40,5 | -- | 28,3 | 0,8 |
| Xylose | | | | | | | | | | | |
| Thermische Vorbehandlung* | a | 40,0 | 4,7 | 45,0 | 4,0 | 22,5 | 6,4 | 4,3 | 0,2 | 2,5 | 0,2 |
| | a | 50,7 | 5,1 | 45,0 | 7,0 | 30,0 | 14,9 | 14,9 | 0,2 | 10,0 | 0,5 |
| Alkalische Vorbehandlung | b | 40,0 | 5,2 | 45,0 | 7,0 | 26,3 | 12,1 | 11,8 | 0,2 | 4,7 | 0,1 |
| | c | 46,7 | 4,9 | 45,0 | 7,0 | 19,8 | 19,9 | 17,2 | 0,2 | 12,4 | 0,4 |
| Saure Vorbehandlung | a | 42,3 | 4,8 | 45,0 | 7,0 | 0,0 | 2,8 | 2,9 | 0,0 | 2,2 | 0,1 |
| | b | 47,2 | 5,5 | 45,0 | 4,0 | 30,0 | 2,6 | 2,1 | 0,9 | 1,7 | 0,2 |
| | d | 44,6 | 4,6 | 45,0 | 7,0 | 0,0 | 3,2 | 3,5 | -- | 2,2 | 0,1 |

5.8.2 Maisspindelgranulat

Neben Weizenstroh ist Maisspindelgranulat ein häufig gewähltes Substrat der enzymatischen Hydrolyse, da es in großen Mengen als Reststoff der Agrarindustrie anfällt. Analog zu Weizenstroh (Kapitel 5.8.1) wurde die Abhängigkeit der Glucose- und Xyloseproduktivität nach 24 h enzymatischer Hydrolyse im Satzverfahren von der Temperatur, pH, Beladung des Cellulase-, β -Glucosidase- und Hemicellulasepräparats mit einem quadratischen Polynomansatz empirisch beschrieben. Hierzu wurde basierend auf der Box-Wilson Methode ein Versuchsplan mit 27 Experimenten jeweils im 3-fach Parallelansatz durchgeführt. Anschließend wurden durch multilinere Regression die Modellparameter identifiziert und die Zielgrößen des quadratischen Polynomansatzes bestimmt.

In der Tabelle 5.8 sind diese Einflussgrößen der Reaktionstemperatur, des pH und die Enzymbeladungen mit dem Cellulasepräparat (C_1), β -Glucosidasepräparat (C_2) und dem Hemicellulasepräparat (C_3) mit den jeweils erreichten Glucose- und Xyloseproduktivitäten für verschiedene Vorbehandlungsverfahren des Maisspindelgranulats dargestellt. Deutlich wurde der Einfluss der Enzymgemische auf die Glucose- und Xyloseproduktivität, wobei hohe Enzymbeladungen die Produktivität von Glucose und Xylose steigern konnten. Hohe Produktivitäten sind in der Tabelle 5.8 blau markiert dargestellt. Auffallend niedrige Produktivitäten traten bei einer Reaktionstemperatur von 60 °C in Verbindung mit pH 4 oder pH 6 und geringen Enzymbeladungen auf (Tabelle 5.8, rote Markierungen).

Bestimmung und Bewertung der Modellparameter β_{ij}

Die Modellparameter wurden nach Gleichung 4-3 analog zur empirischen Optimierung von Weizenstroh identifiziert und deren Signifikanz mit Hilfe des p-Wertes bewertet (siehe Anhang A9). Die als nicht signifikant erkannten Parameter β_{ij} wurden aus dem quadratischen Modellansatz entfernt und sind in Tabelle 5.9 durch ein X gekennzeichnet. Bei Interaktionen zwischen den Variablen (Einflussgrößen) und bei quadratischen Termen von Variablen wurden die Parameter β_{ij} aus den linearen Abhängigkeiten stets beibehalten. Nach Änderungen am Modell wurden die Parameter β_{ij} grundsätzlich neu bestimmt.

Tabelle 5.8: Experimentelle Versuchsplanung mit fünf variablen Einflussgrößen (x): Temperatur (T , °C), pH, Cellulase-, β -Glucosidase-, u. Hemicellulasepräparat (C_1 , C_2 , C_3 , $\text{mg}_{\text{Protein}} \text{g}^{-1}_{\text{TS}}$). „Celluclast“, „Novozym 188“, „NS22002“ (a) und „Celluclast“, „Novozym 188“, „Shearzyme“ (b). Produktivität nach 24 h Reaktion für Glucose u. Xylose [$\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$]. Vorbehandlung des Maisspindelgranulats: Alkalisch (alk., $0,1 \text{ g g}^{-1}_{\text{TS}} \text{Ca(OH)}_2$, 135 °C , 1 h) und saure Methode ($0,5 \text{ \% v/v H}_2\text{SO}_4$, 135 °C , 0,5 h). Die drei jeweils höchsten Zuckerkonzentrationen sind mit blauer Farbe und die drei jeweils geringsten Konzentrationen mit roter Farbe markiert.

| Methode | x | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | Referenz | Validierung Referenz | |
|----------------|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----------|----------------------|-----|
| | T | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 40 | 60 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| | pH | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 5,0 | 5,0 | 4,0 | 6,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 |
| | C_1 | 15,0 | 15,0 | 45,0 | 45,0 | 15,0 | 15,0 | 45,0 | 45,0 | 15,0 | 15,0 | 45,0 | 45,0 | 15,0 | 15,0 | 45,0 | 45,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 15,0 | 45,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 15 | 15 |
| | C_2 | 1,0 | 7,0 | 1,0 | 7,0 | 1,0 | 7,0 | 1,0 | 7,0 | 1,0 | 7,0 | 1,0 | 7,0 | 1,0 | 7,0 | 1,0 | 7,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 1,0 | 7,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 1,9 | 1,9 |
| | C_3 | 30,0 | 0 | 0 | 30,0 | 0 | 30,0 | 30,0 | 0 | 0 | 30,0 | 30,0 | 0,0 | 30,0 | 0 | 0 | 30,0 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 0 | 30,0 | 15,0 | 0 | 0 | 0 | |
| Glucose | Enzyme | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Alk. Vorb. | a | 39,1 | 28,9 | 40,1 | 53,1 | 18,1 | 52,0 | 54,7 | 32,4 | 8,9 | 28,4 | 34,6 | 20,5 | 40,2 | 8,0 | 12,1 | 55,5 | 49,0 | 48,2 | 51,4 | 56,7 | 52,4 | 55,3 | 48,4 | 56,5 | 46,8 | 57,8 | 55,4 | 32,7 | 29,5 | |
| Alk. Vorb. | b | 41,9 | 24,5 | 35,4 | 59,7 | 18,3 | 50,3 | 40,5 | 38,3 | 10,9 | 41,4 | 50,0 | 31,2 | 26,2 | 12,7 | 12,7 | 69,8 | 54,1 | 70,0 | 48,0 | 46,4 | 61,7 | 62,9 | 53,7 | 67,9 | 42,0 | 65,8 | 61,6 | 27,6 | 36,6 | |
| Saure Vorb. | b | 56,6 | 75,6 | 74,1 | 99,7 | 22,6 | 50,0 | 35,7 | 52,2 | 38,6 | 63,3 | 99,8 | 69,2 | 28,9 | 10,1 | 1,1 | 47,7 | 78,2 | 125 | 104 | 68,0 | 96,2 | 107 | 83,2 | 115 | 99,7 | 104 | 104 | 70,6 | 83,2 | |
| Xylose | Enzyme | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Alk. Vorb. | a | 16,5 | 20,3 | 29,7 | 20,2 | 13,4 | 31,8 | 32,3 | 19,2 | 7,6 | 14,1 | 24,2 | 19,1 | 35,8 | 6,6 | 9,8 | 36,8 | 26,4 | 33,5 | 30,2 | 37,9 | 32,6 | 33,7 | 32,5 | 32,2 | 32,3 | 33,3 | 33,4 | 24,7 | 22,5 | |
| Alk. Vorb. | b | 36,0 | 17,1 | 26,4 | 38,4 | 13,8 | 38,3 | 38,1 | 22,7 | 9,1 | 26,6 | 37,1 | 26,1 | 42,4 | 11,3 | 9,2 | 52,7 | 42,7 | 52,8 | 34,1 | 41,1 | 48,0 | 49,1 | 48,8 | 51,9 | 29,1 | 51,8 | 49,1 | 20,6 | 23,6 | |
| Saure Vorb. | b | 7,3 | 5,8 | 7,7 | 11,3 | 3,4 | 5,9 | 4,9 | 4,4 | 1,5 | 5,8 | 10,3 | 4,4 | 5,3 | 0,3 | 0 | 6,5 | 8,4 | 13,3 | 10,2 | 7,7 | 9,9 | 12,3 | 10,2 | 12,0 | 8,9 | 12,1 | 11,4 | 5,4 | 6,0 | |

In Tabelle 5.9 sind die einzelnen Parameter β_{ij} zur empirischen Modellierung der enzymatischen Hydrolyse von vorbehandeltem Maisspindelgranulat mit einem Feststoffanteil von 18 % (w/w TS) dargestellt. Die als signifikant und notwendig erachteten Parameter variieren je nach Art der Vorbehandlung und dem jeweils verwendeten Enzymgemisch für die betrachteten Produkte Glucose und Xylose.

Auffällig war bei der Modellierung der enzymatischen Hydrolyse nach alkalischer Substratvorbehandlung der hohe Betrag des Parameters β_5 zur Beschreibung der Einflüsse der Hemicellulasepräparate mit 0,192 und 0,174 für Glucose und 0,128 und 0,207 für Xylose bei den Enzymgemischen „Celluclast“ und „Novozym 188“ mit dem jeweils verwendeten Hemicellulasepräparat „NS22002“ bzw. „Shearzyme“. Zudem zeigten die hohen Beträge des Parameters β_5 von „Shearzyme“ für Glucose und Xylose den Einfluss des Hemicellulasepräparats (Tabelle 5.9, blaue Markierungen). Dies wurde auch aus den Interaktionsparametern β_{15} und β_{45} für Glucose und β_{25} für Xylose sowie dem quadratischen Term mit Parameter β_{55} deutlich. Ein ähnliches Verhalten konnte für das Hemicellulasepräparat „NS22002“ beobachtet werden, wobei der Interaktionsparameter β_{25} des pH einen hohen Wert mit 0,148 bei der Xylosetreisetzung einnimmt. Des Weiteren zeigten die Parameter β_{15} und β_{11} die Signifikanz der Reaktionstemperatur.

Bei saurer Vorbehandlung ist der Einfluss von „Shearzyme“ (β_5) produktabhängig. Während der Parameter β_5 für die Glucoseproduktivität zwar als signifikant erkannt wurde, zeigt $\beta_5 = 0,063$ im Vergleich zur Xyloseproduktivität ($\beta_5 = 0,138$) eine um ≈ 50 % reduzierte Wertigkeit. „Celluclast“ (β_3) ist für die Produkte Glucose und Xylose gleichermaßen bedeutsam. „Novozym 188“ (β_4) hatte bei alkalischer als auch saurer Vorbehandlung einen geringen Einfluss auf die Xyloseproduktivität. Für die Freisetzung von Glucose war „Novozym 188“ besonders in Verbindung mit „Shearzyme“ notwendig (Tabelle 5.9).

Tabelle 5.9: Modellparameter β_{ij} mit C_{norm} (höchste Produktivität je Ansatz) für die Normierung verwendete Glucose- und Xyloseproduktivität. Alkalische (0,1 g g⁻¹ TS Ca(OH)₂, 135 °C, 1 h) und saure (0,5 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) Vorbehandlung des Maisspindelgranulats (< 1 mm). Feststoffanteil während der enzymatischen Hydrolyse 18 % (w/w TS). Parameter β_{ij} mit i = 1 für den Temperatureinfluss, i = 2 für den Einfluss des pH, i = 3 für den Einfluss des Cellulasepräparats „Celluclast“, i = 4 für den Einfluss des β -Glucosidasepräparats „Novozym 188“ und i = 5 für den Einfluss der Hemicellulasepräparate „NS22002“ und „Shearzyme“. „Celluclast“, „Novozym 188“, „NS22002“ (a) und „Celluclast“, „Novozym 188“, „Shearzyme“ (b). Blau eingefärbte Ziffern markieren die sechs bedeutendsten Modellparameter. Als nicht signifikant erkannte Parameter sind mit einem X gekennzeichnet.

| Glucose | Enzyme | β_0 | β_1 | β_2 | β_3 | β_4 | β_5 | β_{12} | β_{13} | β_{14} | β_{15} | β_{23} | β_{24} | β_{25} | β_{34} | β_{35} | β_{45} | β_{11} | β_{22} | β_{33} | β_{44} | β_{55} | $C_{norm} / \text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ |
|---------------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--|
| Alk. Vorb. | a | 0,979 | -0,107 | 0,024 | 0,079 | 0,038 | 0,192 | X | X | X | X | X | X | 0,081 | X | X | X | -0,158 | -0,064 | X | -0,092 | -0,094 | 57,9 |
| | b | 0,888 | -0,030 | -0,022 | 0,089 | 0,084 | 0,174 | X | 0,030 | X | 0,040 | X | 0,049 | X | X | X | 0,030 | X | -0,239 | X | X | -0,143 | 70,0 |
| Saure Vorb. | b | 0,842 | -0,027 | -0,162 | 0,064 | 0,063 | 0,063 | X | X | -0,033 | 0,052 | -0,042 | X | X | X | X | X | -0,145 | -0,270 | X | X | X | 125,0 |
| Xylose | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Alk. Vorb. | a | 0,915 | -0,033 | 0,061 | 0,068 | X | 0,128 | X | X | X | 0,082 | -0,040 | | 0,148 | X | X | X | -0,170 | X | -0,086 | X | -0,096 | 37,9 |
| | b | 0,929 | X | 0,019 | 0,060 | 0,025 | 0,207 | X | X | X | X | -0,026 | 0,026 | 0,065 | 0,044 | X | X | X | -0,227 | X | X | -0,173 | 52,8 |
| Saure Vorb. | b | 0,857 | -0,048 | -0,108 | 0,070 | X | 0,138 | X | X | X | 0,064 | -0,058 | X | X | X | X | X | X | -0,282 | X | X | -0,166 | 13,3 |

Tabelle 5.10: Statistische Parameter für die empirische Modellierung der Zielgrößen Glucose- und Xyloseproduktivität nach 24 h aus vorbehandeltem Maisspindelgranulat. „Celluclast“, „Novozym 188“, „NS22002“ (a), „Celluclast“, „Novozym 188“, „Shearzyme“ (b).

| Glucose | Enzyme | R² | R²_{angepasst} | p-Wert |
|--------------------------|---------------|----------------------|--|----------------------|
| alkalische Vorbehandlung | a | 0,9489 | 0,9169 | $1,92 \cdot 10^{-8}$ |
| | b | 0,9518 | 0,9165 | $7,09 \cdot 10^{-8}$ |
| saure Vorbehandlung | b | 0,8900 | 0,8213 | $7,03 \cdot 10^{-6}$ |
| Xylose | | | | |
| alkalische Vorbehandlung | a | 0,9246 | 0,8775 | $3,92 \cdot 10^{-7}$ |
| | b | 0,9510 | 0,9204 | $1,37 \cdot 10^{-8}$ |
| saure Vorbehandlung | b | 0,8963 | 0,8502 | $2,28 \cdot 10^{-7}$ |

Die statistischen Parameter sind in Tabelle 5.10 zusammengefasst, wobei die Werte des R^2 , $R^2_{\text{angepasst}}$ und der p-Werte eine hinreichende Genauigkeit der einzelnen Korrelationen zeigen.

Beispielhaft wurde für das alkalische Vorbehandlungsverfahren ($0,1 \text{ g g}^{-1}_{\text{TS}} \text{ Ca(OH)}_2$, $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h) das Hemicellulasepräparat „Shearzyme“ aus Tabelle 5.10 betrachtet. Die Abbildung 5.44A und Abbildung 5.44B veranschaulicht das Ergebnis der Modellschätzungen mit der Referenzbedingung und deren Validierung für die Produktivität von Glucose und Xylose durch eine Paritätsdarstellung. Zudem sind die optimalen Zielgrößen veranschaulicht. Es konnte eine gute Übereinstimmung zwischen Experiment und Simulation erreicht werden. Dies kann an den statistischen Parametern erkannt werden. Für Glucose betragen diese für $R^2 = 0,9518$, $R^2_{\text{angepasst}} = 0,9165$ und einem p-Wert von $7,09 \cdot 10^{-8}$. Für Xylose ergeben sich die statistischen Parameter zu $R^2 = 0,9510$, $R^2_{\text{angepasst}} = 0,9204$ und einem p-Wert von $1,37 \cdot 10^{-8}$. Weitere Paritätsdarstellungen zu den durchgeführten Substratvorbehandlungen sind im Anhang A10 zu finden.

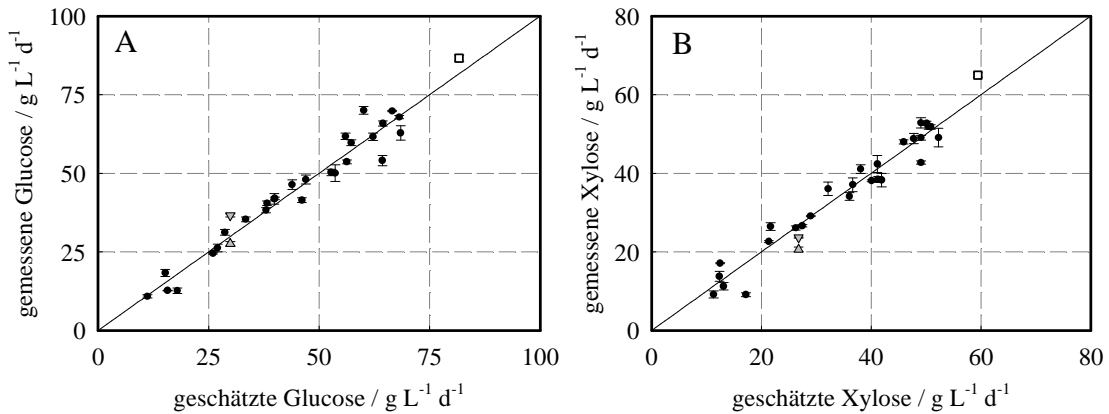


Abbildung 5.44: Paritätsdarstellung für das Enzymgemisch aus den kommerziellen Enzympräparaten „Celluclast“ (Cellulasepräparat), „Novozym 188“ (β -Glucosidasepräparat) und „Shearzyme“ (Hemicellulasepräparat) bei alkalischer Vorbehandlung ($0,1 \text{ g g}^{-1}_{\text{TS}} \text{ Ca(OH)}_2$, $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h) des Maisspindelgranulats ($< 1 \text{ mm}$) mit einem Feststoffanteil von 18% (w/w TS). Dargestellt sind die Glucose- und Xyloseproduktivität nach 24 h (●). Referenzbedingung (▽) $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Celluclast“, $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Novozym 188“, $0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Shearzyme“ mit Validierung (▲) und optimaler Produktivität (□). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen aus einem 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

Bei einer alkalischen Vorbehandlung des Weizenstrohs und der Verwendung des Hemicellulasepräparats „Shearzyme“ zeigten die hohen Werte des Parameters β_5 mit $0,174$ für Glucose und $0,207$ für Xylose, die Interaktionsparameter β_{15} , β_{25} und β_{45} , sowie der quadratische Parameter β_{55} in Tabelle 5.9 den Einfluss von „Shearzyme“ auf die Glucose- und Xyloseproduktivität an.

Dazu ist in Abbildung 5.45 das Hemicellulasepräparat „Shearzyme“ in Abhängigkeit des pH der vorbehandelten Weizenstrohsuspension dargestellt. Die Optima für die Glucose- und Xyloseproduktivität von $81,7 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Glucose und $59,4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Xylose konnten bei pH $5,1$ für $27,8 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Shearzyme“ und $24,3 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Shearzyme“ bestimmt werden (Abbildung 5.45A und Abbildung 5.45B).

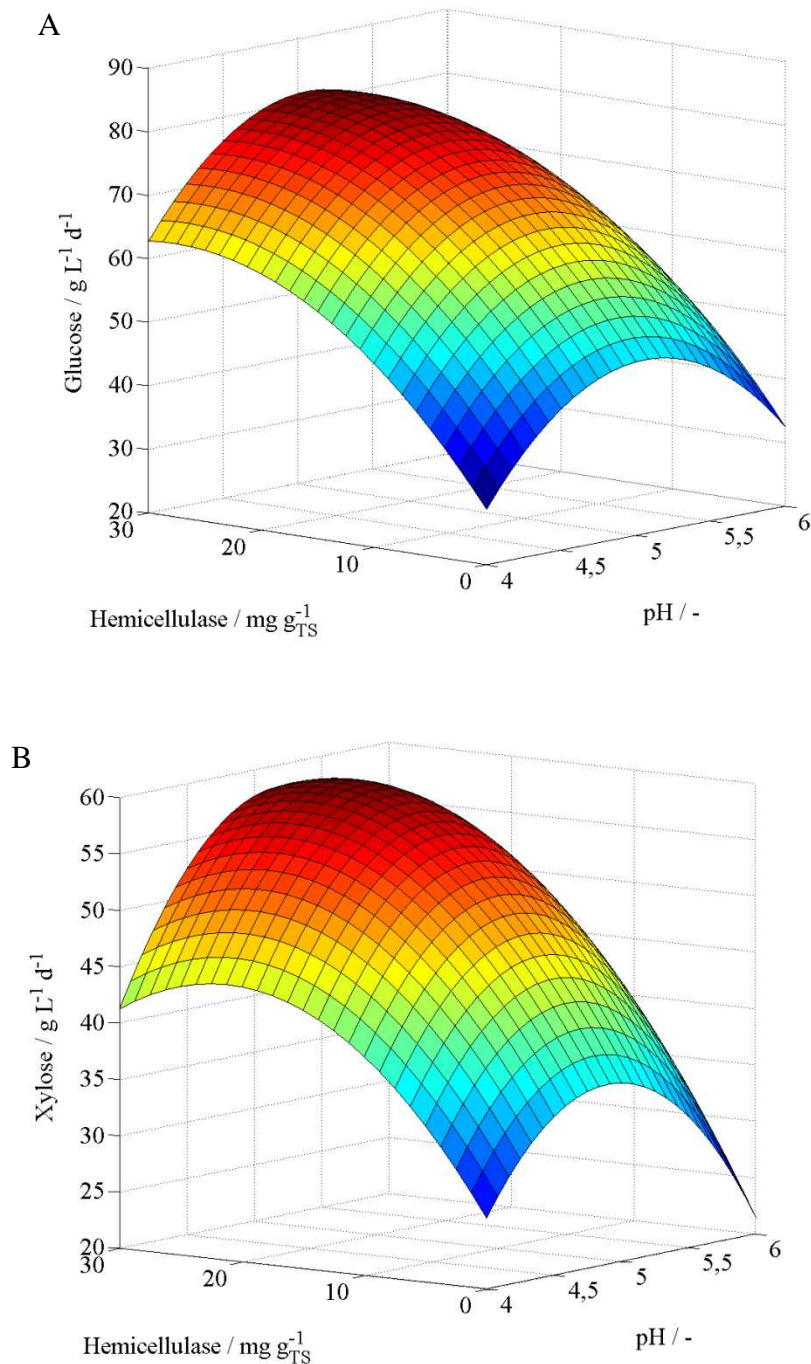


Abbildung 5.45: Glucose- und Xyloseproduktivitäten (A und B) nach 24 h in Abhängigkeit des Hemicellulasepräparats „Shearzyme“ und des pH der Suspensionslösung. 18 % (w/w TS) Feststoffanteil von alkalisch vorbehandeltem Maisspindelgranulat ($0,1 \text{ g g}_{\text{TS}}^{-1} \text{ Ca(OH)}_2$, $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h). Die anderen Einflussgrößen wurden bei den bestimmten Optima fixiert. Temperatur $60,0 \text{ }^\circ\text{C}$ (A) und $50,0 \text{ }^\circ\text{C}$ (B) mit jeweils $45,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}_{\text{TS}}^{-1}$ „Celluclast“, $7,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}_{\text{TS}}^{-1}$ „Novozym 188“.

Validierte Reaktionsbedingungen

Die optimalen Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 5.11 zusammenfassend dargestellt und wurden experimentell validiert. Die Reaktionstemperaturen unterscheiden sich deutlich voneinander. So betrug die optimale Temperatur für die Xylosetreisetzung aus zuvor saurer Substratvorbehandlung 40,0 °C und liegt damit am unteren Ende des betrachteten Temperaturbereiches. Für die Bildung von Glucose aus alkalisch vorbehandeltem Maisspindelgranulat betrug bei Verwendung von „Shearzyme“ die optimale Reaktionstemperatur 60,0 °C. Die optimalen Temperaturen für das Enzymgemisch „Celluclast“, „Novozym 188“ und „NS22002“ lagen bei 46,6 °C für Glucose und 52,7 °C für Xylose. So wurden nach 24 h Reaktionsdauer $71,5 \pm 1,5 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ Glucose und $45,0 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ Xylose bei einem pH von 5,8 und pH 6,0 erreicht. Die freigesetzte Glucose betrug $326 \pm 7 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und an Xylose $205 \pm 2 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Durch die Verwendung des Hemicellulasepräparats „Shearzyme“, anstelle von „NS22002“, konnte die Glucoseproduktivität bei alkalischer Vorbehandlung des Maisspindelgranulats auf $86,6 \pm 1,1 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ($395 \pm 5 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose) und die Xyloseproduktivität auf $65,0 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ($296 \pm 3 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Xylose) gesteigert werden. Die Vergleichswerte der Referenzbedingung betragen $36,6 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ für Glucose und $23,6 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ für Xylose, wobei die Enzymbeladungen bei $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ für „Celluclast“ und „Novozym 188“ lagen. Durch eine saure Vorbehandlung des Maisspindelgranulats bei einer Reaktionstemperatur von 49,7 °C sowie einem pH der Reaktionslösung von pH 4,6, konnte die Glucoseproduktivität für das Enzymgemisch aus „Celluclast“, „Novozym 188“ und „Shearzyme“ auf $119,6 \pm 2,2 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ erhöht werden. Dies entspricht einer Glucosefreisetzung von $545 \pm 10 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$.

Tabelle 5.11: Geschätzte optimale Reaktionsbedingungen für die Glucose- und Xyloseproduktivität aus alkalisch ($0,1 \text{ g g}^{-1}_{\text{TS}} \text{ Ca(OH)}_2$, $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h) und sauer ($0,5 \text{ } \%$ v/v H_2SO_4 , $135 \text{ }^\circ\text{C}$, $0,5 \text{ h}$) vorbehandeltem Maisspindelgranulat ($< 1 \text{ mm}$). Feststoffanteil während der enzymatischen Hydrolyse $18 \text{ } \%$ (w/w TS). Geschätzte und gemessene maximale Glucose- und Xyloseproduktivität nach $24 \text{ h } C_{\text{max}}$ mit Validierung und der Produktivität aus der Referenzbedingung C_{ref} ($T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5,0$, $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ Cellulase-, $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ β -Glucosidase-, $0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ Hemicellulasepräparat) mit Standardabweichungen aus jeweils einem 3-fach Parallelansatz ΔC_{max} und ΔC_{ref} . „Celluclast“, „Novozym 188“, „NS22002“ (a) und „Celluclast“, „Novozym 188“, „Shearzyme“ (b).

| Glucose | Enzyme | Temperatur / $^\circ\text{C}$ | pH | Cellulase / $\text{mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ | β -Glucosidase / $\text{mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ | Hemicellulase / $\text{mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ | C_{max} geschätzt / $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ | C_{max} / $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ | ΔC_{max} / $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ | C_{ref} / $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ | ΔC_{ref} / $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ |
|--------------------------|--------|----------------------------------|-----|---|--|---|---|--|---|--|---|
| Alkalische Vorbehandlung | a | 46,6 | 5,8 | 45,0 | 4,6 | 30,0 | 70,6 | 71,5 | 1,4 | 29,5 | 0,8 |
| | b | 60,0 | 5,1 | 45,0 | 7,0 | 27,8 | 81,7 | 86,6 | 1,1 | 36,6 | 0,5 |
| | b | 49,7 | 4,6 | 45,0 | 7,0 | 30,0 | 133,9 | 119,6 | 2,2 | 83,2 | 2,3 |
| Xylose | | | | | | | | | | | |
| Alkalische Vorbehandlung | a | 52,7 | 6,0 | 32,4 | 4,0 | 30,0 | 44,0 | 45,0 | 0,5 | 22,5 | 0,3 |
| | b | 50,0 | 5,1 | 45,0 | 7,0 | 24,3 | 59,4 | 65,0 | 0,6 | 23,6 | 0,1 |
| | b | 40,0 | 4,7 | 45,0 | 4,0 | 18,4 | 13,4 | 10,9 | 0,5 | 6,0 | 0,2 |

6 Diskussion

6.1 Rührorgane zur Homogenisierung von Suspensionen und viskosen Medien

Die bisher für Anwendungen im Milliliter-Maßstab entwickelten Rührorgane mussten Anforderungen genügen, die für die Kultivierung von aeroben Mikroorganismen notwendig sind. So sind vor allem hohe Sauerstoffeinträge durch das Rührorgan wichtig, um den Sauerstoffbedarf von Mikroorganismen wie Bakterien und Hefen decken zu können. Hierfür wurde von Puskeiler *et al.* (2005a) ein gasinduzierendes Rührorgan entwickelt, das abhängig von der Rührerdrehzahl einen k_{La} von $0,1 \text{ s}^{-1}$ bis $0,4 \text{ s}^{-1}$ erreicht. Weitere Forschungsarbeiten zeigten die Notwendigkeit von scherkraftarmen Rührorganen, gekennzeichnet durch besonders niedrige lokale Energiedissipationen für morphologisch veränderliche Mikroorganismen (Hortsch *et al.*, 2010).

Der neuartige H- und S-Rührer soll im Gegensatz dazu die Homogenisierung von Suspensionen bei hohem Feststoffanteil während der enzymatischen Hydrolyse ermöglichen. Dazu wurden die Rührorgane mit dem Programm CATIA V5R20 konstruiert und die Geometrie auf die Anforderungen im Milliliter-Maßstab angepasst. So konnte der Durchmesser der zylindrischen Grundgeometrie auf 14,4 mm verkleinert werden. Gleichzeitig war es möglich, größere Dauermagnete von $\varnothing 7 \times 3 \text{ mm}$ anstelle der bisher verwendeten Dauermagnete von $\varnothing 6 \times 3 \text{ mm}$ zu verwenden. Die Dauermagnete wurden analog zum gasinduzierenden Rührorgan durch eine Kappe aus dem Kunststoff PEEK vom Reaktionsraum getrennt (Kusterer, 2007).

Durch die diagonale Positionierung der beiden Paddel des S-Rührers wurde eine effektivere Durchmischung der Rührmedien durch CFD-Simulation nachgewiesen und radialer, tangentialer und axialer Transport von Feststoffpartikeln beobachtet (Brüning, 2012). Die sich vertikal nach oben verjüngende Geometrie des S-Rührers ermöglicht zudem automatisierte Probenahmen und Titrationsen mit einem Pipettierroboter.

6.2 Rührercharakterisierung im Milliliter-Rührreaktor

6.2.1 Homogenisierung

Ein direkter Vergleich der Homogenisierung aus unterschiedlichen Mischsystemen kann nicht über Mischzeiten erfolgen, da diese von der jeweils verwendeten Reaktorgeometrie abhängig sind. Die Mischzeiten für die untersuchten Rührmedien ermöglichen jedoch eine Darstellung von Einflüssen durch die jeweilige Rührer- und Reaktorgeometrie in Form von Strömungsbrechern. Eine Newtonsche Glycerinlösung mit 80 % (w/w) Glycerinanteil führte für den S-Rührer und einer Rührerdrehzahl von 800 min^{-1} zu einer Mischzeit von kleiner 10 s, unabhängig von der Bewehrung der Milliliter-Rührreaktoren. Die Mischzeiten für den H-Rührer betragen etwa 40 s und nehmen damit etwa die 4-fache Zeitdauer des S-Rührers in Anspruch. Bei geringerer Rührerdrehzahl von 200 min^{-1} ist der geforderte Homogenitätszustand von 97 % nur für den S-Rührer bestimmbar. Die Mischzeiten betragen $48,8 \pm 14,0 \text{ s}$ in bewehrten Rührreaktoren, während der Homogenitätszustand in unbewehrten Rührreaktoren bereits nach $19,4 \pm 0,3 \text{ s}$ erreicht war, so dass eine effektive Homogenisierung durch den S-Rührer möglich war. Der Einsatz von Strömungsbrechern hatte allerdings bei 80 % (w/w) Glycerinlösung keine Reduzierung der Mischzeit zur Folge, sondern führte bei niedrigen Rührerdrehzahlen zu verlangsamter Homogenisierung. Zudem war die relative Standardabweichung der Mischzeit bei geringer Rührerdrehzahl von 200 min^{-1} in bewehrten Milliliter-Rührreaktoren mit 29 % sehr hoch.

Besonders deutlich wird der negative Einfluss von Strömungsbrechern auch bei einer strukturviskosen Xanthanlösung (0,4 % w/w). Die Mischzeit des S-Rührers betrug $68,3 \pm 5,8 \text{ s}$ mit Strömungsbrecher und einer Rührerdrehzahl von 800 min^{-1} , ohne Strömungsbrecher lag diese bei $31,3 \pm 3,2 \text{ s}$. Die Mischzeiten bei Verwendung des H-Rührers sind damit um 58 % ohne Strömungsbrecher und um 44 % bei Verwendung von Strömungsbrechern höher als die des S-Rührers, so dass wie zuvor für die Newtonsche Glycerinlösung auch für die strukturviskose Xanthanlösung der S-Rührer in Milliliter-Rührreaktoren ohne Strömungsbrecher als bevorzugte Systemkonfiguration gilt. Ein ähnliches Mischzeitverhalten konnte für eine Suspension von 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose beobachtet werden. Für unbewehrte Reaktoren bei einer Rührerdrehzahl von 200 min^{-1} wurde mit dem S-Rührer bereits nach $34 \pm 5 \text{ s}$ ein homogener Zustand (97 %) nachgewiesen. Beim H-Rührer wurde dieser

Homogenitätsgrad erst nach 98 ± 17 s erreicht, so dass der S-Rührer auch für die Homogenisierung von Suspensionen besser geeignet ist.

Die beeinträchtigenden Einflüsse von Strömungsbrechern werden gestützt durch Aussagen von Kraume (2003), der den Einsatz von Strömungsbrechern nur im turbulenten Strömungsbereich und damit bei hohen Rührerdrehzahlen befürwortet. Obwohl nach Weber (1995) in beiden Reaktorarten für den Mischeffekt notwendige axiale Umwälzungen der Flüssigkeit stattfinden, führt die Viskosität der Flüssigkeit zum Aufbau einer Grenzschicht an der Reaktorwand. Bei niedrigen Rührerdrehzahlen ist es daher wahrscheinlich, dass Strömungsbrecher die bei ausreichenden Scherkräften den axialen Mischeffekt verstärken würden, bei niedrigen Scherkräften allerdings die Bildung von nicht durchmischten Totzonen begünstigen.

6.2.2 Leistungseintrag

Signifikante Unterschiede im volumenspezifischen Leistungseintrag bestehen zwischen Milliliter-Rührreaktoren bei Verwendung von Strömungsbrechern. Strömungsbrecher erhöhen den Leistungseintrag (Brucato *et al.*, 2010). Der betragsmäßige Unterschied zwischen dem Leistungseintrag war allerdings abhängig von der Rührerdrehzahl und nahm mit der Drehzahl weiter zu, wobei der Leistungseintrag des H-Rührers größer war als der des S-Rührers. So erreichte der H-Rührer bei Verwendung einer Newtonschen Glycerinlösung (80 % w/w) und einer Rührerdrehzahl von 1500 min^{-1} einen maximalen Leistungseintrag von 6 W L^{-1} . Die entsprechenden Leistungseinträge einer Weizenstrosuspension (5 % w/w TS) und einer Suspension mikrokristalliner Cellulose (20 % w/w TS) lagen bei 5 W L^{-1} und 4 W L^{-1} . Die Leistungseinträge des S-Rührers waren etwa $0,5 \text{ W L}^{-1}$ bis $1,5 \text{ W L}^{-1}$ geringer als die des H-Rührers. Hortsch (2011) konnte einen Leistungseintrag des Paddelrührers bei 1500 min^{-1} von 6 W L^{-1} und für das gasinduzierende Rührorgan von 3 W L^{-1} nachweisen. Mit einem entsprechenden Leistungseintrag von 1 W L^{-1} ist der Leistungseintrag der S-Rührer deutlich niedriger. Jedoch wurde der Leistungseintrag durch Feststoffpartikel erhöht und war zudem von der Partikelgröße abhängig. So erhöhte sich der Leistungseintrag bei Verwendung einer Partikelgröße der Weizenstrosuspension von 0,7 mm bis 2,0 mm anstelle einer Partikelgröße von kleiner 0,7 mm um 140 % von $2,1 \text{ W L}^{-1}$ auf $5,1 \text{ W L}^{-1}$ ($n = 1500 \text{ min}^{-1}$). Es wird vermutet, dass die Zunahme des Leistungseintrags durch einen Anstieg der Viskosität bei Suspensionen verursacht wurde.

Die Newtonzahl (Ne) betrug beim S-Rührer im turbulenten Strömungsbereich und bewehrten Milliliter-Rührreaktoren 3,8. Beim H-Rührer lag Ne bei 5,0 und ist dadurch etwas höher als die des gasinduzierenden Rührorgans mit $Ne = 3,7$. Die Newtonzahl des H- und S-Rührers ist der Newtonzahl von 6-Blatt Scheibenrührern, die $Ne = 4$ bis 5 aufzeigten (Zlokarnik, 2005; Betts *et al.*, 2006), ähnlich. Nach Hortsch (2011) führte die Verwendung des Paddelrührers in unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren zu einer geringen Newtonzahl von 1,3.

6.2.3 Scheinbare Schergeschwindigkeit

Metzner und Otto (1957) bestimmten eine das Rührsystem kennzeichnende Größe, die Metzner-Otto Konstante (k) von 13 für einen 6-Blatt Scheibenrührer. Mit dieser Konstante können scheinbare Schergeschwindigkeiten abgeschätzt und für Maßstabsübertragungen genutzt werden. Die Metzner-Otto Konstante und die hieraus abgeleiteten Kenngrößen sind als Richtwerte anzusehen.

Beispielsweise bestimmte Ducla *et al.* (1983) für den Scheibenblattrührer k zu 11,5. Zudem existieren weitere Konzepte zur Beschreibung der scheinbaren Schergeschwindigkeit (Kelly und Gigas, 2003; Perez *et al.*, 2006), die einen größeren Gültigkeitsbereich besitzen. Abhängig vom gewählten Rührorgan und dem Einsatz von Strömungsbrechern betragen die Metzner-Otto Konstanten der hier entwickelten Rührsysteme zwischen 8,3 und 11,8, wobei Strömungsbrecher diese erhöhten und zu höheren scheinbaren Schergeschwindigkeiten führten. Daher sind Reaktoren ohne Strömungsbrecher für scherarme Anwendungsgebiete bevorzugt einzusetzen. Allerdings sollten höhere scheinbare Schergeschwindigkeiten, wie beim S-Rührer beobachtet, zu höheren Scherintensitäten führen und damit die Homogenisierung in Milliliter-Rührreaktoren positiv beeinflussen.

6.3 Milliliter-Rührreaktoren für die enzymatische Hydrolyse von suspendierten Pflanzenmaterialien

6.3.1 Auswahl des Reaktionssystems

Die Auswahl von Rührreaktoren erfolgt entsprechend deren Rühraufgabe. Meistens werden als Bioreaktoren bewehrte Reaktoren eingesetzt (Brucato *et al.*, 2010).

Während es bei Realisierung gleicher scheinbarer Viskosität zu keiner merklichen Veränderung der anfänglichen Glucose- und Xylosefreisetzung aus der strukturviskosen Suspension mit Maisspindelgranulat (6 % w/w TS) kam, zeigte eine Newtonsche Glycerinlösung mit geringem Anteil an Maisspindelgranulat (0,5 % w/w TS) und einer Viskosität von 36 mPa s einen deutlichen Einfluss des Reaktor- und Rührertyps. Höhere Glucose- und Xylosekonzentrationen signalisierten eine bessere Durchmischung bei Verwendung des S-Rührers anstelle des H-Rührers für geringe Rührerdrehzahlen ($n = 100 \text{ min}^{-1}$). Für den späteren Einsatz des S-Rührers bei $n \leq 500 \text{ min}^{-1}$ sind neben optimaler reaktionstechnischer Voraussetzungen vor allem hohe homogenisierbare Feststoffanteile (> 6 % w/w TS) bei möglichst großen Partikelabmessungen (> 0,25 mm) interessant. Brucato *et al.* (2010) konnte zeigen, dass der Stofftransport von Suspensionen durch eine Zunahme des Partikeldurchmessers (< 1 mm) in Rührreaktoren ohne Strömungsbrecher kaum beeinflusst wird, weshalb S-Rührer in Milliliter-Rührreaktoren ohne Strömungsbrecher für die enzymatische Hydrolyse von suspendierten Pflanzenmaterialien geeignet erscheinen.

6.3.2 Verfahrenstechnische Charakterisierung der S-Rührer in unbewehrten Reaktoren

Für den Vergleich der Partikelbeanspruchung in unterschiedlichen Reaktionssystemen wird meist das Verhältnis aus der maximalen lokalen Energiedissipation zur mittleren Energiedissipation ($\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi}$) herangezogen. Das untersuchte Rührsystem, bestehend aus dem S-Rührer in unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren, zeigte ein $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi}$ -Verhältnis von 7,4. Ein Vergleich des $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi}$ -Verhältnisses mit anderen für Milliliter-Rührreaktoren entwickelten Rührorganen ordnet den S-Rührer in unbewehrten Reaktoren zwischen dem gasinduzierenden Rührorgan ($\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi} = 10$; Hortsch, 2011) und dem Paddelrührer ($\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi} = 6$; Hortsch, 2011) ein. Das deutlich höhere $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi}$ -Verhältnis von 10 und die

dadurch höhere Partikelbeanspruchung beim gasinduzierenden Rührorgan ist auch auf die Verwendung von Milliliter-Rührreaktoren mit Strömungsbrechern zurückzuführen. Für klassische Rührreaktoren wurde ein $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi}$ -Verhältnis von 10 bis 30 beobachtet (Liepe *et al.*, 1988; Kresta, 1998; Kraume, 2003). In Schüttelkolben wurde ein $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi}$ -Verhältnis von bis zu 6 beschrieben (Peter, 2007).

Da bereits für geringe Leistungseinträge von $\approx 0,5 \text{ W L}^{-1}$ Mischzeiten von 5 s bis zum Eintreten des Homogenitätskriteriums von 97 % Durchmischung in Suspensionen mit einem Feststoffanteil von bis zu 20 % (w/w TS) erreicht wurden, kann die Skalierbarkeit von Milliliter-Rührreaktoren aus Sicht dieser beiden verfahrenstechnischen Größen als gesichert gelten. Eine Darstellung der Mischzeit in dimensionsloser Form durch die Durchmischungskennzahl ($n \cdot \theta_{0,97}$) ermöglichte jedoch den Vergleich mit anderen Rührsystemen.

Die Durchmischungskennzahl ist nach Zlokarnik (1970) bei Suspensionen eine Funktion der Reynoldszahl (Re) und der Archimedeszahl (Ar), wobei Ar den Einfluss der Dichteunterschiede der beiden Phasen wiedergibt (Gleichung 3-33). Dieser wurde hier nicht eingehend untersucht. Die scheinbare dynamische Viskosität (η_{app}) für die Suspensionen war allerdings für die Berechnung der scheinbaren Reynoldszahl (Re_{app}) notwendig. Das Nicht-Newtonsche Viskositätsverhalten der Suspensionen wurde dabei durch den Konsistenzindex (K) und den Fließindex (m) beschrieben. Ein Vergleich zeigt, dass die ermittelten Konsistenzindexe $K = 8674 \text{ mPa s}^m$ für eine 5 % (w/w TS) Weizenstrohsuspension und $K = 3111 \text{ mPa s}^m$ für eine Suspension mit 6 % (w/w TS) Maisspindelgranulat zwischen den von Pimenova und Hanley (2004) mit verdünnter Säure vorbehandelten Maisspindeln für einen Feststoffanteil von 10 % ($K = 1870 \text{ mPa s}^m$) und 20 % ($K = 71820 \text{ mPa s}^m$) beschriebenen K -Werten liegen. Der Fließindex betrug 0,04 für eine 5 % (w/w TS) Weizenstrohsuspension und ist damit geringer als der Fließindex einer mit verdünnter Säure vorbehandelten Maisspindelsuspension mit $m = 0,08$ für einen Feststoffanteil von 10 % und 0,06 für 20 % (Pimenova und Hanley, 2004). Für eine Suspension mit 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose ($m = 0,39$) und 6 % (w/w TS) gemahlenem Maisspindelgranulat ($m = 0,21$, $< 250 \mu\text{m}$) wurde jedoch eine geringere Abhängigkeit von der Schergeschwindigkeit beobachtet.

Da das Anhaften von Feststoffpartikeln an den Wänden des Messsystems problematisch für eine zuverlässige Bestimmung der Viskosität sein kann, ist die durchgeführte

rheologische Methode auf einen Feststoffanteil von maximal 5 % (w/w TS) Weizenstroh, 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose und 6 % (w/w TS) Maisspindelgranulat beschränkt. Um höhere Biomasseanteile realisieren zu können, wurden spezielle Messsysteme für Suspensionen und zur Bestimmung des rheologischen Verhaltens mit einem Feststoffanteil von bis zu 30 % und 40 % diskutiert (Pimenova und Hanley, 2003; Stickel *et al.*, 2009). Eine vielversprechende Methode besteht aus einer kegelförmigen Messgeometrie und ermöglicht die Reproduzierbarkeit von rheologischen Messergebnissen auch bei hohen Feststoffanteilen (Knutsen und Liberatore, 2009). Zudem konnte durch gezielte Zugabe von chemischen Zusätzen die Viskosität bei hohen Feststoffanteilen gesenkt werden (Knutsen und Liberatore, 2010).

Das resultierende Verhalten der Durchmischungskennzahl von der scheinbaren Reynoldszahl weist bei doppellogarithmischer Auftragung einen linear abnehmenden Funktionsverlauf für die Suspensionen aus 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose und 5 % (w/w TS) Weizenstroh auf. Dieser Verlauf führte bei den von Zlokarnik (2005) untersuchten Mischsystemen zu einem hohen Anteil laminarer Strömungsverhältnisse, während $n \cdot \theta_{0,97} = \text{const.}$ auf eine zunehmende turbulente Strömung verweisen würde.

6.4 Enzymatische Hydrolyse mikrokristalliner Cellulose in Milliliter-Rührreaktoren

Für die enzymatische Verzuckerung mikrokristalliner Cellulose sind verschiedene Enzyme notwendig. Medve *et al.* (1998) berichtete vom synergistischen Zusammenwirken von Cellobiohydrolasen (CBH) [E.C. 3.2.1.91], Endoglucanasen (EG) [E.C. 3.2.1.4] und β -Glucosidasen (BG) [E.C. 3.2.1.21].

Die erzielte Glucosekonzentration betrug 123 g L^{-1} ($492 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$) bei einem Feststoffanteil von 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose, während bei einem Feststoffanteil von 5 % (w/w TS) eine Glucosekonzentration von 45 g L^{-1} ($885 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$) in der Flüssigphase der Suspension vorlag. Die relativen Standardabweichungen aus 3-fach Parallelansätzen in Milliliter-Rührreaktoren betrugen entsprechend nur 6 % und 9 %, so dass die enzymatische Hydrolyse auch bei hohen Feststoffanteilen erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Der Abnahme der Glucoseausbeute mit ansteigendem Feststoffanteil können folgedessen keine apparativen Gründe zugrundeliegen. Die Wahl der

β -Glucosidasekonzentration ist ausschlaggebend für den Erfolg der enzymatischen Hydrolyse mit hohen Glucoseausbeuten, da sich die Produkte Cellobiose und Glucose inhibierend auswirken können (Bommarius *et al.*, 2008). Bei einer Glucosekonzentration von 123 g L^{-1} ist eine Inhibierung von β -Glucosidasen wahrscheinlich. Ist die β -Glucosidaseaktivität der Reaktion zu gering, kommt es zur Anreicherung des Produkts Cellobiose, welches als Inhibitor des Enzyms Cellobiohydrolase CBH I bekannt ist (Bansal *et al.*, 2009; Holtzapfle *et al.*, 1984 und 1990). CBH I ist eine Exoglucanase des Cellulasepräparats „Celluclast“. Tatsächlich konnte im Ansatz mit 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose Cellobiose in einer Konzentration von $8,4 \text{ g L}^{-1}$ nachgewiesen werden. Die Konzentration von Cellobiose betrug damit nur 7 % der gebildeten Glucosekonzentration. Trotzdem könnte eine höhere Konzentration des β -Glucosidasepräparats „Novozym 188“ die Akkumulation von Cellobiose verhindern und damit hohe Ausbeuten an Glucose ermöglichen (Bommarius *et al.*, 2008).

Ein anderer Einflussfaktor auf die enzymatische Hydrolyse stellt die Kristallinität der mikrokristallinen Cellulose dar. Aktuelle Untersuchungen bestimmen den Kristallinitätsindex von mikrokristalliner Cellulose (Avicel PH-101) auf 0,53 bis 0,58 (Sathitsuksanoh *et al.*, 2011). Da Cellulasen bevorzugt den amorphen Anteil umsetzen würde dieser bei einem Feststoffanteil von 20 % (w/w TS) und einer Glucoseausbeute von 44 % nahezu vollständig hydrolysiert.

Eine Enzyminaktivierung aufgrund zu hoher Scherkräfte wird hingegen als unwahrscheinlich angesehen, da nach Kapitel 5.2.3 bei einer Rührerdrehzahl von 200 min^{-1} eine scheinbare Schergeschwindigkeit von nur 33 s^{-1} vorlag und nach Kapitel 5.3.2 die maximale lokale Energiedissipation des S-Rührers nur $0,3 \text{ W kg}^{-1}$ betrug. Eine Enzyminaktivierung von Hydrolasen wurde bisher für sehr hohe Rührerdrehzahlen von 2000 min^{-1} bei gleichzeitig einsetzender Oberflächenbegasung beobachtet (Ganesh *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1982). Kaya *et al.* (1996) konnte eine Inaktivierung von Hemicellulasen bei einer hohen Schergeschwindigkeit von 14500 s^{-1} beobachten. Unter realistischeren Prozessbedingungen konnten von Samaniuk *et al.* (2011) höhere Zuckerausbeuten bei gesteigerter Intensität der Durchmischung möglicherweise aufgrund einer verringerten Stofftransportlimitierung, homogeneren Verteilung der Enzyme und verbesserter Zugänglichkeit des Substrats nachgewiesen werden.

6.5 Enzymatische Hydrolyse von Weizenstroh und Maisspindelgranulat in Milliliter-Rührreaktoren

6.5.1 Einfluss von pH und Temperatur

Um die enzymatische Hydrolyse in effizienter Weise zu betreiben, sind die Reaktionstemperatur und der pH einer Suspension aus vorbehandeltem Weizenstroh zwei entscheidende Parameter. Häufig ist eine Abschätzung der Prozessbedingungen anhand optimaler Bedingungen für einzelne Enzyme schwierig, da Enzympräparate aus einer Mischung von mehreren Enzymen wie Cellobiohydrolasen, Endoglucanasen und β -Glucosidasen bestehen. So beschrieben Zhang und Lynd (2004) eine Zunahme der β -Glucosidaseaktivität von 45 °C auf 50 °C um 39 %. Die Cellobiohydrolase I (CBH I wird auch als Cel7A bezeichnet) aus *Trichoderma reesei* besitzt eine thermostabilisierende Cellulose-Bindungs Domäne (CBM), die bei einer Temperatur von 50 °C stabilisierend auf die katalytisch aktive Domäne (CD) wirkt. So zeigten die kinetischen Daten eine verlangsamte Inaktivierung von CBH I mit CBM verglichen mit CD (Hall *et al.*, 2011). Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur von 50 °C auf 60 °C verringerte allerdings die gebildete Glucosemenge nach 48 h Hydrolysedauer mit dem Cellulasepräparat „Celluclast“ um 42 % und bei Verwendung von „Accellerase 1500“ um 31 %. Durch die stufenweise Absenkung des pH von pH 5,0 auf pH 4,0 und pH 3,5 reduzierte sich die Glucosefreisetzung um 41 % und 50 % bei „Celluclast“ sowie 36 % und 46 % bei „Accellerase 1500“. Ein ähnliches Verhalten konnte bei der Hydrolyse von vorbehandelten Maisspindelgranulaten beobachtet werden, weshalb für die Referenzbedingung eine Reaktionstemperatur von 50 °C und ein pH von 5,0 gewählt wurde.

6.5.2 Substratzusammensetzung, Feststoffgehalt und Partikelgröße

Da die Analyse der Substratzusammensetzung bisher aufwändig, diese aber für die Bewertung eines Aufschlussverfahrens notwendig ist, wird gegenwärtig intensiv an vereinfachten und beschleunigten Verfahren der quantitativen Substratanalyse gearbeitet (Tamaki und Mazza, 2011). Für die Charakterisierung des Weizenstrohs wurde die von Sluiter *et al.* (2008) publizierte Methode angewandt und der Einfluss der hydrothermischen Vorbehandlung auf die Zusammensetzung von Weizenstroh untersucht. Mit einer hydrothermischen Vorbehandlung des Weizenstrohs bei einem

Feststoffanteil von 10 % (w/w TS), konnte die Zusammensetzung ohne weitere chemische Zusätze beeinflusst werden. Bei ähnlichen Kennzahlen von $\log(R_o) = 3,4$ für eine Temperatur von 140 °C für 3 h sowie $\log(R_o) = 3,5$ bei 160 °C für 1 h, wurden vergleichbare Veränderungen im Weizenstroh beobachtet. Eine Bewertung durch diese Kennzahl scheint für den schnellen Vergleich der Intensität einer hydrothermischen Vorbehandlung möglich. Für Weizenstroh konnte Sidiras *et al.* (2011) optimierte hydrothermische Vorbehandlungsbedingungen von 180 °C für 70 min finden, wobei die Freisetzung von Xylose maximiert gleichzeitig aber der Abbau von Xylose zu Furfural minimiert wurde ($\log(R_o) = 4,2$). Dadurch konnten 76 % (w/w) Xylose aus dem Weizenstroh herausgelöst und der Abbau von Xylose auf 5 % minimiert werden.

Ein Vergleich der Zusammensetzung von gemahlenem Weizenstroh (< 2 mm) und gemahlenem Maisspindelgranulat (< 1 mm) verdeutlicht den hohen Einfluss des Pflanzenmaterials, so betrug der Glucananteil bei Weizenstroh $37,8 \pm 3,5$ %, bei Maisspindelgranulat betrug dieser 47,1 % (Tabelle 4.2). Der Ligninanteil betrug $20,5 \pm 0,8$ % bei Weizenstroh und 6,8 % bei Maisspindelgranulat. Entsprechend ist der Hemicelluloseanteil mit 37,3 % bei Maisspindelgranulat, verglichen mit ≈ 25 % bei Weizenstroh deutlich höher. Die Substratzusammensetzung sollte die enzymatische Hydrolyse beeinflussen und zu unterschiedlichen Monosaccharidfreisetzungen aus den Pflanzenmaterialien führen.

Partikelgröße

Eine Verringerung des mittleren Partikeldurchmessers um den Faktor 33 von 25,52 μm auf 0,78 μm erhöhte die Ausbeute bei der enzymatischen Hydrolyse von mikrokristalliner Cellulose von 50 % auf 90 % (Yeh *et al.*, 2010). Wurden anstelle reiner Cellulose lignocellulosehaltige Pflanzenmaterialien wie Weizenstroh und Maisspindelgranulat für die enzymatische Hydrolyse eingesetzt, so war auch hier die Partikelgrößenverteilung ein wichtiger Einflussfaktor, der die gebildete Menge an Glucose beeinflusst (Maache-Rezzoug *et al.*, 2011). Durch eine feinere Zerkleinerung der Weizenstrohfaser und einer Reduzierung der maximalen Faserlänge auf 10 % von 2 mm auf 0,2 mm, konnte die Ausbeute an Glucose bei hydrothermischer Vorbehandlung (135 °C, 1 h) um 38 % auf $128 \pm 8 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ gesteigert werden. Allerdings war die gelöste Glucosekonzentration immer noch gering, weshalb zusätzliche Vorbehandlungen des Weizenstrohs zur enzymatischen Verzuckerung

notwendig waren. Hierfür wurde ein säurehaltiges Substrataufschlussverfahren (1 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) gewählt und die gelöste Glucosemenge auf $386 \pm 35 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für das feingemahlene Weizenstroh gesteigert. Dabei wurde eine geringere Erhöhung der Glucosefreisetzung um 26 % beobachtet. Maache-Rezzoug *et al.* (2011) zeigte bei Verwendung von Partikelgrößen zwischen 50 µm und 600 µm anstelle von 600 µm bis 1000 µm abhängig von der Vorbehandlung des Weizenstrohs eine um $\approx 20 \%$ erhöhte Glucosefreisetzung. Silva *et al.* (2012) konnte durch gemahlenes Weizenstroh mit 100 µm anstelle 800 µm mittlerem Partikeldurchmesser die Gesamtausbeute von Monosacchariden auf 36 % und die Ausbeute von Glucose auf 40 % steigern. Durch eine weitergehende Zerkleinerung auf 10 µm wurde die Gesamtausbeute an Monosacchariden auf 46 % erhöht. Die Glucoseausbeute konnte nach Silva *et al.* (2012) aufgrund einer verringerten Kristallinität der Cellulose sogar auf 76 % gesteigert werden. Ein Vergleich zu Maisspindelgranulat aus saurer Vorbehandlung (1 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) zeigte nur eine geringe Abhängigkeit der Glucosefreisetzung von der untersuchten Partikelgröße ($< 250 \text{ µm}$ bzw. $< 1 \text{ mm}$). Möglicherweise wurde die Freisetzung von Glucose durch die unterschiedlichen Ligninanteile im Weizenstroh (20,5 % w/w TS) und Maisspindelgranulat (6,8 % w/w TS, Tabelle 4.2) beeinflusst, so dass das Stofftransport- und Adsorptionsverhalten auf mikroskopischer Ebene für das unterschiedliche Verhalten der beiden Substrate verantwortlich ist. Denkbar wären allerdings auch veränderte makroskopische Eigenschaften, die durch Granulierung von Maisspindeln oder einer Erhöhung der Rührerdrehzahl von 200 min^{-1} auf 500 min^{-1} entstanden sind.

Feststoffanteil

Mit unterschiedlichen Feststoffanteilen an hydrothermisch vorbehandeltem Weizenstroh, jedoch konstanter Rührerdrehzahl, wurde der Einfluss der Homogenisierung in Milliliter-Rührreaktoren während der enzymatischen Hydrolyse untersucht. Für die untersuchten Feststoffanteile der Weizenstrohsuspension zwischen 4 % und 10 % (w/w TS) konnte nur zu Beginn der enzymatischen Reaktion eine merkliche Beeinflussung der gebildeten Glucose durch die Feststoffanteile festgestellt werden. Für eine Vorbehandlungstemperatur von 160 °C war dieser Einfluss geringer als bei 140 °C. Es ist wahrscheinlich, dass für eine Rührerdrehzahl von 200 min^{-1} bei gleichzeitig hohem Feststoffanteil von 10 % (w/w TS) Limitierungen durch den

Stofftransport entstanden sind und dadurch die Reaktionsrate zu Beginn reduziert wurde. Mit zunehmender Reaktionsdauer trat dann eine zunehmende Verflüssigung der Suspension ein, die Viskosität nahm ab und für die Glucosefreisetzung ergaben sich für die verschiedenen Feststoffanteile nahezu identische Werte ($\approx 140 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$). Die hohe Viskosität der Suspension, die bei hohen Feststoffanteilen vor allem zu Beginn der Reaktion für die Homogenisierung problematisch sein kann, könnte durch Zugabe der Endoglucanase (EG II bzw. Cel5A) reduziert werden, so dass auch Haufwerke (15 % w/w) hydrothermisch vorbehandelten Weizenstrohs durch die höhere EG II-Aktivität enzymatisch verzuckert werden können (Szijarto *et al.*, 2011). Zudem könnte durch chemische Zusätze die Viskosität bei hohen Feststoffanteilen gesenkt werden (Knutsen und Liberatore, 2010). Die Glucoseausbeuten aus hydrothermisch vorbehandeltem Weizenstroh ($160 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, $\log(R_0) = 3,5$, Enzymbeladung: $16,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$) betragen nur $33 - 38 \pm 3 \%$ und waren damit gering, wobei eine mögliche Kontamination durch Mikroorganismen als unwahrscheinlich gilt, da der pH bei $\text{pH } 5,0 \pm 0,3$ nahezu konstant blieb und keine Milchsäure detektiert werden konnte. Des Weiteren konnte Pallapolu *et al.* (2011) vergleichbare Glucoseausbeuten von $36,5 \%$ nach 24 h und $40,4 \%$ nach 72 h für amerikanische Rutenhirse mit einer hydrothermischen Vorbehandlung ($200 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min, $\log(R_0) = 3,9$) erreichen. Die Enzymbeladung betrug $33 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ mit dem Cellulasepräparat „Spezym-CP“ und dem β -Glucosidasepräparat „Novozym 188“.

Eine mit Erhöhung des Feststoffanteils abnehmende Glucosefreisetzung wurde allerdings mit hydrothermisch vorbehandeltem Maisspindelgranulat ($135 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h) beobachtet. Der Feststoffanteil der Suspension konnte mit bis zu 18% deutlich höher gewählt werden als bei Weizenstroh, so dass ein produktinhibierender Einfluss wahrscheinlich ist. Die relative Standardabweichung eines 3-fach Parallelansatzes in Milliliter-Rührreaktoren betrug nur 6% bei einem Feststoffanteil von 18% (w/w TS). Wurde der Feststoffanteil auf 6% (w/w TS) reduziert, verringerte sich die Standardabweichung geringfügig auf 4% , so dass die enzymatische Hydrolyse für vorbehandeltes Maisspindelgranulat mit einem Feststoffanteil von bis zu 18% (w/w TS) erfolgreich miniaturisiert werden konnte.

Sun und Cheng (2002) beschrieben den Verlauf der enzymatischen Hydrolyse durch die Adsorption der Enzyme auf der Substratoberfläche, den Abbau des Substrates und die anschließende Desorption vom Substrat. Bei der Hydrolyse von vorbehandeltem Weizenstroh ($160 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h) konnte eine Abnahme der Enzymaktivität in der Flüssigphase

der Suspension um 50 % bis 70 % während einer Reaktionsdauer von 48 h für die beiden verwendeten synthetischen Substrate p-Nitrophenyl-Cellobiosid und p-Nitrophenyl-Glucosid registriert werden. Die Inaktivierung könnte am irreversiblen Adsorptionsverhalten von Enzymen liegen (Sun und Cheng, 2002). Grundsätzlich sind aber für die Inaktivierung von Enzymen mehrere Ursachen denkbar. Gebildete Glucose, akkumulierte Cellobiose und andere Mono- und Polysaccharide, wie Xylose und Xylooligomere wirken inhibierend auf Cellulasen (Bommarius *et al.*, 2008; Qing und Wyman, 2011b). Während eine direkte Produktinhibierung von Endoglucanasen und Cellobiohydrolasen durch Cellobiose existiert, wirkt sich Glucose größtenteils indirekt über eine Inhibierung der β -Glucosidase negativ auf die Aktivität von Endoglucanasen und Cellobiohydrolasen aus. Des Weiteren stellen Cellulose und Cellobiose Substrate für Hydrolasen dar, bei denen eine Substratinhibierung nachgewiesen wurde (Andric *et al.*, 2010). Eine Transglycosylierung von Glucose und Cellobiose zu Oligosacchariden wurde für β -Glucosidasen beobachtet. So zeigten Schmid und Wandrey (1989) eine Transglycosylierung für die β -Glucosidase aus *Trichoderma reesei*, dem Produktionsorganismus von „Celluclast“ und Watanabe *et al.* (1992) für die β -Glucosidase aus *Aspergillus niger* dem Produzenten von „Novozym 188“.

Weiter können geringe Anteile phenolytischer Verbindungen und Furanverbindungen (Hydroxymethylfurfural, Furfural) die Reaktion durch Enzyminaktivierung oder Inhibierung in negativer Weise beeinflussen (Kim *et al.*, 2011). Einer Inaktivierung der im Enzymgemisch enthaltenen Exoglucanasen könnte durch die Zugabe von Bovine Serum Albumin (BSA) begegnet werden (Brethauer *et al.*, 2011). Auch eine Erhöhung der Konzentration der Enzympräparate „Celluclast“ und „Novozym 188“ ermöglicht es, einer Inaktivierung zu begegnen und die Glucoseausbeuten für vorbehandeltes Weizenstroh und für vorbehandeltes Maisspindelgranulat zu steigern. Zudem wäre eine Mehrfachzugabe von Enzymen durch sequentielles zu dosieren in periodischen Abständen möglich (Yang *et al.*, 2011). Die Zugabe von Hemicellulasen und ergänzenden Enzymen würde die Glucoseausbeute weiter erhöhen (Alvira *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2011; Qing und Wyman, 2011b). Wesentliche Bedeutung hat zudem die Substratvorbehandlung auf die Monosaccharidausbeute während der enzymatischen Hydrolyse.

6.5.3 Substratvorbehandlung

Die Resistenz von reiner mikrokristalliner Cellulose vor der enzymatischen Verzuckerung wird nur durch die intra- und intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Die hohe Kristallinität behindert zwar die enzymatische Hydrolyse, diese könnte jedoch durch eine alkalische Vorbehandlung reduziert werden, so dass der Einsatz von nur zwei Cellobiohydrolasen (CBH I und CBH II) ausreicht, um die Cellulose vollständig zu hydrolysieren (Igarashi *et al.*, 2011). Dass Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waalsche Wechselwirkungen zwischen Saccharidketten die Zugänglichkeit von lignocellulosehaltigen Pflanzenmaterialien verringern, ist bekannt (Sathitsuksanoh *et al.*, 2011), jedoch wird die enzymatische Hydrolyse durch Hemicellulose- und Ligninstrukturen zusätzlich behindert (Mussatto *et al.*, 2008). Die Glucoseausbeuten bei milden Bedingungen, niedriger Prozesstemperatur und ohne weitere chemische Zusätze sind nur sehr gering und führten bei einer hydrothermischen Vorbehandlung (135 °C, 1 h) zu einer Glucosefreisetzung von 93 mg g⁻¹_{TS}. Wurde die Vorbehandlungstemperatur auf 190 °C erhöht, führten Veränderungen im Weizenstroh zu einer Glucosefreisetzung von 243 mg g⁻¹_{TS}. Durch eine alkalische oder saure Katalysatorzugabe in Form von Calciumhydroxid oder Schwefelsäure konnte die Glucose- und Xylosefreisetzung weiter gesteigert werden. Da während saurer Substratvorbehandlungen hohe Anteile der Hemicellulose gelöst wurden ($\approx 264 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Xylose bei Weizenstroh oder $\approx 341 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Xylose bei Maisspindelgranulat), sind die anschließend durch enzymatische Hydrolyse erreichten Xylosekonzentrationen gering. Höhere enzymatische Xylosefreisetzungen konnten durch eine alkalische Vorbehandlung mit $151 \pm 8 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ erreicht werden, wobei die relative Standardabweichung nur 5 % betrug (8 % w/w TS). Bei saurer Vorbehandlung des Maisspindelgranulats konnten sogar bis zu $659 \pm 34 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose aus dem Substrat gelöst werden. Bei Weizenstroh war die Glucosefreisetzung mit $460 \pm 28 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ etwas geringer. Es wird vermutet, dass der geringe Ligningehalt des Maisspindelgranulats von nur 6,8 % dazu führte (Tabelle 4.2). Um den Einfluss der Ligninbarriere durch unspezifisches Binden und Enzyminaktivierung von Enzymen zu reduzieren, wurde nach Enzymen mit geringerer Ligninaffinität gesucht (Berlin *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde versucht, auf enzymatischem Wege durch die Verwendung von Peroxidasen und Laccasen den Ligninanteil von Pflanzenmaterialien zu verringern (Martinez *et al.*, 2009; Kolb *et al.*, 2012). Auch wurden Vorbehandlungsverfahren entwickelt, die den Ligningehalt der Substrate reduzieren (Chang und Holtzapfel,

2000). Alkalische Vorbehandlungsmethoden greifen die Ligninschicht an, während der Hemicelluloseanteil nur geringfügig verändert wird. Saure Substrataufschlussverfahren führen hingegen zu einem Abbau der Hemicellulose im Substrat, bei gleichzeitig geringer Löslichkeit von Lignin. Dabei führte eine Vorbehandlung mit Calciumhydroxid zum Herauslösen von etwa 33 % des Lignins und zu einem nahezu vollständigem Entfernen von inhibierenden Acetylgruppen (Wyman *et al.*, 2005). Um hohe Monosaccharid-Ausbeuten auch bei niedrigen Temperaturen möglich zu machen, sind extreme pH-Bedingungen während der Vorbehandlung notwendig. Wie Pedersen *et al.* (2011) berichtete, führen alkalische Aufschlussmethoden bei niedrigen Vorbehandlungstemperaturen (< 140 °C) und kurzen Verweilzeiten (< 10 min) zu höheren Glucose- und Xyloseausbeuten als saure Substratvorbehandlungen. Das könnte daran liegen, dass Teile des Lignins während der Vorbehandlung des Weizenstrohs gelöst werden und dadurch geringere Behinderungen durch das verbleibende Lignin entstehen. So machte Hansen *et al.* (2011) während der Reaktion zunehmende oberflächennahe Ligninstrukturen des Weizenstrohs für die abnehmende Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse mit verantwortlich, so dass das spezifische Binden von Cellulasen nicht nur vom jeweiligen Enzym, sondern auch vom Vorbehandlungsverfahren beeinflusst wird (Gao *et al.*, 2011b). Diese Beobachtungen scheinen sich mit den hier gemachten Erfahrungen dadurch zu decken, da der Großteil der enzymatischen Umsetzung bei saurer Vorbehandlung innerhalb der ersten 9 h ablief, bei alkalischer Vorbehandlung die Glucose- und Xylosetfreisetzung allerdings über einen längeren Zeitraum von bis zu 48 h beobachtet wurde. Bei Maisspindelgranulat sind die Unterschiede in der Glucose- und Xylosetfreisetzung zwischen einer sauren Vorbehandlung und einer alkalischen Vorbehandlung geringer ausgeprägt, da der Ligningehalt des rohen Substrates (gemahlene Maisspindelgranulat) mit nur 6,8 % (Tabelle 4.2) deutlich geringer war als bei Weizenstroh mit 20,5 %.

6.5.4 Mehrfache Enzymzugaben

Um den Einfluss des Lignins zu quantifizieren, wurde zunächst eine saure Vorbehandlungsmethode für die verwendeten Substrate an Weizenstroh und an Maisspindelgranulat gewählt, um große Anteile der Hemicellulose aus dem Substrat lösen zu können (Alvira *et al.*, 2010). Die Löslichkeit des Lignins ist hingegen nur gering ausgeprägt (Hendriks und Zeeman, 2009; Wyman *et al.*, 2005), so dass eine

mögliche Beeinträchtigung für Weizenstroh mit hohem Ligninanteil und für Maisspindelgranulat mit einem geringen Anteil des Lignins untersucht werden konnte.

Auf die erreichten Ausbeuten an Glucose und Xylose hat auch die Zusammensetzung der Enzympräparate mit verschiedenen Glucanasen, Xylanasen und β -Glucosidasen Einfluss (Wyman *et al.*, 2011). Durch die Zugabe des Hemicellulasepräparats „Shearzyme“ mit geringer Glucannebenaktivität und um 48 h zeitlich verzögerter Zugabe der Enzympräparate „Celluclast“ (Cellulasepräparat) mit „Novozym 188“ (β -Glucosidasepräparat), konnte für sauer vorbehandeltes Weizenstroh allerdings keine gesteigerte Glucose- und Xyloseproduktion beobachtet werden ($\approx 350 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose). Dies wurde von Wyman *et al.* (2011) bestätigt, der bei Vorbehandlung von amerikanischer Rutenhirse mit verdünnter Säure keinen Einfluss von Xylanasen auf die Zuckerausbeute beobachten konnte (Ligninanteil: 29,4 %).

Nicht bekannt war bisher der Einfluss von Xylanasen auf Suspensionen mit sauer vorbehandeltem Maisspindelgranulat mit geringem Ligninanteil von 6,8 % (Tabelle 4.2). Durch Zugabe des Hemicellulasepräparats „Shearzyme“ analog zur enzymatischen Hydrolyse von Weizenstroh konnte eine Glucosemenge von $735 \pm 25 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ erreicht werden. Ohne „Shearzyme“ waren $659 \pm 34 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose möglich. Dadurch war eine um 12 % gesteigerte Glucosebildung bei Zugabe von „Shearzyme“ beobachtet worden. Es wird vermutet, dass der Ligningehalt Einfluss auf die Wirkung des Hemicellulasepräparats „Shearzyme“ hatte und inhibierend wirkte.

Bei alkalischer Vorbehandlung des Weizenstrohs wurde mit einem 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren eine Glucosemenge von $379 \pm 11 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und eine Xylosemenge von $164 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ erreicht. In einem vergleichbaren Ansatz ohne „Shearzyme“ betrug die erzeugte Glucose $321 \pm 23 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und Xylose $151 \pm 8 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Damit konnte durch Zugabe des Hemicellulasepräparats „Shearzyme“ die Glucosefreisetzung um 18 % und die Xylosefreisetzung um 9 % gesteigert werden.

Bei alkalischer Vorbehandlung des Maisspindelgranulats betrug die freigesetzte Glucosemenge $441 \pm 14 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei einer gleichzeitig erzielten Xylosefreisetzung von $317 \pm 11 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Das entspricht einer Steigerung der Ausbeute von 39 % Glucose ausgehend von $317 \pm 19 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ ohne „Shearzyme“ und entsprechend 44 % Xylose ausgehend von $220 \pm 13 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$.

Der Einsatz von Xylanasen machte es möglich, die Glucose- und Xylosefreisetzung aus alkalisch vorbehandeltem Maisspindelgranulat ($< 1 \text{ mm}$) deutlich zu erhöhen, wobei die

Effektivität des Hemicellulasepräparats „Shearzyme“ verglichen mit alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh (< 2 mm) für Glucose um den Faktor 2,2 und für Xylose um den Faktor 4,9 höher ist.

Der Einfluss des Hemicellulasepräparats „Shearzyme“, das nahezu keine Glucan Nebenaktivität aufwies, ist dadurch nicht nur bei saurer Vorbehandlung vom Ligningehalt des Substrats abhängig, sondern für Weizenstroh und Maisspindelgranulat auch bei alkalischer Substratvorbehandlung. Berlin *et al.* (2006) konnte zeigen, dass Cellulasen und Xylanasen durch aufgereinigtes Lignin aus Weichhölzern (Reinheit > 90 % w/w) inhibiert werden. Danach könnte die Zuckerausbeute durch die Verwendung von Xylanasen vor allem bei geringem Ligningehalt der Pflanzenmaterialien erhöht werden. Der inhibierende Einfluss des Lignins konnte allerdings auch durch die Zugabe von Bovine Serum Albumin (BSA) verringert werden (Rollin *et al.*, 2011).

Um die Freisetzung von Glucose aus Weizenstroh und Maisspindelgranulat und den Einfluss der Enzymaktivität während der Reaktionsdauer besser zu verstehen und diese kontrollieren zu können, wurden die Enzympräparate sequentiell zugegeben. Die mehrfache Zugabe der Enzympräparate „Celluclast“, „Accellerase 1500“ und „Novozym 188“ ermöglichte für sauer vorbehandeltes Weizenstroh (1 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) eine über 72 h konstante Produktivität von Glucose mit einer maximalen Glucosemenge von etwa 400 mg g⁻¹_{TS} und einer periodischen Cellulasenbeladung von 3,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} „Celluclast“. Bis zu 600 mg g⁻¹_{TS} Glucose wurden bei sequentieller Enzymzugabe von 7,0 mg_{Protein} g⁻¹_{TS} nach 72 h erreicht. Für Maisspindelgranulat nach saurer Vorbehandlung (1 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) konnten bis zu 890 mg g⁻¹_{TS} Glucose innerhalb von 33 h produziert werden. Dadurch war es möglich, einer Enzyminaktivierung zu begegnen und eine konstant bleibende Glucoseproduktivität für mögliche Folgeprozesse bereitzustellen. Zudem konnte die Zuckerausbeute gesteigert werden, so erzielte Yang *et al.* (2011) durch stufenweise Enzymzugaben eine um 34 % bis 37 % erhöhte Ausbeute. Weiter führte die kontrollierte Zugabe von Enzymen und Substraten zu einer erhöhten Xyloseaufnahme bei Hefen und die Umsetzung des 5-fach Zuckers Xylose konnte von 40 % auf 50 % gesteigert werden (Olofsson *et al.*, 2010).

6.6 Enzymatische Hydrolysen in verschiedenen Reaktoren

Die geringen Kenntnisse zur Skalierbarkeit von biologischen Umsetzungen pflanzenbasierter Reststoffe zu Biokraftstoffen führte zu Problemen bei der kommerziellen Anwendung (Shao *et al.*, 2010). Die enzymatische Verzuckerung stellt einen wichtigen Zwischenschritt bei der energetischen Nutzung von Pflanzenmaterialien dar (Wyman, 2007), weshalb die systematische Beschreibung der Maßstabsübertragung der enzymatischen Hydrolyse einen wichtigen Bestandteil für die erfolgreiche Maßstabsübertragung des Gesamtprozesses liefern könnte.

Für die Maßstabsübertragung aus Milliliter-Rührreaktoren in klassische Liter-Rührkesselreaktoren wurde eine identische Durchmischungskennzahl ($n \cdot \theta_{0,97} = 65 \pm 3$) als maßgebendes Kriterium ausgewählt. Der volumenspezifische Leistungseintrag war im Liter-Rührkesselreaktor kleiner $0,5 \text{ W L}^{-1}$. Der in den Milliliter-Rührreaktoren mit dem S-Rührer bestimmte Leistungseintrag war kleiner $0,1 \text{ W L}^{-1}$ für eine Drehzahl von 200 min^{-1} und $0,1 \text{ W L}^{-1}$ bis $0,3 \text{ W L}^{-1}$ für eine Rührerdrehzahl von 500 min^{-1} .

Die scheinbaren Schergeschwindigkeiten ergaben 33 s^{-1} für 200 min^{-1} und 82 s^{-1} für eine Rührerdrehzahl von 500 min^{-1} , wobei die Metzner-Otto Konstante (k) des Reaktionssystems 9,8 betrug. Ein Vergleich mit dem Liter-Rührkesselreaktor zeigt bei Annahme von $k = 13$ (Metzner und Otto, 1957) eine scheinbare Schergeschwindigkeit von 108 s^{-1} für eine Rührerdrehzahl von 500 min^{-1} .

Obwohl das Verhältnis der Energiedissipationen im gerührten Milliliter-Rührreaktor mit $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi} = 7,4$ (siehe Kapitel 5.3.2) etwas höher ist als in geschüttelten Reaktoren ($\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi}$ bis zu 6; Peter, 2007), konnte kein negativer Einfluss auf die Entwicklung der Enzymaktivitäten bezüglich der synthetischen Substrate p-Nitrophenyl-Cellobiosid und p-Nitrophenyl-Glucosid in der Flüssigphase der Suspension mit 20 % mikrokristalliner Cellulose und 8 % (w/w TS) hydrothermisch vorbehandeltem Weizenstroh beobachtet werden. Für die gerührten Reaktionssysteme im Milliliter- und Liter-Maßstab konnte bei identischen Durchmischungskennzahlen eine gute Übereinstimmung in der Glucosefreisetzung erreicht werden, so betrug der Unterschied des Liter-Rührkesselreaktors zu Milliliter-Rührreaktoren am Ende der Reaktion nach 72 h bei 20 % mikrokristalliner Cellulose -11 % und nach 48 h bei 8 % hydrothermisch vorbehandeltem Weizenstroh -3 %. Die Schüttelfrequenz der Erlenmeyerkolben wurde einer Standardmethode von NREL (1996) entnommen. Trotz einer Schüttelfrequenz von 200 min^{-1} betragen die Abweichungen der enzymatischen Hydrolyse im Schüttelkolben

-24 % für 20 % mikrokristalline Cellulose und -32 % für 8 % hydrothermisch vorbehandeltes Weizenstroh. Brethauer *et al.* (2011) konnte bei einer Schüttelfrequenz der Erlenmeyerkolben von 150 min^{-1} mit mikrokristalliner Cellulose (Avicel PH 101) und Maisspindelgranulat ($< 2 \text{ mm}$) ebenfalls geringere Glucoseausbeuten als im gerührten Referenzreaktor feststellen. Als Referenzreaktor verwendete Brethauer *et al.* (2011) einen 3 L Labor-Rührkesselreaktor mit 8-Blatt Scheibenrührer (40 mm Durchmesser), bei einer Rührerdrehzahl von 500 min^{-1} . Die geringeren Glucosefreisetzungen im Schüttelkolben könnten durch nicht ausreichende Durchmischung verursacht werden. Weitere Charakterisierungen mit höheren Schüttelfrequenzen oder Schüttelkolben mit Schikanen wären notwendig, um die Ursache der geringeren Glucosefreisetzung zu identifizieren. Jäger *et al.* (2010) verwendete bei Eppendorfgefäßen eine Schüttelfrequenz von 1000 min^{-1} um Stofftransportlimitierungen vollständig auszuschließen.

Im Gegensatz zu Weizenstroh lag Maisspindelgranulat bei deutlich höheren Feststoffanteilen noch als Suspension vor, so dass neben einem Feststoffanteil von 8 % (w/w TS) auch 18 % (w/w TS) Maisspindelgranulat als Suspension zu betrachten ist. Für das sauer (0,5 % v/v H_2SO_4 , $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 0,5 h) und alkalisch ($0,1 \text{ g g}^{-1}_{\text{TS}} \text{ Ca(OH)}_2$, $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h) vorbehandelte Maisspindelgranulat konnte eine erfolgreiche Maßstabsübertragung bei einer Rührerdrehzahl von 500 min^{-1} im Liter-Rührkesselreaktor und 500 min^{-1} in unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren mit S-Rührern durchgeführt werden. Der Skalierungserfolg sollte unabhängig von der Substratvorbehandlung und für einen Feststoffanteil des Weizenstrohs bis 8 % (w/w TS) und des Maisspindelgranulats bis 18 % (w/w TS) möglich sein (Riedlberger und Weuster-Botz, 2012). Für Haufwerke von Pflanzenmaterialien sind hingegen spezielle Rührreaktoren notwendig, die möglicherweise durch eine horizontale Anordnung des Reaktionsgefäßes und der Rührerwelle gekennzeichnet sind (Jørgensen *et al.*, 2007b).

6.7 Optimierung der enzymatischen Hydrolyse in Milliliter-Rührreaktoren

Die Monosaccharide Glucose und Xylose sind in hohen Anteilen in Pflanzenmaterialien enthalten. Die enzymatische Verzuckerung wird jedoch von einer Vielzahl von Parametern beeinflusst. Neben den inhibierenden Einflüssen auf die Enzyme durch erzeugte Mono- und Polysaccharide, wird die enzymatische Verzuckerung auch von

Zuckerabbauprodukten gestört (Kim *et al.*, 2011). Die hohe Zahl an potentiellen Einflüssen entsteht durch die Vielzahl der beteiligten Enzyme, die Pflanzenart, den Umgebungseinflüssen während des Pflanzenwachstums, der Substratlagerung und der Substratvorbehandlung, so dass reaktionstechnische Beschreibungen durch mechanistische Enzymkinetiken häufig nicht übertragbar sind und somit einen eingeschränkten Gültigkeitsbereich besitzen (Hodge *et al.*, 2008). Empirische Reaktionsbeschreibungen ermöglichen hingegen die Simulation von Abhängigkeiten und liefern funktionale Zusammenhänge zwischen Einflussgrößen innerhalb des Variablenbereiches. Dabei können optimale Reaktionsbedingungen für die abhängigen Prozessvariablen berechnet und damit die Antwortgrößen (Zielgrößen) Glucose- und Xyloseproduktivität maximiert werden. Zur empirischen Korrelation wurde ein quadratischer Polynomansatz mit fünf Einflussgrößen verwendet und deren Bedeutung für die enzymatische Hydrolyse beurteilt. Cellulasen, Hemicellulasen und β -Glucosidasen sind die entscheidenden Enzyme, die an der Verzuckerung von Pflanzenmaterialien beteiligt sind, so dass deren Einfluss durch die Zugabe entsprechender Enzympräparate untersucht wurde. Zudem wurden die Reaktionsbedingungen Temperatur und pH auf die enzymatische Hydrolyse von Weizenstroh und Maisspindelgranulat für ausgewählte Vorbehandlungen optimiert. Berlin *et al.* (2007) beschrieb ein optimales Enzymgemisch aus Xylanasen, Pectinasen und β -Glucosidasen für die Hydrolyse von Maisspindelgranulat nach saurer Vorbehandlung. Da der Anteil an Cellulose, Hemicellulose und Lignin von der Vorbehandlung abhängig ist (Wyman *et al.*, 2005), sind die Ergebnisse allerdings nicht übertragbar.

Die Beladung des vorbehandelten Weizenstrohs und Maisspindelgranulats mit dem Cellulasepräparat „Celluclast“ und „Accellerase 1500“ sollte hoch gewählt werden, um Glucose und Xylose möglichst vollständig aus dem Substrat lösen zu können. Daher erzielte unabhängig vom Vorbehandlungsverfahren des Weizenstrohs oder des Maisspindelgranulats meistens das obere Maximum von $45 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ die besten Glucose- und Xylosetreisetzen. Die Maximalbeladung der verwendeten Enzympräparate betrug $82 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$. Falls *et al.* (2011) konnte für vorbehandelte amerikanische Rutenhirse ab einer Enzymbeladung von $\approx 450 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ keine weiteren Einflüsse der Enzymkonzentration auf die Zuckerausbeute erkennen. Derart hohe Enzymbeladungen würden die Kosten für Folgeprodukte wie Biokraftstoffe jedoch

massiv erhöhen. Falls *et al.* (2011) und Klein-Marcuschamer *et al.* (2012) schätzten die Enzymkosten für die Produktion von Ethanol auf 0,3 \$ L⁻¹ bis 0,4 \$ L⁻¹.

Da das verwendete Cellulasepräparat „Celluclast“ eine geringe β -Glucosidaseaktivität besitzt (Merino und Cherry, 2007), war das ergänzende Enzympräparat „Novozym 188“ notwendig. Allerdings scheint das Cellulasepräparat „Accellerase 1500“ eine höhere β -Glucosidaseaktivität als „Celluclast“ zu besitzen, da geringere Beladungen an zusätzlichem „Novozym 188“ für die Optimierung notwendig waren. Auffallend ist allerdings, dass „Novozym 188“ für die Xylosetreisetzung häufig als signifikant erkannt wurde. Pallapolu *et al.* (2011) konnte eine erhöhte Hydrolyse von Xylan bei alkalisch vorbehandelten Substraten beobachten und schloss auf eine β -Xylosidaseaktivität von „Novozym 188“. Qing und Wyman (2011a) konnte zudem den geringen Abbau von hochpolymeren Xylooligomeren durch „Novozym 188“ nachweisen.

Es ist bekannt, dass Enzyme wie Xyloglucane und Xylanasen die Gesamtausbeute an Monosacchariden erhöhen (Benkö *et al.*, 2008, Hu *et al.*, 2011). Bei saurer Vorbehandlung des Weizenstrohs hatten allerdings die Hemicellulasepräparate „NS22002“ und „Pulpzyme“ nur einen geringen Einfluss, da der Großteil der Hemicellulose bereits während der Vorbehandlung aus dem Weizenstroh und dem Maisspindelgranulat gelöst wurde.

Auf das Hemicellulasepräparat „Shearzyme“ sollte bei saurer Vorbehandlung (0,5 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) des ligninärmeren Maisspindelgranulats und hohem Feststoffanteil von 18 % (w/w TS) allerdings nicht verzichtet werden, da weiter bedeutende volumenspezifische Produktivitäten von Xylose mit 10,9 g L⁻¹d⁻¹ erreicht wurden und die Glucoseproduktivität auf 119,6 ± 2,2 g L⁻¹d⁻¹ gesteigert werden konnte.

Bei hydrothermischer (160 °C, 1 h) und alkalischer Vorbehandlung (0,1 g g⁻¹_{TS}, 135 °C, 1 h) sind Hemicellulasen jedoch unerlässlich für die Maximierung der volumenspezifischen Glucose- und Xyloseproduktivitäten aus Weizenstroh und Maisspindelgranulat. Dieser Effekt scheint bei diesen Vorbehandlungen unabhängig vom Substrat und dem Ligningehalt der Substrate zu sein, da Xylooligomere als Inhibitoren von Cellulasen gelten (Qing *et al.*, 2010). Xylan und Xylose wirken dagegen weniger inhibierend. Daher ist auch für die Glucosefreisetzung eine ausreichende Xylanase- und β -Xylosidaseaktivität vor allem bei hohen Xylananteilen im Substrat notwendig (Qing und Wyman, 2011b).

Die Verwendung des Cellulasepräparats „Accellerase 1500“ führte zu einem geringeren Einfluss des Hemicellulasepräparats „NS22002“ als bei Verwendung von „Celluclast“. Wurde anstelle des Hemicellulasepräparats „NS22002“ „Shearzyme“ verwendet, so ist bei alkalischer Vorbehandlung eine geringere Beladung des Hemicellulasepräparats notwendig. Die Beladungen mit dem Hemicellulasepräparat „Shearzyme“ waren für die optimierte Glucose- und Xyloseproduktivität aus Weizenstroh mit $20,1 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $19,8 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ vergleichbar. Auch für alkalisch vorbehandeltes Maisspindelgranulat konnten vergleichbare Beladungen von „Shearzyme“ mit $27,8 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und $24,3 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ festgestellt werden. Die Freisetzungen aus den Substraten nach 24 h waren jedoch unterschiedlich und betragen für Glucose $457,7 \pm 4,6 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ aus 8 % (w/w TS) alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh und $394,5 \pm 5,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ aus 18 % (w/w TS) alkalisch vorbehandeltem Maisspindelgranulat. Für Xylose ergaben sich entsprechend $197,8 \pm 2,3 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für Weizenstroh und $296,1 \pm 2,7 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für Maisspindelgranulat. Dies wurde auf die unterschiedliche Zusammensetzung der beiden Substrate zurückgeführt. Der pH und die Temperatur lassen keine allgemeine Festlegung zu, häufig ist ein pH von $5,0 \pm 0,3$ und eine Temperatur von $50 \pm 5 \text{ °C}$ jedoch optimal für die verwendeten Enzymgemische und Substratvorbehandlungsmethoden.

7 Zusammenfassung

Zur Entwicklung effizienter Verfahren zur enzymatischen Hydrolyse von Pflanzenmaterialien sind zahlreiche experimentelle Untersuchungen notwendig. Neben der Optimierung der beeinflussenden Reaktionsbedingungen wie Temperatur und pH sind Untersuchungen zu einer geeigneten Art der Substratvorbehandlung notwendig, um die lignocellulosehaltigen Pflanzenmaterialien bei möglichst geringer Enzymkonzentration enzymatisch mit hohen Monosaccharidausbeuten zu hydrolysieren. Des Weiteren wird die enzymatische Hydrolyse durch das verwendete Pflanzenmaterial und die Umweltbedingungen während des Wachstums beeinflusst, so dass ein parallelisierbares Reaktionssystem notwendig ist, um aus den vielen Einflussgrößen geeignete Reaktionsbedingungen effizient zu bestimmen.

Rührkesselreaktoren sind in der biotechnologischen Stoffproduktion weit verbreitet und werden bis in den Kubikmeter-Maßstab eingesetzt. Rührkesselreaktoren werden daher auch im Labor für reaktionstechnische Untersuchungen eingesetzt, um optimale Reaktionsbedingungen identifizieren zu können. Aufgrund der eingeschränkten Parallelisierbarkeit von Standard-Rührkesselreaktoren im Labor-Maßstab wurden bisher im Labor zur reaktionstechnischen Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse häufig Mikrotiterplatten mit bis zu 96 Kavitäten verwendet. Die geringen Abmessungen der geschüttelten Mikrotiterplatten ermöglichen jedoch nur die Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse für geringe Feststoffanteile ($\leq 2\%$) sehr fein gemahlener Partikel ($\leq 500\ \mu\text{m}$).

Miniaturisierte Rührreaktoren für die enzymatische Hydrolyse von suspendierten Pflanzenmaterialien mit 48 parallel angeordneten Bioreaktoren im Milliliter-Maßstab können daher eine effiziente Möglichkeit darstellen, die enzymatische Hydrolyse unter verfahrenstechnisch vergleichbaren physikalischen Bedingungen zum Labor- oder Pilotmaßstab durchzuführen.

Zielsetzung war deshalb die Entwicklung neuer Rührorgane für die enzymatische Hydrolyse von suspendierten Pflanzenmaterialien bei möglichst hohem Feststoffanteil und großen Partikelabmessungen im Milliliter-Maßstab vergleichbar zu Rührkesselreaktoren im Liter- oder Kubikmeter-Maßstab durchzuführen. Eine weitere Zielsetzung, am Beispiel kommerziell verfügbarer Enzyme war es, möglichst hohe

Freisetzungen von Monosacchariden aus den Pflanzenmaterialien mit minimalem Enzymeinsatz unter erstmaliger Nutzung der neuen Rührorgane im Parallelansatz zu erreichen.

Ausgehend von industriell verwendeten Rührorganen (Gitter- und Blattrührer) wurde ein neuartiger Rührer (H-Rührer) für magnetisch-induktiv angetriebene Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab entwickelt. Ein würfelförmiger Grundkörper mit zwei Dauermagneten für den magnetisch-induktiven Antrieb bildet zwei symmetrische, blattförmige Paddel ober- und unterhalb des Grundkörpers aus. In einer Weiterentwicklung wurde eine asymmetrische Anordnung der Paddel ober- und unterhalb des Grundkörpers gewählt (S-Rührer). Durch Mischzeitmessungen konnte die Durchmischung für die beiden Rührorgane in Milliliter-Rührreaktoren bewertet werden. Die Mischzeit zur 97 % Homogenisierung einer 80 % (w/w, Viskosität von 33 mPa s) Glycerinlösung bei einer Rührerdrehzahl von 200 min^{-1} und einem volumenspezifischen Leistungseintrag des S-Rührers in unbewehrten Reaktoren von $0,04 \pm 0,01 \text{ W L}^{-1}$ betrug nur $19,4 \pm 0,3 \text{ s}$. In bewehrten Rührreaktoren war die Mischzeit deutlich höher und betrug $48,8 \pm 14,0 \text{ s}$. Im Vergleich dazu wurde mit dem H-Rührer nach 20 s oder 50 s keine Homogenität von 97 % erreicht. Bei Xanthanlösungen ist die Viskosität im Gegensatz zu Glycerinlösungen von den Scherkräften im Rührreaktor abhängig und wird dadurch von der Rührerdrehzahl beeinflusst. Ansteigende Scherbeanspruchungen reduzieren die Viskosität des strukturviskosen Fluids. Die Bestimmung der Mischzeit einer 0,4 % (w/w) Xanthanlösung zeigte bei Verwendung des S-Rührers anstelle des H-Rührers eine effektivere Durchmischung. Die Mischzeit bei einer Rührerdrehzahl von 800 min^{-1} betrug beim S-Rührer mit Strömungsbrecher $68,3 \pm 5,8 \text{ s}$ und ohne Strömungsbrecher $31,3 \pm 3,2 \text{ s}$. Die Mischzeiten bei Verwendung des H-Rührers waren mit Strömungsbrecher um 44 % und ohne Strömungsbrecher um 58 % höher als die des S-Rührers, weshalb der S-Rührer wie zuvor für die Glycerinlösung in unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren auch für die Homogenisierung strukturviskoser Xanthanlösungen geeigneter ist und für weitergehende verfahrenstechnische Charakterisierungen ausgewählt wurde.

In miniaturisierten Rührkesselreaktoren können Feststoffanteile von bis zu 20 % Trockensubstanz (TS) mikrokristalliner Cellulose mit dem S-Rührer homogenisiert werden. Ein Homogenitätszustand von 97 % wurde innerhalb von 50 s ab einer Rührerdrehzahl von 200 min^{-1} und einem Leistungseintrag von $0,04 \text{ W L}^{-1}$ erreicht. Bei einem Leistungseintrag von $0,5 \text{ W L}^{-1}$ betrug die Mischzeit für die Homogenisierung

einer Suspension von 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose nur 4 s. Für eine Suspension von 5 % (w/w TS) Weizenstroh betrug der Leistungseintrag bei entsprechender Mischzeit $0,1 \text{ W L}^{-1}$. Auf Grund der effektiven Durchmischung bei geringem Leistungseintrag wurde der S-Rührer für die enzymatische Hydrolyse von suspendierten Pflanzenmaterialien in unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren ausgewählt.

Ein verfahrenstechnisches Kriterium für die Abschätzung von Scherintensitäten stellen scheinbare bzw. effektive Schergeschwindigkeiten dar. Diese sind als Richtwerte zu verstehen. Die hierfür notwendige Metzner-Otto Konstante (k) des S-Rührers in unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren beträgt 9,8 und ist dadurch etwas geringer als die von 6-Blatt Scheibenrührern ($k = 13$; Metzner und Otto, 1957). Das Verhältnis aus maximaler und mittlerer Energiedissipation ($\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi}$) berücksichtigt lokal auftretende maximale Scherkräfte. Das untersuchte Rührsystem, bestehend aus dem S-Rührer in unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren, zeigte ein $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi}$ -Verhältnis von 7,4. Ein Vergleich der maximalen lokalen zur mittleren Energiedissipation mit anderen für Milliliter-Rührreaktoren entwickelten Rührorganen ordnet den S-Rührer in unbewehrten Reaktoren zwischen dem gasinduzierenden Rührorgan ($\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi} = 10$; Hortsch, 2011) und dem Paddelrührer ($\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi} = 6$; Hortsch, 2011) ein.

Mit dem ausgewählten parallelen Rührkesselreaktorsystem (Abbildung 7.1) war es möglich, Glucose mit einer Konzentration von $123 \pm 7 \text{ g L}^{-1}$ aus 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose bei einer geringen Enzymbeladung von $16,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ freizusetzen. Die Standardabweichung des 4-fach Parallelansatzes in unbewehrten Milliliter-Rührreaktoren betrug 6 %. Bei Verwendung der ligninhaltigen Substrate hydrothermisch vorbehandelten Weizenstrohs im 10-fach Parallelansatz ($160 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h, Partikelgröße bis zu 15 mm) und hydrothermisch vorbehandelten Maisspindelgranulats im 3-fach Parallelansatz ($135 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h, Partikelgröße bis zu 1 mm) bei der enzymatischen Hydrolyse mit einem Feststoffanteil von bis zu 10 % (w/w TS) Weizenstroh und bis zu 18 % (w/w TS) Maisspindelgranulat war die Standardabweichung der Glucose- und Xylosetzfreisetzung jeweils kleiner 10 %. Somit ist es möglich, die enzymatische Hydrolyse zur Durchführung reaktionstechnischer Untersuchungen in Milliliter-Rührreaktoren bei hohem Feststoffanteil der Suspension aus Pflanzenmaterialien zu parallelisieren.



Abbildung 7.1: 48-fach gefertigte S-Rührer mit individuellem Milliliter-Rührreaktor ohne Strömungsbrecher im Vordergrund am Deckel des parallelen Rührkesselreaktorsystems.

Für die enzymatische Hydrolyse mikrokristalliner Cellulose, unterschiedlich vorbehandelten Weizenstrohs und Maisspindelgranulats konnten beeinflussende Reaktionsbedingungen im Satzverfahren oder durch sequentielle Zugaben von Enzymen für suspendierte Pflanzenmaterialien mit unterschiedlichen Feststoffanteilen und Partikelgrößen in Milliliter-Rührreaktoren untersucht werden. In ersten experimentellen Untersuchungen erwies sich eine Temperatur von 50 °C und ein pH von 5,0 am geeignetsten um hohe Monosaccharidausbeuten und hohe Monosaccharidkonzentrationen zu erreichen, so dass zunächst für die weiteren reaktionstechnischen Untersuchungen eine Temperatur von 50 °C und ein pH von 5,0 gewählt wurde.

Für hohe Feststoffanteile mikrokristalliner Cellulose (20 % w/w TS) und vorbehandelten Maisspindelgranulats (18 % w/w TS) konnte eine Produktinhibierung durch Glucose nachgewiesen werden. Diese war gekennzeichnet durch eine geringere Glucosefreisetzung aus dem Substrat. Wurde eine Suspension von 20 % (w/w TS) mikrokristalliner Cellulose anstelle einer Suspension mit 5 % (w/w TS) unter ansonsten gleichen Bedingungen enzymatisch hydrolysiert ($16,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$), konnten nur $492 \pm 29 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose anstelle von $858 \pm 67 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose freigesetzt werden. Während die Glucosefreisetzung um 44 % zurückging, stieg die Glucosekonzentration allerdings von $45 \pm 4 \text{ g L}^{-1}$ auf $123 \pm 7 \text{ g L}^{-1}$ an. Ein vergleichbares Verhalten wurde für

hydrothermisch vorbehandeltes Maisspindelgranulat mit einer um 40 % abnehmenden Glucosefreisetzung beobachtet. Durch gezielte Vorlage von Glucose zu Beginn der Reaktion konnte die inhibierende Wirkung von Glucose bestätigt werden und zusätzlich eine Abnahme von bereits vorhandener Glucose beobachtet werden. Eine Hypothese dafür ist die Transglycosylierung. Die Transglycosylierung von β -Glucosidasen des Cellulasen- („Celluclast“) bzw. β -Glucosidasepräparates („Novozym 188“) ist gekennzeichnet durch eine Konzentrationsabnahme bereits vorhandener Glucose (Andric *et al.*, 2010). Eine Verdreifachung der Enzymkonzentration erhöhte die Glucosefreisetzung und bietet somit eine Möglichkeit noch höhere Glucosekonzentrationen zu erreichen.

Eine andere Möglichkeit die Glucosefreisetzung zu erhöhen, konnte durch Reduzierung der Partikelgröße von Weizenstroh und Maisspindelgranulat vom Millimeter- in den Mikrometerbereich mit Partikelgrößen kleiner 250 μm durch eine vergrößerte zugängliche Oberfläche für die Enzyme gezeigt werden.

Einen besonders hohen Einfluss auf die Zuckerfreisetzung aus Weizenstroh und Maisspindelgranulat hatte die Substratvorbehandlung vor der enzymatischen Hydrolyse, welche die Zusammensetzung der Pflanzenmaterialien verändert. Es konnten durch saure Vorbehandlungen (0,5 % und 1 % H_2SO_4 v/v, 135 °C, 0,5 h) hohe Glucosefreisetzungen von 400 $\text{mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bis 450 $\text{mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für Weizenstroh und 600 $\text{mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ bis 650 $\text{mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für Maisspindelgranulat bei einer geringen Enzymbeladung von 16,9 $\text{mg}_{\text{Protein g}^{-1}_{\text{TS}}}$ erreicht werden. Durch eine Verdopplung der Enzymbeladung konnte die Glucosefreisetzung bei Weizenstroh auf $546 \pm 24 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ und bei Maisspindelgranulat auf $889 \pm 23 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ mit jeweils 8 % (w/w TS) erhöht werden. Als nachteilig erscheint allerdings das nahezu vollständige Trennen der Cellulose- und Hemicellulosefraktion durch das Herauslösen der Hemicellulose aus den Pflanzenmaterialien während der sauren Vorbehandlung. Dies führt zu getrennten Stoffströmen in den Folgeprozessen mit einer cellulosehaltigen festen Phase und den Sacchariden der Hemicellulose in der flüssigen Phase. Weiter besteht bei sauren Aufschlussverfahren ein erhöhtes Risiko zur Bildung von toxischen Zuckerabbauprodukten. Aus diesem Grund werden hydrothermische und alkalische Vorbehandlungsmethoden, die bei geeigneter Parameterwahl eine wesentlich geringere Löslichkeit der Hemicellulose zur Folge haben, als bevorzugte Vorbehandlungsverfahren eingestuft. Dadurch können die verbliebenen Pentosen in

Folgeprozessen, beispielsweise als Kohlenstoffquelle für Mikroorganismen, genutzt werden.

Bei alkalischer Vorbehandlung mit Calciumhydroxid ($0,1 \text{ g g}^{-1}_{\text{TS}} \text{ Ca(OH)}_2$, $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h) konnten bei einer Enzymbeladung von nur $16,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ sowohl $321 \pm 23 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose als auch $151 \pm 8 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Xylose aus Weizenstroh und bei Verwendung von Maisspindelgranulat $317 \pm 19 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Glucose und $220 \pm 13 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ Xylose gelöst werden. Als weiterer Vorteil einer Vorbehandlung mit Calciumhydroxid gilt das Herauslösen von etwa 33 % Lignin (Wyman *et al.*, 2005), da eine inhibierende oder inaktivierende Wirkung von Lignin beobachtet werden konnte.

Durch die sequentielle Zugabe von Enzymgemischen war es möglich, einer abnehmenden Enzymaktivität entgegenzuwirken und eine hohe Glucosefreisetzung von bis zu $562 \pm 62 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ innerhalb von 72 h aus Weizenstroh und von bis zu $890 \pm 62 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ innerhalb einer Reaktionsdauer von 33 h aus Maisspindelgranulat zu erreichen (Enzymatische Hydrolyse: 8 % w/w TS, Vorbehandlung: 1 % v/v H_2SO_4 , $135 \text{ }^\circ\text{C}$, $0,5 \text{ h}$).

Entscheidend für die in Milliliter-Rührreaktoren identifizierten Reaktionsbedingungen ist deren Skalierbarkeit in Standard-Rührkesselreaktoren. Die Maßstabsübertragung in ein 100-fach größeres Referenzgefäß sollte für die enzymatische Hydrolyse von suspendierten Pflanzenmaterialien in Milliliter-Rührreaktoren die Reproduzierbarkeit im Labor-Rührkesselreaktor anhand der zuvor charakterisierten Homogenisierung zeigen. Die Rührerdrehzahlen in beiden Reaktionsgefäßen wurden so gewählt, dass eine Durchmischungskennzahl $n \cdot \theta_{0,97}$ von 65 ± 3 erreicht wurde. Der Leistungseintrag war in beiden Reaktionsgefäßen kleiner als $0,5 \text{ W L}^{-1}$.

Durch die nachgewiesene Homogenisierung der suspendierten Pflanzenmaterialien war es für mikrokristalline Cellulose mit einem Feststoffanteil von 20 % (w/w TS), vorbehandeltes Weizenstroh von 8 % (w/w TS) und Maisspindelgranulat von 18 % (w/w TS) möglich, die enzymatische Hydrolyse in Milliliter-Rührreaktoren analog zum Reaktionsverlauf in Liter-Rührkesselreaktoren zu gestalten. Abbildung 7.2 veranschaulicht beispielhaft die Verzuckerung von 18 % (w/w TS) alkalisch vorbehandeltem Maisspindelgranulat ($0,1 \text{ g g}^{-1}_{\text{TS}} \text{ Ca(OH)}_2$, $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h), mit identischen Glucose- und Xylosefreisetzungen. Dadurch ist es möglich, reaktionstechnische Untersuchungen in parallel betriebenen Milliliter-Rührreaktoren durchzuführen und die

Versuchsbedingungen für die enzymatische Hydrolyse zu optimieren, um möglichst hohe Freisetzungen von Glucose und Xylose aus Biomasse zu erreichen.

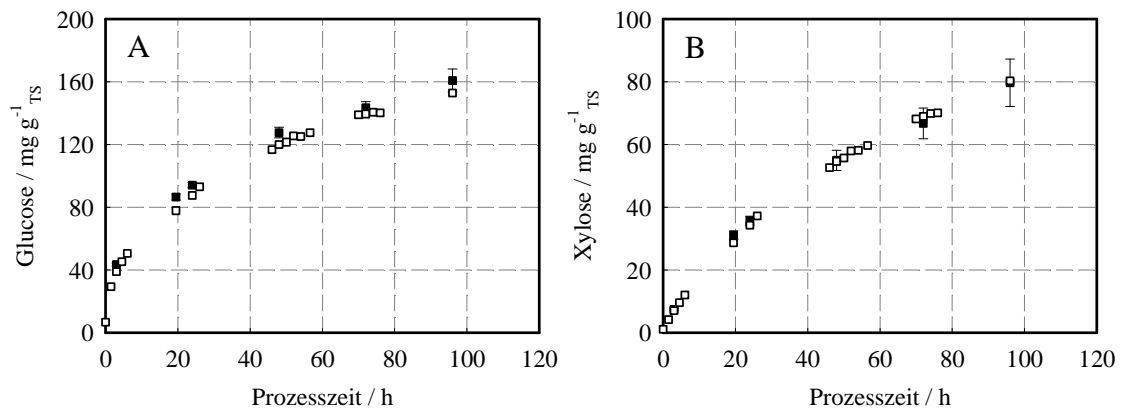


Abbildung 7.2: Enzymatische Hydrolyse mit 18 % (w/w TS) vorbehandeltem Maisspindelgranulat ($0,1 \text{ g g}^{-1}_{\text{TS}} \text{ Ca(OH)}_2$, $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h) in Milliliter-Rührreaktoren (■, $n = 500 \text{ min}^{-1}$) und einem Labor-Rührkesselreaktor (□, $n = 500 \text{ min}^{-1}$) dargestellt für die Glucose- (A) und Xylosefreisetzung (B). Als Enzympräparate wurden „Accellerase 1500“ mit $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ und „Novozym 188“ mit $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ bei einer Reaktionstemperatur von $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und pH 5,0 verwendet. Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus einem 8-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

Da für die gewählten Reaktionsbedingungen noch keine optimalen Freisetzungen und Konzentrationen von Glucose und Xylose aus den vorbehandelten Pflanzenmaterialien erreicht werden konnten, wurde der Einfluss von Temperatur, pH und unterschiedlichen Enzympräparaten im Satzverfahren mit Hilfe statistischer Versuchsplanung im Parallelansatz für die verwendeten Substrate Weizenstroh und Maisspindelgranulat reaktionstechnisch untersucht. Dadurch war es möglich, skalierbare optimale Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH, Cellulase-, β -Glucosidase- und Hemicellulasepräparate) für hydrothermische, alkalische und saure Aufschlussmethoden abhängig vom verwendeten Pflanzenmaterial in parallelen Milliliter-Rührreaktoren zu finden. Es konnten optimale Beladungen mit den Hemicellulasepräparaten entsprechend der Vorbehandlung der beiden Substrate gezeigt werden. Die optimalen Freisetzungen aus den Substraten waren unterschiedlich und betragen nach 24 h für Glucose $457,7 \pm 4,6 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ aus 8 % (w/w TS) alkalisch vorbehandeltem Weizenstroh und $394,5 \pm 5,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ aus 18 % (w/w TS) alkalisch vorbehandeltem Maisspindelgranulat. Für Xylose ergaben sich entsprechend $197,8 \pm 2,3 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für Weizenstroh und $296,1 \pm 2,7 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$ für Maisspindelgranulat (Abbildung 7.3).

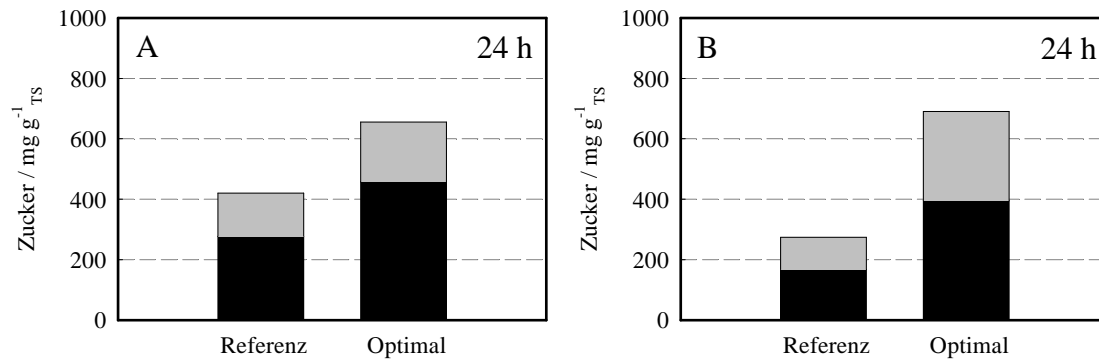


Abbildung 7.3: Enzymatische Hydrolyse mit 8 % (w/w TS) vorbehandeltem Weizenstroh (A) und 18 % (w/w TS) vorbehandeltem Maisspindelgranulat ($0,1 \text{ g g}^{-1} \text{ TS}$ Ca(OH)_2 , $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, (B)) in Milliliter-Rührreaktoren. Freigesetzte Glucose (■) und Xylose (□) nach 24 h. Referenzbedingungen: $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 5,0, $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{ TS}$ Cellulasepräparat, $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{ TS}$ β -Glucosidasepräparat, $0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{ TS}$ Hemicellulasepräparat. Optimale Bedingungen: $T = 46,6 \text{ }^\circ\text{C}$ (Glucose) oder $T = 46,7 \text{ }^\circ\text{C}$ (Xylose), pH 5,1 (Glucose) oder pH 4,9 (Xylose), $45,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{ TS}$ Cellulasepräparat, $7,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{ TS}$ β -Glucosidasepräparat, $20,1 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{ TS}$ (Glucose) oder $19,8 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{ TS}$ (Xylose) Hemicellulasepräparat für Weizenstroh (A) und $T = 60,0 \text{ }^\circ\text{C}$ (Glucose) oder $T = 50,0 \text{ }^\circ\text{C}$ (Xylose), pH 5,1, $45,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{ TS}$ Cellulasepräparat, $7,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{ TS}$ β -Glucosidasepräparat, $27,8 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{ TS}$ oder $24,3 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{ TS}$ Hemicellulasepräparat für Maisspindelgranulat (B). Cellulasepräparat („Celluclast“), β -Glucosidasepräparat („Novozym 188“) und Hemicellulasepräparat („Shearzyme“).

Durch die Verwendung des Hemicellulasepräparats „Shearzyme“ war es auch möglich, die volumenspezifischen Produktivitäten zu erhöhen und es wurden bis zu $119,6 \pm 2,2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Glucose nach 24 h mit sauer vorbehandeltem Maisspindelgranulat und bis zu $65,0 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Xylose aus alkalisch vorbehandeltem Maisspindelgranulat (18 % w/w TS) erreicht. Mit saurer Vorbehandlung lassen sich dadurch die höchsten Glucose- und mit alkalischer Substratvorbehandlung die höchsten Xylosekonzentrationen erzielen. Ein optimales Aufschlussverfahren von Pflanzenmaterialien ist demnach gekennzeichnet durch die individuellen Anforderungen der Folgeprozesse.

8 Ausblick

Die Art der Substratvorbehandlung ist eine bestimmende Größe bei der Maximierung von Monosaccharidausbeuten durch die enzymatische Hydrolyse, weshalb es interessant wäre auch diese zu miniaturisieren. Das Milliliter-Rührkesselreaktorsystem ermöglicht experimentelle Untersuchungen bis 70 °C. Bei diesen Temperaturen würden sich in erster Linie saure und alkalische Aufschlussmethoden anbieten, da diese auch bei geringen Vorbehandlungstemperaturen hohe Zuckerausbeuten durch die enzymatische Hydrolyse ermöglichen. Wäre die Untersuchung von Substrataufschlussverfahren in skalierbaren Parallelreaktoren möglich, könnte die Optimierung von Enzymgemischen für eine möglichst vollständige Substratumsetzung in Monosaccharide für eine Vielzahl von Vorbehandlungsbedingungen gleichzeitig untersucht werden. Des Weiteren würden sich mikrobiologische Substratvorbehandlungen für die parallele Evaluierung eignen, da auch diese bei Temperaturen bis 70 °C erfolgen. Eine Kombination aus einer hydrothermischen Vorbehandlung und dem biologischen Abbau von Pflanzenmaterialien durch den Pilz *Ceriporiopsis subvermispora* zeigten Wan und Li (2011), während Salvachua *et al.* (2011) den Einsatz von Peroxidase- und Laccaseproduzierenden Mikroorganismen mit einer alkalischen Vorbehandlung von Weizenstroh untersuchten. Als mögliche Mikroorganismen würden sich zudem die potentiellen Peroxidase- und Laccaseproduzenten *Poria subvermispora*, *Irpex lacteus* und *Trametes versicolor* eignen.

Eine Erweiterung der Möglichkeiten zur reaktionstechnischen Charakterisierung von Biomasseaufschlüssen und Gewinnung von Chemikalien wäre eine Verbindung der enzymatischen Hydrolyse mit Folgeprozessen. Hier wäre eine parallele Kultivierung von Mikroorganismen, wie beispielsweise *Corynebacterium glutamicum* möglich, die neben Hexosen auch Pentosen wie Xylose als Kohlenstoffquelle verwerten können, um die Synthese von Chemikalien im Parallelansatz direkt zu untersuchen (Gopinath *et al.*, 2012).

Weiter wäre eine sequentielle Zugabe von vorbehandelten Pflanzenmaterialien mit Enzymzugaben kombinierbar um eine kontinuierliche Freisetzung von Monosacchariden aus dem Substrat erreichen zu können. Idealerweise sollte hierzu die Einbindung eines Pipettierroboters für die Automatisierung der enzymatischen Hydrolyse ermöglicht werden.

9 Literatur

- Andric P., Meyer A.S., Jensen P.A., Dam-Johansen K. 2010. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnol Adv.* 28:308-324.
- Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M.J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour Technol.* 101:4851-4861.
- Alvira P., Negro M.J., Ballesteros M. 2011. Effect of endoxylanase and α -L-arabinosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. *Bioresour Technol.* 102:4552-4558.
- Alvo P., Belkacemi K. 1997. Enzymatic saccharification of milled timothy (*Phleum pratense* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bioresour Technol.* 61:185-198.
- Balan V., da Costa Sousa L., Chundawat S.P., Vismeh R., Jones A.D., Dale B.E. 2008. Mushroom spent straw: a potential substrate for an ethanol-based biorefinery. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35(5):293-301.
- Baldrian P., Valaskova V. 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 32:501-521.
- Banerjee G., Car S., Scott-Craig J.S., Borrusch M.S., Aslam N., Walton J.D. 2010. Synthetic enzyme mixtures for biomass deconstruction: Production and optimization of a core set. *Biotechnol Bioeng* 106:707-720.
- Bansal P., Hall M., Realff M.J., Lee J.H., Bommarius A.S. 2009. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnol Adv.* 27:833-848.
- Benkő Z., Siika-aho M., Viikari L., Reczey K. 2008. Evaluation of the role of xyloglucanase in the enzymatic hydrolysis. *Enzyme Microb Technol.* 43:109-114.
- Banse M., van Meijl H., Tabeau A., Woltjer G., Hellmann F., Verburg P.H. 2011. Impact of EU biofuel policies on world agricultural production and land use. *Biomass Bioenergy* 35:2385-2390.
- Bayer E.A., Chanzy H., Lamed R., Shoham Y. 1998. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr Opin Struct Biol.* 8:548-557.
- Bayer E.A., Belaich J-P., Shoham Y., Lamed R. 2004. The cellulosomes: Multi-enzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu Rev of Microbiol.* 58:521-554.
- Bayer E.A., Henrissat B., Lamed R. 2008. The Cellulosome: A natural bacterial strategy to combat biomass recalcitrance. In: Himmel M.E., (Ed.), Biomass recalcitrance. Blackwell Publishing. Oxford: 407-435.
- Berlin A., Gilkes N., Kurabi A., Bura R., Tu M., Kilburn D., Saddler J. 2005. Weak lignin-binding enzymes. *Appl Biochem Biotechnol.* 121-124:163-170.

- Berlin A., Balkshin M., Gilkes N., Kadla J., Maximenko V., Kubo S., Saddler J. 2006. Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. *J Biotechnol.* 125:198-209.
- Berlin A., Maximenko V., Gilkes N., Saddler J. 2007. Optimization of enzyme complexes for lignocelluloses hydrolysis. *Biotechnol Bioeng.* 97(2):287-296.
- Bernardez T.D., Lyford K., Hogsett D.A., Lynd L.R. 1993. Adsorption of *Clostridium thermocellum* cellulases onto pretreated mixed hardwood, avicel, and lignin. *Biotechnol Bioeng.* 42:899-907.
- Betts J. I., Doig S.D., Baganz F. 2006. Characterization and application of a miniature 10 mL stirred-tank bioreactor, showing scale-down equivalence with a conventional 7 L reactor. *Biotechnol Prog.* 22:681-688.
- Bezerra R.M.F., Dias A.A. 2005. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis. *Appl Environ Microb.* 129:49-59.
- Bhat M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv.* 18:355-383.
- Bhat M.K., Bhat S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol Adv.* 15(3/4):583-620.
- Bjerre A.B., Olesen A.B., Fernqvist T., Plöger A., Schmidt A.S. 1996. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnol Bioeng.* 49(5):568-577.
- Blanchard J.E., Withers S.G. 2001. Rapid screening of the aglycone specificity of glycosidases: applications to enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Chem Biol.* 8(7):627-633.
- Boisset C., Fraschini C., Schulein M., Henrissat B., Chanzy H. 2000. Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A digestion form *Hemicolac insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Appl Environ Microb.* 66:1444-1452.
- Bommarius A.S., Katona A., Cheben S.E., Patel A.S., Ragauskas A.J., Knudson, K., Pu. Y. 2008. Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment. *Metab Eng.* 10:370-381.
- Boraston A.B. Bolam D.N. Gilbert H.J., Davies G.J. 2004. Carbohydrate-binding modules: Fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J.* 382:769-781.
- Brethauer S., Studer M.H., Yang B., Wyman C.E. 2011. The effect of bovine serum albumin on batch and continuous cellulose hydrolysis mixed by stirring or shaking. *Bioresour Technol.* 102(10):6295-6298.
- Brucato A., Cipollina A., Micale G., Scargiali F., Tamburini A., 2010. Particle suspension in top-covered unbaffled tanks. *Chem Eng Sci.* 65:3001-3008.
- Brüning S. 2012. Strömungssimulation als Werkzeug zur Bioreaktorcharakterisierung. Dissertation. Technische Universität München. Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.
- Cadoche L., Lopez G.D. 1989. Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. *Biological Wastes.* 30:153-157.

- Cao W.G., Crawford D.L. 1993. Purification and some properties of β -glucosidase from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* strain SMF. *Can J Microbiol.* 39(1):125-129.
- Cantarella M., Canterella L., Gallifuoco A., Spera A., Alfani F. 2004. Effect of inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF. *Biotechnol Prog.* 20:200-206.
- Chang V.S., Holtzapfle M.T. 2000. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl Biochem Biotechnol.* 84-86:5-37.
- Carvalho F. Duarte L.C., Gírio F.M. 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *J Sci Ind Res.* 67:849-864.
- Chen S.F., Mowery R.A., Chambliss C.K., van Walsum G.P. 2007. Pseudo reaction kinetics of organic degradation products in dilute-acid-catalyzed corn stover pretreatment hydrolysates. *Biotechnol Bioeng.* 98(6):1135-1145.
- Chesson A., Gordon A.H., Lomax J.A. 1983. Substituent groups linked by alkali-labile bonds to arabinose and xylose residues of legume, grass and cereal straw cell walls and their fate during digestion by rumen microorganisms. *J Sci Food Agric.* 34:1330-1340.
- Chmiel H. 2006. Bioreaktoren. In: Chmiel H. (Ed). *Bioprozesstechnik.* Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. 2:195-215.
- Chmiel H. 2011. Bioreaktoren. In: Chmiel H. (Ed). *Bioprozesstechnik.* Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. 3:197-236.
- Cullis I.F., Mansfield S.D. 2010. Optimized delignification of wood-derived lignocellulosics for improved enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Bioeng.* 106(6):884-893.
- Chum H.L., Johnson D.K., Black S., Baker J., Grohmann K., Sarkanen K.V., Wallace K., Schroeder H.A. 1988. Organosolv pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplars: I. Enzyme hydrolysis of cellulosic residues. *Biotechnol Bioeng.* 31(7):643-649.
- Chundawat, S.P.S., Balan, V., Dale, B.E. 2008. High-throughput microplate technique for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biotechnol Bioeng.* 99:1281-1294.
- da Costa Sousa L., Chundawat S.P.S., Balan V., Dale B.E. 2009. Cradle-to-grave assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Curr Opin Biotechnol.* 20:339-347.
- Danckwerts P.V. 1957. Measurement of molecular homogeneity in a mixture. *Chem Eng Sci.* 7(1-2):116-117.
- Dashtban M., Schraft H., Qin W. 2009. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives. *Int J Biol Sci.* 5(6):578-595.
- Dashtban M., Schraft H., Syed T.A., Qin W. 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int J Biochem Mol Biol.* 1(1):36-50.
- Davies G., Henrissat B. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure.* 3:853-859.
- Davin L.B., Patten A.M., Jourdes M., Lewis N.G. 2008. Lignins: A twenty-first century challenge. Himmel M.E., (Ed.), *Biomass recalcitrance* Blackwell Publishing. Oxford: 213-305.

- Decker C.H., Visser J., Schreier P. 2000. β -glucosidases from five black aspergillus species: Study of their physico-chemical and biocatalytic properties. *J Agric Food Chem* 48:4929-4936.
- Decker R.D., Siika-aho M., Viikari L. 2008. Enzymatic depolymerization of plant cell wall hemicelluloses. In: Himmel M.E., (Ed.), Biomass recalcitrance. Blackwell Publishing. Oxford: 352-373.
- Delmer D.P., Amor Y. 1995. Cellulose Biosynthesis. *Plant Cell*. 7:987-1000
- Dennewald D., Hortsch R., Weuster-Botz D. (2012). Evaluation of parallel milliliter scale stirred-tank bioreactors for the study of biphasic whole-cell biocatalysis with ionic liquids. *J Biotechnol*. 157:253-257.
- De Vries R.P., Visser J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev*. 65(4):497-522.
- Ding S-Y., Himmel M.E. 2008. Anatomy and ultrastructure of maize cell walls: An Example of energy plants. In: Himmel M.E., (Ed.), Biomass recalcitrance Blackwell Publishing. Oxford: 38-60.
- Divine C., Ståhlberg J., Reinikainen T., Ruohonen L., Pettersson G., Knowles J.K., Teeri T.T., Jones T.A. 1994. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science*. 265:524-528.
- Divne C., Ståhlberg J., Teeri T.T., Jones T.A. 1998. High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *J Mol Biol*. 275:309-25.
- Doi R.H., Kosugi A. 2004. Cellulosomes: Plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nat Rev Microbiol*. 2:541-551.
- Dorado J., Almendros G., Camarero S., Martinez A.T., Vares T., Hatakka A. 1999. Transformation of wheat straw in the course of solid-state fermentation by four ligninolytic basidiomycetes. *Enzyme Microb Technol*. 25(7):605-612.
- Ducla J.M., Desplanches H., Chevalier J.L. 1983. Effective viscosity of non-Newtonian fluids in a mechanically stirred tank. *Chem Eng Commun*. 21:29-36.
- Ehrhardt, M.R., Monz, T.O., Root, T.W., Connelly, R.K., Scott, C.T., Klingenberg D.J. 2010. Rheology of dilute acid hydrolyzed corn stover at high solids concentration. *Appl Biochem Biotechnol*. 160:1102-1115.
- Einenkel W.D. 1978. Fortsch. d. Verfahrenstechnik 16:113-126.
- Einstein A. 1906. Eine neue Bestimmung der Moleküldimensionen. *Annual Phy*. 19:289-305.
- Ewanick S.M., Bura R., Saddler J.N. 2007. Acid-catalyzed steam pretreatment of lodgepole pine and subsequent enzymatic hydrolysis and fermentation to ethanol. *Biotechnol Bioeng*. 98(4):737-746.
- Falls M., Shi J., Ebrik M.A., Redmond T., Yang B., Wyman C.E., Garlock R., Balan V., Dale B.E., Pallapolu R., Lee Y.Y., Kim Y., Mosier N.S., Ladisch M.R., Hames B., Thomas S., Donohoe B.S., Vinzant T.B., Elander R.T., Warner R.E., Sierra-Ramirez R., Holtzapple M.T. 2011. Investigation of enzyme formulation on pretreated switchgrass. *Bioresour Technol*. 102:11072-11079.

- Foreman P.K., Brown D., Dankmeyer L., Dean R., Diener S., Dunn-Coleman N.S., Goedegebuur F., Houfek T.D., England G.J., Kelley A.S., Meerman H.J., Mitchel T., Mitchinson C., Olivares H.A., Teunissen P.J.M., Yao J., Ward M. 2003. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem.* 278(34):31988-31997.
- Fujino T., Beguin P., Aubert J-P. 1993. Organization of a *Clostridium thermocellum* gene cluster encoding the cellulosomal scaffolding protein CipA and a protein possibly involved in attachment of the cellulosome to the cell surface. *J Bacteriol.* 175:1891-1899.
- Ganesh K., Joshi J.B., Sawant S.B. 2000. Cellulase deactivation in a stirred reactor. *Biochem Eng J.* 4:137-141.
- Garcia-Cubero M.A., González-Benito G., Indacochea I., Coca M., Bolado S. 2009. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresour Technol.* 100(4):1608-1613.
- Gao D., Uppugunda N., Chundawat S.P., Yu X., Hermanson S., Gowda K., Brumm P., Mead D., Balan V., Dale B.E. 2011a. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. *Biotechnol Biofuels.* 4:5.
- Gao D., Chundawat S.P., Uppugundla N., Balan V., Dale B.E. 2011b. Binding characteristics of *Trichoderma reesei* cellulases on untreated, ammonia fiber expansion (AFEX), and dilute-acid pretreated lignocellulosic biomass. *Biotechnol Bioeng.* 108(8):1788-1800.
- Gebhardt G. 2010. Reaktionstechnische Untersuchungen von rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae* zur Bernsteinsäureherstellung. Dissertation. Technische Universität München. Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.
- Gerngross U.T., Romaniec M.P.M., Kobayashi T., Huskisson N.S., Demain A.L. 1993. Sequencing of a *Clostridium thermocellum* gene (*cipA*) encoding the cellulosomal S_L-Protein reveals an unusual degree of internal homology. *Mol Microbiol.* 8(2):325-334.
- Ghose T.K. 1987. Measurement of cellulose activities. *Pure Appl Chem.* 59(2):257-268.
- Gírio F.M., Fonseca C., Carvalheiro F., Duarte L.C., Marques S., Bogel-Lukasik R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour Technol.* 101:4775-4800.
- Gopinath V., Murali A., Dhar K.S., Nampoothiri K.M. 2012. *Corynebacterium glutamicum* as a potent biocatalyst for the bioconversion of pentose sugars to value-added products. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93(1):95-106.
- Gould J.M. 1984. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. *Biotechnol Bioeng.* 26(1):46-52.
- Grabber J.H. 2005. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Science.* 45:820-831.
- Grethlein H.E. 1985. The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Nat Biotechnol.* 3:155-160.
- Grishutin S.G., Gusakov A.V., Markov A.V., Ustinov B.B., Semenova M.V. Sinitsyn A.P. 2004. Specific xyloglucanases as a new class of polysaccharide-degrading enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects.* 1674:268-281.

- Hall M., Rubin J., Behrens S.H., Bommarius A.S. 2011. The cellulose-binding domain of cellobiohydrolase Cel7A from *Trichoderma reesei* is also a thermostabilizing domain. *J Biotechnol.* 155:370-376.
- Hamelinck C.N., van Hooijdonk G., Faaij A.P.C. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass Bioenergy.* 28(4):384-410.
- Hansen M.A., Kristensen J.B., Felby C., Jørgensen H. 2011. Pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw (*Triticum aestivum L.*) – the impact of lignin relocation and plant tissues on enzymatic accessibility. *Bioresour Technol.* 102(3):2804-2811.
- Harris E., Beglinger E., Hajny G., Sherrard E. 1945. Hydrolysis of wood: Treatment with sulfuric acid in a stationary digester. *Ind Eng Chem.* 37(1):12-23.
- Harris P.J., Stone B.A. 2008. Chemistry and molecular organization of plant cell walls. In: Himmel M.E., (Ed.), *Biomass recalcitrance* Blackwell Publishing. Oxford: 61-93.
- Heiss-Blanquet S., Zheng D., Lopes Ferreira N., Lappierre C., Baumberger S. 2011. Effect of pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw on cell wall composition, hydrophobicity and cellulase adsorption. *Bioresour Technol.* 102(10):5938-5946.
- Hendriks A.T.W.M., Zeeman G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol.* 100:10-18.
- Henzler H.J., Biedermann A. 1996. Modelluntersuchungen zur Partikelbeanspruchung in Reaktoren. *Chem Ing Tech.* 68:1546-1561.
- Henzler H.J. 2007. Auslegung von Rührfermentern – Berücksichtigung der Nicht-Newton'schen Eigenschaften von Fermentationslösungen. *Chem Ing Tech.* 79:951-965.
- Herrmann J. 2002. Entwicklung von Messmethoden zur Untersuchung der rheologischen Eigenschaften der Maische. Dissertation. Technische Universität München. Lehrstuhl für Maschinen und Apparatekunde.
- Hiby J.W. 1979. Definition und Messung der Mischgüte in flüssigen Gemischen. *Chem Ing Tech.* 51(7):704-709.
- Himmel M.E., Ding S.-Y., Johnson D.K., Adney W.S., Nimlos M.R., Brady J.W., Foust T.D. 2007. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuel production. *Science.* 315:804-807.
- Hodge D.B., Karim M.N., Schell D.J., McMillan J.D. 2008. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. *Bioresour Technol.* 99:8940-8948.
- Hodge D.B., Karim M.N., Schell D.J., McMillan J.D. 2009. Model-based fed-batch for high solids enzymatic cellulose hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol.* 152:88-107.
- Hoefel T., Wittmann E., Reinecke L., Weuster-Botz D. 2010. Reaction engineering studies for the production of 2-hydroxyisobutyric acid with recombinant *Cupriavidus necator* H 16. *Appl Microbiol Biotechnol.* 88:477-484.
- Hoffmann J., Tralles S., Hempel D.C. 1992. Testsystem zur Untersuchung der mechanischen Beanspruchung von Partikeln im Bioreaktor. *Chem Ing Tech.* 64:953-956.

- Holtzaple M.T., Caram H.S., Humphrey A.E. 1984. Determining the inhibition constants in the HCH-1 of cellulose hydrolysis. *Biotechnol Bioeng.* 26:753-757.
- Holtzaple M., Cognata M., Shu Y., Hendrickson C. 1990. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol Bioeng.* 36:275-287.
- Hortsch R., Stratmann A., Weuster-Botz D. 2010. New milliliter-scale stirred tank bioreactors for the cultivation of mycelium forming microorganisms. *Biotechnol Bioeng.* 106(3):443-451.
- Hortsch R., Weuster-Botz D. 2010. Power consumption and maximum energy dissipation in a milliliter-scale bioreactor. *Biotechnol Prog.* 26:595-599.
- Hortsch R. 2011. Miniaturisierte Rührreaktoren zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen. Dissertation. Technische Universität München. Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.
- Hu J., Arantes V., Saddler J.N. 2011. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: Is it an additive or synergistic effect? *Biotechnol Biofuels.* 4:36.
- Igarashi K., Uchihashi T., Koivula A., Wada M., Kimura S., Okamoto T., Penttilä M., Ando T., Samejima M. 2011. Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface. *Science.* 333:1279-1282.
- Irwin D., Walker L., Spezio M., Wilson D. 1993. Activity studies of eight purified cellulases: Specificity, synergism, and binding domain effects. *Biotechnol Bioeng.* 42(8):1002-1013.
- Ishikawa E., Sakai T., Ikemura H., Matsumoto K., Abe H. 2005. Identification, cloning, and characterization of a *Sporobolomyces singularis* β -glucosidase-like enzyme involved in a galacto-oligosaccharide production. *J Biosci Bioeng.* 99(4):331-339.
- IUB (1992). Enzyme Nomenclature. Academic Press. San Diego.
- Jayani R.S., Saxena S., Gupta R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.* 40:2931-2944.
- Jäger G., Wu Z., Garschhammer K., Engel P., Klement T., Rinaldi R., Spiess A.C., Büchs J. 2010. Practical screening of purified cellobiohydrolases and endoglucanases with α -cellulose and specification of hydrodynamics. *Biotechnol Biofuels.* 3:18.
- Jäger G., Wulforth H., Zeithammel E.U., Elinidou E., Spiess A.C., Büchs J. 2011a. Screening of cellulases for biofuel production: Online monitoring of the enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose using high-throughput scattered light detection. *Biotechnol J.* 6:1-12.
- Jäger G., Girfoglio M., Dollo F., Rinaldi R., Bongrad H., Commandeur U., Fischer R., Spiess A.C., Büchs J. 2011b. How recombinant swollenin from *Kluyveromyces lactis* affects cellulosic substrates and accelerates their hydrolysis. *Biotechnol Biofuels.* 4:33.
- Jeromin G., Bertau M. 2005. Bioorganikum. Wiley-VCH. Weinheim.
- Jervis E.J., Haynes C.A., Kilburn D.G. 1997. Surface diffusion of cellulases and their isolated binding domains on cellulose. *J Biol Chem.* 272:24016-24023.

- Jing X., Zhang X., Bao J. 2009. Inhibition performance of lignocelluloses degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol.* 159(3):696-707.
- Johnson D.K., Elander R.T. 2008. Pretreatment for enhanced digestibility of feedstocks. In: Himmel M.E., (Ed.), Biomass recalcitrance Blackwell Publishing. Oxford: 436-453.
- Jones J., Semrau K. 1984. Wood hydrolysis for ethanol production - previous experience and the economics of selected processes. *Biomass.* 5:109-135.
- Jørgensen H., Kristensen J.B., Felby C. 2007a. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: Challenges and opportunities. *Bioprod Bioref.* 1:119-134.
- Jørgensen H., Vibe-Pedersen J., Larsen J., Felby C. 2007b. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnol Bioeng.* 96(5):862-870.
- Joseleau J-P., Kesraoui R. 1986. Glycosidic bonds between lignin and carbohydrates. *Holzforschung.* 40:163-168.
- Katzen R., Madson P.W., Monceaux D.A. 1995. Use of cellulosic feedstocks for alcohol production. In: Lyons T.P., Murtagh J.E., Kelsall D.R., (Ed). The Alcohols Textbook. Nottingham University Press. 37-46.
- Kaya F., Heitmann J. A., Joyce T.W. 1996. Deactivation of cellulase and hemicellulase in high shear fields. *Cellulose Chem Technol.* 30: 49-56.
- Käppel M. 1975. Bestimmung der Mischgüte beim Homogenisieren von Flüssigkeiten. *Chem Ing Tech.* 47(9):395.
- Kelly W., Gigas B. 2003. Using CFD to predict the behaviour of power law fluids near axial-flow impellers operation in the transitional flow regime. *Chem Eng Sci.* 58:2141-2152.
- Khuri A.I., Mukhopadhyay S. 2010. Response surface methodology. *Compstats.* 2:128-149.
- Kim M.H., Lee S.B., Ryu D.D.Y. 1982. Surface deactivation of cellulase and its prevention. *Enzyme Microb Technol.* 4:99-103.
- Kim S., Holtzapple M.T. 2006. Delignification kinetics of corn stover in lime pretreatment. *Bioresour Technol.* 97(5):778-785.
- Kim T.H., Lee Y.Y. 2005. Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia. *Appl Biochem Biotechnol.* 121-124:1119-1131.
- Kim Y., Ximenes E., Mosier N.S., Ladisch M.R. 2011. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme Microb Technol.* 48:408-415.
- King, B.C., Donnelly, M.K., Bergstrom, G.C., Walker, L.P., Gibson, D.M. 2009. An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. *Biotechnol Bioeng.* 102(4):1033-1044.
- Kipke K. 1979. Rühren von dünnflüssigen und mittelviskosen Medien. *Chem Ing Tech.* 51(5):430-436.

- Klein-Marcuschamer D., Olekowicz-Popiel P., Simmons B.A., Blanch H.W. 2012. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnol Bioeng.* 109(4):1083-1087.
- Klempnauer K.H., Fischer L., Otto M.K. 2006. Einführung in die Biochemie. In: Chmiel H. (Ed). Bioprozesstechnik. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg: 2:23-65.
- Klinke H.B., Ahring B.K., Schmidt A.S., Thomsen A.B. 2002. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresour Technol.* 82(1):15-26.
- Knorr B., Schlieker H., Hohmann H-P., Weuster-Botz D. 2007. Scale-down and parallel operation of the riboflavin production process with *Bacillus subtilis*. *Biochem Eng J.* 33:263-274.
- Knutsen J.S., Liberatore M.W. 2009. Rheology of high-solids biomass slurries for biorefinery applications. *J Rheol.* 53:877-892.
- Knutsen J.S., Liberatore M.W. 2010. Rheology modification and enzyme kinetics of high solids cellulosic slurries. *Energy Fuels.* 24:3267-3274.
- Koshijima T., Watanabe T., 2003. Association between lignin and carbohydrates in wood and other plant tissues. Springer. Berlin.
- Kolb M., Sieber V., Amann M., Faulstich M., Schieder D. 2012. Removal of monomer delignification products by laccase from *Trametes versicolor*. *Bioresour Technol.* 104:298-304.
- Kolmogorov A.N. 1958. Die lokale Struktur der Turbulenz in einer inkompressiblen zähen Flüssigkeit bei sehr großen Reynoldsschen Zahlen. In Goering H. (Ed.). Sammelband zur statistischen Theorie der Turbulenz. Akademie-Verlag, Berlin: 71-76.
- Kraume M., Zehner P. 1995. Konzept zur Maßstabsübertragung beim Suspendieren im Rührbehälter. *Chem Ing Tech.* 67(3):280-288.
- Kraume M. 2003. Mischen und Rühren. Wiley-VCH. Weinheim.
- Kresta S. 1998. Turbulence in stirred tanks: Anisotropic, and Applied. *Can J Chem Eng.* 76:563-576.
- Kristensen J.B., Thygesen L.G., Felby C., Jørgensen J., Elder T. 2008. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnol Biofuels.* 1:5.
- Kumar R., Singh S., Sing O.V. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35:377-391.
- Kumar S., Singh S.P., Mishra I.M., Adhikari D.K. 2009a. Recent advances in production of bioethanol from lignocellulosic biomass. *Chem Eng Technol.* 32(4):517-526.
- Kumar R., Mago G., Balan V., Wyman C.E. 2009b. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresour Technol.* 100(17):3948-3962.

- Kumar R., Wyman C.E. 2009. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnol Prog.* 25(2):302-314.
- Kusterer A. 2007. Reaktionstechnische Optimierung von Parallelreaktoren für kontrollierte Bioprozesse. Dissertation. Technische Universität München. Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.
- Kusterer A., Krause C., Kaufmann K., Arnold M., Weuster-Botz D. 2008. Fully automated single-use stirred-tank bioreactors for parallel microbial cultivations. *Bioprocess Biosyst Eng.* 31(3):207-215.
- Lamed R., Setter E., Kenig R., Bayer E.A. 1983. The cellulosome – a discrete cell surface organelle of *Clostridium thermocellum* which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities. *Biotechnol Bioeng.* 13:163-181.
- Lamed R., Kenig R., Setter E., Bayer E.A. 1985. Major characteristics of the cellulolytic system of *Clostridium thermocellum* coincide with those of the purified cellulosome. *Enzyme Microb Technol.* 7:37-41.
- Lau M.W., Dale B.E., Balan V. 2008. Ethanolic fermentation of hydrolysates from ammonia fiber expansion (AFEX) treated corn stover and distillers grain without detoxification and external supplementation. *Biotechnol Bioeng.* 99(3):529-539
- Lau M.W., Dale B.E. 2009. Cellulosic ethanol production from AFEX-treated corn stover using *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST). *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(5):1368-1373.
- Laureano-Perez L., Teymouri F., Alizadeh H., Dale B.E. 2005. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: Characterization of pretreated corn stover. *Appl Biochem Biotechnol.* 121-124:1081-1099.
- Leboreiro J., Hilaly A.K. 2011. Biomass transportation model and optimum plant size for the production of ethanol. *Bioresour Technol.* 102:2712-2723.
- Liepe R., Meusel W., Möckel H.O., Platzer B., Weißgärber H. 1988. Stoffvereinerung in Fluiden Phasen. In Weiß S., Berghoff W., Grahn E., Gruhn G., Güsewell G., Plötner W., Robel H., Schuber M., (Ed.) Verfahrenstechnische Berechnungsmethoden. VCH Verlagsgesellschaft. Weinheim: Band 4.
- Liu C., Wyman C.E. 2003. The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. *Ind Eng Chem Res.* 42:5409-5416.
- Lynd R.L., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(3):506-577.
- Lynd L.R., Laser M.S., Bransby D., Dale B.E., Davison B., Hamilton R., Himmel M., Keller M., McMillan J.D., Sheehan J., Wyman C.E. 2008. How biotech can transform biofuels. *Nat biotechnol.* 26(2):169-172.
- Maache-Rezzoug Z., Pierre G., Nouviaire A., Maugard T., Rezzoug S.A. 2011. Optimizing thermomechanical pretreatment conditions to enhance enzymatic hydrolysis of wheat straw by response surface methodology. *Biomass Bioenergy.* 35:3129-3138.
- Mansfield S.D., Mooney C., Saddler J.N. 1999. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnol Prog.* 15:804-816.

- Martin C., Thomsen A.B. 2007. Wet oxidation pretreatment of lignocellulosic residues of sugarcane, rice, cassava and peanuts for ethanol production. *J Chem Technol Biotechnol.* 82:174-181.
- Martínez J.M., Granado J.M., Montané J., Salvado J., Farriol S.X. 1995. Fractionation of residual lignocellulosics by dilute-acid prehydrolysis and alkaline extraction: Application to almond shells. *Bioresour Technol.* 52(1):59-67.
- Martínez À.T., Ruiz-Duenas F.J., Martínez M.J., del Rìo J.C., Gutiérrez A. 2009. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr Opin Biotechnol.* 20:348-357.
- McIntosh S., Vancov T. 2011. Optimization of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw. *Biomass Bioenergy.* 35:3094-3103.
- McMillan J.D. 1994. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel M.E., Baker J.O., Overend R.P. (Ed). *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production.* American Chemical Society, Washington DC.
- Medve J., Karlsson J., Lee D., Tjerneld F. 1998. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: Adsorption, sugar production, and synergism of enzymes. *Biotechnol Bioeng.* 59(5):621-634.
- Mersmann A., Einenkel W.D., Käppel M. 1975. Auslegung und Maßstabsvergrößerung von Rührapparaten. *Chem Ing Tech.* 47(23):953-996.
- Merino S.T., Cherry J. 2007. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv Biochem Eng/Biotechnol.* 108:95-120.
- Metzner A.B., Otto R.E. 1957. Agitation of non-Newtonian fluids. *AIChE J.* 3:3-10
- Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry* 426-428.
- Mitsuzawa S., Kagawa H., Li Y., Chan S.L., Paavola C.D., Trent J.D. 2009. The rosettazyme: A synthetic cellulosome. *J Biotechnol.* 143:139-144.
- Mohan D., Pittman C.U., Jr., Steele P.H. 2006. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: A critical review. *Energy Fuels.* 20:848-889.
- Mohnen D. 2002. Biosynthesis of pectins. In: Seymour G.B. und Knox J.P., (Ed). *Pectins and their manipulation.* Blackwell Publishing and CRC Press. Oxford: 52-98
- Mohnen D., Bar-Peled M., Somerville C. 2008. Cell wall polysaccharide synthesis. In: Himmel M.E., (Ed.), *Biomass recalcitrance* Blackwell Publishing. Oxford: 95-187.
- Morais H., Ramos C., Matos N., Forgacs E., Cserhati T., Almeida V., Oliveira J., Darwish Y., Illes Z. 2002. Liquid chromatographic and electrophoretic characterization of extracellular β -glucosidase of *Pleurotus ostreatus* grown in organic waste. *J Chromatogr B.* 770:111-119.
- Moraïs S., Barak Y., Hadar Y., Wilson D.B., Shoham Y., Lamed R., Bayer E.A. 2011. Assembly of xylanases into designer cellulosomes promotes efficient hydrolysis of the xylan component of a natural recalcitrant cellulosic substrate. *mBio.* 2(6):e00233-11.

- Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y.Y., Holtzapple M., Ladisch M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol.* 96(6):673-686.
- Moxley G., Zhu Z., Zhang Y.H. 2008. Efficient sugar release by the cellulose solvent-based lignocelluloses fractionation technology and enzymatic cellulose hydrolysis. *J Agric Food Chem.* 56(17):7885-7890.
- Mussatto S.I., Fernandes M., Milagres A.M.F., Roberto I.C. 2008. Effect of hemicelluloses and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewers spent grain. *Enzyme Microb Technol.* 43:124-129.
- Mulakala C., Reilly P.J. 2005. *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) Cel7A as a molecular machine: a docking study. *Proteins Struct Funct Bioinf.* 60:598-605.
- NREL. 1996. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. National Renewable Energy Laboratory, LAP009, Golden, CO, USA.
- Olofsson K., Palmqvist B., Lidèn G. 2010. Improving simultaneous saccharification and co-fermentation of pretreated wheat straw using both enzyme and substrate feeding. *Biotechnol Biofuels.* 3:17.
- O'Neill M., Albersheim P., Darvill A. 1990. The pectic polysaccharides of primary cell walls. In: Dey P.M., (Ed), *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press. London: 2:415-441.
- Overend R.P., Chornet E., Gascoigne J.A. 1987. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Phil Trans R Soc Lond A.* 321(1561):523-536.
- Pallapolu V.R., Lee Y.Y., Garlock R.J., Balan V., Dale B.E., Kim Y., Mosier N.S., Ladisch M.R., Falls M., Holtzapple M.T., Sierra-Ramirez R., Shi J., Ebrik M.A., Redmond T., Yang B., Wyman C.E., Donohoe B.S., Vinzant T.B., Elander R.T., Hames B., Thomas S., Warner R.E. 2011. Effects of enzyme loading and β -glucosidase supplementation on enzymatic hydrolysis of switchgrass processed by leading pretreatment technologies. *Bioresour Technol.* 102:11115-11120.
- Pan X., Gilkes N., Kadla J., Pye K., Saka S., Gregg D., Ehara K., Xie D., Lam D., Saddler J. 2006. Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: optimization of process yields. *Biotechnol Bioeng.* 94:851-861.
- Panagiotou G., Olsson L. 2007. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. *Biotechnol Bioeng.* 96:250-258.
- Pedersen M., Johansen K.S., Meyer A.S. 2011. Low temperature lignocelluloses pretreatment: effects and interactions of pretreatment pH are critical for maximizing enzymatic monosaccharide yields from wheat straw. *Biotechnol Biofuels.* 4:11.
- Pedersen M., Meyer A.S. 2010. Lignocellulose pretreatment severity - relating pH to biomatrix opening. *New Biotechnology.* 27(6):739-750.
- Perez J.A.S., Porcel E.M.R., Lopez J.L.C., Sevilla J.M.F., Chisti Y. 2006. Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors. *Chem Eng J.* 124:1-5.

- Perez J.A., González A., Oliva J.M., Ballesteros I., Manzanares P. 2007. Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor. *J Chem Technol Biotechnol*. 82(10):929-938.
- Peter C.P., Lotter S., Maier U., Büchs J. 2004. Impact of out-of-phase conditions on screening results in shaking flask experiments. *Biochem Eng J*. 17:205-215.
- Peter C.P., Suzuki Y., Büchs J. 2006 Hydromechanical stress in shake flasks: Correlation for the maximum local energy dissipation rate. *Biotechnol Bioeng*. 93:1164-1176.
- Peter C.P. 2007. Auslegung geschüttelter Bioreaktoren für hochviskose und hydromechanisch empfindliche Fermentationssysteme. Dissertation. RWTH Aachen. Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.
- Pimenova N.V., Hanley T.R. 2003. Measurement of rheological properties of corn stover suspensions. *Appl Biochem Biotechnol*. 105:383-392.
- Pimenova N.V., Hanley T.R. 2004. Effect of corn stover concentration on rheological characteristics. *Appl Biochem Biotechnol*. 113:347-360.
- Playne M.J. 1984. Increased digestibility of bagasse by pretreatment with alkalis and steam explosion. *Biotechnol Bioeng*. 26:426-433.
- Poole D.M., Morag E., Lamed R., Bayer E.A., Hazlewood G.P., Gilbert H.J. 1992. Identification of the cellulose binding domain of the cellulosome subunit S1 from *Chlostridium thermocellum*. *FEMS Microbiology Letters*. 99:181-186.
- Puskeiler R., Kaufmann K., Weuster-Botz D. 2005a. Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD). *Biotechnol Bioeng*. 89:512:523.
- Puskeiler R., Kusterer A., John G.T., Weuster-Botz D. 2005b. Miniature bioreactors for automated high-throughput bioprocess design (HTBD): Reproducibility of parallel fed-batch cultivations with *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem*. 42:227-235.
- Qing Q., Wyman C.E. 2011a. Hydrolysis of different chain length xylooligomers by cellulase and hemicellulase. *Bioresour Technol*. 102:1359-1366.
- Qing Q., Wyman C.E. 2011b. Supplementation with xylanase and β -xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover. *Biotechnol Biofuels*. 4:18.
- Qing Q., Yang B., Wyman C.E. 2010. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresour Technol*. 101:9624-9630.
- Riedlberger P., Weuster-Botz D. 2010. Rührorgan für Flüssigkeiten. Gebrauchsmuster DE 20 2010 011 902 U1.
- Riedlberger P., Weuster-Botz D. 2012. New miniature stirred-tank bioreactors for parallel study of enzymatic biomass hydrolysis. *Bioresour Technol*. 106:138-146.
- Roche C.M., Dibble C.J., Knutsen J.S., Stickel J.J., Liberatore M.W. 2009a. Particle concentration and yield stress of biomass slurries during enzymatic high-solids loadings. *Biotechnol Bioeng*. 104:290-300.

- Roche C.M., Dibble C.J., Stickel J.J. 2009b. Laboratory-scale method for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass at high-solids loadings. *Biotechnol Biofuels* 2:28.
- Rollin J.A., Zhu Z., Sathitsuksanoh N., Zhang Y.H.P. 2011. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: A comparison of cellulose solvent-based lignocelluloses fractionation and soaking in aqueous ammonia. *Biotechnol Bioeng.* 108(1):22-30.
- Rouvinen J., Bergfors T., Teeri T., Knowles J.K., Jones T.A. 1990. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science.* 249:380-386.
- Saeman J.F. 1945. Kinetics of wood saccharification: Hydrolysis of cellulose and decomposition of sugars in dilute acid at high temperature. *Ind Eng Chem.* 37(1):43-52.
- Saha B.C., Bothast R.J. 1996. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel β -glucosidase from *Candida peltata*. *Appl Environ Microbiol.* 62:3165-3170.
- Saha B.C. 2003. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 30:279-291.
- Salvachua D., Prieto A., López-Abelairas M., Lu-Chau T., Martínez A.T., Martínez M.J. 2011. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresour Technol.* 102(16):7500-7506.
- Sakka K., Yoshikawa K., Kojima Y., Karita S., Ohmiya K., Shimada K. 1993. Nucleotide-sequence of the *Clostridium stercorarium* xylA gene encoding a bifunctional protein with β -D-Xylosidase and α -L-Arabinofuranosidase activities, and properties of the translated product. *Biosci Biotechnol Biochem.* 57:268-272.
- Samaniuk J.R., Tim Scott C., Root T.W., Klingenberg D.J. 2011. The effect of high intensity mixing on the enzymatic hydrolysis of concentrated cellulose fiber suspensions. *Bioresour Technol.* 102:4489-4494.
- Sandgren M., Ståhlberg J., Mitchinson C. 2005. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: Improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog Biophys Mol Biol.* 89:246-291.
- Santoro N., Cantu S.L., Tornqvist C.E., Falbel T.G., Bolivar J.L., Patterson S.E., Pauly M., Walton J.D. 2010. A high-throughput platform for screening milligram quantities of plant biomass for lignocellulosic digestibility. *Bioenerg Res.* 3:93-102.
- Sathitsuksanoh N., Zhu Z., Wi S., Zhang Y.H.P. 2011. Cellulose solvent-based biomass pretreatment breaks highly ordered hydrogen bonds in cellulose fibers of switchgrass. *Biotechnol Bioeng.* 108(3):521-529.
- Schmid G., Wandrey C. 1989. Characterization of a cellodextrin glucohydrolase with soluble oligomeric substrates: experimental results and modeling of concentration time course. *Biotechnol Bioeng.* 33:1445-1460.
- Schwarz W.H. 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56:124-154.
- Selig M.J., Vinzant T.B., Himmel M.E., Decker S.R. 2009. The effect of lignin removal by alkaline peroxide pretreatment on the susceptibility of corn stover to purified cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol.* 155:397-406.

- Shao X., Lynd L., Bakker A., LaRoche R., Wyman C. 2010. Reactor scale up for biological conversion of cellulosic biomass to ethanol. *Bioprocess Biosyst Eng.* 33:485-493.
- Shareck F., Roy C., Yaguchi M., Morosoli R., Kluepfel D. 1991. Sequences of 3 genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*. *Gene.* 107:75-82
- Sherrard E., Kressman F. 1945. Review of processes in the United States prior to world war II. *Ind Eng Chem.* 37(1):5-8.
- Shill K., Padmanabhan S., Xin Q., Prausnitz J.M., Clark D.S., Blanch H.W. 2011. Ionic liquid pretreatment of cellulosic biomass: enzymatic hydrolysis and ionic liquid recycle. *Biotechnol Bioeng.* 108(3):511-520.
- Shoseyov O., Takagi M., Goldstein M.A., Doi R.H. 1992. Primary sequence analysis of *Clostridium cellulovorans* cellulose binding protein A. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:3483-3487.
- Shoseyov O., Shani Z., Levy I. 2006. Carbohydrate binding modules: Biochemical properties and novel applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70:283-295.
- Sidiras D., Koukios E. 1989. Acid saccharification of ball milled straw. *Biomass.* 19:289-306.
- Sidiras D., Batzias F., Ranjan R., Tsapatsis M. 2011. Simulation and optimization of batch autohydrolysis of wheat straw to monosaccharides and oligosaccharides. *Bioresour Technol.* 102(22):10486-10492.
- Silva G.G., Couturier M., Berrin J.G., Buléon A, Rouau X. 2012. Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw. *Bioresour Technol.* 103(1):192-200.
- Singh D., Chen S. 2008. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81:399-417.
- Singh D., Zeng J., Laskar D.D., Deobald L., Hiscox W.C., Chen S. 2011. Investigation of wheat straw biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biomass Bioenergy.* 35:1030-1040.
- Sluiter A., Hannes B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., Crocker D. 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass. NREL Laboratory Analytical Procedure. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, USA.
- Song L., Laguerre S., Dumon C., Botonnet S., O'Donohue M.J. 2010. A high-throughput screening system for the evaluation of biomass-hydrolyzing glycoside hydrolases. *Bioresour Technol.* 101:8237-8243.
- Ståhlberg J., Johansson G., Pettersson G. 1991. A new model for enzymatic hydrolysis of cellulose based on the two-domain structure of cellobiohydrolase I. *Nat Biotechnol.* 9:286-290.
- Stickel J.J., Knutsen J.S., Liberatore M.W., Luu W., Bousfield D.W., Klingenberg D.J., Tim Scott C., Root T.W., Ehrhardt M.R., Monz T.O. 2009. Rheology measurements of a biomass slurry: an inter-laboratory study. *Rheol Acta.* 48:1005-1015.

- Studer M.H., DeMartini J.D., Brethauer S., McKenzie H.L., Wyman C.E. 2010. Engineering of a high-throughput screening system to identify cellulosic biomass, pretreatments, and enzyme formulations that enhance sugar release. *Biotechnol Bioeng.* 105(2):231-238.
- Studer M.H., DeMartini J.D., Davis M.F., Sykes R.W., Davison B., Keller M., Tuskan G.A., Wyman C.E. 2011. Lignin content in natural *Populus* variants affects sugar release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108(15):6300-6305.
- Sun Y., Cheng J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour Technol.* 83(1):1-11.
- Szijarto N., Horan E., Zhang J., Puranen T., Siika-Aho M., Viikari L. 2011. Thermostable endoglucanases in the liquefaction of hydrothermally pretreated wheat straw. *Biotechnol Biofuels.* 4(1):2.
- Tabka M.G., Herpoël-Gimbert I., Monod F., Asther M., Sigoillot J.C. 2006. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme Microb Technol.* 39:897-902.
- Taherzadeh M.J., Karimi K. 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources* 2(3):472-499.
- Taherzadeh M.J., Karimi K. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *Int J Mol Sci.* 9(9):1621-1651.
- Tamaki Y., Mazza G. 2011. Rapid determination of carbohydrates, ash and extractives contents of straw using attenuated total reflectance fourier transform mid-infrared spectroscopy. *J Agric Food Chem.* 59(12):6346-6342.
- Tassinari T., Macy C., Spano L. 1980. Energy requirements and process design considerations in compression-milling pretreatment of cellulosic wastes for enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Bioeng.* 22:1689-1705.
- Tejirian A., Xu F. 2011. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. *Enzyme Microb Technol.* 48(3):239-247.
- Tenkanen M., Buchert J., Viikari L. 1995. Binding of hemicellulases on isolated polysaccharide substrates. *Enzyme Microb Technol.* 17:499-505.
- Thring R.W., Chornet E., Overend R.P. 1990. Recovery of a solvolytic lignin: Effects of spent liquor/acid volume ratio, acid concentration and temperature. *Biomass.* 23(4):289-305.
- Tipler P.A. 2000. Physik. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg – Berlin 11:339-376.
- Tolan J.S., Foody B. 1999. Cellulases from submerged fermentation. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 65:41-67
- Toor H.L. 1962. Mass transfer in dilute turbulent and nonturbulent systems with rapid irreversible reactions and equal diffusivities. *AIChE J.* 8:70-78.
- Todtenhaupt P., Todtenhaupt E., Müller W. 1990 Handbuch der Rührtechnik. Schopfheim: EKATO Rühr- und Mischtechnik GmbH.

- Turner M.B., Spear S.K., Huddleston J.G., Holbrey J.D., Rogers R.D. 2003. Ionic liquid salt-induced inactivation and unfolding of cellulase from *Trichoderma reesei*. *Green Chem.* 5:443-447.
- Ulrich H., Schreiber H. 1967. Rühren in zähen Flüssigkeiten. *Chem Ing Tech.* 39(5/6):218-224.
- Urbanowicz B.R., Rayon C., Carpita N.C. 2004. Topology of the maize mixed linkage (1,3), (1,4)- β -D-glucan synthase at the Golgi membrane. *Plant Physiol.* 134:758-768.
- Vester A., Hans M., Hohmann H-P., Weuster-Botz D. 2009. Discrimination of riboflavin producing *Bacillus subtilis* strains based on the fed-batch process performances on a milliliter scale. *Appl Microbiol Biotechnol.* 84:71-76.
- Viamajala S., McMillan J.D., Schell D.J., Elander R.T. 2009. Rheology of corn stover slurries at high solids concentration and particle size. *Bioresour Technol.* 100:925-934.
- Walch E., Zemann A., Schinner F., Bonn G., Bobleter O. 1992. Enzymatic saccharification of hemicellulose obtained from hydrothermally pretreated sugar cane bagasse and beech bark. *Bioresour Technol.* 39:173-177.
- Wan C., Li Y. 2011. Effect of hot water extraction and liquid hot water pretreatment on the fungal degradation of biomass feedstocks. *Bioresour Technol.* 102(20):9788-9793.
- Warren R.A.J. 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu Rev Microbiol* 50:183-212.
- Watanabe T., Sato T., Yoshioka S., Koshijima T., Kuwahara M. 1992. Purification and properties of *Aspergillus niger* β -Glucosidase. *Eur J Biochem.* 209:651-659.
- Weber M. 1995. Unterschiede zwischen bewehrten und unbewehrten Rührbehältern im turbulenten Strömungsbereich im Hinblick auf die Maßstabsübertragung. *Chem Ing Tech.* 67(3):330-333.
- Weil J.R., Sarikaya A., Shiang-Lan R., Goetz J., Ladisch C.M., Brewer M., Hendrickson R., Ladisch M.R. 1998. Pretreatment of corn fiber by pressure cooking in water. *Appl Biochem Biotechnol.* 73:1-17.
- Weinspach P.M. 1969. Hydrodynamisches Verhalten von Suspensionen im Rührgefäß. *Chem Ing Tech.* 41(5-6):260-265.
- Werner F., Mersmann A. 1995. Nicht-Newtonsches Fließverhalten von Suspensionen kleiner sedimentierender Partikel. *Chem Ing Tech.* 67(3):217-320.
- Weuster-Botz D. 2005a. Parallel reactor systems for the bioprocess development. In: Scheper T. (Ed.). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 92:125-143.
- Weuster-Botz D., Puskeiler R., Kusterer A., Kaufmann K., John G.T., Arnold M. 2005b. Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design. *Bioproc Biosyst Eng.* 28:109-119.
- Weuster-Botz D., Hekmat D., Puskeiler R., Franco-Lara E. 2007. Enabling technologies: Fermentation and downstream processing. *Adv Biochem Eng/Biotechnol.* 105:205-247.
- Wilson D.B. 2008. Aerobic microbial cellulase systems. In: Himmel M.E., (Ed.), *Biomass recalcitrance*. Blackwell Publishing. Oxford: 374-392.

- Wilson D.B. 2009. Cellulases and biofuels. *Curr Opin Biotechnol.* 20:295-299.
- Withers S.G. 2001. Mechanism of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr Polym.* 44:325-337.
- Wood T.M., Bhat K.M. 1988. Methods for measuring cellulase activities. *Methods Enzymol.* 160(9-10):87-112.
- Wyman C.E. 1996. Handbook on Bioethanol: Production and utilization: Taylor and Francis. Washington DC
- Wyman C.E., Dale B.E., Elander R.T., Holtzapple M., Ladisch M.R., Lee Y.Y. 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour Technol.* 96(18):1959-1966.
- Wyman C.E. (2007). What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends Biotechnol.* 25(4):153-157.
- Wyman C.E., Balan V., Dale B.E., Elander R.T., Falls M., Hames B., Holtzapple M.T., Ladisch M.R., Lee Y.Y., Mosier N., Pallapolu V.R., Shi J., Thomas S.R., Warner R.E. 2011. Comparative data on effects of leading pretreatments and enzyme loadings and formulations on sugar yields from different switchgrass source. *Bioresour Technol.* 102:11052-11062.
- Xiao Z., Zhang X., Gregg D.J., Saddler J.N. 2004. Effects of sugar inhibition on cellulases and glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Appl Environ Microb.* 113-116:1115-1126.
- Ximenes E., Kim Y., Mosier N.S., Dien B., Ladisch M.R. 2010a. Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme Microb Technol.* 46:170-176.
- Ximenes E., Kim Y., Mosier N.S., Dien B., Ladisch M.R. 2010b. Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme Microb Technol.* 48:54-60.
- Yang B., Wyman C.E. 2008. Pretreatment: The key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod Bioref.* 2:26-40.
- Yang J., Zhang X., Yong Q., Yu S. 2011. Three-stage enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover at high substrate concentration. *Bioresour Technol.* 102:4905-4908.
- Yeh A-I., Huang Y-C., Chen S.H. 2010. Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Carbohydr Polym.* 79:192-199.
- Yoshida M., Liu Y., Uchida S., Kawarada K., Ukagami Y., Ichinose H., Kaneko S., Fukuda K. 2008. Effects of cellulose crystallinity, hemicelluloses, and lignin on the enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* to monosaccharides. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72(3):805-810.
- Yu Y., Lou X., Wu H. 2008. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods. *Energy Fuels.* 22:46-60.
- Yun S.I., Jeong C.S., Chung D.K., Choi H.S. 2001. Purification and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. *Biosci Biotechnol Biochem.* 65:2028-2032.

- Zhao X., Cheng K., Liu D. 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 82(5):815-827.
- Zhang Y.H.P., Lynd L.R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng.* 88(7):798-824.
- Zhang Y.H.P., Himmel M.E., Mielenz J.R. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol Adv.* 24:452-481.
- Zhang Y.H., Ding S.Y., Mielenz J.R., Cui J.B., Elander R.T., Laser M., Himmel M.E., McMillan J.R., Lynd L.R. 2007. Fractionating recalcitrant lignocelluloses at modest reaction conditions. *Biotechnol Bioeng.* 92(2):214-223.
- Zhang Y.H.P. 2011. What is vital (and not vital) to advance economically-competitive biofuels production. *Process Biochem.* 46:2091-2110.
- Zhu S., Wu Y., Yu Z., Wang C., Yu F., Jin S., Ding Y., Chi R., Liao J., Zhang Y. 2006. Comparison of three microwave/chemical pretreatment processes for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Biosystems Engineering.* 93(3):279-283.
- Zlokarnik M. 1967. Eignung von Rührern zum Homogenisieren von Flüssigkeitsgemischen. *Chem Ing Tech.* 39(9/10):539-548.
- Zlokarnik M. 1970. Einfluss der Dichte- und Zähigkeitsunterschiede auf die Mischzeit beim Homogenisieren von Flüssigkeitsgemischen. *Chem Ing Tech.* 42(15):1009-1011.
- Zlokarnik M. 2001. Dimensional analysis and scale-up in theory and industrial application. *J liposome res.* 11(4):269-307.
- Zlokarnik M. 2005. Stirring. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH. Weinheim. 1-40.

Abkürzungen und Formelzeichen

| Abkürzung/Formelzeichen | Bedeutung |
|-------------------------|---------------------------------------|
| A | Fläche |
| Ar | Archimedeszahl |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| $Ca(OH)_2$ | Calciumhydroxid |
| CBU | Cellobiaseeinheiten |
| CCD | <i>Central Composite Design</i> |
| c_D | Dissipationsbeiwert = 0,1 |
| CFD | <i>Computational Fluid Dynamics</i> |
| CMC | Carboxymethylcellulose |
| c_{Enzym} | Enzymkonzentration |
| $c_{Essigsäure}$ | Essigsäurekonzentration |
| c_{Zucker} | Zuckerkonzentration |
| C_1 | Beladung Cellulasepräparat |
| C_2 | Beladung β -Glucosidasepräparat |
| C_3 | Beladung Hemicellulasepräparat |
| d | Rührerspitzen­durchmesser |
| d_p | Partikeldurchmesser |
| D | Reaktordurchmesser |
| D | Diffusionskoeffizient |
| DNS | Dinitrosalicylsäure |
| Fe | Feststoffanteil |
| FPU | Filterpapiereinheiten |
| Fr | Froudezahl |
| Fr' | modifizierte Froudezahl |
| g | Erdbeschleunigung |
| h | Länge des Turbulenzerzeugers |
| h | Höhe des Überstandes |
| H | Höhe der Suspension / Füllhöhe |
| HPLC | Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie |
| H_2SO_4 | Schwefelsäure |
| k | empirische Konstante |

| Abkürzung/Formelzeichen | Bedeutung |
|---------------------------------------|--|
| K | Konsistenzindex |
| K_i | Inhibierungskonstante |
| m | Fließindex |
| M | Molar [mol L^{-1}] |
| $m_{\text{Filtertiegel, getrocknet}}$ | Masse nach dem Trocknen bei 70 °C |
| $m_{\text{Filtertiegel, gebrannt}}$ | Masse nach dem Brennen bei 550 °C |
| $m_{\text{Filtertiegel}}$ | Masse des leeren Filtertiegels |
| m_{Probe} | Trockengewicht der Probe |
| min | Minuten |
| n | Rührerdrehzahl, Schüttelfrequenz |
| Ne | Newtonzahl |
| $n_{\theta,97}$ | Durchmischungskennzahl |
| PEEK | Poly-(Ether-Ether-Keton) |
| p | Druck |
| P | eingetragene mechanische Leistung |
| P/V | Volumenspezifischer Leistungseintrag |
| p-Wert | statistischer Parameter |
| Re | Reynoldszahl |
| Re_{app} | scheinbare Reynoldszahl |
| R_0 | Vorbehandlungsfaktor |
| RSM | <i>Response Surface Methodology</i> |
| R^2 | statistischer Parameter |
| $R^2_{\text{angepasst}}$ | statistischer Parameter |
| Sc | Schmidtzahl |
| SUL | Klason Lignin, säureunlösliches Lignin |
| SLL | säurelösliches Lignin |
| T | Temperatur |
| TS | Trockensubstanz |
| t_{Halt} | Haltezeit |
| UV_{abs} | Absorptionsgrad der Probe bei 320 nm |
| V | Flüssigkeitsvolumen |
| V_{Filtrat} | Volumen des Filtrats |
| w_{ss} | Schwarmsinkgeschwindigkeit |
| w_s | Sinkgeschwindigkeit von Einzelpartikel |
| w/w | Massenanteil |

| Abkürzung/Formelzeichen | Bedeutung |
|--------------------------------------|--|
| X_L | gesamter Ligninanteil |
| X_{SUL} | säureunlöslicher Ligninanteil |
| X_{SLL} | säurelöslicher Ligninanteil |
| $X_{Saccharid}$ | Saccharidanteil |
| X_{Zucker} | Zuckeranteil |
| y | Antwortgröße |
| Z, x | Einflussgröße |
| Z^* | codierte Einflussgröße |
| Z_{max} | maximaler Wert der Einflussgröße |
| Z_{min} | minimaler Wert der Einflussgröße |
| | |
| Symbole | Bedeutung |
| β | Anpassungsparameter |
| γ | Schergeschwindigkeit |
| ε | Absorptionskonstante von säurelöslichem Lignin |
| $\varepsilon_{max}/\varepsilon_\phi$ | Verhältnis maximale lokale zu mittlerer Energiedissipation |
| $f_{Verdünnung}$ | Verdünnungsfaktor |
| $f_{Anhydrokorrektur}$ | Umrechnungsfaktor |
| f_{Umsatz} | Umrechnungsfaktor |
| $f(\phi_t)$ | empirische mathematische Korrelation |
| η | dynamische Viskosität |
| η_{app} | scheinbare dynamische Viskosität |
| η_∞ | dynamische Viskosität für $\gamma \rightarrow \infty$ |
| η_0 | dynamische Viskosität für $\gamma \rightarrow 0$ |
| η_s | dynamische Viskosität der Suspension |
| η_f | dynamische Viskosität der Trägerflüssigkeit |
| v | Geschwindigkeit |
| ν | kinematische Viskosität |
| v_{Tip} | Rührerumfangsgeschwindigkeit |
| ρ | Dichte |
| $\Delta\rho$ | Dichtedifferenz der verschiedenen Phasen |
| τ | Scherspannung |
| ϕ_m | Massenanteil der dispersen Phase |

Symbole**Bedeutung** ϕ_{max}

maximale Packungsdichte = 0,74

 ϕ_t

Volumenkonzentration der dispersen Phase

 ω

Winkelgeschwindigkeit

Dimensionslose Kennzahlen

$$Ar = \frac{d^3 \cdot \Delta\rho \cdot g}{v^2 \cdot \rho}$$

$$Fr = \frac{n^2 d}{g}$$

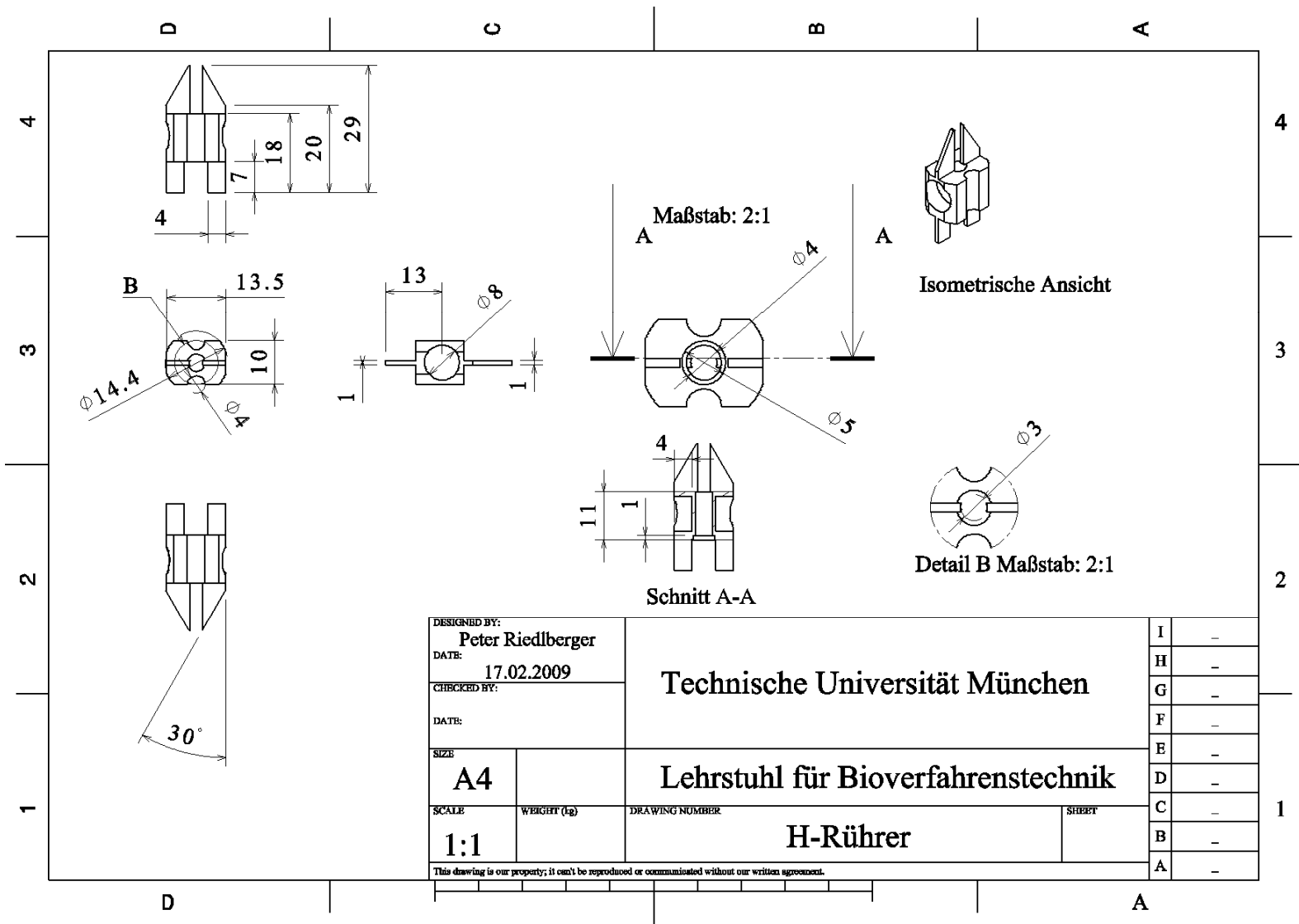
$$Ne = \frac{P}{\rho \cdot n^3 \cdot d^5}$$

$$Re = \frac{\rho \cdot n \cdot d^2}{\eta} = \frac{n \cdot d^2}{\nu}$$

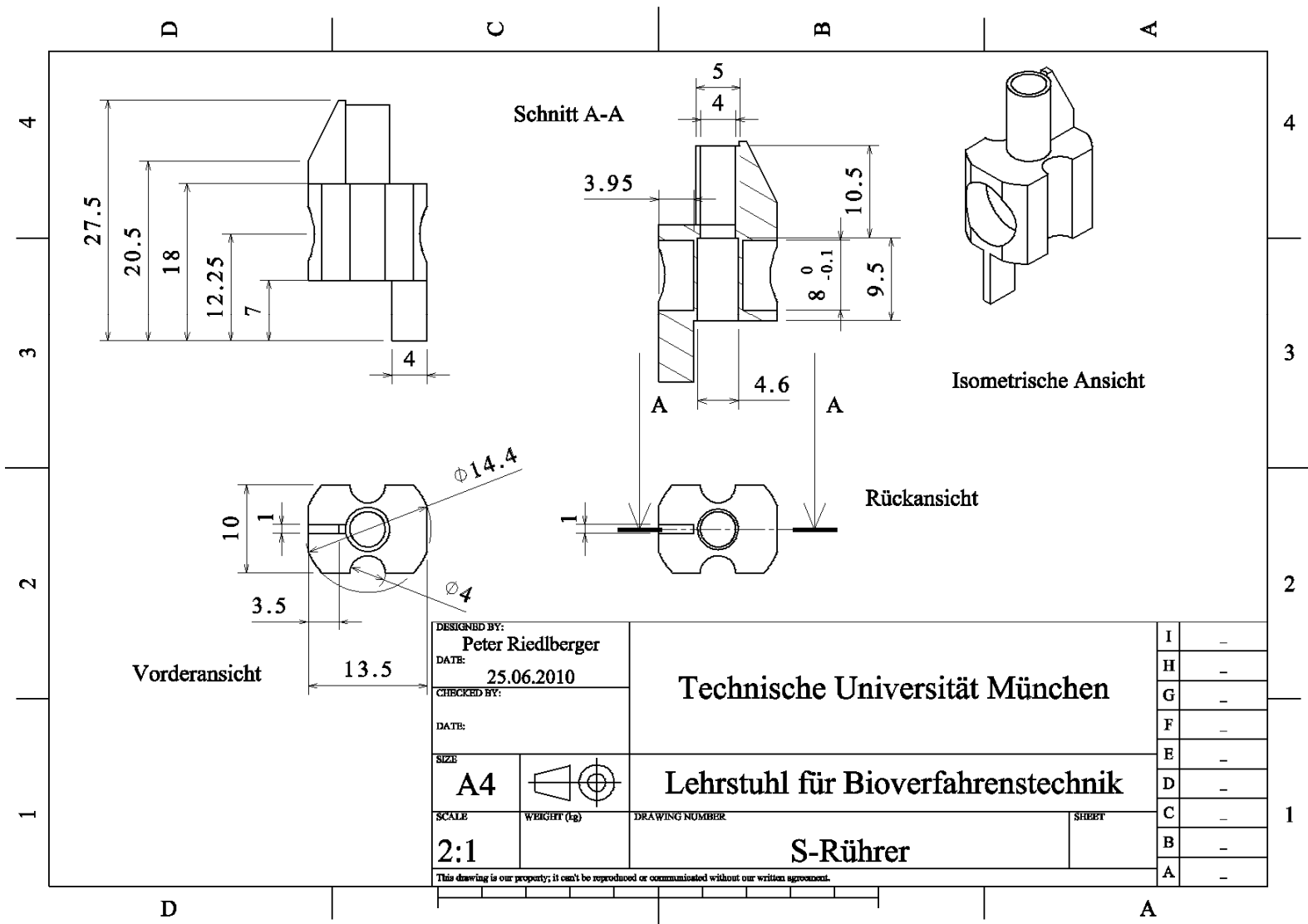
$$Sc = \frac{\nu}{D}$$

Anhang

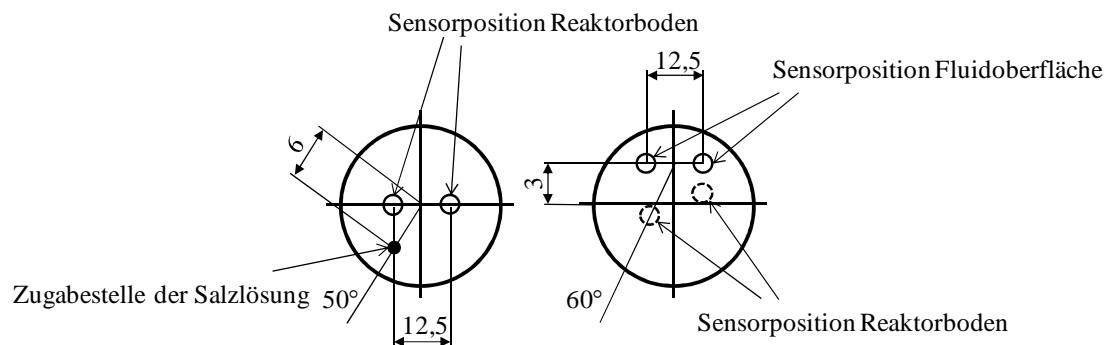
Im Anhang sind neben den technischen Zeichnungen der verwendeten Rührorgane in Milliliter-Reaktoren (A1 bis A2), eine Prinzipskizze der Mischzeitversuche (A3), die Proteinkonzentrationen der verwendeten Enzympräparate (A4) auch Daten für die Modellierungen enthalten (A5 bis A10). p-Werte für die Modellierungen mit dem Substrat Weizenstroh (A5), Paritätsdarstellungen bei der Modellierung der Glucose- und Xyloseproduktivitäten aus Weizenstroh (A6 bis A8). p-Werte für die Modellierungen mit dem Substrat Maisspindelgranulat (A9), Paritätsdarstellungen bei der Modellierung der Glucose- und Xyloseproduktivitäten aus Maisspindelgranulat (A10).



A1: Technische Zeichnung des H-Rührers.



A2: Technische Zeichnung des S-Rührers.



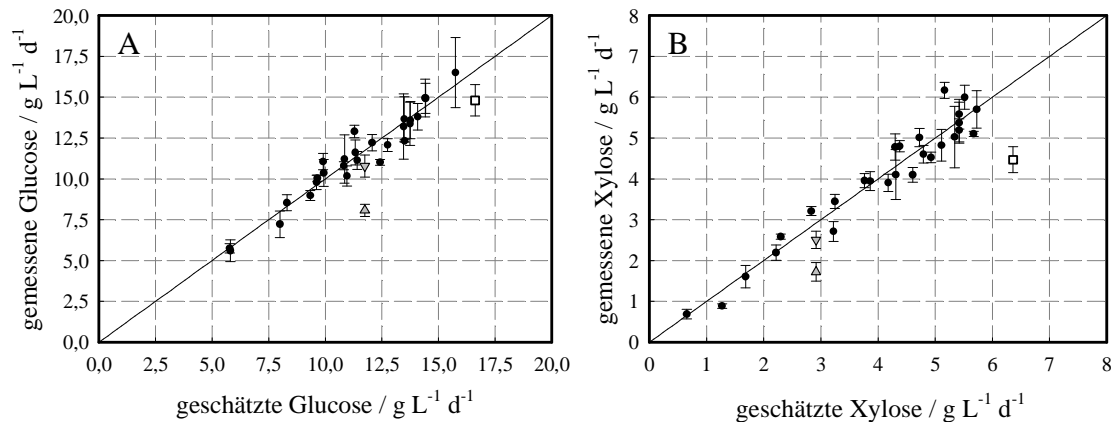
A3: Prinzipskizze zur Mischzeitmessung. Veranschaulicht ist die Zugabestelle der Probenlösung (Salzlösung) sowie die Positionierung der Sensoren am Reaktorboden und an der Fluidoberfläche im Milliliter-Rührreaktor.

A4: Bestimmte Proteinkonzentrationen nach der Pierce-BCA- und Bradford-Methode der verwendeten Enzympräparate. Ermittelte Standardabweichung $\pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$. Für die enzymatische Hydrolyse wurden die Proteinkonzentrationen nach Pierce-BCA verwendet. # 1 wurde in den Kapiteln 5.4, 5.5, 5.6 und 5.7, # 2 in den Kapiteln 5.3 und 5.8 verwendet. NB: nicht bestimmt.

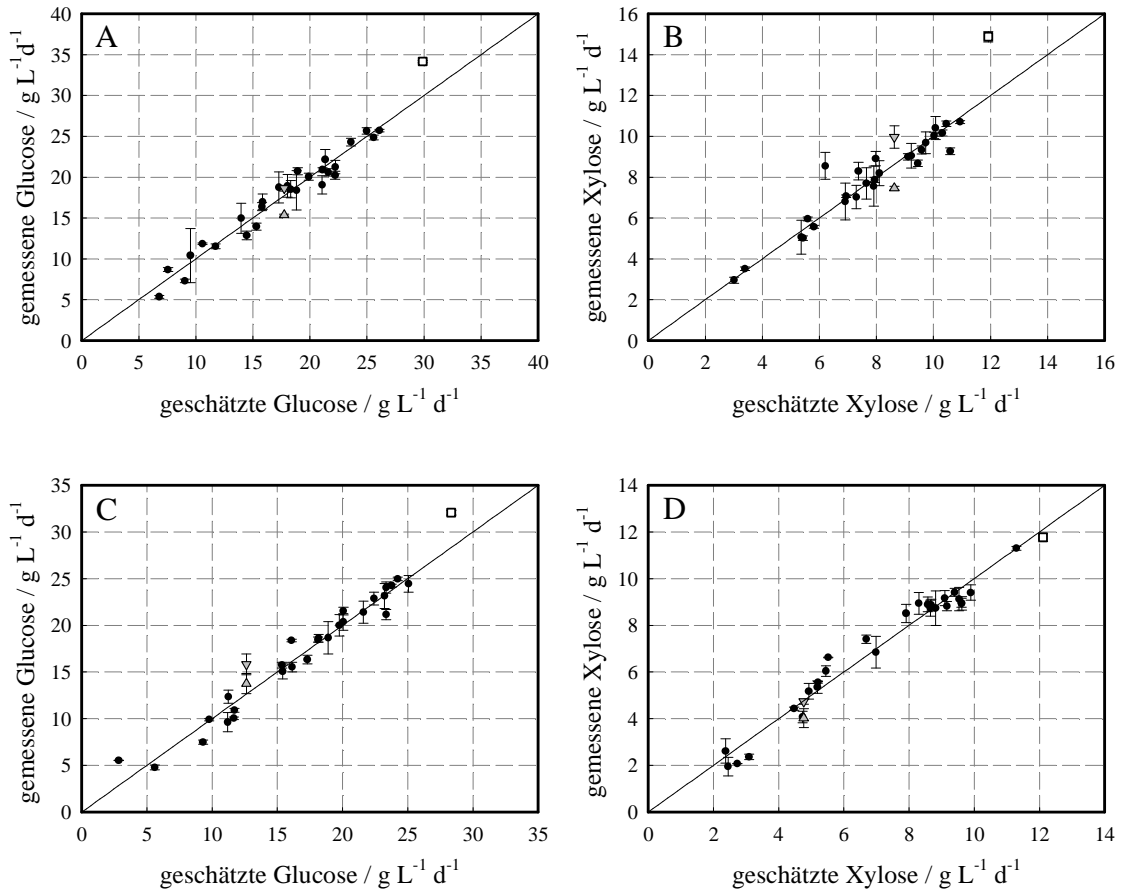
| Enzympräparate | Pierce-BCA / g L ⁻¹ | Bradford / g L ⁻¹ |
|----------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| NS50013 („Celluclast“) #1 | 139,0 | NB |
| NS50013 („Celluclast“) #2 | 136,2 | 42,6 |
| NS50010 („Novozym 188“) #1 | 120,0 | NB |
| NS50010 („Novozym 188“) #2 | 150,7 | 56,4 |
| NS22002 | 30,2 | 17,5 |
| NS50030 („Shearzyme“) #1 | 32,0 | NB |
| NS50030 („Shearzyme“) #2 | 27,5 | 17,0 |
| NS 22012 („Pulpzyme“) #1 | 47,0 | NB |
| NS 22012 („Pulpzyme“) #2 | 29,3 | 21,0 |
| NS50012 | 184,0 | NB |
| Accellerase 1500 #1 | 114,0 | NB |
| Accellerase 1500 #2 | 98,9 | 26,3 |
| Distizym Beta-G | 165,0 | NB |
| BG-Super | 19,0 | NB |
| BG HK-4 | 23,0 | NB |
| Vegazym HC | 68,0 | NB |

A5: Modellparameter β_{ij} mit p-Werten. Hydrothermisch (160 °C, 1 h), alkalisch (0,1 g g⁻¹_{TS} Ca(OH)₂, 135 °C, 1 h) und saure (0,5 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) Vorbehandlung von Weizenstroh (< 2 mm). Feststoffanteil während der enzymatischen Hydrolyse 8 % (w/w TS). „Celluclast“, „Novozym 188“, „NS22002“ (a), „Accellerase 1500“, „Novozym 188“, „NS22002“ (b), „Celluclast“, „Novozym 188“, „Shearzyme“ (c), „Celluclast“, „Novozym 188“, „Pulzyme“ (d), 2,0 mg g⁻¹_{TS} ≤ „Novozym 188“ ≤ 6,0 mg g⁻¹_{TS} (*). Parameter β_{ij} mit i = 1 für den Temperatureinfluss, i = 2 für den Einfluss des pH, i = 3 für den Einfluss der Cellulasepräparate „Celluclast“ und „Accellerase 1500“, i = 4 für den Einfluss des β -Glucosidasepräparats „Novozym 188“ und i = 5 für den Einfluss der Hemicellulasepräparate „NS22002“, „Shearzyme“ und „Pulzyme“. Als nicht signifikant erkannte Parameter sind mit X gekennzeichnet.

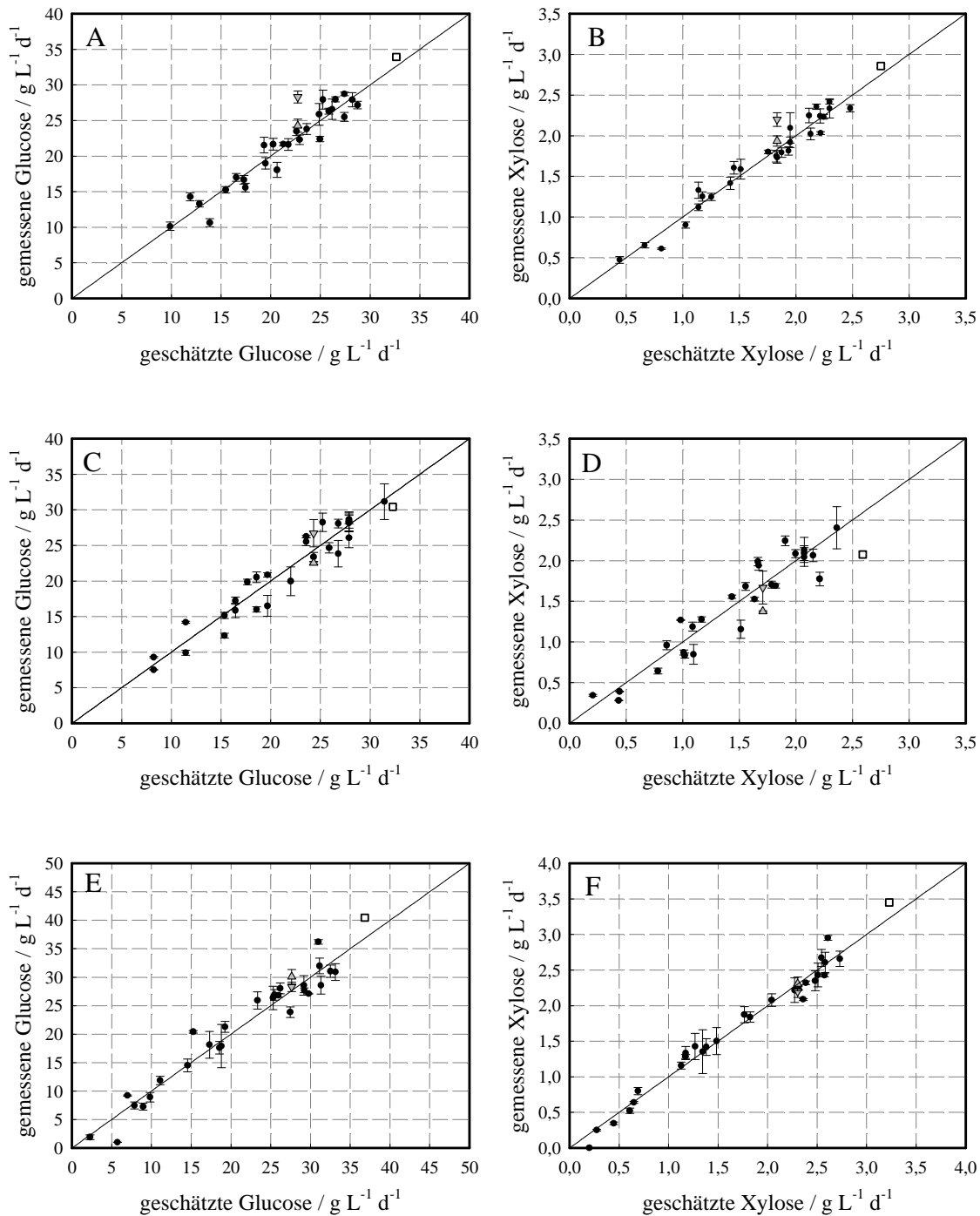
| Glucose | Enzyme | β_0 | β_1 | β_2 | β_3 | β_4 | β_5 | β_{12} | β_{13} | β_{14} | β_{15} | β_{23} | β_{24} | β_{25} | β_{34} | β_{35} | β_{45} | β_{11} | β_{22} | β_{33} | β_{44} | β_{55} | |
|---------------|---------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|--------------|--------------|----------------------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|--------------|--------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------|--------------|---|
| Therm. Vorb.* | a | 1,1·10 ⁻¹⁹ | 2,3·10 ⁻⁵ | 0,071 | 0,106 | 0,093 | 1,2·10 ⁻⁷ | 0,030 | X | X | X | X | X | 0,011 | X | X | X | 0,002 | 5,4·10 ⁻⁵ | X | X | X | |
| | a | 7,4·10 ⁻²¹ | 5,6·10 ⁻⁸ | 0,140 | 2,2·10 ⁻⁷ | 3,2·10 ⁻⁴ | 4,9·10 ⁻⁶ | X | X | X | X | X | X | 0,001 | X | X | X | 1,7·10 ⁻⁶ | 1,6·10 ⁻⁵ | X | X | X | |
| | b | 7,2·10 ⁻²⁰ | 1,9·10 ⁻⁹ | 0,095 | 1,9·10 ⁻⁷ | 0,023 | 1,7·10 ⁻⁹ | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | 0,005 | 0,002 | X | X | 0,004 | |
| Alk. Vorb. | c | 2,9·10 ⁻¹⁸ | 1,2·10 ⁻⁶ | 0,331 | 1,2·10 ⁻⁴ | 0,003 | 2,7·10 ⁻⁵ | X | X | X | X | X | 0,023 | X | X | X | X | 5,1·10 ⁻⁴ | 1,1·10 ⁻⁴ | X | X | 0,004 | |
| | a | 4,6·10 ⁻¹⁹ | 2,6·10 ⁻⁸ | 0,579 | 1,4·10 ⁻⁵ | 0,011 | 0,459 | X | X | X | 0,029 | X | X | X | X | X | X | 0,012 | 2,1·10 ⁻⁴ | X | X | X | |
| | b | 7,8·10 ⁻²¹ | 3,5·10 ⁻⁸ | 0,003 | 3,5·10 ⁻⁷ | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | 2,4·10 ⁻⁵ | 0,001 | X | X | X | |
| Saure Vorb. | d | 3,3·10 ⁻¹⁶ | 1,2·10 ⁻⁸ | 0,169 | 0,064 | 0,010 | 0,819 | 0,079 | X | X | 0,063 | X | X | X | X | X | X | 3,2·10 ⁻⁵ | 5,0·10 ⁻⁴ | X | X | X | |
| | Xylose | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Therm. Vorb.* | a | 8,4·10 ⁻¹⁸ | 0,027 | 0,163 | 0,009 | X | 2,5·10 ⁻⁹ | X | X | X | 1,7·10 ⁻⁴ | X | X | 0,005 | X | X | X | 0,001 | 4,6·10 ⁻⁴ | X | X | X |
| a | | 7,6·10 ⁻¹⁹ | 4,9·10 ⁻⁵ | 6,6·10 ⁻⁵ | 3,4·10 ⁻⁷ | 0,013 | 7,6·10 ⁻⁴ | X | X | X | 2,1·10 ⁻⁶ | 0,040 | 0,107 | 5,1·10 ⁻⁷ | 0,041 | X | X | 1,3·10 ⁻⁶ | 5,4·10 ⁻⁵ | X | X | X | |
| b | | 1,5·10 ⁻¹⁷ | 0,003 | 0,007 | 6,5·10 ⁻⁵ | 0,009 | 2,8·10 ⁻¹⁰ | 0,004 | X | X | X | X | X | 2,5·10 ⁻⁶ | 0,007 | X | X | 2,1·10 ⁻⁴ | 4,2·10 ⁻⁴ | X | X | X | |
| Alk. Vorb. | c | 9,9·10 ⁻¹⁸ | 3,5·10 ⁻⁶ | 0,012 | 1,2·10 ⁻⁴ | 0,027 | 6,2·10 ⁻⁶ | 0,033 | X | X | 0,050 | X | X | 0,097 | X | X | X | 1,2·10 ⁻⁴ | 0,001 | X | X | 0,003 | |
| | a | 4,1·10 ⁻¹⁸ | 4,1·10 ⁻⁹ | 0,289 | 6,4·10 ⁻⁷ | 0,024 | 0,359 | 0,012 | X | X | 1,2·10 ⁻⁴ | X | X | 0,007 | X | X | X | 1,7·10 ⁻⁴ | 5,4·10 ⁻⁵ | X | X | X | |
| | b | 3,6·10 ⁻¹⁶ | 7,8·10 ⁻⁶ | 0,002 | 3,7·10 ⁻⁵ | X | 0,166 | X | X | X | X | X | X | 0,003 | X | X | X | 1,8·10 ⁻⁴ | 0,009 | X | X | X | |
| Saure Vorb. | d | 5,0·10 ⁻¹⁶ | 1,3·10 ⁻⁹ | 2,3·10 ⁻⁵ | 4,8·10 ⁻⁴ | 0,387 | 0,145 | X | 0,047 | 0,024 | 0,046 | 0,003 | X | X | X | 0,078 | X | 7,3·10 ⁻⁷ | 7,5·10 ⁻⁵ | X | X | X | |



A6: Glucose- und Xyloseproduktivität nach 24 h enzymatischer Hydrolyse für 8 % (w/w TS) vorbehandeltem Weizenstroh. Hydrothermische Vorbehandlung (160 °C, 1 h, (A und B)), 2,0 mg g⁻¹TS ≤ „Novozym 188“ ≤ 6,0 mg g⁻¹TS (A und B). 15,0 mg g⁻¹TS ≤ „Celluclast“ ≤ 45,0 mg g⁻¹TS, 0,0 mg g⁻¹TS ≤ „NS22002“ ≤ 30,0 mg g⁻¹TS. Referenzbedingung (▼) 15,0 mg_{Protein} g⁻¹TS „Celluclast“, 1,9 mg_{Protein} g⁻¹TS „Novozym 188“, 0 mg_{Protein} g⁻¹TS „NS22002“ mit Validierung (▲) und optimaler Produktivität (□). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen aus einem 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.



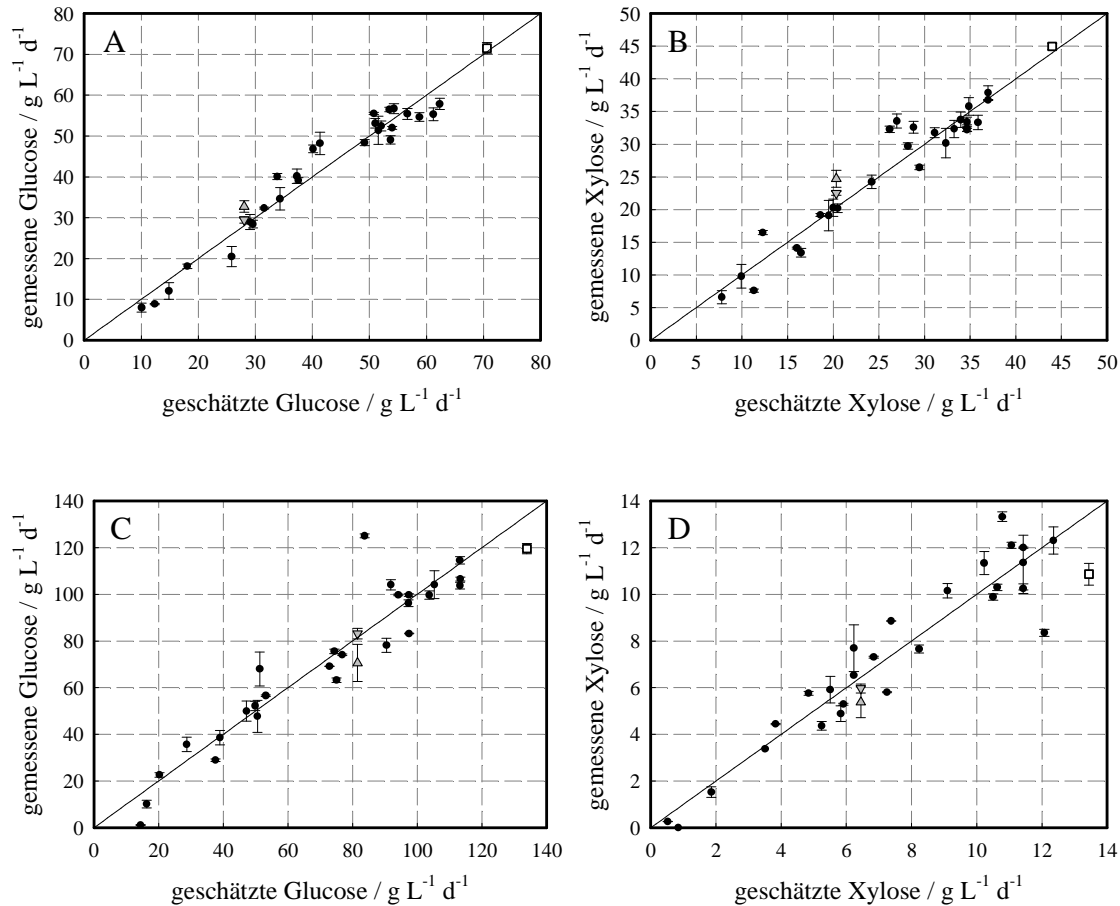
A7: Glucose- und Xyloseproduktivität nach 24 h enzymatischer Hydrolyse für 8 % (w/w TS) vorbehandeltem Weizenstroh. Alkalische Vorbehandlung ($0,1 \text{ g g}^{-1}_{\text{TS}} \text{ Ca(OH)}_2$, $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, (A, B, C, D)). Enzymgemische: „Celluclast“, „Novozym 188“, „NS22002“ (A und B), „Accellerase 1500“, „Novozym 188“, „NS22002“ (C und D), $15,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}} \leq$ „Celluclast“ oder „Accellerase 1500“ $\leq 45,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$, $1,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}} \leq$ „Novozym 188“ $\leq 7,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$, $0,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}} \leq$ „NS22002“ $\leq 30,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Referenzbedingung: (∇) $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Celluclast“ oder „Accellerase 1500“, $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Novozym 188“, $0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „NS 22002“ mit Validierung (\blacktriangle) und optimaler Produktivität (\square). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen aus einem 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.



A8: Glucose- und Xyloseproduktivität nach 24 h enzymatischer Hydrolyse für 8 % (w/w TS) vorbehandeltem Weizenstroh. Saure Vorbehandlung (0,5 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h, (A, B, C, D, E, F)). Verwendete Enzymgemische: „Celluclast“, „Novozym 188“, „NS22002“ (A und B), „Accellerase 1500“, „Novozym 188“, „NS22002“ (C und D), „Celluclast“, „Novozym 188“, „Pulpzyme“ (E und F), 15,0 mg g⁻¹ TS ≤ „Celluclast“ oder „Accellerase 1500“ ≤ 45,0 mg g⁻¹ TS, 1,0 mg g⁻¹ TS ≤ „Novozym 188“ ≤ 7,0 mg g⁻¹ TS, 0,0 mg g⁻¹ TS ≤ „NS22002“ oder „Pulpzyme“ ≤ 30,0 mg g⁻¹ TS. Referenzbedingung (▼) 15,0 mg_{Protein} g⁻¹ TS „Celluclast“ oder „Accellerase 1500“, 1,9 mg_{Protein} g⁻¹ TS „Novozym 188“, 0 mg_{Protein} g⁻¹ TS „NS22002“ oder „Pulpzyme“ mit Validierung (▲) und optimaler Produktivität (□). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen aus einem 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.

A9: Modellparameter β_{ij} mit p-Werten. Alkalische (0,1 g g⁻¹_{TS} Ca(OH)₂, 135 °C, 1 h) und saure (0,5 % v/v H₂SO₄, 135 °C, 0,5 h) Vorbehandlung des Maisspindelgranulats (< 1 mm). Feststoffanteil während der enzymatischen Hydrolyse 18 % (w/w TS). Modellparameter β_{ij} mit i = 1 für den Temperatureinfluss, i = 2 für den Einfluss des pH, i = 3 für den Einfluss des Cellulasepräparats „Celluclast“, i = 4 für den Einfluss des β -Glucosidasepräparats „Novozym 188“ und i = 5 für den Einfluss der Hemicellulasepräparate „NS22002“ und „Shearzyme“. „Celluclast“, „Novozym 188“, „NS22002“ (a) und „Celluclast“, „Novozym 188“, „Shearzyme“ (b). Als nicht signifikant erkannte Parameter sind mit einem X gekennzeichnet.

| Glucose | Enzyme | β_0 | β_1 | β_2 | β_3 | β_4 | β_5 | β_{12} | β_{13} | β_{14} | β_{15} | β_{23} | β_{24} | β_{25} | β_{34} | β_{35} | β_{45} | β_{11} | β_{22} | β_{33} | β_{44} | β_{55} |
|----------------|--------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------------|---------------------|--------------|--------------|
| Alk. Vorb. | a | $3,1 \cdot 10^{-16}$ | $3,3 \cdot 10^{-5}$ | 0,227 | $6,7 \cdot 10^{-4}$ | 0,062 | $2,0 \cdot 10^{-8}$ | X | X | X | X | X | X | $8,9 \cdot 10^{-4}$ | X | X | X | 0,006 | 0,214 | X | 0,082 | 0,077 |
| | b | $1,8 \cdot 10^{-15}$ | 0,110 | 0,231 | $1,5 \cdot 10^{-4}$ | $2,5 \cdot 10^{-4}$ | $6,1 \cdot 10^{-8}$ | X | 0,131 | X | 0,053 | X | 0,020 | X | X | X | 0,136 | X | $3,5 \cdot 10^{-5}$ | X | X | 0,003 |
| Saure Vorb. | b | $4,8 \cdot 10^{-13}$ | 0,327 | $1,7 \cdot 10^{-5}$ | 0,029 | 0,032 | 0,031 | X | X | 0,258 | 0,088 | 0,160 | X | X | X | X | X | 0,033 | $5,1 \cdot 10^{-4}$ | X | X | X |
| Xylose | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Alk. Vorb. | a | $3,9 \cdot 10^{-15}$ | 0,137 | 0,010 | 0,005 | X | $1,4 \cdot 10^{-5}$ | X | X | X | 0,002 | 0,088 | X | $5,3 \cdot 10^{-6}$ | X | X | X | 0,005 | X | 0,121 | X | 0,088 |
| | b | $1,8 \cdot 10^{-16}$ | X | 0,297 | 0,004 | 0,175 | $3,4 \cdot 10^{-9}$ | X | X | X | X | 0,184 | 0,191 | 0,003 | 0,034 | X | X | X | X | $5,0 \cdot 10^{-5}$ | X | X |
| Saure Vorb. | b | $1,4 \cdot 10^{-14}$ | 0,073 | $5,1 \cdot 10^{-4}$ | 0,014 | X | $3,7 \cdot 10^{-5}$ | X | X | X | 0,030 | 0,047 | X | X | X | X | X | X | $1,5 \cdot 10^{-4}$ | X | X | 0,012 |



A10: Glucose- und Xyloseproduktivität nach 24 h enzymatischer Hydrolyse mit vorbehandeltem Maisspindelgranulat. Alkalische ($0,1 \text{ g g}^{-1}_{\text{TS}} \text{ Ca(OH)}_2$, $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, (A und B)) und saure Vorbehandlung ($0,5 \text{ \% v/v H}_2\text{SO}_4$, $135 \text{ }^\circ\text{C}$, 0,5 h, (C und D)). Verwendete Enzymgemische: „Celluclast“, „Novozym 188“, „NS22002“ (A und B), „Celluclast“, „Novozym 188“, „Shearzyme“ (C und D). $15,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}} \leq$ „Celluclast“ $\leq 45,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$, $1,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}} \leq$ „Novozym 188“ $\leq 7,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$, $0,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}} \leq$ „NS22002“ oder „Shearzyme“ $\leq 30,0 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TS}}$. Referenzbedingung (\blacktriangledown) $15,0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „Celluclast“, $1,9 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ Novozym 188, $0 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{TS}}$ „NS22002“ oder „Shearzyme“ mit Validierung (\blacktriangle) und optimaler Produktivität (\square). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen aus einem 3-fach Parallelansatz in Milliliter-Rührreaktoren.