

Masterarbeit

Einfluss von Lignocelluloseaufschlüssen auf die
nachgeschaltete enzymatische Verzuckerung sowie
Ethanol-Fermentation von Biertreber

Zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Engineering (M. Eng.)
im Studiengang Chemie- und Umweltingenieurwesen
im Fachbereich Ingenieur- und Naturwissenschaften
an der Hochschule Merseburg

eingereicht von

Mirko Nötzold

Erstgutachter:
Zweitgutachter:

Prof. Dr. Christoph Wunsch
Dipl.-Ing. Björn Schwarz

Abgabedatum:

12.10.2023

Autorenreferat

Der fortschreitende Klimawandel führt zum Umdenken in der Politik. Im Vordergrund steht dabei die Vermeidung der Treibhausgasemissionen durch Verbrennung fossiler Rohstoffe. Durch Nutzung von Biokraftstoffen im Verkehrssektor sind deutliche Einsparungspotenziale möglich. Deshalb wurde ein Mindestanteil dieser Kraftstoffe am Gesamtkraftstoffverbrauch in der Europäischen Union vorgeschrieben. Die Nutzung von Bioethanol ist eine mögliche Variante der Umsetzung. Von besonderem Interesse ist die Ethanolherstellung aus organischen Reststoffen wie z. B. Biertreber. Damit dieser zur Produktion von Bioethanol genutzt werden kann, ist ein Aufschluss der stabilen Lignocellulosematrix notwendig.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Optimierung von zwei verschiedenen Aufschlussverfahren untersucht. Ziel war es dabei, die Struktur des Biertrebers so zu verändern, dass in einer nachgeschalteten enzymatischen Verzuckerung möglichst hohe Monosaccharidkonzentrationen erreicht werden. In einer anschließenden Fermentation wurde die gelöste Glucose zu Ethanol umgesetzt. Zur Bestimmung der optimalen Versuchsbedingungen wurde ein flächenzentrierter Versuchsplan genutzt. Als unabhängige Größen wurden im Rahmen der statistischen Versuchsplanung die Temperatur, Versuchszeit und Konzentration der verdünnten Natronlauge bzw. Schwefelsäure untersucht.

Die Messergebnisse der alkalischen Aufschlüsse zeigten keine eindeutigen Abhängigkeiten von den Versuchsbedingungen. In den meisten Versuchen schwankte die Menge der gelösten Glucose nach der Verzuckerung um eine Konzentration von 4 g/l, was einer Ausbeute von etwa 17 % entsprach. Die Ergebnisse der Fermentation zeigten, dass bei einer Natronlaugekonzentration von 3 bzw. 5 % (w/v) ein Plateau der Ethanolausbeute erreicht wurde. Die Konzentration betrug ca. 2,2 g/l, was einer Ausbeute von rund 18,5 % entsprach.

Die Ergebnisse der sauren Aufschlüsse zeigten einen eindeutigen Trend. Durch Erhöhung der Temperatur, Konzentration und Versuchszeit wurde nach den Aufschlüssen eine Steigerung der Freisetzung der Monosaccharide aus der Hemicellulose nachgewiesen. Das gleiche Verhalten zeigte sich bei der Freisetzung von Glucose nach der enzymatischen Verzuckerung und bei der Ethanolkonzentration nach der Fermentation. Durch Vorbehandlung bei maximaler Temperatur, Konzentration und Versuchszeit wurde eine Glucosekonzentration von 5,5 g/l erreicht, was einer Ausbeute von 26,3 % entsprach. Nach der Fermentation wurde unter diesen Versuchsbedingungen eine Ethanolkonzentration von 3,2 g/l erzielt. Dies entsprach einer Ausbeute von 30,4 %.

Schlagwörter:

Lignocelluloseaufschluss; Biertreberaufschluss; verdünnter Natriumhydroxid- aufschluss; verdünnter Schwefelsäureaufschluss; hohe Feststoffbeladung; Enzymverzuckerung; Fermentation mit Bäckerhefe

Abstract

The progressing global warming leads to a rethinking in politics. The focus lays on avoiding greenhouse gas emissions from the combustion of fossil fuels. The use of biofuels in the transport sector offers significant potential for savings. That's why a minimum share of these fuels in total consumption has been prescribed politically in the European Union. The use of bioethanol is one possible implementation option. Of particular interest is the production of ethanol from organic residues such as brewer's spent grain. To use brewer's spent grain for bioethanol production, digestion of the stable lignocellulosic matrix is necessary.

Therefore the optimization of two different pretreatments were investigated in this thesis. The aim of the work was to change the structure of the brewer's spent grain in such a way that the highest possible monosaccharide concentrations are achieved in a downstream enzymatic saccharification. In the following fermentation step the glucose should be converted into ethanol. A face centred Central Composite Design was used to determine the optimum experimental conditions. The temperature, experimental time and concentration of dilute sodium hydroxide solution or sulfuric acid were researched as independent variables.

The measurement results of the alkaline digestions showed no clear dependencies on the experimental conditions. In most of the experiments the amount of dissolved glucose after saccharification fluctuated around a concentration of 4 g/l. It corresponds to a yield of about 17 %. The fermentation results showed that a plateau in ethanol yield was reached at a sodium hydroxide concentration of 3 or 5 % (w/v). The plateau was about 2.2 g/l and it corresponds to a yield of about 18.5 %.

The results of the acid pretreatment showed a clear trend. An increase in the release of the monosaccharides from the hemicellulose was demonstrated after the pretreatment by increasing the temperature, concentration and experimental time. The same behavior was shown by the release of glucose after enzymatic saccharification and for the ethanol concentration after fermentation. Under the maximum experimental conditions a glucose concentration of about 5.5 g/l was obtained. It corresponds to a yield of about 26.3 %. After fermentation an ethanol concentration of 3.2 g/l was achieved under these experimental conditions. This corresponds to a yield of 30.4 %.

Keywords:

lignocellulosic digestion; brewer's spent grain digestion; dilute sodium hydroxide digestion; dilute sulfuric acid digestion; high solid loading; enzyme saccharification; fermentation with baker's yeast

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Masterarbeit unterstützt haben. Als Erstes möchte ich mich ausdrücklich beim gesamten Team der Abteilung Biomassetechnologien und Membranverfahrenstechnik des Fraunhofer IKTS am Standort Dresden für die tatkräftige Unterstützung bei meinen Versuchen bedanken.

Besonderer Dank gilt meinem betrieblichen Betreuer Dipl.-Ing. Björn Schwarz für das entgegengebrachte Vertrauen. Weiterhin möchte ich mich für die Unterstützung während der Versuche sowie für die Hinweise zur Anfertigung der schriftlichen Arbeit bedanken.

Dank gebührt ebenfalls meinem Hochschulbetreuer Prof. Dr. Christoph Wunsch von der Hochschule Merseburg für die gute Zusammenarbeit.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei meiner Freundin für das Korrekturlesen der Arbeit, für ihre Geduld, auch wenn es mal wieder länger dauerte, sowie für ihr offenes Ohr.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Symbolverzeichnis	X
1 Einleitung.....	1
2 Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 Treibhausgasemissionen in Deutschland und der potenzielle Beitrag von Bioethanol zur Senkung der CO ₂ -Emissionen am Beispiel des Verkehrssektors.....	3
2.2 Ethanolbedarf und Potenzial an Bioethanol aus Biertreber in Deutschland	6
2.3 Biertreber	7
2.3.1 Die wichtigsten Produktionsschritte der Bierherstellung vom Gerstenkorn bis zum Biertreber	7
2.3.2 Zusammensetzung des Biertreibers.....	9
2.3.3 Alternative Verwertungswege von Biertreber.....	14
2.4 Vorbehandlungsmethoden zum Aufschluss lignocellulosehaltiger Biomasse	16
2.4.1 Variante 1 – rein chemische Vorbehandlung.....	17
2.4.2 Variante 2 – Vorbehandlung mit anschließender enzymatischer Verzuckerung	19
3 Zielstellung.....	36
4 Material und Methoden	37
4.1 Material	37
4.1.1 Biertreber	37
4.1.2 Verwendete Chemikalien	37
4.2 Festlegung der Versuchsbedingungen	38
4.3 Versuchsplanung sowie Vorgehen bei der Auswertung des statistischen Versuchsplans	40
4.4 Aufbau des Versuchsstands sowie Ablauf der Biertreberaufschlüsse.....	45
4.5 Ablauf der standardisierten Verzuckerung und Fermentation	50
4.6 Vorversuche.....	52
4.7 HPLC-Analyse	53

5	Ergebnisse und Diskussion	55
5.1	Auswertung der Vorversuche	55
5.2	Alkalische Versuchsreihe	56
5.2.1	Ergebnisse der Biertreberaufschlüsse mit verdünnter Natronlauge	56
5.2.2	Ergebnisse der enzymatischen Verzuckerung nach alkalischem Aufschluss des Biertrebers	60
5.2.3	Ergebnisse der Ethanolfermentation nach alkalischem Aufschluss und enzymatischer Verzuckerung des Biertrebers	65
5.3	Saure Versuchsreihe.....	68
5.3.1	Ergebnisse der Biertreberaufschlüsse mit verdünnter Schwefelsäure	68
5.3.2	Ergebnisse der enzymatischen Verzuckerung nach saurem Aufschluss des Biertrebers	75
5.3.3	Ergebnisse der Ethanolfermentation nach saurem Aufschluss und enzymatischer Verzuckerung des Biertrebers	83
6	Zusammenfassung und Ausblick	89
7	Literaturangaben.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Treibhausgasemissionen von 1990 bis 2021 in Deutschland nach Sektoren des Klimaschutzgesetzes und die politische Zielstellung für das Jahr 2030 [4].....	3
Abbildung 2:	Produktion und Absatz von Bioethanol in Deutschland in den Jahren 2009 bis 2019 [10]	7
Abbildung 3:	Darstellung des Brauprozesses [12]	9
Abbildung 4:	Ausschnitt aus der linksgängigen Amylose-Helix [15]	10
Abbildung 5:	Ausschnitt eines Amylopektin-Moleküls mit Nummerierung der Kohlenstoffatome in der D-Glucopyranosyleinheit sowie Kennzeichnung der glycosidischen Bindungen in der Hauptkette (eigene Darstellung auf Basis von [15])	11
Abbildung 6:	Ausschnitt einer Cellulosekette mit Nummerierung der Kohlenstoffatome in der D-Glucopyranosyleinheit sowie Kennzeichnung der glycosidischen Bindungen und der Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelt) zwischen den Einheiten (eigene Darstellung auf Basis von [15])	12
Abbildung 7:	Strukturformeln der drei Grundkomponenten des Lignins: (a) p-Cumarylalkohol, (b) Coniferylalkohol, (c) Sinapylalkohol, und ein beispielhafter Ausschnitt einer Ligninstruktur (d) [17].....	14
Abbildung 8:	Abbaugrade der kontinuierlichen anaeroben Hydrolyse und Versäuerung von Gerstenbiertreber ohne Enzymzusatz in Abhängigkeit von der Substratverweilzeit [14]	16
Abbildung 9:	Überblick über mögliche Vorbehandlungsverfahren für eine enzymatische Verzuckerung zur Produktion von Ethanol aus lignocellulosehaltiger Biomasse (eigene Darstellung auf Basis von [30 bis 32]).....	20
Abbildung 10:	Säurekatalysierte Bildung von HMF aus Glucose durch Bildung von Fructose mit anschließendem Ringschluss zu Fructofuranose gefolgt von einer dreistufigen säurekatalysierten Dehydratation [33].....	21
Abbildung 11:	Verlauf des pK_W -Werts von Wasser in Abhängigkeit der Temperatur bei entsprechendem Sättigungsdampfdruck [39]	24

Abbildung 12:	Abhängigkeit der logarithmischen Säurekonstante von der Ionenstärke bei verschiedenen Temperaturen in einer Abstufung von 25 °C [47].....	27
Abbildung 13:	Erstarrte Lignintropfen auf der Oberfläche der Biomasse nach einer sauren Vorbehandlung [48].....	29
Abbildung 14:	Zuckerausbeuten verschiedener Biertreberückstände nach Vorbehandlung mit verdünnter Natronlauge sowie anschließender enzymatischer Verzuckerung unter folgenden Vorbehandlungsbedingungen: (A) 5 % (w/v) NaOH für 12 h bei 50 °C und Variation der Feststoffbeladung; (B) 12 h bei 50 °C, einer Feststoffbeladung von 25 % (w/v) und Variation der NaOH-Konzentration; (C) 5 % (w/v) NaOH bei 50 °C, einer Feststoffbeladung von 30 % (w/v) und Variation der Versuchsdauer [56].....	34
Abbildung 15:	Darstellung des zentral zusammengesetzten Versuchsplans für 3 Faktoren. Die Lage der Punkt im Raum zeigt dabei die verschiedenen Versuchsbedingungen der jeweiligen Versuche [61].....	41
Abbildung 16:	flächenzentrierter Versuchsplan mit normierten Versuchspunkten.....	42
Abbildung 17:	Versuchsaufbau für die alkalischen und sauren Aufschlüsse.....	46
Abbildung 18:	Aufheizkurve eines Vorversuchs von 20,8 auf 95 °C.....	47
Abbildung 19:	Abkühlkurven ausgewählter alkalischer und saurer Aufschlüsse bei den jeweils drei verschiedenen Aufschlusstemperaturen.....	49
Abbildung 20:	Fest eingespannte Proben im Inkubationsschüttler nach der Verzuckerung.....	50
Abbildung 21:	Versuchsstand für die Ethanolfermentation.....	51
Abbildung 22:	Links Probe ohne Aufschluss nach kurzem Einrühren; rechts Versuch 3 nach Aufschluss (bei 45 °C, 120 min und einer Natronlaugenkonzentration von 3 % (w/v)).....	57
Abbildung 23:	Makroskopische Aufnahmen des unbehandelten Biertrebers und von gewaschenem Biertreber nach alkalischem Aufschluss bei 45, 70 und 95 °C sowie identischer Natronlaugenkonzentration (3 %(w/v)) und Versuchszeit (120 min) (Versuch 3, 10 und 15).....	58
Abbildung 24:	Links nach Versuch 1 bei 45 °C, 60 min, 1 % (w/v); rechts nach Versuch 17 bei 95 °C, 180 min, 5 % (w/v).....	59

Abbildung 25: Massenkonzentrationen der freigesetzten Glucose nach der enzymatischen Verzuckerung mit Markierung der Ergebnisse des zentralen Versuchspunkts (gelb) sortiert nach Konzentration, Temperatur und Zeit der Aufschlüsse	61
Abbildung 26: Massenkonzentrationen der freigesetzten Xylose und Arabinose nach enzymatischer Verzuckerung sortiert nach Konzentration, Temperatur und Zeit der Aufschlüsse	62
Abbildung 27: Massenkonzentrationen der gebildeten Ameisensäure infolge der Aufschlüsse mit verdünnter Natronlauge sortiert nach Temperatur, Konzentration und Zeit der Aufschlüsse.....	63
Abbildung 28: Makroskopische Aufnahmen der festen Rückstände des Biertreibers nach enzymatischer Verzuckerung und Zentrifugation der Proben: links Ergebnis von Versuch 10 (Aufschlussbedingungen: 70 °C, 120 min, 3 % (w/v)); rechts von Versuch 15 (Aufschlussbedingungen: 95 °C; 120 min, 3 % (w/v))	64
Abbildung 29: Ethanolausbeuten nach Fermentation sortiert nach Konzentration, Temperatur und Versuchszeit der Aufschlüsse	67
Abbildung 30: Massenkonzentrationen der freigesetzten Glucose durch Aufschluss mit verdünnter Schwefelsäure sortiert nach Temperatur, Konzentration und Zeit der Aufschlüsse	69
Abbildung 31: Massenkonzentrationen der freigesetzten Xylose und Arabinose durch Aufschluss mit verdünnter Schwefelsäure sortiert nach Temperatur, Konzentration und Zeit der Aufschlüsse.....	70
Abbildung 32: Durch Aufschluss mit verdünnter Schwefelsäure gebildete Furfuralmassenkonzentrationen sortiert nach Temperatur, Konzentration und Zeit der Aufschlüsse.....	72
Abbildung 33: Makroskopische Aufnahmen des Biertreibers direkt nach saurem Aufschluss, von links nach rechts: steigende Temperatur (65, 80, 95 °C) bei identischer Schwefelsäurekonzentration (4 % (w/v)) und Versuchszeit (120 min)	73
Abbildung 34: Abhängigkeit der Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose von der Zeit sowie Temperatur bei konstanter Schwefelsäurekonzentration von 4 % (w/v) direkt nach saurem Aufschluss.....	74

Abbildung 35: Abhängigkeit der Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose von der Zeit sowie Konzentration an verdünnter Schwefelsäure bei konstanter Temperatur von 80 °C direkt nach saurem Aufschluss	75
Abbildung 36: Anstieg der Massenkonzentrationen von Xylose und Arabinose durch enzymatische Verzuckerung sortiert nach Temperatur, Konzentration und Zeit der Aufschlüsse	77
Abbildung 37: Abhängigkeit der Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose von der Zeit sowie Temperatur bei konstanter Schwefelsäurekonzentration von 4 % (w/v) (während der sauren Aufschlüsse) nach enzymatischer Verzuckerung	80
Abbildung 38: Abhängigkeit der Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose von der Zeit sowie Konzentration an verdünnter Schwefelsäure bei konstanter Temperatur von 80 °C (während der sauren Aufschlüsse) nach enzymatischer Verzuckerung	80
Abbildung 39: Abhängigkeit der Glucoseausbeute von der Konzentration sowie Temperatur (während der sauren Aufschlüsse) nach der enzymatischen Verzuckerung	82
Abbildung 40: Abnahme der Xylosekonzentrationen während der Fermentation sortiert nach Temperatur, Konzentration und Zeit der Aufschlüsse	84
Abbildung 41: Anstieg der Milch- und Essigsäure durch die Fermentation sortiert nach Temperatur, Konzentration und Zeit der Aufschlüsse.....	85
Abbildung 42: Gemessene Massenkonzentrationen an Ethanol nach der Fermentation sortiert nach Temperatur, Konzentration und Zeit der Aufschlüsse	86
Abbildung 43: Abhängigkeit der Ethanolausbeute von der Schwefelsäurekonzentration sowie Temperatur der Aufschlüsse nach Fermentation.....	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Vorgaben der Treibhausgasminderung bezogen auf den Referenzwert nach § 37a Absatz 4 BImSchG	5
Tabelle 2:	Zusammensetzung von Gersten- und Gersten-/Weizenbiertreber [14]	10
Tabelle 3:	Ausgewählte Metallionen mit deren Anzahl an Wassermolekülen in der Hydrathülle.....	33
Tabelle 4:	Zusammensetzung des unbehandelten Biertrebers	37
Tabelle 5:	Überblick über die wichtigsten Angaben zur Natronlauge und Schwefelsäure	38
Tabelle 6:	Experimentell zu untersuchender Bereich der Temperatur, Verweilzeit und Konzentration für die alkalischen bzw. sauren Aufschlüsse.....	39
Tabelle 7:	Versuchsplan der Aufschlüsse mit verdünnter Natronlauge (Spalte 1 systematische Reihenfolge der Versuche, Spalte 2 randomisierte Reihenfolge (Reihenfolge, in der die Versuche durchgeführt wurden), Spalte 3 – 5 normierte Versuchswerte, Spalte 6 – 8 reale Versuchswerte) ...	43
Tabelle 8:	Versuchsplan der Aufschlüsse mit verdünnter Schwefelsäure (Spalte 1 systematische Reihenfolge der Versuche, Spalte 2 randomisierte Reihenfolge (Reihenfolge, in der die Versuche durchgeführt wurden), Spalte 3 – 5 normierte Versuchswerte, Spalte 6 – 8 reale Versuchswerte) ...	44
Tabelle 9:	Gemessene Massenkonzentrationen nach enzymatischer Verzuckerung der Proben (alkalische Versuchsreihe).....	60
Tabelle 10:	Gemessene Massenkonzentrationen und Ethanolausbeuten nach Ethanolfermentation der vorbehandelten Proben (alkalische Versuchsreihe)	65
Tabelle 11:	Gemessene Massenkonzentrationen und Ausbeuten an Monosacchariden der Hemicellulose nach Aufschluss mit Schwefelsäure	68
Tabelle 12:	Regressionskoeffizienten und deren Konfidenzintervalle zur Vorhersage der Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose direkt nach Aufschluss mit verdünnter Schwefelsäure.....	73
Tabelle 13:	Gemessene Massenkonzentrationen und Ausbeuten an Glucose sowie Monosacchariden der Hemicellulose nach enzymatischer Verzuckerung der Proben (saure Versuchsreihe)	76

Tabelle 14:	Regressionskoeffizienten und deren Konfidenzintervalle zur Vorhersage der Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose nach enzymatischer Verzuckerung	79
Tabelle 15:	Regressionskoeffizienten und deren Konfidenzintervalle zur Vorhersage der Glucoseausbeute nach der enzymatischen Verzuckerung	81
Tabelle 16:	Gemessene Massenkonzentrationen und Etanolausbeuten nach Ethanolfermentation der vorbehandelten Proben (saure Versuchsreihe).....	83
Tabelle 17:	Regressionskoeffizienten und deren Konfidenzintervalle zur Vorhersage der Ethanolausbeuten nach der Fermentation.....	86

Abkürzungsverzeichnis

BlmSchG	Bundesimmissionsschutzgesetz
BlmSchV	Bundesimmissionsschutzverordnung
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
DAD	Dioden-Array-Detektor
HMF	Hydroxymethylfurfural
IN	Auf Einguss justiert
RI-Detektor	Brechungsindexdetektor
TS	Trockensubstanzgehalt (Trockenmasse / Frischmasse)
TVA	Tennessee Valley Authority
(U)HPLC	(Ultra-)Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (englisch (ultra) high performance liquid chromatography)
UV- Strahlung	ultraviolette Strahlung
% (v/v)	Konzentrationsangabe Volumen pro Gesamtvolumen, z. B. 50 ml Ethanol auf 100 ml mit Wasser auffüllen entspricht einer Konzentration von 50 % (v/v)
% (w/v)	Konzentrationsangabe Masse pro Gesamtvolumen, z. B. 5 g Natriumchlorid in Wasser lösen und auf 100 ml auffüllen entspricht einer Konzentration von 5 % (w/v)
% (w/w)	Konzentrationsangabe Masse pro Gesamtmasse, z. B. eine Lösung aus 5 g Natriumchlorid und 100 g Wasser entspricht einer Konzentration von 5 % (w/w)

Symbolverzeichnis

<u>Formelzeichen</u>	<u>Einheit</u>	<u>Bedeutung</u>
a	–	Koeffizienten für die normierte Modellgleichung
A	Einheit ergibt sich je nach Koeffizienten	Koeffizienten für die Modellgleichung mit realen Werten für Temperatur [°C], Konzentration [% (w/v)] und Zeit [min]
b	mol/kg	Molalität
c	% (w/v)	Konzentration der Chemikalie im Aufschluss
$\overline{E}_{\text{kin}}$	J	Mittlere kinetische Energie der Teilchen
I	mol/kg	Ionenstärke
K_s	mol/l	Säurekonstante bezogen auf die Stoffmengenkonzentration
K_w	mol ² /l ²	Ionenprodukt des Wassers
pH	–	Negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
pK _w	–	Negativer dekadischer Logarithmus des Ionenprodukts des Wassers
Q	mol/kg	Säurekonstante berechnet aus der Molalität
t	min	Versuchszeit (ohne Auf- und Abkühlen)
T	°C	Temperatur
X _i		Unabhängige normierte Variable in der Modellgleichung
Y _i	%	Modellwert für die entsprechende Ausbeute

1 Einleitung

Die Reduktion des CO₂-Ausstoßes ist derzeit eines der beherrschenden Themen in der Politik. Im Zentrum steht dabei die Vermeidung der Verbrennung fossiler Rohstoffe. Dies ist darin begründet, dass durch Verbrennung fossiler Rohstoffe Kohlenstoff, welcher vor vielen Millionen Jahren gebunden wurde und seitdem in unterirdischen Lagerstätten gespeichert ist, in Form von CO₂ in die Atmosphäre gelangt. Infolge der zusätzlichen Freisetzung kommt es zu einem Anstieg der CO₂-Konzentration in der Atmosphäre. Da es sich dabei um ein Treibhausgas handelt, führt dies zur globalen Erwärmung. Die Folgen sind zum Teil jetzt schon deutlich zu spüren. Des Weiteren sinkt das Vorkommen an leicht zugänglichen fossilen Rohstoffen, weshalb die Förderung immer aufwendiger und teurer wird. Da vor allem Erdöl zur Herstellung von zahlreichen Produkten im Alltag benötigt wird, sollte auch aus diesem Grund sparsam mit der wertvollen Ressource umgegangen werden.

Eine Möglichkeit im Kraftstoffsektor den Verbrauch zu reduzieren ist die Nutzung von Biokraftstoffen wie z. B. Biodiesel oder Bioethanol. Jedoch führt die konventionelle Herstellung der Biokraftstoffe direkt zur nächsten Problematik, da für die Herstellung derzeit potenzielle Lebensmittel genutzt werden. Die Herstellung von Biokraftstoffen ist seit Jahren einer der Gründe für den Anstieg der Lebensmittelpreise auf dem Weltmarkt. [1] Aus diesem Grund stellt sich die Frage, ob es ethisch und moralisch vertretbar ist, dass aus potenziellen Lebensmitteln wie z. B. Mais, Zuckerrüben oder Getreide Bioethanol für den Kraftstoffmarkt produziert wird, wenn gleichzeitig ungefähr 10 % der Weltbevölkerung 2021 an Unterernährung litten [2]. Bei der Herstellung von Bioethanol aus Biertreber stellt sich diese Frage nicht, da es sich um einen Reststoff handelt.

Nach derzeitigem Stand der Technik ist die Produktion von Ethanol aus Biertreber bzw. allgemein aus lignocellulosehaltiger Biomasse noch nicht konkurrenzfähig mit konventionell hergestelltem Bioethanol aus z. B. stärkehaltigen Rohstoffen. Dies ist darin begründet, dass die Produktionskosten deutlich höher sind. Bevor Ethanol oder andere Stoffe aus lignocellulosehaltiger Biomasse gewonnen werden können, muss der stabile Lignocellulosekomplex aufgeschlossen werden. Ohne Vorbehandlung ist der Abbau der Lignocellulosematrix durch Mikroorganismen unter anaeroben Bedingungen nahezu unmöglich. Durch eine gezielte Vorbehandlung soll deswegen unter möglichst milden Reaktionsbedingungen der Komplex aufgebrochen werden. Im Anschluss sollen die in der Hemicellulose und Cellulose gebundenen Zuckerbausteine durch Enzyme möglichst vollständig in gelöste Monosaccharide überführt werden.

Im Rahmen der Masterarbeit sollen dafür zwei verschiedene Aufschlussverfahren unter atmosphärischem Druck untersucht werden. Als Einflussgrößen auf den Aufschluss wird die Temperatur, Verweilzeit und Konzentration der verwendeten Chemikalien untersucht. Die

einzelnen Versuchspunkte werden dabei anhand eines flächenzentrierten Versuchsplans festgelegt. Ziel der Aufschlussversuche ist es, die Versuchsbedingungen zu ermitteln, bei denen die folgenden Punkte erfüllt werden:

- Maximale Glucoseausbeute aus der Cellulose
- Maximale Ausbeute an Xylose und Arabinose aus der Hemicellulose
- Minimaler Abbau der Monosaccharide in Inhibitoren für die Fermentation
- Maximale Ethanolausbeute nach der Fermentation

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Treibhausgasemissionen in Deutschland und der potenzielle Beitrag von Bioethanol zur Senkung der CO₂-Emissionen am Beispiel des Verkehrssektors

Der fortschreitende Klimawandel ist vor allem auf die hohen Kohlenstoffdioxidemissionen zurückzuführen. Eine Statistik des Umweltbundesamts zeigt, dass 2022 allein 89,4 % der gesamten Treibhausgasemissionen in Deutschland auf Kohlenstoffdioxid zurückzuführen waren. Die Statistik berücksichtigt dabei die unterschiedlichen Treibhausgaspotenziale (Normierung auf Kohlenstoffdioxidäquivalente). Der Großteil der Kohlenstoffdioxidemissionen stammt dabei aus der Verbrennung fossiler Rohstoffe, wodurch 2022 84 % der gesamten Treibhausgasemissionen freigesetzt wurden. Die meisten CO₂-Emissionen in Deutschland (2022) stammen aus der Energiewirtschaft mit ca. 37 % gefolgt vom Verkehr mit ca. 22 % und dem verarbeitenden Gewerbe sowie der Haushalte und Kleinverbraucher mit jeweils rund 17 %. [3]

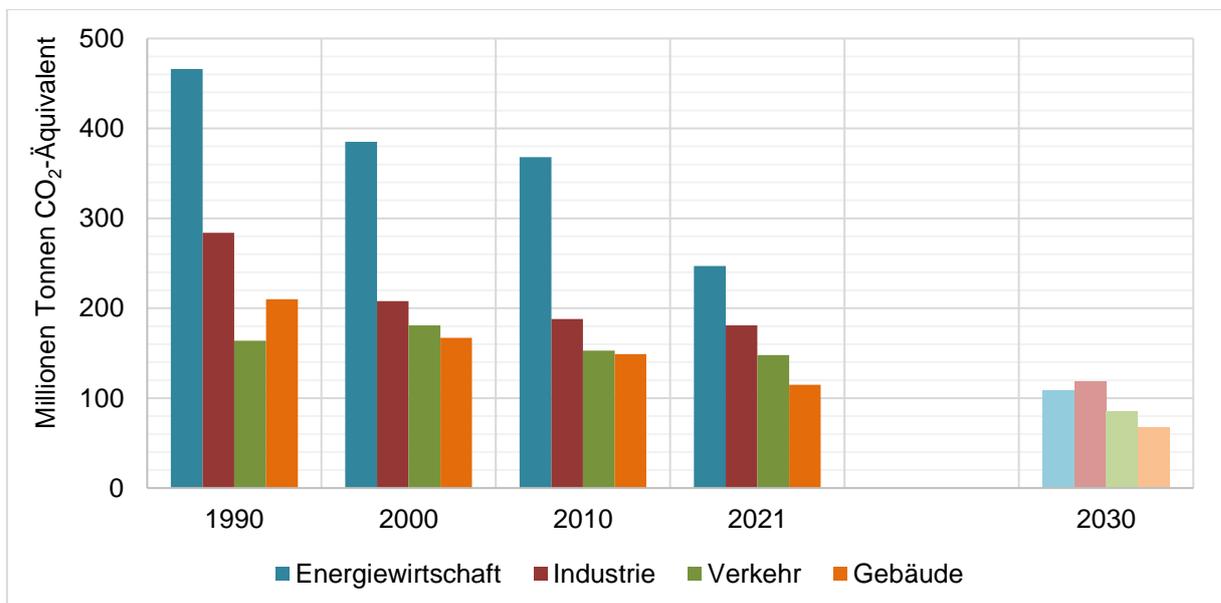


Abbildung 1: Treibhausgasemissionen von 1990 bis 2021 in Deutschland nach Sektoren des Klimaschutzgesetzes und die politische Zielstellung für das Jahr 2030 [4]

Abbildung 1 zeigt den Verlauf der Kohlenstoffdioxidemissionen in den 4 Sektoren. Wie die Grafik zeigt, sind in allen Bereichen noch deutliche Einsparmaßnahmen notwendig, um die politischen Ziele für 2030 zu erreichen. Besonders groß ist der Handlungsdruck im Bereich des Verkehrssektors, da hier seit 1990 keine signifikante Reduktion der Treibhausgasemissionen erreicht werden konnte. Langfristig soll die Reduktion der Kohlenstoffdioxid-

emissionen durch den Einsatz der Elektromobilität erreicht werden. E-Autos sind aktuell gut für Kurzstrecken wie z. B. der Fahrt zur Arbeit geeignet. Die Umstellung des Automobilsektors von Verbrennungs- auf Elektromotoren bedarf bspw. eines Ausbaus der Ladeinfrastruktur, was mit einem Ausbau der Stromnetze sowie der Stromerzeugung verbunden ist. Diese Transformation benötigt Zeit und wird noch einige Jahre benötigen, weshalb kurzfristige Alternativen zur Reduktion von Treibhausgasemissionen auch im Bereich des PKW-Verkehrs notwendig sind. Bioethanol ist dabei eine gute Alternative, da es als Beimischung in Ottokraftstoff ohne Anpassung der Motoren genutzt werden kann. Des Weiteren stößt im Bereich der Schifffahrt sowie im Schwergütertransport die Elektromobilität an ihre Grenzen, da hier oft lange Strecken zurückgelegt und hohe Energiemengen bereitgestellt werden müssen [5]. In diesen Bereichen bieten sich flüssige Biokraftstoffe auch für die Zukunft als Alternative an.

Außerdem wurde der Druck auf den Verkehrssektor durch die Neufassung der Europäischen Richtlinie (EU) 2018/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Förderung der Nutzung von Energie aus erneuerbaren Quellen verstärkt. Die daraus folgenden Vorgaben für den Verkehrssektor in Deutschland werden im Bundesimmissionsschutzgesetz (BImSchG) beschrieben. Die Umsetzung wird durch die Bundesimmissionsschutzverordnung (BImSchV) Nr. 37 und 38 geregelt. Nach § 37a Absatz 4 BImSchG sind Inverkehrbringer von Kraftstoffen dazu verpflichtet die Treibhausgasemissionen von „[...] fossilen Otto- und fossilen Dieselmotoren zuzüglich der Treibhausgasemissionen der von ihnen eingesetzten Erfüllungsoptionen um einen festgelegten Prozentsatz gegenüber [dem] Referenzwert [...]“ zu reduzieren.

Im Folgenden wird die Ermittlung der Treibhausgasbilanz kurz erläutert. Für die Bestimmung des Referenzwerts werden zuerst die in Verkehr gebrachten Mengen an Kraftstoff mit ihrer jeweiligen Energiedichte multipliziert und so der Gesamtenergiegehalt bestimmt. Anschließend wird dieser Wert mit dem Basiswert von 94,1 kg CO_{2eq}/GJ multipliziert, woraus sich der Referenzwert in kg CO_{2eq} ergibt. Danach wird der Zielwert bestimmt. Dafür wird die Treibhausgasminderungsquote mit dem Referenzwert multipliziert und das Ergebnis vom Referenzwert abgezogen. Die Vorgaben für die Treibhausgasminderung steigen jährlich an (siehe Tabelle 1). [6]

Tabelle 1: Vorgaben der Treibhausgasminderung bezogen auf den Referenzwert nach § 37a Absatz 4 BImSchG

Gültig ab	Treibhausgasminderungsquote [%]
2023	8
2024	9,25
2025	10,5
2026	12
2027	14,5
2028	17,5
2029	21
2030	25

Die „tatsächlichen“ CO₂-Emissionen ergeben sich analog zur Bestimmung des Referenzwerts. Als Erstes werden die jeweiligen Energiemengen der einzelnen Kraftstoffe bestimmt und mit den spezifischen Treibhausgasemissionen multipliziert. Nach Addition der CO₂-Emissionen darf der Wert maximal so groß wie der Zielwert sein. [6] Für Emissionen, die den Zielwert überschreiten, müssen Unternehmen laut § 37c Absatz 2 Satz 5 BImSchG seit 2022 600 €/t nicht eingespartes CO₂ Strafe zahlen.

Das Ziel der Treibhausgasminderungsquote ist die CO₂-Emissionen aus fossilen Quellen zu senken. Bei der Anrechnung von Biokraftstoffen werden die CO₂-Emissionen aus der Produktion in der Gesamtbilanz berücksichtigt. Da es sich bei Birtreber um einen Reststoff handelt, wirkt sich dies positiv auf die in der Bilanz zu berücksichtigenden Treibhausgasemissionen aus (Anhang 5 RICHTLINIE (EU) 2018/2001).

Die Anrechenbarkeit von konventionell hergestelltem Bioethanol auf die Treibhausgas-minderung (aus Nahrungs- und Futtermittelpflanzen) ist bezogen auf den Gesamtenergie-gehalt auf 4,4 % begrenzt (§ 13 Absatz 1 38. BImSchV). Oberhalb der Beimischungsgrenze wird für konventionell hergestelltes Bioethanol zur Bestimmung der Treibhausgasemissionen der Basiswert zugrunde gelegt.

Grund für die Begrenzung ist, dass durch gezielten Anbau von Energiepflanzen direkt oder indirekt neue Agrarflächen entstehen können, wodurch in Verbindung mit mangelndem Naturschutz wichtige Naturschutzgebiete wie z. B. der Regenwald zerstört werden. Des Weiteren steht die konventionelle Bioethanolproduktion damit in Konflikt, dass potenzielle Lebensmittel zur Produktion von Kraftstoffen eingesetzt werden (Teller Tank Diskussion). [5] An dieser Stelle setzt die Bioethanolproduktion aus Birtreber an. Da es sich bei Birtreber um einen Reststoff der Bierproduktion handelt (siehe Kapitel 2.3.1), führt eine Nutzung von Birtreber nicht zu derartigen Konflikten. Des Weiteren gehört Bioethanol, welcher aus Birtreber gewonnen wird, zu den fortschrittlichen Biokraftstoffen nach Anlage 1 38. BImSchV. Im Gegensatz zu konventionell hergestelltem Bioethanol, welcher durch eine Obergrenze

gedeckt ist, sind für fortschrittliche Biokraftstoffe sogar Mindestmengen im Kraftstoff nach § 14 Absatz 1 38. BImSchV vorgeschrieben. Durch die schrittweise Erhöhung der Mindestmenge an fortschrittlichen Biokraftstoffen bis 2030 soll die Einführung dieser Kraftstoffe in den Kraftstoffmarkt gefördert werden. 2030 schreibt der Gesetzgeber einen Mindestanteil von 2,6 % bezogen auf den Energiegehalt des Kraftstoffs vor. Unter Berücksichtigung der großen Menge an Kraftstoff, die jährlich verkauft wird, stellt dies einen großen Absatzmarkt für Ethanol aus Biertreber dar.

2.2 Ethanolbedarf und Potenzial an Bioethanol aus Biertreber in Deutschland

Neben dem großen Potenzial des Einsatzes als Flüssigkraftstoff im Verkehrssektor (siehe Kapitel 2.1) kann Bioethanol auch für zahlreiche weitere Anwendungen genutzt werden, bspw. ist eine Nutzung als Energieträger in der Industrie denkbar. Darüber hinaus ist der Einsatz von Ethanol nicht auf die energetische Nutzung begrenzt, sondern es gibt zahlreiche weitere Anwendungen. In der Technik wird es z. B. als Lösungsmittel für Öle, Fette und Harze eingesetzt. Wichtige Einsatzgebiete sind dafür bspw. die Herstellung von Lack und Firnes. Auch in der Herstellung von Kosmetika wird Ethanol als Lösungsmittel für Duftstoffe verwendet, z. B. in Rasierwasser, Haarwasser und Parfum. Des Weiteren wird Ethanol zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten gebraucht. In der Chemieindustrie dient Ethanol ebenfalls als Ausgangsstoff für zahlreiche Reaktionen, bspw. soll an dieser Stelle die Herstellung von Ethylacetat und Ethylchlorid genannt werden. Aufgrund seiner keimtötenden Wirkung ist Ethanol auch in Desinfektionsmitteln enthalten. Des Weiteren wird Ethanol aufgrund seiner Eigenschaften häufig als Reinigungsmittel in der Industrie genutzt. [7] Auch privat kommt Ethanol als Reinigungsmittel zum Einsatz, z. B. in Bremsenreiniger für Fahrräder. Wie anhand der ausgewählten Beispiele deutlich wird, ist der Bedarf an Ethanol sehr groß. Wie groß der Bedarf allein in Deutschland ist, zeigt Abbildung 2. 2019 entsprach die Produktion in Deutschland gerade einmal 57 % der in Deutschland benötigten Ethanolmenge. Die Produktion von Bioethanol aus Biertreber stellt dabei eine vielversprechende Alternative mit großem Potenzial dar, weil es sich um einen Reststoff handelt, dessen alternative Verwertungswege begrenzt sind (siehe Kapitel 2.3.3). Pro 1 m³ Bier entstehen ca. 200 kg feuchter Biertreber [8]. Bei einer Jahresbierproduktion von rund 8,5 Mio. m³ (im Jahr 2021 in Deutschland) [9] ergibt sich eine Biertreberproduktion von rund 1,7 Mio. t (Frishmasse). Dies entspricht einem Potenzial an Glucose bei vollständiger Nutzung der in der Cellulose gebundenen Glucose von ca. 269.000 t/a, was einer maximal möglichen Menge an Ethanol von ca. 138.000 t/a entspricht. Neben Glucose können weitere Rohstoffe wie z. B. Xylose und Arabinose aus der Hemicellulose gewonnen werden. Durch die Nutzung der Fünffachzucker

bei der Fermentation kann der Ethanolertrag noch deutlich gesteigert werden. Selbst bei vollständiger Nutzung des Biertreibers ist das zu erwartende Potenzial deutlich kleiner als der derzeitige zusätzliche Bedarf an Ethanol in Deutschland (siehe Abbildung 2). Hinzu kommt, dass eine Freisetzung der Glucose ohne Verluste sowie eine Nutzung aller anfallenden Biertreber auch in Zukunft weder technisch noch wirtschaftlich sinnvoll sein wird. Aufgrund weiterer Verwertungswege, welche in Kapitel 2.3.3 beschrieben werden, wäre dies auch nicht zu empfehlen.

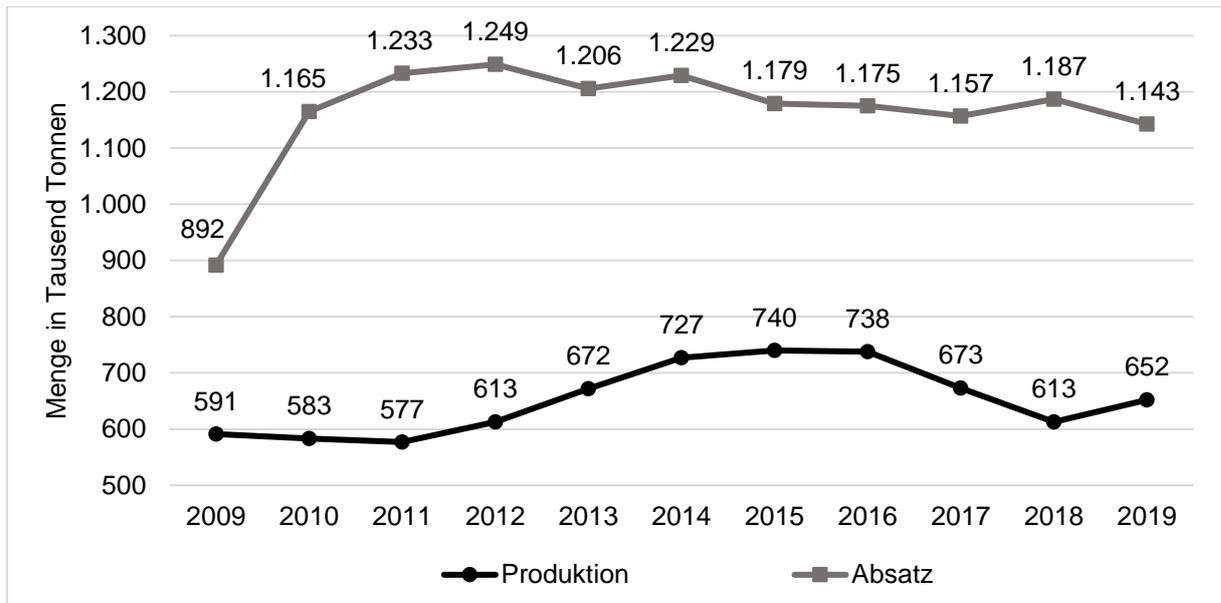


Abbildung 2: Produktion und Absatz von Bioethanol in Deutschland in den Jahren 2009 bis 2019 [10]

2.3 Biertreber

2.3.1 Die wichtigsten Produktionsschritte der Bierherstellung vom Gerstenkorn bis zum Biertreber

In Deutschland darf Bier nur nach dem deutschen Reinheitsgebot gebraut werden. Die Urfassung des Reinheitsgebots wurde 1516 als Verordnung im Herzogtum Bayern erlassen. Es schreibt vor, dass als Zutaten zum Brauen nur Wasser, Malz, Hopfen und Hefe verwendet werden dürfen. Weitere Zutaten wie z. B. künstliche Konservierungs-, Farb- oder Aromastoffe sowie zusätzliche Enzyme und Emulgatoren sind im Bier bis heute nicht zulässig. [11]

Hauptsächlich wird in Deutschland Gerstenmalz zum Bierbrauen verwendet. Damit aus den Körnern der Gerste Gerstenmalz entsteht, sind einige Verfahrensschritte notwendig. Nach dem Waschen und Sortieren der Körner werden diese eingeweicht. Durch eine gesteuerte

Belüftung und Befeuchtung beginnen die Körner zu keimen, wodurch wichtige Enzyme im Getreide gebildet sowie aktiviert werden. Die gekeimten Körner werden Grünmalz genannt. Grünmalz ist aufgrund seiner Feuchte sehr leicht verderblich, weshalb sich eine Trocknung anschließt. Im ersten Schritt wird Grünmalz bei niedrigen Temperaturen getrocknet, was auch Schwelken genannt wird. Anschließend folgt die eigentliche Trocknung (Darren) bei 80 – 105 °C sowie eine Entkeimung des Malzkorns. Während der Malzherstellung entscheidet sich, welche Biersorte später daraus gebraut wird. [12]

In Abbildung 3 ist der gesamte Brauprozess vereinfacht dargestellt. Als Erstes wird das Malz geschrotet. Eine Herausforderung stellen dabei die unterschiedlichen Anforderungen der Spelzen und Stärkekörner an die Zerkleinerung dar. Die Spelzen sollen möglichst wenig zerkleinert werden, damit beim Maischen nicht zu viele Gerb-, Bitter- und Farbstoffe extrahiert werden. Des Weiteren ist eine geringe Zerkleinerung der Spelzen für die Bildung des Filterkuchens beim Läutern (Fest-Flüssig-Trennung der Maische) wichtig, damit der Druckverlust über den Filterkuchen nicht zu groß wird. Im Gegensatz dazu sollen die Stärkekörner möglichst fein zermahlen werden, damit die Enzyme im Malz die Stärke möglichst restlos in Zucker umwandeln. Die Verzuckerung findet während des Maischeprozesses statt. Besonders wichtig ist dabei die Einstellung der richtigen Temperaturstufen, da die verschiedenen Enzyme unterschiedliche Temperaturoptima besitzen. Nach Beendigung des Maischens wird die Würze (flüssige Phase) von den festen Bestandteilen, dem Biertreber, abgetrennt. Dieser Vorgang wird Läutern genannt. Nach der Fest-Flüssig-Trennung wird der Biertreber gewaschen, um eine bessere Ausbeute zu erzielen. Für den weiteren Brauprozess wird nur die Würze verwendet und der Biertreber aus dem Brauprozess ausgeschleust. Im Rahmen der Masterarbeit wird dieser weiterverarbeitet, weshalb auf den nachfolgenden Brauprozess nicht weiter eingegangen wird. [12]

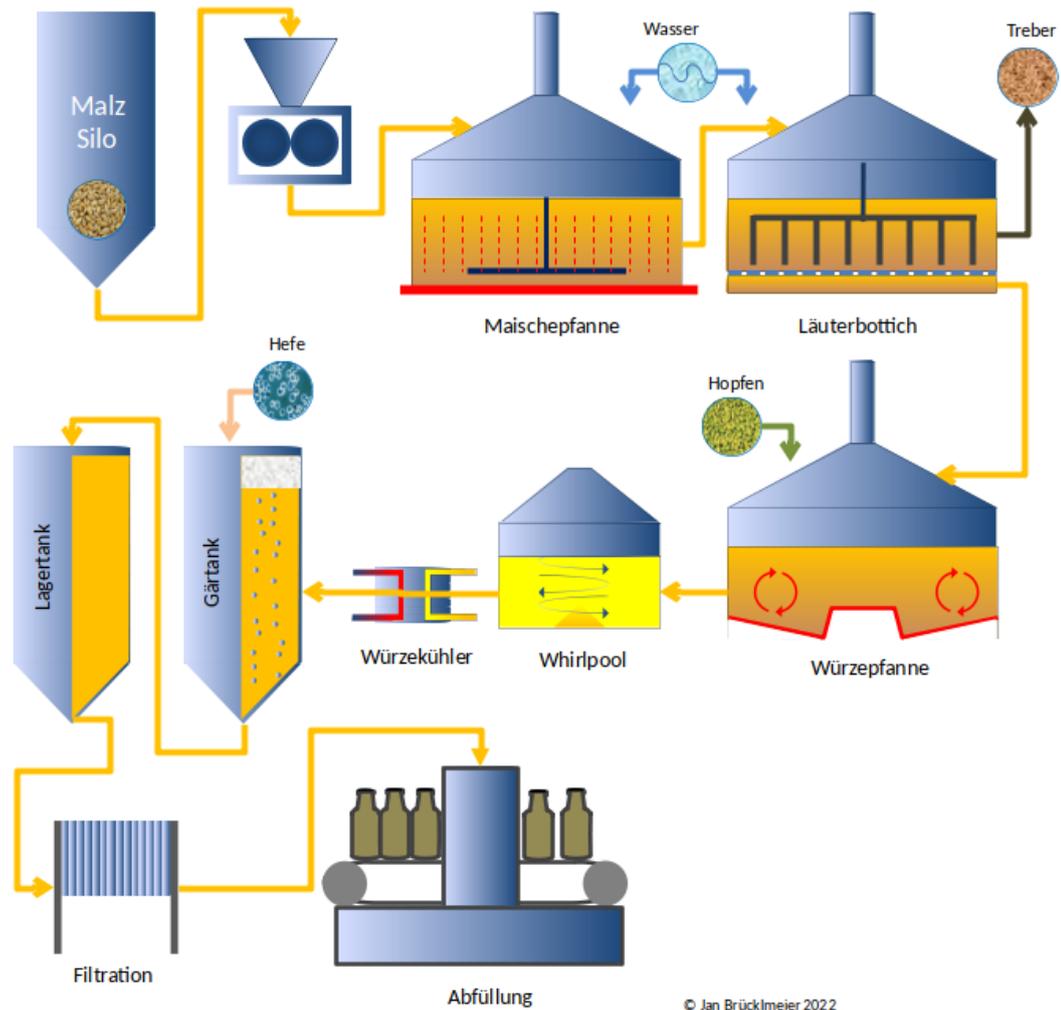


Abbildung 3: Darstellung des Brauprozesses [13]

2.3.2 Zusammensetzung des Biertreibers

Die Zusammensetzung des Biertreibers ist von vielen Faktoren abhängig, bspw. der Getreidesorte, dem Erntezeitpunkt und den Wachstumsbedingungen. Darüber hinaus wird die Zusammensetzung auch durch die Bedingungen bei der Malzherstellung sowie während des Maischeprozesses und durch das Waschen des Biertreibers nach der Fest-Flüssig-Trennung beeinflusst. [14] Der Hauptbestandteil von frischem Biertreber ist mit 70 – 80 % Wasser. Die durchschnittliche prozentuale Zusammensetzung von trockenem Gerstenbierreber und gemischtem Bierreber aus Gersten- und Weizenmalz ist in Tabelle 2 gezeigt. Im Anschluss werden die für die Masterarbeit wichtigsten Bestandteile des Biertreibers kurz vorgestellt. Auf die Zusammensetzung der Fette (Lipide) und Proteine wird an dieser Stelle nicht weiter eingegangen, da sie im Rahmen der Masterarbeit nicht untersucht wurden.

Tabelle 2: Zusammensetzung von Gersten- und Gersten-/Weizenbiertreber [15]

Inhaltsstoffe	Gerstenbiertreber bezogen auf TS [%]	Gersten-/Weizenbiertreber bezogen auf TS [%]
Protein	20 – 28	20 – 28
Fett	8 – 18	8 – 18
Stärke	0,8 – 1,0	0,6 – 1,0
Hemicellulose	25 – 30	35 – 40
Cellulose	18 – 20	14 – 16
Lignin	8 – 10	4 – 7
Asche	3 – 4	3 – 4

Stärke

Stärke ist aus α -glycosidisch verknüpften D-Glucopyranosyleinheiten aufgebaut. Sie dient der Pflanze als Energiespeicher. Durch Photosynthese bilden Pflanzen mithilfe des Chlorophylls aus Kohlenstoffdioxid und Wasser Glucose, anschließend wird diese durch Polymerisation in Stärke umgewandelt. Im Gerstenkorn wird sie als Energiequelle für den Keimling eingelagert. [12]

Strukturell kann Stärke in Amylose und Amylopektin unterschieden werden. Amylose befindet sich in der Regel im Inneren der Gerstenkörner. Sie ist dabei aus 60 – 2.000 D-Glucopyranosyleinheiten aufgebaut, welche α -1,4-glycosidisch verknüpft sind (Maltosebindung). Die Molekülkette bildet dabei eine lange unverzweigte linksgängige Spirale aus (siehe Abbildung 4). Amylose löst sich in Wasser kolloidal und bildet keinen Kleister. Nachgewiesen werden kann sie in Lösungen durch Zugabe von Jod, wobei sich Amylose blau färbt. Enzymatisch kann sie leicht durch α - und β -Amylasen gespalten werden, wodurch sie in kleinere Bruchstücke (Dextrine) bis hin zu Maltose und Glucose abgebaut werden kann. [12]

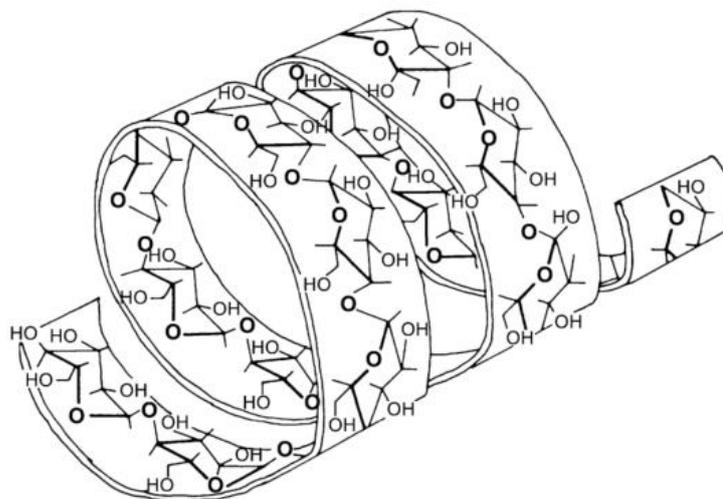


Abbildung 4: Ausschnitt aus der linksgängigen Amylose-Helix [16]

Amylopektin umhüllt die Amylose im Stärkekorn und bildet dabei den Hauptbestandteil der Stärke. Es ist ebenfalls aus α -1,4-glycosidisch verknüpften D-Glucopyranosyleinheiten aufgebaut. Hinzu kommen Verzweigungen nach durchschnittlich 25 Glucosebausteinen, woraus sich ein stark verzweigtes Molekül ergibt. Die Verzweigungen sind α -1,6-glycosidisch verknüpft. In Abbildung 5 ist ein Ausschnitt eines Amylopektin-Moleküls gezeigt. Amylopektin ist in kaltem Wasser unlöslich. In warmem Wasser quillt es auf und bildet einen Kleister, welcher nach Erkalten gelartig bis fest wird. Die Verkleisterungsfähigkeit ist auf die starke Verzweigung zurückzuführen. Aufgebaut ist Amylopektin aus 6.000 – 40.000 Glucopyranosyleinheiten. Es ist ebenfalls leicht durch α - und β -Amylasen abbaubar. In Lösung verfärbt sich Amylopektin mit Jod violett bis rein rot. [12, 16]

Während des Läuterns bei der Bierherstellung wird die Stärke in den Stärkekörnern weitestgehend durch Enzyme gespalten und in Lösung überführt. Infolgedessen spielt Stärke im Biertreber nur eine untergeordnete Rolle als Glucosequelle zur Ethanolgewinnung.

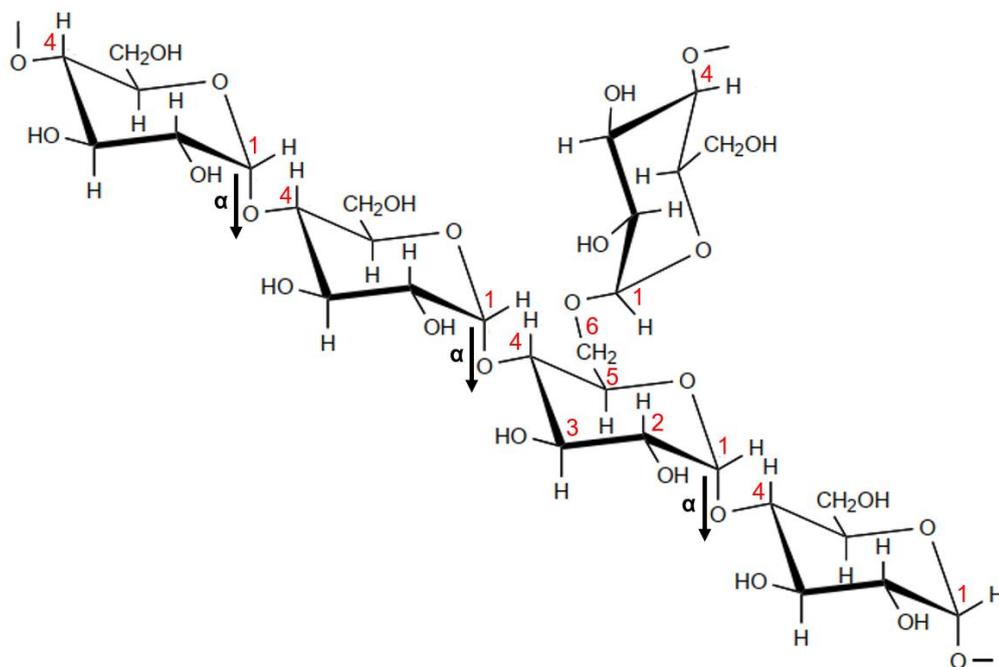


Abbildung 5: Ausschnitt eines Amylopektin-Moleküls mit Nummerierung der Kohlenstoffatome in der D-Glucopyranosyleinheit sowie Kennzeichnung der glycosidischen Bindungen in der Hauptkette (eigene Darstellung auf Basis von [16])

Cellulose

Cellulose befindet sich als Polysaccharid in den pflanzlichen Zellwänden und bildet die Gerüstsubstanz der Pflanzen. Im Biertreber ist Cellulose in den Spelzen enthalten. Eine Fibrille der Cellulosefaser ist aus 500 – 5.000 D-Glucosemolekülen (C-6-Zucker) aufgebaut. Die Moleküle innerhalb einer Fibrille sind dabei β -1,4-glycosidisch verknüpft und bilden lineare unverzweigte β -D-Glucopyranosyleinheiten. Zwischen den OH-Gruppen an Stellung 3 und den Ring-

sauerstoffatomen im Polysaccharid bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen aus. Diese verhindern, dass die glycosidischen Bindungen frei drehbar sind. Abbildung 6 zeigt einen Ausschnitt aus einer Fibrille der Cellulose, in der auch die Wasserstoffbrückenbindungen gekennzeichnet sind. Zum Vergleich siehe Abbildung 5, in der ein Ausschnitt des Amylopektins gezeigt ist. Im Amylopektin sind die D-Glucopyranosyleinheiten untereinander α -1,4-glycosidisch verknüpft, woraus sich eine andere Struktur des Moleküls ergibt. Durch die Veränderung der räumlichen Anordnung können sich im Amylopektin bspw. keine Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Glucoseeinheiten in einem Molekül ausbilden. [16]

Die Einzelfibrillen halten untereinander durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammen. Eine Cellulosefaser besteht dabei aus ca. 40 Einzelfibrillen. Die Abstände zwischen den Einzelfibrillen sind sehr klein, weshalb sich starke Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Infolgedessen wird das Eindringen von Wasser und Enzymmolekülen erschwert. Dies führt dazu, dass Cellulose unlöslich in Wasser, verdünnten Säuren und verdünnten Laugen ist. Im Rahmen der Vorbehandlung ist eines der Ziele die Auflockerung des Faserverbunds, damit die Enzyme besser die glycosidischen Bindungen spalten können. [16]

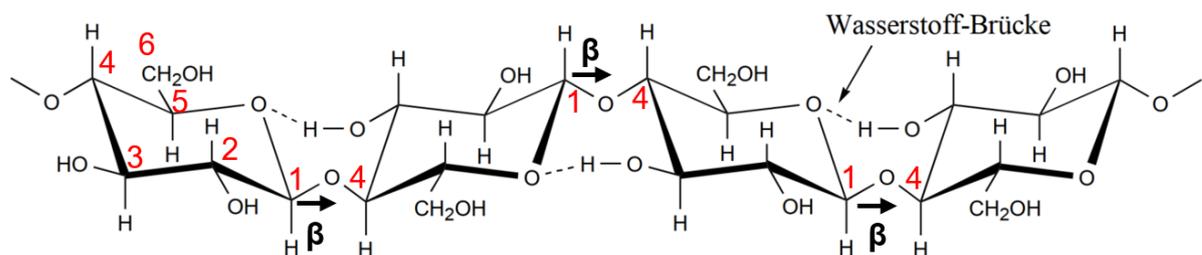


Abbildung 6: Ausschnitt einer Cellulosekette mit Nummerierung der Kohlenstoffatome in der D-Glucopyranosyleinheit sowie Kennzeichnung der glycosidischen Bindungen und der Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelt) zwischen den Einheiten Biomasse (eigene Darstellung auf Basis von [16])

Hemicellulose

Hemicellulose ist in den pflanzlichen Fasern und Zellwänden immer im Zusammenspiel mit Cellulose zu finden. Sie dient als Stütz- und Gerüstsubstanz der Zellwände und erhöht deren Festigkeit. Des Weiteren wird durch die Vernetzung der Cellulose und Hemicellulose der biologische Abbau erschwert. Im Gegensatz zur Cellulose ist das Polysaccharid Hemicellulose aus verschiedenen Pentosen und Hexosen aufgebaut und zusätzlich verzweigt. Mögliche Pentosen (C-5-Zucker), die am Aufbau der Hemicellulose beteiligt sein können, sind Arabinose sowie Xylose. Bei den Hexosen (C-6-Zucker) handelt es sich um Galactose, Glucose und Mannose. Des Weiteren können in Seitenketten z. B. Uronsäuren oder Acetylgruppen enthalten sein. Hemicellulosen sind amorph und lösen sich in Basen, verdünnten Säuren und zum Teil auch in Wasser auf. [16]

Je nachdem, wo die Hemicellulose in der Gerste vorkommt, unterscheidet sich ihre Zusammensetzung. Die Hemicellulose der Spelzen ist vor allem aus Xylan und wenig β -Glucan sowie in geringen Mengen aus Uronsäuren aufgebaut. In Lösung führt sie zu einer geringen Viskosität. Die Hemicellulose im Mehlkörper (Endosperm) besteht hauptsächlich aus β -Glucan und wenig Xylan. Es sind keine Uronsäuren enthalten. In Lösung führt sie zu einer hohen Viskosität. [12]

β -Glucan (Polysaccharid aus Glucose) ist durch 70 % β -1-4- und 30 % β -1-3-Bindungen untereinander verbunden. Die Xylanketten bestehen aus Xyloseeinheiten, die durch β -1-4-Bindungen miteinander verknüpft sind. In den Spelzen befinden sich zusätzlich Seitenketten in β -1-3- und β -1-2-Bindung aus Xylose, Arabinose und Uronsäure. Im Mehlkörper sind die Seitenketten ebenfalls in β -1-3- und β -1-2-Bindung, jedoch ist hier nur Arabinose an die Xylose gebunden. An Arabinose kann durch eine Esterbindung Ferulasäure gebunden sein. Über die Ferulasäuremoleküle ist eine Quervernetzung der Hemicellulose im Mehlkörper möglich. [12] Zusätzlich ist eine Quervernetzung der Hemicellulose durch Proteine über eine Esterbindung mit Tyrosin und Xylan möglich. Durch die Verbindung mit Proteinen wird die Hemicellulose wasserunlöslich. [12]

Des Weiteren berichten Carvalheiro et al., dass zusätzlich Acetylgruppen an das Xylan-Grundgerüst gebunden sind. Während der Vorbehandlung können diese abgespalten werden, wodurch in wässriger Lösung Essigsäure gebildet wird. [17]

Lignin

Lignin ist ein hoch polymerer Stoff, welches aus Phenyl-Propan-Derivaten durch radikalische Polymerisation entsteht. Aufgrund des Bildungsmechanismus ist Lignin chemisch sehr heterogen. Es wird zwischen die Mikrofibrillen der Cellulose in die Zellwand eingelagert und bildet ein dreidimensionales Netzwerk. Die Grundbausteine des Lignins sind p-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol (siehe Abbildung 7). Durch Lignin steigt die mechanische Festigkeit der Zellwand. Des Weiteren ist es unter aeroben Bedingungen biologisch schwer abbaubar. [18] Anaerob ist der Abbau von Lignin unmöglich, da es sich dabei um einen oxidativen Prozess handelt [19]. Neben der mechanischen Stabilität schützt Lignin die Pflanzen durch seine schwere Abbaubarkeit vor Parasiten und Pathogenen bei Verletzung der Pflanzen sowie vor Fressfeinden [20]. In Wasser ist Lignin unlöslich. In heißer Alkalilauge oder Hydrogensulfidlösung kann Lignin unter Bildung von Lignosulfonaten in Lösung gehen. Die Größe der gebildeten Ligninsulfonsäuren schwankt dabei zwischen 10.000 und 200.000 g/mol. [21]

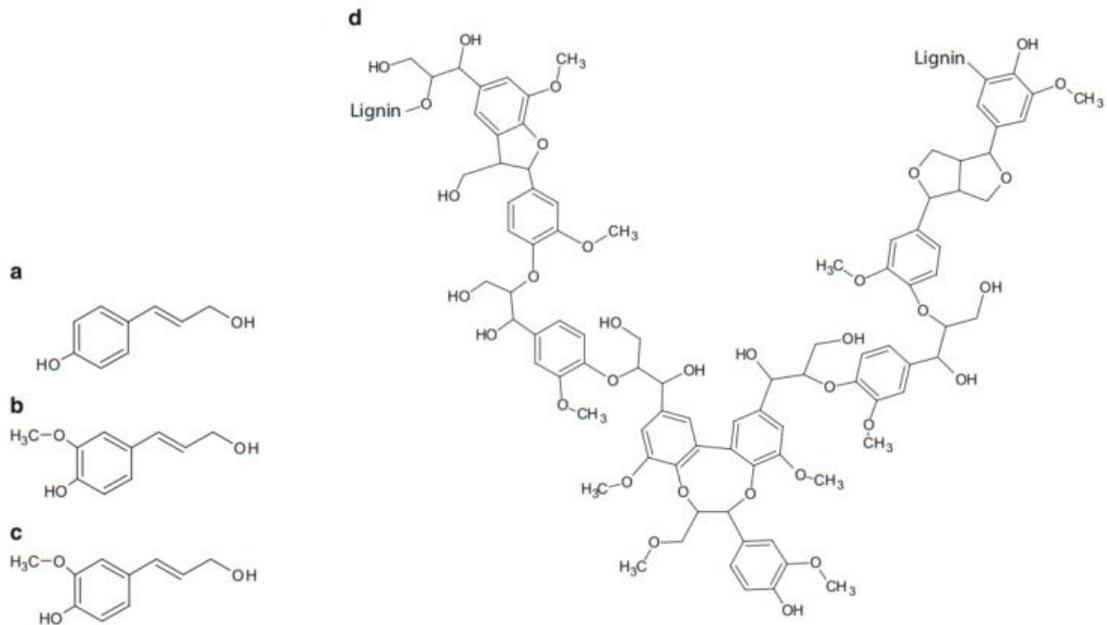


Abbildung 7: Strukturformeln der drei Grundkomponenten des Lignins: (a) p-Cumarylalkohol, (b) Coniferylalkohol, (c) Sinapylalkohol, und ein beispielhafter Ausschnitt einer Ligninstruktur (d) [18]

Aufgrund der Verflechtung der Hemicellulose, Cellulose und des Lignins wird dieser Komplex auch Lignocellulosekomplex genannt. Die drei Stoffe sind dabei untereinander durch Wasserstoffbrückenbindungen und zum Teil durch kovalente Bindungen miteinander verbunden, wodurch sich ein sehr stabiler Komplex bildet. Damit der enzymatische Abbau der Cellulose und Hemicellulose in ihre Monosaccharide erleichtert wird, ist eine Vorbehandlung notwendig, wobei die Struktur möglichst schonend aufgebrochen werden soll, damit die Bildung von Giftstoffen so gering wie möglich ist. [22, 23]

2.3.3 Alternative Verwertungswege von Biertreber

Aufgrund des hohen Proteingehalts kann Biertreber bei Milchkühen und zum Teil auch bei Mastriern dem Futter beigemischt werden. Bevorzugt wird Biertreber in Futterrationen mit großem Anteil an Maissilage. Bei Milchkühen ist eine Beimischung zum Futter von 6 – 10 kg Biertreber pro Tag üblich, zum Teil werden auch bis zu 15 kg pro Tag verfüttert. Durch Beimischung von 10 – 12 kg Biertreber zur Tagesration können ca. 2,5 kg Krafffutter pro Tag bei einer Milchkuh mit einer durchschnittlichen Milchleistung von 26 l/d eingespart werden. Bei der Fütterung mit Biertreber muss auf eine ausreichende Versorgung der Tiere mit Kohlenhydraten geachtet werden, da der Gehalt an Zuckern und Kohlenhydraten bezogen auf die Gesamtmenge relativ gering ist. Des Weiteren ist frischer Biertreber schnell verderblich. Unter aeroben Bedingungen beträgt die Haltbarkeit maximal 2 – 3 Tage. In der warmen Jahreszeit, in der gleichzeitig mehr Biertreber anfällt, verkürzt sie sich auf 1,5 Tage. Eine Möglichkeit zur

Steigerung der Haltbarkeit ist die Zugabe von Konservierungsmitteln oder die Trocknung. Durch den hohen Wassergehalt ist die Trocknung jedoch sehr energieaufwendig. Eine weitere Möglichkeit besteht im Silieren von Biertreber, trotz der theoretisch schlechten Eignung wird von guten Ergebnissen in der Literatur berichtet. [24]

Biertreber wird auch als Ballaststoff- und Proteinquelle in Backwaren verwendet. Jedoch spielt dieser Verwertungsweg mengenmäßig nur eine untergeordnete Rolle. [25]

Weiterhin ist eine energetische Nutzung möglich. Eine Herausforderung stellt dabei der hohe Wassergehalt dar. Ohne Vorbehandlung ist keine Verbrennung möglich. Bei einem Wassergehalt von 80 % wird praktisch die gesamte Energie für die Erwärmung und Verdampfung des Wassers benötigt [8]. Für eine thermische Verwertung muss der Biertreber im ersten Prozessschritt mechanisch entwässert werden, wodurch der Trockensubstanzgehalt von ca. 20 % auf ungefähr 40 % ansteigt. Das Presswasser besitzt einen CSB von 15 – 30 kg/m³, je nachdem welches Entwässerungssystem verwendet wird. Verantwortlich für den hohen CSB sind vor allem feine Partikel, die einen Feststoffgehalt von bis zu fünf Volumenprozent erreichen können. [26] Das Presswasser ist ideal für die Biogaserzeugung geeignet. Der Biogasertrag ist dabei abhängig vom CSB und der Verfügbarkeit für die Mikroorganismen. Pro Tonne Presswasser beträgt der Biogasertrag ungefähr 8 Nm³. [8]

Nach der mechanischen Trocknung kann der Biertreber direkt verbrannt werden. Bei der Verbrennung entstehen pro Tonne feuchtem Biertreber ca. 1 MWh thermische Energie. [8] Zum Vergleich: Der Heizwert von Heizöl beträgt 11,4 MWh/t [27]. Neben der Energiegewinnung dient die Verbrennung vor allem der Beseitigung des Biertreibers. Für das Anfahren des Kessels ist eine Unterstützung mit bspw. Holzpellets oder Holzhackschnitzel notwendig. Eine Möglichkeit ist den Kessel auf Zieltemperatur (oberhalb von 850 °C) aufzuheizen und im Anschluss langsam auf die Beschickung mit Biertreber umzustellen. Das Anfahren mit Biertreber ist aufgrund des hohen Wassergehalts (60 %) nicht möglich, da dieser bei niedrigen Temperaturen von selbst nicht sicher verbrennt. [28, 29] Des Weiteren kann zur Erhöhung des Heizwerts der Wassergehalt durch thermische Trocknung weiter reduziert werden. Der Heizwert von trockenem Biertreber ist mit 18 – 20 MJ/kg hoch und mit dem von Braunkohle vergleichbar, jedoch ist die Trocknung sehr energieaufwendig. Eine weitere Herausforderung an die Verbrennung stellt der hohe Proteingehalt des Biertreibers dar. Proteine sind schwefel- und stickstoffreich, weshalb bei der Verbrennung Stickoxide sowie Schwefeldioxid entstehen. Außerdem enthält das Rauchgas große Mengen an Feinstaub. Zur Einhaltung der gesetzlichen Grenzwerte ist somit eine umfangreiche Abgasbehandlung notwendig. [8]

Eine weitere Verwertung des Biertreibers stellt die Fermentation in Biogasanlagen dar. Wie in Tabelle 2 ersichtlich besteht Biertreber hauptsächlich aus Lignocellulose. Sie ist jedoch nur sehr schwer durch Mikroorganismen abbaubar, woraus sich hohe Verweilzeiten ergeben. Damit die hohen Verweilzeiten gewährleistet werden können, sind große Fermenter bezogen

auf den Durchsatz notwendig, was zu hohen Kosten führt. In der folgenden Abbildung wird der Abbaugrad einer kontinuierlichen anaeroben Hydrolyse und Versäuerung von Gerstentreibereis gezeigt. Dabei wird deutlich, dass nach ca. 9 Tagen Fette sowie Proteine nahezu vollständig hydrolysiert sind, aber nur weniger als 9 % der Lignocellulose. [15]

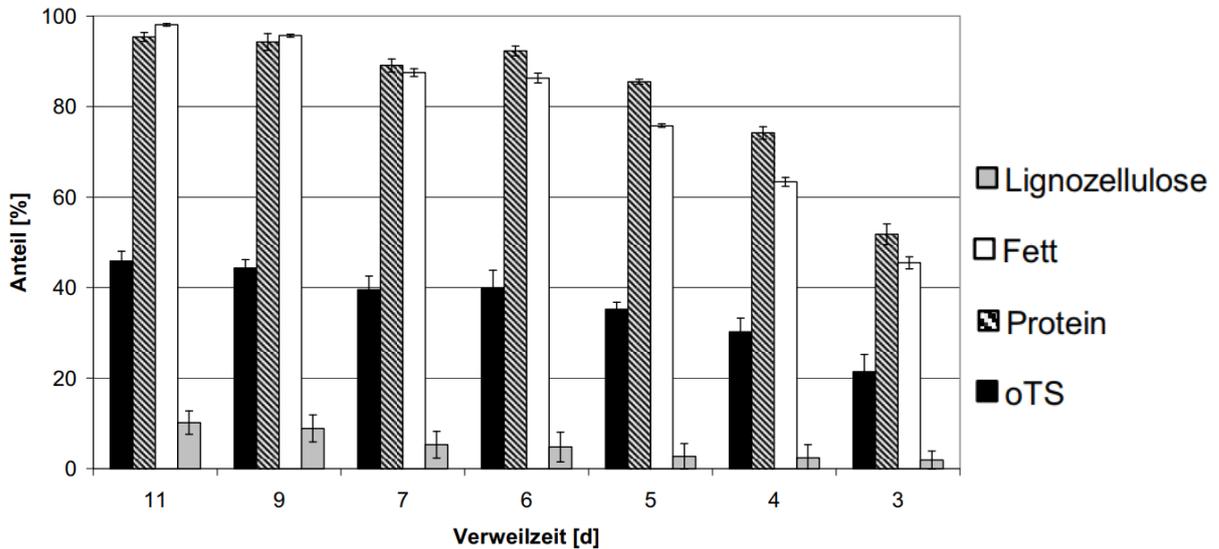


Abbildung 8: Abbaugrade der kontinuierlichen anaeroben Hydrolyse und Versäuerung von Gerstentreibereis ohne Enzymzusatz in Abhängigkeit von der Substratverweilzeit [15]

Für eine bessere und schnellere Hydrolyse der Lignocellulose sind verschiedene Vorbehandlungen möglich. Beispiele sind die chemische und physikalisch-chemische sowie enzymatische Vorbehandlung [15]. Dies ist jedoch mit zusätzlichen Kosten verbunden. Nach einer Vorbehandlung ist die Nutzung der freigesetzten Zucker bspw. zur Gewinnung von Ethanol zu favorisieren, da Ethanol ein deutlich hochwertigerer Stoff im Vergleich zu Methan ist. Des Weiteren entsteht bei der Biogasfermentation durch den hohen Proteingehalt große Mengen an Ammoniak und Schwefelwasserstoff. Beide Stoffe sind im Biogas unerwünscht und können die Gasproduktion hemmen.

2.4 Vorbehandlungsmethoden zum Aufschluss lignocellulosehaltiger Biomasse

Es gibt viele verschiedene Varianten für den Aufschluss lignocellulosehaltiger Biomasse. Sie unterscheiden sich zum Teil deutlich in ihren Wirkmechanismen. Das primäre Ziel der in den folgenden Unterkapiteln beschriebenen Vorbehandlungen ist eine nahezu vollständige Freisetzung der Monosaccharide, aus denen die Hemicellulose und Cellulose aufgebaut sind. Gleichzeitig sollen dabei Lösungen mit möglichst hohen Zuckerkonzentrationen hergestellt werden. Die gewonnenen Monosaccharide können anschließend z. B. zu Ethanol fermentiert

werden. Die Vorbehandlung soll dabei so wenig wie möglich Ressourcen verbrauchen. Des Weiteren ist für die nachgeschaltete Fermentation auf eine geringe Bildung von Giftstoffen zu achten. Von besonderem Interesse ist dabei die Hydrolyse der Cellulose. Auf der einen Seite können Mikroorganismen Glucose als Monosaccharid der Cellulose schnell und effektiv unter anaeroben Bedingungen in Ethanol umwandeln. Gleichzeitig sind die Cellulosefasern aufgrund ihres Aufbaus relativ stabil, wodurch sie die Reaktionsbedingungen bei einem rein chemischen Aufschluss maßgeblich bestimmen.

Prinzipiell sind zwei verschiedene Wege möglich. In der ersten Variante wird der lignocellulosehaltige Rohstoff wenn nötig mechanisch zerkleinert und anschließend chemisch bis in seine Monosaccharide aufgeschlossen. Dafür gibt es verschiedene Verfahren, die zum Teil schon industriell eingesetzt wurden. Für die Aufschlüsse sind jedoch sehr raue Versuchsbedingungen notwendig. [18]

Die zweite Variante ist eine mindestens zweistufige Vorbehandlung bei mildereren Reaktionsbedingungen. Im ersten Schritt erfolgt eine biologische, chemische, mechanische oder thermische Vorbehandlung bzw. eine Kombination dieser Methoden. Durch die Vorbehandlung soll die Hemicellulose und zum Teil auch das Lignin aus dem Komplex entfernt werden. Anschließend werden die Bruchstücke der Hemicellulose sowie die festen Bindungen der Cellulose enzymatisch in Mono- und Disaccharide überführt, wobei die Reaktionsbedingungen deutlich milder sind als bei den Verfahren mit rein chemischer Behandlung. Das Hauptaugenmerk im Rahmen der Masterarbeit liegt auf diesen Verfahren. [18]

2.4.1 Variante 1 – rein chemische Vorbehandlung

Eine Möglichkeit ist der Einsatz konzentrierter Säuren bei moderaten Temperaturen. Im Folgenden sollen beispielhaft zwei dieser Verfahren kurz vorgestellt werden.

Das erste Verfahren ist das Bergius-Verfahren, welches für die Hydrolyse von Nadelholz während des Zweiten Weltkriegs in Deutschland eingesetzt wurde. Für die Gewinnung von Holzzucker wird bei diesem Verfahren im ersten Schritt das Holz zerkleinert und anschließend für 2 h in einer 1%-(w/w)-Salzsäurelösung bei 135 °C vorbehandelt. Im Anschluss wird die Zuckerlösung, welche hauptsächlich aus den Zuckern der Hemicellulose besteht, abfiltriert und mit Kalk neutralisiert. Die Fasern aus Lignin und Cellulose werden im nachfolgenden Schritt durch Zentrifugation getrocknet und mit einer konzentrierten Salzsäurelösung (ca. 41 % (w/w)) bei Raumtemperatur im Gegenstromprinzip hydrolysiert. Danach wird durch Vakuumverdampfung die Salzsäure teilweise zurückgewonnen. Die restliche Salzsäure wird neutralisiert. Trotz der Rückgewinnung liegt der Säureverbrauch bei ca. 1,2 t frischer Säure je Tonne Holz. Nach der Behandlung liegen die Zucker als Oligomere vor, weshalb eine Nachhydrolyse im

Autoklav bei 120 °C notwendig ist, um die Oligomere in Glucose zu überführen. Die ligninreiche Fraktion kann abgepresst und anschließend z. B. thermisch verwertet werden. [18]

Eine weitere Möglichkeit der Vorbehandlung ist der Arkenol-Prozess aus dem Jahr 1997. Dafür muss vor der Behandlung die Lignocellulose gemahlen werden. Für den Aufschluss wird im ersten Schritt konzentrierte Schwefelsäure (25 – 90 % (w/w)) verwendet, um einen Teil der Lignocellulose zu lösen. Das Gemisch aus festen und flüssigen Bestandteilen wird anschließend auf eine Säurekonzentration von 20 – 30 % (w/w) verdünnt und auf eine Temperatur zwischen 80 und 100 °C erwärmt. Die Behandlungszeit ist dabei von der Temperatur abhängig und liegt zwischen 40 und 480 min. Nach dem Aufschluss folgt eine Fest-Flüssig-Trennung. Der feste Bestandteil wird ein zweites Mal behandelt. [30]

Die Schwefelsäure kann nicht durch Destillation aus der Zuckerlösung zurückgewonnen werden, weshalb für das Recycling der Säure eine chromatografische Trennung genutzt wird. Dafür wird das Hydrolysat durch eine gepackte Kolonne mit einem kugelförmigen Ionenaustauscherharz geleitet. Durch die chromatografische Trennung werden Zucker- und Säurefraktion verdünnt. Damit die Säure erneut im Prozess eingesetzt werden kann, wird diese durch Eindampfen aufkonzentriert. Durch das Säurerecycling steigt der Energieverbrauch. Die zuckerreiche Fraktion besitzt nach der chromatografischen Trennung eine Zuckerkonzentration von mindestens 15 % (w/w) und weniger als 3 % (w/w) Schwefelsäure, welche durch Zugabe von Kalk neutralisiert wird. Durch das Recycling der Schwefelsäure ist eine Reduktion des Säureverbrauchs und der Gipsproduktion (durch Neutralisation mit Kalk) möglich. [30]

Neben den beiden beschriebenen Verfahren gibt es zahlreiche weitere Entwicklungen, bei denen konzentrierte Säuren verwendet werden, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen wird. Gemeinsam haben diese Verfahren, dass sie in der Regel hohe Ausbeuten, hohe Zuckerkonzentrationen und kurze Reaktionszeiten aufweisen. Als Nachteile sind die hohen Anforderungen an die Materialien aufgrund der starken Korrosivität und die hohen Kosten für konzentrierte Säuren zu nennen. [18]

Neben dem Einsatz von konzentrierten Säuren ist auch die Nutzung von verdünnten Säuren möglich. Diese Technologie ist zum Teil ebenfalls seit Anfang des 20. Jahrhunderts bekannt. Bspw. stammt das Scholler-Verfahren, welches auch in Deutschland industriell eingesetzt wurde, aus dem Jahr 1920. In weiterentwickelten Verfahren wie dem TVA-Madison-Verfahren wurde die einstufige Behandlung durch eine zweistufige ersetzt. In zweistufigen Verfahren wird die unterschiedliche Reaktivität der Hemicellulose und Cellulose genutzt. In einem ersten Schritt wird dabei die Hemicellulose hydrolysiert und eine vorwiegend aus Pentosen bestehende Lösung gewonnen. Anschließend folgt eine zweite Hydrolyse bei stärkeren Reaktionsbedingungen, bei der Cellulose in Glucose überführt wird. Durch Trennung der beiden Reaktionsschritte wird die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten reduziert. Im TVA-Madison-Verfahren wird bspw. in einer ersten Stufe die Lignocellulose (Holz) mit

ca. 1 % (w/w) Schwefelsäure und Dampf bei ungefähr 12 bar hydrolysiert. Dies entspricht einer Reaktionstemperatur von ca. 190 °C. Anschließend folgt der Aufschluss der Cellulose mit einer 3%-(w/w)-Schwefelsäure bei ca. 20 bar. Durch den höheren Dampfdruck werden Temperaturen von rund 210 °C erreicht. [18]

Als Vorteil der Verfahren mit verdünnten Säuren im Vergleich zur Nutzung von konzentrierten Säuren sind die kurzen Verweilzeiten bei gleichzeitig geringerem Säureverbrauch zu nennen. Als Nachteil erweisen sich die geringeren Zuckerausbeuten sowie -konzentrationen. Des Weiteren stellt die Kombination aus hohen Temperaturen und verdünnten Säuren große Anforderungen an die verwendeten Materialien bezüglich der Korrosionsbeständigkeit und Druckstabilität. [18]

2.4.2 Variante 2 – Vorbehandlung mit anschließender enzymatischer Verzuckerung

Bevor die Cellulose enzymatisch hydrolysiert werden kann, ist ein Aufbrechen der stabilen Lignocellulose notwendig. Ohne Vorbehandlung ist die Cellulose im Komplex nur sehr schwer für Enzyme zugänglich, weshalb mit langen Hydrolysezeiten sowie mit geringen Ausbeuten zu rechnen ist. Das Ziel der Vorbehandlung ist daher die verflochtene Struktur zwischen Hemicellulose, Cellulose und Lignin zu lösen, damit die Enzyme besser eindringen können. Hierfür sind mildere Reaktionsbedingungen als im letzten Kapitel möglich, da hauptsächlich nur die Hemicellulose und je nach Verfahren auch das Lignin aus dem Komplex entfernt werden soll. Für die Vorbehandlung der Biomasse stehen zahlreiche Verfahren zur Verfügung. Sie können in chemische, hydrothermale, biologische und mechanische Verfahren unterteilt werden. Eine Kombination mehrerer Verfahren im Rahmen der Vorbehandlung ist ebenfalls möglich. Abbildung 9 gibt einen Überblick über ausgewählte Verfahren. [22]



Abbildung 9: Überblick über mögliche Vorbereitungsverfahren für eine enzymatische Verzuckerung zur Produktion von Ethanol aus lignocellulosehaltiger Biomasse (eigene Darstellung auf Basis von [31 bis 33])

Aufgrund der milderen Reaktionsbedingungen sinkt das Risiko der Bildung von Giftstoffen wie z. B. Furfural und Hydroxymethylfurfural (HMF). Bei der Bildung der Furfurale handelt es sich um eine mehrmalige säurekatalysierte Dehydratisierung der Monosaccharide. Durch Abspaltung von Wasser entstehen ungesättigte cyclische Ether. Die Hexosen wie bspw. Glucose bilden dabei HMF und die Pentosen wie z. B. Xylose Furfural. In Abbildung 10 ist exemplarisch der Bildungsmechanismus von HMF aus Glucose gezeigt. [16]

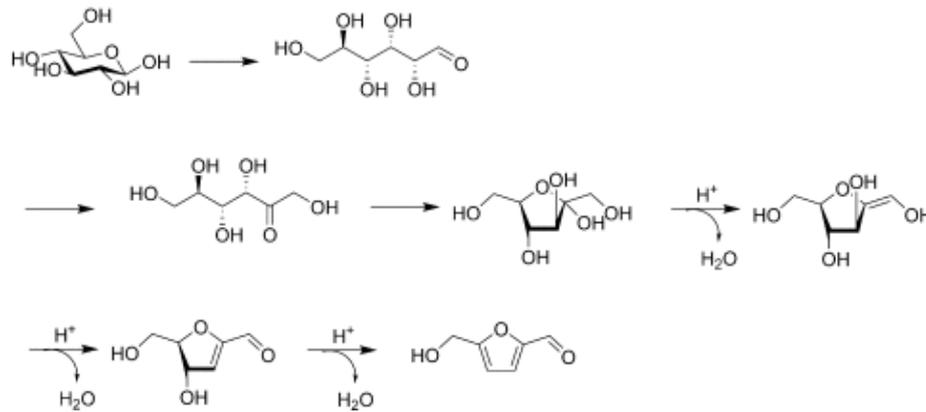


Abbildung 10: Säurekatalysierte Bildung von HMF aus Glucose durch Bildung von Fructose mit anschließendem Ringschluss zu Fructofuranose gefolgt von einer dreistufigen säurekatalysierten Dehydratation [34]

Die gebildeten Giftstoffe HMF und Furfural können anschließend weiterreagieren. Durch Spaltung kann dabei unter anderem Ameisensäure entstehen. Hayes et al. berichten bspw., dass durch Hydratation von HMF ein instabiles Zwischenprodukt gebildet wird, welches nach mehrmaliger Umlagerung in Ameisensäure und Lävulinsäure zerfällt. [17, 35]

Durch Entfernung des Xylans (Teil der Hemicellulose) und Lignins steigt die Zuckerausbeute nach der enzymatischen Verzuckerung an. Die Entfernung des Xylans hat dabei einen größeren Effekt auf die enzymatische Verzuckerung, da sie die Zugänglichkeit der Enzyme direkt verbessert. [19]

Die Entfernung der Hemicellulose sowie des Lignins ist von der Art der Vorbehandlungsmethode abhängig. Je nach Verfahren wird die Hemicellulose mehr oder weniger in lösliche Bruchstücke überführt, wodurch sich die für die Enzyme zugängliche Oberfläche (Entstehung von Poren) vergrößert. Dies führt zu einer verbesserten Adsorption von Cellulasen an die Cellulosefasern. Primär steigt auch durch Entfernung des Lignins die Zugänglichkeit für die Cellulasen. Zu beachten ist jedoch, dass die löslichen Ligninverbindungen reaktiv sind. Dadurch steigt bei hohen Konzentrationen die Wahrscheinlichkeit einer Rekondensation und anschließenden Ablagerung des gebildeten Lignins auf der Biomasse. Infolgedessen sinkt die Zugänglichkeit der Enzyme. [36]

Durch den Einsatz von Enzymen (Biokatalysatoren) ist eine selektive Hydrolyse der glycosidischen Bindungen der Cellulose bei mildereren Reaktionsbedingungen (im Vergleich zu Kapitel 2.4.1) möglich. Aus diesem Grund sind diese Vorbehandlungsverfahren in den letzten Jahren stark in den Fokus gerückt. In Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen sind in der Lösung ebenfalls mehr oder weniger Oligomere der Hemicellulose enthalten. Sie können ebenfalls durch Enzyme hydrolysiert werden. Die in der Lignocellulose zurückgebliebene Hemicellulose kann ebenso durch Enzyme abgebaut werden. Für eine effektive Verzuckerung wird eine Mischung aus verschiedenen Enzymen eingesetzt. [22]

Im Rahmen der Arbeit sollen zwei verschiedene Vorbehandlungsmethoden für die enzymatische Verzuckerung näher untersucht werden, weshalb im Folgenden auf einige ausgewählte Verfahren genauer eingegangen wird. Je nach Biomasse können sich die Bedingungen sowie die Ausbeuten deutlich unterscheiden. Ein Direktvergleich der jeweiligen Zuckerausbeuten aus den verschiedenen Verfahren ist schwierig, da in der Literatur unterschiedliche Bezugspunkte für die Bestimmung genutzt werden. Die Angaben der jeweiligen Ausbeuten sollen vielmehr zur groben Einordnung der Verfahren dienen. Ob es sich um ein wirtschaftliches Verfahren handelt, ist selbstverständlich nicht allein von der Ausbeute abhängig.

Biologische Vorbehandlung

Für die biologische Vorbehandlung werden verschiedene Pilze verwendet. Von besonderem Interesse sind dabei Pilzarten, welche die Lignocellulose durch Weißfäule abbauen. Diese Pilze sind in der Lage Exoenzyme zu produzieren, welche Lignin, Cellulose und Hemicellulose abbauen können. Manche Weißfäulepilze bauen sogar selektiv Lignin und Hemicellulose ab, wodurch die Cellulosefasern nahezu unberührt erhalten bleiben. Bei einem nichtselektiven Abbau werden alle drei Fraktionen in der Lignocellulose gleichzeitig abgebaut, wodurch der Energieverlust durch die biologische Behandlung zunimmt. Ob Pilze die Lignocellulose selektiv oder nicht selektiv abbauen, ist dabei von verschiedenen Faktoren wie z. B. der Pilzart, der Kultivierungsdauer und der Art der Lignocellulose abhängig. Zwischen den Ligninbestandteilen gibt es die Möglichkeit der Kohlenstoff- und Etherbindungen, weshalb der Abbau eher oxidativ als hydrolytisch ist. Am Ligninabbau sind verschiedene Arten von Enzymen beteiligt. Fast alle Weißfäulepilze produzieren Manganperoxidasen und Laccasen. Je nach Organismus sind weitere Enzyme wie z. B. Ligninperoxidasen möglich. Des Weiteren produzieren die Pilze verschiedene Cellulasen und Hemicellulasen. Der Ligninabbau wird unter anderem vom verwendeten Pilzstamm, der Konzentration und Quelle des Stickstoffs, dem Feuchtigkeitsgehalt, pH-Wert und der Temperatur beeinflusst. [37] Von großer Bedeutung ist die Belüftung, worüber die Pilze mit Sauerstoff versorgt und gleichzeitig Abbauprodukte wie z. B. CO₂ entfernt werden. Des Weiteren kann über die Belüftung die Temperatur gesteuert werden. [19]

Zu den Vorteilen der biologischen Vorbehandlung gehören die milden Reaktionsbedingungen sowie, dass auf den Einsatz von Chemikalien verzichtet werden kann. Dementsprechend ist kein aufwendiges Recycling der Chemikalien notwendig. Ein weiterer Vorteil ist, dass durch die Vorbehandlung keine toxischen Nebenprodukte entstehen, welche die Umwelt belasten. Als Nachteil der biologischen Verfahren ist der Energieverlust durch den Abbau von Hemicellulose und Cellulose zu nennen. Des Weiteren ist eine aufwendige Sterilisation notwendig, damit nur die gewünschten Pilze oder ein bestimmtes mikrobielles Konsortium aus verschiedenen Bakterien und Pilzen an der Vorbehandlung beteiligt sind. Durch Verunreinigungen kann es zu unerwünschten Abbaureaktionen kommen. Der größte Nachteil

besteht in den hohen Verweilzeiten bei gleichzeitig geringen Ausbeuten der Monosaccharide nach einer enzymatischen Verzuckerung. [19] Cianchetta et al. berichten bspw. nach einer 10-wöchigen Vorbehandlung von Weizenstroh durch Weißfäulepilze von einer maximalen Zuckerausbeute von 44 %. Eine Reduktion der Verweilzeit auf 4 Wochen führte fast zu einer Halbierung der Zuckerausbeute. [38]

Hydrothermale Vorbehandlung

Es gibt verschiedene technische Umsetzungen der hydrothermalen Vorbehandlung. Sie reichen von Verfahren, bei denen die Biomasse in Druckreaktoren auf klassische Weise erhitzt wird, über Aufschlussverfahren mit Hilfe von Mikrowellenstrahlung bis hin zu Verfahren, bei denen die Biomasse mit Dampf behandelt wird. Bei den zuletzt genannten Verfahren wird Hochdruckdampf (20 – 50 bar, 210 – 290 °C) eingesetzt. Nach kurzer Behandlungszeit wird das Material durch eine kleine Düse aus dem Reaktor getrieben. Durch die schlagartige Entspannung verdampft die Feuchtigkeit in den Fasern (Steam Explosion), wobei zusätzlich hohe mechanische Kräfte auf die Lignocellulose wirken. [39]

Gemeinsam haben diese Verfahren, dass als Reaktionsmedium ausschließlich unterkritisches Wasser verwendet wird. Durch den Verzicht auf Chemikalien kann im Anschluss auf ein Recyclingverfahren verzichtet werden, was sich positiv auf die Betriebskosten sowie Umweltverträglichkeit auswirkt. [40]

Typischerweise werden je nach Verfahren und genutzter Biomasse Temperaturen zwischen 150 und 230 °C genutzt. Unter diesen Bedingungen wird hauptsächlich Hemicellulose aus der Lignocellulose entfernt und in lösliche Oligosaccharide überführt. Bei Temperaturen unter 100 °C findet keine hydrolytische Spaltung der Lignocellulose statt. Wird die Betriebstemperatur über 220 °C erhöht, ist mit einem zunehmenden Abbau der Cellulose zu rechnen. Ab einer Temperatur von ca. 240 – 250 °C kommt es anschließend vermehrt zu Pyrolysereaktionen. Die Reaktionszeit ist dabei stark von der genutzten Temperatur sowie der Art der Biomasse abhängig und variiert von Sekunden bis hin zu Stunden. [39]

Als Katalysator für die Hydrolyse dienen die gelösten Hydroniumionen. Zu Beginn der Behandlung stammen diese aus der Autohydrolyse des Wassers. Ein Maß hierfür ist das Ionenprodukt des Wassers (K_W) bzw. der negative dekadische Logarithmus davon (pK_W) (Gleichung (1) und (2)). [40]

$$K_W = [H_3O^+] \cdot [OH^-] \quad (1)$$

$$pK_W = -\log_{10} K_W \quad (2)$$

Die Selbstdissoziation des Wassers ist dabei temperatur- sowie druckabhängig. Bei einer Temperatur von 22 °C beträgt der K_W -Wert von flüssigem Wasser $10^{-14} \text{ mol}^2/\text{l}^2$ ($\text{p}K_W = 14$). Dies entspricht einem pH-Wert von 7 (Hälfte des $\text{p}K_W$ -Werts). Mit steigender Temperatur sinkt der $\text{p}K_W$ -Wert von flüssigem Wasser, was einen Anstieg der Hydroniumionenkonzentration bedeutet (siehe Gleichung (1) und (2)). Bei 250 °C erreicht der $\text{p}K_W$ -Wert sein Minimum. Durch weitere Erhöhung der Temperatur bis zum Kritischen Punkt kommt es anschließend zu einem Anstieg des $\text{p}K_W$ -Werts. In Abbildung 11 ist der Verlauf schematisch dargestellt. [40]

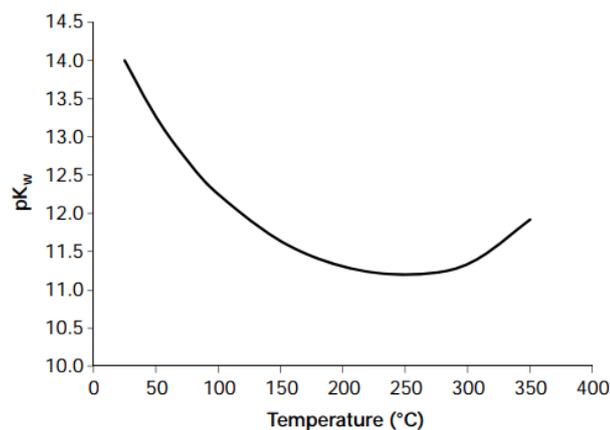


Abbildung 11: Verlauf des $\text{p}K_W$ -Werts von Wasser in Abhängigkeit der Temperatur bei entsprechendem Sättigungsdampfdruck [40]

Durch Erhöhung der Temperatur von 22 °C auf 250 °C sinkt der pH-Wert von 7 auf 5,6. Dies entspricht einem Anstieg der Hydroniumionenkonzentration auf das 25-Fache bezogen auf 22 °C. Zu beachten ist, dass laut Definition die Lösung trotz Anstieg der Hydroniumionenkonzentration neutral ist, da die Konzentration der Hydroxidionen in gleichem Umfang ansteigt. Gleichzeitig steigt die kinetische Energie der Moleküle bei Erhöhung der Temperatur ($T \sim \overline{E_{\text{kin}}}$). In Kombination führt dies zu einer Erhöhung der Hydrolysegeschwindigkeit der pflanzlichen Polymere. [40]

Unter den Bedingungen der hydrothermalen Vorbehandlung kommt es durch selektive Hydrolyse hauptsächlich zur Depolymerisation der Hemicellulose. Dies geschieht durch Spaltung der glycosidischen Bindungen sowie durch Abspaltung von Acetylgruppen. Durch die Abspaltung von Acetylgruppen entsteht in Lösung Essigsäure, wodurch es zu einem Anstieg der Hydroniumionenkonzentration kommt. Auf den gesamten Aufschluss bezogen hat der Anstieg der Hydroniumionen durch die Bildung der Essigsäure einen größeren Einfluss als die Autohydrolyse des Wassers. Diese dient vor allem als Initiator, damit die hydrolytische Spaltung starten kann. Da bei diesen Verfahren die Autohydrolyse des Wassers sowie die Selbstverstärkung durch Bildung von Essigsäure genutzt wird, werden diese Verfahren auch als Autohydrolyseverfahren bezeichnet. [39]

Ebenfalls kann die Abspaltung von Uronsäuren aus der Hemicellulose trotz ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber der sauren Hydrolyse zur Bildung von Hydroniumionen beitragen. Die Wirkung der Uronsäuren ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. [39] Durch Bildung von Säuren während des Aufschlusses (vor allem Essigsäure) sinkt der pH-Wert der Lösung auf ungefähr 4,5 bis 3,0 bei Raumtemperatur ab. [40]

Durch die Hydrolyse wird wie beschrieben vor allem die Hemicellulose in lösliche Bruchstücke überführt und so aus der Lignocellulose entfernt. Das Ziel der Vorbehandlung ist dabei die Hemicellulose möglichst vollständig zu entfernen, damit in der nachfolgenden enzymatischen Verzuckerung die Cellulose effektiv zu Glucose hydrolysiert werden kann. Jedoch ist die Hydrolyse der Hemicellulose in lösliche Oligosaccharide langsamer als die Hydrolyse der gelösten Oligosaccharide in Monosaccharide, was ein Problem darstellt. Dies ist darin begründet, dass die gebildeten Monosaccharide anschließend zu Furfural bzw. HMF abgebaut werden können. Diese Giftstoffe können die nachgeschaltete Fermentation hemmen oder weiter zu Folgeprodukten wie z. B. Ameisensäure und Lävulinsäure reagieren. Eine Herausforderung stellt dabei die Optimierung der Versuchszeit und -temperatur dar, damit auf der einen Seite die Enzymverfügbarkeit der Cellulose im Feststoff möglichst maximal ist und gleichzeitig der Abbau der Monosaccharide in der Flüssigkeit auf ein Minimum begrenzt wird. Nur so ist eine maximale Gesamtausbeute an Monosacchariden möglich. Die Cellulose selbst wird durch die Vorbehandlung kaum verändert. [40]

Lignin ist in saurem und neutralem Milieu nur zu einem geringen Teil löslich. In der Literatur werden Beobachtungen beschrieben, welche darauf hindeuten, dass während der Behandlung unter hoher Temperatur und Druck Lignin zumindest bis zu einem gewissen Maß gelöst wird. Beim anschließenden Abkühlen fällt Lignin jedoch wieder als Feststoff aus. Des Weiteren ist Lignin unter den vorherrschenden Bedingungen während der hydrothermalen Vorbehandlung resistent gegenüber einer Depolymerisation. Je nach Art der Biomasse variiert der Schmelzpunkt des Lignins zwischen 90 und 190 °C. Daher kann es bei der hydrothermalen Vorbehandlung zum Schmelzen des Lignins kommen. Lignin ist hydrophob, weshalb in wässriger Lösung geschmolzenes Lignin zu kleinen Tropfen koalesziert. Beim Abkühlen können diese an der Oberfläche der Biomasse adsorbieren oder in der Zellwandmatrix verbleiben. Mit Hilfe eines Elektronenrastermikroskops konnten die erstarrten Tropfen auf der Zellwandoberfläche beobachtet werden. [40] Eine weitere Möglichkeit ist, dass es sich bei den Tropfen um Pseudolignin handelt. Auf die Entstehung wird im Abschnitt zur Vorbehandlung mit verdünnten Säuren genauer eingegangen.

Insgesamt wird von guten bis sehr guten Zuckerausbeuten in der Literatur berichtet. Je nach verwendetem Verfahren unterscheiden sich die Vor- und Nachteile zum Teil erheblich, weshalb an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen werden soll. Michelin und Teixeira berichten bei einer Heißwasserhydrolyse von Biertreber (190 °C und ca. 30 min, Temperatur

nur im Ölbad, nicht im Reaktor gemessen) bspw. von einer Glucosefreisetzung aus der Cellulose im vorbehandelten Feststoff von 76 % nach der Enzymbehandlung [41]. López-Linares et al. berichten, dass nach einer hydrothermalen Vorbehandlung in einer Mikrowelle bei 193 °C und 5,4 min 69,5 % der maximal möglichen Glucose aus dem Biertreber nach der enzymatischen Verzuckerung zurückgewonnen werden konnte. Insgesamt konnte eine Ausbeute von 82 % bezogen auf die im Biertreber potenziell gebundenen Zucker erreicht werden. [42] Bei einer Behandlung von Biertreber mit Wasserdampf konnte laut Kempainen et al. bei 200 °C und 10 min durch eine Enzymbehandlung 75 % der im Feststoff zurückgebliebenen Kohlenhydrate hydrolysiert werden [43].

Vorbehandlung mit verdünnten Säuren

Die Erforschung von säurekatalysierten Verfahren ist derzeit am weitesten fortgeschritten. Die Ergebnisse sind sehr vielversprechend, dass sie in den industriellen Maßstab überführt werden können. Der Vorteil in Bezug auf die in Kapitel 2.4.1 beschriebenen sauren Verfahren liegt vor allem in der Reduktion von unerwünschten Abbaureaktionen der Monosaccharide. Prinzipiell sind die Wirkmechanismen vergleichbar mit denen der hydrothermalen Vorbehandlung, da auch hier vor allem die Hydroniumionen als Katalysator fungieren. Durch die Zugabe von Säure ist jedoch eine gezielte Erhöhung der Hydroniumionenkonzentration möglich. Der Übergang zwischen hydrothermalen Vorbehandlungen hin zu Vorbehandlungen mit verdünnten Säuren ist dabei fließend. Die am häufigsten verwendete Säure ist Schwefelsäure, typischerweise liegt die Konzentration zwischen nahezu 0 und 5 % (w/w). Die Temperatur variiert in Abhängigkeit der Verweilzeit, Konzentration und Art der Biomasse in der Regel zwischen 120 und 215 °C. Die Verweilzeit kann je nach Härte der Aufschlussbedingungen zwischen einigen Sekunden und ca. 2 h variieren. Im Allgemeinen gilt: Je höher die Konzentration der Säure, desto geringer ist die benötigte Temperatur während der Aufschlüsse. In neueren Berichten werden meist Temperaturen oberhalb von 100 °C genutzt, damit möglichst wenig Säure eingesetzt werden muss. [44, 45]

Durch Zugabe von Säure eröffnen sich weitere Stellgrößen für die Optimierung der Hydrolyse. Zu nennen sind dabei die Wahl der Säure sowie deren Konzentration. Prinzipiell steht eine Vielzahl von Säuren zur Verfügung. Jedoch ist bei der Auswahl neben den chemischen Eigenschaften auf den Preis der Säure und auf das Gefährdungspotenzial in Bezug auf die Umwelt sowie auf nachgeschaltete Prozesse wie der Fermentation zu achten. Häufig verwendete Säuren sind Schwefelsäure, Salzsäure, Salpetersäure und Phosphorsäure. Des Weiteren kann zum leichten Ansäuern Schwefeldioxid bzw. Kohlenstoffdioxid verwendet werden. [39, 46] In Lösung reagieren die Gase zum Teil zu schwefliger Säure bzw. Kohlensäure. Kohlenstoffdioxid ist dabei von besonderem Interesse, da es als Abfallprodukt während der Fermentation anfällt.

Neben den Hydroniumionen können ebenfalls die Anionen der Säure den Verlauf der Aufschlüsse beeinflussen. Liu et al. untersuchten den Einfluss von anorganischen Salzen auf ihren Abbau von Hemicellulose und Cellulose in Maisstroh. Ihre Ergebnisse zeigten, dass durch Chloridionen im Vergleich zu Sulfationen der Abbau von Hemicellulose leicht verstärkt wurde. Des Weiteren zeigten die Experimente, dass vor allem der Abbau von gelösten Xylanbruchstücken zu Xylose und weiter zu Furfural beschleunigt wurde. Dies könnte zu Konflikten bei der Optimierung der maximalen Hemicelluloseentfernung bei gleichzeitig minimalem Xyloseverlust führen. [32] Marcotullio und De Jong zeigten ebenfalls, dass durch Chloridionen der Abbau von Xylose zu Furfural verstärkt wurde. Bei Versuchen mit Kaliumbromid wurde auch eine verstärkte Furfuralbildung beobachtet. Marcotullio und De Jong vermuteten, dass durch Halogenidionen im Allgemeinen die Furfuralbildung verstärkt wird. Sie gehen davon aus, dass die Unterschiede der katalytischen Wirkung auf die Nukleophilie der Ionen sowie ihrer Größe und Ladungsdispersion zurückzuführen ist. [47] Da es sich bei Aufschlüssen von lignocellulosehaltiger Biomasse um sehr komplexe Systeme mit vielen Einflussfaktoren handelt, ist eine pauschale Aussage, ob Salzsäure wegen der katalytischen Wirkung der Chloridionen besser oder schlechter geeignet ist als Schwefelsäure, nicht möglich.

Wie schon bei der hydrothermalen Vorbehandlung im letzten Abschnitt beschrieben hat auch bei Säuren die Temperatur Einfluss auf die Dissoziation. Dadurch kann die Konzentration der Hydroniumionen je nach Säure mehr oder weniger beeinflusst werden. Darüber hinaus ist die Dissoziation auch von der Salzkonzentration der Lösung abhängig. Bspw. soll an dieser Stelle der Einfluss der Temperatur auf die zweite Dissoziationsstufe der Schwefelsäure gezeigt werden. Zur Einstellung der Ionenstärke (I) wurde die Konzentration von Natriumchlorid variiert. [48]

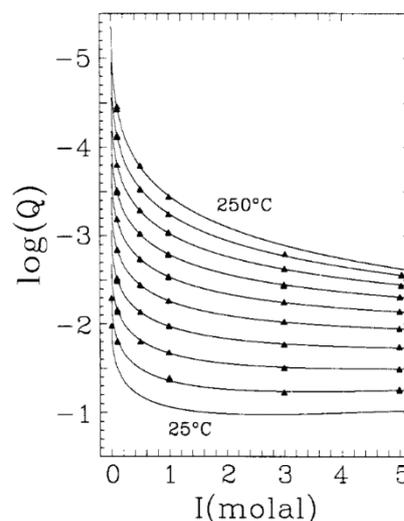


Abbildung 12: Abhängigkeit der logarithmischen Säurekonstante von der Ionenstärke bei verschiedenen Temperaturen in einer Abstufung von 25 °C [48]

Q ist dabei die Säurekonstante berechnet aus der Molalität der an der zweiten Dissoziationsstufe beteiligten Ionen (siehe Gleichung (3)), nicht zu verwechseln mit der Säurekonstante (K_s), welche aus der Stoffmengenkonzentration berechnet wird. Anhand des Kurvenverlaufs in Abbildung 12 wird in Verbindung mit Gleichung (3) deutlich, dass mit zunehmender Temperatur die Molalität und somit auch die Konzentration der Hydroniumionen sinkt. [48]

$$Q = \frac{b_{H_3O^+} \cdot b_{SO_4^{2-}}}{b_{HSO_4^-}} \quad (3)$$

Durch die Vorbehandlung wird der Polymerisationsgrad der Cellulose reduziert, womit die Abbaubarkeit durch Cellulasen verbessert wird. Der Abbau der Cellulose in lösliche Bestandteile infolge der Vorbehandlung ist wie bei den hydrothermalen Verfahren gering. Die Ligninstruktur unterliegt ähnlichen Veränderungen wie im Rahmen der hydrothermalen Vorbehandlung beschrieben wurde. Auch bei der Behandlung mit verdünnten Säuren wird von einer geringfügigen Ligninentfernung berichtet. Möglicherweise wird diese aber unterschätzt, da einige Autoren Reaktionen beobachteten, die zu ligninähnlichen Strukturen führten. Diese auch Pseudolignin genannten Strukturen können in den gängigen Analysemethoden nicht von natürlichem Lignin unterschieden werden. [46]

Die Entstehung von Pseudolignin ist noch nicht vollständig geklärt. Schmatz et al. führten die Bildung von ligninähnlichen Strukturen auf Kondensationsreaktionen der Ligninfragmente mit Abbauprodukten der Monosaccharide zurück. Des Weiteren zeigten sie, dass die Extraktstoffe aus den pflanzlichen Zellen die Bildung von Pseudolignin erhöhen. [49] Sannigrahi et al. untersuchten ebenfalls die Bildung von Pseudolignin sehr ausführlich. Sie kamen zu dem Entschluss, dass die ligninähnlichen Strukturen allein aus Abbauprodukten der Monosaccharide entstehen können. Denkbare Reaktionswege sind dabei Reaktionen von Furfural und HMF mit gelöster Glucose, Xylose oder anderen Abbauprodukten. [45] Beide Forschungsarbeiten zeigten eine positive Korrelation der Pseudoligninbildung in Bezug auf die Härte der Versuchsbedingungen. Je höher die Temperatur und Säurekonzentration war, desto mehr Pseudolignin entstand mit der Zeit. [45, 49]

Mit einem Elektronenrastermikroskop konnten erstarrte kugelförmige Tropfen auf der Biomasse beobachtet werden (siehe Abbildung 13). Untersuchungen zeigten, dass es sich dabei um Lignin handelt. Die Tropfen können durch Ablagerungen von Pseudolignin entstehen. Mit einem Anstieg der Pseudoligninbildung während der Vorbehandlung wurde gleichzeitig eine Erhöhung der unerwünschten Lignintropfen auf der Biomasse beobachtet. Des Weiteren können die Tropfen durch Schmelzen von natürlichem Lignin entstehen, wie im Abschnitt zur hydrothermalen Vorbehandlung beschrieben wurde. [45]

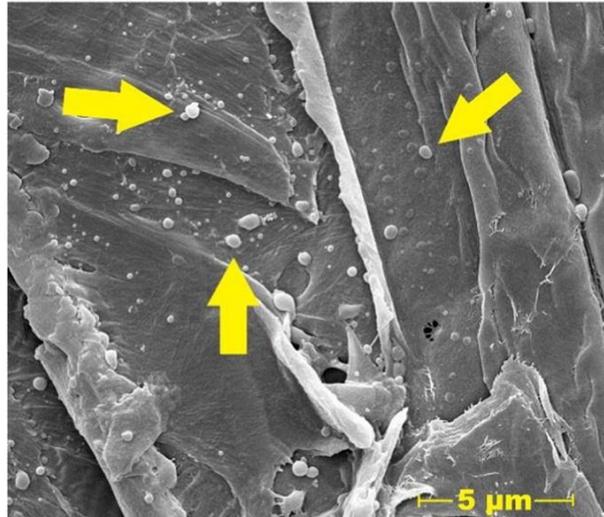


Abbildung 13: Erstarre Lignintropfen auf der Oberfläche der Biomasse nach einer sauren Vorbehandlung [49]

Ein großer Vorteil der Verfahren mit verdünnten Säuren ist, dass die Hemicellulose nahezu vollständig aus der Lignocellulose entfernt werden kann, was zu sehr guten Ausbeuten an Glucose aus der Cellulose nach der enzymatischen Verzuckerung führt. Es wird von Zuckerausbeuten bis zu 90 % berichtet. [44] Ein weiterer Vorteil ist, dass durch reduzierte Temperaturen während der Behandlung niedrigere Drücke als bei der hydrothermalen Vorbehandlung herrschen.

Der Hauptnachteil von Verfahren, in denen verdünnte Säuren genutzt werden, ist, dass nach der Behandlung die Säuren mit Basen neutralisiert oder über ein aufwendiges Recyclingverfahren zurückgewonnen werden müssen. Dies führt zu zusätzlichen Betriebskosten. Des Weiteren müssen z. B. Reaktoren, Messtechnik sowie das Rührwerk aus korrosionsbeständigen Materialien bestehen, was zu höheren Investitionskosten führt. Ebenfalls ist darauf zu achten, dass der Abbau der Monosaccharide zu Furfural und HMF auf ein Minimum reduziert wird, um Zuckerverluste sowie Störungen bei der Fermentation zu vermeiden. [46] Für die Neutralisation der Flüssigkeit kann bspw. Calciumcarbonat, eine relativ kostengünstige Base, genutzt werden. Außerdem stellt Calciumcarbonat im Vergleich zu Natronlauge geringere Anforderungen an die Lagerung. Martinez et al. berichten zusätzlich, dass durch Neutralisation mit Calciumcarbonat die Menge an gebildetem Furfural und HMF um ca. 50 % sowie die von phenolischen Verbindungen um ca. 40 % reduziert werden kann. Gleichzeitig wird jedoch die Zuckerkonzentration auch bei optimaler Zugabe um ca. 9 % reduziert, wodurch die Ausbeute sinkt. [50]

Rojas-Chamorro et al. untersuchten Biertreberaufschlüsse in einem Druckreaktor mit verdünnter Schwefelsäure in Abhängigkeit der Versuchszeit (10 – 40 min), Temperatur (110 – 130 °C) und Säurekonzentration (1 – 3 % (w/v)). Das Verhältnis Feststoff zu Flüssigkeit betrug dabei 1:8 (ca. 11 %). Das Ziel der Forschung war mit Hilfe eines Box-Behnken-

Versuchsplans die optimalen Aufschlussbedingungen zu finden. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine maximale Ausbeute bei 130 °C, einer Versuchszeit von 26 min und einer Schwefelsäurekonzentration von 1 % (w/v) erreicht wurde. Ein Versuch unter diesen Bedingungen zeigte, dass durch die Vorbehandlung 94 % der Zucker der Hemicellulose in Lösung überführt wurden. Nach der enzymatischen Verzuckerung des Feststoffs konnte ebenfalls eine Gesamtzuckerausbeute von 94 % bezogen auf die im unbehandelten Biertreber gebundene Zuckermenge erreicht werden. [51]

In einem anderen Paper untersuchten Rojas-Chamorro et al. den Einfluss von verdünnter Phosphorsäure auf den Aufschluss von Biertreber. Die Aufschlüsse wurden ebenfalls in einem Druckreaktor bei einem Feststoff-zu-Flüssigkeits-Verhältnis von 1:8 durchgeführt. Der untersuchte Temperaturbereich betrug dabei 140 – 180 °C. Nach Erreichen der Zieltemperatur wurde der Reaktor sofort abgekühlt. Die Säurekonzentration wurde in den Versuchen zwischen 2 und 6 % (w/v) variiert. Die Bedingungen der einzelnen Versuche wurden durch einen drehbaren zentralen Versuchsplan festgelegt. Die Auswertung der Versuche ergab, dass die optimalen Versuchsbedingungen 155 °C sowie eine Phosphorsäurekonzentration von 2 % (w/v) waren. Unter diesen Bedingungen konnte aus der Hemicellulose eine Zuckerausbeute von 80 % erreicht werden. Insgesamt wurde nach der enzymatischen Hydrolyse eine Zuckerausbeute von 92 % bezogen auf den maximal möglichen Zuckergehalt im unbehandelten Biertreber erreicht. Dies deutet darauf hin, dass mit Hilfe von Schwefelsäure unter etwas milderen Bedingungen höhere Ausbeuten erzielt werden konnten. Zu beachten ist dabei, dass die Versuchsabläufe nicht identisch waren. [52]

Alkalische Vorbehandlung

Während der alkalischen Vorbehandlung wird hauptsächlich Lignin aus den Zellwänden entfernt. Im Gegensatz zu den hydrothermalen und sauren Vorbehandlungen unterliegt die Hemicellulose hierbei nur einem geringfügigen Abbau. Infolgedessen verbleibt die Cellulose und auch zum größten Teil die Hemicellulose im Feststoff. Im Vergleich zur sauren Vorbehandlung ist die alkalische Vorbehandlung schonender. Da die Aufschlüsse weniger aggressiv sind, können günstigere Materialien für die Reaktoren genutzt werden. [23]

Die alkalische Vorbehandlung kann in 3 Arten unterteilt werden. Die jeweiligen Verfahren unterscheiden sich dabei zum Teil deutlich in den Reaktionsmechanismen und der technischen Umsetzung. Als Erstes sind Verfahren zu nennen, in denen Laugen aus vorwiegend Natriumhydroxid oder Calciumhydroxid eingesetzt werden. Der genutzte Temperaturbereich erstreckt sich dabei von 25 °C bis hin zu 190 °C, womit dieser deutlich größer als bei den zuvor vorgestellten Verfahren ist. Der genutzte Konzentrationsbereich variiert zwischen 1 und 10 % (w/w). Nach der Vorbehandlung ist wie bei den sauren Vorbehandlungsverfahren eine Neutralisation notwendig. Je nach Temperatur und Konzentration ergeben sich

daraus Vorbehandlungszeiten von 30 min bis hin zu mehreren Tagen. Die entfernten Ligninbestandteile sollen dabei in der Flüssigkeit gelöst werden. In der Regel wird Natriumhydroxid oder Calciumcarbonat eingesetzt. Der Einsatz von Natronlauge ist dabei aus der Papierindustrie schon seit vielen Jahren bekannt. Calciumhydroxid bzw. Calciumcarbonat ist im Vergleich deutlich günstiger, was sich positiv auf die Betriebskosten auswirkt. Des Weiteren ist es einfach zu handhaben und mit Oxidationsmitteln kompatibel. Der größte Nachteil stellt die geringe Löslichkeit dar, wodurch es zu Ablagerungen auf der Biomasse kommen kann, welche den weiteren Abbau behindern. [53]

Als zweites Verfahren ist die Nassoxidation unter alkalischen Bedingungen zu nennen. Hierfür wird Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid unter Druck während der Behandlung zugegeben, wodurch sich Radikale in der Lösung bilden. Für eine maximale Radikalbildung aus Sauerstoff sollte der pH-Wert höchstens 11 – 11,5 betragen. Die Radikale greifen bevorzugt elektronenreiche Stellen im Substrat an, wobei es zu einer Oxidation des Substrats sowie einer Reduktion der Radikale kommt. Durch Zugabe von Oxidationsmitteln kommt es zu einem verstärkten Abbau des Lignins, aber auch der Hemicellulose sowie teilweise der Cellulose. Die Radikale können dabei Hemicellulosebestandteile über niedermolekulare Carbonsäuren bis hin zu CO₂ und Wasser oxidieren, wodurch die Zuckerausbeute reduziert wird. Gleichzeitig werden auch potenzielle Hemmstoffe wie Phenole (aus Lignin) und Furane (aus Zucker) weiter zu Carbonsäuren und schließlich zu CO₂ und Wasser abgebaut. Versuche zeigten, dass der Ligninabbau mit einem Anstieg der Carbonsäuren korreliert. Durch den radikalischen Abbau kommt es zur Bildung verschiedenster Säuren, vorwiegend handelt es sich jedoch um Ameisensäure und Essigsäure. Typische Temperaturen liegen zwischen 180 und 200 °C. Die Behandlungszeit variiert zwischen 5 und 15 min. Typische Feststoffbeladungen sind 5 – 20 % bezogen auf die Trockensubstanz. [23, 53]

Das letzte Verfahren stellt die Ammonia Fibre Explosion dar. Bei diesem Verfahren wird die alkalische Wirkung von Ammoniak genutzt. Während der Behandlung wird lignocellulosehaltige Biomasse mit flüssigem Ammoniak für 5 – 10 min bei moderaten Temperaturen zwischen 90 und 100 °C behandelt. Dabei liegt ein Druck von 17 – 20 bar an. Nach der Behandlungszeit wird der Druck wie bei der Dampfbehandlung schlagartig entspannt, wodurch hohe mechanische Kräfte auf die Biomasse wirken. Durch die Entspannung kommt es zur Verdampfung des Ammoniaks, welches anschließend zurückgewonnen und erneut eingesetzt werden kann. Die Besonderheit bei diesem Verfahren ist, dass ein Trockensubstanzgehalt von bis zu 60 % effizient behandelt werden kann sowie dass nach der Behandlung keine flüssige Fraktion vorliegt. Durch die Vorbehandlung wird die Lignocellulose aufgespaltet, aber die Spaltprodukte nicht von der Biomasse entfernt, weshalb Ligninablagerungen auf der Biomasse nach der Behandlung zu beobachten sind. Des Weiteren führt die Vorbehandlung zur

Depolymerisation der Cellulose und zur teilweisen Hydrolyse der Hemicellulose. Der Abbau von Zuckern zu Inhibitoren ist gering. [23]

Im Folgenden soll etwas genauer auf die Verfahren der ersten Variante eingegangen werden. In der Papierindustrie wird weltweit das Sulfatverfahren zur Herstellung von Zellstoff am häufigsten eingesetzt. Bei diesem Verfahren wird unter anderem Natronlauge zugegeben. Ziel der Behandlung ist die Cellulosefasern möglichst vollständig von Lignin zu befreien, was im Allgemeinen mit den Zielen der Biomassevorbehandlung für die Ethanolproduktion übereinstimmt. Es gibt jedoch wichtige Unterschiede im Detail, weshalb die Verfahren nicht direkt auf die Vorbehandlung für enzymatische Verzuckerungen übertragbar sind. In der Papierindustrie ist z. B. eine möglichst vollständige Entfernung des Lignins besonders wichtig, damit das Papier mit der Zeit nicht vergilbt. Die Produktion von Giftstoffen spielt dabei nur eine untergeordnete Rolle. Für die Enzymbehandlung ist eine teilweise Entfernung des Lignins hingegen ausreichend. Eine Minimierung der Hemmstoffe ist dafür sehr wichtig für die Folgeprozesse. Des Weiteren entsteht bei der Herstellung von Zellstoff ein wertvolles Zwischenprodukt für die Papierherstellung, welches verkauft werden kann. Bei der alkalischen Biomassevorbehandlung soll nur die Produktivität der Enzyme gesteigert werden. [53, 54]

Der Ligninabbau für eine effektive enzymatische Verzuckerung ist stark von der Art der Biomasse abhängig. Holzige Biomasse (z. B. Hartholz, Weichholz) hat einen hohen Ligningehalt, wodurch die Entfernung erschwert wird. Damit bei derartiger Biomasse die Verdaulichkeit deutlich gesteigert wird, ist eine umfangreiche Ligninentfernung von 50 – 70 % notwendig. Krautige Biomasse, zu der der Biertreber gehört, besitzt wenig Lignin, weshalb die Entfernung erleichtert wird. Für derartige Biomasse ist eine Entfernung von 30 – 50 % ausreichend. [53]

Die Eigenschaften des Lignins erschweren die Entfernung. Zu nennen sind hier die Hydrophobie, physikalische Steifigkeit, starke Polyringbindungen und seine Neigung zur Rekondensation. Lignin ist ein sehr komplexes dreidimensionales Polymer. Trotz umfassender Forschung ist der Abbau noch nicht vollständig verstanden. Während der alkalischen Vorbehandlung laufen zahlreiche komplexe Reaktionen ab, welche z. B. von Ramirez et al. und Li et al. genauer erklärt werden. Durch Spaltung der Etherbindungen im Ligninkomplex können verschiedene Abbauprodukte entstehen. Des Weiteren können unter alkalischen Bedingungen Esterbindungen zwischen den Polysacchariden und dem Lignin am effektivsten aufgebrochen werden. Während des Abbaus der Ligninstruktur entstehen reaktive Zwischenprodukte, wodurch es zu unerwünschten Kondensationsreaktionen kommen kann. An dieser Stelle soll auf die einzelnen Reaktionen nicht weiter eingegangen werden. [53, 55]

Wie oben erwähnt ist Lignin hydrophob, weshalb das Aufquellen der Lignocellulosefasern verhindert wird. Durch Entfernung des Lignins während der Vorbehandlung können die Fasern aufquellen. Dies führt zu einer Vergrößerung der inneren Oberfläche sowie des mittleren Porenvolumens, womit die Enzymverfügbarkeit verbessert wird. [53] Des Weiteren haben die

Kationen der Base Einfluss auf das Quellvermögen der Cellulosefasern. Dies ist in der unterschiedlichen Hydratation der Metallionen begründet. Je größer die Hydrathülle der Metallionen ist, desto stärker können die Fasern aufquellen. Die Größe der Hydrathülle ist dabei vom Radius sowie der Ladung der Ionen abhängig. Je größer der Ionenradius ist, desto kleiner wird bei gleicher Ladung die Hydrathülle. Bei ähnlichem Ionenradius nimmt die Anzahl der Wassermoleküle in der Hydrathülle mit steigender Ladung zu (siehe Tabelle 12). [25, 56]

Tabelle 3: Ausgewählte Metallionen mit deren Anzahl an Wassermolekülen in der Hydrathülle

Metallion	Anzahl an Wassermolekülen in der Hydrathülle
Natriumionen (Na ⁺)	8
Kaliumionen (K ⁺)	4
Magnesiumionen (Mg ²⁺)	14
Calciumionen (Ca ²⁺)	10 – 12

Je nach Reaktionsbedingungen und Art der Biomasse können auch Cellulose und Hemicellulose mehr oder weniger abgebaut werden, wodurch die Zuckerausbeute abnimmt. Besonders groß sind die Verluste unter anderem bei Xylan. Der Abbau der Polysaccharide beginnt am reduzierenden Ende. Durch den Abbau von Xylan wird vor allem Xyloisosaccharinsäure und 2-Hydroxybuttersäure gebildet. Glucane werden vor allem zu Glucoisosaccharinsäure und 2,5-Dihydroxyvaleriansäure abgebaut. Des Weiteren können Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Dicarbonsäuren entstehen. Außerdem ist unter den meisten alkalischen Bedingungen eine effektive Entfernung der Acetylgruppen aus den Xylanpolymeren möglich. Die Bildung der Säuren führt zu Neutralisationsreaktionen, was vor allem bei Aufschlüssen mit geringer Alkalität zu beachten ist. [53]

Untersuchungen von Wilkinson et al. zeigten, dass Natriumhydroxid sehr gut geeignet ist, um Biertreber für eine enzymatische Verzuckerung vorzubereiten. Sie erreichten nach enzymatischer Verzuckerung der festen Bestandteile des Aufschlusses eine Glucoseausbeute von über 90 % bezogen auf die im festen Rückstand enthaltene Glucose. Für den Aufschluss wurden eine moderate Temperatur von gerade einmal 50 °C, eine Natriumhydroxidkonzentration von 5 % (w/v) sowie eine Aufschlussdauer von 12 h genutzt. Des Weiteren zeigten sie, dass mit zunehmendem Gehalt an Biertreber während der Vorbehandlung die Effektivität der Vorbehandlung sinkt. Durch Reduktion der Natriumhydroxidkonzentration von 5 auf 1 % (w/v) kam es zu einer drastischen Abnahme der Ausbeute. Die Aufschlusszeit hingegen hatte nur geringfügigen Einfluss auf die erreichten Ausbeuten. Die beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 14 gezeigt. [57]

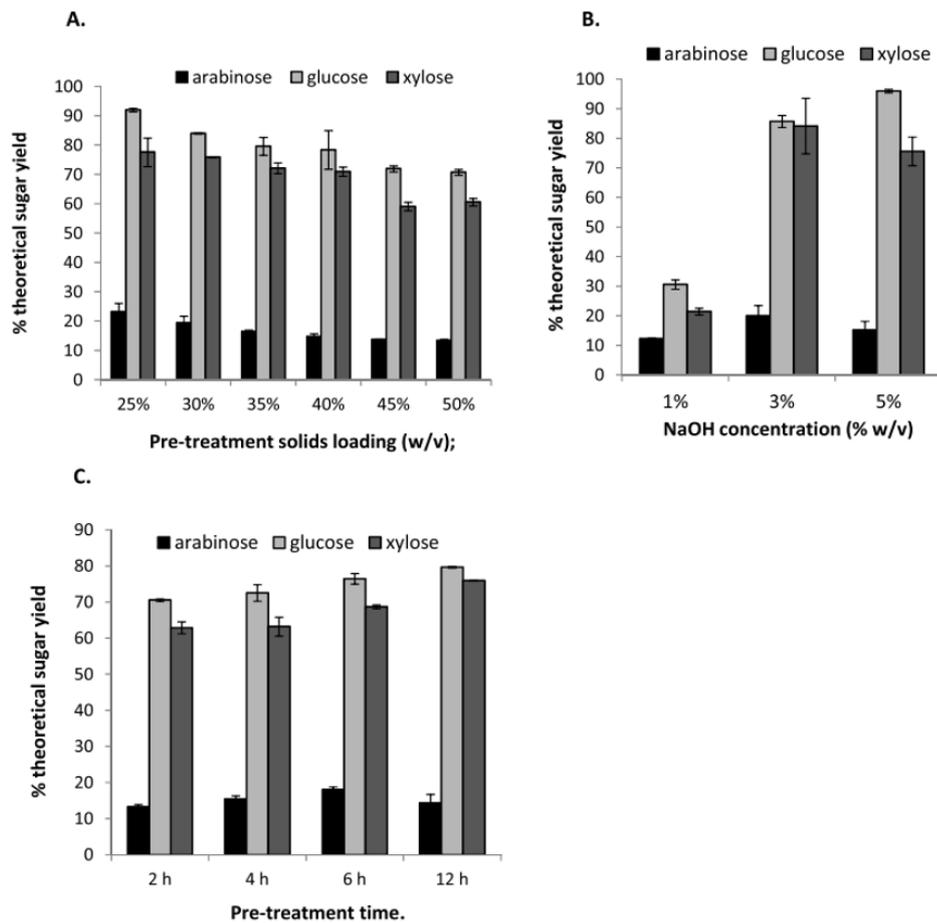


Abbildung 14: Zuckerausbeuten verschiedener Biertreberückstände nach Vorbehandlung mit verdünnter Natronlauge sowie anschließender enzymatischer Verzuckerung unter folgenden Vorbehandlungsbedingungen: (A) 5 % (w/v) NaOH für 12 h bei 50 °C und Variation der Feststoffbeladung; (B) 12 h bei 50 °C, einer Feststoffbeladung von 25 % (w/v) und Variation der NaOH-Konzentration; (C) 5 % (w/v) NaOH bei 50 °C, einer Feststoffbeladung von 30 % (w/v) und Variation der Versuchsdauer [57]

Organosolv-Verfahren

Bei diesen Verfahren werden organische Lösungsmittel zum Aufschluss der Biomasse eingesetzt. Häufige Lösungsmittel sind dabei Ethanol, Methanol, Aceton, Ethylenglycol und Triethylenglycol. Typische Konzentrationen der Lösungsmittel liegen zwischen 25 und 75 % (v/v). Die Aufschlusstemperatur und Verweilzeit variieren in der Regel zwischen 155 und 205 °C sowie 30 und 90 min. [18] Von besonderem Interesse ist die Nutzung von Ethanol als Lösungsmittel, da es eine geringe Toxizität aufweist. Des Weiteren kann auf zusätzliche Lösungsmittel im Gesamtprozess verzichtet werden. Ebenfalls wäre ein Recycling innerhalb des Prozesses mit etablierter Technik vergleichsweise einfach zu realisieren.

Während des Aufschlusses kommt es durch die Autohydrolyse des Wassers zum Abbau der Hemicellulose, wie im Abschnitt zur hydrothermalen Vorbehandlung beschrieben wurde. Durch Zugabe der Lösungsmittel kann zusätzlich Lignin in Lösung überführt werden. Zur Verbesserung der Hydrolyse von Hemicellulose kann als Katalysator z. B. Säure genutzt

werden. Häufig wird dafür Schwefelsäure in Konzentrationen von 0,8 – 1,7 % (w/w) zugegeben. Nach der Vorbehandlung kann der cellulosereiche Feststoff von der Flüssigkeit abgetrennt werden. In einer nachgeschalteten enzymatischen Verzuckerung kann anschließend die Cellulose in Glucose überführt werden. In der Flüssigphase kann durch Zugabe von Wasser die Löslichkeit des Lignins reduziert werden, wodurch es zur Ausfällung kommt. Die Oligomere und Monomere der Hemicellulosezucker verbleiben dabei in der verdünnten Lösung. Das Lignin kann durch eine erneute Fest-Flüssig-Trennung gewonnen und als Rohstoff in der chemischen Industrie eingesetzt werden. [18]

Parchami et al. untersuchten den Aufschluss von Biertreber bei einer Ethanolkonzentration von 50 % (v/v) im Vergleich zu 0 % (v/v) bei verschiedenen Temperaturen (120 °C, 140 °C, 180 °C) sowie Verweilzeiten (10 min, 30 min, 60 min und 120 min). Sie vermuten, dass die Ligninentfernung maßgeblich durch die Entfernung der Hemicellulose beeinflusst wird. Dies ist darin begründet, dass die Bindungen zwischen Lignin und Hemicellulose eine Barriere für den Ligninabbau darstellen. Durch Erhöhung der Ethanolkonzentration kommt es zu einer Abnahme der Hydroniumionenkonzentration, da die Säuredissoziationskonstante von Ethanol deutlich kleiner als die von Wasser ist. Infolge der Reduktion der Hydroniumionen in der Flüssigkeit sinkt der Abbau der Hemicellulose, da die Konzentration des Katalysators geringer ist. Gleichzeitig verbessert die Anwesenheit des Ethanols die Löslichkeit des Lignins und senkt die Wahrscheinlichkeit der unerwünschten Ligninkondensation, weshalb eine Optimierung der Versuchsbedingungen notwendig ist. Bei den von Parchami et al. durchgeführten Versuchen wurde das beste Ergebnis bei 180 °C, 120 min und 50 % (v/v) Ethanol erreicht. Unter diesen Bedingungen wurde eine Ligninreinheit von 95 % sowie eine Ausbeute von 58 % erreicht. Die Celluloseausbeute betrug 60 % mit einer Reinheit von 39 %. Die Ausbeuten sind auf die Mengen in unbehandeltem Biertreber bezogen. [58]

3 Zielstellung

An der Optimierung der Lignocelluloseaufschlüsse wird seit vielen Jahren geforscht, sodass auf eine gute Datenlage zurückgegriffen werden konnte. Auch zu Aufschlussverfahren von Biertreber gibt es einige Veröffentlichungen. Dennoch ist es noch nicht gelungen die Biertreberaufschlüsse so weit zu optimieren, dass sie in den industriellen Maßstab überführt werden können. Da Biertreber jedoch jährlich in großen Mengen als Reststoff in der Bierherstellung anfällt, stellt dieser ein großes Potenzial z. B. als Rohstoff für die Erzeugung alternativer Kraftstoffe dar.

Ziel ist im Rahmen der Masterarbeit einen wichtigen Beitrag für die technische Nutzung von Biertreber zu leisten. Eine Herausforderung stellt die gezielte Freisetzung der Monosaccharide, aus denen die Cellulose und Hemicellulose aufgebaut ist, dar. Deshalb liegt der Fokus dieser Masterarbeit vor allem auf der Vorbehandlung für eine enzymatische Verzuckerung. Nachdem die Monosaccharide in Lösung überführt wurden, gibt es verschiedene Möglichkeiten der Nutzung. Eine Variante ist die Herstellung von Bioethanol, welche auch im Rahmen der Arbeit als Endprodukt angestrebt wird.

Nach einer ausführlichen Recherche sollen die in der Literatur gefundenen Tendenzen zur Optimierung der Biertreberaufschlüsse unter gewissen Rahmenbedingungen weiter untersucht werden. Eine technische Rahmenbedingung ist dabei, dass alle Versuche unter Atmosphärendruck durchgeführt werden sollen. Dies bedeutet, dass die maximal mögliche Temperatur für die Aufschlüsse ca. 100 °C beträgt, unter der Voraussetzung, dass verdünnte wässrige Lösungen zum Aufschluss des Biertreibers genutzt werden. Ziel dieser Vorgabe ist ein Verfahren zu finden, welches möglichst energiesparend arbeitet sowie ohne Druckreaktoren auskommt, da korrosionsbeständige und druckstabile Reaktoren teuer sind. Des Weiteren geht von ihnen ein erhöhtes Gefährdungspotenzial aus. Außerdem sollen möglichst günstige Chemikalien in geringen Mengen eingesetzt werden.

Idealerweise sollen die Aufschlüsse unter möglichst milden Bedingungen ablaufen, um den Abbau der Monosaccharide auf ein Minimum zu begrenzen. Gleichzeitig sollen hohe Zuckerausbeuten nach der enzymatischen Verzuckerung erreicht werden, damit in einer nachgeschalteten Fermentation möglichst hohe Ethanolkonzentrationen erzielt werden können. Hierfür soll ein geeignetes Versuchsprogramm zur Variation des Biertreberaufschlusses auf Basis der statistischen Versuchsplanung konzipiert, durchgeführt und analytisch bewertet werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Biertreber

Der verwendete Biertreber wurde von einem Projektpartner zur Verfügung gestellt. Für die Lagerung wurden repräsentative Teilmengen der Probe in Gefrierbeutel abgefüllt und im Gefrierschrank bei -30 °C bis zur Nutzung gelagert. Pro Beutel wurde rund 1 kg Biertreber abgefüllt, was für die Versuche einer Woche ausreichte. Für die Versuche wurde der Biertreber aufgetaut und anschließend bis zu den jeweiligen Aufschlüssen im Kühlschrank bei +5 °C gelagert. Für die Bestimmung der Zusammensetzung wurde der Biertreber in einem externen Analyselabor untersucht. Die Ergebnisse sowie die Messunsicherheiten sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des unbehandelten Biertreibers

Parameter	Gehalt
Trockensubstanzgehalt [%]	20,6
Cellulose [% TS]	20,4 ± 5,4
Hemicellulose [% TS]	37,7 ± 9,8
Säureunlösliches Lignin [% TS]	9,5 ± 2,4
Asche [% TS]	4,5 ± 0,2
Protein [% TS]	24,2 ± 1,5
Fett [% TS]	11,0 ± 1,9
Stärke [% TS]	4,8 ± 0,2
Zucker [% TS]	0,9 ± 0,1

4.1.2 Verwendete Chemikalien

Als Base wurde handelsübliche 50 % (w/w) reinst Natronlauge der Firma CARL ROTH verwendet. Zum Anheben des pH-Werts im Rahmen der pH-Wert-Einstellung kam die Natronlauge unverdünnt zum Einsatz. Für die alkalischen Aufschlüsse wurde die Natronlauge stark verdünnt. Die jeweiligen Verdünnungen wurden vor dem ersten Aufschluss selbst hergestellt und in Glasflaschen zwischengelagert. Als Säure wurde Schwefelsäure 96 % (w/w) für Analysen von PanReac AppliChem ITW Reagents genutzt. Für die Senkung des pH-Werts im Rahmen der pH-Wert-Einstellung wurde die Schwefelsäure um ca. Faktor 3 in einem Maßkolben selbst verdünnt. Dies führte zu einer Konzentration der verdünnten Schwefelsäure von ca. 6 mol/l. Damit bei allen Versuchen einheitliche Bedingungen vorlagen, wurde die

Verdünnung zur pH-Wert-Einstellung im Voraus für alle Neutralisationen hergestellt. Zu beachten war bei der Verdünnung eine starke Wärmeentwicklung, sodass die Herstellung einige Zeit in Anspruch nahm. Für die sauren Aufschlüsse wurde analog zu den alkalischen Aufschlüssen vorgegangen. In Tabelle 5 sind die wichtigsten Angaben zu den Chemikalien für die Versuche angegeben.

Tabelle 5: Überblick über die wichtigsten Angaben zur Natronlauge und Schwefelsäure

	Natronlauge [59]	Schwefelsäure [60, 61]
Konzentration [% (w/w)]	49,91	95,8
Molare Masse [g/mol]	40,01	98,08
Dichte bei 20 °C [g/cm ³]	1,52	1,84

Für die enzymatische Verzuckerung wurde eine Mischung aus zwei Enzympräparaten eingesetzt. Das erste Enzympräparat wird von der Firma Biogas-Additive.de GmbH unter dem Handelsnamen ZYmaXX® 4U MIX 1.x vertrieben. Dabei handelt es sich um eine kommerziell verfügbare Enzymmischung zur Optimierung der Biogasausbeute aus faserhaltigen Substraten. In der Enzymmischung sind unter anderem Cellulasen, Amylasen, Glucanasen und Xylanasen enthalten. Die zweite Enzymzubereitung ist von der Firma Biopract GmbH. Auch in dieser Enzymmischung sind Cellulasen, Xylanasen und Glucanasen enthalten. Die Firma Biopract ist auf die Anwendung von Enzympräparaten in der Landwirtschaft und in industriellen Anwendungen spezialisiert. Für die Ethanolfermentation wurde handelsübliche Trockenbackhefe von RUF Lebensmittelwerk KG verwendet.

4.2 Festlegung der Versuchsbedingungen

Für die Bearbeitung der Fragestellung wurde zuerst eine ausführliche Literaturrecherche durchgeführt. Die wichtigsten Erkenntnisse können in Kapitel 2 nachgelesen werden. Durch die in Kapitel 3 beschriebenen Rahmenbedingungen wurde die Auswahl der möglichen Verfahren stark eingegrenzt. Für die meisten Aufschlussverfahren werden deutlich höhere Drücke als Atmosphärendruck benötigt, da nur so die gewünschten Temperaturen erreicht werden können (siehe Kapitel 2.4.2). Auch bei den sauren Aufschlüssen geht der Trend eher zu Temperaturen oberhalb von 100 °C, wofür Druckreaktoren notwendig sind.

Dennoch wird im festgelegten Rahmen großes Potenzial von sauren und alkalischen Aufschlüssen anhand der Ergebnisse in der Literatur erwartet. Aus diesem Grund wurden beide Verfahren im Rahmen der Masterarbeit genauer untersucht. Ein rein biologischer Aufschluss mit Pilzen wurde aufgrund der in Kapitel 2.4.2 beschriebenen Nachteile nicht weiterverfolgt.

Die Zuckerausbeuten sowie die erreichten Zuckerkonzentrationen nach Aufschluss der Lignocellulose mit anschließender enzymatischer Verzuckerung sind von zahlreichen Faktoren

abhängig. Die Zuckerfreisetzung kann dabei maßgeblich durch die enzymatische Verzuckerung selbst beeinflusst werden. Wichtige Einflussgrößen sind die verwendete Enzymmischung sowie die Bedingungen während der Verzuckerung (z. B. Temperatur, pH-Wert, Zeit, Rührgeschwindigkeit). Auf diese Punkte soll jedoch im Rahmen der Arbeit nicht eingegangen werden. Die Verzuckerung wurde als standardisiertes Verfahren vorgegeben und für alle Versuche gleich angewendet.

Des Weiteren wird die enzymatische Verzuckerung entscheidend durch den Erfolg der Aufschlüsse beeinflusst, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben ist. Besonders großer Einfluss wird anhand der Literatur von den folgenden Parametern erwartet:

- Temperatur
- Wahl der Säure bzw. Base sowie deren Konzentration
- Verweilzeit
- Feststoffbeladung

Für die Optimierung wurde ausschließlich der Einfluss der Temperatur, Verweilzeit sowie Konzentration untersucht. Auf Grundlage der Literaturrecherche sowie eigener Vorversuche wurden die in Tabelle 6 aufgelisteten Bereiche für die genauere Untersuchung der Biertreberaufschlüsse ausgewählt.

Tabelle 6: Experimentell zu untersuchender Bereich der Temperatur, Verweilzeit und Konzentration für die alkalischen bzw. sauren Aufschlüsse

	alkalischer Aufschluss	saurer Aufschluss
Temperatur [°C]	45 – 95	65 – 95
Verweilzeit [min]	60 – 180	60 – 180
Konzentration (NaOH bzw. H ₂ SO ₄) [% (w/v)]	1 – 5	2,5 – 5,5

Der Einfluss verschiedener Säuren bzw. Basen wurde nicht untersucht. Für alle sauren Aufschlüsse wurde verdünnte Schwefelsäure verwendet. In den alkalischen Aufschlüssen kam ausschließlich verdünnte Natronlauge zum Einsatz. Für die Versuche wurden jeweils 500 ml der entsprechenden Lösung dem frischen Biertreber zugegeben. Der Gehalt an Feststoff war innerhalb einer Versuchsreihe konstant. Die zugegebene Menge an Biertreber wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit auf die Trockensubstanz bezogen.

Für die Aufschlüsse mit verdünnter Natronlauge zeigten die Vorversuche, dass der Feststoffgehalt an Biertreber im Ansatz maximal 45 g bezogen auf die Trockensubstanz betragen darf. Bei weiterer Erhöhung konnte zu Beginn der Versuche aus technischen Gründen keine ausreichende Durchmischung gewährleistet werden. In den anschließenden Aufschlüssen mit verdünnter Schwefelsäure musste die Menge an Feststoff reduziert werden,

da eine derartige Feststoffbeladung zu einer mangelhaften Durchmischung zu Beginn der Versuche führte. Aus diesem Grund wurde der Feststoffgehalt für die sauren Aufschlüsse auf 40 g Trockensubstanz reduziert. Die für die Versuche tatsächlich eingewogenen Mengen an frischem Biertreber wurden vor jedem Versuch explizit nach der Messung der aktuellen Trockensubstanz des Biertreibers berechnet. Durchschnittlich wurden für die alkalischen Aufschlüsse rund 215 g und für die sauren Aufschlüsse rund 190 g frischer Biertreber eingewogen. Dies entspricht einem Verhältnis von frischem Biertreber zu Flüssigkeit während der alkalischen Aufschlüsse von ca. 1:2,3 bzw. während der sauren Aufschlüsse von ca. 1:2,6. Daraus ergibt sich ein Trockensubstanzgehalt (TS) in den alkalischen Aufschlüssen von ungefähr 6,3 % und in den sauren Aufschlüssen von ungefähr 5,8 %.

4.3 Versuchsplanung sowie Vorgehen bei der Auswertung des statistischen Versuchsplans

Für die Untersuchung der Wirkung der drei Einflussgrößen auf die Aufschlüsse wurde ein statistischer Versuchsplan verwendet. Der Vorteil der statistischen Versuchsplanung im Vergleich zur schrittweisen Untersuchung (One-factor-at-a-time), bei der jeweils die Einflussgrößen einzeln durch Veränderung untersucht werden, besteht darin, dass zur Bestimmung der Effekte immer alle Versuchspunkte genutzt werden können. Durch die Mehrfachnutzung der Versuchspunkte bei der Auswertung kann bei gleicher Genauigkeit die Anzahl der Versuche deutlich reduziert werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass durch die gezielte Verteilung der Messpunkte im Versuchsraum sowie durch die statistische Auswertung eine rechnerische Prognose über die Ergebnisse aller im Versuchsraum denkbaren Kombinationen der Einflussgrößen mit Hilfe einer empirischen Modellgleichung möglich ist. Für die Bestimmung eines Maximums oder Minimums werden in der Regel quadratische Modelle zur empirischen Beschreibung genutzt. Damit dies möglich ist, sind die Einflussgrößen, welche in der statistischen Versuchsplanung Faktoren heißen, bei mindestens drei verschiedenen Werten, den Faktorstufen, zu untersuchen. Auf Grundlage dessen können die optimalen Versuchsbedingungen gezielt bestimmt werden. Bei der Untersuchung durch One-factor-at-a-time ist eine derartige Prognose nicht möglich, wodurch das Optimum leicht verfehlt werden kann. Des Weiteren stehen bei einem statistischen Versuchsplan vor Beginn der Versuche alle notwendigen Versuchspunkte für die Auswertung fest, weshalb die Zeitplanung im Vergleich zu einer schrittweisen Untersuchung, bei der immer wieder neue Punkte dazukommen können, erleichtert wird. [62]

In der Literatur werden für derartige Fragestellungen wie in dieser Masterarbeit zentral zusammengesetzte Versuchspläne empfohlen. Für Versuchspläne mit drei Faktoren kann der Versuchsraum dreidimensional dargestellt werden. Abbildung 15 zeigt die Anordnung der

Einzelversuche für einen vollständigen faktoriellen Versuchsplan („Würfel“), dem ein „Stern“ und ein „Zentrum“ hinzugefügt wurden. Jeder Punkt entspricht einem Versuch. Durch die Lage im Raum werden die verschiedenen Versuchsbedingungen dargestellt. [62]

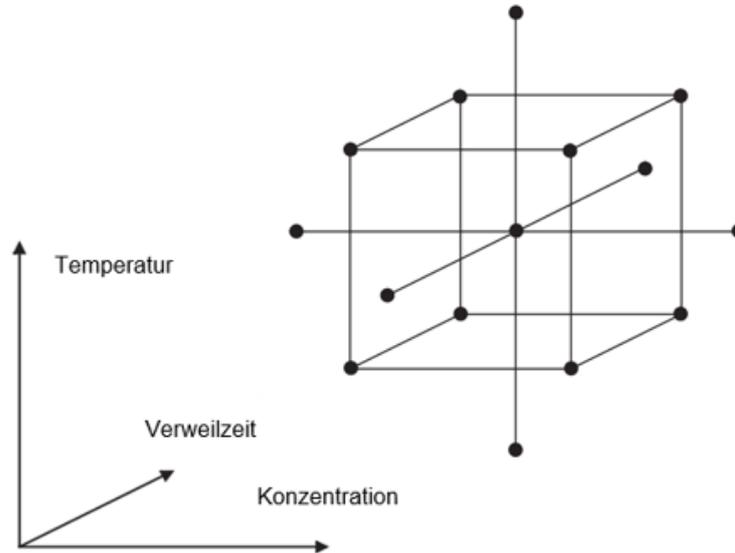


Abbildung 15: Darstellung des zentral zusammengesetzten Versuchsplans für 3 Faktoren. Die Lage der Punkt im Raum zeigt dabei die verschiedenen Versuchsbedingungen der jeweiligen Versuche [62]

Aus mathematischer Sicht sollten für die statistische Auswertung die Versuchspunkte des „Sterns“ nicht direkt auf den Flächen des Würfels liegen. Die genaue Lage der Versuchspunkte ist für jeden Versuchsplan in Abhängigkeit der Anzahl der Versuche zu berechnen. Eine derartig genaue Einstellung der Versuchsbedingungen war jedoch aus technischen Gründen schwer zu realisieren, weshalb ein flächenzentrierter Versuchsplan, wie in Abbildung 16 gezeigt, genutzt wurde. Durch die Positionierung der Punkte des „Sterns“ in den Flächen des Würfels ist darauf zu achten, dass es zur Korrelation der quadratischen Effekte kommt. [62]

Für die statistische Auswertung werden nicht die realen Werte der Faktorstufen verwendet, sondern die normierten Werte. Dafür werden die Grenzen des zu untersuchenden Bereichs der Faktoren auf 1 (obere Grenze) und -1 (untere Grenze) normiert. Die zusätzlichen Stufen können anschließend linear daraus berechnet werden. In Abbildung 16 ist die Verteilung der normierten Versuchspunkte für den flächenzentrierten Versuchsplan grafisch dargestellt.

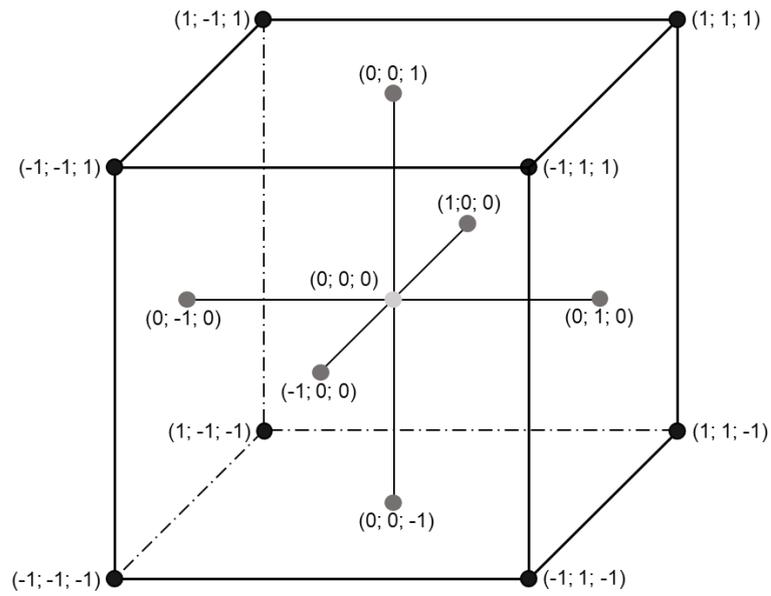


Abbildung 16: flächenzentrierter Versuchsplan mit normierten Versuchspunkten

In Tabelle 7 und Tabelle 8 sind die aus der Versuchsplanung resultierenden Versuchspunkte der alkalischen und sauren Versuchsreihe aufgelistet. Der zentrale Versuchspunkt $(0; 0; 0)$ wurde in beiden Versuchsreihen drei Mal realisiert (zu Beginn, in der Mitte und am Ende). Daraus ergibt sich eine Gesamtanzahl von je 17 Versuchen für die alkalischen sowie sauren Aufschlüsse.

Tabelle 7: Versuchsplan der Aufschlüsse mit verdünnter Natronlauge (Spalte 1 systematische Reihenfolge der Versuche, Spalte 2 randomisierte Reihenfolge (Reihenfolge, in der die Versuche durchgeführt wurden), Spalte 3 – 5 normierte Versuchswerte, Spalte 6 – 8 reale Versuchswerte)

Nr.	Reihenfolge	normierte Werte			reale Werte		
		Zeit	Konzentration	Temperatur	Zeit [min]	Konzentration [% (w/v)]	Temperatur [°C]
1	1	-1	-1	-1	60	1	45
2	14	1	-1	-1	180	1	45
3	15	0	0	-1	120	3	45
4	8	-1	1	-1	60	5	45
5	4	1	1	-1	180	5	45
6	10	0	-1	0	120	1	70
7	5	-1	0	0	60	3	70
8	2	0	0	0	120	3	70
9	7	0	0	0	120	3	70
10	17	0	0	0	120	3	70
11	9	1	0	0	180	3	70
12	16	0	1	0	120	5	70
13	12	-1	-1	1	60	1	95
14	6	1	-1	1	180	1	95
15	3	0	0	1	120	3	95
16	13	-1	1	1	60	5	95
17	11	1	1	1	180	5	95

Tabelle 8: Versuchsplan der Aufschlüsse mit verdünnter Schwefelsäure (Spalte 1 systematische Reihenfolge der Versuche, Spalte 2 randomisierte Reihenfolge (Reihenfolge, in der die Versuche durchgeführt wurden), Spalte 3 – 5 normierte Versuchswerte, Spalte 6 – 8 reale Versuchswerte)

Nr.	Reihenfolge	normierte Werte			reale Werte		
		Zeit	Konzentration	Temperatur	Zeit [min]	Konzentration [% (w/v)]	Temperatur [°C]
1	16	-1	-1	-1	60	2,5	65
2	6	1	-1	-1	180	2,5	65
3	13	0	0	-1	120	4	65
4	4	-1	1	-1	60	5,5	65
5	11	1	1	-1	180	5,5	65
6	3	0	-1	0	120	2,5	80
7	12	-1	0	0	60	4	80
8	1	0	0	0	120	4	80
9	9	0	0	0	120	4	80
10	17	0	0	0	120	4	80
11	7	1	0	0	180	4	80
12	15	0	1	0	120	5,5	80
13	8	-1	-1	1	60	2,5	95
14	14	1	-1	1	180	2,5	95
15	5	0	0	1	120	4	95
16	10	-1	1	1	60	5,5	95
17	2	1	1	1	180	5,5	95

Zur weitestgehenden Vermeidung einer Verfälschung des empirischen Modells durch eine systematische Abweichung der Ergebnisse wurden die Versuche in zufälliger Reihenfolge (randomisiert) durchgeführt [62]. Auf das Vorgehen zur Beurteilung der Messunsicherheit wird in Kapitel 5 genauer eingegangen.

Im Rahmen der Auswertung des statistischen Versuchsplans werden die Koeffizienten (a_{ij}) der empirischen Modellgleichung (Gleichung (4)) durch die Software Statistica so angepasst, dass die Summe der quadratischen Abweichungen zwischen den Ergebnissen der Versuche und den berechneten Modellwerten (Y_i) möglichst klein ist. Die Variablen X_1 , X_2 und X_3 in Gleichung (4) stehen für die normierte Temperatur, Verweilzeit sowie Konzentration. Mit dem empirischen Modell können lineare, quadratische und Zwei-Faktor-Wechselwirkungen untersucht werden. [62]

$$\begin{aligned}
 Y_i = & a_0 + a_1 \cdot X_{1i} + a_2 \cdot X_{2i} + a_3 \cdot X_{3i} + a_{12} \cdot X_{1i} \cdot X_{2i} + a_{13} \cdot X_{1i} \cdot X_{3i} + a_{23} \cdot X_{2i} \cdot X_{3i} \\
 & + a_{11} \cdot X_{1i}^2 + a_{22} \cdot X_{2i}^2 + a_{33} \cdot X_{3i}^2
 \end{aligned}
 \tag{4}$$

Nach der Anpassung der Modellgleichung an die realen Ergebnisse muss die Signifikanz der Koeffizienten überprüft werden. Sind sie nicht signifikant, werden sie schrittweise aus dem Modell entfernt. Nach Entfernung eines Parameters wird die neue Modellgleichung erneut durch die Software an die realen Ergebnisse angepasst. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis alle Koeffizienten im Modell signifikant sind.

Für die Auswertung werden die Koeffizienten so umgerechnet, dass die realen Werte für die Temperatur T (in °C), Konzentration c (in % (w/v)) sowie Zeit t (in min) in die angepasste Modellgleichung eingesetzt werden können (Gleichung (5)). Im Rahmen der Arbeit werden ausschließlich die signifikanten Koeffizienten für Gleichung (5) angegeben. Alle anderen Koeffizienten bekommen den Wert Null, da diese Terme keinen Einfluss auf den Modellwert haben. [62]

$$Y_i = A_0 + A_T \cdot T_i + A_t \cdot t_i + A_c \cdot c_i + A_{T,t} \cdot T_i \cdot t_i + A_{T,c} \cdot T_i \cdot c_i + A_{t,c} \cdot t_i \cdot c_i + A_{T^2} \cdot T_i^2 + A_{t^2} \cdot t_i^2 + A_{c^2} \cdot c_i^2 \quad (5)$$

4.4 Aufbau des Versuchsstands sowie Ablauf der Biertreberaufschlüsse

Als Erstes wurde der aufgetaute Biertreber in einem 1-Liter-Becherglas grob eingewogen und homogenisiert. Für die Bestimmung aller Einwaagen im Rahmen der Arbeit wurde dieselbe Laborwaage Sartorius LA 3200 D mit einer Messunsicherheit von ca. $\pm 0,02$ g verwendet. Anschließend wurden 3 – 5 g Biertreber für die Bestimmung des Trockensubstanzgehalts entnommen. Für die Bestimmung wurde das Feuchtemessgerät MA 40 von Sartorius verwendet. Die Messunsicherheit der Trockensubstanz des Biertrebers beträgt dabei $\pm 0,6$ %. Damit während der Bestimmung des Trockensubstanzgehalts der Biertreber im Becherglas nicht austrocknet, wurde dieser mit Alufolie abgedeckt. Mit Hilfe des Trockensubstanzgehalts konnte die benötigte Masse an frischem Biertreber berechnet und genau eingewogen werden. Ziel war, dass in jedem Versuchsansatz möglichst gleich viel Biertreber-Trockensubstanz enthalten war. Im Anschluss wurden 500 ml der entsprechenden verdünnten Aufschlusschemikalie in einem 500-ml- Messzylinder der Firma Hirschmann Laborgeräte der Klasse B ($\pm 3,8$ ml IN bei 20 °C) abgemessen und dem Biertreber zugegeben. Damit die Abweichung durch zurückgebliebene Lösung im Messzylinder immer ca. gleich groß war, wurde bei allen Versuchen identisch vorgegangen sowie derselbe Messzylinder verwendet. Es ist darauf hinzuweisen, dass Messzylinder auf Einguss (IN) justiert sind und somit die zugegebene Menge etwas geringer als 500 ml war. Für die Berechnungen im Rahmen der Arbeit wurde trotzdem mit 500 ml gerechnet, da der Fehler als vernachlässigbar gering eingestuft wurde.

Vor Beginn der Versuchsreihe wurde die jeweils benötigte Menge an verdünnten Aufschlusschemikalien für alle Versuche hergestellt, womit konstante Konzentrationsunterschiede für die gesamte Versuchsreihe gewährleistet waren. Für die Herstellung wurde die Natronlauge bzw. die Schwefelsäure auf der Laborwaage in einem 1000-ml- bzw. 2000-ml-Messkolben aus Glas eingewogen und dieser anschließend bis zur Markierung mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Der verwendete 1000-ml-Messkolben der Klasse A von Schott hatte eine Genauigkeit von $\pm 0,400$ ml (IN) bei 20 °C. Der 2000-ml-Messkolben von Schott der Genauigkeitsklasse A wird mit einer Messunsicherheit von $\pm 0,600$ ml (IN) bei 20 °C angegeben.

Nach Zugabe der Aufschlusschemikalie zum eingewogenen Biertreber wurde die Gesamtmasse bestimmt. Anschließend konnte der Versuchsaufbau eingerichtet und der Versuch gestartet werden. Abbildung 17 zeigt den Aufbau des Versuchsstands für die alkalischen und sauren Aufschlüsse. Für die Versuche wurde der Biertreber mit der stark verdünnten Natronlauge bzw. Schwefelsäure in einem Becherglas auf der C-MAG HS 7 Heizplatte von IKA auf die gewünschte Temperatur erwärmt. Zur Vermeidung von Verbrennungen des Biertrebers am Boden des Becherglases wurde die Maximaltemperatur der Heizplatte auf 315 °C begrenzt. Die Einstellung der Zieltemperatur sowie die Messung und Regelung erfolgte durch das elektronische Kontaktthermometer VT-5 von VWR (mit PT-1000-Temperaturfühler).



Abbildung 17: Versuchsaufbau für die alkalischen und sauren Aufschlüsse

Im nachfolgenden Diagramm (siehe Abbildung 18) ist exemplarisch das Aufheizverhalten eines Vorversuchs gezeigt. Durch die automatische Temperaturregelung wiesen alle Versuche ein ähnliches Verhalten auf. Zu Beginn erfolgte eine rasche Erwärmung mit anschließend vorsichtiger Annäherung an die Zieltemperatur. Infolgedessen konnte ein geringes Überschwingen nach Erreichen der Zieltemperatur gewährleistet werden. Für die vorsichtige Annäherung wurde einige Zeit benötigt. Die vorgegebene Versuchszeit wurde deswegen nach erstmaligem Erreichen der Zieltemperatur abzüglich 1 °C gestartet. Durch den vorzeitigen Start der Versuchszeit sowie durch das leichte Überschwingen nach Erreichen der Zieltemperatur ergaben sich zu Beginn der Versuche Temperaturschwankungen von ± 1 °C. Nach der Einlaufphase wurde die Temperatur bei $\pm 0,1$ °C stabil eingestellt, was dem Großteil der Versuchszeit entsprach. Für die alkalischen Aufschlüsse ergaben sich je nach Zieltemperatur die folgenden mittleren Aufheizzeiten:

- Für 45 °C rund 18 min
- Für 70 °C rund 24 min
- Für 95 °C rund 36 min

Im Rahmen der sauren Aufschlüsse stellten sich die folgenden mittleren Aufheizzeiten in Abhängigkeit der Temperatur ein:

- Für 65 °C rund 22 min
- Für 80 °C rund 30 min
- Für 95 °C rund 38 min

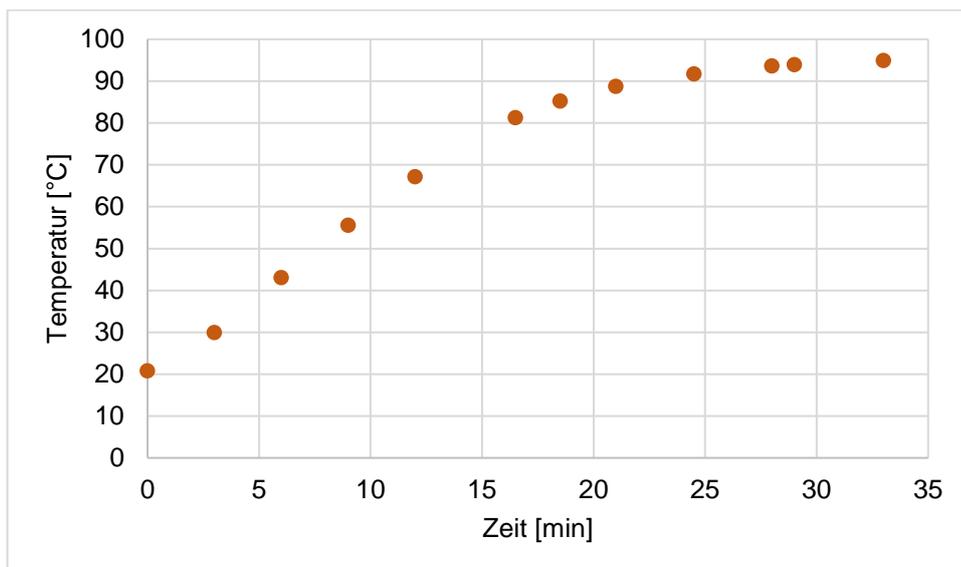


Abbildung 18: Aufheizkurve eines Vorversuchs von 20,8 auf 95 °C

Durch die möglichst hohe Beladung mit Biertreber stellte die Durchmischung eine gewisse Herausforderung dar. Die Kraft der Magnetrührung war viel zu klein, weshalb auf ein Überkopfrührwerk von IKA mit einem speziellen Propellerrührer zurückgegriffen wurde. Zu Beginn der Aufschlüsse wurde eine Drehzahl von ca. 600 1/min eingestellt. Mit steigender Temperatur und Fortschritt der Aufschlüsse verbesserten sich die Eigenschaften der Rührung deutlich. Infolgedessen konnte die Drehzahl schrittweise händig angepasst werden. Nach der Einlaufphase konnte die Drehzahl auf ca. 300 1/min reduziert werden. Zur Minimierung der Verdunstung während der Versuche wurde das Becherglas mit einem Deckel aus Alufolie abgedeckt. Für jeden Versuch wurde ein neuer Deckel angefertigt.

Nach Ablauf der Versuchszeit wurde das Gemisch so schnell wie möglich abgekühlt. Ziel war, dadurch die Versuchszeit möglichst scharf zu begrenzen, damit der Einfluss der Versuchszeit analysiert werden konnte. Für die Kühlung wurde die Heizplatte entfernt und das Becherglas mit Rührung und Temperaturmessung in einen 10-Liter-Eimer gestellt. Zusätzlich wurden zwei gefrorene Kühlakkus in den Eimer gelegt. Anschließend wurden ca. 4 l kaltes Wasser (5 °C) aus dem Kühlschrank zugegeben, sodass der Biertreberaufschluss vollständig von Kühlwasser umgeben war. Das Kühlwasser selbst erwärmte sich nur geringfügig.

Für den Umbau des Versuchsstands wurden im Mittel bei den alkalischen Versuchen ca. 3 min und bei den sauren Versuchen ca. 2,2 min benötigt. Zur Abkühlung der alkalischen Proben auf rund 21 °C wurden je nach Aufschlusstemperatur im Durchschnitt die folgenden Abkühlzeiten benötigt:

- Für 45 °C rund 10 min
- Für 65 °C rund 15 min
- Für 95 °C rund 17 min

Für die Abkühlung der sauren Aufschlüsse auf ebenfalls rund 21 °C haben sich im Mittel je nach Aufschlusstemperatur die folgenden Abkühlzeiten ergeben:

- Für 65 °C rund 12 min
- Für 80 °C rund 14 min
- Für 95 °C rund 16 min

In Abbildung 19 sind die Abkühlkurven von ausgewählten Aufschlussversuchen gezeigt. Durch die rasche Abkühlung vor allem zu Beginn konnte der Einfluss der Aufschlusstemperatur auf die Versuchszeit erfolgreich auf ein Minimum begrenzt werden.

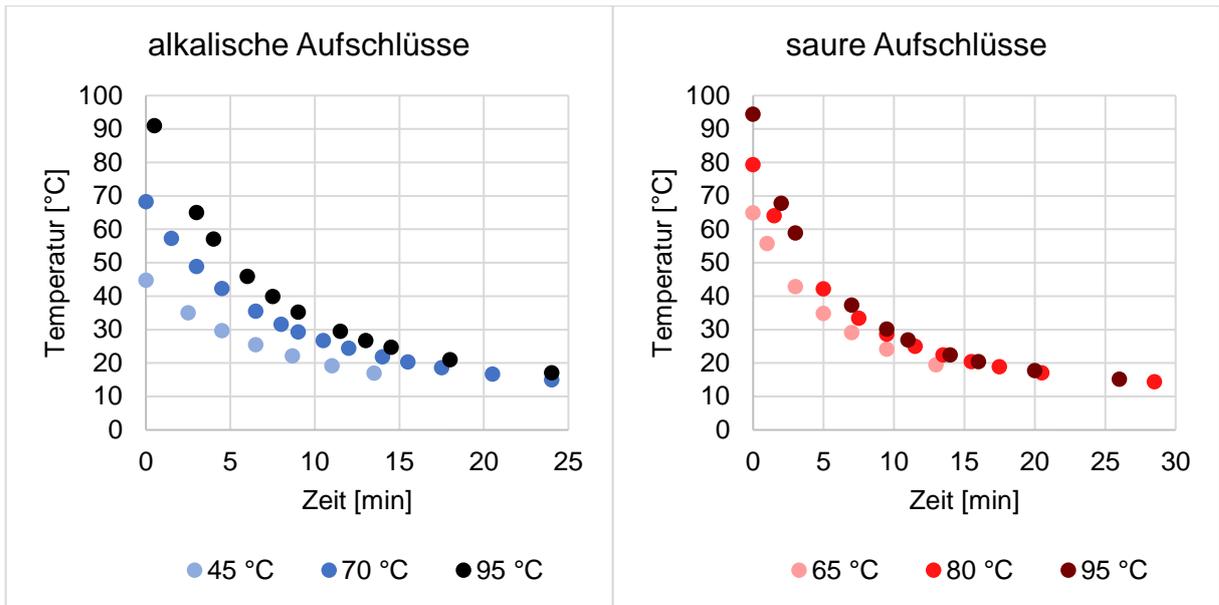


Abbildung 19: Abkühlkurven ausgewählter alkalischer und saurer Aufschlüsse bei den jeweils drei verschiedenen Aufschlusstemperaturen

Nach der Abkühlung wurde die Gesamtmasse zur Bestimmung der verdunsteten Wassermenge gemessen. Anschließend folgten die Messung sowie Einstellung des pH-Werts. Das pH-Meter wurde dafür täglich mit Hilfe zweier Standards überprüft und bei Bedarf neu kalibriert. Als pH-Elektrode wurde die InLab Expert DIN der Firma Mettler Toledo genutzt. Für die alkalischen Versuche wurde der pH-Wert durch Zugabe der selbst hergestellten Schwefelsäureverdünnung (ca. 6 mol/l) auf ca. pH 7 eingestellt. Die sauren Aufschlüsse wurden auf ca. pH 5 durch Zugabe unverdünnter Natronlauge 50 % (w/w) (ca. 19 mol/l) eingestellt, da dieser pH-Wert später für die Enzymverzuckerung genutzt wurde. Nach Einstellung des pH-Werts wurde die Masse erneut bestimmt.

Der Großteil der Probe wurde anschließend in eine 500-ml-Flasche aus PTFE abgefüllt und bis zur Verzuckerung im Gefrierschrank bei -30 °C zwischengelagert. Auch hier wurde die Masse des abgefüllten Biertreberaufschlusses mit der Laborwaage bestimmt. Ein zweiter Teil der Probe wurde in Zentrifugenröhrchen abgefüllt und in der Universal 32 Tischzentrifuge von Hettich bei 9000 1/min für 15 min zentrifugiert. Für die alkalischen Aufschlüsse folgte anschließend eine Druckfiltration mit einem Membranfilter aus Celluloseacetat der Firma LABSOLUTE. Die Porengröße des Filters betrug 0,45 µm. Im nachfolgenden Arbeitsschritt wurde die vorfiltrierte Probe mit einem Spritzenvorsatzfilter von LABSOLUTE aus regenerierter Cellulose mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Danach konnte die Probe mit Hilfe der HPLC vermessen werden. Für die sauren Aufschlüsse wurde bei der Probenvorbereitung für die HPLC analog vorgegangen. Der einzige Unterschied war, dass die Druckfiltration durch eine Vorfiltration mit einem Spritzenvorsatzfilter aus Celluloseacetat von LABSOLUTE ersetzt wurde. Die Porengröße betrug ebenfalls 0,45 µm. Der Rest der Probe wurde in ein Sieb mit

der Maschenweite 1 mm gegeben und mit Leitungswasser gewaschen. Ein Teil der sauberen Fasern wurde anschließend ausgebreitet und fotografiert, um möglicherweise optische Unterschiede zwischen den Versuchen zu dokumentieren.

4.5 Ablauf der standardisierten Verzuckerung und Fermentation

Die Versuche der standardisierten Verzuckerung und Fermentation (IKTS-Standardmethode) wurden in Zusammenarbeit mit dem Laborpersonal der Arbeitsgruppe durchgeführt. Für die enzymatische Verzuckerung wurden 5 Proben aus den durchgeführten Aufschlussversuchen zuerst in einem warmen Wasserbad aufgetaut. Gleichzeitig wurde eine Verdünnung beider Enzymmischungen um Faktor 100 hergestellt, damit die Zugabe der Enzyme besser dosiert werden konnte. Für die Verdünnung wurden jeweils 0,5 ml der Enzymmischung mit einer Hubkolbenpipette (100 – 1000 µl FinnpiPETTE von Thermo Fisher Scientific) in einen 50-ml-Messkolben (Hirschmann Laborgeräte Klasse A, Messunsicherheit $\pm 0,08$ ml (IN) bei 20 °C) pipettiert und anschließend bis zur Markierung mit deionisiertem Wasser aufgefüllt.

Nachdem die Proben aufgetaut waren, erfolgte eine Einstellung des pH-Werts auf 5. Zur Anhebung des pH-Werts wurde ebenfalls 50%-(w/w)-Natronlauge verwendet. Für die Senkung des pH-Werts wurde wie bei der Neutralisation der alkalischen Aufschlüsse verdünnte Schwefelsäure mit einer Konzentration von ca. 6 mol/l genutzt. Anschließend wurde jede Probe in eine 1-l-Borosilikatglasflasche überführt und die Masse der überführten Probe gemessen. Im nächsten Schritt wurden die verdünnten Enzympräparate zugegeben (Verdünnung Biogas-Additive 7,5 ml, Verdünnung BioPract 7,65 ml). Danach wurden die Flaschen verschlossen und im Inkubationsschüttler (KS 4000 i control) fest eingespannt (siehe Abbildung 20). Für den enzymatischen Aufschluss betrug die Temperatur im Schüttler 45 °C. Damit eine gute Durchmischung der Proben gewährleistet war, wurden diese mit 300 1/min geschwenkt. Insgesamt dauerte die Behandlung (Aufheizzeit inbegriffen) 48 h.



Abbildung 20: Fest eingespannte Proben im Inkubationsschüttler nach der Verzuckerung

Nach dem enzymatischen Aufschluss wurde von jedem Versuch eine Probe in ein verschließbares Zentrifugenröhrchen abgefüllt. Zur Deaktivierung der Enzyme wurden die Proben anschließend in einem Wasserbad für mindestens 10 min (ohne Aufheizzeit) bei 70 °C behandelt. Nachdem die Proben wieder abgekühlt waren, wurden sie in der Tischzentrifuge Universal 32 von Hettich bei 9000 1/min für 5 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Flüssigphase mit einem Spritzenvorsatzfilter Porengröße 0,45 µm aus Celluloseacetat der Firma LABSOLUTE filtriert. Danach wurde die Probe bis zur Messung mit der HPLC bei -30 °C eingefroren. Für die Messung wurde die Probe aufgetaut, geschüttelt und mit einem Spritzenvorsatzfilter von LABSOLUTE Porengröße 0,2 µm aus regenerierter Cellulose filtriert. Anschließend wurde die Probe gemessen.

Für die Ethanolfermentation wurden 6 Batchansätze vorbereitet. Als Erstes wurde dabei die Trockenhefe in einen Erlenmeyerkolben mit Schraubverschluss eingewogen. Des Weiteren wurde ein Magnetrührer hinzugegeben. Danach wurde der pH-Wert der aufgeschlossenen und verzuckerten Biertreberproben auf pH 6 durch Zugabe von Natronlauge 50 % (w/w) eingestellt. Im Anschluss wurden die Proben möglichst vollständig in die Erlenmeyerkolben überführt und die Masse mit der Laborwaage bestimmt. Zusätzlich zu den 5 Proben wurde in einen Erlenmeyerkolben als Referenzprobe ca. 500 g einer Glucoselösung mit 20 g/l eingewogen. Danach wurden die Erlenmeyerkolben einzeln an je eine Gastüte angeschlossen und in ein 37 °C temperiertes Wasserbad gestellt. Das Wasserbad stand dabei auf einer Magnetrührplatte, wodurch eine Durchmischung der 6 Batchansätze während der 48-stündigen Fermentation gewährleistet war. Abbildung 21 zeigt den Versuchsaufbau für die Ethanolfermentation.

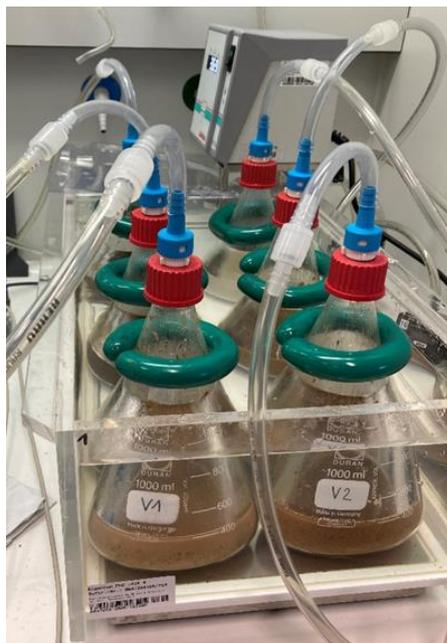


Abbildung 21: Versuchsaufbau für die Ethanolfermentation

Im Anschluss wurde wie nach der enzymatischen Verzuckerung je eine Probe für die HPLC entnommen. Bis auf die Deaktivierung, welche nicht erfolgte, waren dabei alle Arbeitsschritte zur Probenvorbereitung identisch.

4.6 Vorversuche

Für die Beurteilung der enzymatischen Verzuckerung wurden einige Tests durchgeführt. Zur Bestimmung der allgemeinen Effektivität der Enzyme wurden zwei Ansätze mit mikrokristalliner Cellulose und ein Ansatz mit Kartoffelstärke enzymatisch verzuckert. Ansatz 1 der Cellulose entsprach ungefähr der zu erwartenden Menge an Cellulose im Biertreber bei den sauren Aufschlüssen. Für den zweiten Ansatz wurde der Cellulosegehalt halbiert, um eine mögliche Hemmung durch Abbauprodukte zu erkennen. Im Ansatz mit Kartoffelstärke wurde ebenfalls die im Biertreber zu erwartende Menge an Stärke eingewogen. Für die enzymatische Verzuckerung wurde wie bei den aufgeschlossenen Biertreberproben vorgegangen.

Zusätzlich wurde mikrokristalline Cellulose sowie Kartoffelstärke in zwei weiteren Versuchen jeweils ohne Enzyme nur mit Wasser versetzt. Anschließend wurden die Proben ebenfalls unter den Bedingungen der enzymatischen Verzuckerung behandelt. Anhand dieser Versuche wurde die Menge an Glucose bestimmt, welche allein durch die Bedingungen während der enzymatischen Verzuckerung (ohne Enzyme) aus beiden Stoffen eluiert werden konnte. Die gemessene Glucosekonzentration beider Ansätze ist sehr gering und kann für die Auswertung vernachlässigt werden. Im Ansatz der Cellulose wurde eine Glucosekonzentration von ca. 9 mg/l und im Stärkeansatz von ca. 7 mg/l gemessen.

Ebenfalls wurde ein Ansatz mit ausschließlich Wasser und der verdünnten Enzymmischung im ungefähren Mischungsverhältnis wie bei den alkalisch bzw. sauer vorbehandelten Proben mit der HPLC analysiert, um zu ermitteln, welche Zucker eventuell bereits durch die Enzymlösung eingebracht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe der verdünnten Enzyme nur geringfügigen Einfluss auf die Konzentration der Glucose und Xylose haben. Die gemessene Konzentration im Ansatz betrug gerade einmal ca. 8 mg/l Glucose und 22 mg/l Xylose. Die restlichen im Rahmen der Arbeit ausgewerteten Stoffe konnten nicht nachgewiesen werden. Da in allen Aufschlüssen dieselbe Enzymmenge zugegeben wurde, ist der Einfluss bei allen Versuchen ungefähr gleich groß, weshalb in der Auswertung nicht weiter darauf eingegangen wird.

Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Nullprobe dieselbe Menge an Biertreber wie bei den sauren Aufschlüssen in einem Becherglas mit ca. 500 ml deionisiertem Wasser für 180 min bei 95 °C gekocht. Im Anschluss wurde der Ansatz analog zu den alkalischen und sauren

Aufschlüssen enzymatisch verzuckert, um zu bewerten, ob bereits ohne einen chemischen Aufschluss eine signifikante Freisetzung von Monosacchariden aus der Lignocellulose erzielt werden kann.

4.7 HPLC-Analyse

Während der Biertreberaufschlüsse gehen zahlreiche Verbindungen in Lösung. Eine allumfassende qualitative und quantitative Analyse der Verbindungen war nicht möglich. Zur quantitativen Analyse ausgewählter Verbindungen wurde die UHPLC Dionex UltiMate 3000 von Thermo Fisher Scientific verwendet. Als Detektoren kamen ein Brechungsindexdetektor (RI-Detektor) RI-101 von Shodex als Universaldetektor sowie ein Dioden-Array-Detektor (DAD) UltiMate 3000 von Thermo Fisher Scientific mit einem Wellenlängenbereich von 190 bis 800 nm zum Einsatz. Zur Trennung des sehr komplexen Stoffgemisches wurde die IC Sep ICE-Coregel 87 H3 Trennsäule von Concise Separations, einem Spezialhersteller für derartige Trennaufgaben, eingesetzt.

Der primäre Trennmechanismus zur Separation der organischen Säuren beruht auf dem Ionenausschluss. Die Gelkugeln der stationären Phase bestehen aus vollständig sulfoniertem Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer. Durch die Sulfonierung des Polymers wirken die Kugeln nach außen negativ geladen. Infolgedessen können undissoziierte Säuremoleküle in die Kugeln eindringen. Nach der Dissoziation hingegen werden die Säurerestmoleküle abgestoßen, da sie negativ geladen sind. Dies führt zu einer Trennung der organischen Säuren nach ihren pK_s -Werten, z. B. wird zuerst Ameisensäure ($pK_s = 3,75$) und dann Essigsäure ($pK_s = 4,75$ [63]) eluiert. Des Weiteren erfolgt eine Trennung aufgrund der Größenverteilung sowie des Ligandenaustauschs. Dies ermöglicht die gleichzeitige Trennung von einfachen Kohlenhydraten, organischen Säuren und Alkoholen, weshalb die Säule gut für die benötigten Trennaufgaben im Rahmen der Arbeit geeignet ist. [64]

Die Auswahl der Parameter zur Trennung des Stoffgemisches ist aus technischen Gründen stark eingeschränkt. Bei Nutzung eines RI-Detektors muss die Zusammensetzung des Eluenten während der gesamten Messung konstant bleiben. Des Weiteren dürfen bei der verwendeten Säule keine organischen Lösungsmittel als Eluenten zum Einsatz kommen. Durch organische Lösungsmittel würde es zum Aufquellen des Polymers kommen, was zur Zerstörung der stationären Phase führt [64]. Als Eluent wurde, wie vom Hersteller für derartige Trennaufgaben empfohlen, deionisiertes Wasser mit 0,008 mol/l Schwefelsäure genutzt. Die Flussrate des Eluenten betrug standardmäßig 0,6 ml/min. In Bezug auf die Temperatur zeigten Vorversuche, dass für die Analyse der Proben bei 50 °C etwas bessere Ergebnisse als bei

80 °C (wie allgemein vom Hersteller empfohlen) erzielt wurden. Aus diesem Grund wurde die Temperatur des Säulenofens für die Messungen auf 50 °C eingestellt. Die Messzeit betrug 50 min je Messung. [65]

Für die Bestimmung der Zuckerausbeuten wurde Glucose, Xylose und Arabinose gemessen. Da die Zucker nicht UV-aktiv sind, wurden sie mit dem RI-Detektor gemessen. Bei der Bestimmung der Xylose ist eine Überlagerung durch Mannose nicht auszuschließen, da beide Zucker gleichzeitig eluiert werden (in Vorversuchen bestimmt). Wie Kapitel 2.3.2 zeigt, ist durch Hydrolyse der Hemicellulose des Biertreibers hauptsächlich mit einer Freisetzung von Xylose zu rechnen. Aus diesem Grund wurde das gesamte Signal im Chromatogramm der gelösten Xylose zugeordnet. Auf Mannose wird im Folgenden nicht weiter eingegangen. Der Bereich der Kalibrierung für die Monosaccharide erstreckte sich von 0,01 – 1,00 g/l. Die Abbauprodukte der Monosaccharide Furfural und HMF wiesen eine ausgeprägte Absorptionsbande im Spektrum bei 277 und 284 nm auf, weshalb beide Stoffe mit dem DAD bei 280 nm bestimmt wurden. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit war eine sichere Kalibrierung von HMF und Furfural bei deutlich kleineren Konzentrationen im Vergleich zu allen anderen Stoffen möglich. Beide Stoffe wurden im Bereich von 2 – 200 mg/l kalibriert. Bei der Messung der organischen Säuren wurde sich auf die Bestimmung der Ameisensäure und Essigsäure konzentriert. Beide Säuren sind leicht UV-aktiv. Jedoch war die Basislinie sowie die Form der Peaks im Chromatogramm des RI-Detektors etwas besser ausgeprägt, weshalb beide Säuren mit diesem Detektor gemessen wurden. Der kalibrierte Bereich beider Säuren erstreckte sich von 0,1 – 1,0 g/l. Des Weiteren war die Konzentration der Milchsäure vor allem nach der Fermentation von Interesse. Wie die zuvor genannten Säuren ist auch Milchsäure nur leicht UV-aktiv. Aufgrund einer starken Überlagerung des Signals in den realen Proben musste die Milchsäure dennoch mit dem DAD bei 245 nm gemessen werden. Wegen der geringeren Empfindlichkeit wurde die Milchsäure im Bereich 0,5 – 5 g/l kalibriert. Ethanol ist wie die Monosaccharide nicht UV-aktiv, weshalb zur Messung der RI-Detektor genutzt wurde. Zur Bestimmung der Massenkonzentration wurde Ethanol im Bereich von 0,01 – 1,00 g/l kalibriert. Die umfangreiche Kalibrierung aller Stoffe sowie die Messungen der Proben wurden dabei selbstständig durchgeführt. Für die Kalibrierung wurden alle Standards drei Mal vermessen und zur Erstellung der Kalibriergeraden der Mittelwert aus den Messungen gebildet. Für die Bestimmung der Konzentrationen wurde von jeder Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt. Bei der Probenvorbereitung wurde wie bereits in Kapitel 4.4 und 4.5 beschrieben vorgegangen.

5 Ergebnisse und Diskussion

Zu Beginn dieses Kapitels soll auf die Betrachtung der Messunsicherheiten eingegangen werden. Eine detaillierte Fehlerbetrachtung, in der alle Messunsicherheiten explizit ausgewiesen werden, war aus mehreren Gründen nicht möglich. Bspw. können einige Fehlerquellen wie der Einfluss der verschiedenen Aufheiz- und Abkühlzeiten oder die Auswirkung einer nicht idealen Überführung der Proben (Überführung führt zur Änderung des Verhältnisses Biertreber zu Flüssigkeit) nicht so einfach quantitativ bestimmt werden.

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass der Term der zufälligen Messunsicherheit deutlich größer als die systematische Messunsicherheit ist. Für die wichtigsten Geräte sind dennoch die Messunsicherheiten in den jeweiligen Abschnitten von Kapitel 4 aufgeführt. Zur Bestimmung der Standardabweichung aller Versuchspunkte hätten diese mehrfach unabhängig voneinander bestimmt werden müssen, was einen enormen experimentellen Aufwand bedeutet hätte. Bei einer Dreifachbestimmung aller Messpunkte wären z. B. 45 Versuche je Versuchsreihe notwendig gewesen (Mehraufwand ca. 6 Monate). Aus diesem Grund wurde auf eine generelle Mehrfachbestimmung verzichtet.

Für die Bestimmung der Effekte bei der Auswertung der statistischen Versuchsplanung ist der zentrale Versuchspunkt von entscheidender Bedeutung, weshalb dieser als Einziger dreimal gemessen wurde (zu Beginn, in der Mitte und am Ende der jeweiligen Versuchsreihe). Um daraus einen ungefähren Überblick über die zufällige Messunsicherheit aller Versuchspunkte zu erhalten, wurde die Standardabweichung (mittlere Streuung der einzelnen Messwerte) aus den drei Messwerten des zentralen Versuchspunkts bestimmt. Im Anschluss wurde die Standardabweichung durch den Mittelwert des zentralen Versuchspunkts geteilt, um die prozentuale mittlere Streuung der Einzelmessungen zu bestimmen. Die erhaltene prozentuale Streuung wurde anschließend pauschal für alle anderen Versuchspunkte, bei denen nur eine Einfachbestimmung durchgeführt wurde, zur Beurteilung der Messunsicherheit herangezogen.

5.1 Auswertung der Vorversuche

In Ansatz 1 mit hoher Cellulosefracht wurde eine Glucosekonzentration von 2,9 g/l gemessen. Dies entspricht einer Glucoseausbeute von ca. 17,2 %. Bei halber Cellulosefracht in Ansatz 2 wurde eine Konzentration von 1,8 g/l gemessen. Die erzielte Glucoseausbeute war mit ca. 21,6 % etwas größer als in Ansatz 1. In Ansatz 2 stand aufgrund der halben Cellulosefracht die doppelte Menge an Enzymen pro Gramm Cellulose für die Hydrolyse zur Verfügung, weshalb auch eine leicht höhere Ausbeute als in Ansatz 1 zu erwarten war. Außerdem wurde in Ansatz 1 eine deutlich größere Glucosekonzentration als in Ansatz 2 nachgewiesen. Anhand

der beiden Ergebnisse kann eine Hemmung der Enzyme durch Abbauprodukte aus der Hydrolyse der mikrokristallinen Cellulose ausgeschlossen werden.

Der Abbau der Stärke durch die verwendeten Enzymprodukte war entgegen der Erwartung sehr gering. Nach der Verzuckerung wurde gerade einmal eine Konzentration von 0,2 g/l gemessen, was einer Glucoseausbeute aus der Kartoffelstärke von nur 4 % entspricht. Die Ergebnisse belegen, dass die Aktivität der durch IKTS ausgewählten Enzyme insbesondere hinsichtlich des Stärkeabbaus, aber auch bezüglich des Abbaus mikrokristalliner Cellulose relativ gering war. Dies ist bei der Bewertung der Versuche zu berücksichtigen. Dennoch wurde sich bewusst für die Nutzung von Enzymmischungen, welche für die Verbesserung der Verzuckerung der Lignocellulose in Biogasanlagen entwickelt wurden, entschieden, da so auf teure Spezialenzyme verzichtet werden konnte.

Die Freisetzung der Monosaccharide durch Kochen der Nullprobe bei 95 °C über eine Dauer von 180 min war sehr gering (Glucose: 0,06 g/l; Xylose: 0,03 g/l; Arabinose: 0,11 g/l). Durch die enzymatische Verzuckerung stieg die Konzentration der Monosaccharide leicht an (Glucose: 0,25 g/l; Xylose: 1,28 g/l; Arabinose: 0,64 g/l). Die Gesamtglucoseausbeute bezogen auf die maximal mögliche Glucose aus Cellulose und Stärke lag unter 1 %. Interessant war, dass die Differenz der Glucosemenge vor und nach der enzymatischen Verzuckerung einer Ausbeute von 4,1 % der theoretisch maximal möglichen Menge an Glucose aus der Stärke im Biertreber entsprach. Bei der Verzuckerung der Kartoffelstärke wurde eine ähnliche Ausbeute erzielt (siehe oben). Dies deutet darauf hin, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit ohne intensive Vorbehandlung ($T < 100$ °C und keine Chemikalien) so gut wie kein Abbau der Cellulose im Biertreber durch die Enzyme möglich ist. Die Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose in der Nullprobe war nach der enzymatischen Verzuckerung ebenfalls sehr gering. Sie betrug ca. 5,1 %. Des Weiteren wurden nach dem Kochen der Nullprobe für die Stoffe Furfural und HMF minimale Konzentrationen von unter 1 mg/l gemessen.

5.2 Alkalische Versuchsreihe

5.2.1 Ergebnisse der Biertreberaufschlüsse mit verdünnter Natronlauge

Eine detaillierte Auswertung der Massenkonzentrationen von Glucose, Xylose und Arabinose war aufgrund uneindeutiger Peaks (Überlagerung durch Störsignale) in den mit der HPLC gemessenen Chromatogrammen nicht möglich. Aus diesem Grund werden die Konzentrationen der drei Monosaccharide nach den Aufschlüssen nicht im Rahmen der Arbeit veröffentlicht. Einige Störsignale waren eindeutig von der Härte der Aufschlussbedingungen abhängig, mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich dabei um Abbauprodukte des Biertrebers. Eine Bestimmung dieser Stoffe war mit der zur Verfügung stehenden Analytik jedoch

nicht möglich. Des Weiteren waren die gemessenen Zuckerkonzentrationen sehr gering. Wie in Kapitel 2.4.2 im Abschnitt zu alkalischen Vorbehandlungen beschrieben, war auch laut Literatur nicht mit hohen Monosaccharidkonzentrationen nach den Aufschlüssen zu rechnen. Die größte gemessene Glucosekonzentration betrug weniger als 200 mg/l. Das Signal der Xylose war teilweise gar nicht zu erkennen und die maximale Konzentration lag unter 20 mg/l. Arabinose wurde ebenfalls nur in geringen Konzentrationen freigesetzt. Die maximale Konzentration betrug dabei weniger als 50 mg/l. Die Angaben dienen ausschließlich zur Orientierung. Sie zeigen jedoch, dass so gut wie keine Monosaccharide aus der Hemicellulose freigesetzt wurden. Gleiches gilt für die Freisetzung der Glucose aus Stärke bzw. Cellulose.

Die Essigsäure zeigte deutliche Signale in den Chromatogrammen, dennoch war kein eindeutiger Trend in Abhängigkeit der drei Einflussgrößen Temperatur, Versuchszeit und Konzentration zu erkennen. Die Konzentration der Essigsäure unterlag vielmehr einer zufälligen Schwankung, sodass kein Rückschluss auf den Abbau von Acetylgruppen aus der Hemicellulose möglich war. Im Mittel lag die Essigsäurekonzentration bei 0,84 g/l, die kleinste gemessene Konzentration betrug 0,56 g/l und die größte 1,32 g/l.

Anhand der gemessenen Massenkonzentrationen der Monosaccharide und der Essigsäure war eine Bewertung der Effektivität der Aufschlüsse nicht möglich. Optisch konnten hingegen deutliche Veränderungen durch die Aufschlüsse beobachtet werden. In Abbildung 22 wird die Verfärbung durch die Aufschlüsse exemplarisch an Versuch 3 gezeigt. Je nach Härte der Versuchsbedingungen färbte sich die Lösung während der Aufschlüsse dunkelrotbraun bis nahezu schwarz. Durch Neutralisation der aufgeschlossenen Proben wurde die Farbe der Aufschlüsse wieder etwas heller.

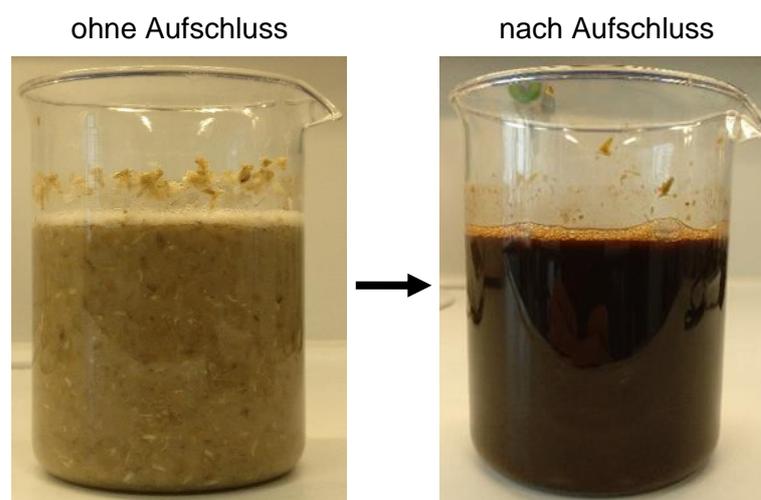


Abbildung 22: Links Probe ohne Aufschluss nach kurzem Einrühren; rechts Versuch 3 nach Aufschluss (bei 45 °C, 120 min und einer Natronlaugenkonzentration von 3 % (w/v))

Auch anhand der Fasern waren nach den Aufschlüssen makroskopisch deutliche Unterschiede in Abhängigkeit der Versuchsbedingungen zu erkennen. In Abbildung 23 ist der Biertreber ohne Vorbehandlung und nach Aufschluss bei 45, 70 und 95 °C sowie einer Natronlaugenkonzentration von jeweils 3 % (w/v) und einer Versuchszeit von 120 min gezeigt. Bei genauerer Beobachtung wird deutlich, dass die Fasern leicht aufgequollen sind. Dies war anhand der Berichte in der Literatur zu erwarten und ist in Kapitel 2.4.2 im Abschnitt „Alkalische Vorbehandlung“ genauer beschrieben. Nach einer Behandlung bei 45 °C war ansonsten kaum eine optische Veränderung im Vergleich zu unbehandeltem Biertreber erkennbar. Nach einer Vorbehandlung bei 70 °C waren die Fasern etwas kleiner und heller. Nach einem Aufschluss bei 95 °C waren nur noch feine Fasern übrig, außerdem waren sie farblich deutlich heller.

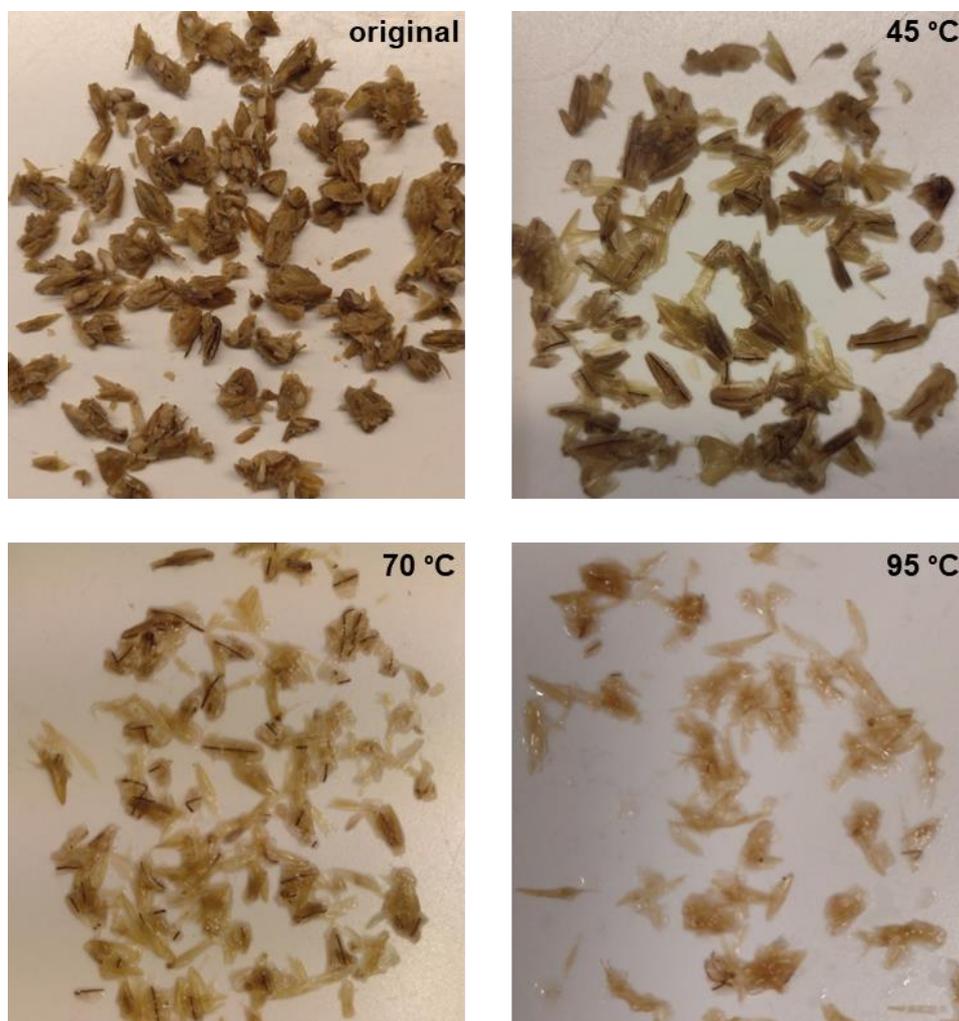


Abbildung 23: Makroskopische Aufnahmen des unbehandelten Biertrebers und von gewaschenem Biertreber nach alkalischem Aufschluss bei 45, 70 und 95 °C sowie identischer Natronlaugenkonzentration (3 % (w/v)) und Versuchszeit (120 min) (Versuch 3, 10 und 15)

Der Einfluss der Natronlaugenkonzentration und der Versuchszeit war etwas geringer als der der Temperatur, dennoch waren zwischen Maximum und Minimum leichte Unterschiede zu erkennen. Unter den mildesten Versuchsbedingungen waren nahezu keine Veränderungen des Biertreibers sichtbar (siehe Abbildung 24 links). Optisch wurden die besten Ergebnisse bei 95 °C erzielt. Durch Sortierung der Aufschlüsse bei dieser Temperatur nach der Konzentration und bei gleicher Konzentration nach der Zeit zeigte sich von Versuch zu Versuch eine schrittweise Verbesserung der Aufschlüsse. Durch Erhöhung der Konzentration wurden optisch etwas größere Unterschiede als bei Verlängerung der Versuchszeit beobachtet. Die größten Veränderungen der Fasern waren unter den maximalen Aufschlussbedingungen zu erkennen (siehe Abbildung 24 rechts).

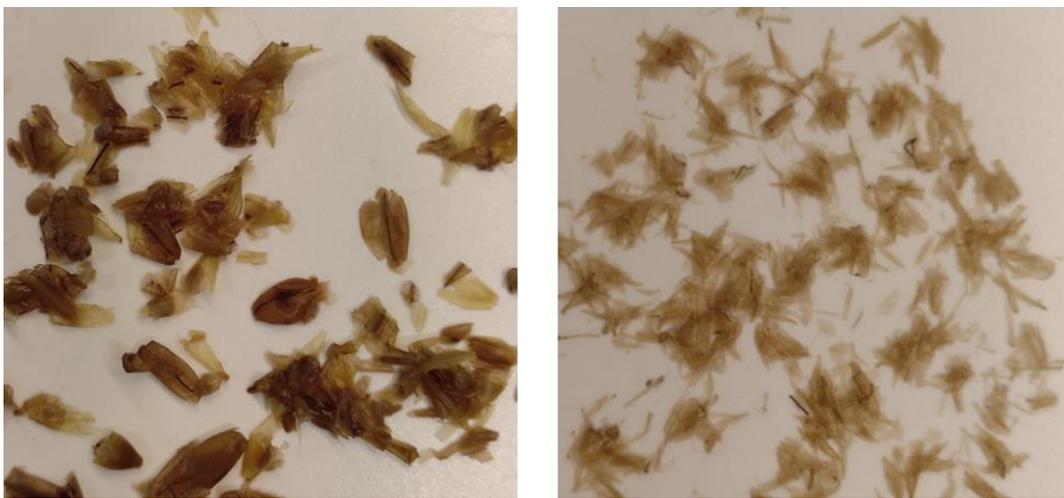


Abbildung 24: Links nach Versuch 1 bei 45 °C, 60 min, 1 % (w/v); rechts nach Versuch 17 bei 95 °C, 180 min, 5 % (w/v)

5.2.2 Ergebnisse der enzymatischen Verzuckerung nach alkalischem Aufschluss des Biertreibers

Nach der enzymatischen Verzuckerung fiel die Überlagerung durch Störsignale geringer als im letzten Kapitel beschrieben aus, sodass die Massenkonzentrationen besser bestimmt werden konnten. Die Beurteilung der Messunsicherheit erfolgte wie in Kapitel 5 beschrieben. In Tabelle 9 sind die gemessenen Massenkonzentrationen ausgewählter Stoffe gezeigt.

Tabelle 9: Gemessene Massenkonzentrationen nach enzymatischer Verzuckerung der Proben (alkalische Versuchsreihe)

Nr.	Glucose [g/l]	Xylose [g/l]	Arabinose [g/l]	Essigsäure [g/l]	Milchsäure [g/l]	Ameisensäure [g/l]
1	3,67	1,87	0,64	1,44	1,71	0,02
2	1,02	1,70	0,19	1,16	4,33	
3	4,27	2,08	0,39	1,16	0,77	0,04
4	4,16	2,15	0,60	1,06	0,71	0,03
5	4,75	2,21	0,59	0,77	0,61	0,04
6	1,76	0,99	0,43	1,33	3,00	0,13
7	4,47	2,13	0,63	0,92	0,65	0,10
8	4,67	2,19	0,64	1,01	0,85	0,14
9	3,93	2,02	0,58	1,07	0,93	0,13
10	3,58	1,78	0,53	0,76	0,16	0,12
11	4,05	2,06	0,57	1,13	0,75	0,18
12	3,25	1,62	0,50	0,98	0,37	0,11
13	2,09	0,38	0,20	0,81	1,13	0,36
14	3,77	0,83	0,64	1,20	1,14	0,51
15	4,14	1,86	0,60	1,00	1,25	0,35
16	3,32	1,54	0,25	1,05	1,20	0,23
17	3,06	1,49	0,24	1,00	0,81	0,29

Prozentuale mittlere Streuung der Einzelmessungen bestimmt anhand der drei Versuche des zentralen Versuchspunkts: Glucose: $\pm 13,7\%$; Xylose: $\pm 10,4\%$; Arabinose: $\pm 9,4\%$; Essigsäure: $\pm 17,2\%$; Ameisensäure: $\pm 7,7\%$

Die Signale der Glucose wurden durch ein kleines Störsignal auf der linken Seite überlagert. Bei den Versuchen 2 und 6 führte die Überlagerung zu einer kleinen Peakschulter. Bei allen anderen zeigte sich die Überlagerung in Form eines leichten Frontings. Mit steigender Konzentration wurde der Effekt immer kleiner. In Abbildung 25 ist die Glucosekonzentration nach der enzymatischen Verzuckerung der Aufschlüsse grafisch dargestellt. Hierfür wurden die Versuche zuerst nach der Natronlaugenkonzentration, bei gleicher Konzentration nach der Temperatur und bei gleicher Temperatur nach der Versuchszeit sortiert. Die Ergebnisse in

Abbildung 25 deutet darauf hin, dass der Biertreberaufschluss unter den gewählten Temperaturen und Versuchszeiten bei einer Natronlaugenkonzentration von 3 % (w/v) am effektivsten war. Nach der enzymatischen Verzuckerung konnten unter diesen Bedingungen im Durchschnitt die höchsten Glucosekonzentrationen ermittelt werden. Der Vergleich der Ergebnisse des zentralen Versuchspunkts (Versuch 8, 9, 10) zeigte jedoch, dass die Glucosekonzentration einer starken Schwankung unterlag. Infolgedessen war eine sichere Interpretation der Trends anhand der Ergebnisse nicht möglich. Auch mit Hilfe der Software Statistica konnte kein sinnvolles Modell, welches die Freisetzung der Glucose beschrieb, entwickelt werden. Für die Berechnung der Glucoseausbeute wurde als maximal mögliche Menge die Glucose berücksichtigt, welche aus der Cellulose und Stärke freigesetzt werden konnte, da beide Fraktionen das mit Abstand größte Potenzial an gebundener Glucose aufweisen. Aus dem Maischeprozess stammende sowie in der Hemicellulose gebundene Glucose wurde nicht berücksichtigt. Die maximale Glucoseausbeute lag bei 21,4 %. Sie wurde in Versuch 5 (45 °C, 180 min, 5 % (w/v)) erreicht. Die niedrigste Ausbeute wurde in Versuch 2 (45 °C, 180 min, 1 % (w/v)) mit gerade einmal 4,2 % erzielt. Die meisten Versuche schwankten um eine Glucosekonzentration von 4 g/l, was einer Ausbeute von ca. 17 % entsprach. Insgesamt war die Glucoseausbeute bei allen Versuchen gering.

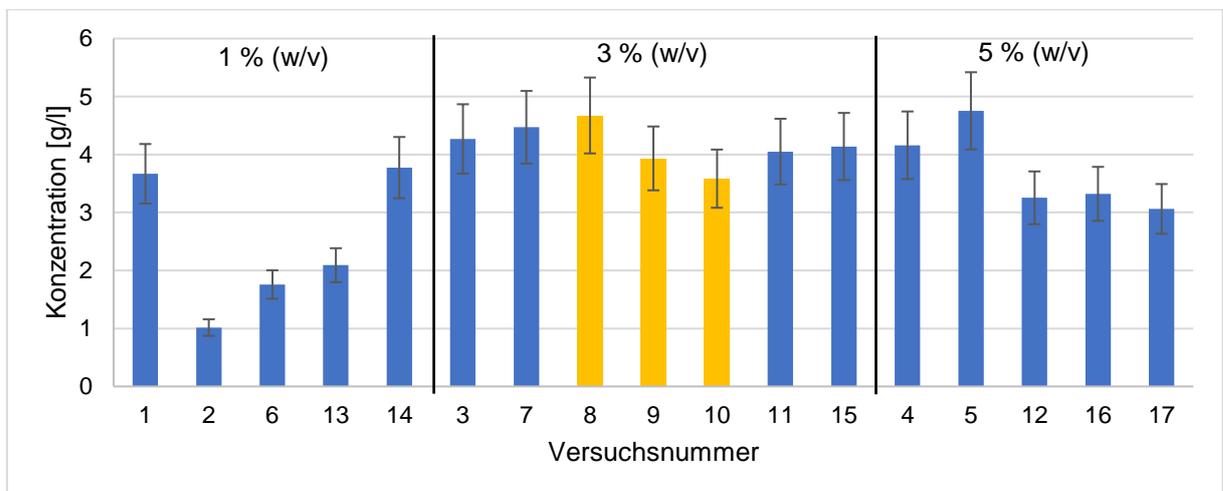


Abbildung 25: Massenkonzentrationen der freigesetzten Glucose nach der enzymatischen Verzuckerung mit Markierung der Ergebnisse des zentralen Versuchspunkts (gelb) sortiert nach Konzentration, Temperatur und Zeit der Aufschlüsse

Die Signale der Xylose und Arabinose waren im Allgemeinen gut auswertbar. Bei einigen Signalen der Xylose zeigte sich ein leichtes Tailing und bei den Signalen der Arabinose ein leichtes Fronting. Insgesamt war der Abbau der Hemicellulose in seine Einzelbausteine gering. Wie schon bei der Auswertung der Glucose ist kein klarer Trend bei der Freisetzung beider Monosaccharide zu erkennen (siehe Abbildung 26). Die Konzentration der Xylose schwankte

in den meisten Versuchen um eine Konzentration von ca. 1,8 g/l. Die Konzentration der Arabinose war deutlich kleiner und schwankte in der Regel um eine Konzentration von ca. 0,5 g/l.

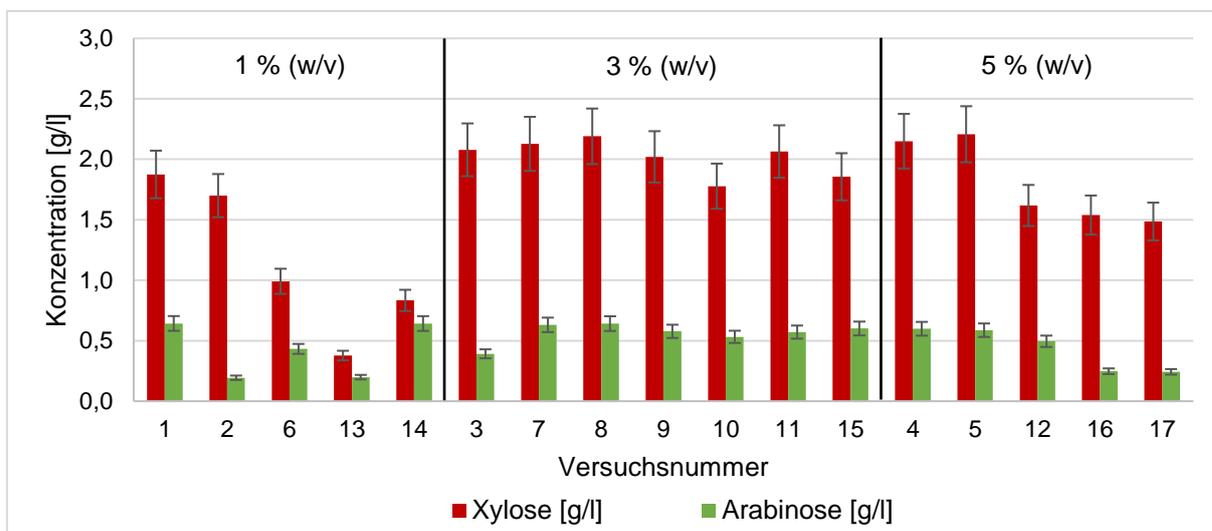


Abbildung 26: Massenkonzentrationen der freigesetzten Xylose und Arabinose nach enzymatischer Verzuckerung sortiert nach Konzentration, Temperatur und Zeit der Aufschlüsse

Zur Beurteilung des Abbaus der Hemicellulose wurde die Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose bestimmt. Hierfür wurde die Summe der gemessenen Menge an Xylose und Arabinose durch die theoretisch maximal mögliche Menge beider Monosaccharide, welche aus der Hemicellulose freigesetzt werden konnten, geteilt. Für die Berechnung der maximal möglichen Menge wurde angenommen, dass die gesamte Hemicellulose nur aus diesen beiden C-5-Zuckern aufgebaut ist. Dies entspricht nicht der Realität, wie in Kapitel 2.3.2 gezeigt wurde, wodurch die Ausbeute an Xylose und Arabinose etwas unterschätzt wurde. Des Weiteren bedeutet dies, dass die Entfernung der Hemicellulose in Realität etwas erfolgreicher war. Dennoch sollten die berechneten Zuckerausbeuten die ungefähre Abhängigkeit der Hemicelluloseentfernung im Rahmen der gewählten Versuchsbedingungen zeigen, da beide Zucker laut Literatur den Hauptbestandteil der Hemicellulose repräsentieren (siehe z. B. Rojas-Chamorro et al. [51]). Die berechnete Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose schwankte in den meisten Versuchen um einen Wert von 6,5 %. Dieses Ergebnis ist nicht zufriedenstellend. Die Auswertung der berechneten Ausbeuten an Monosacchariden der Hemicellulose mit der Software Statistica ergab, dass wie schon bei der Glucosefreisetzung möglicherweise durch Vorbehandlung mit einer Natriumhydroxidkonzentration von ca. 3 % (w/v) der Biertreber am effektivsten für die Enzyme aufgeschlossen werden konnte. Die Temperatur und Versuchszeit hatten dabei keinen deutlichen Einfluss auf die Ausbeute. Im Folgenden soll nicht weiter auf das Modell eingegangen werden, da aufgrund der großen zufälligen Schwankungen der Messergebnisse keine gute Anpassung der Modellgleichung möglich war. Dies war eindeutig am Bestimmtheitsmaß ($R^2 = 0,8190$) und im Paritätsdiagramm

der Modellgleichung zu erkennen. Aufgrund der starken Schwankungen bei gleichzeitig geringen Ausbeuten war auch keine gute Anpassung der Modellgleichung zu erwarten.

Wie schon im letzten Kapitel beschrieben, konnte auch nach der enzymatischen Verzuckerung die Konzentration der Essigsäure gut bestimmt werden. Dennoch ist anhand der gemessenen Massenkonzentrationen sowie am Anstieg der Konzentration in Bezug auf die Konzentration nach den Aufschlüssen kein eindeutiger Trend zu erkennen. Insgesamt kam es in den Versuchen zu einem leichten Anstieg der Essigsäurekonzentration, was ebenfalls auf einen geringen Abbau der Hemicellulose hindeutet. Die mittlere Essigsäurekonzentration lag bei ca. 1 g/l, die kleinste gemessene Konzentration betrug 0,76 g/l und die größte 1,4 g/l.

Auffällig war der zum Teil hohe Gehalt an Milchsäure, welcher möglicherweise auf einen unkontrollierten Abbau der Zucker zurückzuführen ist. Im Allgemeinen schwankte die Konzentration der Milchsäure im Bereich von 0,2 bis 1,2 g/l, außer bei Versuch 1, 2 und 6, bei denen deutlich höhere Konzentrationen gemessen wurden (siehe Tabelle 9).

Unter den analysierten Abbauprodukten aus den Aufschlüssen war nur bei der Ameisensäure eine Abhängigkeit zu erkennen. Zu beachten ist, dass die Kalibrierung der Ameisensäure nur im Bereich zwischen 0,1 und 1 g/l möglich war. Bei niedrigeren Konzentrationen ist zum Teil mit drastischen Abweichungen zu rechnen. In Kapitel 5.3.1 wird darauf noch einmal genauer eingegangen. In Abbildung 27 sind die gemessenen Konzentrationen der einzelnen Versuche zuerst nach der Temperatur, bei gleicher Temperatur nach der Konzentration und bei gleicher Konzentration nach der Versuchszeit sortiert. Wie im Diagramm deutlich wird, führte eine Erhöhung der Temperatur gleichzeitig zum Anstieg der Ameisensäure. Insgesamt war der Abbau jedoch gering, die maximale Konzentration betrug gerade einmal rund 0,5 g/l.

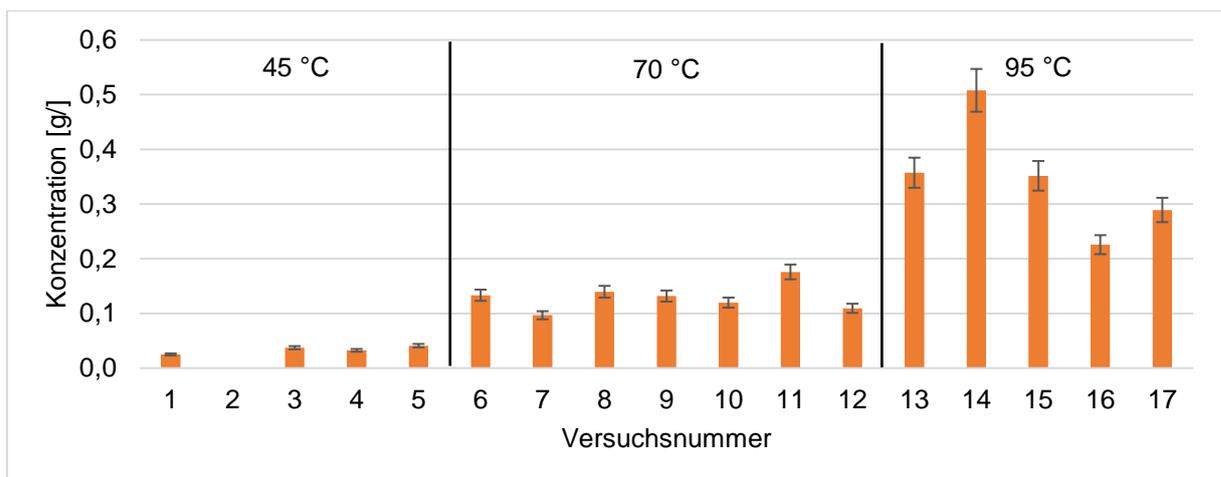


Abbildung 27: Massenkonzentrationen der gebildeten Ameisensäure infolge der Aufschlüsse mit verdünnter Natronlauge sortiert nach Temperatur, Konzentration und Zeit der Aufschlüsse

Die ermittelten Konzentrationen für HMF und Furfural waren in allen Versuchen deutlich kleiner als 1 mg/l. Unter den gewählten Versuchsbedingungen war somit kein Anstieg beider Stoffe im Vergleich zum Gehalt der Nullprobe zu erkennen.

Entgegen den bisher beschriebenen Ergebnissen konnten makroskopisch eindeutige Effekte durch die enzymatische Verzuckerung beobachtet werden. In Abbildung 28 ist der feste Rückstand der Proben nach der enzymatischen Verzuckerung und Zentrifugation abgebildet. Auf der linken Seite ist das Ergebnis von Versuch 10 (70 °C, 120 min, 3 % (w/v)) und auf der rechten Seite von Versuch 15 (95 °C, 120 min, 3 % (w/v)) gezeigt. Der einzige Unterschied zwischen beiden Versuchen ist die höhere Temperatur bei Versuch 15 während der Aufschlüsse. Durch die enzymatische Verzuckerung kam es bei Versuch 10 zu einem teilweisen Abbau einiger Fasern. Dies ist daran zu erkennen, dass oft nur die dünnen braunen Faserbestandteile nach der enzymatischen Verzuckerung übrig waren (siehe rote Markierung). In Versuch 15 waren nach der enzymatischen Verzuckerung keine Fasern mehr zu erkennen. Durch Zentrifugation kam es ausschließlich zur Abtrennung eines sehr feinen Feststoffs. Eine Bestimmung der Zusammensetzung des Feststoffs wurde nicht durchgeführt.

Warum der makroskopisch sichtbare Erfolg der enzymatischen Verzuckerung nicht durch die Messwerte der HPLC belegbar war, konnte nicht geklärt werden. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass die Enzyme nicht in der Lage waren, die Bruchstücke bis in die Monosaccharide zu hydrolysieren. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Monosaccharide mit anderen Stoffen im Aufschluss reagiert haben. Eine positive Erkenntnis ist, dass möglicherweise durch Verbesserung der enzymatischen Verzuckerung unter moderaten Versuchsbedingungen gute Ergebnisse erzielt werden können, da offensichtlich die Verfügbarkeit des aufgeschlossenen Biertreibers für die Enzyme gut gewährleistet war (siehe Abbildung 28).



Abbildung 28: Makroskopische Aufnahmen der festen Rückstände des Biertreibers nach enzymatischer Verzuckerung und Zentrifugation der Proben: links Ergebnis von Versuch 10 (Aufschlussbedingungen: 70 °C, 120 min, 3 % (w/v)); rechts von Versuch 15 (Aufschlussbedingungen: 95 °C; 120 min, 3 % (w/v))

5.2.3 Ergebnisse der Ethanolfermentation nach alkalischem Aufschluss und enzymatischer Verzuckerung des Biertreibers

Die Auswertung der Chromatogramme erwies sich bei einigen Stoffen als uneindeutig. Der wichtigste Stoff Ethanol konnte jedoch sehr gut bestimmt werden. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse ausgewählter Stoffe aufgeführt. Die angegebenen Messunsicherheiten wurden wie in Kapitel 5 beschrieben ermittelt.

Tabelle 10: Gemessene Massenkonzentrationen und Ethanolausbeuten nach Ethanolfermentation der vorbehandelten Proben (alkalische Versuchsreihe)

Nr.	Xylose [g/l]	Essigsäure [g/l]	Milchsäure [g/l]	Ethanol [g/l]	Ethanolausbeute [%]
1	< 0,02	2,99	5,78	1,82	14,7
2	< 0,01	2,28	7,71	0,68	5,5
3	< 0,06	2,83	4,64	2,34	19,9
4	< 0,07	2,98	5,15	2,08	18,3
5	1,46	1,78	3,11	2,50	21,9
6	< 0,03	2,50	8,73	1,11	9,0
7	1,14	2,44	4,20	2,52	21,2
8	0,73	2,74	5,21	2,50	20,9
9	< 0,03	3,08	5,37	2,27	19,0
10	< 0,06	2,51	4,28	1,94	16,4
11	< 0,05	3,18	5,67	2,27	19,1
12	0,59	2,27	3,23	1,77	15,4
13	< 0,02	2,20	6,29	1,38	11,1
14	< 0,01	3,43	6,67	2,11	16,6
15	0,32	2,65	5,27	2,35	19,5
16	1,44	1,55	2,46	1,94	16,3
17	1,28	1,60	2,12	1,82	15,1

Prozentuale mittlere Streuung der Einzelmessungen bestimmt anhand der drei Versuche des zentralen Versuchspunkts: Xylose: keine Aussage möglich; Essigsäure: $\pm 10,2$ %; Milchsäure: $\pm 11,8$ %; Ethanol: $\pm 12,5$ %; Ethanolausbeute: $\pm 12,2$ %

Die Messung der Xylose war nicht immer eindeutig möglich. Die kleinen Xylosepeaks konnten aufgrund einer Überlagerung nicht eindeutig abgegrenzt werden, weshalb bei einigen Versuchen nur die ungefähre Größenordnung angegeben wurde. Anhand der Reduktion der Massenkonzentrationen bezüglich der gemessenen Konzentrationen nach der enzymatischen Verzuckerung kann dennoch eindeutig auf einen Abbau geschlossen werden. Laut Literatur ist Backhefe jedoch nicht in der Lage Xylose in diesen Größenordnungen zu verstoffwechseln [66], weshalb die beobachtete Abnahme auf eine Kontamination durch andere Mikro-

organismen hindeutet. Während der gesamten Probenvorbereitung wurde nicht steril gearbeitet, weshalb dies auch nicht unwahrscheinlich ist.

Eine sehr starke Überlagerung der Arabinosepeaks im Chromatogramm führte zu einer unmöglichen Auswertung der Massenkonzentrationen.

Wie schon in den letzten beiden Kapiteln beschrieben, konnte die Konzentration der Essigsäure gut bestimmt werden, jedoch war anhand der Ergebnisse kein Trend bezüglich der optimalen Aufschlussbedingungen zu erkennen. Insgesamt kam es in allen Versuchen mehr oder weniger zu einem Anstieg der Konzentration. Die mittlere Essigsäurekonzentration lag bei ca. 2,5 g/l, was einem mittleren Anstieg im Vergleich zu den Ergebnissen nach der enzymatischen Verzuckerung um das 1,5-Fache entsprach. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist dies vor allem auf die Bildung durch Mikroorganismen zurückzuführen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass ein Teil aus dem Abbau der Hemicellulose stammt, da die Enzyme nach der Verzuckerung nicht deaktiviert wurden.

Die Messung der Milchsäure war nur mit dem DAD möglich, da das Chromatogramm des IR-Detektors eine starke Überlagerung des Milchsäurepeaks zeigte. Im UV-Bereich wurde das Signal nicht überlagert. Der Anstieg der Milchsäure von durchschnittlich 3,85 g/l kann jedoch nicht allein auf den oben beschriebenen Abbau der Xylose zurückgeführt werden. Im Durchschnitt ist die Xylosekonzentration um weniger als 1,5 g/l gesunken. Die genaue Ursache für den starken Anstieg der Milchsäure konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise waren die Mikroorganismen auch in der Lage weitere Stoffe neben den Monosacchariden als Kohlenstoffquelle in ihrem Stoffwechsel zu nutzen. Des Weiteren ist es möglich, dass durch die Enzyme der aufgeschlossene Biertreber während der Fermentation weiter abgebaut wurde. Glucose konnte nach der Fermentation nicht mehr nachgewiesen werden, was auf einen vollständigen Abbau hindeutet. Bei fast allen Proben wurde sogar mehr Ethanol nach der Fermentation gemessen als anhand der gelösten Glucose nach der enzymatischen Verzuckerung rechnerisch theoretisch möglich gewesen wäre, was auf eine Fortsetzung der enzymatischen Glucosefreisetzung während der Ethanolfermentation hinweist. Im Durchschnitt lag die Ethanolausbeute bei 111 % bezogen auf das Potenzial der gelösten Glucose nach der Verzuckerung. Der größte Zuwachs war in Versuch 14 mit 31 % zu verzeichnen. Anhand dieser Ergebnisse kann eine Hemmung der Hefe ausgeschlossen werden. Zur genaueren Auswertung der Ethanolausbeute wurden die Ergebnisse mit der Software Statistica analysiert. Wie schon im letzten Kapitel für die Glucosefreisetzung und Ausbeute der Monosaccharide aus der Hemicellulose konnte auch für die Ethanolausbeute die Modellgleichung nicht sinnvoll an die Messergebnisse angepasst werden, weshalb an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen wird. Die in Abbildung 29 und in Tabelle 10 gezeigten Ethanolausbeuten sind auf die maximale Glucosemenge bezogen, welche durch vollständige Hydrolyse der Stärke und Cellulose aus dem Biertreber freigesetzt werden konnte. Für die

Darstellung der Ethanolausbeuten sind die Versuche in Abbildung 29 zuerst nach der Natronlaugenkonzentration, bei gleicher Konzentration nach der Temperatur und bei gleicher Temperatur nach der Versuchszeit während der Aufschlüsse sortiert. Es wird deutlich, dass durch Aufschluss mit einer Natronlaugenkonzentration von 1 % (w/v) die Ausbeute am geringsten war. Durch Erhöhung der Temperatur und Verweilzeit bei dieser Konzentration erhöhte sich gleichzeitig die Ethanolausbeute. Bei einer Konzentration von 3 bzw. 5 % (w/v) wurde anschließend ein Plateau erreicht. Die Ergebnisse schwankten hier um eine Ausbeute von ca. 18,5 %, was einer Konzentration von rund 2,2 g/l entsprach.

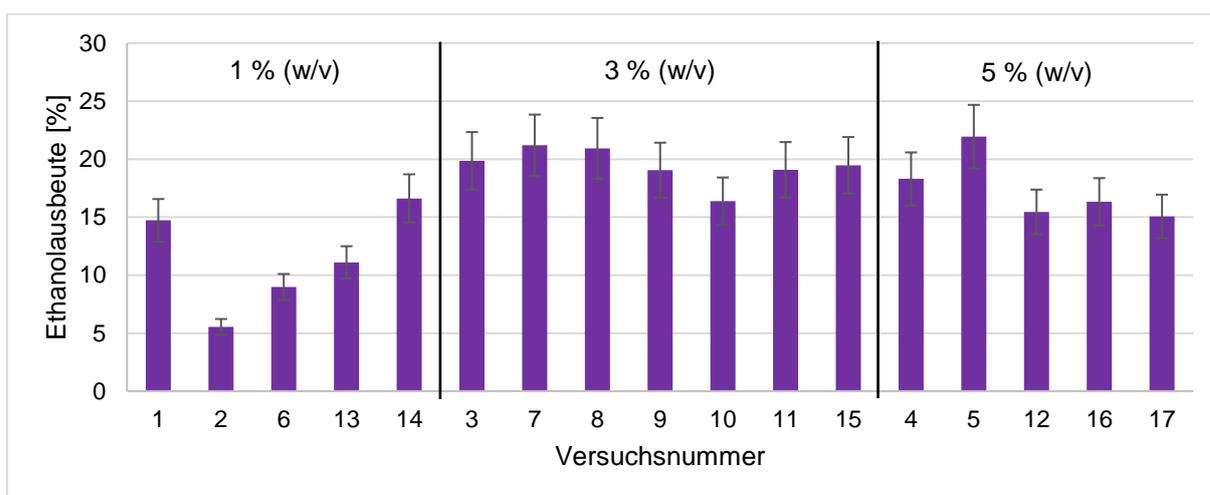


Abbildung 29: Ethanolausbeuten nach Fermentation sortiert nach Konzentration, Temperatur und Versuchszeit der Aufschlüsse

Bei der Bewertung der Aufschlüsse ist darauf zu achten, dass makroskopisch ein anderer Trend als bei den Messergebnissen der HPLC zu beobachten war. In weiteren Versuchen wäre zu klären, aus welchen Stoffen der feine Feststoff nach der enzymatischen Verzuckerung aufgebaut war und ob möglicherweise durch eine andere Enzymmischung die Ausbeute der Monosaccharide und im Anschluss die Ethanolausbeute deutlich gesteigert werden kann. Nur bei einer erheblichen Steigerung der erzielten Ethanolkonzentrationen ist eine wirtschaftliche Anwendung denkbar. In Kapitel 5.3.3 wird darauf noch einmal etwas genauer eingegangen. Da makroskopisch die Ergebnisse der Aufschlüsse sehr vielversprechend waren, kann möglicherweise durch Optimierung der Verzuckerung die Ausbeute deutlich erhöht werden.

5.3 Saure Versuchsreihe

5.3.1 Ergebnisse der Biertreberaufschlüsse mit verdünnter Schwefelsäure

In den gemessenen Chromatogrammen nach den sauren Aufschlüssen wurden die Peaks im Vergleich zu den Messungen nach den alkalischen Aufschlüssen deutlich weniger durch Stör-signale überlagert. Dies führte zu einer Verbesserung der Genauigkeit bei der Bestimmung der Massenkonzentrationen. Die Betrachtung der Messunsicherheit erfolgte wie in Kapitel 5 beschrieben. In der nachfolgenden Tabelle sind die gemessenen Massenkonzentrationen ausgewählter Stoffe sowie die Ausbeute an Monosacchariden der Hemicellulose aufgelistet.

Tabelle 11: Gemessene Massenkonzentrationen und Ausbeuten an Monosacchariden der Hemicellulose nach Aufschluss mit Schwefelsäure

Nr.	Glucose [g/l]	Xylose [g/l]	Arabi-nose [g/l]	Essig-säure [g/l]	Ameisen-säure [g/l]	HMF [mg/l]	Furfural [mg/l]	Ausbeute an Monosacchariden der Hemicellulose [%]
1	–	0,04	1,66	0,15	0,018	–	< 1	5,1
2	–	0,10	2,86	0,32	0,023	< 1	< 1	8,8
3	0,06	0,14	3,13	0,59	0,015	< 1	< 1	9,9
4	–	0,10	2,80	0,19	0,036	< 1	< 1	8,9
5	0,04	0,34	3,83	0,32	0,036	< 1	< 1	12,8
6	0,07	0,85	4,30	0,31	0,042	< 1	< 1	15,3
7	0,07	0,79	4,04	0,31	0,027	< 1	< 1	14,6
8	0,13	1,90	4,32	0,85	0,019	< 2	1,9	18,7
9	0,17	1,98	4,36	0,79	0,020	< 2	1,9	19,0
10	0,13	2,01	4,37	0,45	0,021	< 2	1,8	19,1
11	0,22	3,39	4,54	0,47	0,043	< 2	3,7	23,9
12	0,20	3,47	4,49	0,75	0,018	< 2	3,4	24,2
13	0,41	5,01	4,88	0,72	0,018	< 2	6,0	29,7
14	1,25	9,02	4,75	0,96	0,016	4,3	29,9	40,1
15	1,55	9,36	4,63	0,86	0,019	4,1	34,9	41,5
16	1,22	9,14	4,75	0,94	0,018	2,6	23,0	42,0
17	2,28	9,66	4,51	0,87	0,023	8,5	86,2	43,1

Prozentuale mittlere Streuung der Einzelmessungen bestimmt anhand der drei Versuche des zentralen Versuchspunkts: Glucose: $\pm 14,5\%$; Xylose: $\pm 2,8\%$; Arabinose: $\pm 0,6\%$; Essigsäure: $\pm 30,5\%$; Ameisensäure: Messwerte außerhalb der Kalibrierung; HMF: $\pm 4,7\%$; Furfural: $\pm 3,3\%$, Ausbeute an Monosacchariden der Hemicellulose: $\pm 1,2\%$

Vor der Auswertung der Ergebnisse wird auf einige Herausforderungen bei der Bestimmung der Massenkonzentrationen eingegangen. Die Messwerte der Glucose wurden bei allen Messungen etwas zu groß bestimmt, da das Messsignal durch ein Störsignal überlagert wurde. Bei kleinen Signalen (0,1 – 0,2 g/l) zeigte sich die Überlagerung durch eine Peak-schulter auf der linken Seite (zu kleineren Retentionszeiten). Je größer das Messsignal wurde, desto weniger war die Peakschulter ausgeprägt. Signale oberhalb von 1 g/l besaßen keine Peakschulter, bei diesen Signalen zeigte sich die Überlagerung durch ein leichtes Fronting. Dies deutet darauf hin, dass mit steigender Glucosekonzentration der prozentuale Anteil des Störsignals am Gesamtsignal abnahm, wodurch die Genauigkeit anstieg. Für Versuch 1, 2 und 4 war keine quantitative Auswertung der Glucosemenge möglich. Dies lag daran, dass das Signal der Glucose ungefähr so groß wie das Störsignal war. Für diese Versuche ist mit Konzentrationen unter 10 mg/l zu rechnen. Im Allgemeinen war die Glucosefreisetzung wie zu erwarten durch die Aufschlüsse relativ gering. In Abbildung 30 ist die Glucosekonzentration der einzelnen Versuche grafisch gezeigt. Hierfür wurden die Versuche zuerst nach der Temperatur und bei gleicher Temperatur nach der Konzentration sortiert, bei gleicher Konzentration folgte eine Sortierung nach der Versuchszeit. Mit zunehmender Temperatur stieg die Glucosefreisetzung an, besonders deutlich wird dies bei der Betrachtung der Versuche 3, 8 und 15. Bei diesen Versuchen betrug die Temperatur 65, 80 und 95 °C bei gleichzeitig konstanter Konzentration und Verweilzeit. Durch Erhöhung der Konzentration sowie der Versuchszeit stieg die Menge an freigesetzter Glucose ebenfalls an. Der Einfluss beider Größen ist jedoch eher gering, wie in Abbildung 30 zu erkennen ist. Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit stammt die Glucose aus den Resten der noch im Biertreber enthaltenen Stärke, welche unter den Aufschlussbedingungen zu Glucose hydrolysiert wurde. Ein Aufschluss der Cellulose ist unter den milden Reaktionsbedingungen laut Literatur nicht zu erwarten, was mit den Messwerten sehr gut übereinstimmt.

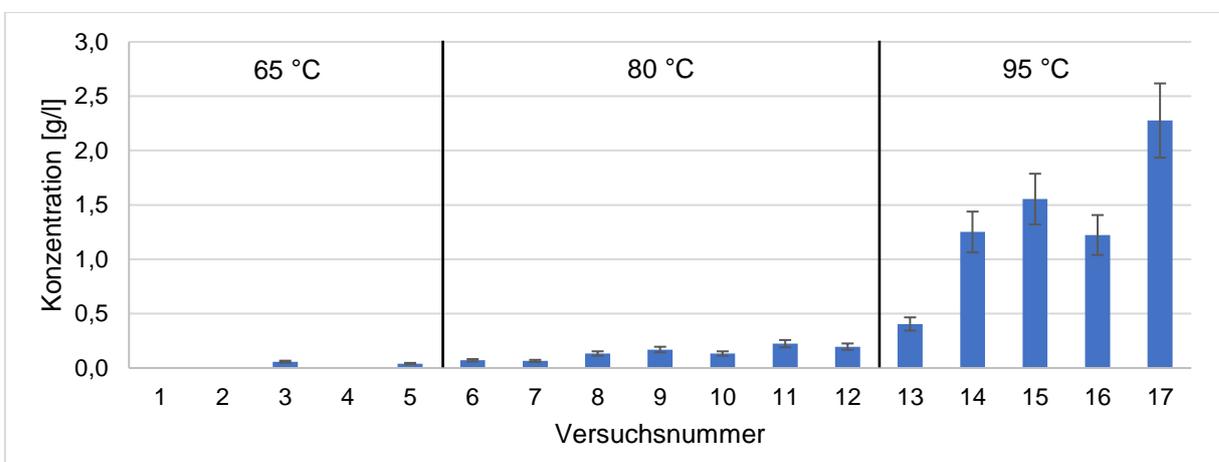


Abbildung 30: Massenkonzentrationen der freigesetzten Glucose durch Aufschluss mit verdünnter Schwefelsäure sortiert nach Temperatur, Konzentration und Zeit der Aufschlüsse

Bei den Peaks der Xylose, Arabinose und Essigsäure, welche ein Maß für die Freisetzung der Hemicellulose sind, waren keine Überlagerungen im Chromatogramm zu erkennen. Eine detaillierte Bewertung der Aufschlüsse anhand der Freisetzung der Essigsäure war nicht möglich, weil die Massenkonzentration der Essigsäure auch unter gleichen Versuchsbedingungen stark schwankte (siehe Tabelle 11 Versuch 8, 9, 10). Dennoch ist ein allgemeiner Trend zu erkennen. Mit steigender Temperatur erhöhte sich der Abbau der Acetylgruppen, wodurch die Konzentration der Essigsäure zunahm. Ein möglicher Grund für die Schwankung der Essigsäure ist, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass während der Lagerung im Kühlschrank Mikroorganismen Essigsäure aus leicht abbaubaren Stoffen gebildet haben.

In Abbildung 31 sind die gemessenen Massenkonzentrationen der Xylose und Arabinose grafisch dargestellt. Die Versuche sind dabei wie zuvor in Abbildung 30 sortiert. Bei der Freisetzung der Xylose ist eindeutig zu erkennen, dass mit steigender Temperatur der Abbau des Xylans zunahm. Durch Erhöhung der Zeit sowie Konzentration konnte die Freisetzung der Xylose ebenfalls leicht gesteigert werden. Den mit Abstand größten Effekt auf die Freisetzung hatte die Temperatur. Der Anstieg der Arabinosefreisetzung begann bei deutlich mildereren Bedingungen als die Freisetzung der Xylose. Dies wurde schon von Kempainen et al. beschrieben [43]. Auch bei der Freisetzung der Arabinose hatte die Temperatur den größten Effekt. Durch Erhöhung der Temperatur von 65 auf 80 °C wurde nahezu ein Plateau erreicht. Je nach Aufschlussbedingungen schwankten die erzielten Massenkonzentrationen bei 80 bzw. 95 °C zwischen 4,0 und 4,9 g/l. Im Mittel betrug die Freisetzung 4,5 g/l.

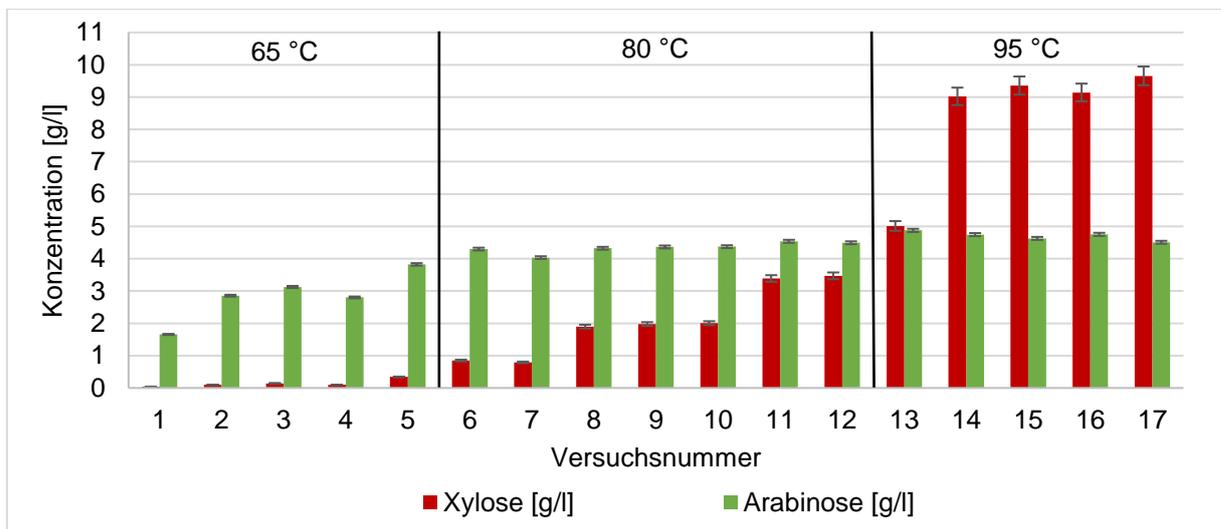


Abbildung 31: Massenkonzentrationen der freigesetzten Xylose und Arabinose durch Aufschluss mit verdünnter Schwefelsäure sortiert nach Temperatur, Konzentration und Zeit der Aufschlüsse

Die Ergebnisse der Ameisensäure können nur zur groben Einordnung der Bildung von Abbauprodukten genutzt werden. Grund dafür ist, dass für die organischen Säuren der RI-Detektor nur im Bereich zwischen 0,1 und 1 g/l sicher kalibriert werden konnte. Bei kleineren Signalen war das Signal/Rausch-Verhältnis zu klein, um die Konzentration sicher zu bestimmen, weshalb bei kleineren Konzentrationen mit gravierenden Messabweichungen zu rechnen war. Bspw. betrug die reale Konzentration des kleinsten gemessenen Standards der Ameisensäure 11,6 mg/l, mit der Kalibrierung wurde die Konzentration im Mittel 82 % zu groß bestimmt (21,1 mg/l). Je größer die reale Konzentration war (bis 100 mg/l), desto kleiner wurde die Abweichung. Bei einer Konzentration von 58 mg/l wurde die Konzentration durch die Kalibrierung im Mittel 15 % zu groß bestimmt. Da die Massenkonzentration der Ameisensäure eher zu groß bestimmt wurde, ist bei einer maximal ermittelten Konzentration von rund 40 mg/l mit einem geringen Abbau der Monosaccharide zu rechnen (siehe Tabelle 11), was für die milden Versuchsbedingungen spricht.

Für die Stoffe HMF und Furfural konnten aufgrund der ausgeprägten Absorptionsbanden deutlich geringere Konzentrationen als bei den zuvor genannten Stoffen mit dem DAD bestimmt werden. Die Bestimmungsgrenze beider Stoffe wurde vor allem durch die Qualität der Basislinie beeinflusst. Dies war besonders bei der Bestimmung von HMF zu beachten. Im Bereich des HMF-Peaks waren die Schwankungen der Basislinie im Verhältnis zur Peakgröße des Signals so groß, dass bei Konzentrationen kleiner 2 mg/l keine quantitative Auswertung möglich war. Des Weiteren wurden beide Stoffe nur im Bereich von 2 – 200 mg/l kalibriert. Die Angaben < 1 und < 2 mg/l in Tabelle 11 dienen ausschließlich zur ungefähren Abschätzung der Größenordnung. Die Schwankungen der Basislinie sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die komplexe Probenmatrix zurückzuführen. Sicher konnte HMF nur in den Proben 14, 15, 16 und 17 nachgewiesen werden. Unter den mildesten Versuchsbedingungen (Versuch 1) war kein Signal im Chromatogramm zu sehen. Auch wenn die maximale HMF-Konzentration mit 8,5 mg/l sehr gering war, sollte bei Versuchen mit Temperaturen oberhalb von 95 °C auf die Bildung von HMF geachtet werden. Durch Erhöhung der Temperatur von 80 auf 95 °C kam es zu einem deutlichen Anstieg der Konzentration. Die HMF-Konzentration in den Proben sollte jedoch nicht überbewertet werden, da zum Vergleich der mittlere Massenanteil von HMF in Lebensmitteln wie z. B. Aprikosenkonfitüre 36,3 mg/kg beträgt [67]. Der Einfluss der Schwefelsäurekonzentration sowie der Versuchszeit auf den Anstieg der Bildung von HMF ist im untersuchten Bereich deutlich geringer als der Einfluss der Temperatur.

Das Signal von Furfural kam relativ spät im Chromatogramm (erst nach 46 min), wodurch die meisten potenziellen Störstoffe schon eluiert waren. Infolgedessen war die Basislinie nicht so wellig und die Massenkonzentrationen konnten im Allgemeinen besser als die von HMF bestimmt werden. Bei den Versuchen 1 – 7 war die Furfuralkonzentration dennoch so klein, dass auch hier nur eine Angabe der ungefähren Größenordnung sicher möglich war. In

Abbildung 32 sind zur Abschätzung der Bildung von Furfural auch für die Versuche 1 – 7 die gemessenen Konzentrationen angegeben (die Angaben sollen nur zur Orientierung dienen). Die Versuche in Abbildung 32 wurden ebenfalls wie in Abbildung 30 sortiert. Das Diagramm zeigt, dass die Bildung von Furfural stark von der Temperatur abhängig war. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse der Aufschlüsse bei 95 °C, dass durch eine Erhöhung der Schwefelsäurekonzentration sowie der Versuchszeit die Bildung von Furfural ebenfalls zunahm. Bei Versuchen unter höheren Temperaturen (> 100 °C) zur Verbesserung des Hemicelluloseabbaus sollte aufgrund des deutlichen Anstiegs weiter auf die Entwicklung der Furfural- und HMF-Konzentration geachtet werden. Des Weiteren ist darauf hinzuweisen, dass es aufgrund des offenen Versuchsaufbaus während der Aufschlüsse zur Verflüchtigung beider Stoffe kommen konnte. In einem geschlossenen Reaktor könnten daher die Konzentrationen etwas höher ausfallen.

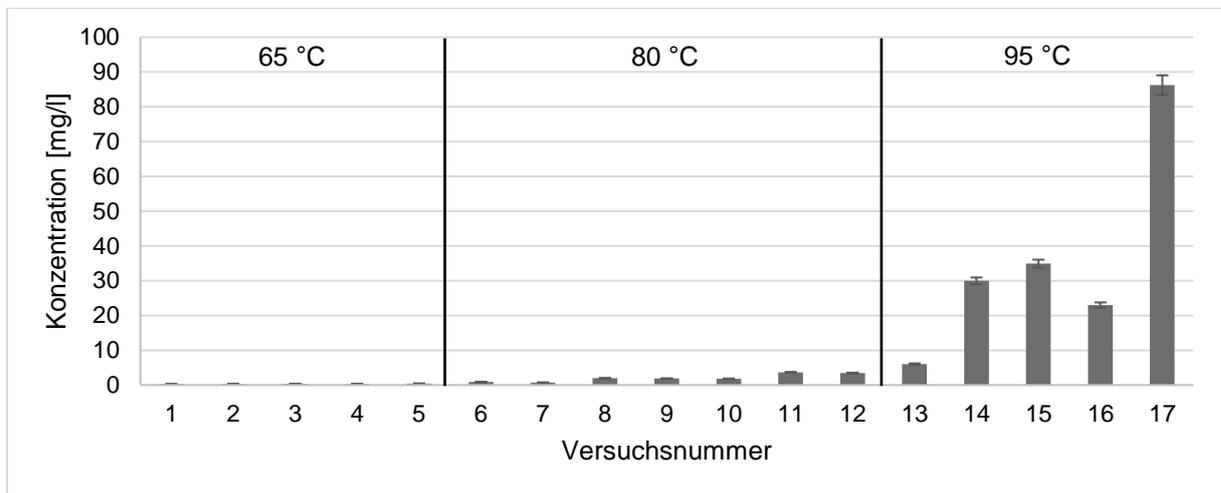


Abbildung 32: Durch Aufschluss mit verdünnter Schwefelsäure gebildete Furfuralmassenkonzentrationen sortiert nach Temperatur, Konzentration und Zeit der Aufschlüsse

Makroskopisch war nach den sauren Aufschlüssen im Vergleich zu den alkalischen nur eine geringfügige Veränderung des Biertreibers zu beobachten. Abbildung 33 zeigt die verschiedenen Ergebnisse in Abhängigkeit der Temperatur. Bei Aufschlüssen unter 65 °C waren optisch nahezu keine Veränderungen im Vergleich zum unbehandelten Biertreiber zu erkennen (siehe Abbildung 23 links oben). Das Ergebnis passt sehr gut zu den niedrigen Massenkonzentrationen, welche mit der HPLC bestimmt wurden. Durch eine Erhöhung der Temperatur auf 80 bzw. 95 °C waren optisch bessere Aufschlussresultate zu erkennen. Zwischen beiden Temperaturen konnte optisch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Auch zwischen verschiedenen Versuchszeiten sowie Schwefelsäurekonzentrationen waren keine deutlichen Unterschiede zu sehen. Bei 80 und 95 °C wurde der Verbund der Schale teilweise voneinander getrennt, wodurch viele kleine Faserbruchstücke zu erkennen waren. Die Reste

des Keimlings, welche bei 65 °C noch deutlich sichtbar waren, lösten sich unter diesen Bedingungen auf. Die Farbe der Aufschlüsse war bei allen Versuchen beige-milchig.

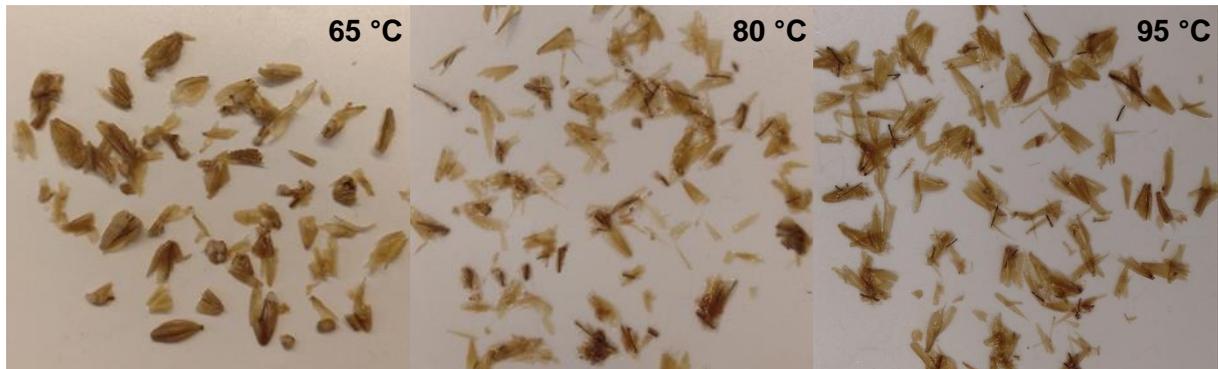


Abbildung 33: Makroskopische Aufnahmen des Biertrebers direkt nach saurem Aufschluss, von links nach rechts: steigende Temperatur (65, 80, 95 °C) bei identischer Schwefelsäurekonzentration (4 % (w/v)) und Versuchszeit (120 min)

Durch die sauren Aufschlüsse konnte die Hemicellulose gezielt aus dem Komplex entfernt werden, was zu einer Anreicherung der Cellulose im Feststoff führte. Als Parameter für den Erfolg der Aufschlüsse wurde die Ausbeute der Monosaccharide aus der Hemicellulose bestimmt. Für die detailliertere Auswertung der Ausbeuten an Monosacchariden aus der Hemicellulose wurden die Ergebnisse der statistischen Versuchsplanung mit der Software Statistica analysiert. Die Ergebnisse der Modellgleichung entsprechen den zu erwartenden Ausbeuten an Monosacchariden der Hemicellulose in Prozent. Die ermittelten Koeffizienten sowie deren Konfidenzintervalle sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt. Für den Ansatz der Modellgleichung siehe Gleichung (5) in Kapitel 4.3. In Anhang 1 der Arbeit sind des Weiteren die durch das Modell vorhergesagten Ausbeuten, die Abweichung der Modellwerte von den experimentell bestimmten Ergebnissen und das Paritätsdiagramm beigefügt. Das Bestimmtheitsmaß der angepassten Modellgleichung ($R^2 = 0,9807$) sowie das Paritätsdiagramm zeigen, dass mit Hilfe der Software die Modellgleichung gut an die Messergebnisse (siehe Tabelle 11) angepasst werden konnte.

Tabelle 12: Regressionskoeffizienten und deren Konfidenzintervalle zur Vorhersage der Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose direkt nach Aufschluss mit verdünnter Schwefelsäure

Koeffizient	Wert des Koeffizienten	Konfidenzintervall 95 %
b_0	64,1	$2,2 \leq b_0 \leq 126,0$
b_T	-2,5	$-4,1 \leq b_T \leq -0,9$
b_{T^2}	0,022	$0,012 \leq b_{T^2} \leq 0,032$
b_t	0,047	$0,024 \leq b_t \leq 0,071$
b_c	2,1	$1,2 \leq b_c \leq 3,1$

Mit Hilfe des Modells konnten die folgenden beiden Diagramme erstellt werden. Es wird besonders deutlich, dass vor allem die Temperatur den Erfolg des Aufschlusses maßgeblich bestimmt (siehe Abbildung 34). Der Einfluss der Versuchszeit sowie der Konzentration der Schwefelsäure war eher gering, siehe dazu Abbildung 35. Des Weiteren wird deutlich, dass im untersuchten Zeit- und Konzentrationsbereich beide Faktoren ungefähr den gleichen Einfluss auf die Ausbeute hatten. Bei Betrachtung beider Diagramme zeigt sich, dass bei maximaler Temperatur, Konzentration und Zeit die höchste Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose zu erwarten ist. Bei einer Temperatur von 95 °C, einer Verweilzeit von 180 min und einer Konzentration von 5,5 % (w/v) Schwefelsäure wurde experimentell eine Ausbeute von 43,1 % ermittelt. Durch das Modell wird für diese Versuchsbedingungen eine Ausbeute von 45,3 % vorhergesagt. Dies entspricht einer Abweichung von gerade einmal 5 %.

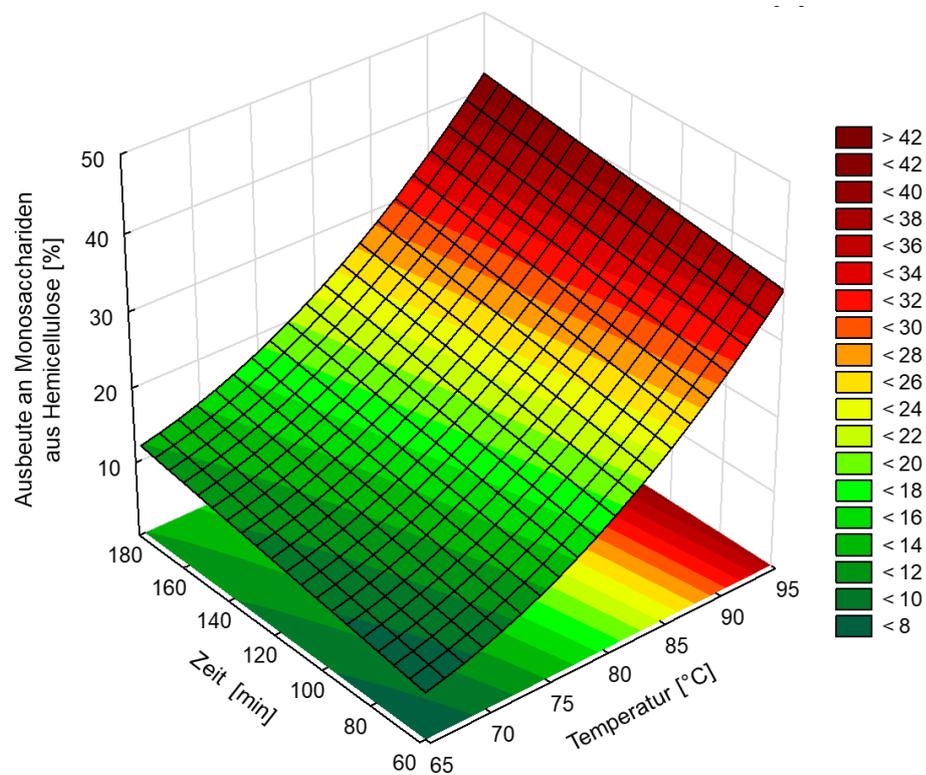


Abbildung 34: Abhängigkeit der Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose von der Zeit sowie Temperatur bei konstanter Schwefelsäurekonzentration von 4 % (w/v) direkt nach saurem Aufschluss

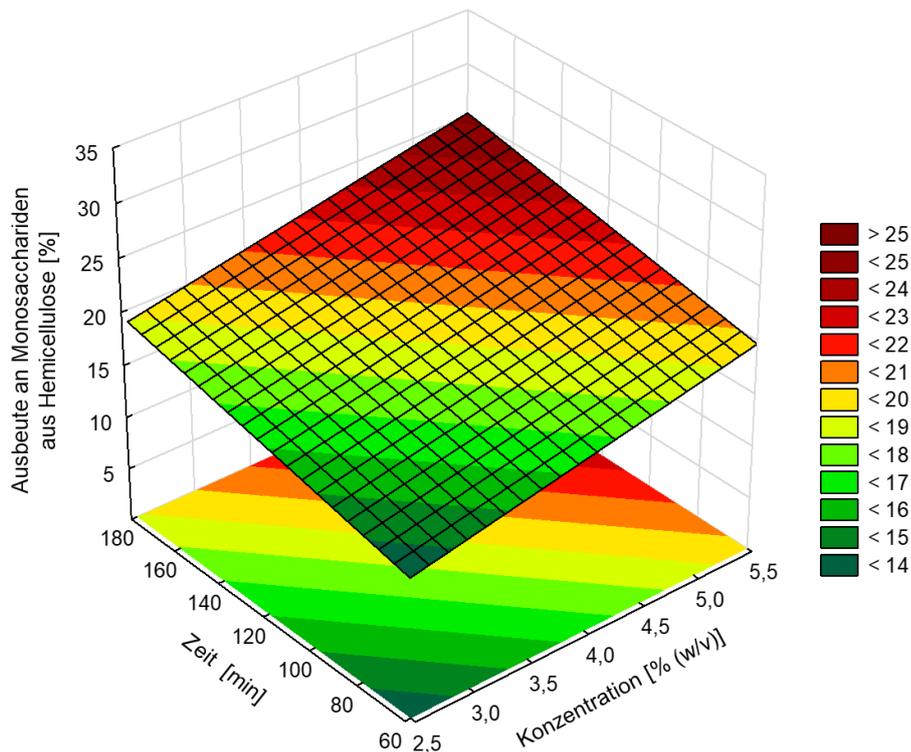


Abbildung 35: Abhängigkeit der Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose von der Zeit sowie Konzentration an verdünnter Schwefelsäure bei konstanter Temperatur von 80 °C direkt nach saurem Aufschluss

5.3.2 Ergebnisse der enzymatischen Verzuckerung nach saurem Aufschluss des Biertreibers

Das Vorgehen für die Auswertung der Ergebnisse nach der enzymatischen Verzuckerung erfolgte analog der Auswertung in den letzten Kapiteln. Im Allgemeinen wiesen die Chromatogramme sehr gut auswertbare Peaks auf. In Tabelle 13 sind die gemessenen Massenkonzentrationen ausgewählter Stoffe aufgelistet. Des Weiteren wird die erzielte Ausbeute an Glucose und an Monosacchariden der Hemicellulose gezeigt. Auf die Abbauprodukte der Zucker Furfural, HMF sowie Ameisensäure wird an dieser Stelle nicht erneut eingegangen, da unter den milden Bedingungen der enzymatischen Verzuckerung nicht mit einem Abbau der Zucker zu rechnen war.

Tabelle 13: Gemessene Massenkonzentrationen und Ausbeuten an Glucose sowie Monosacchariden der Hemicellulose nach enzymatischer Verzuckerung der Proben (saure Versuchsreihe)

Nr.	Glucose [g/l]	Xylose [g/l]	Arabinose [g/l]	Essigsäure [g/l]	Glucoseausbeute [%]	Ausbeute an Monosacchariden der Hemicellulose [%]
1	3,29	1,97	1,86	0,20	15,6	11,9
2	3,09	2,48	2,80	0,44	14,6	16,3
3	4,29	2,93	3,05	0,63	20,6	18,8
4	3,88	2,49	2,80	0,26	18,9	16,9
5	3,87	2,23	3,53	0,43	18,9	18,4
6	4,66	2,99	3,95	0,40	22,0	21,4
7	4,58	3,48	3,69	0,40	22,0	22,6
8	4,44	3,71	4,08	0,90	21,3	24,4
9	4,66	4,19	4,01	0,83	22,3	25,6
10	4,63	4,27	4,02	0,50	22,2	25,9
11	4,99	5,31	4,24	0,52	23,9	30,0
12	4,60	5,19	4,19	0,77	22,3	29,7
13	5,36	6,16	4,52	0,78	25,6	33,3
14	5,33	8,61	4,41	0,96	24,7	39,4
15	5,82	9,54	4,63	0,91	27,4	43,7
16	5,21	8,53	4,32	0,93	25,0	40,4
17	5,45	9,37	4,35	0,85	26,3	43,4

Prozentuale mittlere Streuung der Einzelmessungen bestimmt anhand der drei Versuche des zentralen Versuchspunkts: Glucose: $\pm 2,7$ %; Xylose: $\pm 7,5$ %; Arabinose: ± 1 %; Essigsäure: $\pm 28,9$ %; Glucoseausbeute: $\pm 2,5$ %; Ausbeute an Monosacchariden der Hemicellulose: $\pm 3,1$ %

Bei der Glucosefreisetzung war ein deutlicher Anstieg im Vergleich zu den gemessenen Konzentrationen direkt nach dem Aufschluss zu erkennen. Durch Erhöhung der Temperatur während der vorgeschalteten Aufschlüsse konnte die Freisetzung der Glucose durch die Enzyme deutlich gesteigert werden. Die Konzentration sowie die Versuchszeit während der Aufschlüsse hatten hingegen nur geringfügigen Einfluss auf die Glucosefreisetzung nach der Verzuckerung. Nach einer Vorbehandlung bei 65 °C betrug die mittlere Glucosekonzentration nach der Verzuckerung 3,7 g/l, durch Erhöhung der Temperatur während der Vorbehandlung auf 80 °C stieg sie auf 4,7 g/l an. Durch weitere Erhöhung der Temperatur auf 95 °C während der Vorbehandlung konnte die Glucosekonzentration nach der Verzuckerung im Mittel auf 5,4 g/l gesteigert werden.

Der Anstieg der Xylose durch die Verzuckerung ist in Abbildung 36 grafisch dargestellt. Die Versuche sind dafür in folgender Reihenfolge sortiert: zuerst nach der Temperatur, bei gleicher Temperatur nach der Konzentration und bei gleicher Konzentration nach der Versuchszeit. Die

Freisetzung der Xylose wird vor allem durch die Temperatur während der Aufschlüsse bestimmt. Die Schwefelsäurekonzentration sowie die Versuchszeit während der vorgeschalteten Aufschlüsse hatten auf die Freisetzung der Xylose nur einen geringen Einfluss. Ein eindeutiger Trend bezüglich der beiden Einflussgrößen war anhand der Messergebnisse nicht zu beobachten (siehe Abbildung 36). Die Xylose zeigte nur bei Versuchen mit Aufschluss-temperaturen unterhalb von 95 °C nach der Verzuckerung eine deutliche Steigerung der gelösten Massenkonzentrationen. Der mittlere Anstieg der Xylosekonzentration durch die Enzyme betrug 2,2 g/l bei diesen Versuchen.

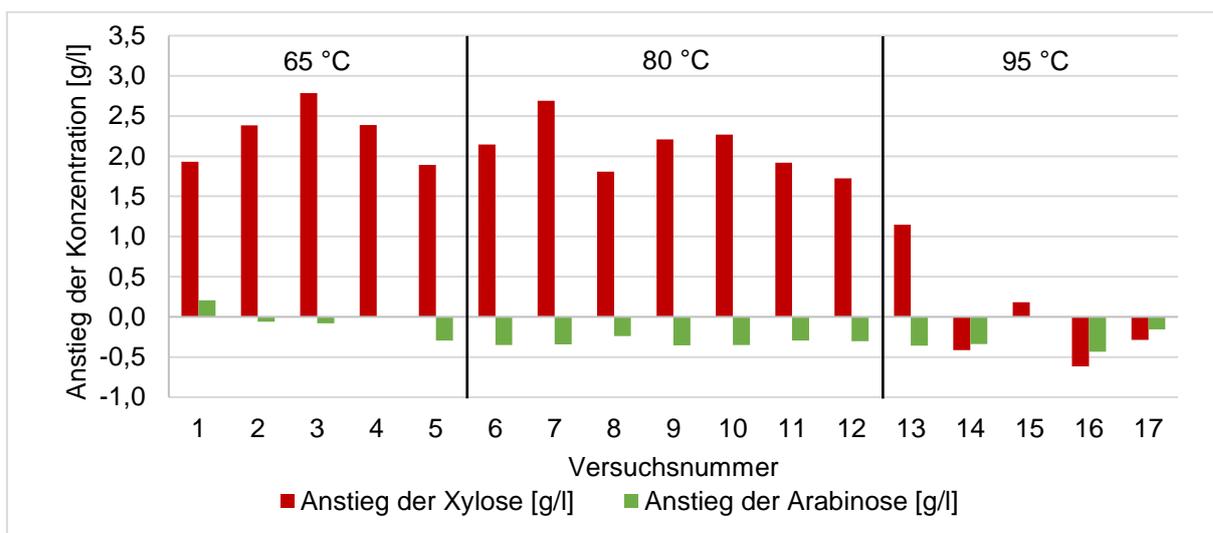


Abbildung 36: Anstieg der Massenkonzentrationen von Xylose und Arabinose durch enzymatische Verzuckerung sortiert nach Temperatur, Konzentration und Zeit der Aufschlüsse

Bei den Aufschlüssen mit einer Temperatur von 95 °C wurde nach der enzymatischen Verzuckerung teilweise sogar ein Rückgang der Konzentration beobachtet. Versuch 13 (95 °C, 60 min, 2,5 % (w/v)) ist der einzige Versuch bei 95 °C, welcher einen deutlichen, wenn auch geringeren Anstieg der Xylose im Vergleich zu den anderen Versuchen nach der Verzuckerung aufzeigte. Bei Versuch 13 stieg die Massenkonzentration um 1,2 g/l an. Der Versuch wies jedoch schon direkt nach dem Aufschluss im Vergleich zu den restlichen Aufschlüssen bei 95 °C eine deutlich geringere Xylosekonzentration auf. Für die Abnahme bzw. Stagnierung der Xylosetfreisetzung bei Versuch 14, 15, 16 und 17 gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Am wahrscheinlichsten ist, dass der Rückgang auf eine Verdünnung durch Zugabe der Enzymmischungen sowie auf die Messunsicherheit bei der Bestimmung der Konzentration zurückzuführen ist. Infolge der Enzymzugabe kam es zu einer rechnerischen Reduktion der Massenkonzentration von rund 4 %, wenn keine Xylose freigesetzt wurde. Der Verlauf des Hemicelluloseabbaus durch sauren Aufschluss in Abbildung 34 und Abbildung 35 deutet nicht darauf hin, dass bei den härtesten Aufschlussbedingungen bereits ein Plateau erreicht wurde und der

restliche Abbau der Hemicellulose deutlich schwerer ist. Möglicherweise waren die Enzyme nicht in der Lage effektiv die Hemicellulose direkt aus der teilaufgeschlossenen Lignocellulose zu entfernen. Das gleiche Ergebnis wurde bei der Untersuchung der Nullprobe festgestellt. Der Anstieg bei allen anderen Versuchen außer bei Versuch 14, 15, 16 und 17 könnte möglicherweise auf in Lösung befindliche Xylanbruchstücke zurückzuführen sein, welche unter den milden Reaktionsbedingungen der Aufschlüsse nicht vollständig zu Xylose abgebaut wurden. In der nachgeschalteten Verzuckerung konnten eventuell diese Bruchstücke durch die Enzyme hydrolysiert werden. Die genaue Ursache konnte nicht geklärt werden.

Bei Betrachtung der gelösten Menge an Arabinose war auffällig, dass bei fast allen Versuchen ein Rückgang im Vergleich zu den gemessenen Ergebnissen direkt nach den Aufschlüssen zu verzeichnen war (siehe Abbildung 36). Auch hier ist auf die Verdünnung durch Zugabe der Enzymmischungen sowie auf die Messunsicherheit hinzuweisen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Enzyme nicht in der Lage waren, die seitlichen Arabinoseverzweigungen der Hemicellulose zu hydrolysieren. Die Ergebnisse der Arabinosefreisetzung durch die enzymatische Verzuckerung in der Nullprobe passen ebenfalls gut zu dieser Vermutung.

Die gemessene Essigsäurekonzentration sowie der Anstieg der Essigsäure in Bezug auf die Konzentration direkt nach dem Aufschluss unterlag großen Schwankungen, weshalb an dieser Stelle nicht im Detail darauf eingegangen werden soll. Im Allgemeinen war mit steigender Temperatur eine Abnahme der enzymatischen Essigsäurefreisetzung aus der Hemicellulose in den Proben zu beobachten. Aufgrund der verhältnismäßig geringen Essigsäurefreisetzung durch die Enzyme war insgesamt die Konzentration in den Proben mit hohen Aufschluss-temperaturen dennoch am größten.

Makroskopisch war im Vergleich zu den alkalischen Aufschlüssen die Veränderung deutlich geringer. Die Struktur der Fasern war auch nach der enzymatischen Verzuckerung in allen Proben zu erkennen. Neben den Fasern waren feine Bruchstücke sowie kleine Körnchen zu sehen. Optisch waren die Ergebnisse vergleichbar mit denen in Abbildung 28 auf der linken Seite nach alkalischer Vorbehandlung.

Im Folgenden wird genauer auf die Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose des Biertreibers eingegangen. Die Analyse der Ergebnisse des statistischen Versuchsplans mit der Software Statistica ergab für die Modellgleichung zur Bestimmung der Ausbeute an Monosacchariden der Hemicellulose die in Tabelle 14 gezeigten Koeffizienten mit ihren Konfidenzintervallen. Das Bestimmtheitsmaß ($R^2 = 0,9659$) zeigt, dass die Modellgleichung gut an die Messergebnisse angepasst werden konnte. In Anhang 2 sind zur Beurteilung der Modellgleichung des Weiteren das Paritätsdiagramm, die durch das Modell vorhergesagten Ausbeuten und die prozentualen Abweichungen der Modellwerte von den aus den Messwerten berechneten Ausbeuten für alle Versuche gezeigt.

Tabelle 14: Regressionskoeffizienten und deren Konfidenzintervalle zur Vorhersage der Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose nach enzymatischer Verzuckerung

Koeffizient	Wert des Koeffizienten	Konfidenzintervall 95 %
b_0	-16,6	$-22,7 \leq b_0 \leq -10,5$
b_{T^2}	0,0049	$0,0044 \leq b_T \leq 0,0055$
b_t	0,037	$0,014 \leq b_t \leq 0,061$
b_c	1,8	$0,83 \leq b_c \leq 2,7$

In den folgenden beiden Diagrammen sind die Ergebnisse der Modellgleichung grafisch dargestellt. Es zeigt sich wie schon im letzten Kapitel, dass auch nach der enzymatischen Verzuckerung die beste Freisetzung der Monosaccharide aus der Hemicellulose bei maximaler Temperatur, Versuchszeit und Schwefelsäurekonzentration zu erwarten ist. Infolge des Zuwachses der Xylose durch die enzymatische Verzuckerung in ausschließlich Aufschlüssen mit milden Reaktionsbedingungen (65 und 80 °C) kommt es in Abbildung 37 zu einem etwas flacheren Anstieg des Graphen in Richtung zunehmender Temperatur im Vergleich zu Abbildung 34. Der Effekt der Versuchszeit sowie der Schwefelsäurekonzentration ist im untersuchten Intervall ungefähr gleich groß, wie in Abbildung 38 deutlich wird. Der im letzten Kapitel ermittelte geringe Einfluss beider Größen auf die Ausbeute der Monosaccharide aus der Hemicellulose wird durch die Ergebnisse nach der enzymatischen Verzuckerung bestätigt. Insgesamt war der Einfluss der enzymatischen Verzuckerung auf die Freisetzung der Monosaccharide aus der Hemicellulose gering, weshalb zu untersuchen wäre, ob dies an der verwendeten Enzymmischung oder an der Effektivität der Aufschlüsse liegt.

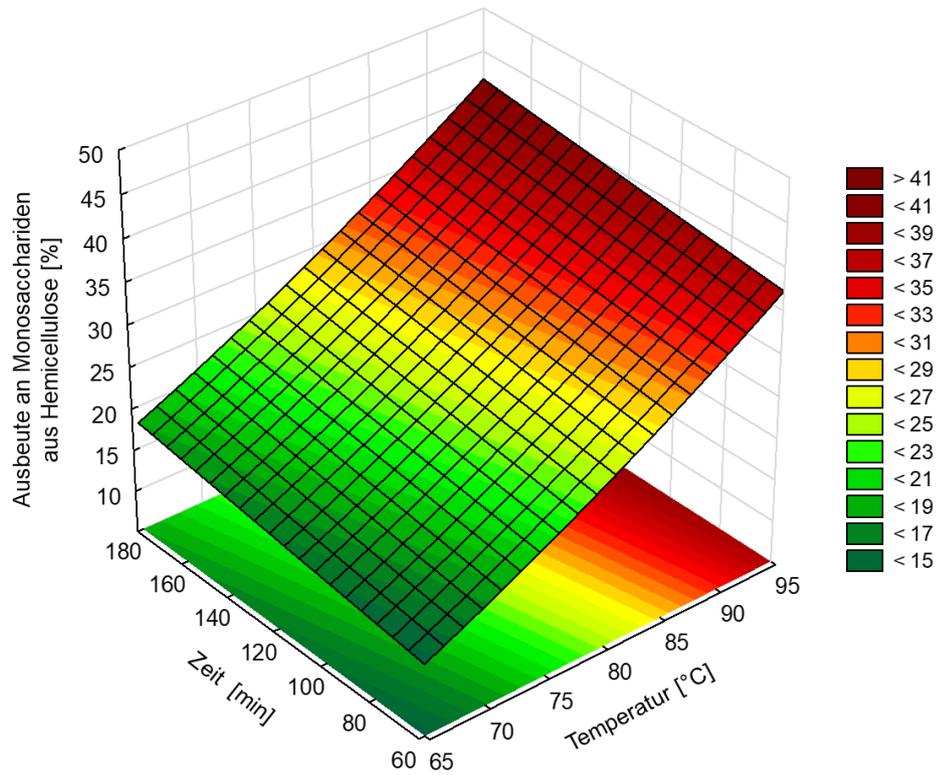


Abbildung 37: Abhängigkeit der Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose von der Zeit sowie Temperatur bei konstanter Schwefelsäurekonzentration von 4 % (w/v) (während der sauren Aufschlüsse) nach enzymatischer Verzuckerung

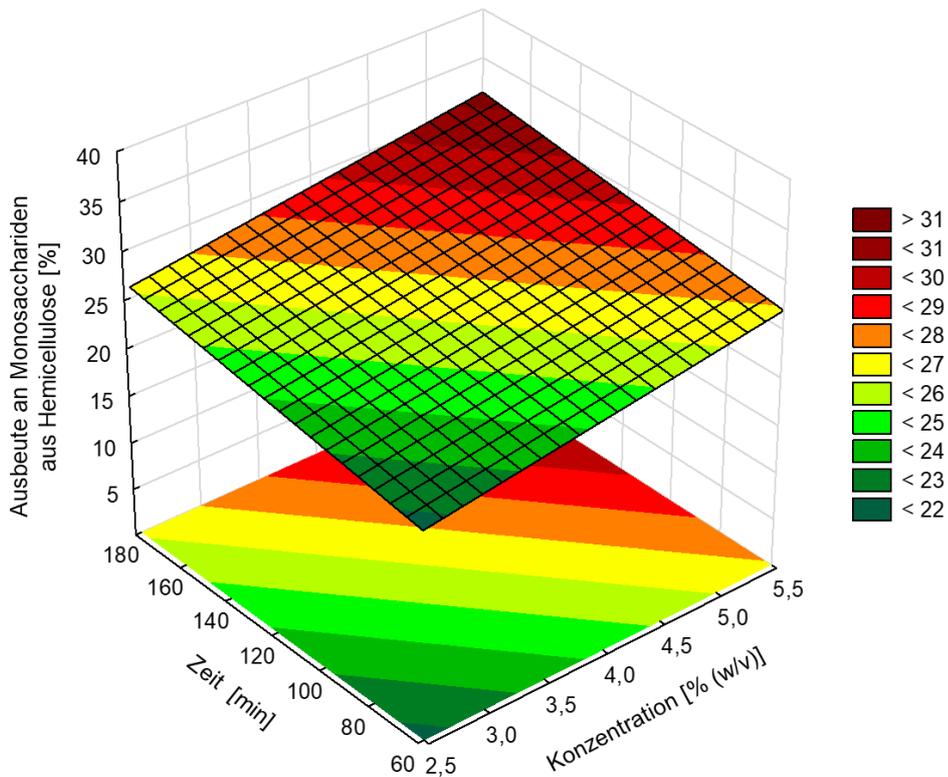


Abbildung 38: Abhängigkeit der Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose von der Zeit sowie Konzentration an verdünnter Schwefelsäure bei konstanter Temperatur von 80 °C (während der sauren Aufschlüsse) nach enzymatischer Verzuckerung

Im folgenden Abschnitt wird auf die erzielte Glucoseausbeute genauer eingegangen. Versuch 3 wurde bei der Auswertung der Ergebnisse nicht mitberücksichtigt, da nur bei diesem Versuch die berechnete Glucoseausbeute aus den Messwerten nicht durch das Modell sicher vorhergesagt werden konnte. Das Bestimmtheitsmaß ohne Versuch 3 betrug $R^2 = 0,9546$, unter Berücksichtigung des Versuchs lag es gerade einmal bei $R^2 = 0,9059$. Des Weiteren sank das mittlere Quadrat der Abweichungen deutlich durch Ausschluss von Versuch 3 von 1,43 auf 0,81. Tabelle 15 zeigt die Koeffizienten sowie deren Konfidenzintervalle nach Anpassung der Modellgleichung. In Anhang 2 sind zusätzlich das Paritätsdiagramm, die durch das Modell vorhergesagten Ausbeuten und die prozentualen Abweichungen der Modellwerte von den aus den Messwerten berechneten Ausbeuten zur Beurteilung der Modellgleichung beigelegt. Das Bestimmtheitsmaß sowie das Paritätsdiagramm zeigen, dass die Messwerte ohne Versuch 3 sehr gut durch das Modell vorhergesagt werden konnten.

Tabelle 15: Regressionskoeffizienten und deren Konfidenzintervalle zur Vorhersage der Glucoseausbeute nach der enzymatischen Verzuckerung

Koeffizient	Wert des Koeffizienten	Konfidenzintervall 95 %
b_0	-21,9	$-34,3 \leq b_0 \leq -9,46$
b_T	0,43	$0,30 \leq b_T \leq 0,56$
b_c	7,3	$2,86 \leq b_c \leq 11,74$
b_{c^2}	-0,480	$-0,94 \leq b_{c^2} \leq -0,023$
$b_{T;c}$	-0,036	$-0,067 \leq b_{T;c} \leq -0,005$

Die Analyse zeigt, dass die Glucoseausbeute nach der enzymatischen Verzuckerung nicht signifikant von der Versuchszeit während der Aufschlüsse abhing. In Abbildung 39 ist der zu erwartende Verlauf der Glucoseausbeute nach der enzymatischen Verzuckerung in Abhängigkeit der Temperatur und Konzentration während der Aufschlüsse grafisch dargestellt. Auch bei der Glucosefreisetzung ist ein eindeutiger Trend zu erkennen. Je höher die Temperatur während der Aufschlüsse war, desto mehr Glucose war nach der Verzuckerung in Lösung. Der Einfluss der Schwefelsäurekonzentration während der Aufschlüsse auf die erzielte Glucoseausbeute ist dabei deutlich kleiner als der der Temperatur. Dies ist ähnlich wie bei den zuvor beschriebenen Entwicklungen der Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose. Auffällig ist, dass bei 95 °C durch Variation der Konzentration während der Aufschlüsse die Ausbeute nur geringfügig beeinflusst werden konnte. Im Mittel betrug die aus den Messwerten berechnete Glucoseausbeute nach einer Vorbehandlung bei 95 °C ca. 25,8 %. Durch alleinige Hydrolyse der im Biertreber enthaltenen Stärke würde sich eine rechnerische Glucoseausbeute von 19 % ergeben. Anhand der Vorversuche (siehe Kapitel 5) ist jedoch nicht damit zu rechnen, dass nahezu die gesamte Glucose aus der Stärke stammt, da der Abbau der Stärke in Glucose durch die Enzyme nicht sehr effektiv war.

Die Ergebnisse der enzymatischen Verzuckerung legen nahe, dass in weiteren Untersuchungen zu klären wäre, ob die geringe Glucosefreisetzung durch Nutzung einer anderen Enzymmischung, welche auf die Freisetzung von Monosacchariden aus Lignocellulose und auf den Abbau von Stärke optimiert wurde, deutlich verbessert werden kann, oder ob tatsächlich unter diesen Bedingungen der Aufschluss der Lignocellulose so unvollständig ist, dass der enzymatische Abbau der Cellulose nur geringfügig möglich ist. Des Weiteren scheinen Aufschlüsse mit Temperaturen oberhalb von 100 °C bei niedrigen Säurekonzentrationen sehr vielversprechend zu sein, um bessere Ausbeuten zu erreichen. Diese Erkenntnis ist deckungsgleich mit anderen Forschungsberichten, in denen bei höheren Temperaturen deutlich bessere Ausbeuten erzielt wurden (siehe Rojas-Chamorro et al. in [51]).

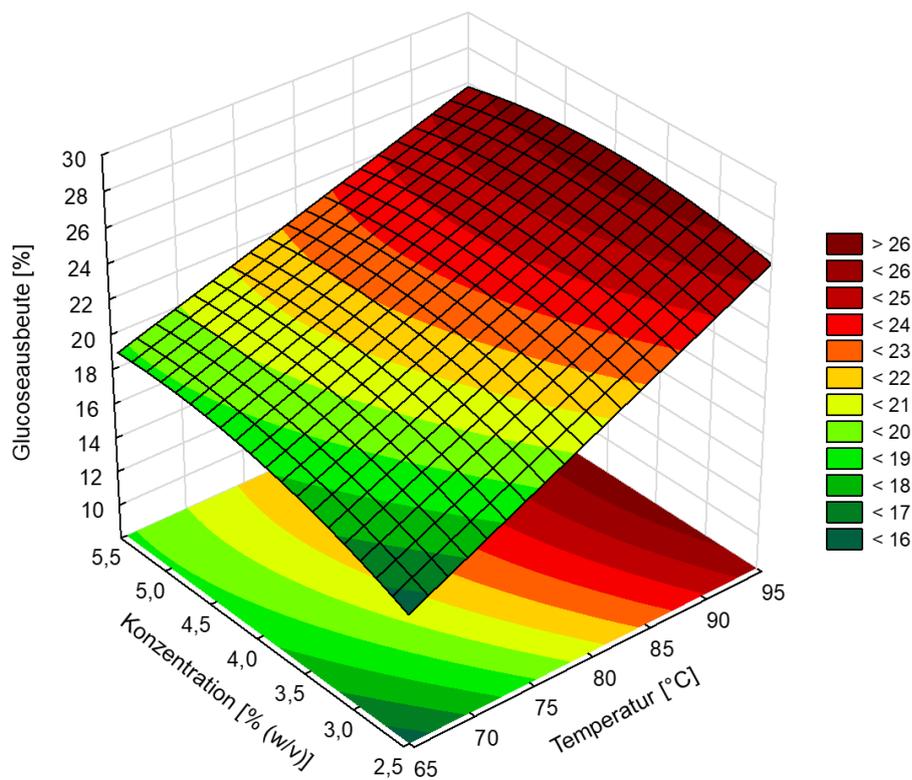


Abbildung 39: Abhängigkeit der Glucoseausbeute von der Konzentration sowie Temperatur (während der sauren Aufschlüsse) nach der enzymatischen Verzuckerung

5.3.3 Ergebnisse der Ethanolfermentation nach saurem Aufschluss und enzymatischer Verzuckerung des Biertreibers

Für die Auswertung wurde wie in den letzten Kapiteln vorgegangen. Im Allgemeinen waren die wichtigsten Signale in den Chromatogrammen gut auswertbar. Auf die Abbauprodukte der Zucker Furfural, HMF sowie Ameisensäure wird wie im letzten Kapitel nicht eingegangen, da die Signale keine deutlichen Veränderungen aufzeigten. Unter den milden Versuchsbedingungen der Fermentation war auch nicht damit zu rechnen. In Tabelle 16 sind die wichtigsten Stoffe mit ihren Massenkonzentrationen und die erzielten Ethanolausbeuten aufgeführt.

Tabelle 16: Gemessene Massenkonzentrationen und Etanolausbeuten nach Ethanolfermentation der vorbehandelten Proben (saure Versuchsreihe)

Nr.	Xylose [g/l]	Essigsäure [g/l]	Milchsäure [g/l]	Ethanol [g/l]	Ethanolausbeute [%]
1	0,70	1,62	3,46	2,01	18,6
2	2,35	0,96	4,86	1,73	16,0
3	1,83	2,49	4,60	2,57	24,2
4	1,48	2,21	3,01	2,16	20,6
5	2,68	0,76	4,17	1,93	18,4
6	2,20	3,04	5,63	2,55	23,5
7	3,24	2,59	4,84	2,51	23,6
8	2,17	3,30	5,57	2,57	24,0
9	3,87	3,74	6,78	2,67	24,9
10	4,04	3,51	6,63	2,53	23,7
11	4,51	3,63	6,60	2,65	24,9
12	2,19	4,97	8,74	2,67	25,3
13	4,95	4,13	7,97	2,93	27,4
14	6,35	4,07	7,94	3,05	27,6
15	7,55	3,60	6,75	3,25	29,9
16	6,49	3,99	6,95	2,99	28,1
17	7,30	3,76	6,29	3,22	30,4

Prozentuale mittlere Streuung der Einzelmessungen bestimmt anhand der drei Versuche des zentralen Versuchspunkts: Xylose: $\pm 30,9$ %; Essigsäure: $\pm 6,3$ %; Milchsäure: $\pm 10,4$ %; Ethanol: $\pm 2,8$ %; Ethanolausbeute: $\pm 2,7$ %

Eine sichere Auswertung der Arabinose war nicht möglich, da die Signale stark überlagert wurden. In den Chromatogrammen nach Aufschluss sowie Enzymverzuckerung war das Stör-signal noch nicht zu erkennen. Auch wenn die exakten Massenkonzentrationen nicht ermittelt werden konnten, war eindeutig eine Abnahme der Arabinose zu beobachten.

Die Konzentration der Xylose unterlag einer zufälligen, zum Teil deutlichen Abnahme, wie in Abbildung 40 zu erkennen ist. Die verwendete Backhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) ist nicht in der Lage Xylose sowie Arabinose in derartigen Mengen zu verstoffwechseln [66]. Die Abnahme der Arabinose, der nachgewiesene zufällige Abbau der Xylose sowie die Tatsache, dass nicht steril gearbeitet wurde, deuten darauf hin, dass es vor der Fermentation zu einer unerwünschten Kontamination durch Mikroorganismen kam.

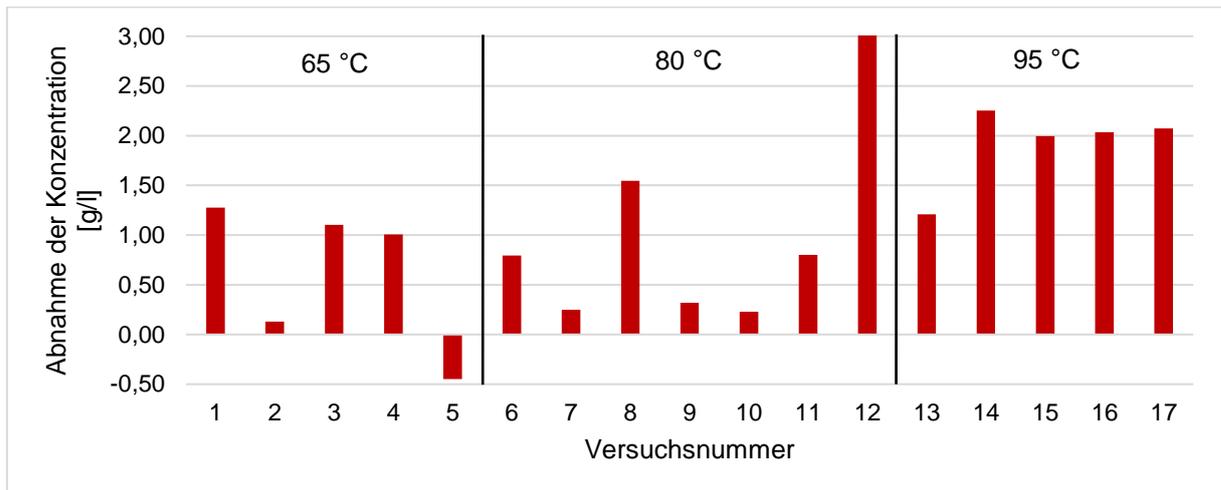


Abbildung 40: Abnahme der Xylosekonzentrationen während der Fermentation sortiert nach Temperatur, Konzentration und Zeit der Aufschlüsse

Der Abbau der Xylose und Arabinose erklärt jedoch nicht den starken Anstieg der Milchsäure- sowie Essigsäurekonzentration (siehe Abbildung 41). Nach der enzymatischen Verzuckerung waren alle gemessenen Milchsäurekonzentrationen kleiner als 1 g/l. Eine genaue Auswertung war nicht möglich, da die Konzentrationen außerhalb der Kalibrierung lagen. Dennoch stimmt die ungefähre Größenordnung überein. Für das beobachtete Verhalten gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Variante eins: Durch Kontamination wurden Mikroorganismen eingeschleust, welche in der Lage waren unter den anaeroben Bedingungen weitere Bruchstücke des Biertreibers neben den gemessenen Monosacchariden zu verstoffwechseln. Als zweite Variante ist ebenfalls denkbar, dass es simultan zur Ethanolfermentation zum Abbau des aufgeschlossenen Biertreibers durch die Enzyme kam, da diese vor der Fermentation nicht deaktiviert wurden. Durch den Abbau der Monosaccharide könnte des Weiteren eine mögliche Hemmung der Enzyme aufgehoben worden sein. Eine Freisetzung von zusätzlichen Monosacchariden sowie Mehrfachzuckern aus dem vorbehandelten Biertreiber würde ebenfalls bedeuten, dass die Menge an fermentierbarem Substrat für die Hefe und für die unbekanntenen Mikroorganismen unterschätzt wurde.

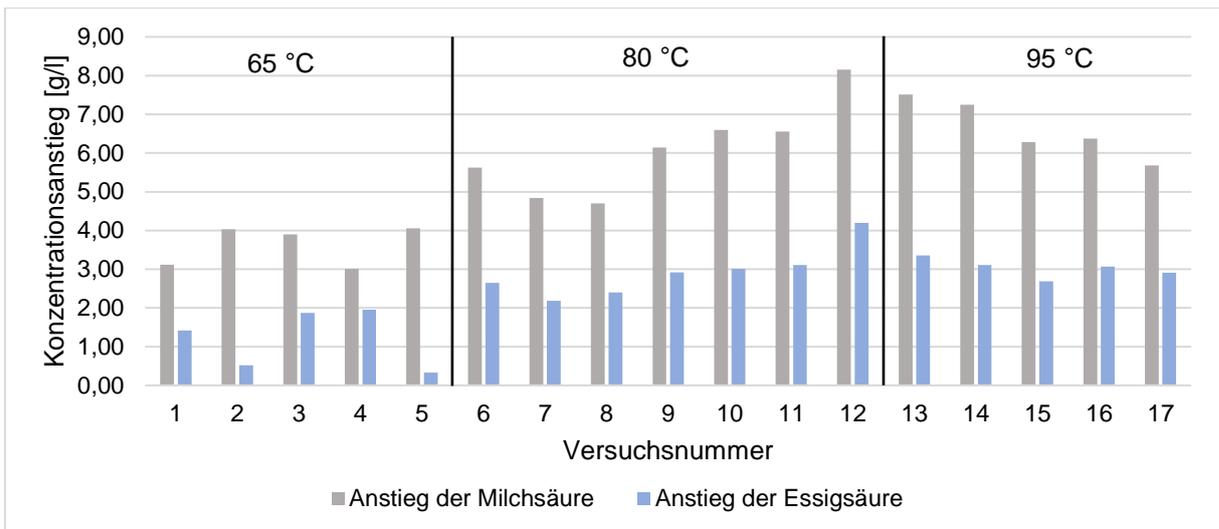


Abbildung 41: Anstieg der Milch- und Essigsäure durch die Fermentation sortiert nach Temperatur, Konzentration und Zeit der Aufschlüsse

In Abbildung 42 sind die erzielten Ethanolkonzentrationen nach Aufschluss und Verzuckerung des Biertreibers grafisch dargestellt. Die Versuche sind dafür nach den Reaktionsbedingungen der Aufschlüsse sortiert (zuerst nach der Temperatur, bei gleicher Temperatur nach der Konzentration und bei gleicher Konzentration nach der Versuchszeit). Auch hier zeigt sich, wie zu erwarten war, dass vor allem durch Erhöhung der Temperatur während der Aufschlüsse die Ethanolkonzentration nach der Fermentation gesteigert werden konnte. Eine Hemmung der Hefe durch bspw. Abbauprodukte der Zucker (HMF, Furfural, Ameisensäure) oder der freigesetzten Essigsäure konnte nicht beobachtet werden. In allen Versuchen wurde die gelöste Glucose vollständig verstoffwechselt. Nach der Fermentation war keine Glucose mit der HPLC nachweisbar. Des Weiteren wurde die theoretisch maximal mögliche Ausbeute bezogen auf die Glucosekonzentration nach der Enzymverzuckerung in allen Proben bis auf Versuch 5 überschritten. Im Durchschnitt lag die Ausbeute bei 110 % bezogen auf die theoretisch maximal mögliche Ethanolkonzentration aus der gemessenen Glucosekonzentration nach der Verzuckerung. Dies bedeutet, dass es während der Fermentation zu einer weiteren Freisetzung von Glucose aus dem aufgeschlossenen Biertreber kam.

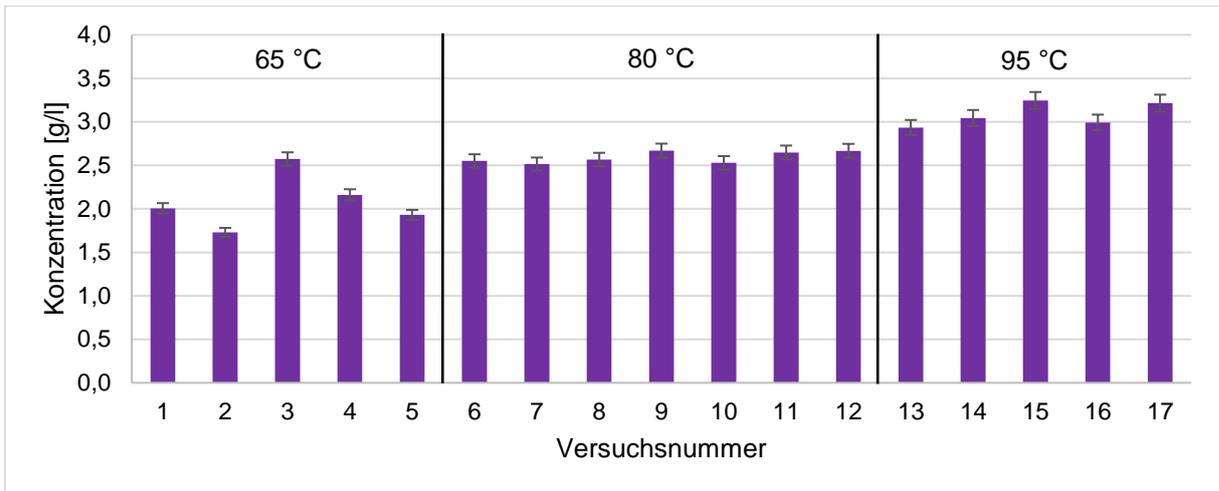


Abbildung 42: Gemessene Massenkonzentrationen an Ethanol nach der Fermentation sortiert nach Temperatur, Konzentration und Zeit der Aufschlüsse

Im Folgenden wird auf die Ethanolausbeute bezogen auf die maximal mögliche Menge der im Biertreber gebundenen Glucose genauer eingegangen. Für die Analyse der Ergebnisse wurde wie schon bei der Auswertung der Glucoseausbeute im letzten Kapitel Versuch 3 nicht mitberücksichtigt. Nur so war eine Anpassung der Modellgleichung mit signifikanten Parametern möglich. Ohne Versuch 3 konnten zwei signifikante Modelle an die Messergebnisse angepasst werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Glucoseausbeute im letzten Kapitel wurde das folgende Modell ausgewählt. In Tabelle 17 sind die dazugehörigen Koeffizienten sowie deren Konfidenzintervalle angegeben. Das Bestimmtheitsmaß der Modellgleichung betrug $R^2 = 0,9447$ und das mittlere Quadrat der Abweichungen 1,1. In Anhang 3 sind zur Beurteilung des Modells zusätzlich das Paritätsdiagramm, die durch das Modell vorhergesagten Ausbeuten und die prozentualen Abweichungen der Modellwerte von den aus den Messwerten bestimmten Ausbeuten beigefügt.

Tabelle 17: Regressionskoeffizienten und deren Konfidenzintervalle zur Vorhersage der Ethanolausbeuten nach der Fermentation

Koeffizient	Wert des Koeffizienten	Konfidenzintervall 95 %
b_0	-5,9	$-10,45 \leq b_0 \leq -1,40$
b_T	0,34	$0,29 \leq b_T \leq 0,39$
b_c	0,65	$0,18 \leq b_c \leq 1,13$

Die Versuchszeit hatte in diesem Modell keinen signifikanten Einfluss auf die Ethanolausbeute. Das gleiche Ergebnis zeigte die Auswertung der Glucoseausbeute im letzten Kapitel. In Abbildung 43 ist die Modellgleichung grafisch dargestellt. Den mit Abstand größten Effekt auf die Ethanolausbeute hatte die Temperatur. Durch Erhöhung der Temperatur konnte die

erzielte Ethanolausbeute deutlich gesteigert werden. Die Erhöhung der Schwefelsäurekonzentration während der Aufschlüsse führte zu einem leichten Anstieg der Ethanolausbeute, wie in Abbildung 43 zu erkennen ist.

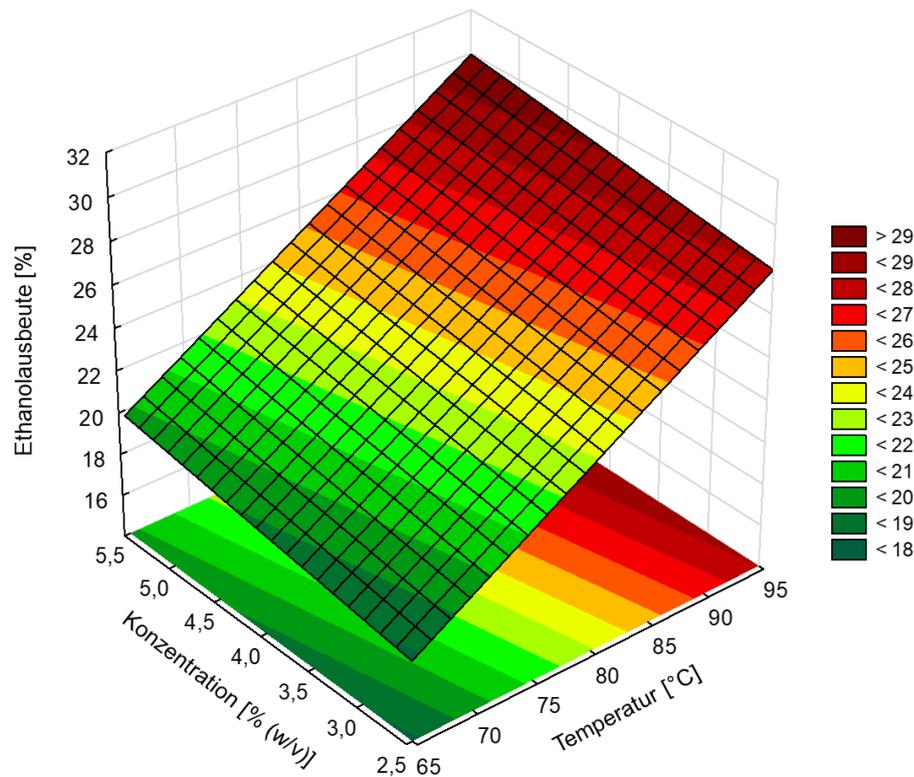


Abbildung 43: Abhängigkeit der Ethanolausbeute von der Schwefelsäurekonzentration sowie Temperatur der Aufschlüsse nach Fermentation

In einem zweiten Modell war der Einfluss der Konzentration nicht signifikant. Dafür waren in diesem Modell die Versuchszeit quadratisch und die lineare Wechselwirkung zwischen Konzentration und Versuchszeit signifikant. Das Ergebnis beider Modelle zeigt, dass der Einfluss der Konzentration und Versuchszeit auf die Aufschlüsse so gering war, dass durch die große Streuung der Messergebnisse nach der Fermentation die Effekte nicht eindeutig zugeordnet werden konnten.

Laut einem Paper von Rojas-Chamorro et al. ist für eine wirtschaftliche Anwendung der Destillation zur Trennung des Ethanol-Wasser-Gemisches eine Ethanolkonzentration von mindestens 4 % (w/w) notwendig [68]. Bei niedrigeren Konzentrationen ist nach Stand der Technik keine wirtschaftliche Trennung des Gemisches durch Destillation möglich. Die maximal gemessene Konzentration von 3,25 g/l in Versuch 15 beträgt jedoch umgerechnet noch nicht einmal 0,4 % (w/w). Dies bedeutet, dass die Ethanolkonzentration um mehr als Faktor 10 gesteigert werden muss, damit überhaupt eine wirtschaftliche Trennung des Gemisches nach derzeitigem Stand der Technik möglich ist. Damit dies erreicht werden kann, ist eine Optimierung des gesamten Prozesses beginnend bei der Vorbehandlung notwendig.

Großes Potenzial wird von der enzymatischen Verzuckerung und der Fermentation erwartet. Durch Einsatz speziell für diese Anwendung hergestellter Enzymmischungen könnte möglicherweise eine Steigerung der Freisetzung der Monosaccharide bei gleicher Probenvorbehandlung erzielt werden. Eine Optimierung der Fermentation ist bspw. durch einen Einsatz von Mikroorganismen wie z. B. *E. coli* SL100 oder *Scheffersomyces stipitis* möglich. Diese Mikroorganismen sind in der Lage neben Glucose auch C-5-Zucker für die Produktion von Ethanol zu nutzen. Der Einsatz ist sehr vielversprechend, da der Gehalt an Hemicellulose im Biertreber (Quelle der C-5-Zucker) im Durchschnitt ungefähr doppelt so groß wie der Gehalt an Cellulose (Hauptquelle der Glucose) ist. Beide genannten Mikroorganismen verstoffwechseln jedoch bevorzugt Glucose, weshalb erst nach Erreichen einer bestimmten Glucosekonzentration die C-5-Zucker genutzt werden. [68]

Des Weiteren ist eine Erhöhung der Feststoffbeladung mit Biertreber während der Aufschlüsse notwendig. Dies erfordert entweder eine andere Art der Erwärmung oder eine Verbesserung des Rührsystems, da mit dem aktuellen Versuchsstand keine Erhöhung des Feststoffgehalts bei gleichzeitig kontinuierlicher Durchmischung gewährleistet werden konnte. Außerdem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass durch eine Erhöhung der Temperatur während der Aufschlüsse bei gleichzeitig niedrigen Säurekonzentrationen die Monosaccharidausbeuten der Verzuckerung deutlich gesteigert werden können. Infolgedessen ist mit größeren Ethanolkonzentrationen nach der Fermentation zu rechnen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die CO₂-Emissionen aus der Verbrennung fossiler Rohstoffe sind eines der Hauptgründe für die globale Erderwärmung, weshalb der Ausstoß möglichst schnell reduziert werden muss. Großes Einsparungspotenzial besteht z. B. im Verkehrssektor. Hierauf entfielen in Deutschland 2022 allein 22 % der CO₂-Emissionen [3]. Eine Möglichkeit die CO₂-Emissionen aus fossilen Rohstoffen im Verkehr zu reduzieren ist der Einsatz von Biokraftstoffen. Auch die Neufassung der Europäischen Richtlinie (EU) 2018/2001 zur Förderung der Nutzung von Energie aus erneuerbaren Quellen fordert eine schrittweise Erhöhung dieser Kraftstoffe. Die Gewinnung von Bioethanol aus Biertreber stellt dafür eine gute Möglichkeit dar, da es sich um einen Reststoff der Bierherstellung mit begrenzter Verwertungsmöglichkeit handelt. Damit die in der Cellulose und Hemicellulose gebundenen Monosaccharide durch Fermentation in Bioethanol umgewandelt werden können, ist jedoch eine aufwendige Vorbehandlung notwendig. In der Literatur werden dafür verschiedene Aufschlussverfahren beschrieben. In neueren Verfahren erfolgt nach dem Aufschluss der Lignocellulose eine enzymatische Verzuckerung mit anschließender Fermentation.

In der vorliegenden Arbeit wurden saure und alkalische Aufschlüsse umfassend untersucht. Für die Aufschlüsse mit verdünnter Natronlauge wurden die ausgewählten Einflussgrößen in folgenden Bereichen variiert: Temperatur zwischen 45 und 95 °C, Konzentration der Natronlauge zwischen 1 und 5 % (w/v) sowie Versuchszeit zwischen 60 und 180 min. Im Rahmen der Aufschlüsse mit verdünnter Schwefelsäure wurde der Einfluss der Versuchsbedingungen in folgenden Grenzen untersucht: Temperatur von 65 – 95 °C, Schwefelsäurekonzentration von 2,5 – 5,5 % (w/v) und Versuchszeit von 60 – 180 min. Das primäre Ziel der Aufschlüsse war den Biertreber so vorzubehandeln, dass möglichst hohe Monosaccharidkonzentrationen nach der enzymatischen Verzuckerung erreicht werden. Des Weiteren sollte in einer nachgeschalteten Fermentation eine maximale Ethanolkonzentration erzielt werden. Laut IKTS-Standard wurde für die enzymatische Verzuckerung eine Mischung aus zwei Enzympräparaten aus der Praxis zum Aufschluss lignocellulosehaltiger Substrate in Biogasanlagen eingesetzt. Für die Ethanolfermentation wurde Backhefe verwendet.

Nach Aufschluss der Biertreberproben mit verdünnter Natronlauge war eine Bewertung der Aufschlüsse anhand der Messergebnisse der HPLC nicht möglich. Makroskopisch waren hingegen deutliche Unterschiede zu erkennen. Die optische Bewertung der (gewaschenen) Faserrückstände aus den Biertreberaufschlüssen ergab, dass mit steigender Temperatur, Konzentration und Versuchszeit der Aufschluss immer weiter fortschritt. Unter den Versuchsbedingungen mit Maximalwerten für die drei Einflussgrößen (95 °C, 5 % (w/v), 180 min) wurde optisch die stärkste Veränderung beobachtet. Durch Erhöhung der Temperatur, Konzentration und Versuchszeit kam es außerdem zum Anstieg der gemessenen Ameisensäure-

konzentration (einem Abbauprodukt der Monosaccharide). Insgesamt kann die Bildung unter den gewählten Versuchsbedingungen jedoch als gering eingestuft werden. Bei Furfural und HMF war im Vergleich zur gemessenen Konzentration in der Nullprobe kein Anstieg zu beobachten. Nach der enzymatischen Verzuckerung konnte die erwartete Freisetzung der Monosaccharide durch die Messergebnisse der HPLC nicht bestätigt werden. Des Weiteren zeigten die Messergebnisse keine eindeutigen Trends. In den meisten Versuchen schwankte die Glucosekonzentration um einen Wert von 4 g/l, was einer Ausbeute von ca. 17 % entspricht. Die berechnete Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose (Xylose und Arabinose) fiel dabei noch deutlich kleiner aus. In den meisten Versuchen schwankte sie um einen Wert von ca. 6,5 %. Die makroskopische Untersuchung der Rückstände nach Zentrifugation der Proben aus der enzymatischen Verzuckerung zeigten hingegen deutliche Veränderungen sowie einen klaren Trend. In den bei 45 °C aufgeschlossenen Proben waren nach der enzymatischen Verzuckerung noch deutliche Faserbestandteile zu erkennen. Durch Erhöhung der Aufschlusstemperatur auf 95 °C konnte der enzymatische Abbau deutlich verbessert werden und es blieb nur ein feinkörniger schwarzer Feststoff übrig. Nach der Ethanolfermentation erwies sich die Auswertung der Messergebnisse der HPLC ebenfalls als schwierig. Nach Aufschluss mit einer Natronlaugenkonzentration von 1 % (w/v) war die mittlere Ethanolausbeute am kleinsten. Durch Erhöhung der Konzentration auf 3 bzw. 5 % (w/v) wurde ein Plateau erreicht. Die Ergebnisse schwankten hier um eine Ausbeute von ca. 18,5 %. Eine Hemmung der Ethanolproduktion konnte ausgeschlossen werden, da in allen Versuchen die gesamte gelöste Glucose verstoffwechselt wurde. Des Weiteren wurde in fast allen Versuchen eine etwas höhere Ethanolkonzentration gemessen als nach der Verzuckerung rechnerisch zu erwarten war.

Die Messergebnisse der Aufschlüsse mit verdünnter Schwefelsäure zeigten eindeutig einen Trend bei der Freisetzung der Monosaccharide aus der Hemicellulose. Eine Erhöhung der Temperatur, Konzentration und Versuchszeit während der Aufschlüsse führte gleichzeitig zum Anstieg der Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose. Den mit Abstand größten Effekt hatte dabei die Temperatur. Unter den maximalen Versuchsbedingungen (95 °C, 5,5 % (w/v), 180 min) wurde eine Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose von 43,1 % erzielt. Die Freisetzung der gemessenen Abbauprodukte HMF und Furfural war unter den gewählten Aufschlussbedingungen gering. Dennoch konnte mit steigender Temperatur, Konzentration und Versuchszeit ein Anstieg verzeichnet werden. Auch hier hatte die Temperatur den größten Effekt. Bei der optischen Bewertung der gewaschenen Faserreste war kaum ein Unterschied zwischen den einzelnen Aufschlüssen zu erkennen. Durch die enzymatische Verzuckerung kam es zu einem deutlichen Anstieg der Glucosekonzentration. Wie bei der Freisetzung der Monosaccharide aus der Hemicellulose war der Erfolg der Glucosefreisetzung maßgeblich von der Temperatur während der Aufschlüsse abhängig. Der Einfluss der

Schwefelsäurekonzentration sowie der Versuchszeit war im untersuchten Bereich gering. Durch Aufschluss bei 95 °C wurde eine mittlere Glucosekonzentration nach enzymatischer Verzuckerung von 5,4 g/l erreicht. Dies entspricht einer durchschnittlichen Glucoseausbeute von 25,8 %. Die Ethanolausbeute nach der Fermentation zeigte eine ähnliche Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen der Aufschlüsse wie zuvor die Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose sowie die Glucoseausbeute nach der Verzuckerung. Die größte Ethanolausbeute von 30,4 % konnte nach Aufschluss des Biertreibers unter den maximalen Aufschlussbedingungen (95 °C, 5,5 % (w/v), 180 min) erzielt werden. Die Ethanolkonzentration betrug dabei 3,2 g/l. Eine Hemmung der Ethanolfermentation konnte aus den gleichen Gründen wie bei der alkalischen Versuchsreihe ausgeschlossen werden.

Für eine großtechnische Anwendung beider Aufschlussverfahren zur Gewinnung von Ethanol aus Biertreber muss die erzielte Ethanolkonzentration nach der Fermentation drastisch gesteigert werden. Hierfür ist eine Optimierung der gesamten Prozesskette notwendig. Beginnend bei den Aufschlüssen wäre für beide Verfahren zu untersuchen, ob durch eine Erhöhung der Feststoffbeladung mit Biertreber der Gehalt an Monosacchariden nach der Verzuckerung gesteigert werden kann. Dafür ist eine Optimierung der Durchmischung bzw. des Wärmeintrags notwendig. Unter den derzeitigen Bedingungen ist keine gleichmäßige Durchmischung bei Steigerung des Feststoffgehalts möglich. Für die sauren Aufschlüsse deuten die Ergebnisse darauf hin, dass bei Temperaturen oberhalb von 95 °C bei gleichzeitig niedrigen Säurekonzentrationen die Effektivität der Aufschlüsse deutlich gesteigert werden kann. In weiteren Versuchen wäre zu klären, ob die erhoffte Verbesserung durch Aufschluss bei höheren Temperaturen bezüglich der Freisetzung der Monosaccharide aus der Hemicellulose sowie der Glucose nach der enzymatischen Verzuckerung auch bestätigt werden kann. In Vorversuchen zur Einordnung der Enzymaktivität zeigte sich, dass die Freisetzung der Monosaccharide durch die standardisierte enzymatische Verzuckerung gering war. Hierfür wurden zwei getrennte Modelllösungen aus mikrokristalliner Cellulose bzw. Kartoffelstärke unter den Standardbedingungen enzymatisch verzuckert. Für die Kartoffelstärke ergab sich eine Glucoseausbeute von rund 4 % und für die mikrokristalline Cellulose von rund 17,2 % (bei vergleichbaren Frachten wie in den sauren Aufschlüssen). Eine Optimierung der Verzuckerung könnte somit unter identischen Aufschlussbedingungen zu deutlich besseren Ergebnissen führen. Mögliche Einflussgrößen auf die Verzuckerung sind dabei Temperatur, pH-Wert und Versuchszeit. Des Weiteren könnte untersucht werden, ob durch Reduktion der Scherbeanspruchung (langsames Schwenken der Proben) während der Verzuckerung die Adsorption der Enzyme und infolgedessen die Aktivität gesteigert werden kann. Die Nutzung einer speziell auf diese Anwendung angepassten Enzymmischung könnte ebenfalls zur Steigerung der Ausbeuten führen. Bei der alkalischen Versuchsreihe ist außerdem zu klären, warum die optisch sehr guten Ergebnisse nicht in Form von hohen Monosaccharid-

konzentrationen nach der Verzuckerung bestätigt werden konnten. Für die Fermentation ist die Nutzung genmanipulierter Mikroorganismen, welche neben Glucose auch C-5-Zucker wie Xylose und Arabinose in Ethanol umwandeln können, sehr vielversprechend. Grund dafür ist, dass das Potenzial an C-5-Zuckern (Hauptbestandteil der Hemicellulose) im Biertreber im Durchschnitt fast doppelt so groß wie das der Glucose (Hauptbestandteil der Cellulose) ist.

7 Literaturangaben

- [1] Graham-Rowe, D. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH (Hrsg.), Tank gegen Teller. 2012. Unter: <https://www.spektrum.de/news/tank-gegen-teller/1142590>, [Zugriff am 05.09.2023].
- [2] Food and Agriculture Organization of the United Nations (Hrsg.), The State of Food Security and Nutrition in the World 2022. 2.1 Food security indicators - latest updates and progress towards ending hunger and ensuring food security. 2022. Unter: <https://www.fao.org/3/cc0639en/online/sofi-2022/food-security-nutrition-indicators.html>, [Zugriff am 05.09.2023].
- [3] Umweltbundesamt (Hrsg.), Kohlendioxid-Emissionen. 2023. Unter: <https://www.umweltbundesamt.de/daten/klima/treibhausgas-emissionen-in-deutschland/kohlendioxid-emissionen#herkunft-und-minderung-von-kohlendioxid-emissionen>, [Zugriff am 27.06.2023].
- [4] Umweltbundesamt. Statista (Hrsg.), Treibhausgasemissionen nach Sektoren in Deutschland. 2022. Unter: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/1241046/umfrage/treibhausgasemissionen-in-deutschland-nach-sektor/>, [Zugriff am 27.06.2023].
- [5] NOW GmbH, Nationale Organisation Wasserstoff- und Brennstoffzellentechnologie (Hrsg.), Factsheet Biokraftstoffe. 2022. Unter: https://www.now-gmbh.de/wp-content/uploads/2022/10/NOW_Factsheet-Biokraftstoffe.pdf, [Zugriff am 27.06.2023].
- [6] Hauptzollamt Frankfurt (Hrsg.), Quotenberechnung. Unter: https://www.zoll.de/DE/Fachthemen/Steuern/Verbrauchssteuern/Treibhausgasquote-THG-Quote/Quotenverpflichtung/Quotenberechnung/quotenberechnung_node.html, [Zugriff am 27.06.2023].
- [7] Baum, M. RÖMPP [Online], Georg Thieme Verlag (Hrsg.), Ethanol. 2019. Unter: <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-05-01878>, [Zugriff am 27.06.2023].
- [8] Oreopoulou, V., Russ, W. Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry. Boston, MA: Springer US. 2007. ISBN: 9780387357669.
- [9] Deutscher Brauer-Bund. Statista (Hrsg.), Bierausstoß in Deutschland bis 2021. 2022. Unter: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/29616/umfrage/bierproduktion-der-brauereien-in-deutschland-seit-1991/>, [Zugriff am 25.03.2023].
- [10] FNR (Hrsg.), Produktion und Absatz von Bioethanol in Deutschland in den Jahren 2009 bis 2019 (in 1.000 Tonnen). 2020. Unter: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/240759/umfrage/produktion-und-absatz-von-bioethanol-in-deutschland/>, [Zugriff am 26.04.2023].

- [11] Stiftung Warentest. 500 Jahre Reinheitsgebot. Deutsches Bier - was darf rein und was ist drin? In: Stiftung Warentest, (2016)
- [12] Narziß, L., Back, W., Gastl, M., Zarnkow, M. Abriss der Bierbrauerei. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2017. 8., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. ISBN: 9783527340361.
- [13] Brücklmeier, J. Braumagazin (Hrsg.), Energieeinsatz in der Brauerei. Energie-land-karte einer Brauerei. 2022. Unter: <https://braumagazin.de/article/energieeinsatz-in-der-brauerei/>, [Zugriff am 12.01.2023].
- [14] Gupta, M., Abu-Ghannam, N., Gallagher, E. Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products. In: Comprehensive reviews in food science and food safety, 9, (2010), Nr. 3, (S. 318–328).
- [15] Herfellner, T. Anaerobe Hydrolyse und Methanisierung fester, flüssiger und pastöser organischer Produktionsrückstände aus Brauereien. München, Technische Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Dissertation, 05/2011.
- [16] Wollrab, A. Organische Chemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 2014. ISBN: 978-3-642-45143-0.
- [17] Carvalho, F., Esteves, M. P., Parajó, J. C., Pereira, H., Gírio, F. M. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. In: Bioresource technology, 91, (2004), Nr. 1, (S. 93–100).
- [18] Kaltschmitt, M., Hartmann, H., Hofbauer, H. Energie aus Biomasse. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 2016. ISBN: 978-3-662-47437-2.
- [19] Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass--An overview. In: Bioresource technology, 199, (2016), (S. 76–82).
- [20] Kössel, H., Bonk, M. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH (Hrsg.), Lexikon der Biologie. Lignin. 1999. Unter: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/lignin/39320>, [Zugriff am 14.05.2023].
- [21] Böckler, F., Dill, B., Eisenbrand, G., Faupel, F., Fugmann, B., Gamse, T., Matissek, R., Pohnert, G., Rühling, A., Schmidt, S., Sprenger, G. Ligninsulfonsäure. Thieme Gruppe. 2002.
- [22] Robak, K., Balcerek, M. Review of Second Generation Bioethanol Production from Residual Biomass. In: Food technology and biotechnology, 56, (2018), Nr. 2,
- [23] Jørgensen, H., Kristensen, J. B., Felby, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. In: Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 1, (2007), Nr. 2, (S. 119–134).

- [24] Preißinger, W., Obermaier, A., Söldner, K., Olaf, S. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.), *Biertreber. Futterwert, Konservierung und erfolgreicher Einsatz beim Wiederkäuer*. Freising-Weihenstephan, 03/2008. Unter: https://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/informationen/p_29845.pdf, [Zugriff am 11.01.2023].
- [25] Fleischmann, S. *Aufbereitung von Biertrebern für eine optimierte energetische und stoffliche Nutzung*. Kassel, Universität Kasse, Ökologische Agrarwissenschaften, Dissertation, 09/2018.
- [26] Becher, T., Wüst, O. *Versuchsanlage zur thermischen Verwertung von Biertreber*. In: *Brauwelt*, (2007), Nr. 41-42, (S. 1140–1143).
- [27] TotalEnergies Wärme&Kraftstoff Deutschland GmbH (Hrsg.), *Heizwert und Brennwert von Heizöl*. Unter: <https://heizoel.totalenergies.de/rund-um-heizoel/aktuelles-tips/heizoelkauf-beratung/heizwert-und-brennwert-von-heizol/>, [Zugriff am 24.03.2023].
- [28] Millesich, T. S. *Optimierung der Treberverbrennung am Beispiel der Anlage Göss. Leoben*, Montanuniversität Leoben, Institut für Verfahrenstechnik des Industriellen Umweltschutzes der Montanuniversität LOEben, Masterarbeit, 08/2010.
- [29] Binder, S., Weger, A., Ruß, W., Hornung, A. *Thermische Verwertung von mechanisch entwässertem Biertreber*. In: Thrän, D., Pfeiffer, D. (Hrsg.), *Effizient, umweltverträglich, dezentral – neue Konzepte für die Nutzung von biogenen Festbrennstoffen Teil 1*. Leipzig 2013. ISBN: 2192-1806.
- [30] Farone, W. A., Cuzens, J. E. *Arkenol Inc* (Hrsg.), *Strong acid hydrolysis of cellulosic and hemicellulosic materials*, Nr. 5.597.714, USA, 7.6.1995.
- [31] Rezania, S., Oryani, B., Cho, J., Talaiekhosravi, A., Sabbagh, F., Hashemi, B., Rupani, P. F., Mohammadi, A. A. *Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview*. In: *Energy*, 199, (2020), (S. 117457).
- [32] Liu, L., Sun, J., Cai, C., Wang, S., Pei, H., Zhang, J. *Corn stover pretreatment by inorganic salts and its effects on hemicellulose and cellulose degradation*. In: *Bioresource technology*, 100, (2009), Nr. 23, (S. 5865–5871).
- [33] Hassan, S. S., Ravindran, R., Jaiswal, S., Tiwari, B. K., Williams, G. A., Jaiswal, A. K. *An evaluation of sonication pretreatment for enhancing saccharification of brewers' spent grain*. In: *Waste management (New York, N.Y.)*, 105, (2020), (S. 240–247).
- [34] Shrotri, A., Kobayashi, H., Fukuoka, A. *Chapter Two - Catalytic Conversion of Structural Carbohydrates and Lignin to Chemicals*. In: Song, C. (Hrsg.), *Advances in Catalysis*, (S. 59–123. Academic Press 2017. ISBN: 0360-0564.
- [35] Hayes, D., Prof. Ross, J., Prof. Hayes, M., Prof. Fitzpatrick, S. *The Biofine Process: Production of Levulinic Acid, Furfural and Formic Acid from Lignocellulosic Feedstocks*. In: *Biorefineries—Industrial Processes and Product*, 1, (2006), (S. 139–164).

- [36] Hendriks, A. T. W. M., Zeeman, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. In: *Bioresource technology*, 100, (2009), Nr. 1, (S. 10–18).
- [37] Isroi, Millati, R., Syamsiah, S., Niklasson, C., Cahyanto, M. N., Lundquist, K., Taherzadeh, M. J. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: A review. In: *BioResources*, 6, (2011), Nr. 4, (S. 5224–5259).
- [38] Cianchetta, S., Di Maggio, B., Burzi, P. L., Galletti, S. Evaluation of selected white-rot fungal isolates for improving the sugar yield from wheat straw. In: *Applied biochemistry and biotechnology*, 173, (2014), Nr. 2, (S. 609–623).
- [39] Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Gírio, F. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. In: *Journal of Scientific & Industrial Research*, (2008), (S. 849–864).
- [40] Mosier, N. S. Fundamentals of Aqueous Pretreatment of Biomass. In: Wyman, C. E. (Hrsg.), *Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals*, (S. 129–143). Wiley series in renewable resources. Chichester, West Sussex, United Kingdom: Wiley 2013. ISBN: 9780470975831.
- [41] Michelin, M., Teixeira, J. A. Liquid hot water pretreatment of multi feedstocks and enzymatic hydrolysis of solids obtained thereof. In: *Bioresource technology*, 216, (2016), (S. 862–869).
- [42] López-Linares, J. C., García-Cubero, M., Lucas, S., González-Benito, G., Coca, M. Microwave assisted hydrothermal as greener pretreatment of brewer's spent grains for biobutanol production. In: *Chemical Engineering Journal*, 368, (2019), (S. 1045–1055).
- [43] Kemppainen, K., Rommi, K., Holopainen, U., Kruus, K. Steam explosion of Brewer's spent grain improves enzymatic digestibility of carbohydrates and affects solubility and stability of proteins. In: *Applied biochemistry and biotechnology*, 180, (2016), Nr. 1, (S. 94–108).
- [44] Solarte-Toro, J. C., Romero-García, J. M., Martínez-Patiño, J. C., Ruiz-Ramos, E., Castro-Galiano, E., Cardona-Alzate, C. A. Acid pretreatment of lignocellulosic biomass for energy vectors production: A review focused on operational conditions and techno-economic assessment for bioethanol production. In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, (2019), (S. 587–601).
- [45] Sannigrahi, P., Kim, D. H., Jung, S., Ragauskas, A. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. In: *Energy Environ. Sci.*, 4, (2011), Nr. 4, (S. 1306–1310).
- [46] Trajano, H. L., Wyman, C. E. Fundamentals of Biomass Pretreatment at Low pH. In: Wyman, C. E. (Hrsg.), *Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals*, (S. 103–128). Wiley series in renewable resources. Chichester, West Sussex, United Kingdom: Wiley 2013. ISBN: 9780470975831.

- [47] Marcotullio, G., Jong, W. de. Chloride ions enhance furfural formation from d-xylose in dilute aqueous acidic solutions. In: *Green Chemistry*, 12, (2010), Nr. 10, (S. 1739).
- [48] Dickson, A., Wesolowski, D., Palmer, D., Mesmer, R. Dissociation Constant of Bisulfate Ion in Aqueous Sodium Chloride Solutions to 250 °C. In: *Journal of Physical Chemistry*, (1990), Nr. 94, (S. 7978–7985).
- [49] Schmatz, A. A., Salazar-Bryam, A. M., Contiero, J., Sant’Anna, C., Brienzo, M. Pseudo-Lignin Content Decreased with Hemicellulose and Lignin Removal, Improving Cellulose Accessibility, and Enzymatic Digestibility. In: *BioEnergy Research*, 14, (2021), Nr. 1, (S. 106–121).
- [50] Martinez, A., Rodriguez, M. E., Wells, M. L., York, S. W., Preston, J. F., Ingram, L. O. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. In: *Biotechnology progress*, 17, (2001), Nr. 2, (S. 287–293).
- [51] Rojas-Chamorro, J. A., Romero, I., López-Linares, J. C., Castro, E. Brewer’s spent grain as a source of renewable fuel through optimized dilute acid pretreatment. In: *Renewable Energy*, 148, (2020), (S. 81–90).
- [52] Rojas-Chamorro, J. A., Cara, C., Romero, I., Ruiz, E., Romero-García, J. M., Mussatto, S. I., Castro, E. Ethanol Production from Brewers’ Spent Grain Pretreated by Dilute Phosphoric Acid. In: *Energy & Fuels*, 32, (2018), Nr. 4, (S. 5226–5233).
- [53] Ramirez, R. S., Holtzapple, M., Piamonte, N. Fundamentals of Biomass Pretreatment at High pH. In: Wyman, C. E. (Hrsg.), *Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals*, (S. 145–167). Wiley series in renewable resources. Chichester, West Sussex, United Kingdom: Wiley 2013. ISBN: 9780470975831.
- [54] Türk, W. RÖMPP [Online], Georg Thieme Verlag (Hrsg.), Zellstoff. 2018. Unter: <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-26-00151>, [Zugriff am 05.04.2023].
- [55] Li, M., Foster, C., Kelkar, S., Pu, Y., Holmes, D., Ragauskas, A., Saffron, C. M., Hodge, D. B. Structural characterization of alkaline hydrogen peroxide pretreated grasses exhibiting diverse lignin phenotypes. In: *Biotechnology for biofuels*, 5, (2012), Nr. 1, (S. 38).
- [56] Sitzmann, H. RÖMPP [Online], Georg Thieme Verlag (Hrsg.), Hydratation. 2006. Unter: <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-08-02120>, [Zugriff am 25.06.2023].
- [57] Wilkinson, S., Smart, K. A., Cook, D. J. Optimisation of alkaline reagent based chemical pre-treatment of Brewers spent grains for bioethanol production. In: *Industrial Crops and Products*, 62, (2014), (S. 219–227).
- [58] Parchami, M., Agnihotri, S., Taherzadeh, M. J. Aqueous ethanol organosolv process for the valorization of Brewer's spent grain (BSG). In: *Bioresource technology*, 362, (2022), (S. 127764).

- [59] Carl Roth GmbH + Co KG (Hrsg.), Analysenzertifikat. Natronlauge 50 %, reinst. 2021. Unter: <https://www.carlroth.com/medias/AZ-431315241-8655-DE.pdf?context=bWFzdGVyfGFuYWx5c2lzQ2VydGlmaWNhdGVzfDIwODQxMHxhcHBsaWNhdGlvbi9wZGZ8YW5hbHlzaXNDZXJ0aWZpY2F0ZXMvaGI2L2g2Ni85MDQ4MTY4ODI0ODYyLnBkZnwxYjVjNGlyMGZhZDJmYTgwNjY1M2FIZmY2ZDkzN2I4NmYwNjczNDMzMzkyNzFINGYzNzllNjVhZGE3NzYxYWU4>, [Zugriff am 28.06.2023].
- [60] Panreac Química SLU (Hrsg.), Analysenzertifikat. Sulfuric Acid 96% for analysis, ISO. 2018. Unter: https://itwreagents.com/download_file/coa/131058/0001544108/en/coa_131058_0001544108_en.pdf, [Zugriff am 29.06.2023].
- [61] ITW Reagents Division (Hrsg.), Schwefelsäure 96% (Reag. Ph. Eur.) zur Analyse, ISO. Unter: <https://itwreagents.com/germany/de/product/schwefelsaure-96-reag-ph-eur-zur-analyse-iso/131058>, [Zugriff am 29.06.2023].
- [62] Kleppmann, W. Versuchsplanung. Produkte und Prozesse optimieren. München: Hanser. 2020. 10., überarbeitete Auflage. ISBN: 978-3-446-46397-4.
- [63] Becker, F.-M., Bossek, H., Engelmann, L., Ernst, C., Fanghänel, G., Höhne, H., Kalenberg, A., Lenertatt, R., Liesenberg, G., Liesenberg, M., Löffler, R., Meyer, L., Pews-Hocke, C., Raum, B., Schmidt, G.-D., Seidel, P., Simon, H., Stamm, R., Weber, K., Wehser, A. Formelsammlung. Formeln Tabellen Daten; Mathematik Physik Astronomie Chemie Biologie Informatik; [bis zum Abitur]. Berlin: Duden Paetec Schulbuchverlag. 2014. 2. Auflage. ISBN: 9783898187008.
- [64] Transgenomic the power of discovery (Hrsg.), User guide for Organic Acids Analysis Columns. 2008. Unter: <https://mz-at.de/downloads/transgenomic-user's-guide-for-organic-acid.pdf>, [Zugriff am 05.07.2023].
- [65] Concise Separation (Hrsg.), Organic Acid Analysis HPLC Columns. Chromatography Application Notes. 2017. Unter: https://mz-at.de/fileadmin/user_upload/Brochures/mz-apps_os_concise-separations_organic-acids-analysis-hplc-columns.pdf, [Zugriff am 05.07.2023].
- [66] Wisselink, H. W., Toirkens, M. J., del Rosario Franco Berriel, M., Winkler, A. A., van Dijken, J. P., Pronk, J. T., van Maris, A. J. A. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic alcoholic fermentation of L-arabinose. In: Applied and environmental microbiology, 73, (2007), Nr. 15, (S. 4881–4891).

- [67] Bundesinstitut für Risikobewertung (Hrsg.), 5-HMF-Gehalte in Lebensmitteln sind nach
derzeitigem wissenschaftlichen Kenntnisstand gesundheitlich unproblematisch.
15.05.2011. Unter:
[https://www.bfr.bund.de/cm/343/5_hmf_gehalte_in_lebensmitteln_sind_nach_derzeitige
m_wissenschaftlichen_kennntnisstand_gesundheitlich_unproblematisch.pdf](https://www.bfr.bund.de/cm/343/5_hmf_gehalte_in_lebensmitteln_sind_nach_derzeitige_m_wissenschaftlichen_kennntnisstand_gesundheitlich_unproblematisch.pdf), [Zugriff am
31.08.2023].
- [68] Rojas-Chamorro, J. A., Romero-García, J. M., Cara, C., Romero, I., Castro, E. Improved
ethanol production from the slurry of pretreated brewers' spent grain through different
co-fermentation strategies. In: Bioresource technology, 296, (2020), (S. 122367).

Anhang 1 Ergänzung zu Kapitel 5.3.1 Ergebnisse der Biertreberaufschlüsse mit verdünnter Schwefelsäure

Tabelle: Auflistung der aus den Messwerten berechneten und durch das Modell vorhergesagten Ausbeute an Monosacchariden der Hemicellulose sowie deren prozentuale Abweichung

Nr.	Aus Messwerten berechnete Ausbeute [%]	Durch Modell vorhergesagte Ausbeute [%]	Prozentuale Abweichung des Modellwerts bezogen auf die experimentell bestimmte Ausbeute [%]
1	5,1	3	-40,0
2	8,8	8,7	-1,0
3	9,9	9,1	-8,1
4	8,9	9,5	6,3
5	12,8	15,1	18,3
6	15,3	16,0	5,2
7	14,6	16,4	12,6
8	18,7	19,3	2,9
9	19	19,3	1,2
10	19,1	19,3	0,6
11	23,9	22,1	-7,4
12	24,2	22,5	-7,2
13	29,7	33,2	11,9
14	40,1	38,9	-2,9
15	41,5	39,3	-5,4
16	42	39,6	-5,6
17	43,1	45,3	5,2

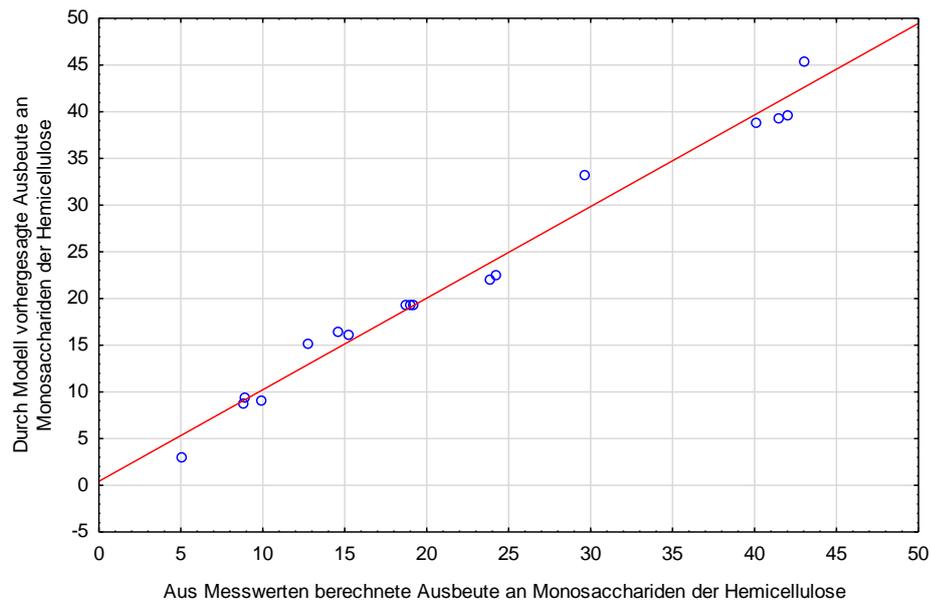


Abbildung: Paritätsdiagramm zur Beurteilung der Modellgenauigkeit

Anhang 2 Ergänzung zu Kapitel 5.3.2 Ergebnisse der enzymatischen Verzuckerung nach saurem Aufschluss des Birtreibers

Tabelle: Auflistung der aus den Messwerten berechneten und durch das Modell vorhergesagten Ausbeute an Monosacchariden der Hemicellulose sowie deren prozentuale Abweichung

Nr.	Aus Messwerten berechnete Ausbeute [%]	Durch Modell vorhergesagte Ausbeute [%]	Prozentuale Abweichung des Modellwerts bezogen auf die experimentell bestimmte Ausbeute [%]
1	11,9	10,9	-8,4
2	16,3	15,4	-5,7
3	18,8	15,8	-15,9
4	16,9	16,2	-4,1
5	18,4	20,7	12,4
6	21,4	23,9	11,6
7	22,6	24,3	7,6
8	24,4	26,5	8,7
9	25,6	26,5	3,6
10	25,9	26,5	2,3
11	30,0	28,8	-4,0
12	29,7	29,2	-1,9
13	33,3	34,6	3,9
14	39,4	39,1	-0,8
15	43,7	39,5	-9,7
16	40,4	39,9	-1,3
17	43,4	44,4	2,3

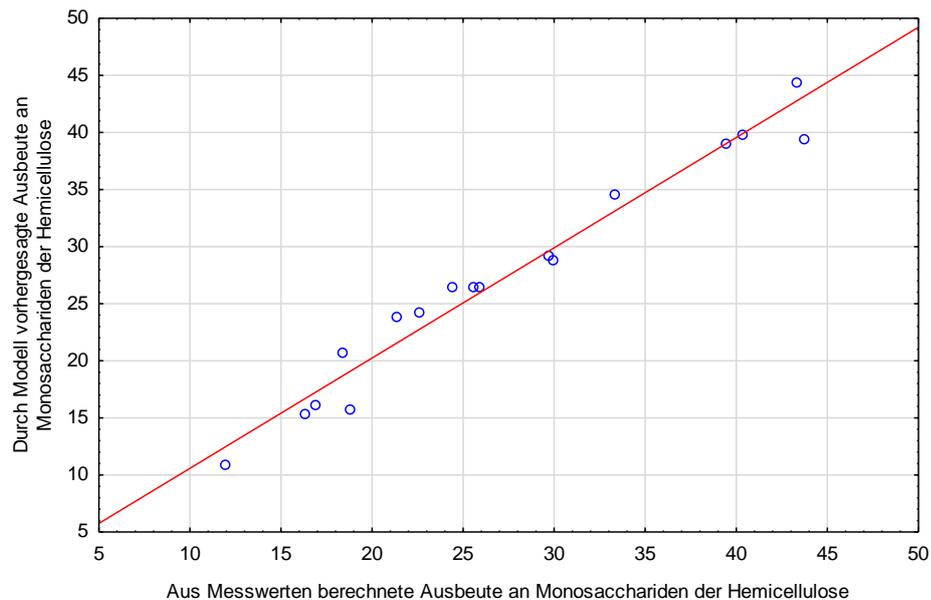


Abbildung: Paritätsdiagramm zur Beurteilung der Modellgenauigkeit für die Vorhersage der Ausbeute an Monosacchariden aus der Hemicellulose

Tabelle: Auflistung der aus den Messwerten berechneten und durch das Modell vorhergesagten Glucoseausbeuten sowie deren prozentuale Abweichung

Nr.	Aus Messwerten berechnete Ausbeute [%]	Durch Modell vorhergesagte Ausbeute [%]	Prozentuale Abweichung des Modellwerts bezogen auf die experimentell bestimmte Ausbeute [%]
1	15,6	15,4	-1,4
2	14,6	15,4	5,3
3	–	–	–
4	18,9	18,8	-0,6
5	18,9	18,8	-0,4
6	22,0	20,5	-6,7
7	22,0	22,5	2,0
8	21,3	22,5	5,7
9	22,3	22,5	0,9
10	22,2	22,5	1,4
11	23,9	22,5	-6,2
12	22,3	22,3	0,1
13	25,6	25,6	0,1
14	24,7	25,6	3,6
15	27,4	26,7	-2,5
16	25,0	25,8	2,9
17	26,3	25,8	-2,2

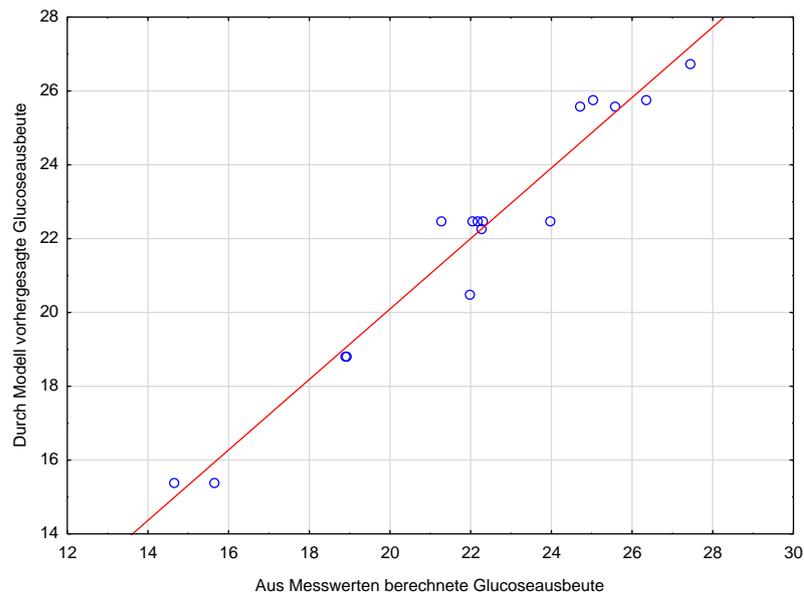


Abbildung: Paritätsdiagramm zur Beurteilung der Modellgenauigkeit für die Vorhersage der Glucoseausbeute

Anhang 3 Ergänzung zu Kapitel 5.3.3 Ergebnisse der Ethanolfermentation nach saurem Aufschluss und enzymatischer Verzuckerung des Biertreibers

Tabelle: Auflistung der aus den Messwerten berechneten und durch das Modell vorhergesagten Ethanolausbeuten sowie deren prozentuale Abweichung

Nr.	Aus Messwerten berechnete Ausbeute [%]	Durch Modell vorhergesagte Ausbeute [%]	Prozentuale Abweichung des Modellwerts bezogen auf die experimentell bestimmte Ausbeute [%]
1	18,6	17,8	-4,4
2	16,0	17,8	11,2
3	–	–	–
4	20,6	19,7	-4,2
5	18,4	19,7	7,1
6	23,5	22,9	-2,7
7	23,6	23,9	1,0
8	24,0	23,9	-0,7
9	24,9	23,9	-4,3
10	23,7	23,9	0,9
11	24,9	23,9	-4,0
12	25,3	24,8	-1,7
13	27,4	28,0	2,3
14	27,6	28,0	1,5
15	29,9	29,0	-3,2
16	28,1	29,9	6,4
17	30,4	29,9	-1,5

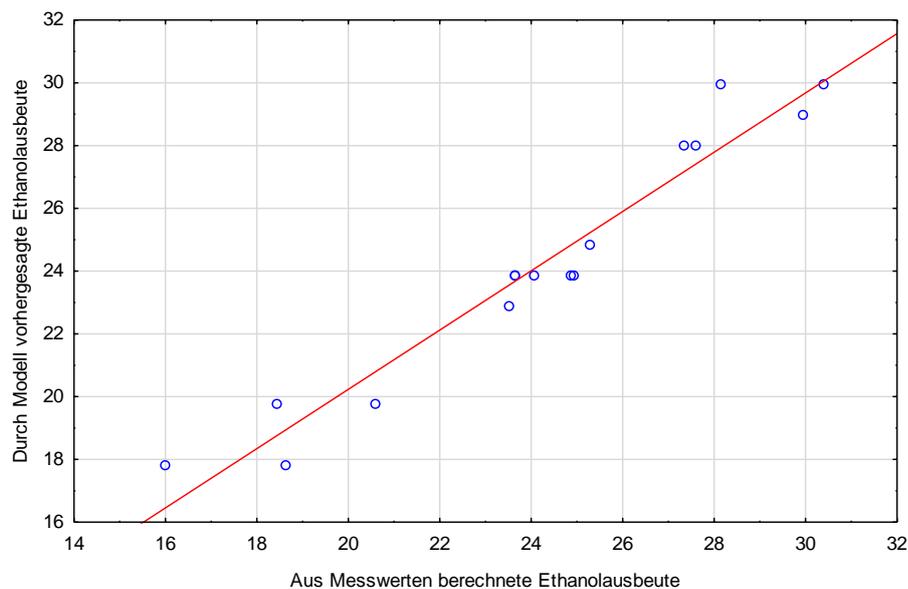


Abbildung: Paritätsdiagramm zur Beurteilung der Modellgenauigkeit zur Vorhersage der Ethanolausbeute

Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Diese Arbeit lag in gleicher oder ähnlicher Weise noch keiner Prüfungsbehörde vor und wurde bisher noch nicht veröffentlicht.

Zwickau, 12.10.2023

Ort, Abgabedatum

Mirko Nötzold

Unterschrift des Verfassers