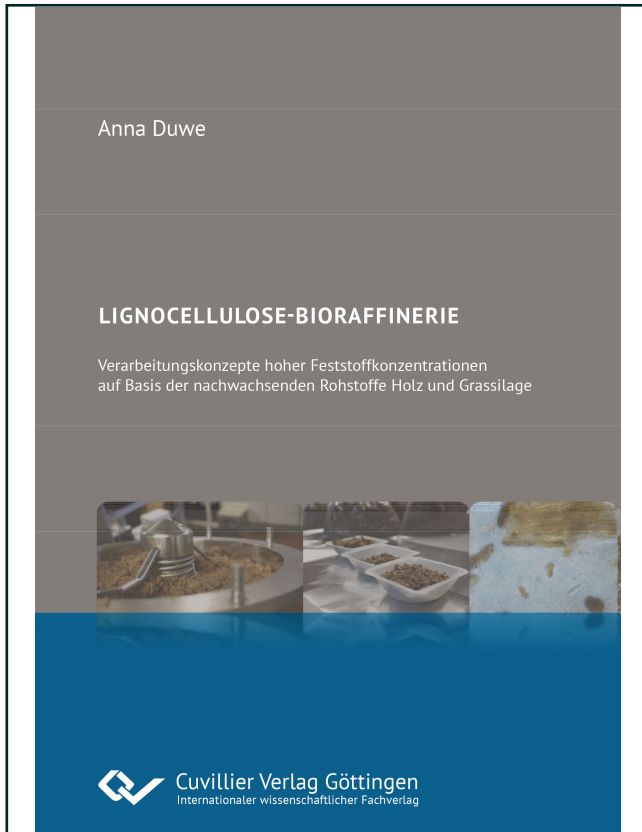




Anna Duwe (Autor)

## **Lignocellulose-Bioraffinerie**

*Verarbeitungskonzepte hoher Feststoffkonzentrationen auf Basis der nachwachsenden Rohstoffe Holz und Grassilage*



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7482>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany  
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>



# 1 EINLEITUNG

Sowohl auf nationalen als auch auf internationalen Ebenen gibt es Bestrebungen fossile Kohlenstoffquellen durch nachwachsende Rohstoffe zu substituieren. Im November 2015 fanden sich auf dem *Global Bioeconomy Summit* mehr als 850 Teilnehmer aus 82 Nationen in Berlin ein und formulierten ein gemeinsames Ziel zur nachhaltigen Förderung einer biobasierten Wirtschaft [1]. Hierbei beschreibt das Konzept der Bioraffinerien einen aussichtsreichen Ansatz für die effiziente und nachhaltige Nutzung der Biomassen. Neben Deutschland entwickeln auch andere EU-Staaten wie die Niederlande, Dänemark, Finnland oder Schweden eigene Bioökonomie-Strategien [2–4]. Auf internationaler Ebene sind auf diesem Feld, neben Brasilien, vor allem die USA sehr aktiv [5].

Wenn sich im Allgemeinen auch unterschiedliche Rohstoffe für den Einsatz in einer Bioraffinerie eignen, so zeigen diese internationalen Bestrebungen deutlich, dass im Speziellen die regionalen Konstellationen und Kostenaspekte ausschlaggebend dafür sind, welcher Rohstoff verwendet wird. In Deutschland erscheint diesbezüglich die Nutzung von Nebenprodukten aus der Land- und Forstwirtschaft und von Abfallprodukten aus dem Kommunalbereich als besonders aussichtsreich [2,6,7]. Viele dieser Rohstoffe sind Lignocellulose-haltige Biomassen.

Vergleichbar mit der Erdöl-basierten Raffinerie wird auch in einer Lignocellulose-Bioraffinerie das Rohmaterial in seine Hauptkomponenten zerlegt. Auf dieser Grundlage werden die individuellen Produktherstellungsverfahren mit unterschiedlichen Prozesstechnologien entwickelt. Doch im Gegensatz zu Erdöl enthält die Lignocellulose-haltige Biomasse einen geringeren Anteil Kohlenstoff und Wasserstoff, während der Anteil an Sauerstoff höher ist (siehe Tab. 1). Der nachwachsende Rohstoff besteht hauptsächlich aus den Kohlenhydrat-basierten Polymeren Cellulose und Hemicellulose sowie dem aus aromatischen Monomeren zusammengesetztem Lignin. Je nach Rohstoffart und saisonalen Bedingungen können sich unterschiedliche Verhältnisse dieser Hauptkomponenten ergeben.

Auf Basis der unterschiedlichen Rohstoffzusammensetzung ergeben sich unterschiedliche Bearbeitungsverfahren. Während die Erdöl-basierten Raffinerie grundsätzlich als Trennprinzip die Destillation einsetzt, existiert eine Vielzahl an Trennungsmöglichkeiten in Bezug auf Lignocellulose. In Abhängigkeit des Rohstoffs und des Zielprodukts werden unterschiedliche Verfahren eingesetzt [8]. Im Anschluss an die Komponententrennung erfolgt im zweiten Bearbeitungsschritt der Bioraffinerie die Bereitstellung der Zuckermonomere aus den Polysacchariden durch enzymatische oder chemische Hydrolyse. Im dritten und letzten Bearbeitungsschritt erfolgt anschließend deren fermentative Umsetzung.

Zu den Zielprodukten gehören organische Verbindungen wie Ethanol, Milchsäure, Bernsteinsäure oder Itaconsäure [9]. Der Rohstoff Lignin besitzt ebenfalls großes Potential und kann zur Wertschöpfung in einer Bioraffinerie maßgeblich beitragen [10]. Es kann zur Herstellung von Copolymeren, thermoplastischen Elastomeren oder cyclischen Aldehyden und gemischten Phenolen genutzt werden [11].

**Tab. 1** Unterschiede in der Zusammensetzung Lignocellulose-haltiger Rohstoffe und Erdöl

Parameter	Laubholz <sup>a</sup>	Nadelholz <sup>b</sup>	Land- wirtschaftliche Reststoffe <sup>c</sup>	Krautige Energie- pflanzen <sup>d</sup>	Erdöl <sup>e</sup>
	[%]				
Cellulose	41,1	41,7	32,6	31,0	-
Hemicellulose	17,0	20,5	22,6	24,4	-
Lignin	24,3	25,9	16,9	17,6	-
Säuren	1,4	2,5	2,2	1,2	-
Extraktstoffe	6,5	2,7	13,0	17,0	-
Asche	1,6	0,3	10,2	5,8	-
Paraffine	-	-	-	-	30
Naphthene	-	-	-	-	49
Aromaten	-	-	-	-	15
Bitumen	-	-	-	-	6
C	51,7	50,3	43,9	47,3	83-87
H	4,5	6,0	5,3	5,3	10-14
O	35,1	42,1	38,8	41,6	0,1-1,5
N	0,20	0,03	0,63	0,51	0,1-2
S	0,03	0,01	0,16	0,10	0,05-6,0

<sup>a</sup> Laubholz (Hybrid Poplar Caudina, DN-34 Whole Tree w/o leaves or needles #13) [12]

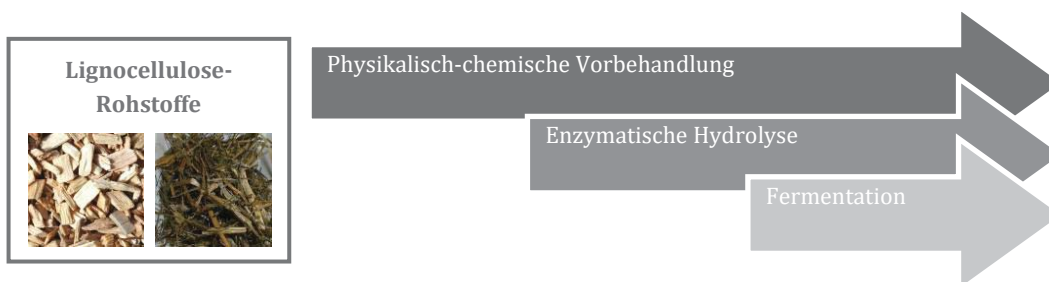
<sup>b</sup> Nadelholz (Monterey Pine (Pinus Radiata) Debarked Wood #153) [12]

<sup>c</sup> Landwirtschaftliche Reststoffe (Wheat Straw (Triticum aestivum) Thunderbird Whole Plant #154) [12]

<sup>d</sup> Krautige Energiepflanzen (Switchgrass Alamo Whole Plant #74) [12]

<sup>e</sup> Erdöl [8,13]

Da es eine Vielzahl von Auswirkungen zwischen den einzelnen Prozessschritten gibt, z. B. können bereits in der Vorbehandlung Inhibitoren entstehen, die sich erst in der Fermentation bemerkbar machen, strebt diese Arbeit eine systemische Betrachtung der Bioraffinerie an. So werden im Rahmen dieser Arbeit alle zentralen Prozessschritte der Bioraffinerie, also Vorbehandlung, enzymatische Hydrolyse und fermentative Umsetzung der Lignocellulose-Rohstoffe Grassilage (Kapitel 2) und Holz (Kapitel 3) betrachtet. Bei beiden Rohstoffen bestand das Ziel darin, diese unter hohen Feststoffkonzentrationen von  $\geq 100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  enzymatisch bzw. fermentativ umzusetzen. In diesem Zusammenhang werden maximale Zuckerausbeuten bei minimalen Einsatzmengen cellulolytischer Enzymen angestrebt.


**Abb. 1** Lignocellulose-Bioraffinerie - Einsatz der Rohstoffe Holz und Silage

Als letztes Thema behandelt diese Arbeit die Etablierung von spektroskopische Analysen der Hydrolyse- und Fermentationsverläufe im MIR-Bereich mittels der FT-IR/ATR-Messtechnik. Die gewonnenen Erkenntnisse sind in Kapitel 4 beschrieben.



## 2 GRASSILAGE-BASIERTE LIGNOCELLULOSE-BIORAFFINERIE

### 2.1 Zielsetzung

Die industrielle Nutzung nachwachsender Rohstoffe setzt heutzutage ökonomische, aber auch ökologische und soziale Bewertungen voraus. In der „Nationalen Politikstrategie Bioökonomie“ der Bundesregierung (März 2014), wird die Umstellung der überwiegend auf fossilen Rohstoffen basierenden Wirtschaft zu einer auf erneuerbaren Ressourcen beruhenden, rohstoffeffizienten Wirtschaft angestrebt. So sollen hierbei einerseits Nutzungspfade mit einem höheren Wertschöpfungspotenzial gefördert werden, andererseits sollen aber auch der Umwelt-, Klima-, Natur- und Tierschutzbelange sowie der Einhaltung sozialer Standards Rechnung getragen werden [14].

Vor diesem Hintergrund bietet Silage als nachwachsender Rohstoff ein großes Wertschöpfungspotenzial. Die Nachfrage an der biobasierten Basischemikalie Milchsäure, welche das Kernprodukt der Silage-basierten Bioraffinerie in dieser Arbeit darstellt, steigt in einer Vielzahl an Industriebereichen. Gleichzeitig können aus der grünen Biomasse Proteine und Aminosäuren gewonnen, Fasern als Ausgangsstoff für Dämmmaterial, Vliese und Paneele hergestellt oder auch Energie erzeugt werden [15].

Neben den ökonomischen Potentialen ist ebenso die nachhaltige Entwicklung der landwirtschaftlichen Nutzfläche zur Erzeugung der Grassilage Gegenstand aktueller politischen Diskussionen. Im November 2012 wurde das Fachforum Grünland der Deutschen Agrarforschungsallianz (DAFA) eingerichtet, das in einem Strategiepapier die stoffliche und energetische Verwertung der Biomasse aus Grünland forciert. Dieses Vorgehen bietet eine alternative bzw. zusätzliche Nutzung von ineffizient genutzten Grünlandstandorten [16]. Derzeit ist die Bewirtschaftung insbesondere von extensivem Dauergrünland für viele Landwirte wirtschaftlich wenig attraktiv, so dass umbruchfähiges Grünland oftmals in Ackerland verwandelt und nicht umbruchfähiges Grünland aufgeforstet oder aufgegeben wurde [16]. Des Weiteren „verbuschen“ diese Flächen häufig, wodurch der Lebensraum für viele Tier- und Pflanzenarten verloren geht.

Die Bedeutung von Grünland wurde auch in einem Report des Bundesamts für Naturschutz hervorgehoben (Juli 2014) [17]. Der Report betrachtet die Bedeutung in vier Ausprägungen:

- *Ökologische Bedeutung*
  - Kulturgrasland gehört zu den artenreichsten Biotoptypen Mitteleuropas, von den in Deutschland gefährdeten Arten der Farn- und Blütenpflanzen haben sogar rund 40 % ( $\approx$  822 Arten) ihr Hauptvorkommen im Grünland
  - Grünland bietet mit seiner Vielfalt an Strukturen und zeitlich gestaffelten Blühabfolgen eine große Vielfalt an Tierlebensräumen



- *Bedeutung für den Klimaschutz*
  - CO<sub>2</sub>-Senkefunktion
  - Rückhaltefunktion für Kohlenstoff, es werden in nur 10 % der landwirtschaftlichen Nutzfläche (vorwiegend Grünland) mehr als 35 % der gesamten Kohlenstoffvorräte landwirtschaftlicher Böden in Deutschland gespeichert
- *Bedeutung für den Auen- und Hochwasserschutz*
  - Auen sind die natürlichen Überschwemmungsgebiete der Fließgewässer, Grünland ist mit 47 % die dominierende Landnutzungsform in der rezenten Aue (d. h. dem Bereich, der noch überflutet werden kann)
  - Durch die bessere und dauerhafte Durchwurzelung der Böden kann Grünland wesentlich zur Verringerung von Bodenerosion beitragen
- *Bedeutung für das Landschaftsbild und die Erholung*

Derzeit besteht in sechs Bundesländern und zwei Stadtstaaten (Nordrhein-Westfalen, Schleswig-Holstein/Hamburg, Mecklenburg-Vorpommern, Niedersachsen/Bremen, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz) eine Antrags- und Genehmigungspflicht für einen geplanten Grünlandumbruch und ein grundsätzliches Grünlanderhaltungsgebot [17]. Weiterhin werden innovative Ansätze für eine Grünlandnutzung gesucht, die sowohl die Wirtschaftlichkeit als auch die Ökosystemleistung fördern.

Ein Ansatz, um diese Ziele zu erreichen, ist die Verwertung von Gras in Form der ganzjährig verfügbaren Silage zur stofflichen und energetischen Verwertung innerhalb einer Bioraffinerie. Hierdurch kann sich der Wert der Bewirtschaftung des Grünlandes erhöhen. Gleichzeitig kann die vorhandene Infrastruktur und Logistik der Silagebereitung durch die Landwirte genutzt werden.

Das Ziel der im Folgenden beschriebenen Forschungsansätze ist die Etablierung der fermentativen Umsetzung von Silagerohstoffen zu Milchsäure. Das Konzept baut auf den Ergebnissen des Projekts „Nutzung von Silage und Silagepresssaft als Rohstoff zur Gewinnung von Grund- und Feinchemikalien“ (FKZ 22004808) [18] auf. In diesem Projekt wurde die Aufarbeitung der Milchsäure aus Silagepresssaft und die Hydrolyse des Silagepresskuchens sowie die Fermentation der Hydrolysate zu Ethanol betrachtet.

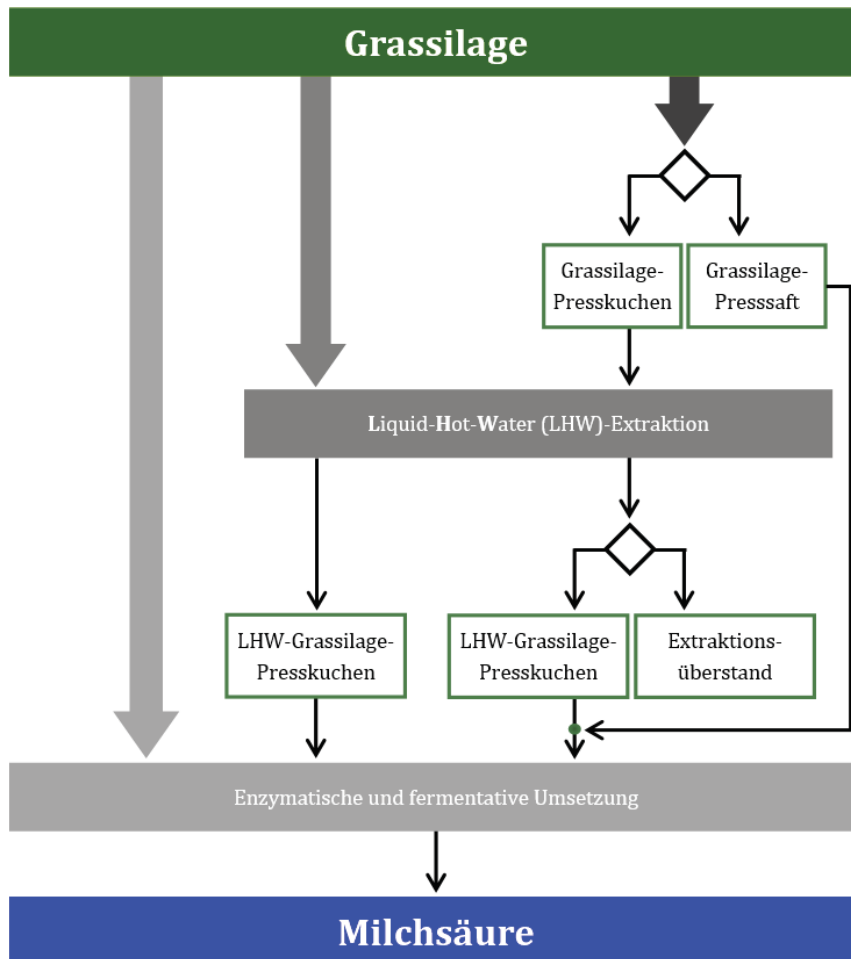
Als komplementärer Ansatz zur Herstellung von Ethanol, fokussiert diese Arbeit auf eine Silage-Bioraffinerie mit dem Schwerpunkt der Herstellung von Milchsäure. Durch die Silierung wird bereits industriell nutzbare Milchsäure produziert. Ziel ist es ein Verfahren auf Basis von Grassilage zur weiteren fermentativen Umsetzung der in der Lignocellulose gebundenen Zucker zu Milchsäure zu entwickeln, um die erreichbare Milchsäureausbeute deutlich zu erhöhen.

Im Rahmen dieser Entwicklungsarbeit wurden folgende Teilziele verfolgt:

1. Analysen zur Rohstoffvariabilität der eingesetzten Grassilagen aus unterschiedlichen Lagerungsformen und deren Einfluss auf die fermentative Umsetzung
2. Untersuchung des Einflusses einer Liquid-Hot-Water (LHW)-Extraktion von Grassilage zur Erhöhung der Celluloseausbeute



3. Bereitstellung von Zuckermonomeren durch enzymatische Hydrolysen unter Minimierung des Enzymeinsatzes
4. Etablierung und Optimierung der fermentativen Umsetzung von Grassilage zu Milchsäure (siehe Abb. 2)



**Abb. 2** Überblick über die verschiedenen Prozesse zur fermentativen Milchsäureproduktion aus Grassilage



## 2.2 Theoretische Grundlagen

### 2.2.1 Rohstoffvariabilität von Grassilagen

Die Silagebereitung hat zum Ziel, Pflanzen für Futterzwecke im Winterhalbjahr zu konservieren. Im Laufe einer Vegetationsperiode werden mehrere Schnitte genutzt. Gras- und Maissilage sind Futtergrundlage für Milchkühe, Mastrinder und andere Nutztiere wie beispielsweise Schafe. Die landwirtschaftliche Nutzfläche, die unter anderem zur Erzeugung der Grassilagen dient, wird als Grünland bezeichnet. Die heutige Entwicklung in Richtung höherer Einzeltierleistungen, vermehrtem Einsatz von Konzentratfütterungsmitteln, größerer Herden und damit reduzierter Weidenutzung führt zu einem Strukturwandel bei der Nutzung des Grünlandes. Als ein hohes Nutzungspotential von Grünland wird die Biomasseerzeugung für Industrieerzeugnisse erachtet. Die stoffliche Verwertung soll den Wert der Grünlandbewirtschaftung erhöhen und die Erhaltung dieser Flächen gewährleisten [16,19]. Silage als nachwachsender Rohstoff bietet den Vorteil als Substrat zeitlich uneingeschränkt nutzbar zu sein, ohne dass die Gefahr des Verderbs besteht. Dies ist einer der größten Nachteile der industriellen Nutzung von frisch geerntetem Gras, da dessen schneller Verderb während der Lagerung eine zeitliche Beschränkung seiner Verarbeitbarkeit bedeutet. Überdies kann auf eine etablierte Infrastruktur und Logistik der Silagebereitung durch die Landwirte zurückgegriffen werden.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen Fahr- und Ballensilage, Siloschläuchen und Hochsilos [20,21]. Der Anteil der Ballensilage hat über die Jahre hinweg kontinuierlich zugenommen, da Mitte der achtziger Jahre die technischen Voraussetzungen durch zuverlässige Maschinen und hochwertige Stretchfolien gegeben waren [22]. Unabhängig vom verwendeten Silier- und Lagersystem besteht der Prozess darin, Luft während des Silierprozesses auszuschließen, so dass eine anaerobe Milchsäuregärung stattfinden kann. Dies wird gewährleistet durch eine hohe Verdichtung des kleingehäckselten Ernteguts (Gras 2-4 cm) und sorgfältige Siloabdeckung [20]. Die im Schnittgut vorhandenen Milchsäurebakterien verstoffwechseln unter diesen Bedingungen die pflanzlichen Saccharide in Milchsäure und andere organische Säuren. Ziel ist ein pH-Wert je nach Anwelkgrad des Grases zwischen 4,4-4,8 zu erreichen, das Wachstum unerwünschter Gärerschädlinge, wie Clostridien, Enterobakterien oder Schimmelpilze zu vermeiden und damit die Silage lagerstabil zu machen [20].

Verschiedene Parameter können die Lagerstabilität und damit die Rohstoffvariabilität der Silage beeinflussen:

- Pflanzenbestand
- Schnittzeitpunkt
- Düngung
- Anwelkgrad
- Konservierung



Generell ist der Kohlenhydratgehalt abhängig vom Pflanzenbestand, dem Schnitzeitpunkt und dem Anwelkgrad. Gräser weisen einen höheren Kohlenhydratgehalt auf als Kräuter und Leguminosen. Letztere haben allerdings einen höheren Eiweiß- und Mineralstoffgehalt, wodurch ihre Pufferkapazität höher ist [20]. Im Laufe der Reifung des Grases steigt der Anteil der Zellwand, welche aus den Strukturkohlenhydraten Cellulose und Hemicellulose sowie Lignin besteht, von ca. 35 % auf 60 %. Gleichermaßen sinkt der Zellinhalt mit entsprechenden Gehalten von Zuckern, Proteinen und Mineralien [23,24]. Die Stickstoffdüngung sowie der Schnitzeitpunkt bedingen den Rohproteingehalt [20,25].

Die zum Silieren des Grasschnitts optimale Trockenmasse liegt bei 30-40 % mit einer Verdichtung von 200 bis 240 kg<sub>TM</sub>·m<sup>3</sup>. Ist der Grasschnitt zu nass und zu verschmutzt, wird das Wachstum von Hefe- und Schimmelpilzen begünstigt. Auch kann dies zur Folge haben, dass zucker- und eiweißspaltende Clostridien vermehrt wachsen. Die zuckerspaltenden Clostridien produzieren Buttersäure oder verstoffwechseln bei Zuckermangel auch die Milchsäure während die eiweißspaltenden Clostridien Eiweiß abbauen und Ammoniak produzieren. Hierdurch kann auch Buttersäure gebildet werden kann. Grundlegend kann die Aussage getroffen werden, dass mit steigendem Wassergehalt der pH-Wert niedriger sein muss, damit die Silage lagerstabil bleibt [20]. Häufig werden dem Siliergut zu Beginn Siliermittel zugesetzt, die die Entstehung von Milchsäure unterstützen und beschleunigen sollen. Dies sind organische Säuren wie Ameisen- oder Propionsäure oder auch Starterkulturen von homofermentativen Milchsäurebakterien [26]. Tab. 2 gibt einen Überblick über verschiedene Qualitätsparameter zur Herstellung lagerstabiler Silagen.

**Tab. 2** Qualitätsparameter für Grassilagen [20,27]

Parameter	Orientierungswerte	Parameter	Orientierungswerte
Trockenmasse	30-40 %	Lagerungsdichte	> 200 kg <sub>TM</sub> ·m <sup>3</sup>
Rohfasergehalt	22-26 % (w/w) <sub>TM</sub>	pH-Wert	4,4-4,8
Rohproteingehalt	15-18 % (w/w) <sub>TM</sub>	Milchsäuregehalt	> 3 % (w/w) <sub>TM</sub>
Rohfettgehalt	< 10 % (w/w) <sub>TM</sub>	Essigsäuregehalt	< 2 % (w/w) <sub>TM</sub>
Rohaschegehalt	> 3 % (w/w) <sub>TM</sub>	Buttersäuregehalt	< 0,3 % (w/w) <sub>TM</sub>

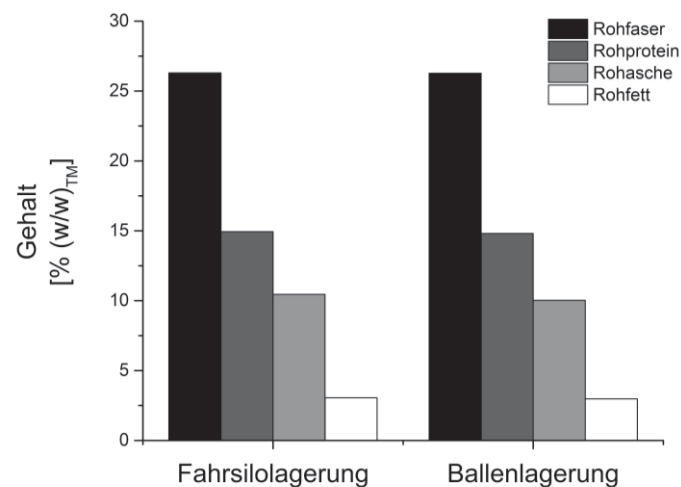
In einer Studie zur Qualitätsbewertung von österreichischen Grassilagen aus Praxisbetrieben wurden in vier Projektjahren (2003-2009) mehr als 3600 Grassilageproben analysiert [21]. In Österreich sind die Fahrsilo- und Ballensysteme die wichtigsten Siloformen. Die Proben bestanden zu rund 63 % aus Fahrsilosilagen und zu 31 % aus Rundballensilagen. Die Trockenmassen der Fahrsilo-gelagerten Rohstoffe betrug durchschnittlich 36,5 % und war damit etwas niedriger als die der Ballensilage (siehe Tab. 3), und lagen somit insgesamt im optimalen Bereich. Die Lagerungsdichten hingegen von 189 bzw. 155 kg<sub>TM</sub>·m<sup>3</sup> unterschritten die optimalen Verdichtungsvorgaben von 200-240 kg<sub>TM</sub>·m<sup>3</sup>.

**Tab. 3** Durchschnittliche Trockenmassen und Lagerungsdichten verschieden gelagerter Grassilagen (Ballen- und Fahrsilolagerung) aus Praxisbetrieben (2003-2009) [21]

Lagerung	Trockenmasse [%]	Lagerungsdichte [kg <sub>TM</sub> ·m <sup>3</sup> ]
Fahrsilo	36,5	189 ± 42,6
Ballen	40,0	155 ± 42,1



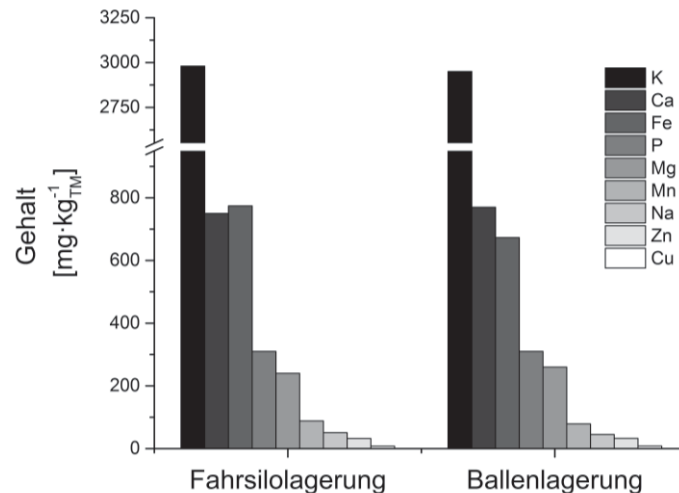
Abb. 3 zeigt die durchschnittlichen Gehalte an Rohfaser, -protein, -fett und -asche. Der Rest des Anteils an der Trockenmasse der Silage beinhaltet Stickstoff-freie Extraktstoffe wie beispielsweise lösliche Zucker, Stärke und Pektine.



**Abb. 3** Durchschnittliche Gehalte an Rohfaser, -protein, -fett und -asche in verschieden gelagerten Grassilagen (Ballen- und Fahrstilolagerung) aus Praxisbetrieben (2003-2009) [21]

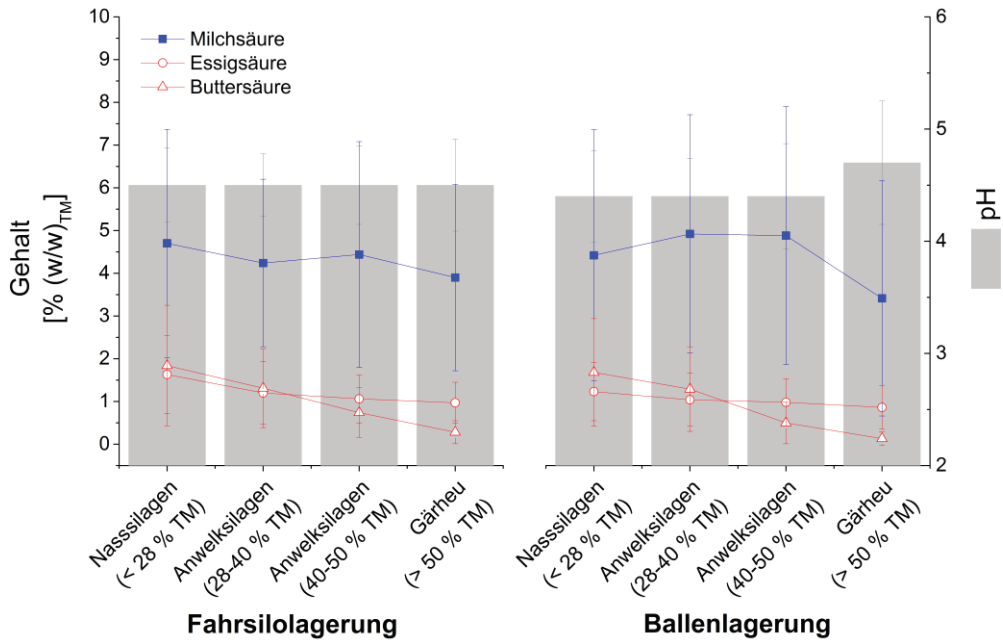
Insgesamt unterscheiden sich die Gehalte zwischen Fahrstilo- und Ballenlagerung kaum. Rohfaser, dessen Hauptbestandteil Cellulose darstellt, stellt mit 26,3 % (w/w)<sub>TM</sub> eine Hauptkomponente der Silage dar. Das Rohprotein hat einen Anteil von 14,9 % (w/w)<sub>TM</sub>, gefolgt von Rohasche mit 10,5 % (w/w)<sub>TM</sub> und von Rohfett mit 3,1 % (w/w)<sub>TM</sub>. Der Gehalt an Rohasche liegt weit über dem optimalen Wert für Silagen. Die Rohasche umfasst anorganische Stoffe wie mineralische Verbindungen und Sand. Ein hoher Wert kommt häufig durch die Verschmutzung mit Erde zustande. Aus diesem Grund sollte die Schnitthöhe mindestens 5-6 cm betragen.

Ebenfalls durchgeführt wurden Mineralstoffanalysen (siehe Abb. 4). Neben dem Alkalimetall Kalium mit dem durchschnittlich höchsten Gehalt von 2965 mg·kg<sup>-1</sup><sub>TM</sub> enthalten die Fahrstilo- und Ballensilagen vor allem das Erdalkalimetall Calcium (760 mg·kg<sup>-1</sup><sub>TM</sub>) und das Übergangsmetall Eisen (724 mg·kg<sup>-1</sup><sub>TM</sub>). Phosphor und Magnesium weisen mit 310 mg·kg<sup>-1</sup><sub>TM</sub> und 250 mg·kg<sup>-1</sup><sub>TM</sub> geringere Gehalte auf. Natrium, Zink und Kupfer haben Gehalte unter 100 mg·kg<sup>-1</sup><sub>TM</sub>. Die Varianz der Mineralstoffgehalte ist je nach Element unterschiedlich. Die Wirtschaftsweise (Biobetrieb oder Teilnahme an Maßnahmen wie das ÖPUL/ Österreichisches Agrar-Umweltprogramm und das UBAG/ Umweltgerechtes Bewirtschaftung von Acker- und Grünlandflächen) erwies sich bei der Varianz der Calciumgehalte als größter Einflussfaktor, bei Phosphor und Kalium hatte der Gehalt an Rohprotein den höchsten Effekt. Der Rohaschegehalt hingegen bei Magnesium und Natrium. Überdies zeigten Faktoren wie die Schnitthöhe, der Nutzungszeitpunkt oder welches Mäh- und Erntegerät verwendet wurde einen signifikanten Einfluss auf bestimmte Elemente.



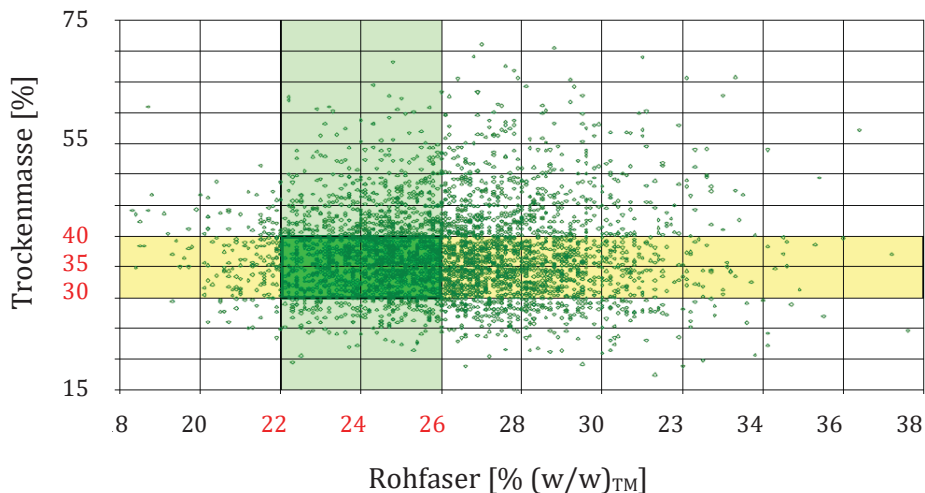
**Abb. 4** Durchschnittliche Gehalte an Mineralstoffen verschieden gelagerter Grassilagen (Ballen- und Fahrstilolagerung) aus Praxisbetrieben (2003-2009) [21]

Die Silagen wurden weiterhin nach ihrer Trockenmasse in Nass- und Anwelksilagen sowie Gärheu gruppiert und bezüglich ihres pH-Wertes und der Gehalte an Milch-, Essig-, und Buttersäure untersucht (siehe Abb. 5). Die pH-Werte lagen bei beiden Siliersystemen mit durchschnittlich 4,5 (Fahrstilo) und 4,5 (Ballen) im Toleranzbereich. Auffällig ist, dass die Gehalte an Buttersäure mit durchschnittlich 1,2 % (w/w)<sub>TM</sub> (Fahrstilo) und 0,9 % (w/w)<sub>TM</sub> (Ballen) weit über dem Orientierungswert von 0,3 % (w/w)<sub>TM</sub> lagen. Nur rund 25 % der Grassilagen wiesen Buttersäuregehalte darunter auf. Begünstigt wird die Buttersäurebildung unter anderem durch hohe Rohaschegehalte und damit einhergehender Verschmutzung durch bodenbürtige Clostridien und eine zu geringe Trockenmasse unter 30 % bei gleichzeitig mangelnder Verdichtung [20], welche wie zuvor dargestellt unter den Vorgaben von mindestens 200 kg<sub>TM</sub>·m<sup>3</sup> lagen. Diese Abhängigkeit zeigt sich auch in den Buttersäuregehalten bei sinkenden Trockenmassen. Insbesondere Nasssilagen und Anwelksilagen mit niedrigen Trockenmassen wiesen die höchsten Gehalte auf. Der Milchsäureanteil lag bei 4,3 % (w/w)<sub>TM</sub> (Fahrstilo) bzw. 4,7 % (w/w)<sub>TM</sub> (Ballen). Daneben wurden Essigsäuregehalte von 1,2 % (w/w)<sub>TM</sub> (Fahrstilo) bzw. 1,0 % (w/w)<sub>TM</sub> (Ballen) festgestellt. Geringe Anteile an Essigsäure sind hierbei jedoch erwünscht, da diese der Hefe- und Schimmelpilzbildung entgegenwirken.



**Abb. 5** Durchschnittliche Gehalte organischer Säuren in Bezug auf die Trockenmasse verschieden gelagerter Grassilagen (Ballen- und Fahr- silolagerung) aus Praxisbetrieben (2003-2009) [21]

Darüber hinaus zeigen die angegebenen Standardabweichungen deutlich, dass Silage eine hohe Rohstoffvariabilität aufweist. Dieser Umstand geht außerdem aus der Auftragung der einzelnen Werte bezüglich der Trockenmasse- und Rohfasergehalte hervor (siehe Abb. 6). 25 % der österreichischen Grassilagen lagen im optimalen Bereich. Unter Einbezug des Rohaschegehaltes sind es nur 9 % der Grassilagen, die in allen drei Parametern im optimalen Bereich lagen.



**Abb. 6** Auftragung der Einzelwerte bezüglich der Trockenmasse- und Rohfasergehalte verschieden gelagerter Grassilagen aus Praxisbetrieben (2003-2009) [21]

Ein weiterer Anhaltspunkt für die hohe Rohstoffvariabilität der Silage ist die Veröffentlichung von Grassilagedaten der Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen aus dem Jahr 2014 [28]. In Tab.4 sind die Mittelwerte und Spannweiten verschiedener Parameter dargestellt.



**Tab. 4** Mittelwerte und Spannweiten der Parameter, Trockenmasse, Rohfasergehalt, Rohproteingehalt, Rohfettgehalt und Rohaschegehalt von Grassilagen des 1. und 2. Schnitts [28]

Parameter	1. Schnitt (421 Proben)		2. Schnitt (221 Proben)	
	Mittelwert [%]	Spannweite [%]	Mittelwert [%]	Spannweite [%]
Trockenmasse	35,8	17,7-78,8	39,9	15,8-82,1
Rohfasergehalt	24,9	19,2-38,9	25,0	18,3-31,9
Rohproteingehalt	16,2	5,6-25,8	16,2	9,7-27,2
Rohfettgehalt	3,9	1,4-5,2	3,9	2,3-5,2
Rohaschegehalt	10,7	5,3-20,0	10,8	7,2-28,0

Die dargestellten Spannweiten umfassen einen weiten Bereich um den Mittelwert. Der Streubereich reicht bei allen Parametern von der Hälfte bis hin zur Verdopplung des Mittelwertes. Allerdings wurden hierbei die Standardabweichungen des arithmetischen Mittelwerts nicht angegeben, so dass keine Aussage darüber gegeben werden kann, welche durchschnittliche Abweichung die einzelnen Werte vom Mittelwert besitzen.

Entsprechende Angaben von Spannweiten veröffentlichte Ecker *et al.*, der im Rahmen der Pilotanlage der „Grünen Bioraffinerie Österreich“ bei der Inbetriebnahme unterschiedliche Silage-Presssäften einsetzte [29]. In Bezug auf die Milchsäure- und Aminosäuregehalte variierten die Milchsäuregehalte von  $22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  bis zu  $38 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Aminosäuren kamen typischerweise in Konzentrationen von  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Grassilagen) und  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Kleesilagen) vor.

Im Hinblick auf die Verwendung der Grassilage als Rohstoff im Rahmen einer Bioraffinerie ist also zu bedenken, dass die Rohstoffvariabilität ein wichtiger Faktor darstellt. Die Qualitätsschwankungen können die Produktausbeuten beeinflussen und sind entsprechend mit Herausforderungen bei der Planung der Produktion und der Wertschöpfungskette verbunden.

## 2.2.2 Biotechnologische Milchsäureproduktion

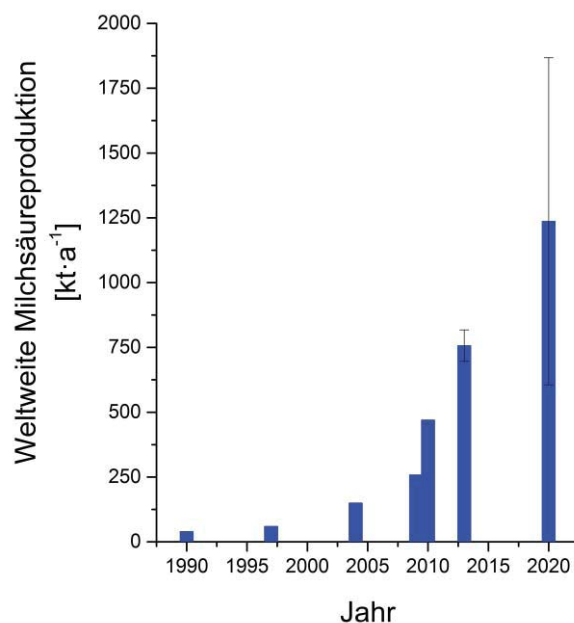
Die biotechnologische Milchsäureproduktion fand ihren Ursprung in Ingelheim am Rhein im Jahr 1893. Eigentlich wurde in der Weinstefabrik von Albert Boehringer an der Herstellung von Zitronensäure geforscht, doch anstelle der hydroxylierten Tricarbonsäure entstand Milchsäure. Infolge dieser unerwünschten Gärung kam man zu der Erkenntnis, dass Milchsäure unter Verwendung bestimmter Bakterien in größerem Umfang erzeugt werden kann. Die Produktion im Industriemaßstab erfolgte 1895 und markierte gleichzeitig einen Meilenstein in der Bioverfahrenstechnik [30–32]. Im Jahr 1990 betrug schließlich der weltweite Anteil an fermentativ hergestellter Milchsäure 65 % und seit dem Jahr 1995 basieren weitgehend alle neu errichteten Produktionsanlagen auf der mikrobiellen Herstellungstechnik. Entsprechend beruht die Weltproduktion heute zu ca. 95 % auf dem Fermentationsweg [33,34].

Gegenüber der chemischen Synthese bietet die fermentative Route entscheidende Vorteile. Die synthetische Herstellung der Milchsäure ist abhängig von petrochemischen Rohstoffen, deren Endlichkeit bekannt ist und deren Verarbeitung als umweltbelastend angesehen wird [35,36].

In den vergangenen Jahren erzeugten großtechnische Anlagen in den USA (Fa. Sterling Chemicals) oder Japan (Fa. Musashino Chemical Laboratory) Milchsäure durch Wasseranlagerung an Acrylsäure oder durch Anlagerung von Cyanwasserstoff an Acetaldehyd über Lactonitril [33,37–39]. Durch die fermentative Herstellung kann eine große Bandbreite an Kohlenstoffquellen genutzt werden und ermöglicht so den Ersatz der fossilen Substrate durch nachwachsende Rohstoffe. Vor allem Abfallstoffe stellen Alternativen dar, wie beispielsweise Melasse (Zuckerindustrie) oder Weizenkleie (Getreideindustrie) [40,41]. Überdies ist je nach eingesetztem Mikroorganismus sowohl die Produktion enantiomerenreiner D- und L-Milchsäure als auch die racemische Mischung aus beiden Enantiomeren möglich [34,42]. Schließlich wird die fermentative Route als kostengünstiger angesehen [34]. Es sind grundsätzlich niedrigere Produktionstemperaturen und im Allgemeinen ein geringerer Energieverbrauch nötig [43].

Im Jahr 2004 erschien Milchsäure in der Top 30-Liste potentieller biobasierter Basischemikalien in einer Studie des US-Department for Energy (DOE) [9]. Seither wurde das Potential der Milchsäureproduktion auf Basis nachwachsender Rohstoffen sowohl in den USA als auch in Europa in verschiedenen Studien festgehalten [2,44–46].

Die genannten ökologischen, technischen und wirtschaftlichen Gesichtspunkte tragen zu einer zukunftsfähigen Milchsäureproduktion auf Basis der fermentativen Herstellungstechnik bei, die angesichts der beständig wachsenden Nachfrage jährlich zu Produktionssteigerungen führt. Betrug die weltweite Milchsäureproduktion im Jahr 1990 ca. 40.000 Tonnen pro Jahr, so ist sie 2013 bereits auf 757.000 Tonnen pro Jahr angestiegen. Für das Jahr 2020 wird eine Nachfragemenge von über 1.000.0000 Tonnen pro Jahr erwartet (siehe Abb. 7).



**Abb. 7** Entwicklung und Prognose der weltweiten Milchsäureproduktion (1990-2020) [34,43,47–52]

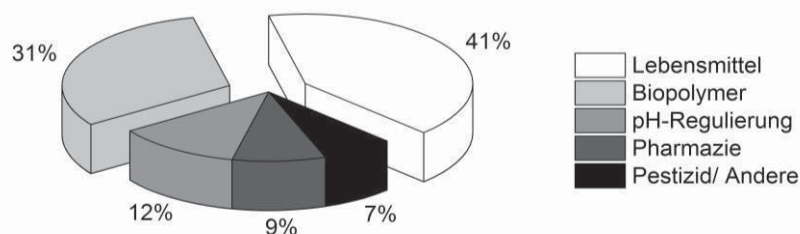
Die weltweit größten Hersteller sind NatureWorks LLC (USA), Purac (Niederlande), Galactic (Belgien) und einige in China ansässige Firmen (Henan Jindan Co., Chongqing Bofei Biochemical Products Co., Zhejiang Hisun Biomaterials Co., Wuhan Sanjiang Space Gude Biotech Co.) [44,46,53–55]. Insbesondere die sprunghaft gestiegene Produktion an



Polymilchsäure (PLA) führt zur immer größeren globalen Nachfrage am Basisrohstoff Milchsäure [54]. PLA gilt als der erste Biokunststoff, der in industriell signifikanten Mengen hergestellt wurde. Das Polymer kann entweder direkt aus Milchsäure durch eine Polykondensationsreaktion hergestellt werden oder durch Ringöffnungspolymerisation (ROP) über das zyklische Dimer der Milchsäure, dem Dilactid. Durch das erste Verfahren der Polykondensation kann ein hochmolekulares, reines Polymer ohne Katalysatorreste und andere Fremdstoffe gewonnen werden. Der Vorteil des zweiten Verfahrens, der Ringöffnungspolymerisation, liegt darin, dass keine niedermolekularen Komponenten während der Aufbaureaktion entfernt werden müssen [56]. Der biologisch abbaubare Polyester aus Milchsäure ermöglicht die Substitution bisher etablierte Kunststoffe wie Polyethylenterephthalat (PET) und Polystyrol (PS) [34]. Als Gebrauchsmaterial des täglichen Lebens ist PLA in Form von Verpackungen oder Bioplastikbechern gegenwärtig [37,57]. Aufgrund seiner Biokompatibilität erschließt der Kunststoff auch in der Medizin profitable Anwendungsgebiete, wie beispielsweise Implantate aus PLA, die sich im Körper langsam zersetzen. NatureWorks LLC, das in 2007 gegründete Joint Venture zwischen Cargill und der japanischen Teijin Limited [58] hat mit seinem Produkt Ingeo™ Biopolymer PLA einen Marktanteil von 95 % (Stand 2013) [54]).

Für die industrielle, fermentative Produktion sind insbesondere Milchsäurebakterien von Interesse. Sie können eine große Bandbreite an Kohlenstoffquellen als Substrate nutzen, so z. B. Melasse, Stärke, Molke, Rüben- und Rohrzucker [56]. Typische Substrate der Fermentation sind Maisstärke (USA), Tapioca-Wurzeln oder Zuckerrohr [37,57]. Während die Umsetzung von Glucose- oder Stärke-haltiger Substrate zur Milchsäureproduktion schon weit ausgereift erscheint, existieren weniger umfangreiche Erkenntnisse bei der Verfahrensentwicklung auf Basis Lignocellulose-haltiger Rohstoffe [56].

Der größte Teil der produzierten Milchsäure wird neben der Biopolymerproduktion in der Lebensmittelindustrie als Konservierungs- und Säuerungsmittel eingesetzt [37]. Ferner dient Milchsäure als pH-Regulator und wird beispielsweise in kosmetischen Produkten verwendet [59]. Die pharmazeutische Industrie verwendet Milchsäure als Elektrolyt in Lösungen, welche die Körperflüssigkeiten ergänzen. Ferner wird die Milchsäure zur Präparation von Lactaten genutzt, welche in vielfältiger Weise, beispielsweise in Form von Calciumlactat als Antikarieswirkstoff, eingesetzt werden [40].



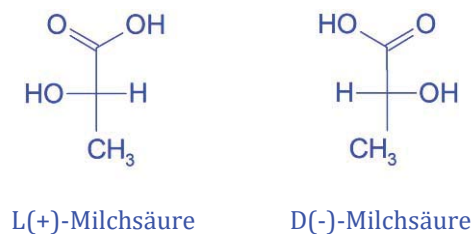
**Abb. 8** Anwendungen der Milchsäure im Überblick (Stand 2008 [46])

Grundlegend bestimmen die physikalisch-chemischen Eigenschaften die Einsatz- bzw. Nutzungsmöglichkeiten der Milchsäure, die sich über eine Vielzahl an Industriebereichen erstrecken [60]:



- Chiralität
- Säurecharakter/ niedriger pK<sub>s</sub>-Wert
- bifunktionale Reaktivität

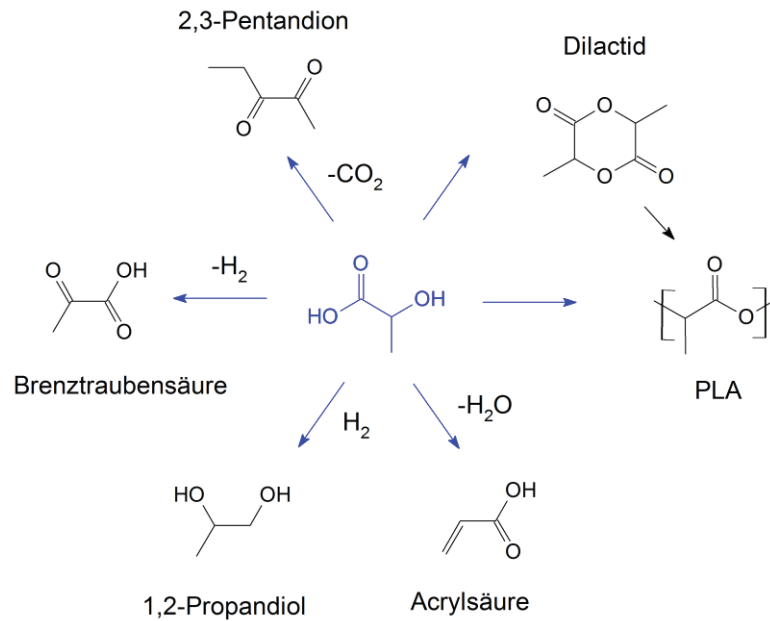
Milchsäure ist eine chirale organische Verbindung (siehe Abb. 9). Das Chiralitätszentrum ist das sp<sup>3</sup>-hybridisierte C2-Atom, an dem die Hydroxygruppe gebunden ist. Es existieren zwei isomere Formen. Die L(+)-Milchsäure unterscheidet sich von der D(-)-Milchsäure in ihrem Effekt auf polarisiertes Licht und in ihrer Reaktivität mit anderen chiralen Substanzen. Während die chemische Synthese grundsätzlich ein Racemat erzeugt, so ist es fermentativ möglich je nach Art der verwendeten Mikroorganismen ausschließlich enantiomerenreine Milchsäure zu erzeugen. Biologisch ist dies zurückzuführen auf die spezifisch exprimierte Lactatdehydrogenase, welche im abschließenden biochemischen Schritt im Rahmen des katabolen Stoffwechsels Pyruvat zu Lactat umsetzt [32,61]. Von Bedeutung ist die Enantiomerenreinheit beispielsweise bei der Herstellung des PLA-Kunststoffes, da die Polymereigenschaften stark von der Stereostruktur abhängen [42,62].



**Abb. 9** Strukturformeln der Milchsäureenantiomere in der Fischer-Projektion (ACD/ChemSketch 2.0)

Die biogene Hydroxysäure hat einen pK<sub>s</sub>-Wert von 3,9 [63] und ist verglichen mit beispielsweise der Alkansäure Propansäure (pK<sub>s</sub>-Wert von 4,89) eine stärkere Säure. Durch den negativen induktiven Effekt der α-Hydroxygruppe ist das Carboxyl-C-Atom stärker positiviert, wodurch sich wiederum die Polarität der O-H-Bindung der sauren Carboxylgruppe erhöht. Zusätzlich stabilisiert die Hydroxygruppe die negative Ladung im Lactat-Ion.

Durch die Carboxy- und Hydroxygruppe erhält Milchsäure eine bifunktionale Reaktivität und schafft so die Voraussetzung zu chemischen Ester- und Kondensationsreaktionen, (De-)Hydrierungen, Reduktionen und Oxidationen [39,64–66]. Neben der angesprochenen Herstellung von PLA kann sie beispielsweise zu Acrylsäure dehydriert, mit Wasserstoff zu Propylenglycol reduziert, zu 2,3-Pentandion kondensiert sowie zu Pyruvat oxidiert oder katalytisch zu Acetaldehyd umgewandelt werden [56]. Als Edukt für chemische Umsetzungen hat Milchsäure somit ein hohes Potential (siehe Abb. 10).



**Abb. 10** Milchsäure als Edukt für ausgewählte chemische Umsetzungen nach Mäki-Arvela *et al.* [66], Isikgor und Becer [64] und Gao *et al.* [65], (ACD/ChemSketch 2.0)

Neben der industriellen Produktion an PLA wird in der chemischen Industrie das ökonomische Potential von Milchsäure vor allem der Synthese von Acrylsäure sowie Propylenglycol bzw. 1,2-Propandiol zugeschrieben [40]. Die Anzahl der wissenschaftlichen Veröffentlichungen spiegeln den Bedarf an neuen Technologien zur Substitution der etablierten chemisch-technischen Prozesse durch biotechnische Herstellungsverfahren auf Basis der Milchsäure wider (siehe Abb. 11).

Mit 4.500.000 Tonnen weltweit hergestellter Acrylsäure in 2012 und jährlich steigendem Bedarf um 4 % stellt die Produktion der ungesättigten Carbonsäure einen ökonomisch attraktiven Wachstumsmarkt dar [67]. Die Chemikalie wird als Polyacrylsäure für Superabsorber (55 %), Kunststoffe und Synthesekautschuk (30 %) genutzt. Weitere Verwendung findet die Säure bei der Herstellung von Lacken sowie von Leder [67]. Während die derzeit gängige großindustrielle Synthese über einen energieintensiven Zwei-Stufen-Prozess in der Gasphase mit Propylen als Edukt abläuft, kann Acrylsäure auch über die katalytische Dehydratisierung von Milchsäure erzeugt werden [68–70].

Auch 1,2-Propandiol (Propylenglycol) ist mit einem jährlich steigenden Bedarf um 8 % wirtschaftlich interessant. Im Jahr 2013 erreichte das weltweite Produktionsvolumen 1.200.000 Tonnen [71]. Die petrochemische Herstellung basiert, wie die Acrylsäure, auf dem Steamcrackerprodukt Propylen, das zu Propylenoxid umgesetzt wird und durch Hydrolyse zu 1,2-Propandiol reagiert [65,72]. Vor allem die Bildung toxischer Zwischen- und Nebenprodukte während der industriellen Produktion initiierte die Bestrebungen 1,2-Propandiol biotechnologisch herzustellen [56]. Verschiedene Routen werden derzeit erforscht. Verschiedene chemische Katalysatoren können die fermentativ hergestellte Milchsäure zu 1,2-Propandiol hydrieren [66,73]. Daneben wird auch die enzymatische Katalyse über die NAD-abhängige Lactaldehyddehydrogenase und die NAD-abhängige-1,2-Propandioldehydrogenase erforscht. Auch der Weg über die mikrobielle