

# 1 EINLEITUNG

Der Einsatz nachwachsender Rohstoffe (NawaRos) für die industrielle Nutzung gewinnt immer mehr an Aufmerksamkeit. Aufgrund endlicher fossiler Ressourcen werden NawaRos zunehmend als Alternative für die stoffliche und energetische Nutzung in Betracht gezogen. Zwar sind diese Rohstoffe ausreichend verfügbar, liegen jedoch aufgrund der komplexen Struktur und Form selten gleichmäßig vor. Daher können der Transport und die Weiterverarbeitung von Energiepflanzen oder Reststoffen aus Agrar- und Forstbeständen oft nicht ohne eine vorläufige Konditionierung erfolgen. Um eine ökonomische Verarbeitung dieser Rohstoffströme zu ermöglichen, muss eine passende Infrastruktur geschaffen werden, welche effiziente Transportwege schafft und entsprechende Konversions- und Aufarbeitungssysteme bereitstellt. Zudem fluktuieren die Rohölpreise, weswegen immer intensiver nach alternativen Energiequellen gesucht wird – auch im Hinblick auf die Produktion von Biokraftstoffen. Die Herstellung von Biobutanol erweist sich hierbei als besonders attraktiv, da Butanol mit allen konventionellen, flüssigen Brennstoffen in jedem Verhältnis mischbar ist und sich nicht korrosiv verhält. Somit lassen sich vorhandene Rohrleitungen und gängige Motoren nutzen, ohne dass Änderungen an Transportpfaden erfolgen müssen.

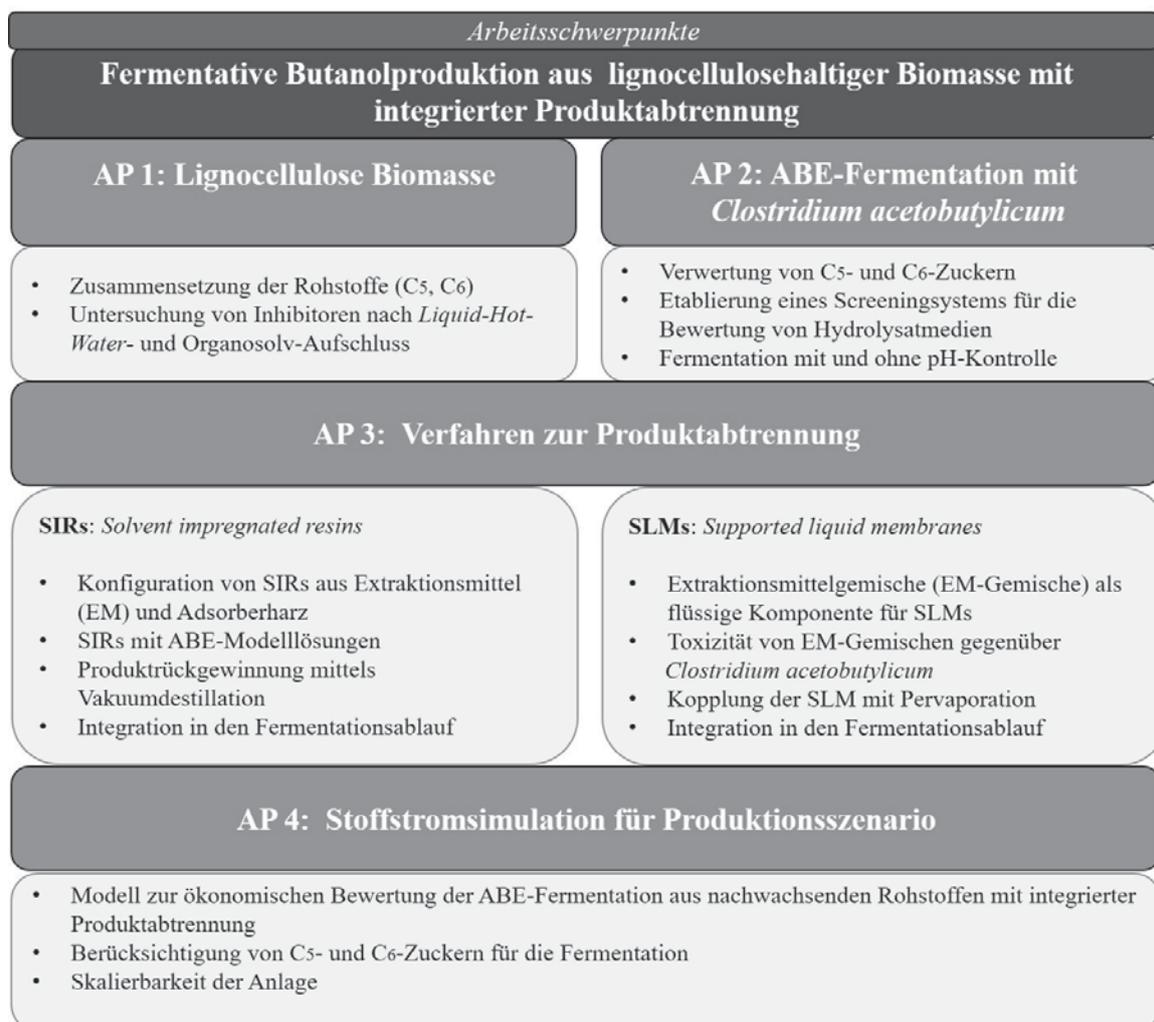
In dem Nachwuchsgruppenprojekt *Lokale Vorbehandlung nachwachsender Rohstoffe für Bioraffinerien (BioSats)* (FKZ 22028411) stehen Methoden zur lokalen Vorbehandlung von NawaRos für Bioraffinerien im Mittelpunkt der Forschungsaktivitäten. In Teilprojekten wird die Konzeption einer Basisvorrichtung für lokale Biomassevorbehandlungsmodule (BioSats) realisiert. Diese umfassen sowohl Vorbehandlungsstrategien als auch Optionen für die fermentative Umsetzung und nachfolgende Produktabtrennung der Prozessströme. Im Zuge dessen können die Stoffströme bereits vor Ort in passende Fraktionen beziehungsweise Verpackungseinheiten überführt werden, was den Weitertransport in zentrale Bioraffinerien vereinfacht. Dank eines modularen Aufbaus von BioSats, der eine individuelle Anpassung an Rohstoffströme ermöglicht, lassen sich regionale Unterschiede berücksichtigen. Die Untersuchung der gesamten Wertschöpfungskette mittels eines integrierten Stoffstromkonzepts ermöglicht die effektive Verzahnung von BioSats und zentralen Bioraffinerien. Anhand des numerischen Modells können die einzelnen Verfahrensstufen auch hinsichtlich ihrer ökonomischen Rentabilität untersucht werden.

Im Zusammenhang mit dem BioSats-Projekt beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Untersuchung verschiedener Rohstoffe und deren Eignung als Substrate für die Aceton-Butanol-Ethanol-(ABE)-Fermentation. In einem weiteren Schritt werden zwei integrierte Verfahren für die Abtrennung von Butanol aus Fermentationen beurteilt und ein Verfahren anhand einer Stoffstromsimulation abgebildet.



Die verwendeten lignocellulosehaltigen Rohstoffe kommen direkt aus dem BioSats-Projekt und umfassen eine mannigfaltige Variabilität. Die Stoffproben stammen unter anderem von Versuchspartnern für Dauerkulturen zur Produktion von Biomasse am Standort Altrich der Dienstleistungszentren Ländlicher Raum Rheinland-Pfalz. Die entsprechenden Vorbehandlungsstrategien auf Basis der Aufschlussverfahren *Liquid-Hot-Water* (LHW) und Organosolv (OS) sowie die enzymatischen Umsetzungen zu Hydrolysatmedien wurden separat in einem anderen Teilprojekt innerhalb des BioSats-Projekts etabliert. So wurde durch einen geeigneten Aufschluss der Rohstoffe und deren anschließenden enzymatischen Hydrolyse Hydrolysatmedien generiert, welche für die Fermentation nutzbar sind. Das Fraunhofer Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse (CBP) in Leuna, das eine Bioraffinerie betreibt, hat zusätzlich ein Hydrolysatkonzentrat ( $CF_{Konz}$ ) auf Basis von Cellulosefaserstoff zur Verfügung gestellt. Ein geeignetes Hydrolysatmedium zeichnet sich durch eine geringe Zahl an Inhibitoren aus, sodass es ohne deren Entfernung (Detoxifizierung) für die Fermentation mit *Clostridium acetobutylicum* eingesetzt werden kann.

Abb. 1 zeigt die in dieser Arbeit wesentlichen Fragestellungen und durchgeführten Arbeitsschritte in Form von Arbeitspaketen (APs).



**Abb. 1:** Übersicht zu den in dieser Arbeit bearbeiteten Arbeitspaketen (APs).

In AP 1 (*Lignocellulose Biomasse*) wurde die Zusammensetzung von verschiedenen Lignocellulose-Substraten vor und nach dem entsprechenden Rohstoffaufschluss sowie der anschließend erfolgten enzymatischen Hydrolyse analysiert.

Nach der analytischen Erfassung der Hydrolysatmedien wurden gemäß AP 2 (*ABE-Fermentation mit C. acetobutylicum*) Fermentationen in parallelen Ansätzen durchgeführt. Dies ermöglicht die Evaluierung der fermentativen Umsetzung von Hydrolysatmedien auf Basis unterschiedlicher Rohstoff- und Aufschlussvarianten auch hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit. Für die biotechnologische Konversion bisher unberücksichtigte Substrate können so auf ihr Potenzial für die Nutzung während der ABE-Fermentation untersucht werden.

Im Rahmen des AP 3 (*Verfahren zur Produktabtrennung*) werden zwei Verfahren zur Entfernung von Butanol aus Fermentationen überprüft: *Solvent impregnated resins* (SIRs) und *solvent impregnated membranes* (SLMs). Beide nutzen ein Extraktionsmittel (EM) in Kombination mit einem Stützgerüst, welches als Adsorberpartikel (SIR-Methode) oder Trägermembran (SLM-Methode) vorliegt. Die Bewertung dieser Methoden erfolgt unter Einbezug von verschiedenen EM und komplexen Modelllösungen (ML). Vor dem Hintergrund des Einsatzes während der Fermentation muss sowohl die Selektivität als auch die Biokompatibilität des gewählten EM bezüglich des Produktionsstammes *C. acetobutylicum* gewährleistet werden und wird daher ebenfalls untersucht. Zusätzlich wird die Regenerationsmöglichkeit mittels SIR-Prozess betrachtet, ebenso der direkte Einsatz während der Fermentation. Im Zuge der SLM-Methode werden EM-Gemische für die Nutzung als flüssige Komponente evaluiert. Die Anwendbarkeit der SLM in Kombination mit der Pervaporation wird unter Einfluss der *feed*-Komposition und Temperatur untersucht. Abschließend wird die SLM-Methode während der ABE-Fermentation eingesetzt.

Integrierte Anlagenkonzepte, die eine Abtrennung und gleichzeitige Rückgewinnung im Fermentationsprozess erlauben, sind eine wichtige Voraussetzung, um ein ökonomisches Gesamtkonzept zu verwirklichen. Deshalb wird in AP 4 (*Stoffstromsimulation für Produktionsszenario*) ein Modell zur ökonomischen Bewertung des Gesamtprozesses erstellt. Hierbei werden alle Grundoperationen in Bezug auf die Vorbehandlung des Rohstoffes, der enzymatischen Hydrolyse und ABE-Fermentation sowie die Produktabtrennung in einem begleitenden Stoffstrommodell einbezogen.



## 2 FERMENTATIVE GEWINNUNG VON BUTANOL

### 2.1 Einleitung und Zielsetzung

Aufgrund der Endlichkeit fossiler Rohstoffe und der zunehmenden Sensibilisierung durch Politik und Wirtschaft für alternative Ressourcen besteht eine gesteigerte Nachfrage nach Biokraftstoffen [1]. Deswegen gibt es neuerliche Bemühungen, die fermentative Herstellung von Butanol zu etablieren, welches als Kraftstoff eingesetzt werden kann. In der biotechnologischen Praxis werden daher optimierte Produktionsstämme, unterschiedliche Betriebsweisen sowie die Nutzung alternativer Fermentationssubstrate angestrebt [2].

Im Hinblick auf eine nachhaltige Produktion nimmt der Einsatz von preiswerten Ausgangssubstraten eine zentrale Rolle ein. Diese tragen wesentlich dazu bei, den Gesamtprozess wirtschaftlich betreiben zu können [3]. Weitere Einsparungen lassen sich durch den Einsatz regional verfügbarer Rohstoffen erzielen, da kurze Transportwege die Kosten senken. Um die Rohstoffe für die Fermentation nutzbar zu machen, muss jedoch eine Vorbehandlung und Hydrolysestufe eingeführt werden.

Das nachfolgende Kapitel umfasst das erste und zweite Arbeitspaket (AP) (Kapitel 1) aus Abb. 1 (S. 2). Hierbei werden folgende vorbehandelten und enzymatisch hydrolysierten lignocellulosehaltigen Rohstoffe untersucht:

- Energiepflanze (EC)
- Rasenschnitt (RS)
- Winterweizensilage (WWS) und
- Cellulosefaserstoff (CF) aus Buchenholz.

Die eingesetzten Hydrolysate enthalten zum einen die für die fermentative Umsetzung benötigten Zuckersubstrate Glucose und Xylose, zum anderen weisen sie jedoch auch Inhibitoren wie Essigsäure oder Furfurale auf. Diese Inhibitoren entstehen hauptsächlich während der *Liquid-Hot-Water*-(LHW)- beziehungsweise Organosolv-(OS)-Extraktion im Zuge der Vorbehandlungen. Ziel des ersten APs ist, die unterschiedlichen Hydrolysate bezüglich ihres Gehalts an verwertbaren Zuckersubstraten sowie an Nebenprodukten zu analysieren.

Innerhalb des zweiten APs wird die fermentative Umsetzung der verschiedenen Hydrolysate untersucht. Die genaue analytische Betrachtung und anschließende fermentative Umsetzung schafft die Voraussetzung für eine im Anschluss erfolgende Prozessbeurteilung und -verbesserung.

Folgende Parameter werden hierbei in Betracht gezogen:

- die Konzentration der verwertbaren Zuckersubstrate Glucose und Xylose,
- die Konzentration verschiedener Nebenprodukte (Inhibitoren),
- die Verwertung von C<sub>5</sub>- und C<sub>6</sub>- Zuckern sowie
- die pH-Regelung während der Fermentation.

Um den negativen Einfluss von Inhibitoren auszuschließen, wird die Konversion zunächst in synthetischem Medium mit Einzel- und Mehrfachzuckern untersucht. In parallelen Ansätzen, mit und ohne pH-Regelung, im 100–150-ml-Maßstab, wird die Aceton-Butanol-Ethanol-(ABE)-Fermentation schließlich mit bisher kaum untersuchten Hydrolysaten aus EC, RS und CF<sub>Konz</sub> aus Buchenholz durchgeführt, welches aus einer Bioraffineriepilotanlage des Fraunhofer Zentrums für Chemisch-Biotechnologische Prozess (CBP) stammt.

Die Ergebnisse sollen zu einem genaueren Verständnis der Verwertbarkeit von in Hydrolysatmedien vorhandenen C<sub>5</sub>- und C<sub>6</sub>-Zuckern beitragen und eine abschließende Beurteilung des Potenzials der verwendeten Rohstoffe während der Fermentation mit *Clostridium acetobutylicum* (DSM 792) zulassen. Abschließend erfolgt die Skalierung des Prozesses im Bioreaktor mit dem Hydrolysatmedium, welches das größte Potenzial aufweist.

## 2.2 Theoretische Grundlagen

### 2.2.1 Grundlagen der Aceton-Butanol-Ethanol-Fermentation

Die fermentative Gewinnung von Aceton-Butanol-Ethanol (ABE) erfolgt mit lösemittelbildenden Mikroorganismen, die der Gattung der Clostridien angehören. Zu den bekannten Vertretern gehört *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 (entspricht: ATCC 824), welcher auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt wird.

Dabei handelt es sich um ein obligat anaerobes, gram-positives Bakterium [4], welches gezielt für die Lösemittelfermentation eingesetzt wird (Abschnitt 2.2.2). Weitere Merkmale der Gattung liegen in der stäbchenförmigen Morphologie sowie darin, dass eine Ausbildung von hitzeresistenten Sporen in Form von Endosporen möglich ist [5: S. 4]. Die Zellen haben eine Größe von  $0,5\text{--}0,9 \times 1,6\text{--}6,4 \mu\text{m}$  während ihre Endosporen ca.  $1,5 \mu\text{m}$  groß sind [6]. Die Produkte des Stoffwechsels sind neben organischen Säuren die Lösemittel Aceton (A), Butanol (B) und Ethanol (E). Als Nebenprodukte entstehen Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid. Unter ungünstigen Wachstumsbedingungen – etwa bei einem pH-Wert niedriger als 5 oder der Limitierung von Eisen – kann auch Laktat das Hauptprodukt der Fermentation werden. Zum Ende der Fermentation liegt oftmals ein Lösemittelverhältnis von 3:6:1 (A:B:E) vor. Bei dem Einsatz von 100 g Zucker entstehen maximal 38 g Lösungsmittel, bei einem Lösemitteltiter von 1,3–2 % [7]. Dieser vergleichsweise geringe Titer wird häufig damit assoziiert, dass der Stoffwechsel in Gegenwart von Butanol beeinträchtigt ist. Dies kann sowohl eine Hemmung als auch eine Inhibition zur Folge haben, wenn das Endprodukt in der Lösung verbleibt. Der