



# KAPITEL 1

---

## Einleitung und Zielsetzung

---

Erdöl zählt zu den wichtigsten Energieträgern weltweit und ist zudem der meist verwendete Rohstoff für die chemische Industrie. Aufgrund der Endlichkeit dieses fossilen Rohstoffes, eines steigenden Umweltbewusstseins, einem stetigen Bevölkerungswachstum und somit einer steigenden Nachfrage an Energie, Rohstoffen und Nahrungsmitteln, muss eine Umstellung auf erneuerbare und nachwachsende Ressourcen erfolgen.

Gerade die Polymerchemie basiert weitestgehend auf Erdöl. Eine umweltverträglichere Herstellung von chemischen Grundstoffen für Kunststoffe bieten u. a. biotechnologische Verfahren. Im biotechnologischen Bereich werden zur Herstellung dieser Grundstoffe häufig reine Zucker in Form von Glucose oder Saccharose verwendet, um hohe Titer und Produktivitäten erzielen zu können. Dabei basiert Glucose meist auf Stärkehydrolysaten aus Mais, Kartoffeln oder Weizen und zur Saccharoseproduktion werden Zuckerrohr oder Zuckerrübe verwendet. Alle diese verwendeten Rohstoffe und die dafür genutzten landwirtschaftlichen Flächen stehen daher in Konkurrenz zur Nahrungs- und Futtermittelindustrie. Alternativ können nachwachsende ungenutzte landwirtschaftliche Nebenprodukte und Reststoffe für biotechnologische Verfahren genutzt werden, wie beispielsweise Weizenkaff, Stroh oder Abfälle aus der Lebensmittelweiterverarbeitung. Diese Biomasse ist größtenteils CO<sub>2</sub>-neutral, kostengünstig und steht nicht in Konkurrenz mit der Nahrungs- oder Futtermittelindustrie.



Itaconsäure zählt zu den chemischen Grundstoffen für die Polymerindustrie, die auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen hergestellt werden können. Seit Mitte des 20. Jahrhunderts wird Itaconsäure biotechnologisch mit dem filamentösen Pilz *Aspergillus terreus* industriell hergestellt. Die Nachfrage für die organische Säure ist aufgrund der hohen Produktionskosten im Vergleich zu alternativen petrochemisch hergestellten Grundstoffen gering. Die hohen Produktionskosten begründen sich auf einem niedrigen Titer von etwa 90 g/L (Batti and Schweiger, 1963; Kuenz et al., 2012). Zwar konnte die Endkonzentration im Labormaßstab auf 129 g/L gesteigert werden (Hevekerl et al., 2014b), dieser Titer liegt aber immer noch deutlich unter dem Titer der vergleichbaren industriellen Produktion von Citronensäure mit *Aspergillus niger* mit durchschnittlich 200 g/L (Roehr et al., 1996). Zusätzlich basiert die Itaconsäureproduktion auf der Nutzung reiner Zucker, aufgereinigten Melassen oder Stärkehydrolysaten, da der Pilz sehr sensitiv auf Störstoffe im Kultivierungsmedium reagiert. Somit stellt der Einsatz von nachwachsenden agrarischen Reststoffen neue Herausforderungen in der Prozessführung und Kultivierung des sehr empfindlichen filamentösen Pilzes *Aspergillus terreus*. Es sind jedoch auch robustere Mikroorganismen, wie *Ustilago maydis*, in der Lage, die organische Säure zu bilden. Aufgrund von zu geringen Titern und Produktivitäten werden diese Mikroorganismen industriell nicht genutzt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Itaconsäureproduktion basierend auf nachwachsenden Reststoffen unterschiedlicher Mikroorganismen mit *Aspergillus terreus* zu vergleichen und die Vor- und Nachteile der einzelnen Organismen herauszuarbeiten. Dazu soll eine systematische Studie durchgeführt und die unterschiedlichen Störstoffe aus Hydrolysaten und deren Effekt auf die Itaconsäureproduktion beschrieben werden. Abschließend soll der effektivste Organismus ausgewählt, unterschiedliche Kultivierungsstrategien und Aufreinigungsverfahren miteinander verglichen und die Itaconsäureproduktion auf Basis agrarischer Reststoffe optimiert werden.

Neben der Produktion von Itaconsäure auf alternativen nachwachsenden Rohstoffen, soll auch die Kultivierung von *Aspergillus terreus* auf reinem Zucker weiter untersucht werden, um den Titer zu erhöhen. Um das mögliche Potenzial der Itaconsäureproduktion mit diesem Organismus aufzuzeigen und die Beeinflussung durch Störstoffe zu verringern, soll Glucose verwendet werden. Speziell soll dazu der Einfluss des pH-Wertes auf die Kultivierung untersucht und nach der Prozessoptimierung die Kultivierung in einen größeren Maßstab überführt werden.



## KAPITEL 2

---

### Theorie

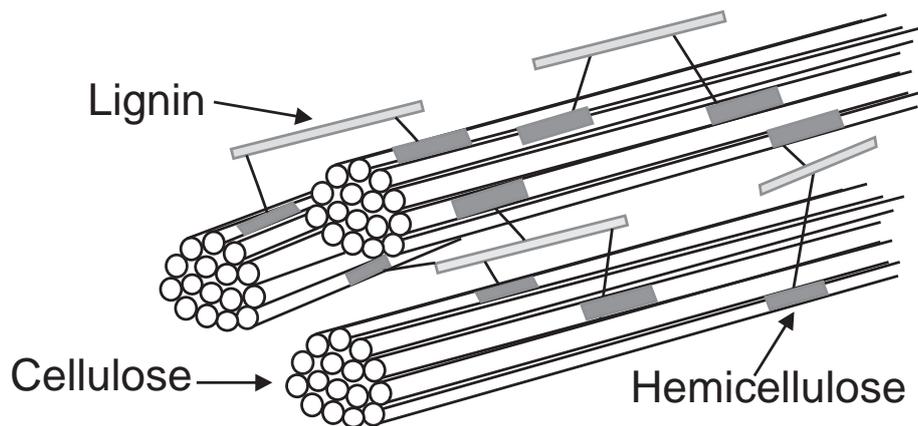
---

## 2.1 Biomasse

Als Biomasse wird das gesamte organische Material bezeichnet, welches von Pflanzen und Tieren erzeugt wird (Geitmann, 2005). Dabei beläuft sich die jährliche weltweite Produktion auf etwa  $146 \cdot 10^9$  bis  $170 \cdot 10^9$  Tonnen (Eggersdorfer et al., 1992; Demirbaş, 2001). Schätzungsweise sind davon  $245 \cdot 10^6$  Tonnen nicht genutzte agrarische Reststoffe, die nicht mit der aktuellen Lebens- und Futtermittelherstellung konkurrieren (Perlack et al., 2011) und könnten daher als alternative nachwachsende Polysaccharide in vielen biotechnologischen Anwendungen genutzt werden.

### 2.1.1 Lignocellulose

Die Biomasse photosynthesebetreibender Pflanzen besteht größtenteils aus Lignocellulose. Diese setzt sich aus den drei Hauptbestandteilen Cellulose (30–50 %), Hemicellulose (20–35 %) und Lignin (10–25 %) zusammen (Lynd et al., 2002; Rowell, 2012). Die genaue prozentuale Zusammensetzung hängt jedoch von der jeweiligen Pflanzenart und Umweltfaktoren ab.



**Abbildung 2.1** – Schematischer Aufbau von Lignocellulose, bestehend aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin (modifiziert nach Lee and Shah (2012)).

Lignocellulose besteht aus unelastischen Cellulosefibrillen, die in eine vernetzte Struktur aus Lignin und Hemicellulose eingelagert sind (Lee and Shah, 2012) (Abbildung 2.1).

Die Cellulosefibrillen bestehen aus einer Vielzahl an parallel angeordneten Cellulosesträngen, die Polymere aus Glucose-Monomeren sind. Die Monomere sind über  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft, gegeneinander um  $180^\circ$  gedreht und bilden so eine lineare, unverzweigte Kette aus (Lynd et al., 1999; Wyman et al., 2005). Die Celluloseketten sind durch inter- und intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte verbunden (Pizzi and Eaton, 1985) und bilden so eine dichte, kristalline Packung aus, welche nur sehr schwierig in ihre Monomere zerlegt werden kann (Dadi et al., 2006). Diese kristallinen Bereiche werden durch ungeordnete, amorphe Bereiche regelmäßig unterbrochen.

Hemicellulose ist ein amorphes Polysaccharid, das sich hauptsächlich aus den Pentosen D-Xylose und L-Arabinose, den Hexosen D-Galactose, D-Glucose und D-Mannose, sowie Glucuronsäure zusammensetzt (Ebringerová et al., 2005; Jäger and Büchs, 2012). Dabei sind Nadelhölzer im Vergleich zu Laubhölzern reicher an Mannose. Laubhölzer bestehen stattdessen zu einem höheren Anteil aus Xylose. Zwischen der Hemicellulose und den Cellulosefibrillen bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen aus. Zudem ist die Hemicellulose über kovalente Bindungen mit Lignin verknüpft, welches ein stark verzweigtes phenolisches Makromolekül ist. Lignin besteht aus den drei phenolischen Hauptkomponenten p-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol (Rubin, 2008).

Der komplexe Aufbau der Cellulose und der Verbund mit Hemicellulose und Lignin machen Lignocellulose zu einer mechanisch sehr stabilen Struktur, welche den Abbau durch Enzyme oder Chemikalien erschwert (Lee and Shah, 2012; Jäger and Büchs, 2012).

### 2.1.2 Weizenkaff

Bei der Weizenernte fällt beim Dreschen des Getreides Weizenkaff an, das auch als Weizenspreu bekannt ist (Perlack et al., 2011). Dieses Weizenkaff verbleibt meist ungenutzt auf dem Feld und fällt in einer Menge von 1–2 Tonnen pro Hektar an (Beneke and Rumpler, 2013). Neben der Spreu können im Weizenkaff auch Spelzen, Hülsen, Stängelteile oder Grannen enthalten sein (Duguid et al., 2007). Die drei Hauptbestandteile des Weizenkaffs sind 32 % Cellulose, 24 % Hemicellulose und 15 % Lignin (Duguid et al., 2007; Anders, 2014). Somit zählt Weizenkaff zu den ungenutzten, kostengünstigen, agrarischen Reststoffen aus Lignocellulose, die nicht in Konkurrenz mit Lebens- oder Futtermitteln stehen und sich zur Verwendung als Substrat für eine Biokonversion anbieten.

## 2.2 Biokonversion

Das globale Interesse, nachwachsende lignocellulosehaltige Biomasse zu Biokraftstoff oder hochwertigen Grund- und Plattformchemikalen umzuwandeln, steigt stetig an und bietet eine Alternative zu klassischen chemischen Verfahren (Lynd et al., 2002; FitzPatrick et al., 2010; Menon and Rao, 2012). Werpy et al. (2004) identifizierte 2004 erstmals zwölf Plattformchemikalien, die auf Basis von Biomasse erzeugt und in eine Reihe von hochwertigen biobasierten Chemikalien oder Materialien umgewandelt werden können. Bereits etablierte biotechnologische Verfahren sind die Ethanol- und Milchsäureproduktion (Wyman, 1995; John et al., 2007).

Die Biokonversion teilt sich grob in vier Hauptschritte auf (Mosier et al., 2005; Huber et al., 2006; Menon and Rao, 2012):

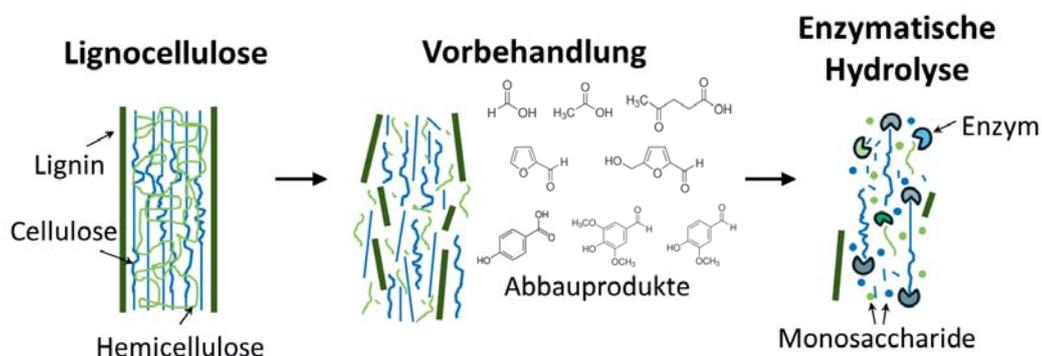
- eine effektive Vorbehandlung der Biomasse
- die Produktion von saccharolytischen Enzymen (Cellulase, Hemicellulasen) und die damit verbundene enzymatische Hydrolyse

- die Fermentation der Hexosen und Pentosen
- Aufreinigung und Veredelung des Produktes

Die Vorbehandlung der Biomasse und die enzymatische Hydrolyse sind in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt und werden im Folgenden weiter betrachtet. Auch werden mögliche Prozessstrategien zur Biokonversion in Kapitel 2.2.3 (S. 9) detaillierter beschrieben.

## 2.2.1 Vorbehandlung

Um Cellulose und Hemicellulose in biotechnologisch verwertbare Zuckermonomere, vorzugsweise mit einer enzymatischen Hydrolyse, umzuwandeln, ist eine Vorbehandlung notwendig (Mosier et al., 2005). Dabei wird die komplexe Struktur der Lignocellulose aufgebrochen und für Enzyme zugänglich gemacht, um so die Zuckerausbeute der enzymatischen Hydrolyse zu erhöhen (Kim et al., 2016). Zusätzlich sollte die Bildung von Zuckerabbauprodukten oder anderen hemmenden Bestandteilen für die nachfolgende Hydrolyse und Fermentation vermieden werden (Kumar et al., 2009). Unter den harschen Bedingungen von hoher Temperatur und meist niedrigem pH-Wert wird in der Vorbehandlung hauptsächlich die Hemicellulose abgebaut, was zur Entstehung von Pentosen und Hexosen führt. Diese Zucker können zu Zuckersäuren, aliphatischen Säuren (Ameisen-, Essig- oder Lävulinsäure), sowie Furanaldehyden (5-Hydroxymethylfurfural (HMF) oder Furfural) weiter abgebaut werden und hemmen die anschließende enzymatische Hydrolyse und Fermentation (Jönsson et al., 2013; Palmqvist and Hahn-Hägerdal,



**Abbildung 2.2** – Schematische Darstellung einer Lignocellulosevorbehandlung mit anschließender enzymatischer Hydrolyse (modifiziert nach Mosier et al. (2005) und Lynd et al. (2002)).

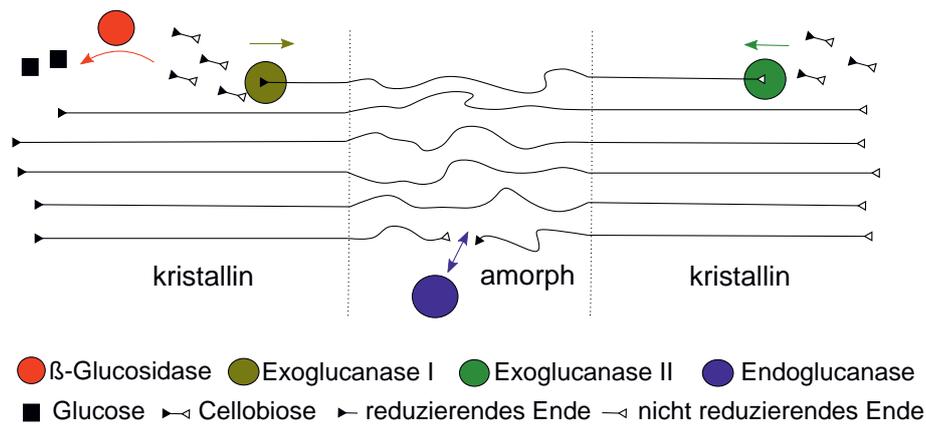
2000). In geringeren Konzentrationen können zudem phenolische und aromatische Komponenten aus herausgelöstem Lignin entstehen, die ebenfalls als Inhibitoren bekannt sind (Jönsson et al., 2013; van der Pol et al., 2014).

Es sind unterschiedlichste Vorbehandlungsmethoden für Biomasse bekannt. Sie reichen von einer physikalischen Vorbehandlung, wie Mahlen oder Zerkleinern der Biomasse, über chemische Vorbehandlungen mit Säuren oder Basen, bis hin zu physikalisch-chemischen Methoden, wie dem Dampfaufschluss. Auch biologische Vorbehandlungsmethoden mit Braun- oder Weißfäulepilzen können eingesetzt werden oder die Kombination der unterschiedlichen Methoden. Einen Überblick über Vorbehandlungsmethoden und die Wirkung auf die Lignocellulose geben Kumar et al. (2009), Hendriks and Zeeman (2009), Agbor et al. (2011) oder Stichnothe et al. (2016).

Bei einer alkalischen Vorbehandlung wird größtenteils Natriumhydroxid, Ammoniak oder Calciumhydroxid verwendet. Dabei liegt der Vorteil der alkalischen Vorbehandlung in der niedrigeren Temperatur im Vergleich zu der säurekatalytischen Vorbehandlung (Kim et al., 2016). Durch die Entesterung der intermolekularen Esterbindungen in der Lignocellulose werden Lignin und Hemicellulose herausgelöst, der Polymerisationsgrad der Lignocellulose herabgesetzt, die Kristallinität der Cellulose nimmt ab und die Oberfläche der Biomassepartikel wird durch Aufquellen vergrößert (Kim et al., 2016). Es kommt zur Bildung von Essigsäure als Nebenprodukt durch die Abspaltung der Acetylgruppen der Hemicellulose (Galbe and Zacchi, 2002). Verglichen mit anderen Vorbehandlungsmethoden ist die Bildung von weiteren Zuckerabbauprodukten eher gering, jedoch können Nachteile der basekatalytischen Vorbehandlung lange Verweilzeiten oder die Aufnahme von Salzen in die Biomasse sein (Menon and Rao, 2012).

### **2.2.2 Enzymatische Hydrolyse**

Auf die Vorbehandlung der Lignocellulose folgt meist eine enzymatische Hydrolyse. Dabei werden die einzelnen Bestandteile der Lignocellulose durch spezifische Enzyme aus der Struktur herausgelöst. Für die Spaltung der Cellulose in Glucose werden Cellulase, für die Spaltung in die unterschiedlichen Monosaccharide der Hemicellulose Hemicellulasen, wie beispielsweise Xylanasen, verwendet. Auch der Abbau von Lignin mittels Laccasen ist möglich.



**Abbildung 2.3** – Schematische Darstellung einer Cellulosehydrolyse mittels End- und Exoglucanase sowie  $\beta$ -Glucosidase (modifiziert nach Lynd et al. (2002)).

Im Folgenden wird der enzymatische Abbau von Cellulose, dem Polymer mit dem größten Anteil in der Biomasse, beispielhaft betrachtet. Die unterschiedlichen Aktivitäten der einzelnen Cellulasen sind in Abbildung 2.3 schematisch dargestellt. Exo- und Endoglucanasen können die Cellulose in immer kürzere Ketten schneiden, bis hin zu Cellobiose. Diese kann anschließend zu Glucose mittels  $\beta$ -Glucosidasen hydrolysiert werden. Somit sind insgesamt drei Cellulase-Gruppen notwendig um Cellulose in Glucose-Monomere zu katalysieren (Lynd et al., 2002):

- Endoglucanasen (1,4- $\beta$ -D-glucan-4-Glucanohydrolasen) hydrolysieren Cellulose in den amorphen Bereichen der Polysaccharidkette und produzieren Oligosaccharide unterschiedlicher Länge.
- Exoglucanasen (1,4- $\beta$ -D-glucan-Cellobiohydrolasen) hydrolysieren reduzierende (EX I) oder nicht-reduzierende (EX II) Enden der Polysaccharidkette in amorphen und kristallinen Bereichen und spalten als Hauptprodukt Cellobiose ab.
- $\beta$ -Glucosidasen ( $\beta$ -D-glucoside-Glucohydrolasen) katalysieren größtenteils die Hydrolyse der abgespaltenen Cellobiose zu Glucose.

Diese Cellulasemischungen werden von Bakterien und Pilzen produziert. Zur industriellen Produktion wird häufig die Gattung *Trichoderma* verwendet, deren Enzyme im pH-Bereich von pH 4–pH 6 und unter 70 °C effektiv zur Cellulosehydrolyse genutzt werden können (Wyman et al., 2005).

Die Spaltung von Hemicellulose ist im Vergleich zu Cellulose aufgrund der amorphen Polysaccharidstruktur sehr komplex und es werden basierend auf der

jeweiligen Biomasse unterschiedlichste Enzyme benötigt, wie beispielsweise Xylanasen, Arabinosidasen, Acetylxylosterasen oder Glucuronidasen (Wyman et al., 2005). Überblicke über den Hemicelluloseabbau geben unter anderem Coughlan and Hazlewood (1993) und Sunna and Antranikian (1997).

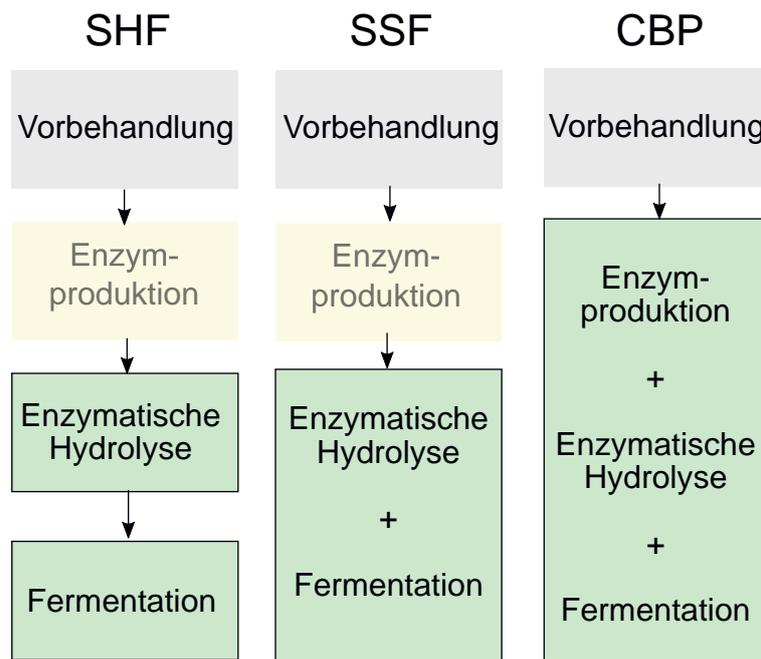
### 2.2.3 Prozesskonfiguration

Die einzelnen Schritte der Biokonversion von Lignocellulose -

1. Vorbehandlung,
2. Produktion von Enzymen,
3. Hydrolyse der vorbehandelten Lignocellulose und
4. die Fermentation von Pentosen und Hexosen

können in unterschiedlichen Varianten durchgeführt werden (Lynd et al., 2002). In Abbildung 2.4 sind drei mögliche Prozesskonfigurationen aufgeführt. Alle Prozesse haben gemeinsam, dass die Lignocellulose zuvor vorbehandelt werden sollte, um die Effektivität der enzymatischen Hydrolyse zu steigern. Wird die Hydrolyse getrennt von der Fermentation durchgeführt, liegt eine sogenannte Separate Hydrolyse und Fermentation (SHF, englisch - separate hydrolysis and fermentation) vor. Hierbei werden als erstes Cellulose und Hemicellulose in kürzere Zuckerketten und Zuckermomere von vorab produzierten oder kommerziell erworbenen Enzymen gespalten. Die Hydrolyse läuft unter höchster Effektivität ab, da Temperatur und pH-Wert optimal für die Enzyme gewählt werden können. Nachteilig an dieser Prozessführung ist, dass es zu einer Produktinhibierung der Cellulasen durch Cellobiose und Glucose kommen kann (Alfani et al., 2000). Nach der Hydrolyse erfolgen die Fermentation der vorliegenden Zucker und die Bildung des Produktes unter optimalen Bedingungen für den Mikroorganismus.

Bei einer Simultanen Verzuckerung und Fermentation (SSF, englisch - simultaneous saccharification and fermentation) laufen Hydrolyse und Fermentation parallel in einem Bioreaktor ab (Lynd et al., 1999). Hierbei können die entstandene Glucose und weitere Monosaccharide direkt zum Produkt umgesetzt werden, so dass eine Inhibierung der zugesetzten Enzyme minimiert wird. Die optimalen Temperatur- und pH-Wert-Bedingungen sind für Mikroorganismen und Enzyme



**Abbildung 2.4** – Schematische Darstellung unterschiedlicher Prozessstrategien für die Biokonversion (modifiziert nach Lynd et al. (2002) und Jäger and Büchs (2012)). SHF - Separate Hydrolyse und Fermentation, SSF - Simultane Verzuckerung und Fermentation, CBP - Konsolidierter Bioprozess.

nicht identisch und stellen in einem SSF einen Kompromiss dar. Jedoch ist es trotzdem möglich, dass ein SSF im Vergleich zum SHF höhere Ausbeuten und kürze Verweilzeiten erzielt, wie bei der Ethanolproduktion mit *Pichia stipitis* (Marques et al., 2008). Insgesamt betrachtet liegt der Vorteil eines SSFs gegenüber einem SHFs in der Kostenreduktion, da zwei Prozessstufen zu einer zusammengelegt werden (Alfani et al., 2000).

Optimal wäre es die Produktion von Enzymen, Hydrolyse der vorbehandelten Lignocellulose und die Fermentation in einem einzigen Prozessschritt durchzuführen, den sogenannten Konsolidierten Bioprozess (CBP, englisch - consolidated bioprocessing). So könnten die Kosten weiter gesenkt werden, da für die Enzymproduktion die vorhandene Lignocellulose eingesetzt werden kann (Lynd et al., 2005). Natürliche Mikroorganismen mit diesen kombinierten Eigenschaften sind nicht bekannt, könnten aber durch genetische Veränderungen, wie für die Ethanolproduktion, erzeugt werden (Olson et al., 2012).