Pilotprojekt "Lignocellulose-Bioraffinerie"

Gemeinsamer Schlussbericht
zu den wissenschaftlich-technischen Ergebnissen
aller Teilvorhaben

(FKZ: 22027405, 22014106, 22014206, 22014306, 22014406, 22001307)

der Partner:

Projektzeitraum: 01.06.2007 bis 31.08.2009

zusammengestellt von: Dr. Jochen Michels, DECHEMA e.V.

Datum: 14.09.2009

Autoren dieses Schlussberichtes:

Kristina Ehrich **Jochen Michels** **Jens Schrader**	DECHEMA - Gesellschaft f. chemische Technik und Biotechnologie e.V. Theodor-Heuss-Allee 25, 60486 Frankfurt
Jürgen Puls[1] **Bodo Saake**[1] **Othar Kordsachia**[1] **Jörg Schweinle**[2] **Holger Weimar**[2]	[1]Johann Heinrich von Thünen Institut, Institut für Holztechnologie und Holzbiologie [2]Johann Heinrich von Thünen Institut, Institut für Ökonomie der Forst- und Holzwirtschaft Leuschnerstr. 91, 21031 Hamburg
Gerd Unkelbach **Rainer Schweppe** **Carolin Schäfer** **Adrei Holzer**	Fraunhofer-Institut für Chemische Technologie Joseph-von-Fraunhofer-Str. 7, 76327 Pfinztal
Birgit Kamm **Petra Schönicke** **Hans-Friedrich Boeden** **Anja Riebel**	Forschungsinstitut Bioaktive Polymersysteme (BIOPOS) e.V. Kantstraße 55, 14513 Teltow
Wolfgang Schwarz	TU München, Fachgebiet Mikrobiologie Am Hochanger 4, 85350 Freising
Sebastian Poth **Magaly Monzón** **Nils Tippkötter** **Roland Ulber**	TU Kaiserslautern, Maschinenbau u. Verfahrenstechnik, Lehrgebiet Bio-verfahrenstechnik Gottlieb-Daimler-Str. 44, 67663 Kaiserslautern
Sebastian Przymusinski **Udo Kragl**	Universität Rostock, Institut für Chemie, Lehrstuhl für technische Chemie Albert-Einstein-Str. 3a, 18059 Rostock
Magnus Fröhling **Martina Haase** **Frank Schultmann**	Universität Karlsruhe (TH), Institut für Industriebetriebslehre und Industrielle Produktion Hertzstraße 16, 76187 Karlsruhe
Werner Bäcker **Birgit Himmelreich** **Martina Mutter** **Markus Schindler** **Sebastian Schmidt** **Arthur Susanto** **Andrea Vester**	Bayer Technology Services GmbH, BTS-PT Process Technology Geb. B310, 51368 Leverkusen
Hansjörg Hagels	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG HPZ 6425-EG-00, 55216 Ingelheim
Murillo Villela[3] **Frank Erhardt**[3] **Henning Marckmann**[4]	[3]Evonik-Degussa GmbH, Creavis Technologies & Innovation Paul-Baumann-Str. 1, 45764 Marl [4]Evonik-Degussa GmbH, Fluidverfahrenstechnik Rodenbacher Chaussee 4, 63457 Hanau-Wolfgang
Steffi Hiller	DOW Deutschland Anlagengesellschaft mbH Industriestraße 1, 77836 Rheinmünster
Elke Fliedner	Dynea Erkner GmbH Berliner Strasse 9, 15537 Erkner
Kerstin Sterck **Peter Wasserscheid** **Andreas Bösmann**	Universität Erlangen-Nürnberg LS für Chem. Reaktionstechnik Egerlandstraße 3, 91058 Erlangen
Marc Uerdingen	Solvent Innovation GmbH Nattermannallee 1, 50829 Köln

Inhaltsverzeichnis

Einleitung **1**

Ergebnisse zum Projektende anhand der Meilensteinplanung **2**

AP1: Extraktion der Inhaltstoffe von Buche und Pappel: Wissenschaftlich-technische Ergebnisse **5**

AP1-1 Ausgangsmaterialien (AP 1.1) 5

AP1-2 Ermittlung der optimalen Extraktionsbedingungen (AP 1.2) und analytische Charakterisierung der Extrakte (AP 1.4) 8

AP1-3 Entwicklung eines kontinuierlichen Extraktionsverfahrens (AP 1.3) 12

AP1-4 Anwendungstechnische Untersuchungen zur Bestimmung der Bioaktivität (AP1.5) 14

AP1-5 Fazit 25

AP2: Aufschluss und Komponententrennung von Buche und Pappel: Wissenschaftlich-technische Ergebnisse **26**

AP2-1 Aufschluss von Buche und Pappel (AP 2.1) 26

AP2-2 Komponententrennung (AP 2.2) 60

AP2-3 Literatur 69

AP2-4 Fazit 70

AP3: Weiterverarbeitung der erhaltenen Fraktionen und anwendungstechnische Untersuchungen: Wissenschaftlich-technische Ergebnisse **71**

AP3-1 Cellulose-Fraktion (AP 3.1) 71

AP3-2 Hemicellulose-Fraktion (AP 3.2) 111

AP3-3 Lignin-Fraktion (AP 3.3) 124

AP3-4 Fazit 172

AP4: Ökonomische und ökologische Bewertung des Verfahrens: Wissenschaftlich-technische Ergebnisse **173**

AP4-1 Übersicht zur Vorgehensweise im AP 4 173

AP4-2 Definition von Systemgrenzen und Teilprozessen entlang der Wertschöpfungskette der Lignocellulose-Bioraffinerie (AP 4.1) 174

AP4-3 Rohstoffbereitstellung und –kosten (AP 4.2) 175

AP4-4 Stoff- und energiestromorientierte Erfassung der Teilprozesse entlang der Wertschöpfungskette (AP 4.3) 197

AP4-5 Basiskonfiguration der Lignocellulose-Bioraffinerie 199

AP4-6 Machbarkeitsstudie – Ökonomische Bewertung und Sensitivitätsanalyse (AP 4.3) 201

AP4-7 Ökologische Bewertung der Verfahrenskonzepte (AP 4.3) 208

AP4-8 Ökonomische und ökologische Bewertung der Prozesskette auf Basis detaillierter Massenbilanzen (AP 4.4) 214

AP4-9 Zusammenfassung und Ausblick 221

AP4-10 Literatur 224

AP4-11 Fazit 226

AP5: Entwicklung eines Konzepts für die technische Umsetzung in einer Pilotanlage 227

AP5-1 Verfahrenskonzept Pilotanlage (BTS) 227

AP5-2 Verfahrenskonzept Hydrolyse 233

AP5-3 Fazit 235

Einleitung

Der vorliegende Abschlussbericht zu den wissenschaftlich-technischen Ergebnissen wurde von allen Projektpartnern im Lignocellulose-Bioraffinerie-Projekt gemeinsam erstellt, um ein geschlossenes Bild des erzielten Ergebnis- und Erkenntnisstandes zu dokumentieren. Diese Dokumentationform wurde bereits für den Zwischenbericht gewählt, da viele Arbeitspakete von mehreren Partnern gemeinsam bearbeitet werden, die aber nicht gleichzeitig Partner in einem Teilvorhaben sind. Auf diese Weise lassen sich Redundanzen zwischen den Berichten der sechs Teilvorhaben vermeiden. In den Abschlussberichten der Teilvorhaben wird auf diesen Bericht zu den wissenschaftlich-technischen Ergebnissen verwiesen. Dieses Vorgehen wurde so mit dem Projektträger abgestimmt.

Das Ziel des Verbundvorhabens (s. Abb. E-1) war es, ein nachhaltiges, integriertes Verfahren zum Aufschluss mit Komponententrennung für heimische lignocellulosehaltige Rohstoffe wie Buche und Pappel zu entwickeln, bei dem alle Bestandteile des Ausgangsmaterials genutzt werden können und in einer Form anfallen, die für eine biotechnologische oder chemische Weiterverarbeitung geeignet ist.

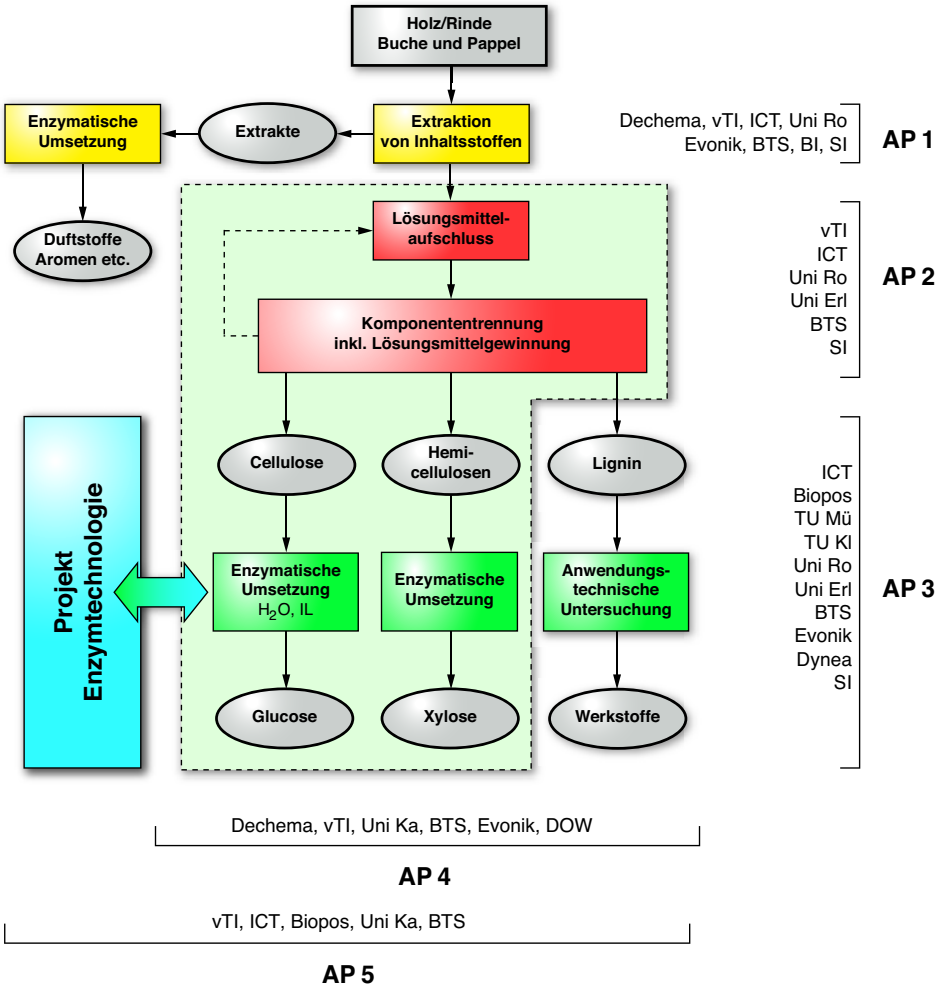


Abb. E-1: Fließdiagramm zum Projekt Lignocellulose Bioraffinerie

Dabei wurde eine kontinuierliche Verfahrensweise entwickelt, die es erlaubt, eine Komponententrennung in Extrakte, Cellulose, Lignin und Hemicellulosen ohne Wechsel des Aufschlussmediums zu erzielen. Die Reinheit der Komponenten sollte dabei flexibel steuerbar sein.

Die technisch-wissenschaftlichen Arbeiten wurden in fünf Arbeitspaketen durchgeführt:

AP 1: Extraktion der Inhaltstoffe von Buche und Pappel

AP 2: Aufschluss und Komponententrennung von Buche und Pappel

AP 3: Weiterverarbeitung der erhaltenen Fraktionen und anwendungstechn. Untersuchungen

AP 4: Ökonomische und ökologische Bewertung des Verfahrens

AP 5: Entwicklung eines Konzepts für die technische Umsetzung in einer Pilotanlage

Gegenüber dem Antrag hat das ICT die Arbeiten der ausgeschiedenen Tecnaro übernommen. Die Zuordnung der Partner zu den einzelnen Arbeitspaketen ist im obigen Fließdiagramm (Abb. E-1) dargestellt.

Ergebnisse zum Projektende anhand der Meilensteinplanung

Für den zeitlichen Ablauf des Projektes sind zu Projektbeginn sechs Meilensteine definiert worden, die in den verschiedenen Arbeitspaketen von den Projektpartnern gemeinsam erarbeitet worden sind (Tab. E-1):

Tab. E-1: Meilensteine im Verbundprojekt „Lignocellulose Bioraffinerie“

Nr.	Beschreibung	AP	Fälligkeit
M 0	Die Wirtschaftlichkeit des gewählten Verfahrenskonzeptes ist unter Berücksichtigung der Rohstoffalternativen und erster technischer Ergebnisse erreichbar	AP 4	02/08
M 1	Optimale Extraktionsbedingungen im diskontinuierlichen Maßstab ermittelt und Extrakte gescreent	AP 1	05/08
M 2	Anwendungstechnische Untersuchungen inkl. biokatalytische Funktionalisierungsversuche abgeschlossen	AP 1	05/09
M 3	Optimale Aufschlussbedingungen im diskontinuierlichen Maßstab ermittelt und Fraktionen charakterisiert	AP 2	05/08
M 4	Kontinuierliches Aufschlussverfahren konzipiert und validiert	AP 2	02/09
M 5	Weiterverarbeitung und anwendungstechnische Untersuchungen abgeschlossen	AP 3	05/09
M 6	Bilanzierung und Bewertung abgeschlossen, Konzept für verfahrenstechnische Umsetzung erstellt	AP 4, AP 5	05/09

Im Rahmen der Untersuchungen zu einer ersten Abschätzung der Wirtschaftlichkeit der Lignocellulose-Bioraffinerie für den **Meilenstein 0** *„Die Wirtschaftlichkeit des gewählten Verfahrenskonzeptes ist unter Berücksichtigung der Rohstoffalternativen und erster technischer Ergebnisse erreichbar“* wurden die Systemgrenzen und die zu untersuchenden Teilprozesse sowie deren Schnittstellen zu vor- und nachgelagerten Prozessen definiert und darauf aufbauend die Wirtschaftlichkeit abgeschätzt.

- Dabei hat sich gezeigt, dass die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens maßgeblich von Preis und Verfügbarkeit der Holzhackschnitzel und insbesondere dem Verkaufspreis, dem Verkaufsvolumen sowie der Qualität des Lignins bestimmt wird.
- Die Analyse des Buchenholz-Aufkommens und der Nutzungskonkurrenz hat gezeigt, dass in den Regionen Nordhessen und Bayern/Hessen/Thüringen jeweils eine Lignocellulose-Bioraffinerie betrieben werden könnte.
- Schwefelfreiem Lignin kommt als mengenmäßig großem und hochpreisigem Produkt eine Schlüsselgröße in der ökonomoschen und ökologischen Bewertung zu. Das Konzept der geplanten Pilotanlage wird dementsprechend auf die Ligninproduktion ausgerichtet.

Der **Meilenstein 1** *„Optimale Extraktionsbedingungen im diskontinuierlichen Maßstab ermittelt und Extrakte gescreent“* konnte erreicht werden.

Es lässt sich abschließend zusammenfassen:

- Die Anwendung unterschiedlichster technischer Extraktionsmethoden hat gezeigt, dass die Gehalte an Triterpenen in Buchen- und Pappelextrakten für eine wirtschaftliche Betrachtung letztendlich zu gering sind.
- Die Eignung Ionischer Flüssigkeiten zur Extraktion von Triterpenen konnte ebenfalls gezeigt werden. Allerdings befindet sich das Arbeitsgebiet aber noch im Bereich der Grundlagenforschung.

Der **Meilenstein 2** *„Anwendungstechnische Untersuchungen inkl. biokatalytische Funktionalisierungsversuche abgeschlossen“* wurde zum Projektende erreicht.

- Zur biokatalytischen Funktionalisierung von Triterpenen wurde eine Analytik etabliert
- Auf Basis einer umfangreichen Literaturrecherche wurde eine Organismen-Stammsammlung angelegt.
- Mit verschiedenen Pilz- und Bakterienstämmen konnten Funktionalisierungen von Modelltripernen erreicht werden. Eine Charakterisierung der Produkte ist noch in Bearbeitung.

Da Triterpene aus Extrakten nicht als zusätzliche Wertschöpfung für das Konzept der Lignocellulose-Bioraffinerie gewonnen werden können, wurde eine Wirtschaftlichkeitsbetrachtung im Rahmen des AP 4 für ein Extraktionsverfahren nicht durchgeführt.

Die Arbeiten für den **Meilenstein 3** *„Optimale Aufschlussbedingungen im diskontinuierlichen Maßstab ermittelt und Fraktionen charakterisiert“* konnten erfolgreich abgeschlossen werden:

- Die Aufschlussbedingungen konnten in Bezug auf Lösungsmittelzusammensetzung, Katalysatorzusatz, Flottenverhältnis und Verweildauer im 1-kg-Maßstab optimiert werden.
- Die optimierten Aufschlussbedingungen konnten in den 10-kg-Maßstab übertragen werden.
- Der Aufschluss in ionischen Flüssigkeiten wurde durch Kochen, Mikrowelle und Ultraschall untersucht und das Lösungsvermögen unterschiedlicher IL erfolgreich getestet. Primär durch die hohen Kosten der IL (gegenüber Organosolv) erscheint eine technische Anwendung nicht sinnvoll.
- Die erhaltenen Fraktionen Cellulose, Hemicellulose und Lignin wurden für die Weiterverarbeitung charakterisiert und den entsprechenden Partnern des AP 3 zur Verfügung gestellt.

Die Ergebnisse flossen in die Konzeption des kontinuierlichen Aufschlussverfahrens ein. Der **Meilenstein 4** *„Kontinuierliches Aufschlussverfahren konzipiert und validiert“* konnte ebenfalls erfolgreich abgeschlossen werden.

Ergebnisse zur Komponententrennung nach erfolgtem Aufschluss können wie folgt zusammengefasst werden:

- Bei der Komponententrennung nach dem OrganoSolv-Aufschluss hat sich die Fällung des Lignins als der kritische Schritt bei der Aufarbeitung herausgestellt. Die negativ geladenen Lignin-Partikel sind elektrostatisch stabilisiert. Dadurch wird bei der Fällung eine Agglomeration der Teilchen verhindert. Verschiedene Fällungsstrategien mittelt Wasserzugabe wurden geprüft, die allerdings im technischen Maßstab ungeeignet erscheinen. Versuche zur Abtrennung der Ligninfraktion ohne Wasserzugabe in einer Destillationskolonne wurden in Hinblick auf den geplanten Pilotmaßstab durchgeführt. Die Ergebnisse bescheinigen bereits eine grundsätzliche Eignung des Verfahrens.
- Die Komponententrennung nach Lösung des Holzes in ionischen Flüssigkeiten war ebenfalls möglich. Die heiße Holzlösung wurde in die 4-fache Menge heißes Lösungsmittel (Wasser, Wasser/Ethanol, Ethanol) eingerührt. Dabei fielen sofort die Cellulose und das Lignin aus. Die Hemicellulosen blieben zusammen mit der IL in Lösung.
- Zur Verbesserung der Delignifikation der Faserfraktion wurde auch ein zweistufiger Prozess (OrganoSolv + Waschung mit NaOH) mit Erfolg getestet.

Der **Meilenstein 5** *„Weiterverarbeitung und anwendungstechnische Untersuchungen“* wurde erreicht. Folgende Ergebnisse lassen sich aus den Untersuchungen ableiten:

- Die enzymatische Hydrolyse der Cellulosefraktion konnte in Bezug auf verfahrenstechnische Anwendung in der Pilotanlage optimiert werden. Dabei kamen vor allem kommerzielle Enzymgemische zum Einsatz.
- Die Rekonstruktion des Cellulosoms aus Clostridien eröffnet dabei weitere Chancen, die Zuckerausbeute aus der Restfaserfraktion weiter zu erhöhen.
- Die Fermentation der Hydrolysate zu Ethanol ist mit Ausbeuten von 60 – 80 % der theoretisch möglichen Ausbeute möglich. Die Hydrolysate können gut zur Biomassebildung von Hefen verwendet werden. Die Kultivierung anderen Mikroorganismen war weniger ergiebig. Auf Grund dieser Ergebnisse lässt sich sagen, dass bei Verwendung der Hydrolysate im Einzelfall überprüft und für den jeweiligen Organismus optimiert werden muss.
- In der Hemicellulosefraktion liegen die Zucker bereits überwiegend als Monomere vor. Mit Hilfe von Enzympräparationen aus thermophilen Clostridien-Stämmen konnten auch die restlichen, di- oder oligomer vorliegenden Zucker hydrolysiert werden. Das Wachstum dieser Stämme auf der Hemicellulose-Fraktion ist ebenfalls möglich.
- Die Umwandlung des Hauptmonomers Xylose in Xylulose durch rekombinante Enzyme eröffnet die Möglichkeit der Vergärung der C5-Fraktion durch (Industrie-)hefen.
- Anwendungstechnische Untersuchungen von Organosolv-Ligninen wurden mit mehreren Matrices und verschiedenen Additiven durchgeführt. Verschiedene Anwendungen konnten dabei identifiziert werden.
- Die oxidative Depolymerisierung von Lignin in IL wurde untersucht. Dabei wurden starke Einflüsse von Katalysator und IL auf das Produktspektrum festgestellt. Untersuchungen zur Depolymerisierung durch Hydrierung stehen noch aus.
- Organosolv-Lignin ist aus Sicht der Harzsynthese und nach den Ergebnissen erster anwendungstechnischer Laborprüfungen als Rohstoff für die Kondensation von Phenolharzen für Holzwerkstoffapplikationen geeignet. Damit kann Organosolv-Lignin als partieller Phenolersatz in diesen Bindemitteln verwendet werden

Das Teilziel *„Bilanzierung und Bewertung abgeschlossen“* des **Meilensteins 6** wurde im AP 4 erreicht. Die Prozessparameter und Massenbilanzen des Szenarios (1:4opt) haben als Grundlage für die Planung der Pilotanlage (Teilziel *„Konzept für verfahrenstechnische Umsetzung erstellt“* im Meilenstein 6) gedient.

Das Teilziel *„Konzept für die verfahrenstechnische Umsetzung“* im **Meilenstein 6** wurde im AP 5 erreicht, indem ein tragfähiges Konzept für Anlage und Betrieb der Pilotanlage vorgelegt werden konnte. Zwei alternative Konzepte der Hydrolysestufe für die Faserfraktion konnten ebenfalls skizziert werden.

AP1: Extraktion der Inhaltstoffe von Buche und Pappel: Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

AP1-1 Ausgangsmaterialien (AP 1.1)

Frische Buchenholzhackschnitzel und Buchenrinde wurden vom Sägewerk Pollmeier Malchow bezogen und im Juli 2007 zentral durch den Partner vTI an die anderen Projektpartner verteilt. Frische Pappelholzhackschnitzel stammen aus einer Kurzumtriebsplantage in Methau/Sachsen. Die Plantage mit unterschiedlichen Pappelhybridklonen war vor 14 Jahren in Zusammenarbeit mit StoraEnso für die Versorgung mit Papierholz angelegt worden. Die Stämme wurden mit Rinde auf einem zentralen Aufarbeitungsplatz gehackt. Die Hackschnitzel wurden anschließend (April 2008) zentral an die Projektpartner verteilt. Die Zusammensetzung des verteilten Materials gibt Tab. 1-1 wieder. Die Zerkleinerung wurde von drei Partnern vorgenommen (BTS, Evonik, vTI, s. Abb. 1-1).

Tab. 1-1: Zusammensetzung von Buchenholz, Buchenrinde und Pappelholz mit Rindenanteil (Werte in %, bezogen auf trockenes Holz)

	Buchenholz	Buchenrinde	Pappelholz m. Rinde
Lignin (als Hydrolyserückstand)	22,5	40,4 *)	24,3 *)
Extraktstoffe	3	8,9	3,7
Acetyl	6	Nicht best.	Nicht best.
Asche	0,5	Nicht best.	1,7
Σ Zucker	65,7	35,2	62,6
darin Glucose	43	18,3	43,9
Xylose	19	10,5	13,3
Mannose	2	0,5	2,9
Arabinose	0,3	2,9	0,5
Rhamnose	0,4	0,8	0,4

*) enthält neben dem Lignin auch andere Verbindungen (z.B. Kork und Wachse)

Holz, feucht: 3 – 5 mm | Rinde: feucht, 3 – 5 mm | Holz: 0,25 – 1 mm | Rinde: 0,25 – 1 mm

Abb. 1-1: Dokumentation der Zerkleinerung, beispielhaft verschiedene Fraktionen (Quelle: BTS)

Für die unterschiedlichen Extraktionsverfahren ergaben sich unterschiedlich optimale Zerkleinerungsgrade (s. Tab. 1-2).

Tab. 1-2: Optimale Zerkleinerung für unterschiedliche Extraktionsverfahren

	Material	Zerkleinerung	Lösungsmittel	Verfahren
BTS	Buchenholz	1,25 – 3 mm	Ethanol-Wasser-Gemisch	Perkolation 8:1
BTS	Buchenrinde	0,25 – 1 mm	MEK-Wasser-Gemisch	Mazeration
BTS	Buchenrinde	< 0,25 mm	Ethanol-Wasser-Gemisch	Perkolation 8:1
BTS	Pappelholz	0,25 – 1 mm	Lösungsmittel-Wasser-Gemische	Perkolation 8:1 / Mazeration
vTI	Rinde	3 mm	Ethanol-Wasser-Gemisch	ASE (100 bar)
Evonik	Buchenrinde	< 0,5 mm	CO_2 oder Propan	Hochdruckextrakt.
Evonik	Pappel	< 0,5 mm	CO_2 oder Propan	Hochdruckextrakt.
UniRo	Holz	keine	Ionic Liquids	

In der Endphase der Projektlaufzeit wurden am vTI Aufschlüsse im 10-kg-Maßstab durchgeführt, für die die Sägewerkshackschnitzel der Firma Pollmeier nicht mehr ausreichten. Die Aufschlüsse wurden mit Buchenholz-Hackschnitzeln durchgeführt, die von der Firma Lenzing AG aus Österreich bezogen wurden. Bei sonst identischen Abmessungen wiesen diese Hackschnitzel nur eine Dicke von 3 – 4 mm auf, was sich bei der Chemiezellstoffherstellung besonders günstig auf die Durchdringung mit Kochlauge auswirken soll. Die zuvor verwendeten Hackschnitzeln wiesen durchweg eine Dicke von 5 – 8mm auf.

Buchenrinde ist wesentlich ergiebiger für die Gewinnung von Extraktstoffen als Buchenholz. Dies wurde sowohl mit klassischer Schüttelkolbenextraktion (Mazeration) als auch mit Perkolation (durchgeführt von BTS) als auch mit accelerated solvent extraction (ASE, durchgeführt von vTI) als auch mit der Hochdruckextraktion (CO_2, durchgeführt von Evonik) übereinstimmend gezeigt, wobei das Buchenholz bei der ASE am schlechtesten abschnitt (Abb. 1-3). Allerdings wurden bisher nur geringe Gehalte an Triterpenen gemessen:

Tab. 1-3: Gehalte an Extraktstoffen bei verschiedenen Extraktionen

Ausgangsmaterial	Lösungsmittel	Gehalt [%]	Bemerkung
Buchenholz	Wasser	0,0	
Buchenholz	Ethanol	< 0,1*	
Buchenholz	Ethanol/Wasser	Nur Spuren	
Buchenrinde	Ethanol	< 0,5	Vergleichsmessung bei BI

*deutliche Signale

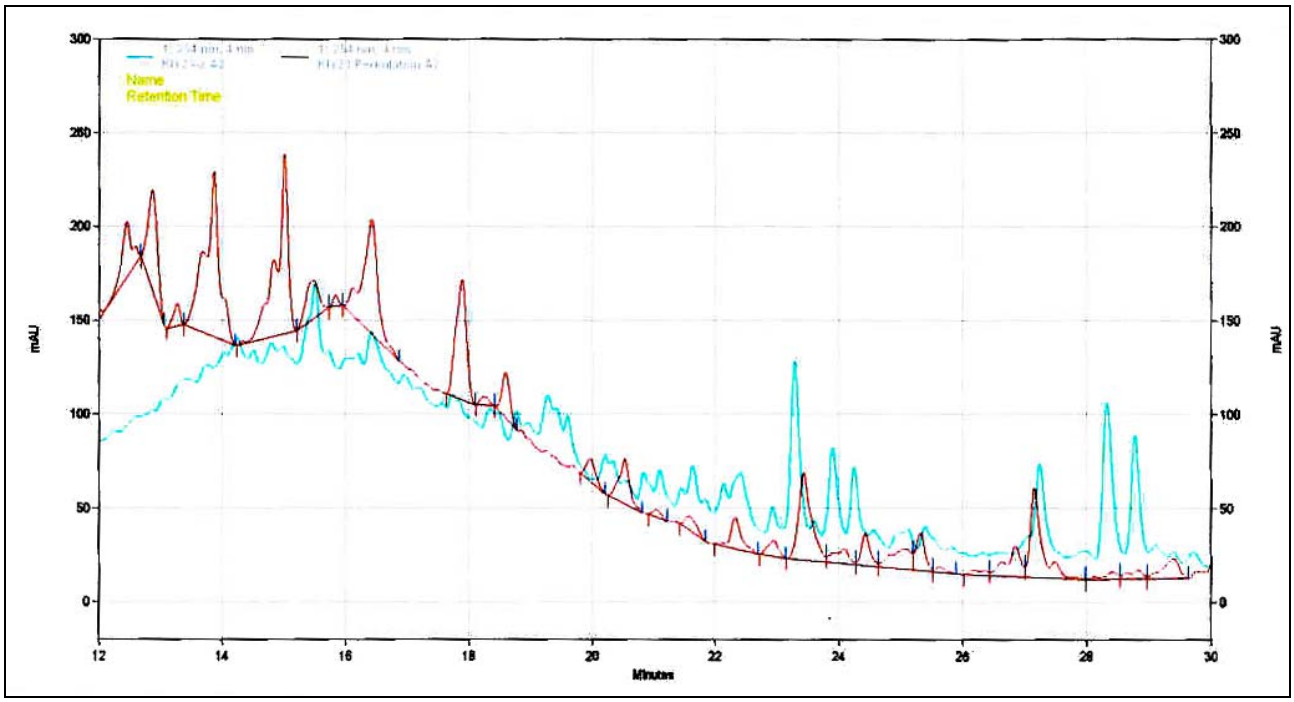


Abb. 1-2: Extraktion von Buchenholz und Buchenrinde durch Perkolation mit Ethanol/Wasser (60:40). Überlagerung der beiden Chromatogramme bei 254 nm bei der Vermessung der jeweils ersten Probe des Extraktes aus Holz (rote Linie) und Rinde (türkise Linie) (Quelle: BTS).

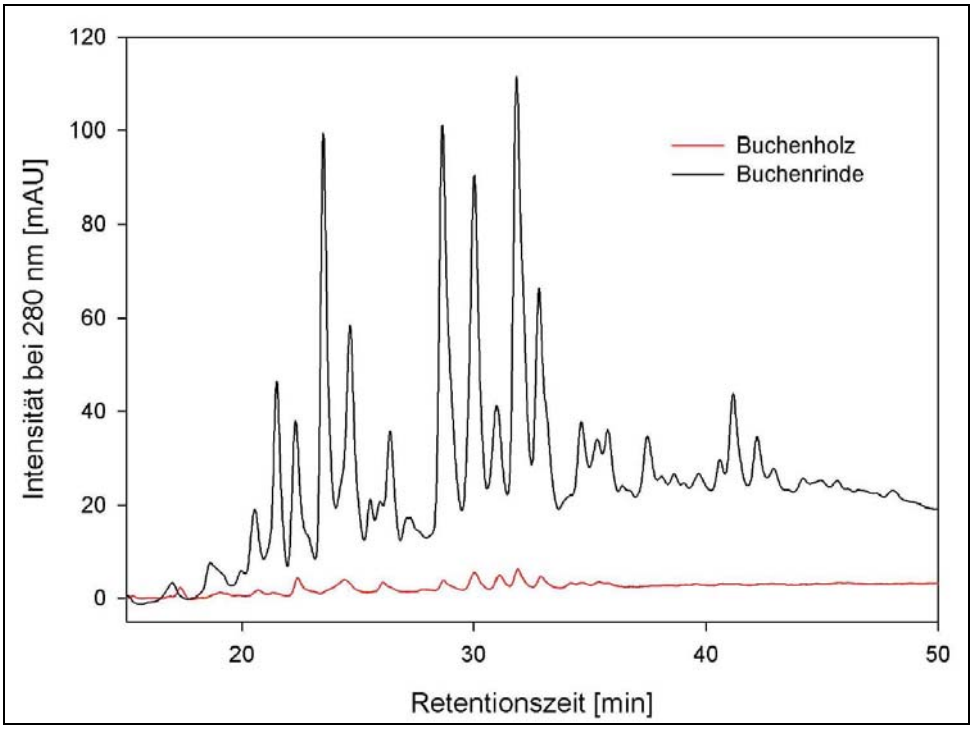


Abb. 1-3: Extraktion von Buchenholz und Buchenrinde durch ASE. Überlagerung der beiden Chromatogramme bei 254 nm bei der Vermessung der jeweils ersten Probe des Extraktes aus Holz (rote Linie) und Rinde (schwarze Linie) (Quelle: vTI).

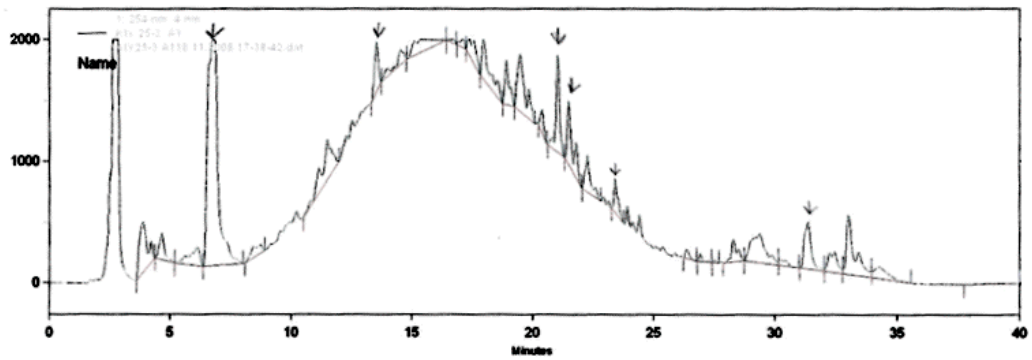


Abb. 1-4: Extraktion von Pappelholz durch Perkolation mit EtOH/Wasser (60:40). Chromatogramm bei 254 nm, Vermessung der ersten Probe des Extraktes (vgl. Abb. 1-7, Probe A1) (Quelle: BTS).

AP1-2 Ermittlung der optimalen Extraktionsbedingungen (AP 1.2) und analytische Charakterisierung der Extrakte (AP 1.4)

Die Extraktionsbedingungen wurden optimiert (z.B. hinsichtlich Lösemittel, Temperatur, Druck, Partikelgröße, Lösemittelverhältnis), um möglichst hohe Extraktstoffausbeuten zu erzielen. Die Partner ermittelten bei unterschiedlichen Systemen, dass mit einem gewissen Anteil von Ethanol als Lösungsmittel gute Ausbeuten sowohl für Buchenrinde als auch für Buchenholz und Pappelholz mit Rindenanteil erhalten werden können (Tab. 1-4).

Tab. 1-4: Gehalte an Extraktstoffen bei verschiedenen Extraktionen nach Optimierung

Partner	Material	Extraktion	Ausbeute [%]
BTS	Buchenholz	8-fach Ethanol-Wasser 60 – 40 % : 40 – 60 % bei 40 – 50 °C, Mazeration	0,4
BTS	Buchenrinden	MEK-Wasser 60 – 40% bei 40 °C, Mazeration	0,4
BTS	Pappelholz	8-fach Ethanol-Wasser 60 – 40 % : 40 – 60 % bei 25 °C, Mazeration	0,65
BTS	Pappelholz	Propanol-Wasser 60:40 Aceton/Wasser 40:60, Bedingungen s.o.	0,8
Evonik	Buchenrinde	CO_2 + 2,7 – 8 % Ethanol, 250 bar, 40 – 60 °C überkritische Extraktion, S/F=25	bis 1,17
Evonik	Buchenrinde	Propan + 2,6 % Ethanol, 30 bar, 30 °C Hochdruckextraktion, S/F=10	1,1
Evonik	Pappel	CO_2 + 6 % Ethanol, 250 bar, 40 – 60 °C überkritische Extraktion, S/F=25	bis 1,5
UniRo	Holz	9-fach BMIM-Chlorid	– *
UniRo	Holz	10-fach EMIM-Acetat	– *

* Beim Einsatz von ionischen Flüssigkeiten kam es zur kompletten Auflösung des Holzes, so dass keine klassische Ausbeutebestimmung erfolgen konnte. Auch konnte durch eine kontinuierliche Gegenstromextraktion mit CO_2 keine quantitativ erfassbare Menge an Extrakt erreicht werden (s. Text).

Abb. 1-5 bis Abb. 1-7 verdeutlichen, dass mit verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedliche Resultate erzielt wurden, sowohl hinsichtlich der Trockenrückstände, als auch der gezeigten Peakflächen (Abb. 1-6). Nach Erfahrungen seitens des vTI handelt es sich dabei nicht unbedingt um die gleichen Stoffe in anderer Menge, sondern durchaus auch um unterschiedliche Stoffe, die durch die unterschiedlichen Extraktionsmedien herausgelöst werden.

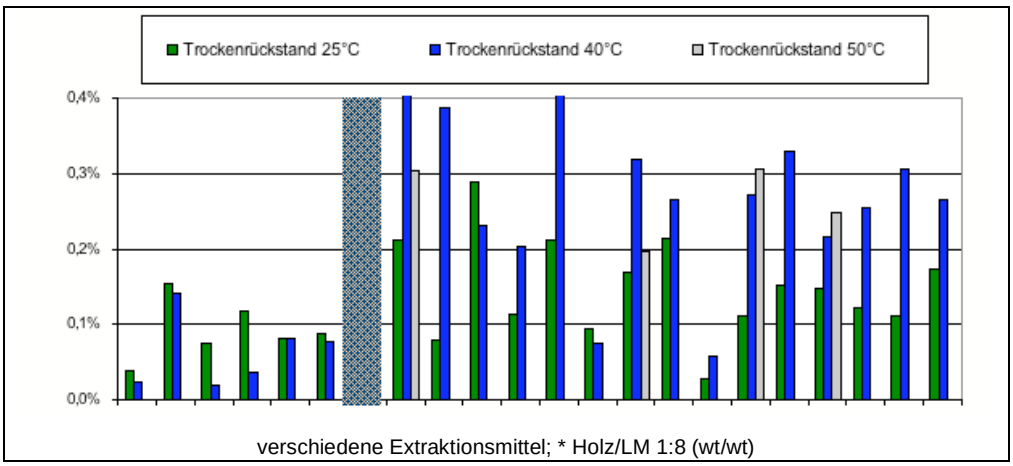


Abb. 1-5: Darstellung der Ergebnisse mit dem Einsatzstoff HOLZ bei verschiedenen Lösungsmitteln und Temperaturen. Aufgetragen ist der Trockenrückstand in [%], Ausgangsmaterial: Holz, trocken, $d_{Partikel}$ < 1,25 mm, Verfahrensvariante: Schüttelkolben ~20 h (Quelle: BTS)

Nach Auswertung der Versuche bei BTS kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse bei Verwendung der drei angesprochenen Holzsorten folgende Tendenzen zeigen: Gute Ausbeuten lassen sich erzielen durch den Einsatz eines Lösemittel-Wasser-Gemisches und durch eine möglichst kleine Partikelgröße. Der Einfluss der Temperatur im untersuchten Bereich (25 – 50 °C) ist gering, die Pappel zeigt wesentlich höhere Trockenrückstände als die untersuchten Buchenfraktionen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde im Rahmen des Projektes durch die Projektpartner Evonik und Solvent-Innovation die Kombination aus einem Aufschluss von Pappelrinde mit Ionic Liquids und anschließender Hochdruckextraktion mit überkritischen CO_2 untersucht. Das Ziel dieser Versuche war die Überführung der Zeit- und damit kostenaufwendigen Feststoffextraktion in einen kontinuierlichen Extraktionprozess (Gegenstromextraktion). Für diese Versuche wurde ein von Solvent-Innovation hergestellter Aufschluss aus Buchenrinde und ECOENG 1111P bei der Evonik mit überkritischen CO_2 bzw. mit einer Mischung aus CO_2 und Ethanol extrahiert. Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass aufgrund des pastösen Verhaltens des Aufschlusses keine kontinuierliche Prozessführung möglich war. Auch waren die Ausbeuten bei diesen Versuchen deutlich geringer und konnten fast nicht quantitativ erfasst werden. Aus diesen Gründen wurde auf eine weitere Ausarbeitung dieser Verfahrensidee verzichtet.

Die Unterschiede zwischen Totalausbeute und selektiver Extraktion bestimmter Stoffe konnte auch anhand der Leitsubstanz für Triterpene, Betulinsäure, gezeigt werden. Die höchsten Ausbeuten an Betulinsäure wurden mit 60 %igem Aceton oder 60 %igem 2-Propanol in Wasser im klassichen Extraktionsverfahren erreicht. Durch Verwendung von reinem Aceton, Methanol, Ethanol oder 2-Propanol sank die Ausbeute. Die Selektivität für Betulinsäure stieg aber (Tab. 1-5, letzte Spalte). Noch höhere Selektivitäten konnten durch Verwendung eines Hochdruckverfahrens beim Partner Evonik erreicht werden. Allerdings waren hier die Ausbeuten ebenfalls niedrig. Dass höhere Ausbeuten theoretisch möglich sind, zeigten das Laborverfahren am vTI mit 0,066 % Betulinsäure (Ausbeute bez. auf TM Buchenrinde) und Gehaltsanalysen der Buchenrinde bei Boehringer Ingelheim.

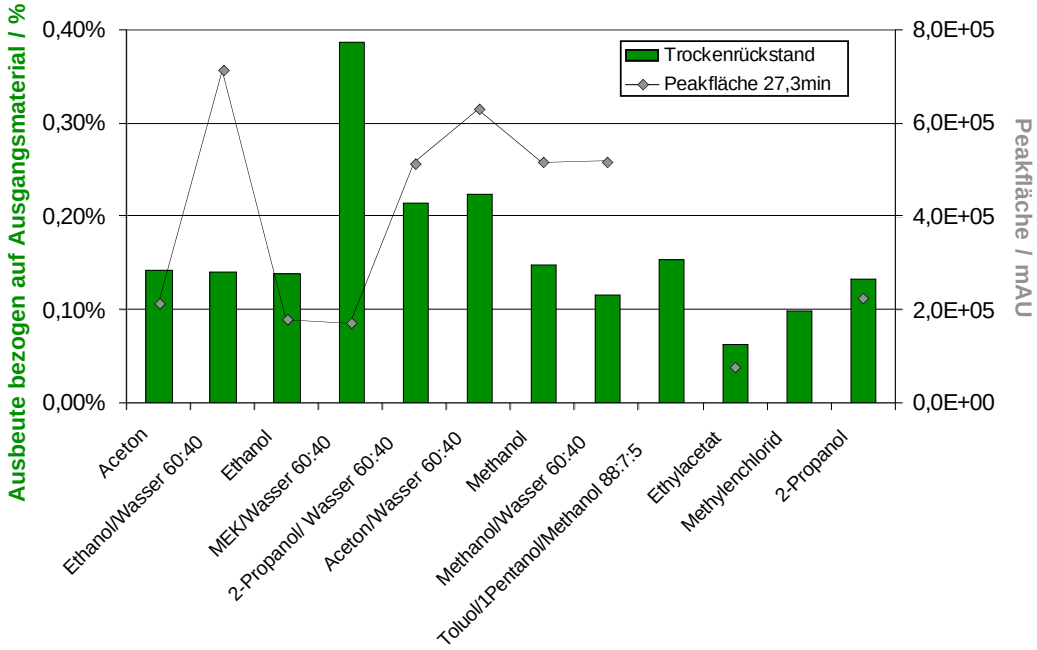


Abb. 1-6: Darstellung der Fotos und Ergebnisse mit dem Einsatzstoff RINDE bei verschiedenen Lösungsmitteln bei 40°C und der Auswahl eines Peaks als Markersubstanz. Links aufgetragen der Trockenrückstand in [%], rechts die Peakfläche bei 27,3 min in mAUs, Ausgangsmaterial: Rinde, gefroren gelagert, $d_{Partikel}$ 0,25 – 1 mm, Verfahrensvariante: Schüttelkolben, ~20 h (Quelle: BTS)

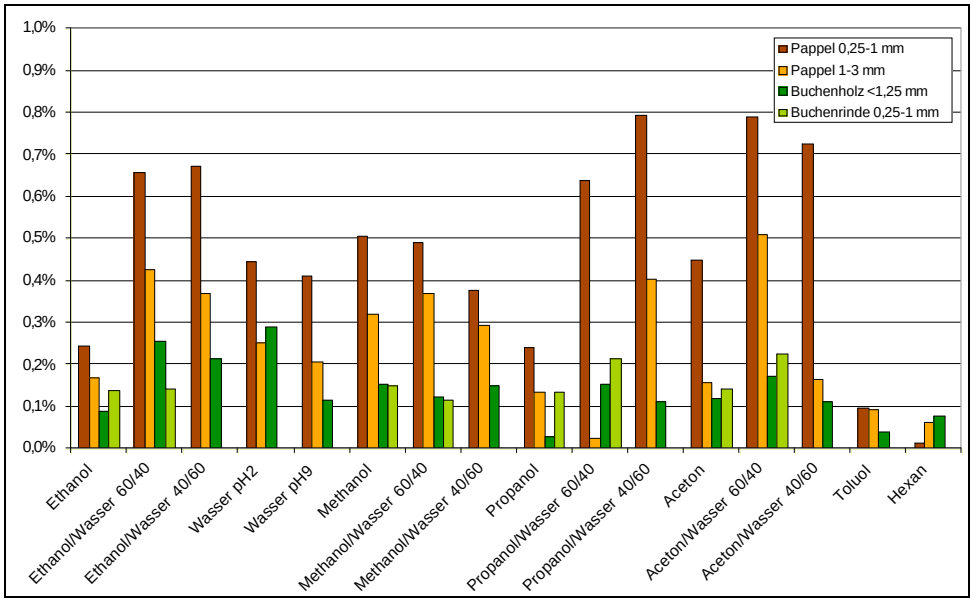


Abb. 1-7: Darstellung der Ergebnisse mit den Einsatzstoffen Buchenrinde und Pappelholz bei verschiedenen Lösungsmitteln und Partikelgrößen. Aufgetragen ist der Trockenrückstand in [%], Verfahrensvariante: Schüttelkolben ~20h (Quelle: BTS)

Tab. 1-5: Vergleich zwischen Totalausbeute und selektiver Extraktion bei verschiedenen Extraktionen am Beispiel der Leitsubstanz Betulinsäure

Proben-Nr.	Probenbeschreibung	Einwaage Rinde/LSM [g : ml]*	Betulinsäure		
			[%] von Einwaage	[µg/ml]	[%] Area HPLC
BTS-KIY-6	Aceton / Wasser (60:40)	1 : 8	0,036	45,346	1,01
BTS-KIY-5	2-Propanol / H_2O (60:40)	1 : 8	0,032	40,544	1,45
BTS-KIY-9	Toluol / 1-Pentanol / Methanol (88:7:5)	1 : 8	0,030	37,259	0,21
BTS-KIY-2	Ethanol / H_2O (60:40)	1 : 8	0,021	26,402	0,94
BTS-KIY-11	Methylenchlorid	1 : 8	0,021	26,184	0,54
BTS-KIY-10	Ethylacetat	1 : 8	0,017	21,117	0,37
BTS-KIY-1	Aceton	1 : 8	0,017	21,060	1,73
BTS-KIY-7	Methanol	1 : 8	0,015	18,448	1,28
BTS-KIY-3	Ethanol	1 : 8	0,014	17,172	2,47
BTS-KIY-12	2-Propanol	1 : 8	0,013	16,632	3,06
BTS-KIY-8	Methanol / H_2O (60:40)	1 : 8	0,004	4,923	0,18
BTS-KIY-4	MEK / Wasser (60:40)	1 : 8	0,001	1,474	0,03
vTI 15	Rinde / Aceton	8,32 : 50	0,066	109,046	1,03
vTI 14	Rinde / EtOH-Wasser	3,23 : 50	0,050	32,594	0,18
vTI 13	Holz / EtOH-Wasser	1,73 : 50	0,010	3,316	0,11
Evo 3160	1 h 2,7kg CO_2 + 1 l EtOH	1 : 9	0,014	779,290	6,83
Evo 3165	CO_2 / Hexan 0,9 %	1 : 40	0,002	405,654	7,53
Evo 3158/59	4 h 12 kg CO_2	1 : 40	0,005	200,703	15,74
Evo 3153	4 h 12 kg scPropan	1 : 40	0,006	193,043	9,53
Evo 3155	4 h 12 kg ncPropan	1 : 40	0,002	103,085	7,47
Evo 3152	4 h 12 kg liqPropan	1 : 40	0,003	102,922	7,33
Evo 3163	Propan / 2,6 % EtOH	1 : 40	0,002	100,785	3,49
RAF 8	Aufschluss	1 : 6	0,110	183,374	0,46
RAF 8	Fällung			0,000	0
NW 128	m. MeOH reextrahiert	3,55 : 3,55	0,001	13,682	3,05

* Bei der Hochdruckextraktion (Evonik) in [g:g]

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich auch für die Leitsubstanz Betulinsäure Lösungsmittelgemische mit Alkoholen (Ethanol, 2-Propanol, Methanol) oder auch Aceton als brauchbar erwiesen haben. Der Unterschied zwischen klassischen Extraktionsverfahren (Mazeration und Perkolation) und moderneren Hochdruckverfahren ist nicht so groß.

Noch geringer waren die Ausbeuten bei der Hochdruckextraktion von Pappelholz. Von insgesamt 13 in Rahmen der Optimierung der Extraktion durchgeführten Versuchen konnten nur in drei Proben Ursolsäure und Oleanolsäure nachgewiesen werden (s. Tab. 1-6). Bei diesen Proben konnte maximal ein Gehalt von 1,09 % Oleanolsäure und 0,17 % Urolsäure im Trockenextrakt erreicht werden. Bezogen auf das Ausgangsmaterial ergeben sich maximale Ausbeuten von 119 ppm bzw. 19 ppm. Diese Ausbeuten sind sowohl bei der Extraktion von Buchenrinde als auch von Pappelholz so gering, dass eine wirtschaftliche Darstellung des Verfahrens nicht möglich ist (langjährige industrielle Erfahrung der Evonik auf dem Gebiet der Hochdruckextraktion).

Tab. 1-6: Ausbeuten von Ursol- und Oleanolsäure bei der Hochdruckextraktion

Probe	Proben-beschreibung	Lösemittel-verhältnis	Gesamt-extrakt	Gehalt im Extrakt (TM) [%]		Ausbeute* [ppm]	
				Ursol-säure	Oleanol-säure	Ursol-säure	Oleanol-säure
Evonik 3188	CO_2 + 3,2 % Ethanol	1 : 24	1,10	0,17	1,09	18,6	118,6
Evonik 3189	CO_2 + 2,8 % Ethanol	1 : 24	1,37	0,09	0,52	12,2	71,1
Evonik 3190	CO_2 + 5,4 % Ethanol	1 : 24	1,48	0,10	0,67	15,5	99,9

* bezogen auf das Ausgangsmaterial

Ebenfalls wurden 14 Proben von BTS aus Versuchen mit Pappelholz und dem Einsatz klassischer Extraktionsverfahren beim Partner BI mittels DC und HPLC vermessen. In keiner dieser Proben konnte eine der Leitsubstanzen analysiert werden.

AP1-3 Entwicklung eines kontinuierlichen Extraktionsverfahrens (AP 1.3)

Erste Ansätze zur Entwicklung eines kontinuierlichen Extraktionsverfahrens wurden erprobt. Auf die Extraktion im Schüttelkolben folgte als quasi-kontinuierliche Verfahrensweise und Möglichkeit zur Aufnahme eines zeitlichen Verlaufs der Extraktion (der Kinetik) je ein Versuch in der **Perkolationssäule**. Das Foto in Abb. 1-8 zeigt den Aufbau. Dabei wird eine Säule mit den zerkleinerten Holz- bzw. Rindestückchen gefüllt und mittels eines präparativen HPLC-Systems bei gleicher Geschwindigkeit von unten nach oben durchströmt und somit extrahiert. Die Proben werden fraktioniert aufgefangen.

Die Abb. 1-8 zeigt den Verlauf der Extraktion jeweils mit Buchenholz und -rinde. Aufgetragen sind die Peakfläche je Probe (als Momentaufnahme der Konzentration), sowie die Akkumulation des extrahierten Stoffes über die Auswertung der Peakflächen über der Zeit.

Abb. 1-9 zeigt den Verlauf von zwei Versuchen via Perkolation beim Einsatz von Pappelholz unterschiedlicher Porengrößen, sowie den optischen Eindruck des Farbverlaufs der genommenen Proben.

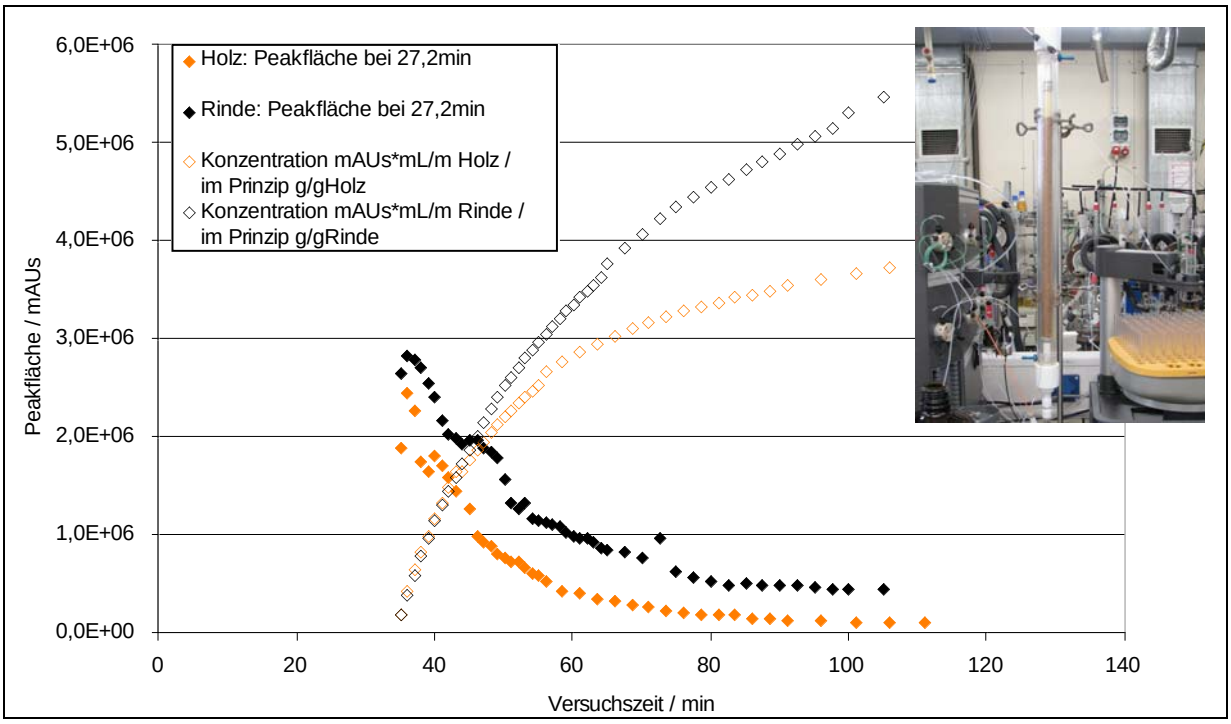


Abb. 1-8: Darstellung des Verlaufs der Perkolation mit Ethanol/Wasser (60:40) mit dem Einsatzstoff Buchenholz bei RT (orange) bzw. Rinde bei RT (schwarz) und der Auswahl eines Peaks (27,2 min) als Markersubstanz. Rechts aufgetragen die Peakfläche jeder einzelnen Probe (gefüllte Rauten) sozusagen als Konzentration, dazu aufsummiert die Peakfläche, bezogen auf die eingesetze Lösungsmittel- und Holz/Rindenmenge (offene Raute), Ausgangsmaterial: Holz, trocken gelagert, $d_{Partikel,\ Holz}$ < 1,25mm bzw. Rinde, eingefroren gelagert, $d_{Partikel,\ Rinde}$ 0,25 bis 1mm, Verfahrensvariante: Perkolation, ~ 2h (Quelle: BTS)

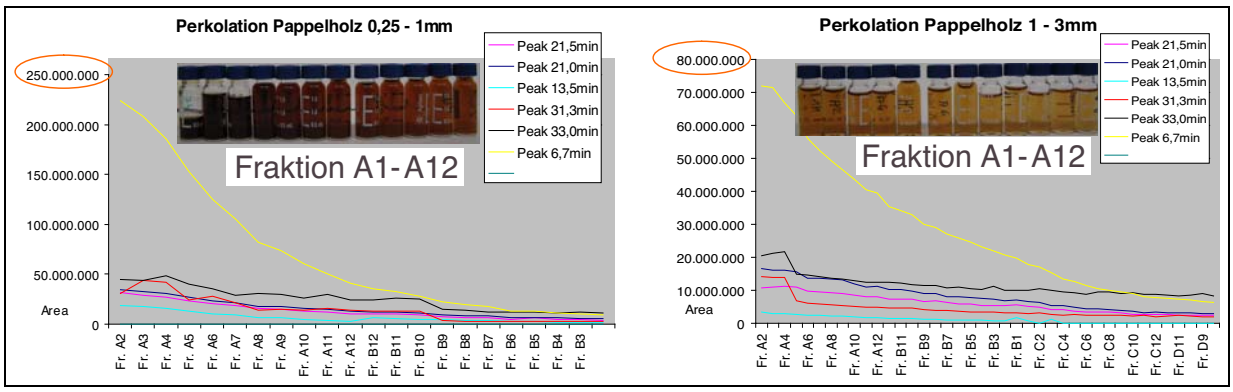


Abb. 1-9: Darstellung des Verlaufs der Perkolation mit Ethanol/Wasser (60:40) mit dem Einsatzstoff Pappelholz bei RT und zwei verschiedenen Partikelgrößen. Aufgetragen ist die Peakfläche einiger Markersubstanzen (vgl. Abb. 1-4) über die Probenfraktion in der Reihenfolge der Probennahme (A1-A12, B12-B1), sowie ein optischer Farbverlauf der jeweils ersten Proben (A1-A12)

AP1-4 Anwendungstechnische Untersuchungen zur Bestimmung der Bioaktivität (AP1.5)

Höhermolekulare Terpene, wie Triterpene (C30), die nur wenige Sauerstoffgruppen tragen, sind auf chemischem Weg nur schwer zu Zielprodukten umzusetzen, daher stellen biokatalytische Strategien eine interessante Alternative dar. Das Potential ausgewählter Mikroorganismen zur regio- und stereoselektiven Funktionalisierung von Betulin, Betulinsäure und Ursolsäure sollte bestimmt werden. Diese pentacyclischen Triteperpene wurden von Boehringer Ingelheim (BI) als Modell-Triterpene mit konkretem wirtschaftlichem Bezug vorgeschlagen und bereitgestellt. Einerseits könnte durch eine selektive Oxyfunktionalisierung direkt eine höhere Wertschöpfung (bioaktives Produkt) oder zumindest eine reaktive Ausgangsstruktur für Folgederivatisierungen und damit für eine breitere pharmakologische Bewertung der Substanzen ermöglicht werden. Denkbar ist auch, dass durch selektive Funktionalisierungen bestimmter Triterpene die Auftrennung der Terpenfraktion erleichtert und damit die wirtschaftliche Isolierung gewünschter bioaktiver Zielsubstanzen überhaupt erst ermöglicht wird.

AP1-4.1 Methodisches Vorgehen

AP1-4.1.1 Erstellung einer Stammbibliothek

Zunächst wurde eine umfangreiche Stammbibliothek, bestehend aus zahlreichen Pilzen und einigen Bakterien, erstellt. Die Mikroorganismen wurden nach zwei Kriterien ausgewählt:

- Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Modell-Triterpene zu Steroiden wurden nach umfangreicher Literaturrecherche zu steroidtransformierenden Mikroorganismen vielversprechende Spezies ausgewählt.
- Die Liste der Stämme wurde durch Mikroorganismen ergänzt, die auf eigene positive Erfahrungen der AG Bioverfahrenstechnik zur mikrobiellen Oxyfunktionalisierung strukturell verwandter Mono- und Sesquiterpene zurückgehen.

Mit dieser Stammbibliothek bestehend aus 26 Pilz- und 7 Bakterienstämmen (Tab. 1-7) wurde ein umfangreiches Screening auf die Fähigkeit zur Biotransformation von Triterpenen durchgeführt. Als Modellsubstanzen für die Gruppe der Triterpene dienten Betulin ($C_{30}H_{50}O_2$), Betulinsäure ($C_{30}H_{48}O_3$) und Ursolsäure ($C_{30}H_{48}O_3$), wobei die Ursolsäure als Gemisch mit dem Konstitutionsisomer Oleanolsäure (70:30) vorlag.

Tab. 1-7: Stammbibliothek der zu testenden Mikroorganismen (alphabethisch) (Quelle: Dechema)

Species	Stamm	Literatur
Pilzstämme:		
Acremonium chrysogenum	DSM 880, ATCC 11550	
Acremonium diospyri	DSM 2939, ATCC 9066	
Aspergillus niger	DSM 821, ATCC 9142	Fried et al. 1952; Betts et al. 1974 ; U.S. Patent 4246346; Kieslich 1984, 1997; US Patent 3,529,000; Demyttenaere et al. 1998, 2000, 2001
Botrytis cinerea	DSM 877, ATCC 12481	Kieslich 1997; Aleu et al. 2001; U.S. Pat. 2,789,940
Chaetomium globosum	DSM 1962, ATCC 6205	Kieslich 1984; Kaspera et al. 2005
Colletotrichum graminicola	DSM 63127	Bastos et al. 2007; de Oliveira et al. 2005
Corynespora cassiicola	DSM 62475	Kieslich et al. 1986 b; Abraham et al. 1986b; Demytterneare et al. 2001; Duetz et al. 2003
Cunninghamella elegans	DSM 1908, ATCC 9245	Betts et al. 1974; Smith & Davis 1977, 1978; Clark et al. 1979; Kieslich 1984, El Sayed et al. 2000, Kouzi et al. 2000; Ata et al. 2007
Cunninghamella echinulata	DSM 1905, ATCC 36190	Betts et al. 1974; Otten et al. 1978; Chien & Rosazza 1979; Clark et al. 1979; Otten & Rosazza 1981, Kieslich 1984
Cunninghamella blakesleeana	DSM 1906, ATCC 8688a	Betts et al. 1974; Otten et al. 1978; Clark et al. 1979; Sariaslani et al. 1983; Kieslich 1997; Manosroi et al. 2007
Curvularia lunata	DSM 63137	Otten & Rosazza 1979; Kieslich 1984
Curvularia lunata	NRRL 2380, ATCC 12017	Clark et al. 1979; U.S. Patent 4246346; Kieslich 1984; Chen et al. 1990; Holland et al. 1999; Ata et al. 2007; Collins et al. 2001, 2002; Manosroi et al. 2007
Diplodia gossypina	ATCC 10936, 10936	Kieslich 1986, 1997; Abraham et al. 1986b, 1994
Emericella nidulans	DSM 820, ATCC 11267	Fried et al. 1961; U.S. Pat. 3,004,047
Fusarium ciliatum	DSM 879, ATCC 14767	Kieslich 1997; Maatooq 2002; U.S. Patent 4144334
Fusarium fujikuroi	DSM 893, ATCC 12616	Malonek et al. 2004; Fraga et al. 2005
Mucor circinelloides	DSM 1173, ATCC 1207b	Clark et al. 1979 ; U. S. Patent 4144334
Mucor plumbeus	CBS 110.16	Guillermo et al. 1997; Kieslich 1997; Reese et al. 2001
Penicillium chrysogenum	DSM 848, ATCC 9178	Kieslich 1984, Demyttenaere et al. 1998
Penicillium digitatum	DSM 62840	Abraham et al. 1986a; Kieslich 1997; Demyttenaere et al. 2001; Duetz et al. 2003
Penicillium italicum	DSM 62846	Bowen 1975; Kieslich 1984
Pleurotus sapidus	DSM 8266	Müller, Berger, Kaspera 2005
Rhizopus oryzae (arrhizus)	DSM 906, ATCC 11145	Holland et al. 1979, 1981 und 1999; Clark et al. 1979; Kieslich 1997; Chen et al. 1997; US Patent 2,646,370
Rhizopus nigricans (stolonifer)	DSM 907, ATCC 6227b	Clark et al. 1979; Maddox et al. 1981; U.S. Patent 4246346; Sonomoto et al. 1982; Smith, 1984; Znidarsic et al. 1998; US Patent 3,053,858
Septomyxa affinis	DSM 3048, ATCC 6737	Singh et al. 1968; Plourde et al.1971; Sebek et al. 1979; Clark et al. 1979; Kouzi et al. 1990; Kieslich 1997; Patent 3,050,534 ; U.S. Patent 4144334
Trichoderma longibrachiatum	DSM 769, ATCC 26921	Lanisnik et al. 1992
Bakterienstämme:		
Arthrobacter simplex	DSM 20130, ATCC 6946	Kieslich 1984; Montes et al. 1991; Llanes et al. 2002; Bastos et al. 2007; Li et al. 2007 ; U.S. Patent 3,010,876; 3,050,534; 2,837,464; 4246346
Bacillus megaterium	ATCC 13368, 13368	Holland et al. 1999; Chatterjee et al. 2000; Kouzi et al. 2000
Bacillus fusiformis	DSM 2898, ATCC 7055	Plourde et al.1971 ; Kieslich 1984; U.S. Patent 3,053,832; 3,054,811
Nocardia erythropolis	DSM 43066, ATCC 25544	Kieslich 1984; U.S. Pat. 3,010,876; U.S. Patent 3,925,164
Nocardia sp.	NRRL 5646, DSM 45197	Chen et al. 1994; 1997; Cheng et al. 2004; Zhang et al. 2005
Pseudomonas putida	DSM 12264	Mars et al. 2001; Mirata et al. 2009
Streptomyces roseochromogens	DSM 40856, ATCC 3347	Kieslich 1984

AP1-4.1.2 Durchführung der Biotransformationen

Zur Durchführung der Biotransformation wurden zwei alternative Strategien verfolgt:

- Strategie 1: Biotransformation mit wachsenden Kulturen
  Während des Wachstums wurde der Kultur zur Biotransformation in DMSO vorgelöstes Triterpen (Betulin, Betulin- oder Ursolsäure) in Konzentrationen von 1 g/l hinzugegeben. Die Extraktion erfolgte durch Zugabe von Ethylacetat (0,5:1 EtAc/Medium (v/v)). Das Ethylacetat wurde unter Vakuum entfernt und die Probe in Methanol aufgenommen. Alternativ wurde vor der Extraktion ein Zellaufschluss der Biomasse durch Ultraschall („Sonifier“) durchgeführt, um eine maximale Produktextraktion und Substratrückgewinnung zu gewährleisten.
- Strategie 2: Biotransformation mit lyophilisierter Biomasse
  Nach Rehydratisierung von lyophilisierter Biomasse in Puffer oder Medium wurde die Biotransformation durch Zugabe des Triterpens (1 g/l; in DMSO) gestartet. Kleine Mengen des Triterpens können ggf. schon während der Wachstumsphase zugegeben werden, um eine etwaige Induktion der beteiligten Enzyme zu bewirken. Nach der Inkubation (72 h) wurden die Proben gefriergetrocknet. Der feste Rückstand wurde in Methanol aufgenommen, 3 – 4 Stunden bei 40 °C geschüttelt und anschließend analysiert.

AP1-4.1.3 Etablierung einer HPLC-Analytik

Während der Projektlaufzeit wurden verschiedene HPLC-Methoden zur Detektion der Triterpene entwickelt und angewendet. Daher wurden die Ergebnisse nicht alle mit der gleichen Methode generiert und es kommt zu Verschiebungen der Retentionszeiten. Aus diesem Grund sind die dargestellten Chromatogramme nicht direkt untereinander vergleichbar, erlauben aber die gewünschten Aussagen über die Biotransformationserfolge. Letzendlich konnte eine stabile, reproduzierbare Analytik aufgebaut werden (siehe Tab. 1-8). Eine exemplarische Trennung der Triterpene, sogar der Konstitutions-Isomere Ursol- und Oleanolsäure, ist in Abb. 1-10 dargestellt.

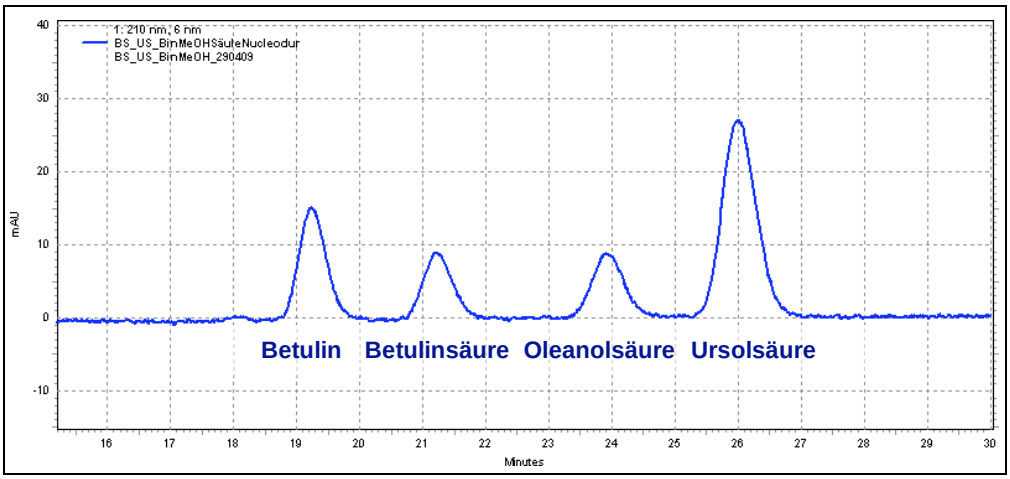


Abb. 1-10: HPLC-Chromatogramm der Trennung der Triterpene Betulin, Betulinsäure, Oleanolsäure und Ursolsäure (in Methanol) (Quelle: Dechema). Methode nach Prof. V. Jordan, P. Schneider FH Münster (s. Tab. 1-8)

Tab. 1-8: RP-HPLC Analytik zur Auftrennung von Triterpenen (Methode nach Herrn P. Schneider (Arbeitsgruppe Prof. V. Jordan, FH Münster))

Säule:	Nucleodur C18 ISIS, 3 µm, 4 x 250 mm (Macherey & Nagel)
Mobile Phase:	Methanol/Wasser/Essigsäure/Triethanolamin (90+10+0,04+0,02 (v/v))
Fließgeschwindigkeit:	0,6 ml/min bei einem Druck von ~ 165 bar
Temperatur:	15 °C
Detektion:	bei 210 nm mit einem UV-Detektor (UV/VIS Detektor SPD-20A)

AP1-4.2 Validierung der entwickelten Biotransformationsmethode für den Nachweis von Triterpen-Oxyfunktionalisierungen

Für einen Nachweis der prinzipiellen Eignung der oben beschriebenen methodischen Vorgehensweise (Biotransformation und Analytik) wurde zunächst eine literaturbekannte Steroidbiotransformation durchgeführt. Hierbei kam der Pilz *Curvularia lunata* NRRL 2380 (COLLINS et al. 2001 UND 2002) und das Steroid Cortexolon (Reichstein´s Verbindung S) als Triterpen-Analogon zum Einsatz. Wachsende Zellen zeigten die erwartete Produktbildung, wobei es sich gemäß Literatur um die 11β-Hydroxylierung zum Hydrocortison handelt (ZUIDWEG et al., 1962; SONOMOTO et al., 1983; CHEN et al., 1990). Damit konnte gezeigt werden, dass das hier gewählte Biotransformationsprotokoll (Strategie 1) in Kombination mit der etablierten HPLC-Analytik geeignet ist, die vom Projektpartner BI als besonders interessant erachteten Oxyfunktionalisierungen von Triterpenstrukturen nachzuweisen.

AP1-4.3 Validierung der entwickelten Biotransformationsmethode für den Nachweis der Funktionalisierung der ausgewählten Modell-Triterpene

Wie laut Literatur zu erwarten war, konnte mit dem Bakterium *Nocardia* sp. (NRRL 5646) als wachsende Kultur eine Umwandlung des Triterpens Betulinsäure gezeigt werden (Abb. 1-11).

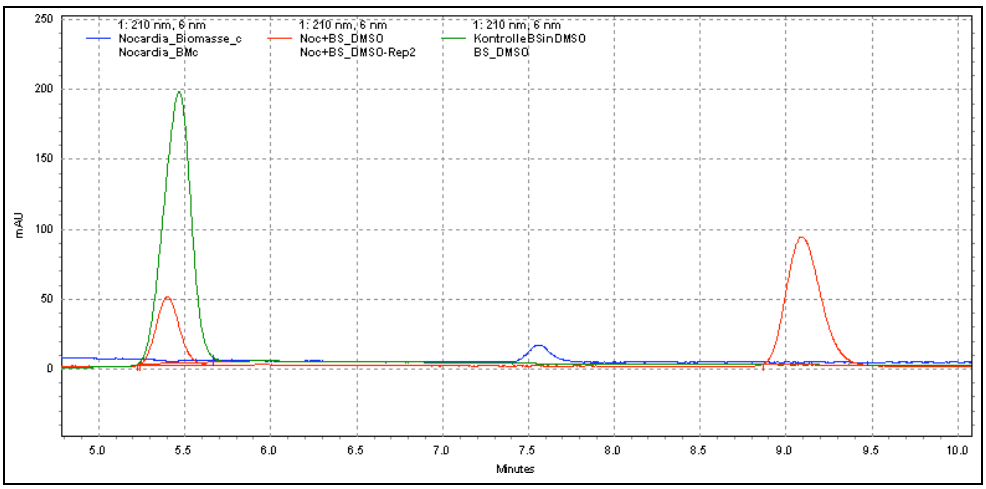


Abb. 1-11: Chromatogramm der Biotransformation von Betulinsäure durch wachsende *Nocardia*-Kultur (NRRL 5646) (Quelle: Dechema)
blau: biologische Kontrolle (Biomasse in Puffer), **grün:** chemische Kontrolle (Substrat in Puffer) und **rot**: Biotransformation (Biomasse und Substrat in Puffer)

Man erkennt aus dem rot markierten Chromatogramm in Abb. 1-11) sehr gut die Abnahme des Eduktpeaks und die Entstehung eines neuen Peaks bei einer Retentionszeit von ~9,2 Minuten in der Biotransformation, während die Kontrollen (grün, blau) dieses Produkt nicht liefern. Bei dem Produkt handelt es sich wahrscheinlich um Betulinsäuremethylester; ähnliche Reaktionen durch *Nocardien* sind aus der Literatur bekannt (ZHANG ET AL. 2005).

Weitere Messungen haben gezeigt, dass *Nocardia* ebenfalls in der Lage ist, Ursolsäure als Substrat zu nutzen und in drei Produkte umzuwandeln. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um weniger polare Stoffe als das Edukt.

AP1-4.4 Nachweis der Eignung von Biomasse-Lyophilisat zur Funktionalisierung von Triterpenen

Besonders hervorzuheben ist, dass es gelang, die Umsetzung Betulinsäure und Ursolsäure auch mit dem Lyophilisat von *Nocardia* sp. erfolgreich durchzuführen. Damit konnte das unter anderem aus dem Einsatz lyophilisierter Pilze zur Transformation von Mono- und Sesquiterpenen bekannte Prinzip (SMITH 1984, BERGER ET AL. 2005) erfolgreich auf die höhermolekularen Triterpene übertragen werden.

Für ein effektives Screening wurde in Absprache mit BI der Schwerpunkt auf die Umsetzung mit Lyophilisaten gelegt. Diese Methode bietet diverse Vorteile:

1. Durch die Lyophilisierung und anschließende Resuspendierung in kleinem Reaktionsvolumen wird die katalytisch aktive Biomasse aufkonzentriert.
2. Die Lyophilisierung ist ursprünglich ein Verfahren zur Konservierung und Langzeit-Lagerung von Mikroorganismen. Dabei werden Anteile der Zellpopulation zerstört, wodurch möglicherweise membrangebundene Enzyme für die hydrophoben Substrate besser zugänglich sind. Der andere Anteil der Zellen bleibt intakt und kann nach Rehydratisierung erneut anwachsen (HIGL et al. 2008).
3. Die parallele Durchmusterung potenzieller Biokatalysatoren erfolgt im kleinen Maßstab bei geringem Materialverbrauch und ist ideal geeignet für ein zeit- und kostensparendes Screening auf neue Biokatalysatoren und Produkte.
4. Die Verwendung von Lyophilisaten ermöglicht auch für einen späteren technischen Einsatz eine sehr einfache Handhabung (ohne mikrobiologische Kenntnisse und Methoden). Eine Implementierung in vorhandene chemisch-technische Infrastrukturen ist erleichtert, es bestehen verfahrenstechnische und ökonomische Vorteile für spätere Anwendungen.

AP1-4.5 Ausgewählte Beispiele erfolgreicher Biotransformationen (neu identifizierte Biokatalysatoren zur Triterpen-Funktionalisierung)

Im Folgenden wird die erfolgreiche Biotransformation von Betulinsäure am Beispiel eines biokatalytisch aktiven Pilzes und Bakteriums exemplarisch dargestellt (Abb. 1-12 und Abb. 1-13).

Anhand des Ascomyceten *Aspergillus niger* konnte gezeigt werden, dass sowohl durch wachsende Biomasse, als auch durch die lyophilisierte Biomasse eine Biotransformation der Triterpene stattfindet. Die Betulinsäure wird zu fünf potentiellen Produkten umgesetzt (Abb. 1-12).

Aus der Literatur ist *A. niger* bereits bekannt für seine Fähigkeit zur Hydroxylierung von Steroiden und Corticosteroiden wie z.B. Cortexolon, Progesteron und Cortisol (FRIED et al. 1952; LARSSON et al. 1978) und für die Transformation von Terpenalkoholen (DEMYTTENAERE et al. 2000). Möglicherweise bewirkt *A. niger* eine gewünschte Hydroxylierung der Triterpensubstrate.

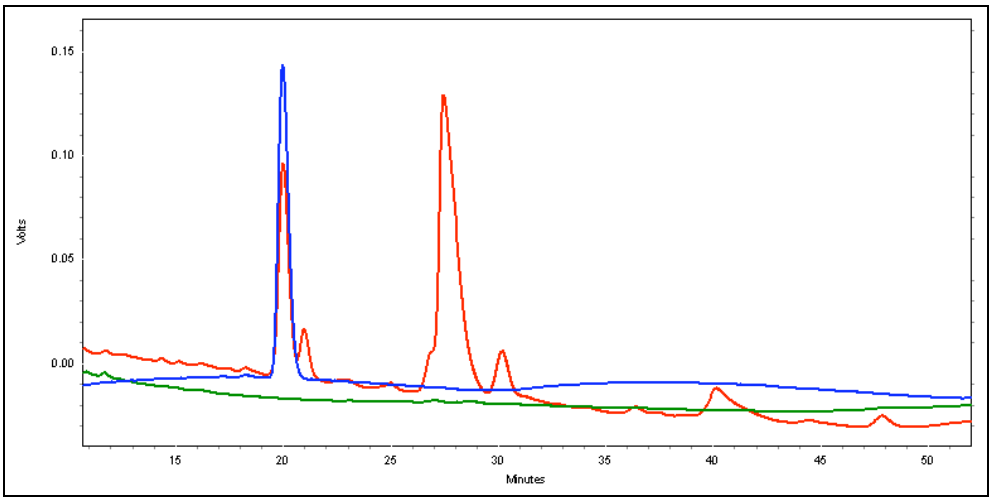


Abb. 1-12: Chromatogramm der Biotransformation von Betulinsäure durch *Aspergillus niger* als Lyophilisat (DSM 821) (Quelle: Dechema)
blau: biologische Kontrolle (Biomasse in Puffer), **grün:** chemische Kontrolle (Substrat in Puffer) und **rot**: Biotransformation (Biomasse und Substrat in Puffer)

In Abb. 1-13 sind die Ergebnisse der erfolgreichen Biotransformation von Betulinsäure durch das Lyophilisat des Bakteriums *Bacillus fusiformis* (DSM 2898) dargestellt. Man erkennt deutlich den neu entstandenen Produktpeak nach einer Retentionszeit von ~26 Minuten, der mit der Abnahme des Eduktpeaks einhergeht. Auffallend ist die Selektivität der Reaktion, Nebenprodukte sind praktisch nicht zu identifizieren. *B. fusiformis* ist laut Literatur in der Lage, Steroide zu transformieren. Bekannt sind z. B. die 1-Dehydrogenierung von Progesteron und die Oxidation der 17β-Hydroxygruppe des Testosterons (PLOURDE et al. 1971; KIESLICH 1984). Zur genaueren Strukturaufklärung der hier entstandenen Produkte bleibt die Analyse von BI abzuwarten.

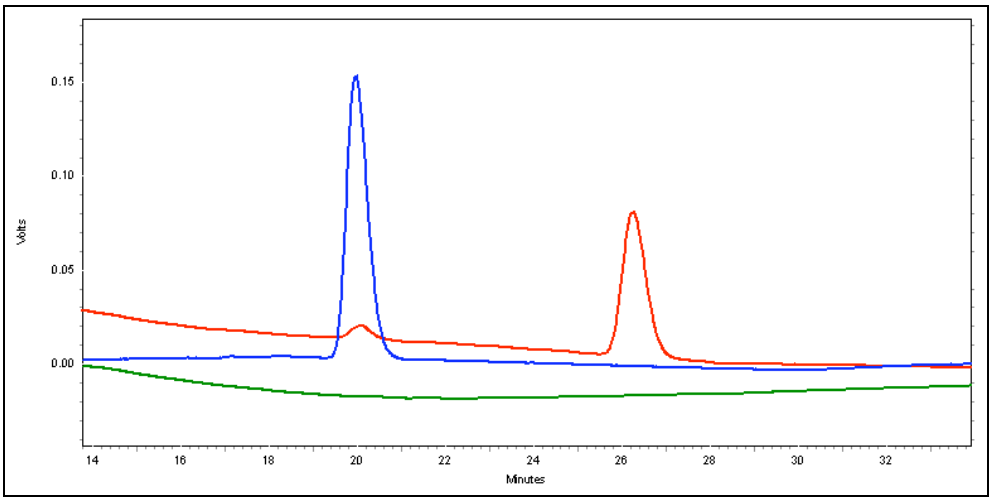


Abb. 1-13: Chromatogramm der Biotransformation von Betulinsäure durch *Bacillus fusiformis* als Lyophilisat (DSM 2898) (Quelle: Dechema)
blau: biologische Kontrolle (Biomasse in Puffer), **grün:** chemische Kontrolle (Substrat in Puffer) und **rot**: Biotransformation (Biomasse und Substrat in Puffer)

AP1-4.6 Zusammenfassende Darstellung des Screenings der Stammbibliothek auf Triterpen-Biotransformationen

Aus der Stammbibliothek waren sowohl Pilze als auch Bakterien in der Lage, die Triterpene erfolgreich zu funktionalisieren. Tab. 1-9 stellt die grundsätzlichen Ergebnisse des Screenings zusammenfassend dar. Aufgrund des Schwerpunktes auf Strategie 2 wurden nicht alle Biotransformationen mit wachsenden Kulturen durchgeführt.

Bereits aus der Literatur für die Fähigkeit zur Funktionalisierung von Triterpenen (auch am konkreten Beispiel der Betulinsäure) bekannt, waren *Bacillus megaterium* (ATCC 13368) und *Nocardia* sp. (NRRL 5646) (CHATTERJEE et al. 2000; ZHANG et al. 2005). Diese Biotransformation konnte nach unserer Methode erfolgreich reproduziert werden. *Nocardia* sp. als Vertreter der Bakterien konnte, sowohl als wachsende Kultur als auch in lyophilisierter Form, Betulin- und Ursolsäure vermutlich zum korrespondierenden Methylester funktionalisieren. Als Vertreter der Pilze konnte am Beispiel des Ascomyceten *Aspergillus niger* die erfolgreiche Biotransformation der Triterpene durch wachsende und durch lyophilisierte Biomasse gezeigt werden.

Insgesamt betrachtet konnten 19 der 33 getesteten Stämme mindestens eines der getesteten Substrate erfolgreich funktionalisieren. Davon konnten 14 Stämme mehr als eine Substanz als Substrat nutzen. Eindeutig positive Ergebnisse bei allen drei getesteten Substraten mit deutlichen Produktpeaks sind von sechs Stämmen erreicht worden, durch die Pilze *A. niger* (DSM 821), *P. digitatum* (DSM 62840), *C. lunata* (DSM 63137), *S. affinis* (ATCC 6737) und durch die Bakterien *B. fusiformis* (DSM 2898) und *P. putida* (DSM 12264). 12 unterschiedliche Mikroorganismen, die bisher überwiegend für ihre Fähigkeit zur Steroid-Transformation bekannt waren, konnten in den hier durchgeführten Versuchen positiv auf die Transformation von Triterpenen getestet werden. Die Organismen *P. digitatum, P. italicum, B. cinerea* und *P. putida* waren bisher laut Literatur lediglich bekannt für die Transformation von Mono- und Sesquiterpenen (DEMYTTENAERE et al. 2001; ALEU et al. 2001; MIRATA et al. 2009). In unseren durchgeführten Versuchen konnten sie ebenfalls erfolgreich zur Transformation der Triterpene eingesetzt werden (Tab. 1-9).

Eine weiterführende Analyse und ggf. Strukturaufklärung der im Rahmen des Screenings erzielten Produkte liegt zum Zeitpunkt des Abschlussberichtes noch nicht vor, da entsprechende Proben erst gegen Ende der Projektlaufzeit an BI übergeben werden konnten. Verantwortlich hierfür waren die unvorhersehbaren Schwierigkeiten bei der Etablierung einer verlässlichen Routine-Analytik mittels HPLC, wodurch es zu zeitlichen Verschiebungen kam.

AP1-4.7 Biotransformationsversuche mit isolierten Enzymen

Ergänzend zur Biotransformation mit Mikroorganismen wurde am Beispiel der Chloroperoxidase (CPO) aus *Caldariomyces fumago* die Möglichkeit einer Transformation mit einem isolierten Enzym untersucht. Die fungale CPO wurde ausgewählt, da eigene Arbeiten des DECHEMA-KWI erstmals gezeigt hatten, dass mit Hilfe des Enzyms Terpene selektiv funktionalisiert werden können (KAUP et al. 2007). Besonders effizient war dabei die Halohydroxylierung von Doppelbindungen in Monoterpenen bei Umsetzung des Terpens in Gegenwart von H_2O_2 und Halogenidionen. Versuche zur direkten enzymatischen Umsetzung der Triterpene mit CPO verliefen nicht erfolgreich. Möglicherweise hängt dies mit einer räumlichen Limitierung des aktiven Zentrums für langkettige Kohlenwasserstoffe zusammen (ZAKS und DODDS, 1995).

Tab. 1-9: Übersicht über die Ergebnisse der Biotransformationen (Quelle: Dechema)

Species	Stamm	Biotransformation Lyophilisat			Biotransf. wachsende Kultur		
		Betulin	Betulin-säure	Ursol-säure	Betulin	Betulin-säure	Ursol-säure
Pilzstämme:							
Acremonium chrysogenum	DSM 880	+	+	+	–	–	–
Acremonium diospyri	DSM 2939	+	–	–	–	–	–
Aspergillus niger	DSM 821	++	++	++	–	++	++
Botrytis cinerea	DSM 877	–	++	++	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*
Chaetomium globosum	DSM 1962	++	–	–	+/–	+/–	+/–
Colletotrichum graminicola	DSM 63127	–	+	–	–	–	++
Corynespora cassiicola	DSM 62475	–	–	–	–	–	–
Cunninghamella blakesleeana	DSM 1906	–	–	–	–	–	+
Cunninghamella echinulata	DSM 1905	++	–	–	+/–	+/–	+/–
Cunninghamella elegans	DSM 1908	–	–	–	+/–	+/–	+/–
Curvularia lunata	DSM 63137	++	++	++	+/–	+/–	+/–
Curvularia lunata	NRRL 2380	–	+	–	–	++	++
Diplodia gossypina	ATCC 10936	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*
Emericella nidulans	DSM 820	–	+	+/–	–	++	+/–
Fusarium ciliatum	DSM 879	+	++	+	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*
Fusarium fujikuroi	DSM 893	–	++	+	–	++	+
Mucor circinelloides	DSM 1173	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*
Mucor plumbeus	CBS 110.16	–	–	–	–	–	–
Penicillium chrysogenum	DSM 848	+/–	+/–	+/–	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*
Penicillium digitatum	DSM 62840	++	++	++	+/–	+/–	+/–
Penicillium italicum	DSM 62846	+	++	++	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*
Pleurotus sapidus	DSM 8266	–	+	–	–	+	+
Rhizopus nigricans (stolonifer)	DSM 907	++	++	+	–	–	–
Rhizopus oryzae (arrhizus)	DSM 906	–	–	–	–	–	–
Septomyxa affinis	DSM 3048	++	++	++	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*
Trichoderma longibrachiatum	DSM 769	+	++	++	+/–	+/–	+/–
Bakterienstämme:							
Arthrobacter simplex	DSM 20130	–	+	–	+/–	+/–	+/–
Bacillus fusiformis	DSM 2898	**++**	**++**	**++**	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*
Bacillus megaterium	ATCC 13368	–	–	–	+	++	++
Nocardia erythropolis	DSM 43066	–	–	–	+/–	+/–	+/–
Nocardia sp.	NRRL 5646	–	++	++	–	++	++
Pseudomonas putida	DSM 12264	++	+	++	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*
Streptomyces roseochromogens	DSM 40856	–	–	–	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*

++ eindeutiger Produktpeak; + kleine Peaks, Produkt möglich; +/- kein eindeutiges Ergebnis; – kein Produkt; *n.d.*: nicht durchgeführt

AP1-4.8 Literaturliste zu AP 1.5

Abraham. W-R., Stumpf, B. Kieslich, K. 1986: "Microbial transformations of terpenoids with 1-p-menthene skeleton". Appl Microbiol Biotechnol 24: 24 – 30.

Abraham. W-R. 1994: "Microbiol hydroxylation of Sclareol". Phytochem 36 (6): 1421 – 1424.

Aleu, J., Collado, I.G. 2001: "Biotransformations by *Botrytis* species". J Mol Catal B Enzym 13: 77 – 93.

Ata, A., Conci, L.J., Betteridge, J., Orhan, I., Sener, B. 2007 "Novel Microbial Transformations of Sclareolide". Chem Pharm Bull 55 (1) 118 – 123.

Bastos, D.Z.L. 2007: "Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi". Phytochemistry 68: 834 – 839.

Betts, R.E., Walters, D.E., Rosazza, J.P. 1974: "Microbial Transformations of Antitumor Compounds. 1. Conversion of Acronycine to 9-Hydroxyacronycine by *Cunninghamella echinulata*". J Medicine Chem 17 (6): 599 – 562.

Bowen, E.R. 1975: „Potential by-products from microbial transformation of D-limonene". Proc Florida State Horticultural Society 304 – 308.

Chatterjee, P., Kouzi, S. A., Pezzuto, J. M., Hamann, M. T. 2000: "Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368". Appl Environ Microbiol 66 (9): 3850 – 3855.

Chen, K-C., Wey, H-C. 1990: „11β-Hydroxylation of Cortexolone by *Curvularia lunata*". Enzyme Microb Technol 12: 305 – 308.

Chen, K-C., Wey, H-C. 1990: „Dissolution-enzyme kinetics of 11β-hydroxylation of cortexolone by *Curvularia lunata".* Enzyme Microb Technol 12: 616 – 621.

Chen, Y. Rosazza, J.P.N., Reese, C.P., Chang, H-Y., Nowakowski, M.A., Kiplinger, J.P. 1997: "Microbial models of soil metabolism: biotransformations of danofloxacin". J Ind Microbiol Biotechnol 19: 378 – 384.

Chen, Y. Rosazza, J.P.N. 1994: "Microbial Transformation of Ibuprofen by a *Nocardia* Species". Appl Environ Microbiol. 60 (4): 1292 – 1296.

Cheng, Z-H., Yu, B-Y., Cordell, G.A., Qiu, S-X. 2004: "Biotransformation of quinovic acid glycosides by microbes: Direct conversion of Oleanane triterpene skeleton by *Nocardia* sp. NRRL 5646". Org Lett 6 (18): 3163 – 3165.

Chien, M.M., Rosazza, J.P. 1979 : "Microbial transformations of natural antitumor agents. 9. O-Demethylation of 9-methoxyellipticine". J Nat Prod 42 (6): 643 – 647.

Clark, A.M., Hufford, C.D. 1979: "Microbial Transformations of the Sesquiterpene Lactone Costunolide". J Chem Soc Perkin Trans: 3022 – 3028.

Collins, D.O., Reese, P.B. 2001: "Biotransformation of Cedrol by *Curvularia lunata* ATCC 12017". Phytochem 56: 417 – 421.

Collins, D.O., Reynolds, W.F., Reese, P.B. 2002: "Aromadendrane transformations by *Curvularia lunata* ATCC 12017". Phytochem 60: 475 – 481.

Demyttenaere, J.C.R., Willemen, H.M. 1998: "Biotransformation of linalool to furanoid and pyranoid linalool oxides by *Aspergillus niger*". Phytochem 47 (6): 1029 – 1036.

Demyttenaere, J.C.R., del Carmen Herrera, M., De Kimpe, N. 2000: "Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp.". Phytochem 55: 363 – 373.

Demyttenaere, J.C.R., Belleghem, K.V., De Kimpe, N. 2001: "Biotransformation of R-(+)- and S-(-)-Liomonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening". Phytochem 57: 199 – 208.

de Oliveira, B.H., Bastos, D.Z., Pimentel, I.C. 2005: "Biotransformation of Betulinic and Betulonic acids by *Colletotrichum* sp.". Biotrans Symposium 2005, Netherlands. P. 255.

Duetz, W.A., Bouwmeester, H., van Beilen, J.B., Witholt, B. 2003: "Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants". Appl Microbiol Biotechnol 61:269 – 277.

El Sayed, K.A., Halim, A.F., Zaghloul, A.F., Dunbar, D.C., McChesney, J.D. 2000: "Transformation of jervine by *Cunninghamella elegans* ATCC 9245". Phytochem 55: 19 – 22.

Fraga, B.M., Gonzales, P., Hernandez, M.B., Suarez, S. 2005: "Biotransformation of 7-oxo-ent-kaur-16-ene derivatives by *Gibberella fujikuroi*". Tetrahedron 61 (23): 5623 – 5632.

Fried, J., Thoma, R.W., Gerke, J.R., Herz, J.E., Donin, M.N., Perlamn, D. 1952: "Oxidation of steroids by microorganisms. II. Hydroxylation in position 11 and synthesis of cortisone from Reichenstein´s compound S". 74: 3962 – 3963.

Fried, J., Principe, P.A. 1961: "6-α-Halo-11-α-Hydroxy Steroids of the Pregnane series and Esters thereof". U.S. Patent 3,004,047.

Guillermo, R., Hanson, J.R., Truneh, A. 1997: "Hydroxylation of Aromadendrane Derivatives by *Mucor plumbeus*". J Chem Research (S*)* 28 – 29.

Higl, B., Santivarangkna, C., Först, P. 2008: "Bewertung und Optimierung von Gefrier- und Vakuumtrocknungsverfahren in der Herstellung von mikrobiellen Starterkulturen". Chemie Ingenieur Technik 80 (8): 1157 – 1164.

Holland, H.L. 1981: "Microbial hydroxylation of steroids. 7. Hydroxylation of *B*-nortestosterone and related compounds by *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145, and 13C nuclear magnetic resonance spectra of some *B*-norsteroids". Can J Chem 59 (11): 1651 – 1655.

Holland, H.L., Lakshmaia, G. 1999: "Microbial hydroxylation of 2-oxatestosterone". J Mol Catal B: Enzym 6: 83 – 88.

Kaspera, R., Krings, U., Nanzad, T., Berger, R.G. 2005: "Bioconversion of (+)-valencene in submerged cultures of the ascomycete *Chaetomium globosum*". Appl Microbiol Biotechnol 67: 477 – 483.

Kaup, B-A. Piantini, U., Wuest, M., Schrader, J. 2007: "Monoterpenes as novel substrates for oxidation and halo-hydroxylation with chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*". Appl Microbiol Biotechnol 73 (5): 1087 – 1096.

Kieslich, K., Smith, L.L. (Rehm, H-J., Reed, G.) 1984: "Biotechnology: Volume 6a Biotransformations". Weinheim, Basel Verlag Chemie. ISBN 3-527-25768-3.

Kieslich, K., Abraham, W.R., Stumpf, B., Thede, B., Washausen, P. 1986: "Transformation of terpenoids. Progress in essential oil research". de Gruyter, Berlin, Seite 367 – 394.

Kieslich, K. 1997: "Biotransformations" in Fungal Biotechnology Anke, T 1997. London, Chapman & Hall, ISBN 3-8261-0090-5. Seite 297 – 362.

Kouzi, S.A., McChesney, J.D. 1990: "197. Microbial Metabolism of the Diterpene Sclareol: Oxidation of the A ring by *Septomyxa affinis*". Helvetica Chimica Acta 73: 2157 – 2164.

Kouzi, S.A., Chatterjee, P., Pezzuto, J.M., Hamann, M.T. 2000: "Microbial Transformations of the antimelanoma agent Betulinic Acid". J Nat Prod 63 (12): 1653 – 1657.

Lanisnik, T., Zakelj-Mavric, M., Belic, I. 1992: "Fungal 17β-hydroxysteroid dehydrogenase". FEMS Microbiol Lett 78 (1): 49 – 52.

Larsson, P.O., Mosbach, K.H., Ohlson, S.A. 1978: "Antibiotic and steroid transformation process". US Patent 4246346.

Li, Y.; Lu, F.; Sun, T.; Du, L. 2007: "Expression of ksdD gene encoding 3-ketosteroid-DELTA1-dehydrogenase from *Arthrobacter simplex* in *Bacillus subtilis*". *Lett. Appl. Microbiol.* 44: 563 - 568.

Llanes, N., Pendas, J., Falero, A., Perez, C., Hung, B.R., Moreira, T. 2002: "Conversion of liposomal 4-androsten-3,17-dione by *A. simplex* immobilized cells in calcium pectate". J Steroid Biochem Mol Biol 80: 131 – 133.

Maatooq, G.T. 2002: "Microbial Conversion of Partheniol by *Calonectria decora*". Zeitung für Naturforschung 57c, 680 – 685.

Mahato, S. B., Garai, S. 1997: "Advances in microbial steroid biotransformation". Steroids 62 (4): 332 –345.

Malonek, S., Rojas, M.C., Hedden, P., Gaskin, P., Hopkins, P., Tudzynski, B. 2004: "The NADPH-cytochrome P450 Reductase Gene from *Gibberella fujikuroi* is essential for Gibberellin Biosynthesis". J Biol Chem 279 (11): 25075 – 25084.

Manosroi, J., Saowakhon, S., Manosroi, A. 2007: "A novel one-step biotransformation of Cortexolone-21-acetate to hydrocortison acetate using *Cunninghamella blakesleeana* ATCC 8688a". Enzyme Microbiol Technol 41 (3): 322 – 325.

Mars, .A.E., Gorissen, J.P.L., van den Beld, I., Eggink, G. 2001: "Bioconversion of limonene to increased concentrations of perillic acid by *Pseudomonas putida* GS1 in a fed-batch reactor". Appl Microbiol Biotechnol 56:101 – 107.

Maddox, I.S., Dunnill, P., Lilly, M.D. 1981: "Use of immobilized cells of *Rhizopus nigricans* for the 11α-hydroxylation of progesterone". Biotechnol Bioeng 23 (2): 345 – 354.

Mirata, M.A., Heerd, D., Schrader, J. 2009: „Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillic acid with *Pseudomonas putida* DSM 12264". Process Biochem 44: 764 – 771.

Montes, M.C., Magana, I. 1991: "Delta-dehydrogenation of steroids by *Arthrobacter simplex* immobilized in calcium polygalacturonate beads". J Ind Microbiol 8 (4): 259 – 264.

Müller, M., Dirlam, K., Wenk, H.H., Berger, R.G., Krings, U., Kaspera, R. 2005: „Verfahren zur Herstellung von aromaaktiven Terpenen". Internationales Patent WO 2005/078110 A1.

Otten, S.L., Rosazza, J.P. 1981: "Microbial transformations of natural antitumor agents: 17. Conversions of lapachol by *Cunninghamella echinulata*". J Nat Prod 44: 562 – 568.

Otten, S., Rosazza, J.P. 1978: "Microbial transformations of natural antitumor agents: Oxidation of Lapachol by *Penicillium notatum*". Appl Environ Microbiol 35 (3): 554 – 557.

Plourde, R., El-Tayeb, O.M., Hafez-Zedan, H. 1972: "Reduction of the 20-Carbonyl Group of C-21 Steroids by Spores of *Fusarium solani* and other Microorganisms". Appl Microbiol 23 (3): 601 – 612.

Reese, P.B. 2001: "Biotransformations of Terpenes and Steroids by Fungi". Nat Prod 71–76.

Sariaslani, S.F.; Rosazza, J.P. 1983: „Microbial transformations of natural antitumor agents: products of rotenone and dihydrorotenone transformation by *Cunninghamella blakesleeana*". Appl Environ Microbiol 45: 616 – 621.

Singh, K., Sehgal, S.N., Vezina, C. 1968: "Large-scale transformation of steroids by fungal spores". Appl Microbiol. 16 (2): 393 – 400.

Smith, R.V., Davis, P.J. 1978: "Regiospecific Synthesis of Isoapocodeine from 10,11-Dimethoxyaporphine by using *Cunninghamella elegans*". Appl Environ Microbiol 35 (4): 738 – 742.

Smith, L.L. 1984: "Steroids" Book Chapter 2 : 32 – 78. University of Texas Medical Branch.

Sonomoto, K., Nomura, K., Tanaka, A., Fukui, S. 1982: "11α-Hydroxylation of progesterone by gel-entrapped living *Rhizopus stolonifer* mycelia". Eur J Appl Microbiol Biotechnol 16: 57 – 62.

Sonomoto, K., Mozammel Hoq, M., Tanaka, A., Fukui, S. 1983: "11β-Hydroxylation of Cortexolone (Reichstein Compound S) to Hydrocortisone by *Curvularia lunata* Entrapped in Photo-Cross-Linked Resin Gels". Appl Environ Microbiol. 45 (2): 436 – 443.

Zaks A, Dodds DR. 1995: "Chloroperoxidase-catalyzed asymmetric oxidations: Substrate specificity and mechanistic study". J Am Chem Soc 117: 10419 – 10424.

Zhang, J., Cheng, Z. H., Yu, B.Y., Cordell, G.A., Qiu, S.X. 2005: "Novel biotransformation of pentacyclic triterpenoid acids by *Nocardia* sp. NRRL 5646". Tetrahedron Letters 46: 2337 – 2340.

Zhao, G., Yan, W., Cao, D. 2007: "Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC". Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 43: 959 – 962.

Znidarsic, P. Komel, R., Pavko, A. 1998: „Studies of a pelleted growth form of *Rhizopus nigricans* as a biocatalyst for progesterone 11α-hydroxylation". J Biotechnol. 60: 207 – 216.

Zuidweg, M.H.J., Van der Waard, W.F., De Flines, J. 1962: "Formation of hydrocortisone by hydroxylation of Reichstein's Compound S with an enzyme preparation from *Curvularia lunata*". Biochim Biophys Acta 58: 131 – 133.

AP1-5 Fazit

Der **Meilenstein 1** *„Optimale Extraktionsbedingungen im diskontinuierlichen Maßstab ermittelt und Extrakte gescreent“* konnte erreicht werden.

Es lässt sich abschließend zusammenfassen:

- Die Anwendung unterschiedlichster technischer Extraktionsmethoden hat gezeigt, dass die Gehalte an Triterpenen in Buchen- und Pappelextrakten für eine wirtschaftliche Betrachtung letztendlich zu gering sind.
- Die Eignung Ionischer Flüssigkeiten zur Extraktion von Triterpenen konnte ebenfalls gezeigt werden. Allerdings befindet sich das Arbeitsgebiet aber noch im Bereich der Grundlagenforschung.

Der **Meilenstein 2** *„Anwendungstechnische Untersuchungen inkl. biokatalytische Funktionalisierungsversuche abgeschlossen“* wurde zum Projektende erreicht.

- Zur biokatalytischen Funktionalisierung von Triterpenen wurde eine Analytik etabliert
- Auf Basis einer umfangreichen Literaturrecherche wurde eine Organismen-Stammsammlung angelegt.
- Mit verschiedenen Pilz- und Bakterienstämmen konnten Funktionalisierungen von Modelltripernen erreicht werden. Eine Charakterisierung der Produkte ist noch in Bearbeitung.

Da Triterpene aus Extrakten nicht als zusätzliche Wertschöpfung für das Konzept der Lignocellulose-Bioraffinerie gewonnen werden können, wurde eine Wirtschaftlichkeitsbetrachtung im Rahmen des AP 4 für ein Extraktionsverfahren nicht durchgeführt.

AP2: Aufschluss und Komponententrennung von Buche und Pappel: Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

AP2-1 Aufschluss von Buche und Pappel (AP 2.1)

AP 2.1 zielte auf die Untersuchung des Einflusses der Parameter Druck (p), Temperatur (T), Konzentration (c) und Verweilzeit (τ), zur Gewährleistung einer vollständigen Gewinnung der Buchen- und Pappelholzkomponenten Cellulose, Hemicellulosen, Lignin und Extraktstoffe. Diese Untersuchungen wurden sowohl im diskontinuierlichen als auch im kontinuierlichen Betrieb durchgeführt.

AP2-1.1 Untersuchungen zur Zerkleinerung von Buchenholz und Buchenrinde (ICT, BTS)

Aus vTI-Sicht ist eine Zerkleinerung der industriell hergestellten Hackschnitzel für die Organosolv-Kochung nicht notwendig. Für das Lösen der Hackschnitzel in ionischen Flüssigkeiten und der Einförderung in der Technikumsanlage ist allerdings eine Nachzerkleinerung unverzichtbar. Hierfür wurden verschiedene Aggregate getestet und ausgewertet. Zum Einsatz kamen eine Kolloidmühle und ein Hochdruckhomogenisator. Vor dieser Feinzerkleinerung wurden die Materialien in einer Schneidmühle trocken auf eine Korngröße < 2 mm vorzerkleinert. Ein Teil dieser Materialproben wurde an beteiligte Partner des AP 2 versendet.

Die Nasszerkleinerungsuntersuchungen mittels Kolloidmühle haben gezeigt, dass mindestens eine Behandlungszeit von 10 Minuten für eine signifikante Zerkleinerung notwendig ist. Während der Kreisfahrweise wurde die Spaltbreite zwischen Rotor und Stator von anfänglich 4 mm bis auf 0,5 mm reduziert. In Abb. 2-1 ist das Ausgangsmaterial, welches durch Klassierung (Sieb: 2 mm) gewonnen wurde, sowie die Proben nach 10, 20 und 30 min Behandlungszeit in einer Durchlichtaufnahme mit polarisiertem Licht gezeigt.

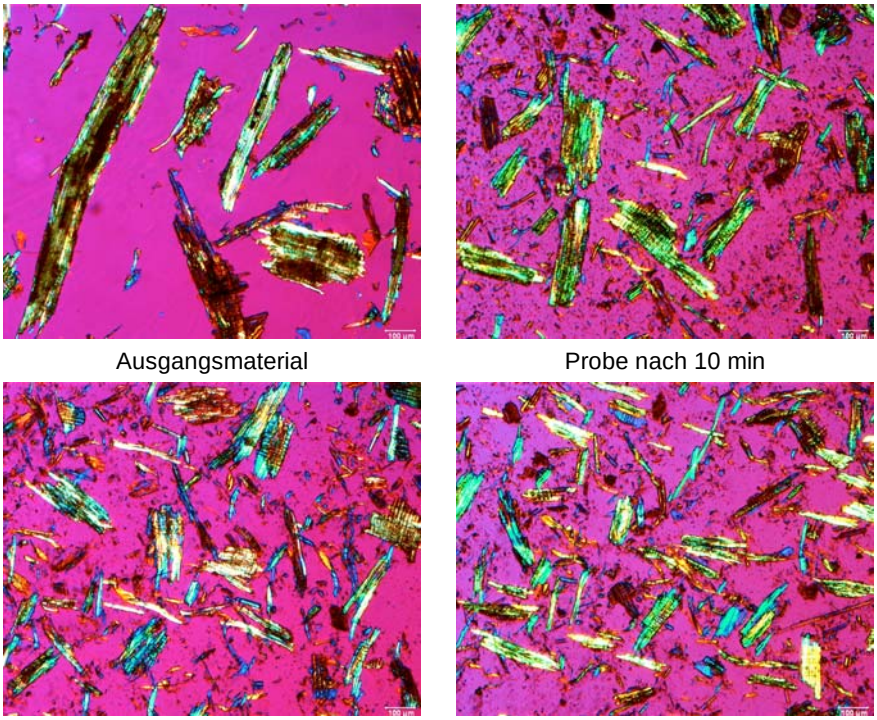


Abb. 2-1: Vergleich des Ausgangsmaterials und der Proben aus der Kolloidmühle (Quelle: ICT)

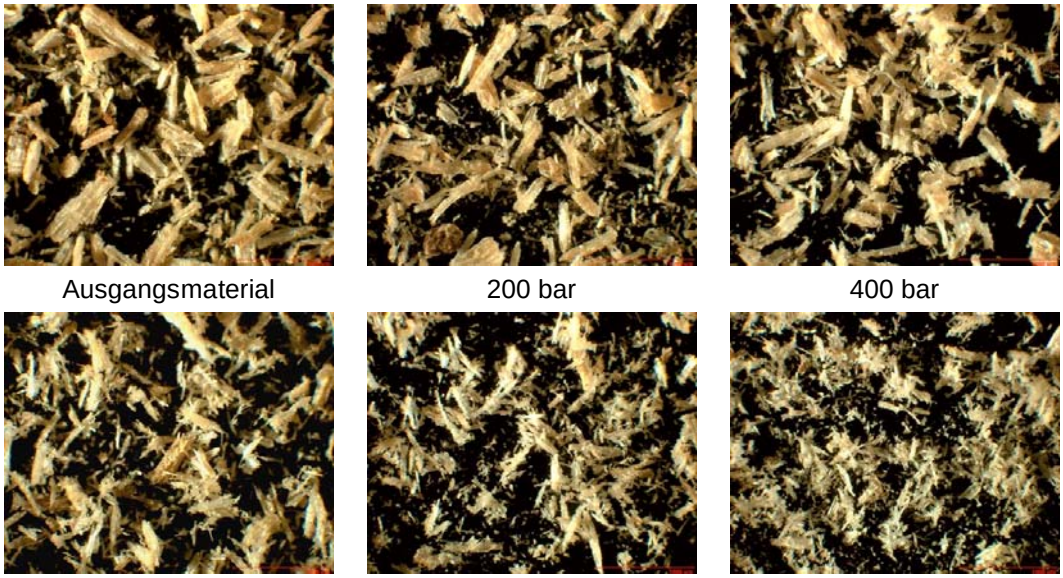


Abb. 2-2: Vergleich des Ausgangsmaterials und der Proben aus dem Hochdruck-Homogenisator (Auflichtmikroskopieaufnahmen) (Quelle: ICT)

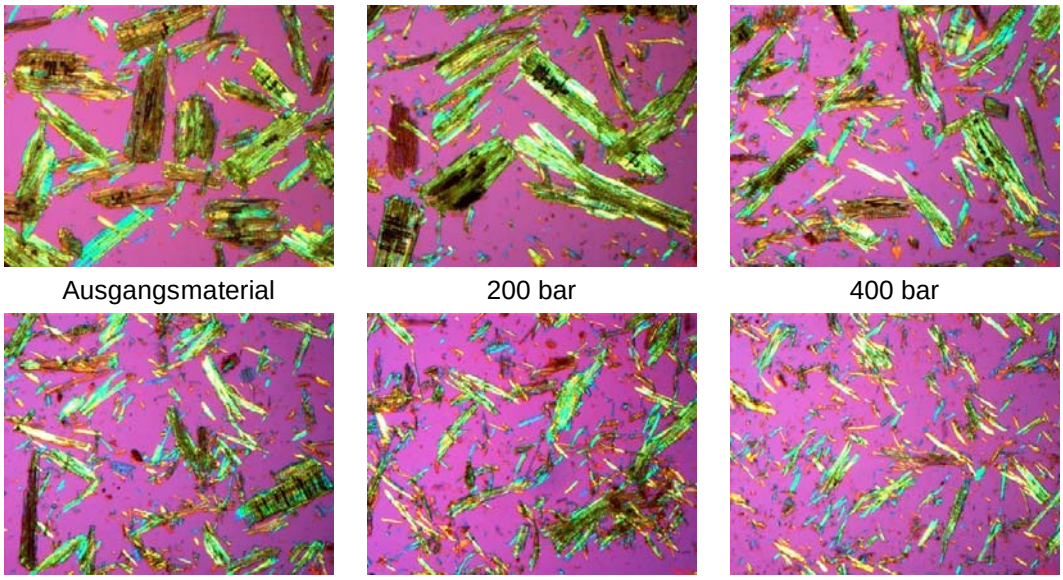


Abb. 2-3: Vergleich des Ausgangsmaterials und der Proben aus dem Hochdruck-Homogenisator (Durchlichtmikroskopieaufnahmen mit polarisiertem Licht) (Quelle: ICT)

Die Erwartung, dass auch unter Organosolv-Bedingungen mit steigendem Aufschlussdruck eine bessere Zerfaserung des Materials auftritt, ist deutlich zu erkennen. Die Hohlräume zwischen den Fasern im Holz werden durch den hohen Druck stark komprimiert. Wird dieser hohe Innendruck dann schlagartig entfernt, reißt das Material entlang der Fasern auf, da es nicht so schnell auf diese Änderung reagieren kann. Die wirtschaftliche Betrachtung (s. Kapitel AP 3) ergab jedoch, dass der Energieaufwand für solch eine Feinzerkleinerung sehr hoch ist. Dennoch muss sich in

Experimenten noch zeigen, ob ein derartig zerkleinertes Material die Extraktions- bzw. Aufschlusszeit so stark reduziert, dass dadurch eine Wirtschaftlichkeit erreicht werden kann.

AP2-1.2 Ermittlung der optimalen Aufschlussbedingungen von Buche und Pappel unter Verwendung niedrig siedender Alkohole und ionischer Flüssigkeiten im diskontinuierlichen Betrieb (bis 1 kg Maßstab) (AP 2.1.1)

AP2-1.2.1 Aufschluss entrindeter Hackschnitzel im System Ethanol:Wasser (vTI-HTB, ICT)

In einem ersten experimentellen Plan wurde Buchenholz im Temperaturbereich 170 °C, 180 °C, 190 °C über 1, 3 und 5 Stunden und einem Flottenverhältnis von 12:1, 9:1 und 6:1 aufgeschlossen (18 Experimente). Es wurden die Ausbeute an Faserstoff, der Ligningehalt im Faserstoff und die Zugänglichkeit für Enzyme des Cellulase-Systems gegenüber dem Faserstoff bestimmt. Naturgemäß nahm die Faserstoffausbeute mit zunehmender Aufschlußzeit und erhöhter Temperatur ab, wobei die Ergebnisse durch Veränderungen im Flottenverhältnis unberührt blieben. Optimale Bedingungen bezüglich der Zuckerausbeute durch enzymatische Hydrolyse des Faserstoffs (29,4 % Zucker, bez. auf Holz) wurden nach 4-stündigem Aufschluss bei 190 °C erhalten. Die Faserstoffausbeute nach Aufschluss lag dabei bei 57,9 %. Der Ligningehalt im Faserstoff lag bei 10,7 %. Die enzymatische Zugänglichkeit war in diesem Versuchsblock stark vom Ligningehalt im Faserstoff abhängig: Mit sinkenden Ligningehalt stieg die Verzuckerungsrate.

In einem 2. Versuchsblock im Temperaturbereich zwischen 170 °C und 190 °C sowie einer Aufschlusszeit zwischen 1 und 5 Stunden wurde auch mit Zugabe von 0,65 % und 1,3 % Schwefelsäure gearbeitet, um den Aufschluss zu forcieren. Es wurden 21 Aufschlussexperimente durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die zuvor ermittelte Korrelation zwischen Ligningehalt im Faserstoff und Hydrolyserate nicht mehr bestand. Das Ziel einer maximalen Hydrolyserate bei minimalem Ligningehalt im Faserstoff (32,2 % Zucker (bez. auf Holz) bei einem Ligningehalt von 10,3 % im Faserstoff) wurde bei einer Aufschlusstemperatur von 172 °C, einer Aufschlussdauer von 2,98 h sowie einer Schwefelsäurezugabe von 0,96 %, bezogen auf Holz erreicht. Gleichzeitig konnte herausgearbeitet werden, dass im Versuchsrahmen ähnliche Ergebnisse bezüglich der Delignifizierung und der enzymatischen Hydrolyserate auf verschiedenen Wegen erreicht werden können (Abb. 2-4). Bei niedrigen Temperaturen kann mit kurzen Reaktionszeiten und hohen Schwefelsäureeinsatzmengen gearbeitet werden. Bei Erhöhung der Temperatur wird die Reaktionszeit verlängert und dafür die Schwefelsäuremenge reduziert. Dies ist sicher darauf zurückzuführen, dass bei hohen Reaktionszeiten durch hohe Schwefelsäuredosierungen Hydrolyseverluste auftreten.

Als weiterer Parameter wurde eine Variation des Ethanol:Wasser-Verhältnisses untersucht. Es zeigte sich aber, dass das in der Literatur als vorteilhaft beschriebene Verhältnis von 1:1 besonders günstig ist. Es wurden weiterhin Versuche zum Zusatz von Salzen nach dem NAEM-Verfahren[1] durchgeführt (YAWALATA und PASZNER 2006). Die Aufschlussergebnisse und Verzuckerungsraten waren positiv zu beurteilen. Der Zusatz von 2,8 % $CaCl_2$ und 6,4 % $(MgNO_3)_2 \times 6\ H_2O$ bzg. auf Holz wurde aber als zu hoch eingeschätzt, um wirtschaftlich zu arbeiten. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

[1] NAEM - *neutral alkali-earth metal*

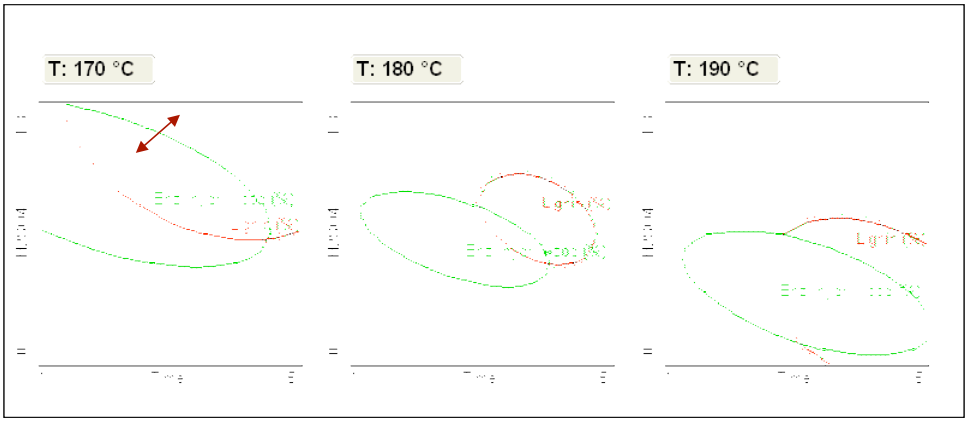


Abb. 2-4: Einfluss der Schwefelsäurekonzentration und der Reaktionszeit auf enzymatische Hydrolyseausbeute und Ligningehalt des Faserstoffs im Temperaturbereich 170-190°C. (Quelle: vTI)
Weiße Fläche: Enzymatische Hydrolyse / Holz > 31 %, Rote Kontur: Lignin im Faserstoff < 11 %

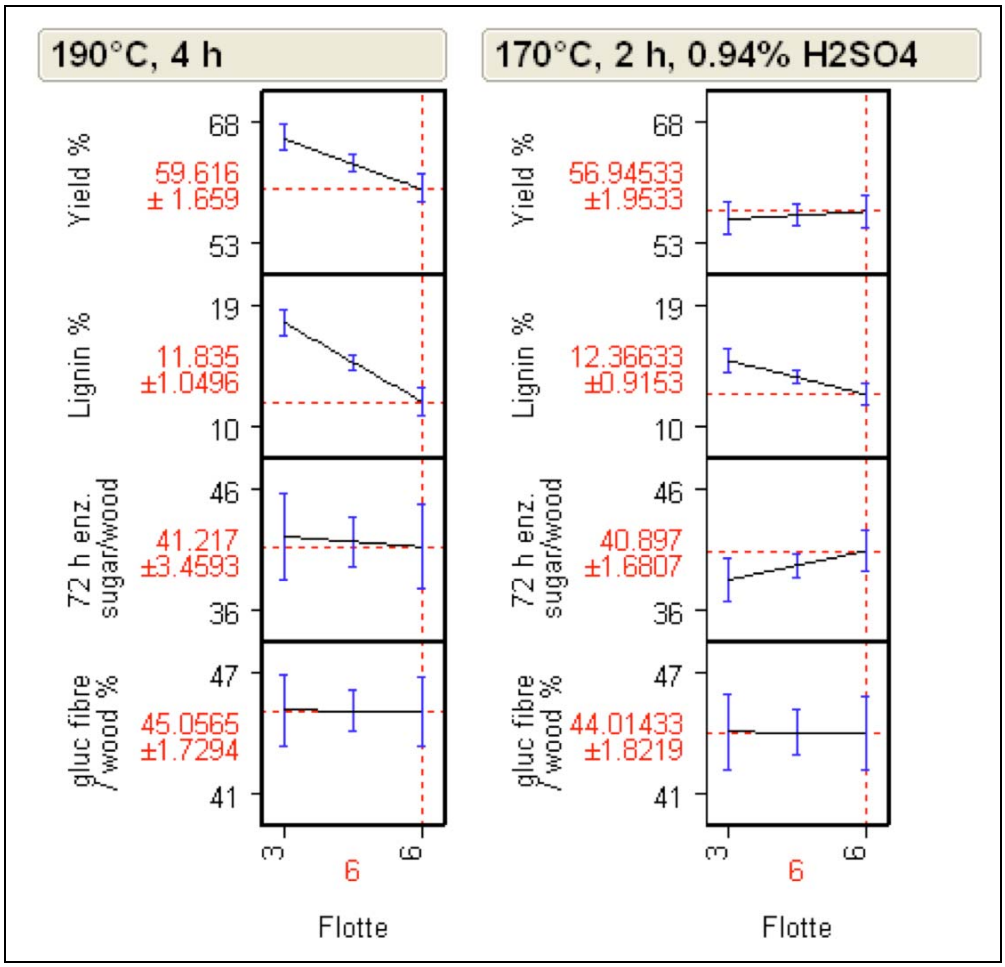


Abb. 2-5: Auswirkung der Flottenreduzierung auf Ausbeute, Ligningehalt im Faserstoff und Verzuckerbarkeit unter den als optimal erarbeiteten Aufschlussbedingungen 190°C, 4 h, sowie 170°C, 2h, 0,94% Schwefelsäurezugabe (Rote Zahlen: Daten bei Flotte 6:1) (Quelle: vTI)

Die vorgehend beschriebenen Versuche wurden zumeist mit einem Flottenverhältnis von 1:6 in 1-l-Autoklaven erzielt. Die Wirtschaftlichkeitsberechnung ergab allerdings, dass eine weitere Reduzierung der Flotte eine wesentliche Voraussetzung für ein ökonomisch erfolgreiches Verfahren ist.

In einem 3. Versuchsblock wurde daher untersucht, wieweit das Flottenverhältnis reduziert werden könnte. Dafür wurden die optimalen Bedingungen für Versuche mit Zugabe von Schwefelsäure (170 °C, 2 h, 0,94 % H_2SO_4; 12 Versuche) und ohne Zugabe von Schwefelsäure (190 °C, 4 h; 8 Versuche) gewählt. Während sich beim Flottenverhältnis von 6:1 beide Aufschlusssysteme (mit und ohne Katalysator) ähnlich verhielten, war beim Flottenverhältnis 3:1 ein unterschiedliches Verhalten zu beobachten. Dies betraf vornehmlich die Faserstoffdaten, die sich mit sinkendem Flottenverhältnis im System 190 °C, 4 h stärker änderten als im System unter Zugabe von Schwefelsäure (Abb. 2-5). Bei der Aufschlussvariante 170 °C, 2 h, 0,94 % Schwefelsäure verringerte sich die Verzuckerungsausbeute um 2,4 %, wenn das Flottenverhältnis auf 3:1 verringert wurde.

In einem weiteren Versuchsblock wurden die für beide Systeme als optimal erarbeiteten Bedingungen im 10-l-Kocher (1 kg Holz) wiederholt. Der erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 2-1 zusammengefasst.

Tab. 2-1: Upscaling des Aufschlusses zur Reduzierung des Flottenverhältnisses von 6:1 auf 3:1 im 10-l-Kocher für beide Systeme (mit und ohne Katalysator)

Flotte	Faserstoff-ausbeute [%]	Lignin im Faserstoff [%]	Σ Kohlenhydrate durch enzym. Hydrolyse [%]	Glucose im Faserstoff/Rohstoff Buche [%]
		180°C, 4 h, ohne Schwefelsäure		
6:1 (n=5)	57,2 (± 1,8)	11,2 (± 0,8)	39,2	43,9 (± 0,5)
3:1	56,5	12,1	43,1	43,0
		170°C, 2h, 0,94% Schwefelsäure		
6:1	57,7	11,9	40,8	45,2
3:1	59,4	13,0	43,0	45,9

Im Vergleich der Daten stellt sich heraus, dass sich durch die Reduzierung des Flottenverhältnisses von 6:1 auf 3:1 die Faserausbeute um Werte zwischen 0,8 % und 1,6 % erhöht, was auf die leicht reduzierte Mobilisierung des Lignins aus den Hackschnitzeln bei verringerter Flotte erklärt werden kann. Der erhöhte Ligningehalt im Faserstoff wirkt sich nicht ungünstig auf die enzymatische Verzuckerung aus.

Offensichtlich bewirkt die Umwälzpumpe des 10-l-Autoklaven eine effektivere Delignifizierung auch bei verringerten Lösungsmittelmengen als es die einfache Rotation im Drehkocher erzielen könnte.

Am ICT waren diskontinuierliche Organosolv-Aufschlüsse auch oberhalb 190 °C möglich. Gleichzeitig fand dort ein Scale-Up von einem 1-l-Reaktor auf einen 13-l-Reaktor statt. Folgende Aufschlussparameter erwiesen sich als optimal: Temperatur 220 °C, Aufschlussdauer 3 h, Ethanol/ H_2O-Verhältnis von 50/50 mit einem Flottenverhältnis von 1:4 (Holz:LM).

Am Fraunhofer ICT wurden in der zweiten Projekthälfte Löslichkeitsuntersuchungen von zuvor selbst präpariertem Organosolv-Buchenholzlignin in Wasser/Ethanol-Gemischen, sowie in Aceton:Wasser (1:1) und in Methanol:Wasser (1:1) unter Aufschlussbedingungen (T=190°C /

Sattdampfdruck) durchgeführt. Mit diesen Experimenten sollte die maximale Löslichkeit von Lignin im Aufschlussmittel geklärt und dadurch das minimale Flottenverhältnis beim Aufschluss ermittelt werden. Die Ergebnisse zeigt Tab. 2-2.

Tab. 2-2: Ergebnisse der Löslichkeitsuntersuchungen unter Aufschlussbedingungen (Quelle: ICT)

org. LM	Anteil org. LM [%]	Wasser [%]	lösl. Lignin [g/kg LM-Gemisch]
Ethanol	20	80	–
	40	60	41
	60	40	90
	80	20	~ 130
	100	0	26
Aceton	50	50	124
Methanol	50	50	31

Das System Ethanol:Wasser besitzt bei einem Mischungsverhältnis von 80:20 eine maximale Löslichkeit für das eingesetzte Lignin. Dennoch ist ein Verhältnis von 50:50 bei einem Flottenverhältnis von 1:4 von eingesetztem Holz zu Aufschlussmittel ausreichend, um alles in der Lignocellulose enthaltene Lignin zu solvatisieren.

Eine Mischung aus Aceton:Wasser besitzt zwar eine höheres Lösungsvermögen, da aber die Ligninfällung schlechter ist und die Kosten höher sind (ein Mindestflottenverhältnis muss eingehalten werden, da ansonsten eine Rührung des Gemisches Biomasse und Aufschlussmittel nicht möglich ist) als bei Aufschlüssen mit Ethanol:Wasser, wurde auf ein Arbeiten mit Aceton verzichtet.

Das Lösungsvermögen einer Methanol:Wasser-Mischung 1:1 scheint nicht ausreichend zu sein um bei gleichem Flottenverhältnis dieselbe Delignifizierungseffektivität zu erreichen, wie mit Ethanol:Wasser-Mischungen.

AP2-1.2.2 Aufschluss von Hackschnitzeln und Rinde im System Ethanol:Wasser=1:1 (vTI-HTB)

In einem 4. Versuchsblock wurde der Einfluss von Rinde auf das Aufschlussergebniss erarbeitet. Kenntnisse zum Einfluss der Rinde sind insofern notwendig, falls auf eine Entrindung der Hackschnitzel verzichtet werden muss. Mit verringerter Astdicke erhöht sich der Rindenanteil. Entsprechend wurde den in den ersten drei Versuchblöcken verwendeten Buchenhackschnitzel 12,5 % und 25 % Buchenrinde zugesetzt (Tab. 2-3)

Tab. 2-3: Versuchsplan zum Einfluss der Rinde (n=22)

Rohstoffe:

- Buchenholzhackschnitzel
- Zusatz von 12,5 % & 25 % Buchenrinde
- Extraktion der Buchenholzrinde
  - nicht extrahiert: Faktorstufe 0
  - extrahiert: Faktorstufe 1

Reaktionsparameter:

- Zeit: 1, 3, 5 h
- Temperatur: 170, 180, 190 °C
- H_2SO_4: 0 %, 0,65 %, 1,3 % (bzg. Holz)

Flotte konstant 1:6, wegen der besseren Handhabung und höheren Genauigkeit

Faserstoffanalyse:

- Faserstoffausbeute:
  Lignin im Faserstoff / Faserstoff (w/w)

Enzymatische Reaktivität 72 h:

- Σ KH enz. Hydr./Rohstoff % (w/w)

Abschätzung der Celluloseverluste:

- Glucose im Faserstoff/Rohstoff (%) berechnet aus Ausbeute und Zusammensetzung des Faserstoffs % (w/w)

Um den Einfluss einer möglichen Vorextraktion der Hackschnitzel in Rinde zu simulieren, wurde vergleichend auch vorextrahierte Buchenrinde eingesetzt. Die Aufschlussparameter waren mit denen der vorherigen Versuchsblöcke identisch. Wegen der besseren Handhabung und höheren Genauigkeit wurde mit einem Flottenverhältnis von 1:6 gearbeitet. Aus der Zusammensetzung von Buchenholz und Buchenrinde (siehe Tab. 1-1, S. 5) wurde rechnerisch der Einfluss der Rinde auf die Zusammensetzung des Aufschlussmaterials ermittelt (Tab. 2-4).

Tab. 2-4: Einfluss der Rinde auf die Rohstoffzusammensetzung

Rohstoff	Rinden-zusammensetzung	Glucose [%]	Σ Kohlenhydr. [%]	"Lignin" [%]
Holz	0	42,2	63,7	22,5
Rinde	100	18,3	35,3	"40,4"
Mischung	12,5	39,2	60,2	24,7
Mischung	25	36,2	56,6	27,0
Δ ± % rel.	25	-14	-11	+20

Die Rinde zeichnet sich ja im Vergleich zum Holz durch einen auf 35,3 % erheblich verringerten Kohlenhydratanteil aus, während der "Ligninanteil" nahezu verdoppelt wurde. Der mit 40,4 % ermittelte Ligninanteil der Rinde wurde gravimetrisch als Hydrolyserückstand ermittelt und setzt sich aus dem tatsächlichen Ligningehalt und den unter sauren Bedingungen kondensierten Holzinhaltsstoffen zusammen. Entsprechend muss bei einer Verwendung von Hackschnitzeln in Rinde z.B. bei einem Rindenanteil von 25 % mit Kohlenhydrateinbußen von 11 % sowie einer scheinbaren Zunahme des Ligninanteils von 20 % gerechnet werden.

Folgende optimierte Reaktionsparameter wurden ermittelt (Abb. 2-6):

- Aufschlusstemperatur 172 °C
- Aufschlusszeit 2,5 Stunden
- Katalysator 0,74 % Schwefelsäure
- Keine Rinde und keine Vorextraktion

Auch bei Vorgabe eines maximalen Rindenzusatzes wäre keine Rinden-Vorextraktion erforderlich. In Tab. 2-5 sind die Auswirkungen eines Rindenzusatzes auf den Restligningehalt im Faserstoff, die Faserstoffausbeute und die Glucose-Ausbeute nach enzymatischer Hydrolyse zusammengetragen (Aufschluss im 10-l-Kocher).

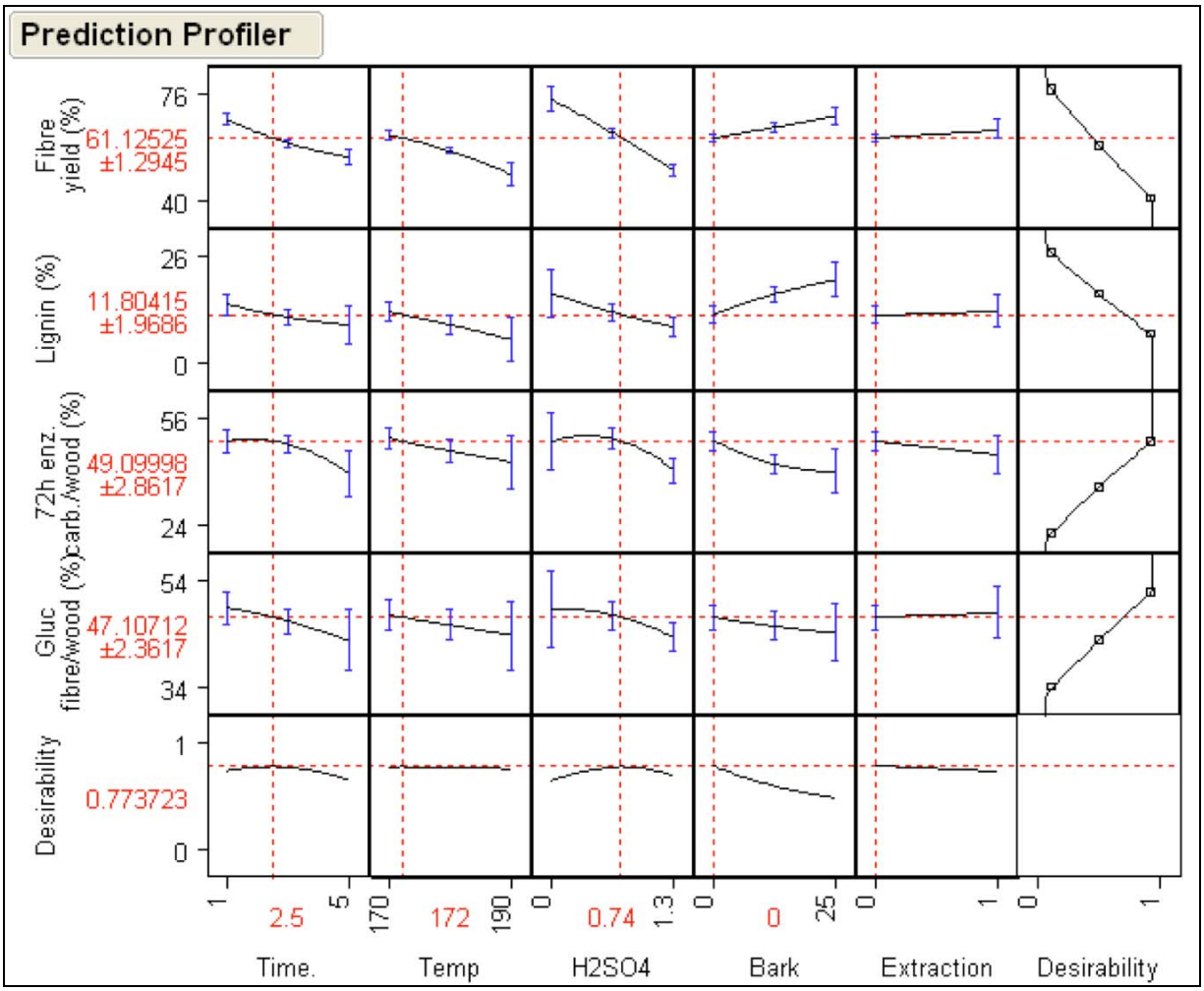


Abb. 2-6: Optimierung der Reaktionsparameter mit der Vorgabe einer optimalen enzymatischen Hydrolyse und Ligningewinnung (minimierter Ligningehalt im Faserstoff) (Quelle: vTI)

Der Zusatz von Rinde erhöht den Hydrolyserückstand im Faserstoff von 11,8 % auf 16,7 % (bei 12,5 % Rindenzusatz) und auf 20,1 % bei 25 % Rindenzusatz. Entsprechend erhöht sich natürlich auch die Faserstoffausbeute. Die Summe der durch enzymatische Hydrolyse erhaltenen Monosacharide sinkt von 49,1 % auf 42,1 % (12,5 % Rindenzusatz) und weiter auf 40,1 %, wenn 25 % Rinde zugesetzt wurde. Ein Rindenzusatz von 25 % verändert "Ligningehalt", Faserstoffausbeute und Monosacharidausbeute nach enzymatischer Verzuckerung um ähnliche absolute %-Werte

zwischen ~7,5 % und 9 %. In relativen %-Werten nehmen sich diese Verschiebungen sehr viel drastischer aus.

Es kann zusammenfassend gefolgert werden, dass der Zusatz von Rinde bei der Organosolv-Kochung möglich ist. Es treten kaum Veränderungen der erforderlichen Reaktionsparameter auf. Eine Vorextraktion des Materials ist nicht zwingend erforderlich und sollte nur dann erfolgen, wenn die Extraktstoffe wertschöpfend Verwendung finden können. Es muss allerdings bei Rindenzusatz eine verringerte Raum-Zeitausbeute an Zuckern akzeptiert werden. Ob sich in Gegenwart von Rinde bei leicht erhöhter Ligninausbeute die Ligninqualität erhalten lässt, wie sie beim Aufschluss von entrindetem Holz erzielt wurde, bedarf weiterer Untersuchungen.

Tab. 2-5: Einfluss der Rinde auf das Aufschlussergebnis in der Bioraffinerie (Quelle: vTI)
(Aufschluss bei 172 °C über 2,5h; 0,74% Schwefelsäure, keine Rindenvorextraktion)

Rohstoff	**Rinde [%]**	**"Lignin" [%]**	**Σ KH [%]**	**Glucose [%]**
Δ± % abs.	25	+ 4,5	- 7,1	- 6,0
Δ± % rel.	25	+ 20	-11	- 14
Bioraffinerie		**Lignin/ Faserstoff [%]**	**Faserstoff-Ausbeute [%]**	**Σ Monosacch. enzym. Hydrol.**
Faserstoff + enzym. Hydrol.	0	11,8	61,1	49,1
	12,5	16,7	64,7	42,3
	25	20,1	68,5	40,1
Δ± % abs.	25	+ 8,3	+ 7,4	- 9,0
Δ± % rel.	25	+ 70	+ 12	- 18

AP2-1.2.3 Organosolv-Aufschluss unter Zusatz ionischer Flüssigkeiten (vTI)

Es wurden keine Organosolv-Aufschlüsse unter Zusatz ionischer Flüssigkeiten durchgeführt, da nach Auskunft von Solvent Innovention keine ILs hoher Temperaturbelastbarkeit zur Verfügung standen, die gleichzeitig Holzkomponenten in Lösung bringen. Zusätzlich ist im Berichtszeitraum bekannt geworden (EBNER et al. 2008), dass ILs mit 1-alkyl-3-methyl-imidazolium-Kationen mit dem C-2 der Cellulose an ihren reduzierenden Ende reagieren, in dem sie C-C-Bindungen bilden. Entsprechend verhalten sich beide, Cellulose und ILs, nicht inert.

AP2-1.2.4 Aufschluss unter ausschließlicher Verwendung ionischer Flüssigkeiten (Solvent Innovation)

Die Untersuchungen zum Lösen von Buchenholz und Buchenrinde unter Verwendung ionischer Flüssigkeiten (IL) wurden in einfachen temperierbaren Rührgefäßen durchgeführt. Für diese Versuche wurden die Hackschnitzel auf eine kleinere Partikelgröße (3 – 5 mm) gemahlen. In der Korngröße von 1 – 2 mm wurden Buchenholzspäne und Buchenrinde durch ICT zur Verfügung gestellt. Diese wurden mit verschiedenen ILs versetzt, um diejenige zu bestimmen, die das größte Lösungspotential aufweisen. Mit dieser sollen dann anschließend die weiteren Prozessparameter angepasst werden.

Aus zahlreichen Vorarbeiten zur Celluloselöslichkeit ist bekannt, dass vor allem die Imidazoliumchloride, beispielsweise Etyhlmethylimidazolium chlorid (EMIMCl), Butylmethylimidazolium chlorid (BMIMCl), sowie Etylmethylimidazolium acetat (EMIMAc) hohe Löslichkeiten aufweisen. Aus eigenen Arbeiten sowie der Veröffentlichung von Fukaya et al. (2008) ist für Cellulose bekannt, dass auch die entsprechenden Phosphate und Phosphonate Löslichkeitspotentiale besitzen. In einem systematischen Screening wurden 20 verschiedene ionische Flüssigkeiten gescreent. Hierzu wurden zuerst mit BMIMCl geeignete Parameter ermittelt. Als geeignete Anwendungstemperatur für die untersuchten ionischen Flüssigkeiten erwies sich 80 °C. Bei dieser Temperatur neigte keine der ionischen Flüssigkeiten zur Zersetzung, und die Lösungsgeschwindigkeit war gegenüber Raumtemperatur wesentlich erhöht. In späteren Versuchen soll die Prozesstemperatur für die in Frage kommenden ionischen Flüssigkeiten weiter optimiert werden. In Abb. 2-7 ist in BMIMCl gelöste Buche in verschiedenen Konzentrationen dargestellt.

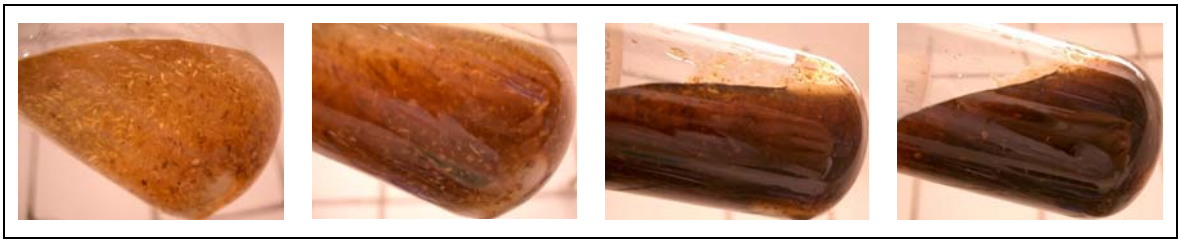


Abb. 2-7: Lösung von Buchenspänen in BMIMCl mit steigender Holzkonzentration (Quelle: SI)

Die dunkle Verfärbung der ionischen Flüssigkeit – Holzlösung ist auf ein in Spuren auftretendes Karamellisieren zurückzuführen. Inwiefern dieser Vorgang zu unterbinden ist, wird Bestandteil weiterer Untersuchungen sein. In Abb. 2-8 sind die vielversprechendsten 9 ILs zum Lösen von Buchenholz und –rinde dargestellt.

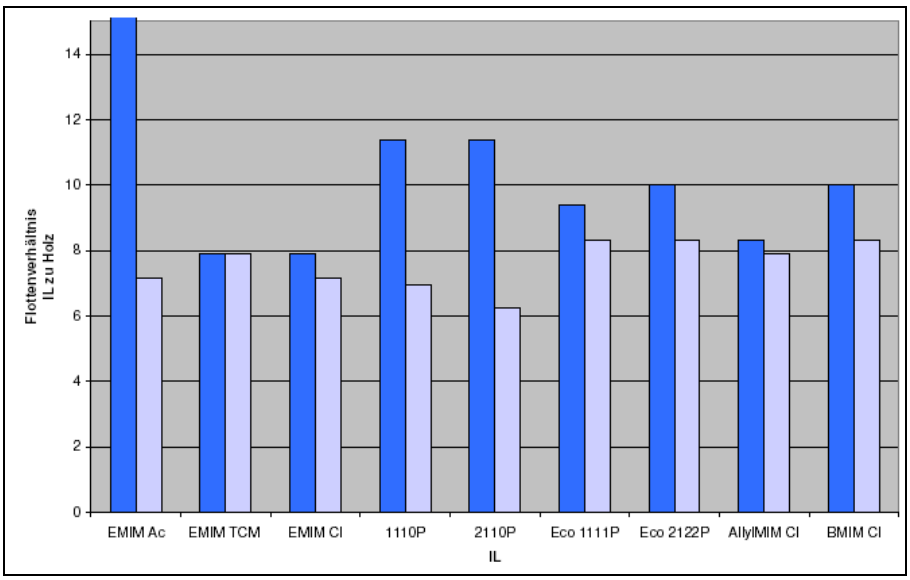


Abb. 2-8: Maximales Flottenverhältnis der ILs zur Lösung von Holz (blau) und Rinde (hellblau) (Quelle: SI)

Der Einfluss der natürlichen Zusammensetzung der zu lösenden Biomasse zeigt sich deutlich am unterschiedlichen Lösungsverhalten. Die Rindenlöslichkeit ist in allen Fällen größer als die des Holzes (Buchenholz: 43 % Cellulose, Buchenrinde: 18 % Cellulose, siehe Tab. 1-1). Mit der Phosphonat basierten ionischen Flüssigkeit – Ethylmethylimidazolium ethylphosphonat weist die größte

Löslichkeit für Rinde auf – wird ein Flottenverhältnis von 6:1 ohne weitere Optimierung erreicht. Für Holz eignet sich Ethylmethylimidazolium tricyanamid neben dem entsprechenden Chlorid am besten. Das erreichte Flottenverhältnis beträgt etwas weniger als 8:1.

Zum Vergleich ist Ethylmethylimidazolium acetat aufgetragen, welches zurzeit großtechnisch für die Lösung von Cellulose seitens der BASF untersucht wird. Mit diesen sind nur Flottenverhältnisse von 7:1 für Rinde und 25:1 für Holz erreichbar.

Dies zeigt deutlich, dass je nach eingesetztem Ausgangsmaterial das Lösungsmittel zu optimieren ist. Aufgrund der guten Verfügbarkeit von Dimethylimidazolim dimethylphosphat (ECOENG™ 1111P) wurden mit diesem Extrakte angefertigt, die auf ihre Zusammensetzung seitens Boehringer-Ingelheim und hinsichtlich des Extraktionvermögen mit $scCO_2$ durch Evonik weiter untersucht werden. Für die vielversprechenden Phosphat- und Phosphonat-ILs werden sowohl die Prozessparamter weiter optimiert als auch der Einsatz von Additiven, z.B. kurzkettige Alkohole, zur Verbesserung des Flottenverhältnisses untersucht.

Zur Optimierung der Löslichkeit kann die Prozesstemperatur erhöht werden. Hierzu ist es hilfreich die maximale Belastungstemperatur zu ermitteln. Aus Abb. 2-9 wird deutlich, dass über einen angestrebten Zeitraum von kleiner 10 Stunden diese selbst bis 200 °C kurzzeitig erhitzt werden können.

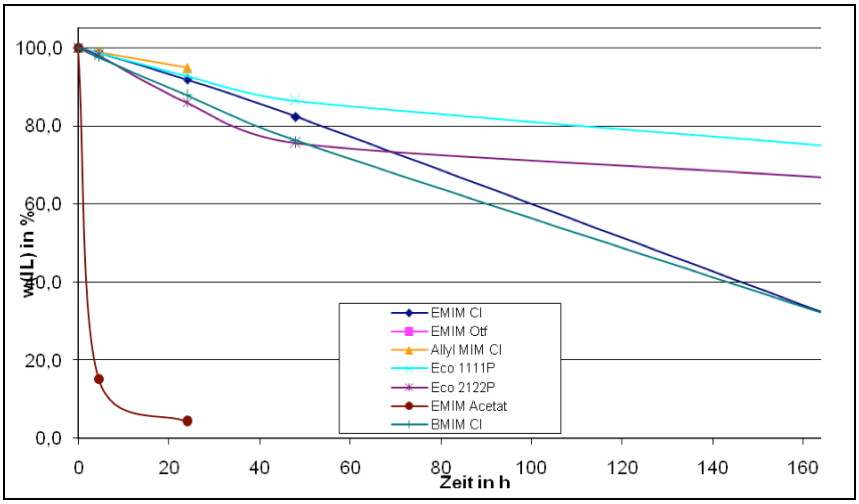


Abb. 2-9: Temperaturbelastung: Bestimmung des Massenverlustes von ausgewählten ILs bei 200 °C (Quelle: SI)

Die Belastung sollte allerdings nur kurzzeitig erfolgen, da ansonsten zu hohe Austauschraten zu berücksichtigen sind. Da sich ionische Flüssigkeiten Newton´sch verhalten, ist die Wahl einer höheren Betriebstemperatur sinnvoll, da dies zu einer erheblichen Viskositäterniedrigung führt. So nimmt beispielsweise die Viskosität von Dimethylimidazolium dimethylphosphat bei einer Temperaturerhöhung von Raumtemperatur auf 100 °C um den Faktor 10 ab.

In Abb. 2-10 ist die Viskositätskurve von Dimethylimidazolium dimethylphosphat von RT bis 100°C dargestellt.

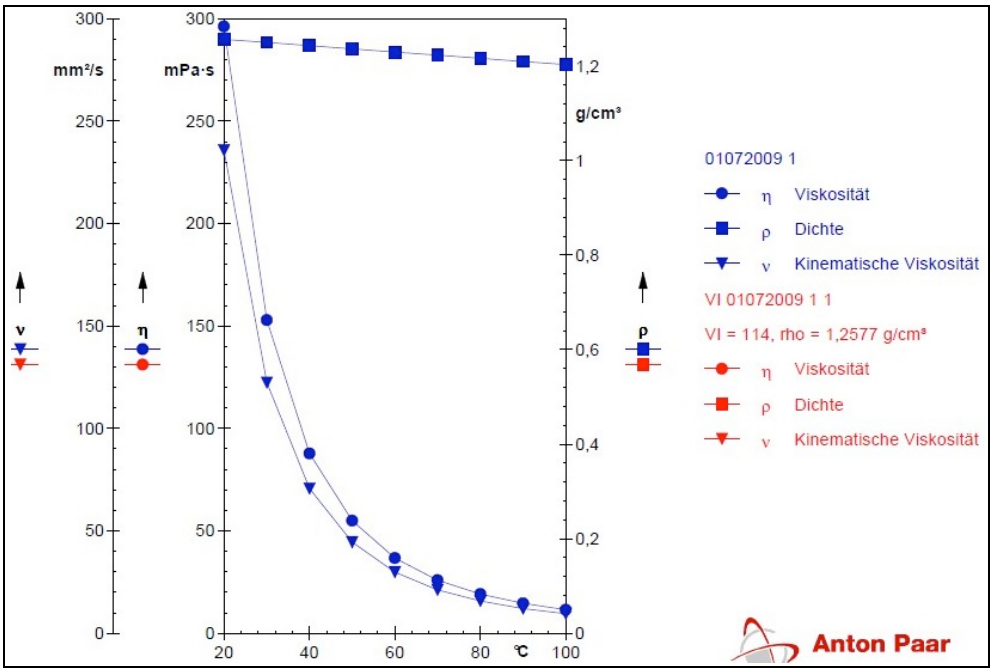


Abb. 2-10: Viskosität von Dimethylimidazolium dimethylphosphat bei unterschiedlichen Temperaturen (Quelle: SI)

Aufgrund der oben angeführten Viskositätserniedrigung wurde die Versuchsreihe bei 100 °C wiederholt. In einem Becherglas wurde hierzu mittels Magnetrührer die IL erwärmt und bei konstant 100 °C gehalten. Bei dieser Temperatur wurde Holz bzw. Rinde zugegeben und mittels Magnetrührer gerührt, bis ein so hoher Viskositätsanstieg zu verzeichnen war, dass die Probe fast nicht mehr rührbar war. In Abb. 2-11 ist das Flottenverhältnis von Holz / Rindelöslichkeit in IL bei 100°C dargestellt.

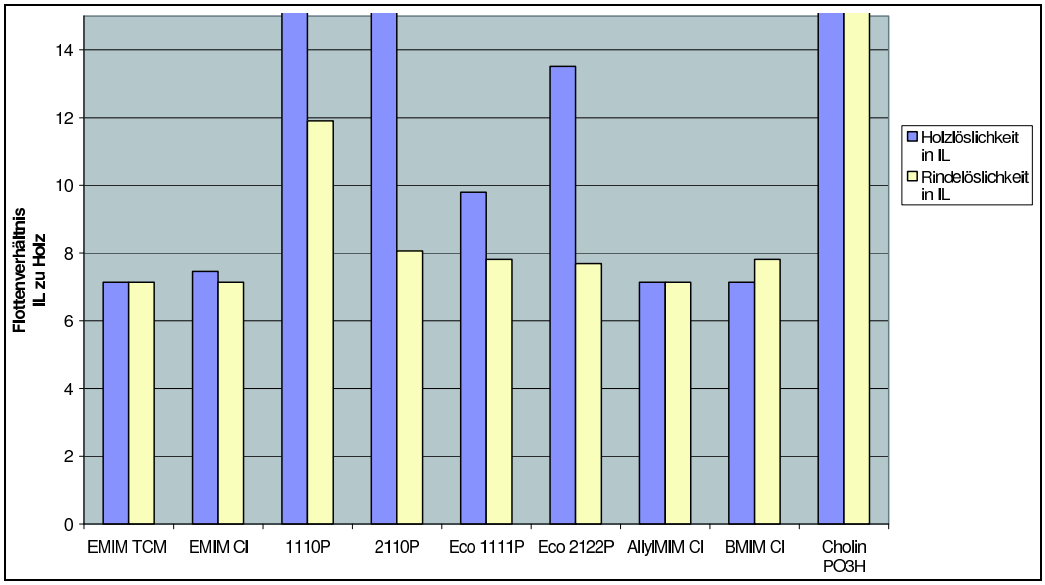


Abb. 2-11: Flottenverhältnis von Holz / Rindelöslichkeit in IL bei 100°C (Quelle: SI)

Das beste Flottenverhältnis erreichen hierbei die halogenierten ILs, jedoch ist keine Verbesserung des Flottenverhältnises gegenüber 80 °C erkennbar. Für die nicht halogenierten ist sogar ein signifikant schlechteres Flottenverhältnis zu beobachten.

Mittels einer Drucknutsche wurde die Mischung abfiltriert, anschließend mit heißem Wasser (vierfache Menge der Probemenge) die Cellulose ausgefällt und über einen Weißbandfilter abfiltriert.

Zur Trennung von Lignin und Cellulose wurde der erhaltene Filterkuchen in ca. 20 %iger NaOH suspendiert. Hierbei sollte die Trennung von Cellulose (unlöslich in wässriger NaOH) und Lignin erfolgen, welches in der NaOH gut löslich ist. Die beiden Komponenten wurden durch Filtration getrennt. Bei unseren Versuchen konnte keine ausreichende Trennung von Lignin und Cellulose erfolgen, so dass zum derzeitigen Zeitpunkt keine signifikante Aussage über den erhaltenen Ligninanteil gemacht werden kann.

Aufgrund des starken Viskositätsanstiegs während des Lösevorgangs ist im Weiteren sicherlich der Einsatz von geeigneteren Rührgeometrien bzw. Viskosität erniedrigenden Additiven zur Erleichterung der Transportvorgänge sinnvoll. Hier bestehen auch Anknüpfungspunkte zu Arbeiten des Projektpartners BTS; die Ethanol-Wassergemische zur selektiven Auftrennung einsetzen. Die Kombination von Ethanol mit ionischer Flüssigkeit könnte ebenso zur Viskositätserniedrigung und somit zu einem besseren Flottenverhältnis führen. Daher wurde zu ECOENG 1111P verschiedene Konzentrationen mit Ethanol eingestellt.

Hierzu wurde die IL in verschiedenen Mischungsverhältnissen mit Ethanol versetzt und anschließend bis zum Rückfluss erhitzt. Bei dieser Temperatur wurde langsam Buchenholz bzw. Buchenrinde zugegeben und unter Rühren mittels Magnetrührer so lange gelöst, bis ein so hoher Viskositätsanstieg zu verzeichnen war, dass keine Durchmischung mehr erfolgen konnte.

In Abb. 2-12 ist zu sehen, dass eine leichte Verbesserung des Flottenverhältnisses zu erzielen ist. Dabei spielt das Mischungsverhältnis keine entscheidende Rolle.

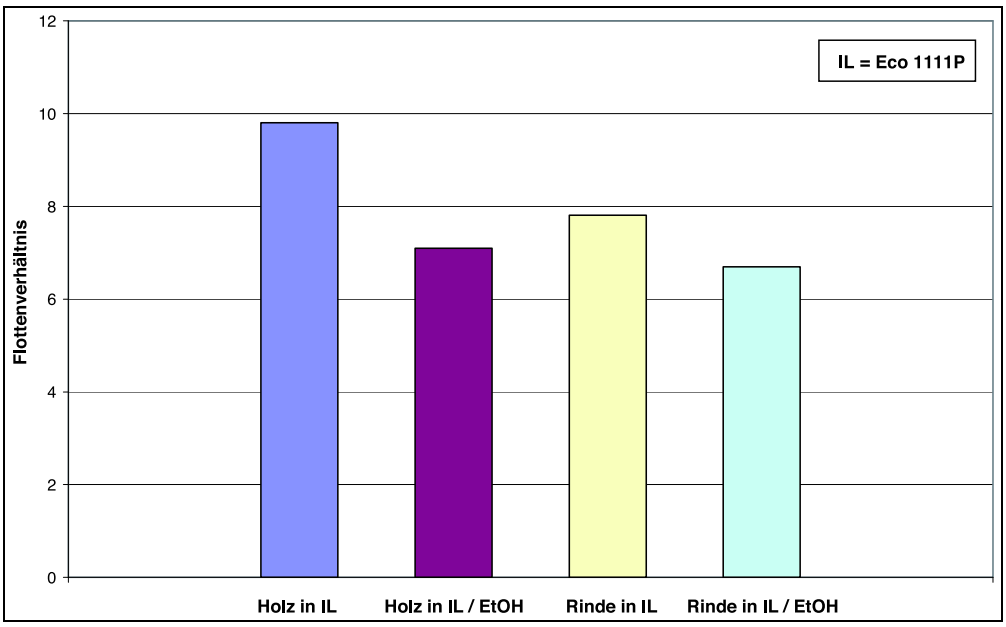


Abb. 2-12: Vergleich Holz mit Rindelöslichkeit in IL bzw. IL/EtOH-Gemisch (Quelle: SI)

All diesen Bemühungen zum Trotz konnten keine vergleichbaren Flottenverhältnisse des Organosolv-Verfahrens erreicht werden. Im Hinblick auf die nicht ausreichenden Flottenverhältnisse und die deutlich höheren Kosten der ionischen Flüssigkeiten gegenüber H_2SO_4 / Wasser / Ethanol ist ein technischer Einsatz basierend auf dem derzeitigen Stand der Technik nicht sinnvoll. Für direkte chemische oder enzymatische Umsetzung in ionischen Flüssigkeiten mag die Bewertung anders ausfallen.

AP2-1.2.5 Aufschluss unter ausschließlicher Verwendung ionischer Flüssigkeiten (Uni Rostock)

AP2-1.2.5.1 Möglichkeiten des Aufschlusses von Holz mit ionischen Flüssigkeiten

Für die Untersuchungen des Aufschlusses von Holz mit ionischen Flüssigkeiten wurden uns Holzproben (Buche und Pappel) in Form von entrindeten Hackschnitzeln von der vTI bereitgestellt. Eine Rindenfraktion vom Fraunhofer ICT wurde bisher nicht untersucht.

Da die Größe der Hackschnitzel für den Labormaßstab ungeeignet ist, wurden diese auf eine Fraktion von 0,35 – 0,63 mm zerkleinert. Der Restwassergehalt betrug 6 %. Für alle folgenden Untersuchungen wurde ausschließlich Buchenholz verwendet.

Die Anzahl an ionischen Flüssigkeiten, welche Cellulose bzw. Holz lösen, ist relativ begrenzt. Wir haben uns für unsere Untersuchungen auf EMIM-Acetat (BASF), EMIM-Cl (SI), Ecoeng 1111P (SI) und AMIM Cl (selbst synthetisiert) begrenzt.

Aus der Literatur sind drei verschiedene Möglichkeiten bekannt, wie man Cellulose in ionischen Flüssigkeiten auflösen kann:

1. „klassischer“ Aufschluss im 3-Halskolben
2. Aufschluss in der Mikrowelle
3. Aufschluss mit Hilfe von Ultraschall

Der „klassische“ Aufschluss wurde in einem 3-Halskolben durchgeführt, welcher mittels Ölbad auf 90 – 120 °C temperiert wurde. Das Flottenverhältnis wurde je nach ionischer Flüssigkeit variiert und betrug 12:1 – 8:1 (IL:Holz). Bei kleinerer Flotte hat sich das Holz nicht mehr vollständig gelöst und es kam zu erheblichen Faserrückständen. Die eingesetzte Menge an IL wurde zwischen 100 und 300 ml variiert und mittels KPG-Rührer kontinuierlich gerührt. Mit EMIM-Acetat und BMIM-Cl wurden die kleinsten Verweilzeiten ermittelt, jedoch betrugen diese mindestens 3 h.

Als eine Alternative zum Aufschluss im Kolben wurde der Mikrowellenaufschluss untersucht. Bei der hierfür verwendeten Labormikrowelle MARS XPress von CEM wurden 10 – 50 ml IL (Flottenverhältnis 20:1 – 9:1) in Teflongefäße gegeben und einem Temperaturprogramm (Temperaturrampen bis 90 °C) ausgesetzt. Die Temperatur wurde bewusst etwas niedriger gewählt, da es in den Teflongefäßen zu partiellen Überhitzungen kommen kann und somit das Holz verkohlt bzw. sich die ionische Flüssigkeit zersetzt (SI, siehe AP2-1.2.4). Ein Rühren der Proben in der Mikrowelle war nicht möglich. Bereits nach 30 min war ein Großteil der Holzproben aufgelöst.

Ultraschall stellt ebenfalls eine Möglichkeit dar, die benötigte Energie in das IL/Holzgemisch einzubringen. Untersucht wurde der Ultraschalleintrag unter Normaldruck, sowie bei erhöhtem Druck bis 4 bar. Je nach Höhe des Energieeintrags erwärmte sich die Probe auf 70 – 150 °C. Es kam zu keiner signifikanten Erhöhung der Auflösegeschwindigkeit. Dies lässt den Schluss zu, dass die Eindringtiefe der ionischen Flüssigkeit in die Holzpartikel durch Ultraschall nicht entscheidend erhöht werden kann. Eine Zerfaserung der Partikel war ebenfalls nicht zu beobachten. Der Aufschluss des Holzes ist hier ausschließlich auf die Erwärmung der Probe zurückzuführen.

Bei allen Aufschlussmethoden resultierte eine dunkelbraun bis schwarz gefärbte Lösung von honig–artiger Konsistenz und karamellartigem Geruch. Die Viskosität der Lösungen betrug bis zu 2 Pas.

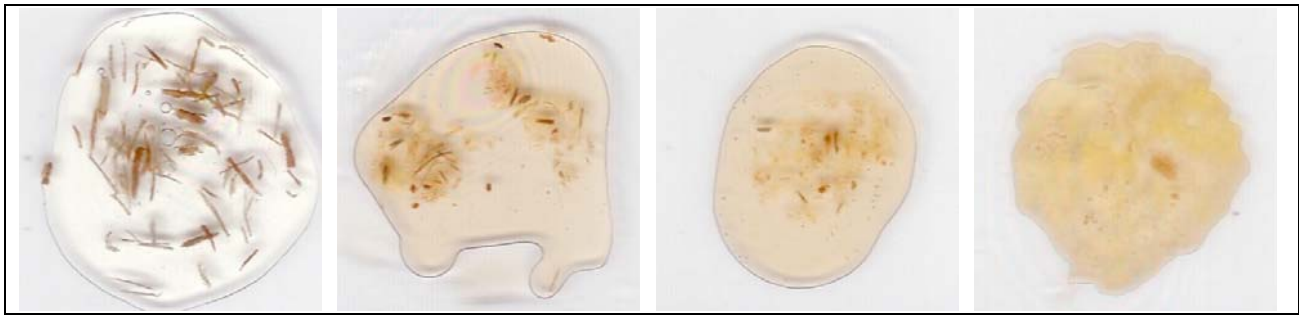


Abb. 2-13: Mikrowellenaufschluss nach 0 min, 10 min, 20 min, 30 min Verweilzeit (Quelle: Uni Ro)

Abb. 2-13 stellt den Auflöseprozess des Holzes in ionischer Flüssigkeit mittels Mikrowelle dar. Zum Zeitpunkt t = 0 ist eine klare, farblose ionische Flüssigkeit zu erkennen, in die Buchenholzpartikel eingebracht wurden. Nach 10 min ist bereits ein Aufquellen und Anlösen des Holzes zu ersichtlich. Nach 30 min sind die Holzspäne fast vollständig gelöst. Während des Auflöseprozesses kommt es zu einer immer stärker werdenden Braunfärbung der ionischen Flüssigkeit.

Abb. 2-14 zeigt das Lösungsvermögen verschiedener ionischer Flüssigkeiten für Buchenholz, Buchenrinde und Cellulose. Es ist zu erkennen, dass Cellulose am besten löslich ist. Der Anteil an Lignin im Buchenholz bzw. in Buchenrinde sorgt für eine teilweise deutlich schlechtere Löslichkeit im Vergleich zur Cellulose. Gleichzeitig ist zu erkennen, dass eine gute Celluloselöslichkeit nicht automatisch mit einer guten Holz- bzw. Rindenlöslichkeit einhergeht.

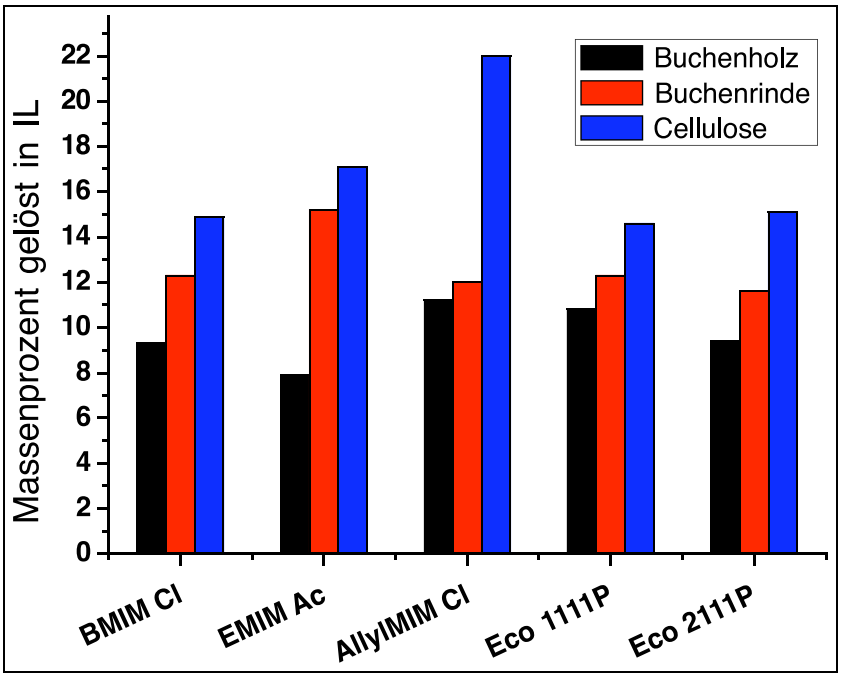


Abb. 2-14: Lösungsvermögen verschiedener ionischer Flüssigkeiten (Mikrowellenaufschluss) (Quelle: Uni Ro)

AP2-1.2.5.2 Komponententrennung

Aus der Literatur ist bekannt, dass man Cellulose, gelöst in IL, durch Eintrag in Wasser oder Ethanol wieder fällen kann. Die heiße Holzlösung wurde in die 4-fache Menge heißes Lösungsmittel (Wasser, Wasser/Ethanol, Ethanol) eingerührt. Dabei fielen sofort die Cellulose und das Lignin aus. Die Hemicellulosen blieben zusammen mit der IL in Lösung. Der Rückstand wurde abfiltriert, 3-mal gewaschen und für weitere Untersuchungen getrocknet.

AP2-1.2.5.3 Analyse des Rückstands

Die gefällte Cellulose/Lignin-Fraktion wurde sauer hydrolysiert (2-stufige Hydrolyse) und mittels HPLC quantifiziert (Boratkomplex-Anionenaustausch mit BCA-Detektion; Arbeiten am vTI). Der Ligningehalt wurde mittels Gravimetrie aus dem Hydrolyserückstand ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass je nach Wahl des Fällungsmittels sich die Verhältnisse von gefällter Cellulose zu gefälltem Lignin stark unterscheiden. Aus der Verwendung von Ethanol resultierte ein Cellulose: Lignin-Verhältnis von 9:1. Ethanol/Wasser-Gemische ergaben ein Verhältnis von 6:1 und reines Wasser 3:2.

In allen drei genannten Fällen blieben die Hemicellulosen zusammen mit der ionischen Flüssigkeit in Lösung.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass der Ligninanteil im Rückstand mit steigender Polarität des Fällungsmittels zunimmt. Eine fraktionierte Fällung von Cellulose und Lignin ist bei geeigneter Wahl des Fällungsmittels möglich.

AP2-1.2.5.4 Aufarbeitung der ionischen Flüssigkeit

Die physikalischen Eigenschaften von ionischen Flüssigkeiten (z.B. sehr geringer Dampfdruck) machen eine destillative Aufarbeitung des Hemicellulose/IL-Gemisches unmöglich. Aus ökonomischen und ökologischen Gesichtspunkten ist eine Rückgewinnung der IL unabdingbar.

Hierfür wurde eine Methode erarbeitet, welche mittels Nanofiltration die Oligo- und Monosaccharide von der ionischen Flüssigkeit trennt.

Folgende Parameter wurden hierfür festgelegt: Der Filtrationsdruck betrug 10 – 20 bar, als Filtrationseinheit diente zum einen eine Berghof-Rührzelle mit einer effektiven Membranfläche von ca. 35 cm^2 und einem Füllvolumen von maximal 200 ml sowie eine Rührzelle RZ 75 mit einer effektiven Membranfläche von 13,9 cm^2 und einem Füllvolumen von 75 ml (Abb. 2-15, Abb. 2-16). Um Membranfouling-Effekte zu reduzieren, wurde mittels Magnetrührer bei 500 U/min gerührt. Die Filtrationstemperatur betrug in allen Fällen 40 °C. Als Membranmaterial kamen kommerziell verfügbare Membranen der Firma GE Osmonics (Desal DK) sowie Koch (TFC-SR3, TFC-HR, MP-44) zum Einsatz.

Abb. 2-15: RZ 75 (links), Berghof-Rührzelle (rechts) (Quelle Uni Ro)

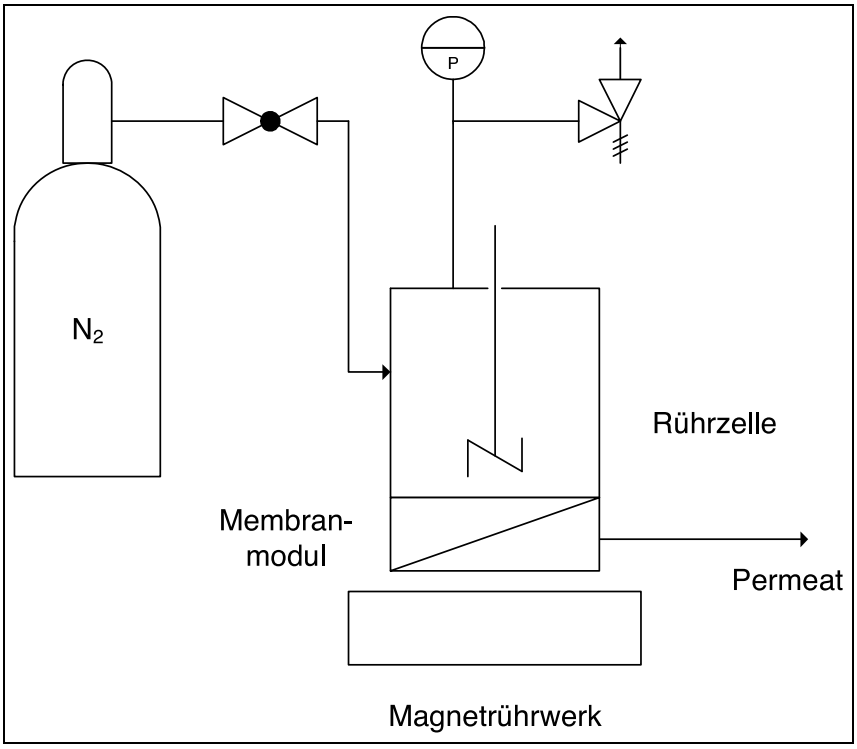


Abb. 2-16: Schema der verwendeten Rührzellen RZ 75 und Berghof-Rührzelle (Quelle: Uni Ro)

Zur Vereinfachung der Analytik der einzelnen Hemicellulosebestandteile, wurde als Modellsystem ein Gemisch aus drei Monosacchariden (Xylose, Rhamnose, Glucose) gewählt, welche in einer Konzentration von 0,05 mol/l verwendet wurden. Die Analytik der Monosaccharide erfolgte über HPLC-Messungen, der IL-Gehalt wurde über Leitfähigkeitsmessungen und Ionenchromatographie bestimmt.

Erste Versuche wurden mit der Nanofiltrationsmembran Desal DK von GE Osmonics durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine relativ offenere Membran mit einem vom Hersteller angegebenen Cut-Off von 150 – 300 g/mol.

Zunächst wurden die Komponenten Glucose, Xylose, Rhamnose (jeweils 50 mM) und AMIM Cl (1 %ig) einzeln filtriert. Hierbei wurden Rückhalte von ca. 65 % für die Xylose und über 80 % für Glucose und Rhamnose bestimmt. Die ionische Flüssigkeit permeierte fast vollständig und wurde mit ca. 5 – 7 % zurückgehalten (Abb. 2-17).

Bei der Filtration aller Komponenten im Gemisch zeigte sich jedoch, dass der Rückhalt der Monosaccharide deutlich abnahm. Hier konnten lediglich Retentionen von 20 – 40 % erreicht werden. Eine mögliche Erklärung könnte im Schrumpfungsverhalten der verwendeten Membran, bedingt durch die Anwesenheit der ionischen Flüssigkeit und das sich dadurch vergrößernde mittlere freie Porenvolumen liegen. Die Retention von AMIM Cl änderte sich nicht signifikant.

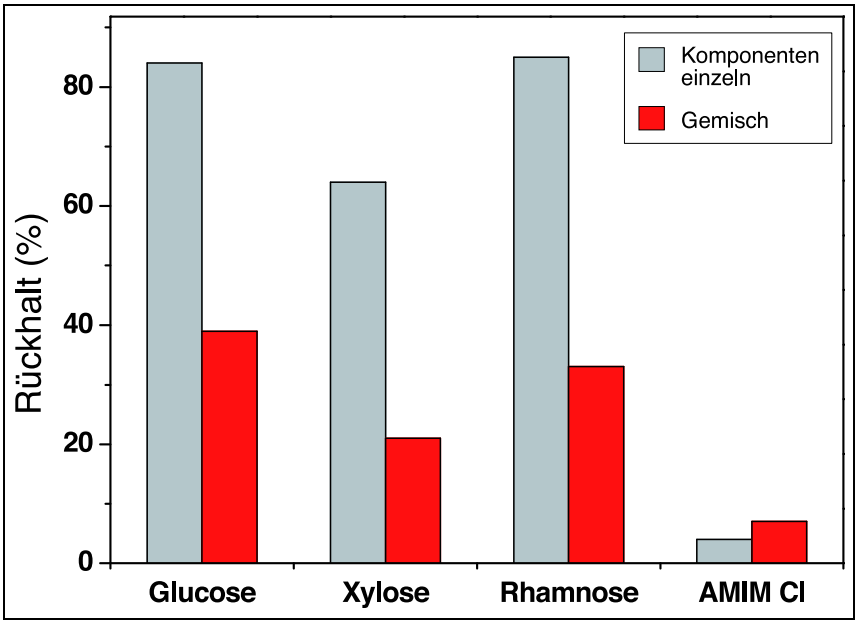


Abb. 2-17: Rückhalt von Glucose, Xylose, Rhamnose (0,05 M Lösung), 10 bar, 1%ige AMIM Cl-Lösung, Desal DK-Membran (Quelle: Uni Ro)

Bedingt durch die Ergebnisse mit der Desal DK-Membran wurden dichtere Membranen auf ihre Filtrationseigenschaften von AMIM Cl und der Monosaccharide getestet (Abb. 2-18)

Auffällig sind die allgemein sehr hohen Retentionen von Glucose, Xylose und Rhamnose aller getesteten Membranen. Xylose wird erwartungsgemäß etwas schlechter zurückgehalten, als die Glucose oder Rhamnose, was auf die geringere molare Masse zurückzuführen ist. Mit der Membran TFC-HR konnten die besten Filtrationsergebnisse erzielt werden. Hier kam es zu einem nahezu vollständigen Rückhalt der Monosaccharide. Gleichzeitig permeierte die ionische Flüssigkeit stärker, als bei der Membran TFC-SR3 und MP-44.

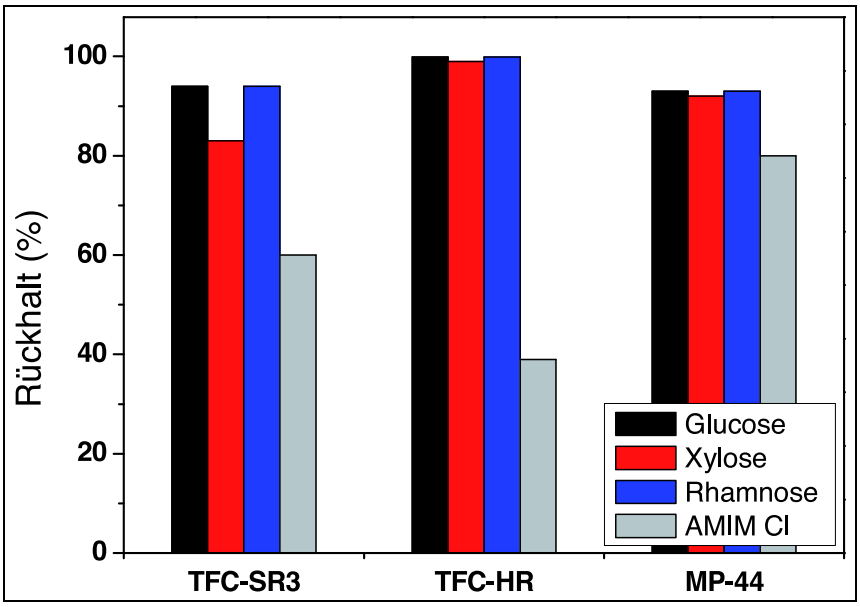


Abb. 2-18: Rückhalt von Glucose, Xylose, Rhamnose (0,05 M Lösung), 1%ige AMIM Cl-Lösung, 10 bar (Quelle: Uni Ro)

Im Folgenden wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Retention untersucht. Abb. 2-19 zeigt die Abnahme der Retention mit steigender Konzentration der ionischen Flüssigkeit. Dieses Verhalten ist typisch für einwertige Salze [KRÖCKEL 2001; FREGER et al. 2000]. Mit der Konzentrationserhöhung der IL geht ein Absinken des Flusses einher. Der osmotische Druck wirkt dabei der Triebkraft, also dem Filtrationsdruck entgegen. Konzentrationen an ionischer Flüssigkeit größer als 5 % sind für die Nanofiltration nicht sinnvoll, da der Fluss gegen null geht.

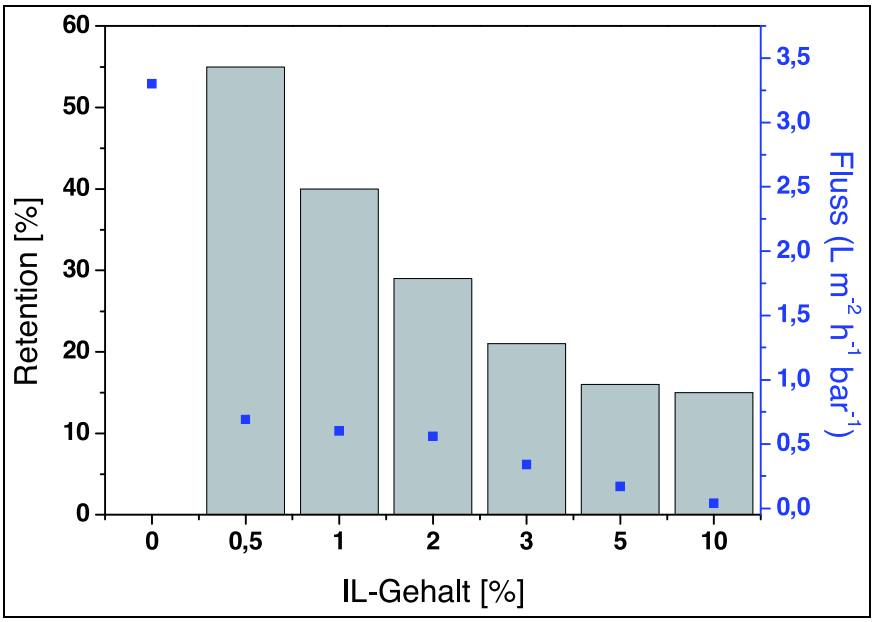


Abb. 2-19: Rückhalt von AMIM Cl, TFC-HR, T = 40 °C (Quelle Uni Ro)

Die aus dem Modellsystem erhaltenen Ergebnisse sollten nun auf ein Hemicellulosesystem übertragen werden. Hierfür wurde Buchenholz aufgelöst und Cellulose und Lignin ausgefällt und abfiltriert. Die erhaltene wässrige Lösung wurde auf ca. 5 % IL – Gehalt eingestellt und anschließend filtriert. Um die ionische Flüssigkeit abzutrennen, wurde diese in einer Ausspülkurve ausgewaschen. Dafür wurde die Rührzelle RZ 75 mit 50 ml Hemicellulose/IL-Lösung gefüllt und 25 ml filtriert. Anschließend wurde das permeierte Volumen mit Reinstwasser aufgefüllt und erneut filtriert. Die Ergebnisse sind in Abb. 2-20 aufgetragen. Nach insgesamt 3,5 Volumenaustäuschen betrug der Gehalt an IL ca. 10 % von der Ausgangskonzentration. Der Gehalt der Hemicellulose war größer als 90 %.

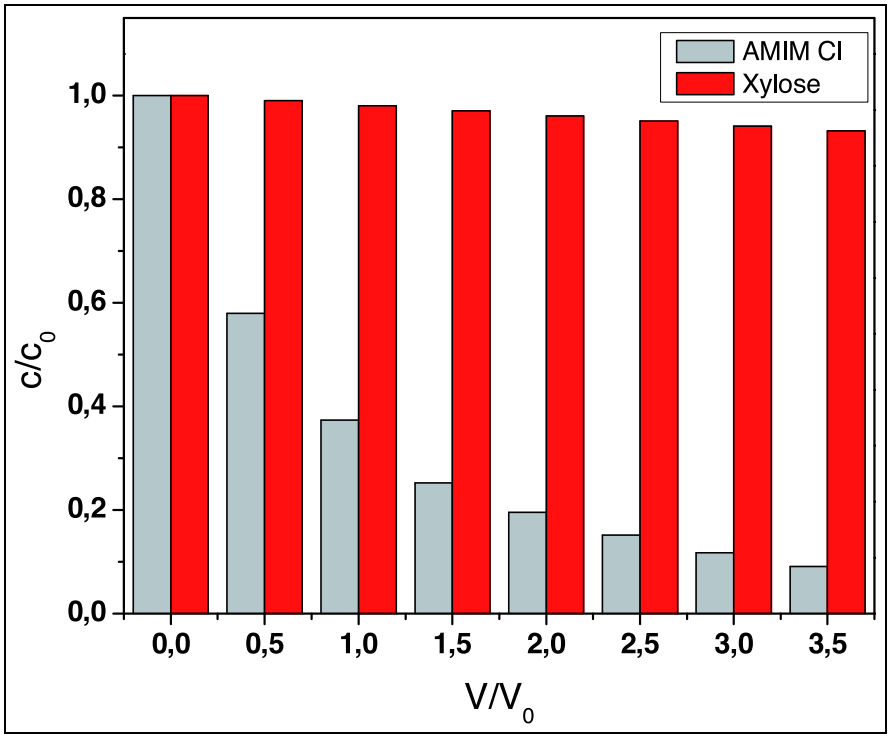


Abb. 2-20: Ausspülkurve von AMIM Cl und Hemicellulose, TFC-HR, T = 40 °C (Quelle Uni Ro)

AP2-1.2.6 Aufschluss unter ausschließlicher Verwendung ionischer Flüssigkeiten (Uni Erlangen)

Uni Erlangen erarbeitete zunächst den Einfluss der Hackschnitzeltrocknung auf die Lösung in ionischen Flüssigkeiten. Hierfür wurde zunächst das Material bei 80 °C auf ≤ 5 Gew.-% Wasser getrocknet. Dieser Schritt führte zu einer Veränderung der Holzstruktur (Verhornung) und damit einer Unlöslichkeit in ionischen Flüssigkeiten. Das Trocknungsverfahren wurde daraufhin umgestellt auf eine Trocknung mittels eines trockenen Druckluftstromes bei Raumtemperatur.

Aus den untersuchten ionischen Flüssigkeiten eigneten sich insbesondere solche mit Chlorid und Alkylphoshonat als Anion. Es ließen sich Lösungen mit bis zu 10 Gew.-% Buche bzw. mit bis zu 15 Gew.-% Pappelholz herstellen. Diese Lösungen zeichnen sich durch eine relativ hohe Viskosität von bis zu 3 Pas aus.

Als alternativer Energieeintrag zum Erhitzen der Lösungen im Heizbad wurde die Verwendung von Ultraschall untersucht. Es zeigte sich, dass die Erhitzung der Lösung auf die angestrebten 100 °C

problemlos zu erreichen war. Eine signifikante Beschleunigung der Auflösung war nicht zu beobachten.

In allen hergestellten Lösungen fanden sich ungelöste Reste von faserigem Material, die etwa 1 % bis 20 % des eingesetzten Holzes ausmachten. Diese Reste traten besonders bei der Verwendung von Buchenholz auf, weniger ausgeprägt bei der Verwendung von Pappelholz. Zur weiteren Untersuchung der Lösungen wurden die Faserreste mittels einer selbstentwickelten beheizbaren Druckfiltereinheit von der Lösung abgetrennt.

Hiernach wurden keine weiteren Versuche zur Holzlösung unternommen; der Fokus wurde auf die Verwertung von Lignin gelegt (AP3-3.3).

AP2-1.3 Aufschluss von Buche und Pappel unter optimierten Bedingungen im diskontinuierlichen Betrieb (10-kg-Maßstab) (AP 2.1.2)

Die unter AP2-1.2.1 und AP2-1.2.2 ermittelten optimalen Aufschlussbedingungen im System ohne Katalysatorzugabe wurden im 10-kg-Maßstab unter Verwendung der ASAM-Kochanlage am vTI wiederholt (Abb. 2-21, rechts). Allerdings wurde bei einem Flottenverhältnis 6:1 aufgeschlossen, um ein Heisslaufen der Umwälzpumpe zu vermeiden. Hierzu wurden die Pollmeier Sägewerkshackschnitzel verwendet, und es wurden vergleichbare Ergebnisse wie im 1-kg-Maßstab erhalten.

Im Endstadium des Projektes war es möglich, mit einer generalüberholten Umwälzpumpe und unter Verwendung von Lenzing-Buchenholzhackschnitzeln (3 – 4 mm Dicke) als Dreifachbestimmung auch die Aufschlussbedingungen mit Katalysatorzugabe zu wiederholen (170 °C, 2 h, 1 % H_2SO_4). Es wurde ein reduziertes Flottenverhältnis von 4:1 eingehalten. Überraschenderweise wurden statt dunkelbrauner Fasern hellbraune Stoffe mit einem Ligningehalt zwischen 4,8 % und 5,8 % erkocht. Auch der Xylangehalt dieser Stoffe lag mit einem Anteil zwischen 1,6 % und 2,2 % wesentlich niedriger als der Stoffe, die im 1-kg-Maßstab erkocht wurden (Abb. 2-21, links).

Die günstigeren Stoffeigenschaften wurden sowohl auf die verbesserte Imprägnierbarkeit der dünnen Hackschnitzel als auch auf die effektive Umwälzung der Aufschlusslösung zurückgeführt. Der 10-kg-Kocher besaß weiterhin die Möglichkeit der direkten Dampfinjektion in den Aufschlußraum. Von dieser Möglichkeit wurde Gebrauch gemacht, so dass die Aufheizperiode signifikant reduziert werden konnte (Aufschlußdauer 90 min).

Bedingt durch das reduzierte Flottenverhältnis von 6:1 auf 4:1 und die verbesserte Delignifizierung der Buchenholz-Hackschnitzel begann der Ausfällvorgang des Lignins bereits bei der Filtration der alkoholischen Aufschlusslösung vom Faserstoff. Die erzielte Ligninausbeute beim anschließend kontrolliert durchgeführten Fällvorgang (Eintropfen der alkoholischen Aufschlusslösung in vorgelegtes gekühltes Wasser) lag bei 11,9 %. Dieser Wert sollte nach Lösung des verfahrenstechnischen Problems durch den unkontrollierten Ausfällvorgang höher liegen.

Die Xylose-Ausbeute in der wässrigen Hemicellulosenfraktion nach saurer Nachhydrolyse lag bei 10,1 %. Damit wurde in etwa 50 % des im Buchenholz vorhandenen Xylans als Xylose gewonnen. Der Rest dürfte bedingt durch die sauren Aufschlussbedingungen in furanartige Produkte übergegangen sein.

Abb. 2-21: Aufschluss von Buchenholz-Hackschnitzeln nach dem Organosolv-Verfahren im 1-kg-Maßstab (links) und im 10-kg-Maßstab (rechts) im Ex-Schutztechnikum des vTIs

Am ICT wurden zur Bereitstellung größerer Mengen an Einzelfraktionen für eigene und Untersuchungen der Partner weitere diskontinuierliche Organosolv-Aufschlüsse im bereits beschriebenen 13-l-Reaktor unter den optimierten Reaktionsbedingungen (Temperatur 220 °C, Aufschlussdauer 3 h, Ethanol/H_2O-Verhältnis von 50/50 mit einem Flottenverhältnis von 1:4 (Holz:LM)) durchgeführt. Bei sechs hintereinanderfolgenden Aufschlüssen wurde eine kontinuierliche Fahrweise durch Verwendung der Waschlösung der Faserfraktion als Aufschlussmittel in der nachfolgenden Kochung simuliert. Dabei wurde auch die Waschlösung der Ligninfraktion zur Fällung derselbigen im nächsten Versuch verwendet. Die Vorgehensweise dieser „quasi-kontinuierlichen“ Experimente zeigt Abb. 2-22. Die erhaltenen Ausbeuten der einzelnen Fraktionen sind in Abb. 2-23 dargestellt.

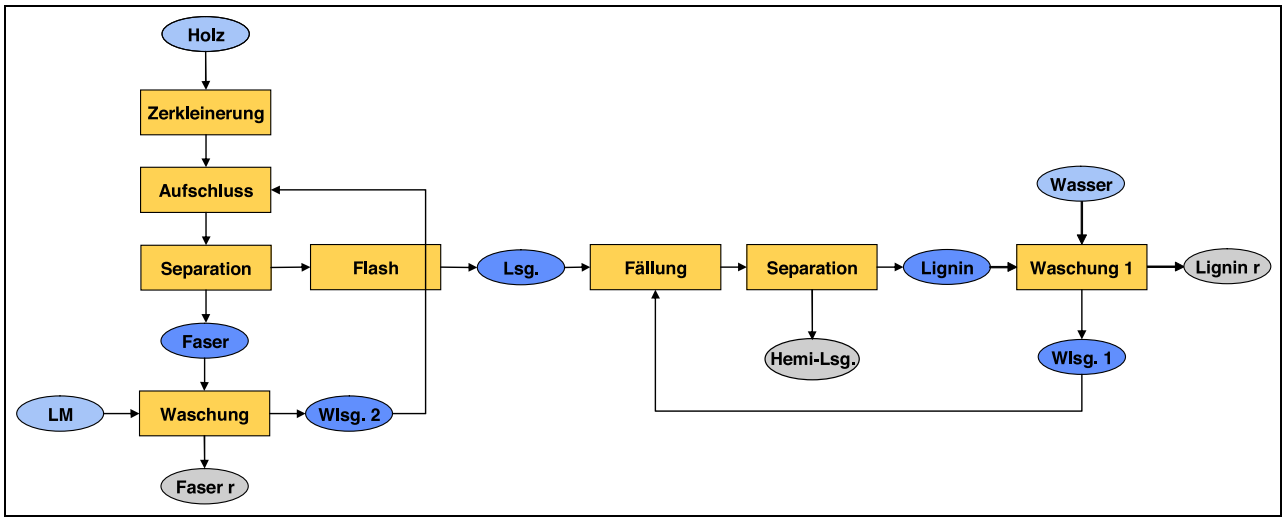


Abb. 2-22: Vorgehensweise bei den „quasi-kontinuierlichen“ Aufschlüssen (Quelle: ICT)

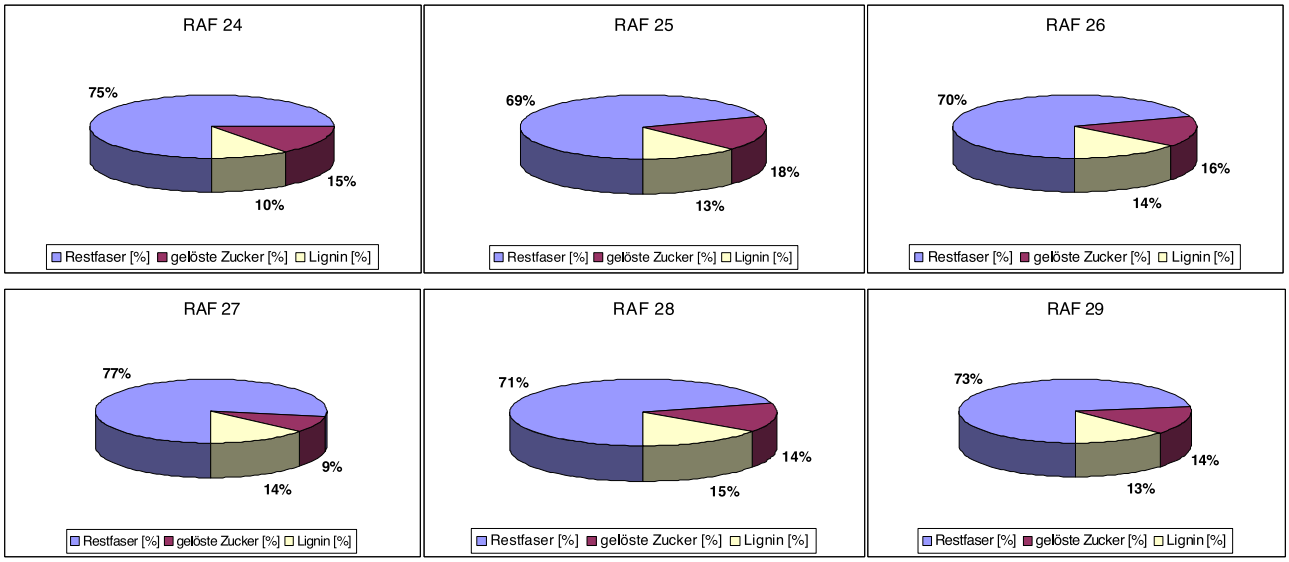


Abb. 2-23: Ausbeuten der Fraktionen bei den „quasi-kontinuierlichen“ Aufschlüssen (Quelle: ICT)

Schon nach dem zweiten Aufschluss verändert sich die Verteilung der Fraktionen nur noch in geringem Maße und es ergeben sich stabile Prozessbedingungen. Dabei ist anzumerken, dass sich alle Werte auf die zurückgewogene Masse an Aufschlusslösung nach der Kochung beziehen. Da die Aufarbeitung zum größten Teil händisch erfolgt und während der Verarbeitung sich Ethanol verflüchtigt, beeinhalten die Angaben einen gewissen Fehler. Da dieser aber als konstant anzunehmen ist, geben die angegebenen Ausbeuten eine gute Vergleichbarkeit der Versuche untereinander wieder.

Um den Aufschlussverlauf analytisch verfolgen zu können, wurde eine NIR/Vis-Messmethode entwickelt und anhand von gravimetrisch bestimmten Daten kalibriert. Damit ist eine online-Prozessverfolgung möglich und eine Anpassung des Aufschlusses auf z.B. wechselnde Substrate realisierbar. Abb. 2-24 zeigt die zeitabhängige Veränderung durch verschiedene Spektren.

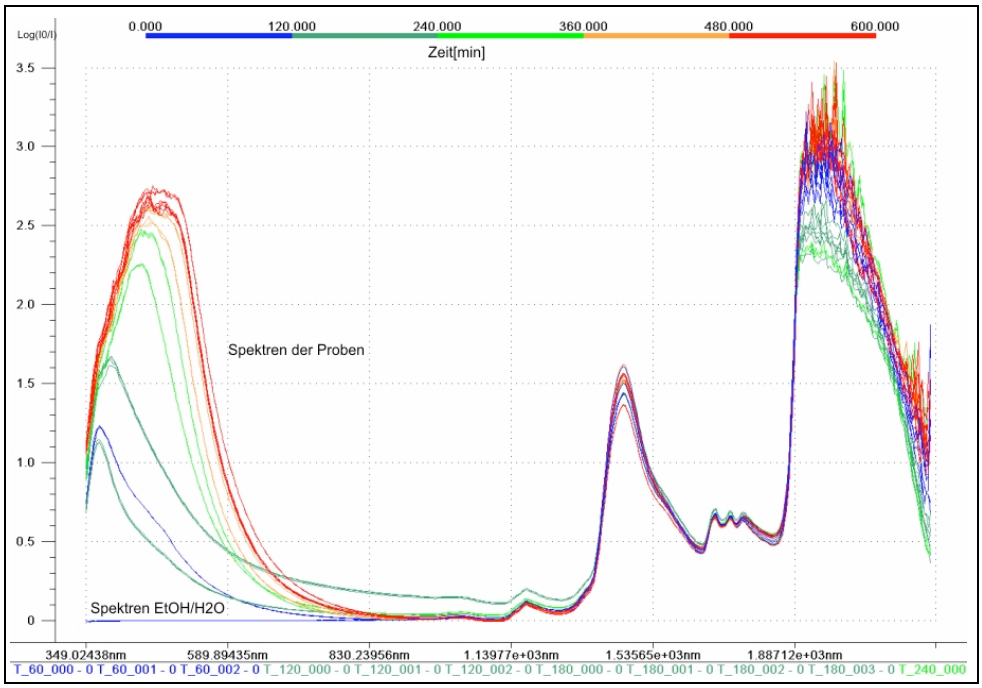


Abb. 2-24: Aufschlussverfolgung durch NIR/Vis-Messung (Quelle: ICT)

Zur Bereitstellung von Referenzfasermaterial für eine enzymatische Hydrolyse zu C_6-Zuckern wurde zur vollständigen Delignifizierung des Ausgangsmaterials nach der Organosolv-Behandlung nach einem Aufschluss die Faserfraktion mit warmer 2%iger NaOH so lange gewaschen, bis keine Braunfärbung der Waschlösung mehr eintrat. Dass so eine einfache Entfernung des anhaftenden Restlignins möglich ist, spricht auch für die Qualität des vorherigen Organosolv-Aufschlusses. Ein Vergleich zwischen dem Material nach Aufschluss und nach Waschung mit NaOH zeigt Abb. 2-25.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich durch diesen Waschschritt eine sehr ligninarme Faserfraktion herstellen lässt. Da sich das herausgelöste Lignin in basischer Lösung befindet sind evtl. Weiterverabeitungsschritte dieser Fraktion denkbar, welche in wässrig alkalischer Lösung stattfinden müssten. Neben den diversen Aufschlüssen mit entrindetem Buchenholz wurden weitere Organosolv-Aufschlüsse mit Buchenrinde und Pappelholz inkl. Rinde im 13-l-Autoklaven durchgeführt.

Abb. 2-25: Faserfraktion nach Organosolv-Aufschluss und nach anschl. NaOH-Wäsche (Quelle: ICT)

AP2-1.4 Entwicklung und Optimierung eines kontinuierlichen Verfahrens zum Aufschluss von Buche und Pappel unter Verwendung niedrig siedender Alkohole und ionischer Flüssigkeiten und Optimierung der Aufschlussbedingungen (T, t, Lösungsmittel) (AP 2.1.3)

AP2-1.4.1 Konzeptionelle Abstimmung

Auf Basis intensiver Diskussionen zwischen ICT und BTS wurde das Verfahrenskonzept eines Schlaufenreaktors anstelle eines Rohrreaktors favorisiert (Stand: Juni 2008), um die Notwendigkeit besonders kleiner Partikel (~ 0,05 mm) und die damit verbundene Problematik (Strömungsbedingungen und Sedimentationsverhalten) zu vermeiden (Abb. 2-26)

In der Diskussion wurden folgende Realisierungsmöglichkeiten erarbeitet:

- Einsatz eines Extruders statt Kolbenmembranpumpe als Einförderaggregat
- Einsatz einer axial fördernden Propellerpumpe im "Separationsbehälter" zur Förderung anstelle der Zahnradpumpe und Homogenisierung
- Realisierung eines Schlaufenreaktors über eine Rührkesselkaskade mit zwei Kesseln

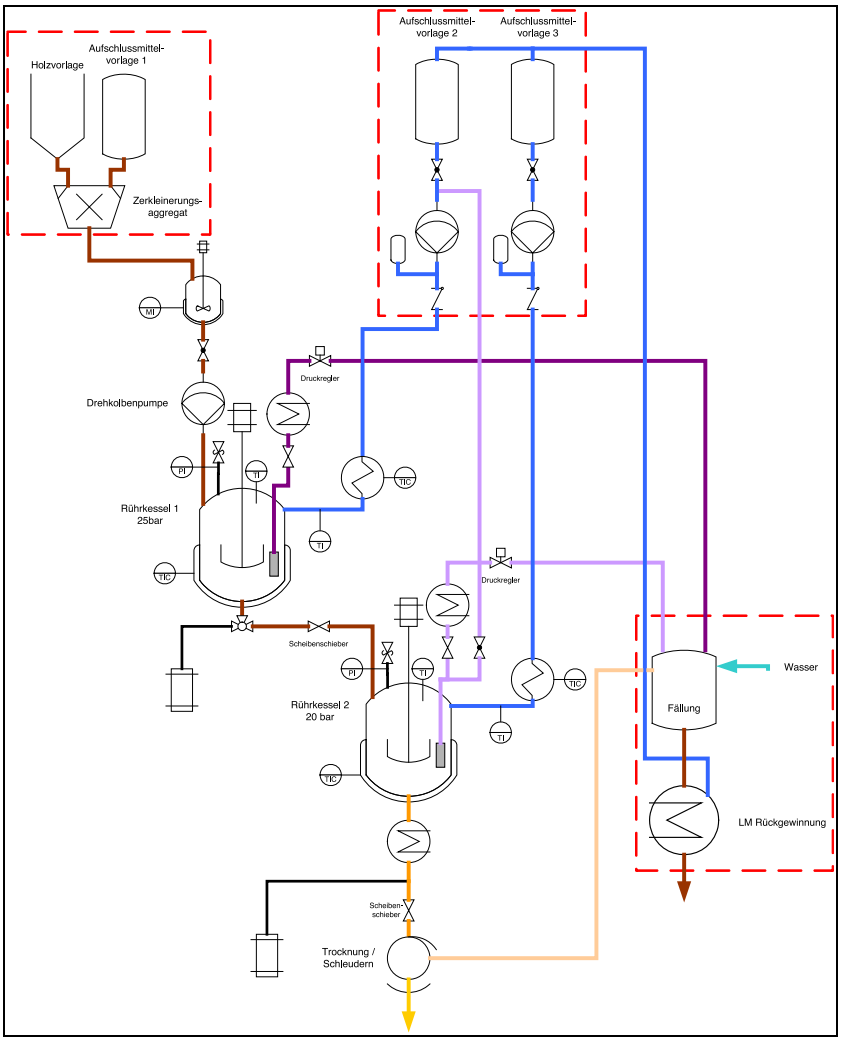


Abb. 2-26: Verfahrensfließbild der geplanten Technikumsanlage.
Stand: Juni 2008 (Quelle: ICT)

Folgende Parameter wurden festgelegt: Die Druckdifferenz zwischen den Behältern ~5 bar, beginnend mit 40 – 45 bar, die Verweilzeit: 45 min, ein Austrag der homogenen Lösung soll an jedem Kessel möglich sein, vorerst keine Kombination mit einer Hochdruckfiltration (nach Aussage des Filtrationsexperten von BTS ist für einen Feeddruck von ~100 bar kein entsprechendes Filter/-Gehäuse bekannt).

Die Filtration der Cellulose kann über eine Zentrifuge, einen Dekanter oder Trommel-/Bandfilter realisiert werden, BTS liefert Daten zu Apparategröße und Trenneffizienz in Abhängigkeit der Partikelgröße (siehe AP 4).

In der Zwischenzeit wurde am Fraunhofer ICT die kontinuierlich arbeitende Technikumsanlage fertiggestellt, eingefahren und erste Versuche zum Aufschluss von Buchenholz erfolgreich durchgeführt. Ein Verfahrensfließbild und ein Foto der Anlage zeigen Abb. 2-27 und Abb. 2-28.

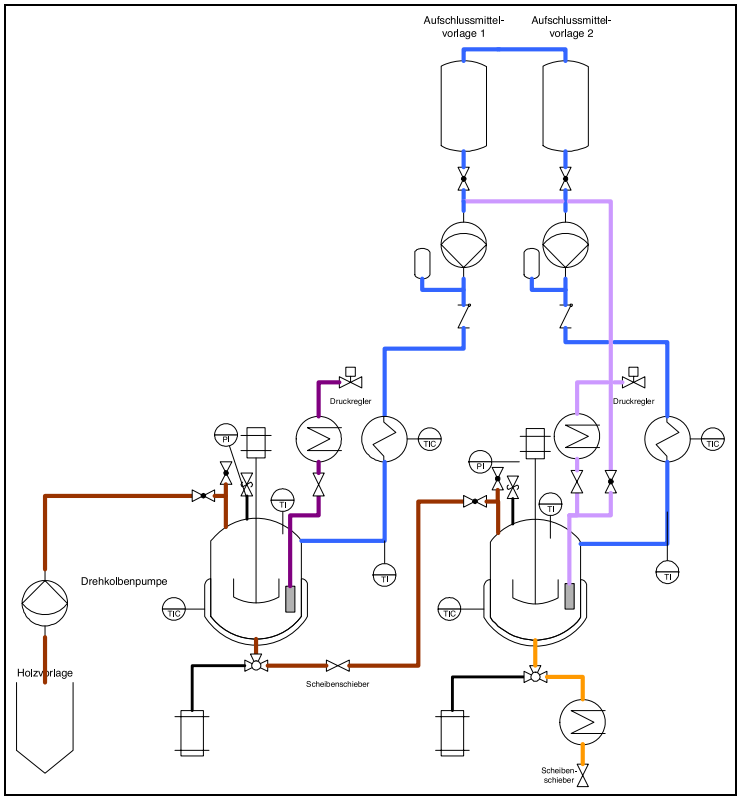


Abb. 2-27: Verfahrensfließbild der kontinuierlich arbeitenden Technikumsanlage, Stand Feb. 2009 (Quelle: ICT)

Abb. 2-28: Foto der kontinuierlich arbeitenden Technikumsanlage

Mit der aufgebauten Aufschlussanlage konnten verschiedene Bertriebsarten erfolgreich gefahren werden. Einerseits ist ein 2-stufiger Aufschluss bei verschiedenen Temperaturniveaus inklusive der Möglichkeit der schlagartigen Entspannung des Aufschlussgemisches vom ersten in den zweiten Reaktor. Dadurch kann neben der guten Zerfaserung durch die Turbinenrührer, eine extreme Scherbeanspruchung auf das Material ausgeübt werden, was nochmals zu einem verbesserten Aufschluss führt. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Fasermaterials nach Aufschluss und nach Aufschluss mit Druckentspannung belegen dies eindeutig (siehe Abb. 2-29).

Abb. 2-29: Rasterlektronische Aufnahmen des erhaltenen Fasermaterials

Weiterhin kann entweder Aufschlussmittel in jeden Reaktor frisch eingebracht werden (Mehrfachextraktion) oder das heiße Aufschlussmittel im Gegenstrom zur Faserfraktion gefördert werden.

Dass eine Mehrfachextraktion zu einer gesteigerten Delignifizierung führt, zeigten Versuche, in denen die abgetrennte Faserfraktion erneut unter den gleichen Bedingungen einer Organosolv-Behandlung unterzogen wurde. Diese Versuche zeigt Tab. 2-6.

Tab. 2-6: Versuche zur Mehrfachextraktion von entrindetem Buchenholz. Temperatur 220 °C, Aufschlussdauer 3 h, Ethanol/H_2O-Verhältnis von 50/50 mit einem Flottenverhältnis von 1:4 (Holz:LM)) (Quelle: ICT)

Versuch	Einwaage			Faser-fraktion	Faser	Aufschluss-lösung	Lignin	Hemi-cell.
	Holz	H_2O	Ethanol					
	m [g]	m [g]	m [g]	m [g]	[%]*	m [g]	[%]*	[%]*
RAF 28 M5	1.800 TS 88 %	3.600 Waschlsg. aus M4	3.600 Waschlsg. aus M4	1.116	70,5	5.497	15,2	14,4
RAF 28 M6	1.800 TS 88 %	3.600 Waschlsg. aus M5	3.600 Waschlsg. aus M5	1.157	73,0	5.464	12,9	14,0
RAF 35	1.800 (aus M5/M6) TS 94 %	3.600	3.600	2.500 (1.550)	91,4	4.640	5.23	0,9

*bezogen auf TS Holz

Auch bei diesen Versuchen sind die Ausbeuten auf die zurückgewogene Masse an Aufschlusslösung nach der Kochung bezogen (s. Tab. 2-6) und daher als relativ zueinander anzusehen. Bei den ersten Aufschlüssen wurde im Mittel eine Ligninausbeute von 14,1 % – bezogen auf die eingesetzte Masse an Holz – erreicht. Wird das Fasermaterial erneut aufgeschlossen, so erhält man nochmals 5,2% bezogen auf die eingesetzte Masse Faser oder 3,5 % Lignin bezogen auf die eingesetzte Masse Holz beim ersten Aufschluss. Eine Ausbeutesteigerung durch zweistufigen Aufschluss ist bei der Hemicellulosenfraktion nur maginal. Diese sind im ersten Aufschluss schon fast vollständig abgetrennt.

AP2-1.5 Analytische Charakterisierung und Erstellung von Massenbilanzen (AP 2.1.4)

AP2-1.5.1 Cellulosefraktion

Nach erfolgtem Aufschluss wurde die Faserfraktion bei Normklima (65 % rel. Luftfeuchtigkeit, 20 °C) auf 10 % Feuchtigkeit getrocknet und gravimetrisch bestimmt. Das Material wurde geflufft und durch analytische saure Hydrolyse in seine Monosaccharide überführt, die durch HPLC (Boratkomplex-Anionenaustausch mit BCA-Detektion) quantifiziert wurden. Der Ligningehalt in der Faserfraktion wurde als Hydrolyserückstand bestimmt. Alle produzierten Faserfraktionen wurden nach dieser Vorgehensweise untersucht. Die Ergebnisse wurden in die Abb. 2-5 und Abb. 2-6, sowie in die Tab. 2-1 und Tab. 2-5 eingespeist.

AP2-1.5.2 Hemicellulosenfraktion

Nach Ausfällen des Lignins und Ethanolrückgewinnung (Destillation) wurde ein aliquoter Anteil der wässrigen Fraktion gefriergetrocknet. Das Material wurde wiederum durch analytische saure Hydrolyse in seine Monosaccharide überführt, die durch HPLC quantifiziert wurden.

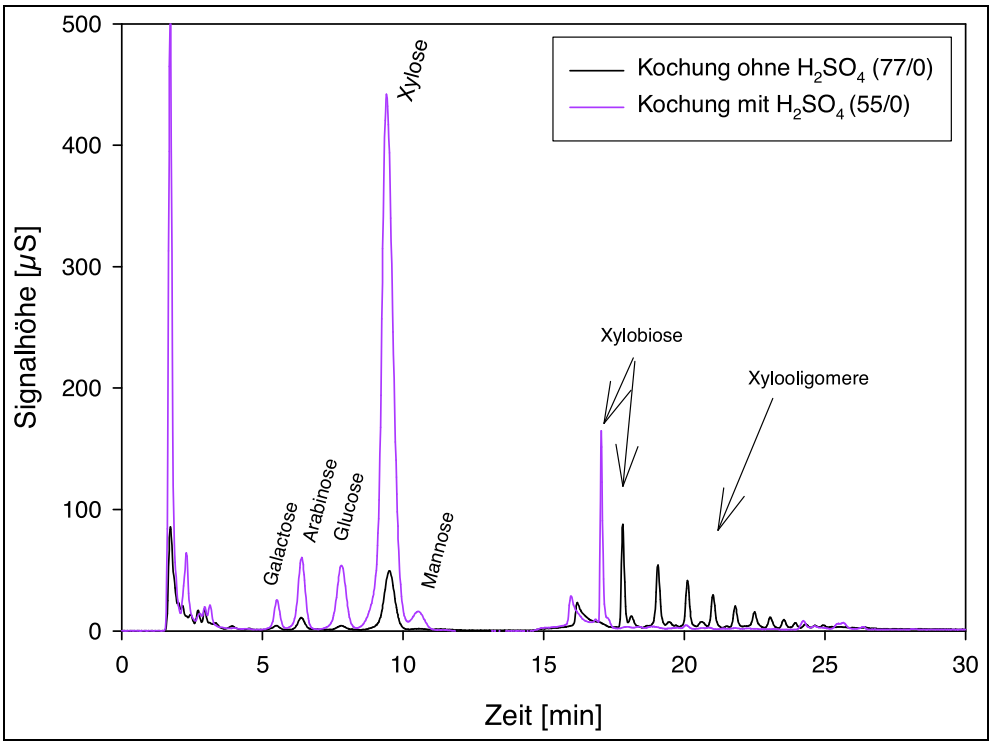


Abb. 2-30: Hemicellulosenzucker in der wässrigen Phase von Buchenholz-Organosolvaufschlüssen mit und ohne H_2SO_4-Zusatz (Quelle: vTi)

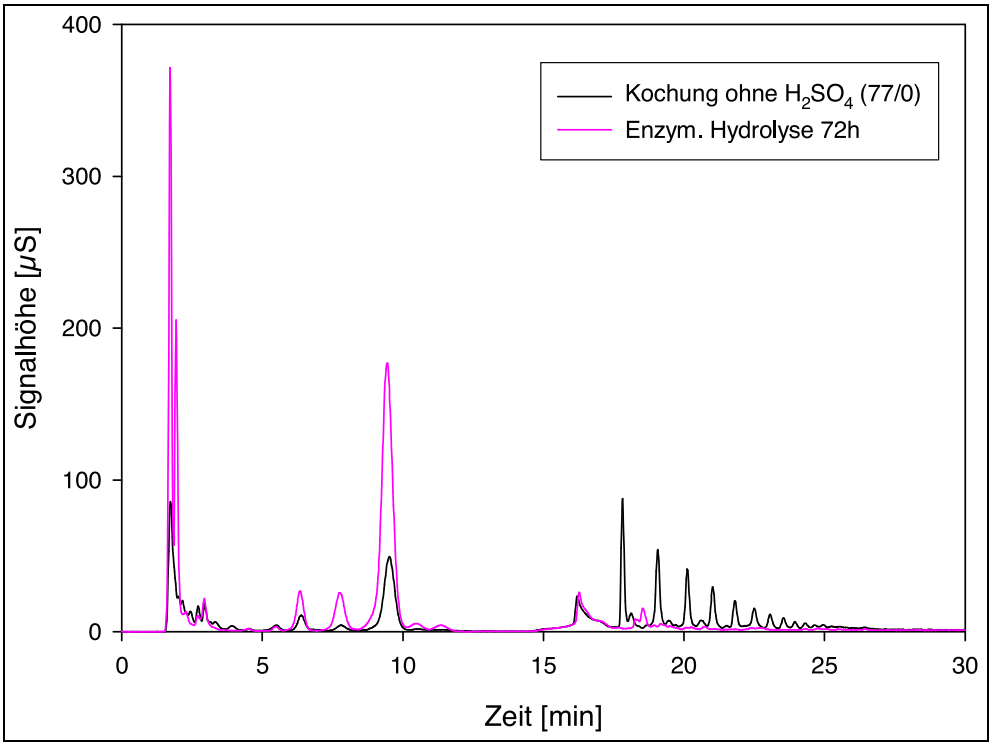


Abb. 2-31: Enzymatische Hydrolyse der Oligosaccharide in der wässrigen Phase eines Buchenholz-Organosolv-Aufschlusses (4h, 180°C, kein H_2SO_4-Zusatz) (Quelle: vTi)

Parallel hierzu wurde auch eine Bestimmung der Zuckerzusammensetzung in der wässrigen Lösung durchgeführt. Gleichzeitig erfolgte eine Quantifizierung der erhaltenen Furfural- und Essigsäureanteile. Für einige Hemicellulosenfraktionen erfolgte eine Bestimmung der Kettenlängenverteilung durch Größenausschlusschromatographie (SEC). Es zeigte sich, dass die Hemicellulosenketten im Verlauf des Aufschlusses bereits intensiv zu Oligo- und Monosacchariden fragmentiert worden waren. Dies erklärt auch, warum die Hemicellulosen durch erneute Ethanolzugabe nicht ausgefällt werden konnten.

Die Untersuchungen zur Hemicellulosencharakterisierung wurden unter Verwendung der HPAEC (Dionex-Methode zur Charakterisierung von Mono- und Oligosacchariden) intensiviert. Abb. 2-30 verdeutlicht, dass beim Aufschluss ohne Katalysatorzugabe kurzkettige Oligosaccharide freigesetzt werden. Bei Kochungen mit Katalysatorzugabe wurden die Oligomeren (bis Xylononaose) in Xylobiose und Xylose abgebaut. Abb. 2-31 verdeutlicht, dass die Xylo-Oligosaccharide der Hemi-Fraktion ohne Katalysatorzusatz durch Zugabe von Xylanasen in Xylose zu überführen ist.

AP2-1.5.3 Ligninfraktion

Am vTI wurden die erhaltenen Ligninfraktionen zunächst auf ihren Restkohlenhydratanteil und auf ihren Aschegehalt untersucht. Der Ascheanteil der Organosolv-Lignine war vernachlässigbar gering. Er betrug im höchsten Fall 0,1 %. Elementaranalysen ergaben, dass die Präparate schwefelfrei waren, auch wenn unter Zugaben von Schwefelsäure gekocht wurde (Tab. 2-7).

Tab. 2-7: Kohlenhydrat- und Ascheanteile der Organosolv-Lignine (Quelle: vTI)

Flotte	Σ Kohlenhydrate (%)	Asche (%)
	Variante mit Schwefelsäure	
6:1	0,7	0,0
3:1	1,13	0,1
	Variante ohne Schwefelsäure	
6:1	1,15	0,1
3:1	0,84	0,0

Der Kohlenhydratanteil belief sich auf ca. 1 % und lag damit auch extrem niedrig. Naturgemäß wurden geringste Kohlenhydratanteile bei Ligninen ermittelt, die aus Aufschlüssen unter Zugabe von Schwefelsäure stammten. Ein veringertes Flottenverhältnis von 3:1 im Vergleich zum Aufschluss mit einer Flotte von 6:1 macht sich nicht negativ auf den Restkohlenhydratanteil bemerkbar (Tab. 2-7)

Die Molmassenverteilungen der erhaltenen Lignine wurden durch Größenausschlusschromatographie in DMSO/LiBr an Säulen vom Typ PL PolarGel erhalten. Die ermittelten Molmassen lagen zwischen 5.200 g/mol und 6.100 g/mol, wobei die Lignine aus Kochungen unter Zusatz von Schwefelsäure weniger niedermolekulare Bestandteile enthielten (s. Abb. 2-32). Bedingt durch die längere Kochzeit (4 h) der Aufschlüsse ohne Schwefelsäure lagen die Molmassen der entsprechenden Lignine geringfügig höher als solche, die in Gegenwart von Schwefelsäure nur 2 Stunden aufgeschlossen wurden. Interessanterweise hat sich die Gegenwart der Schwefelsäure nicht negativ durch Kondensationsreaktionen am Lignin ausgewirkt.

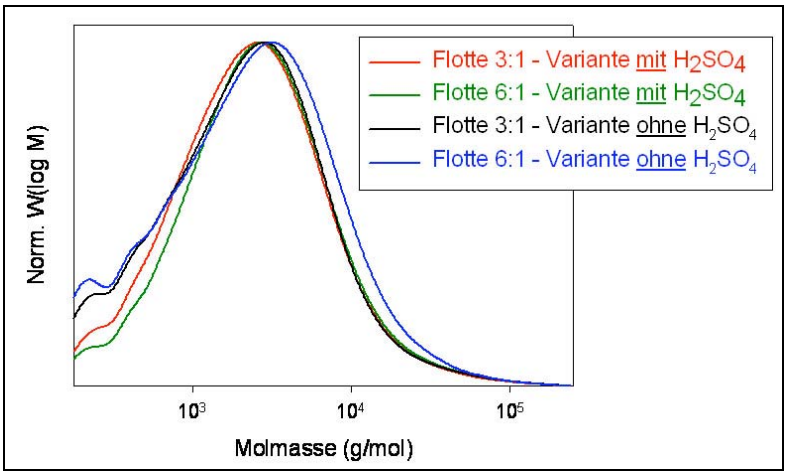


Abb. 2-32: Molmassenverteilungen der OrganoSolv-Lignine (Quelle: vTI)

Die erhaltenen Lignine wurden weiterhin durch verschiedene Kernspinnresonanzspektroskopische Verfahren charakterisiert. Die ^{1}H-NMR erlaubte nach Acetylierung der Lignine eine Bestimmung der Methoxylgruppen (Abb. 2-33). Die ^{31}P-NMR-Spektroskopie ließ eine quantitative Unterscheidung der phenolischen OH-Gruppen an Syringyl-, Guajacyl- und *p*-Hydroxyphenolbausteinen zu (Abb. 2-34).

Die quantitativen Daten aus der Ermittlung der Molmassen (Abb. 2-32), der Protonen-NMR-Spektroskopie (Abb. 2-33) und der Phosphor-NMR Spektroskopie (Abb. 2-34) sind in Tab. 2-8 in der sogenannten C900-Formel zusammengefasst. Bemerkenswert ist der leicht erhöhte Anteil an Methoxylgruppen der unter Zugabe von Schwefelsäure erhaltenen Lignine, während der Protonengehalt am Ring bei den Ligninen leicht erhöht ist, die ohne Schwefelsäure erkocht wurden.

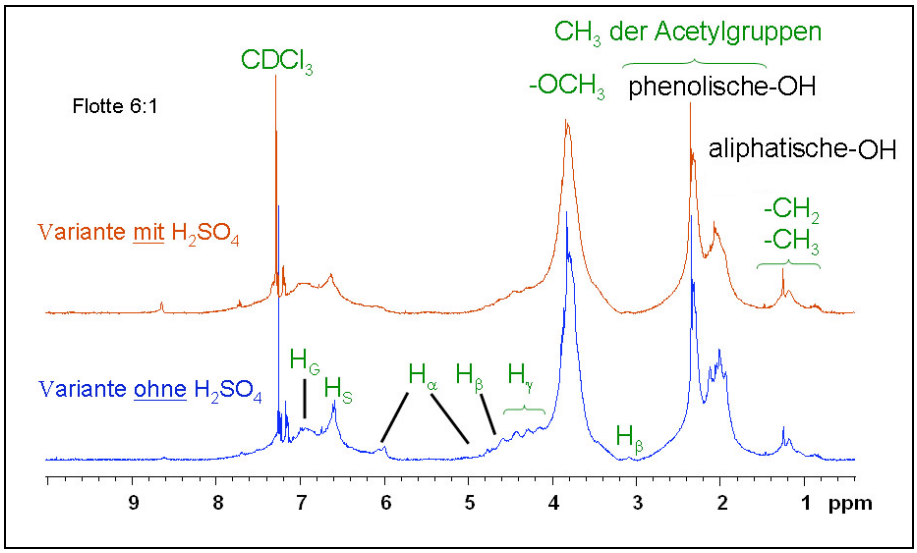


Abb. 2-33: ^{1}H-NMR Spektroskopie der Lignine aus der Lignocellulose-Bioraffinerie nach Acetylierung (Quelle: vTI)

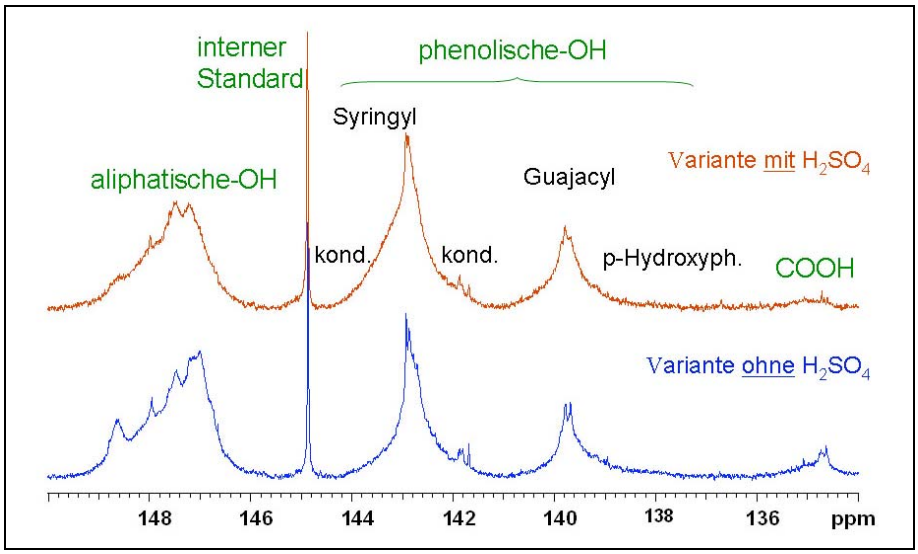


Abb. 2-34: ^{31}P-NMR Spektroskopie der Lignine aus der Lignocellulose-Bioraffinerie zur Bestimmung der OH-Gruppen. Phosphitylierungs-Reagenz: 2-Chloro-4,4,5,5,-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholane (Quelle: vTI)

Zu besseren Einschätzung der Daten aus Tab. 2-8 sind in Tab. 2-9 die OH-Gruppen pro C900-Einheit von Ligninen aus unterschiedlichen Aufschlussverfahren wiedergegeben. Es wird deutlich, dass das Buchenholzlignin der Lignocellulose-Bioraffinerie die höchsten Anteile an phenolischen und aliphatischen OH-Gruppen besitzt. Dabei handelt es sich um jene funktionellen Gruppen, die für die Reaktivität des Lignins besonders wichtig sind.

Tab. 2-8: C900 Formel: Methoxyl- und OH-Gruppen, Protonen an Ring & Seitenkette sowie Molmassen der Lignine aus der Lignocellulose-Bioraffinerie (Quelle: vTI)

Flotte	OCH_3	Σ OH	$H_{Syringyl}$	$H_{Gyacacyl}$	$H_{\gamma\beta\alpha}$	$-CH_2$ $-CH_3$	Mw [g/mol]
			Variante mit Schwefelsäure				
6:1	***149***	0,0	70	60	82	50	5.700
3:1	***156***	0,1	80	68	122	34	5.200
			Variante ohne Schwefelsäure				
6:1	135	0,1	***91***	***69***	138	41	6.100
3:1	127	0,0	***86***	***68***	117	34	5.300

Tab. 2-9: Vergleich der OH-Gruppen pro C900-Einheiten von Ligninen aus unterschiedlichen Aufschlussverfahren (Quelle: vTI)

Verfahren	Rohstoff	OH_{phen}	OH_{aliph}
Bioraffinerie (+Kat.)	***Buche***	***84***	***65***
Acetosolv	Pappel	61	63
Formacell	Aspe	81	36
Alcell	LH-Mischung	71	50
Milox	Birke	63	23
Dampfdruck	Pappel	55	61
Kraft	NH-Mischung	55	62

Am ICT wurden zur ausführlichen Charakterisierung der erhaltenen Lignine Infrarotspektroskopie (IR), thermische Analysen (TGA, DSC), Gelpermeations-Chromatographie (GPC) und Elementaranalyse verwendet. Die Abb. 2-35 – Abb. 2-38 und Tab. 2-10 zeigen die Analysenergebnisse von Organosolv-Buchenlignin aus den „quasi-kontinuierlichen“ Aufschlüssen des ICT.

Tab. 2-10: Elementaranalyse eines Organosolv-Buchenlignins (Quelle: ICT)

Elementaranalyse [%]					Massenbilanz [%]
N	C	H	S	O	
0,3	61,37	5,82	0	30,84	98,3

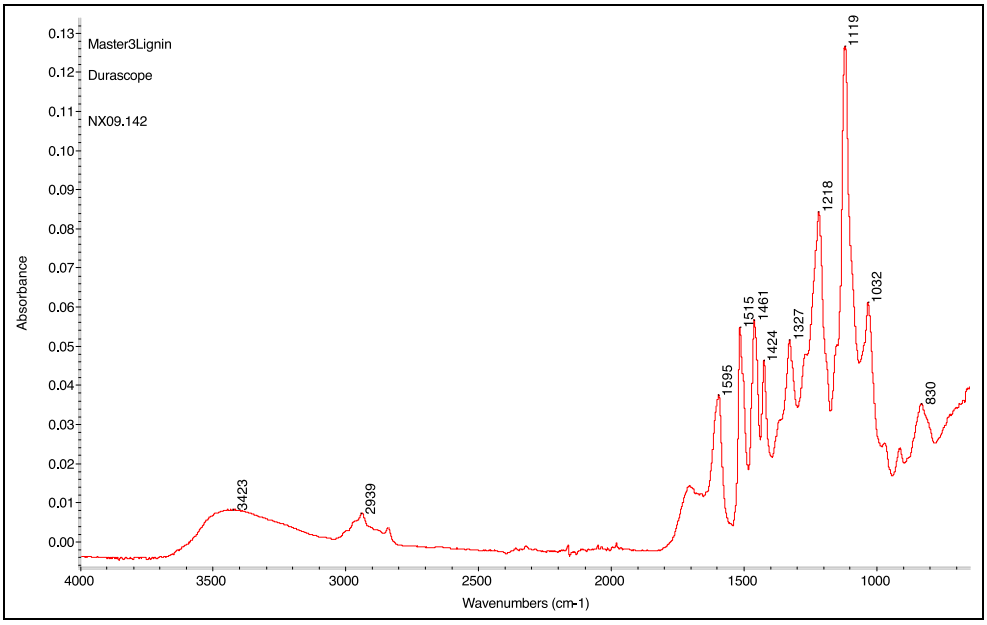


Abb. 2-35: IR-Spektroskopie eines Organosolv-Buchenlignins (Quelle: ICT)

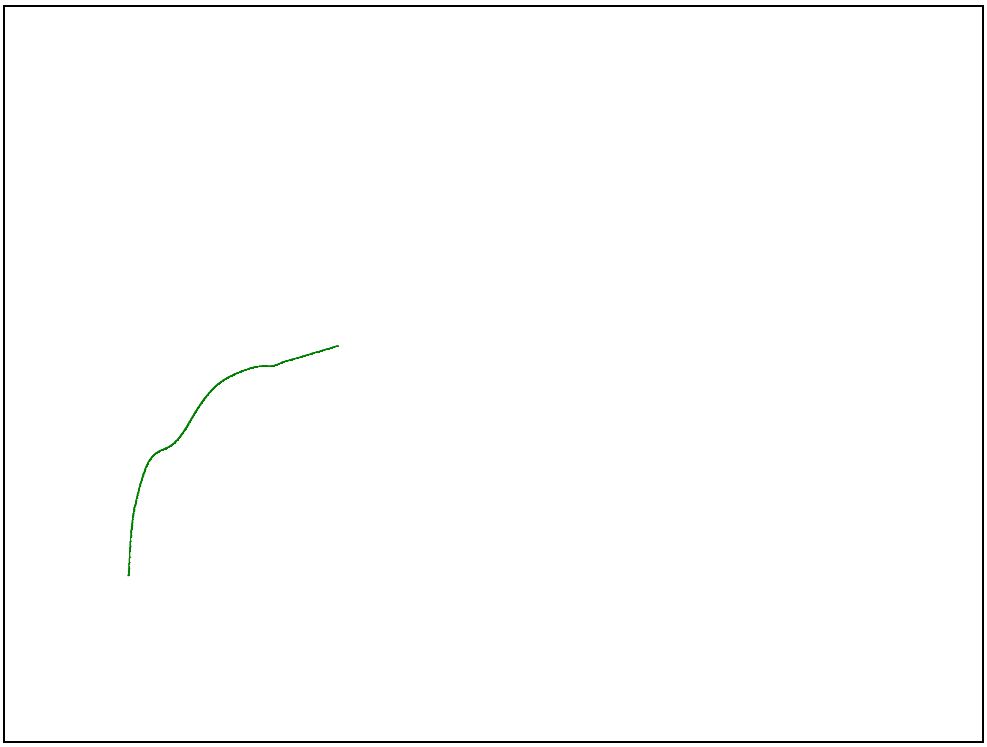


Abb. 2-36: DSC eines Organosolv-Buchenlignins (Quelle: ICT)

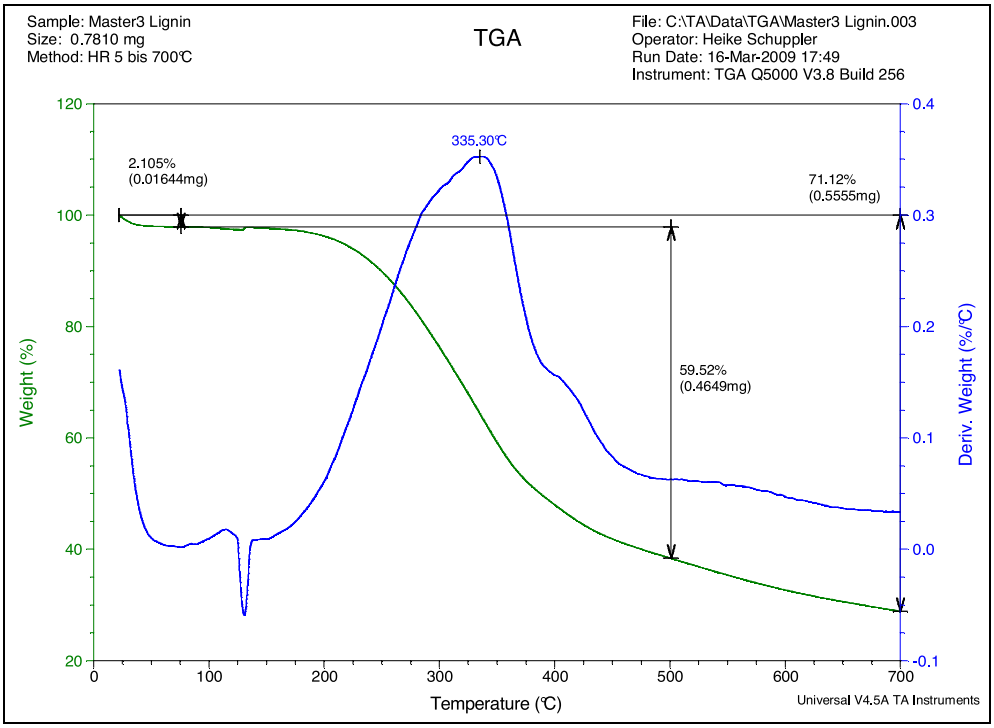


Abb. 2-37: TGA eines Organosolv-Buchenlignins (Quelle: ICT)

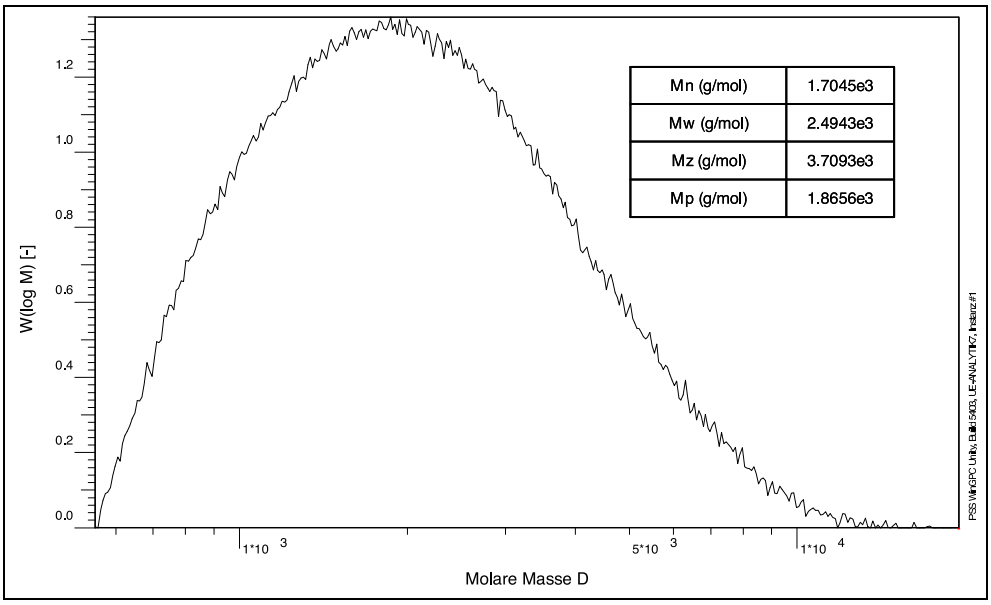


Abb. 2-38: GPC eines Organosolv-Buchenlignins (Quelle: ICT)

AP2-2 Komponententrennung (AP 2.2)

AP2-2.1 Auftrennung der Komponenten nach Aufschluss im diskontinuierlichen Maßstab (10-kg-Maßstab), Lösungsmittelrückgewinnung und Bereitstellung von Proben für anwendungstechnische Untersuchungen (AP 2.2.1)

AP2-2.1.1 Komponententrennung nach Ethanol-Wasser-Aufschluss (vTI, ICT, BTS)

Bisher erfolgte die Komponententrennung basierend auf Aufschlüssen im 1-kg-Maßstab. Die Abtrennung der Cellulosefraktion erfolgte durch Zentrifugation und Nachwäsche mit dem Aufschlussmedium. Nach Abtrennung der Cellulosefraktion enthielt die Aufschlusslösung (bestehend aus Ethanol + Wasser) die Lignin- und die Hemicellulosenfraktion. Es hat sich als günstig erwiesen, die Ligninfraktion durch weitere definierte Zugabe von Wasser auszufällen. Das so gefällte Lignin besaß eine partikuläre Struktur, die eine weitere Reinigung durch Wäsche und eine gleichmäßige Trocknung erlaubte. Der alternative Weg der Ligninfällung durch Destillation des Ethanols erwies sich als weniger praktikabel, da eine schwierig zu handhabende pastöse Masse erhalten wurde.

Das vTI unternahm erfolglos Experimente im Technikum der TU Hamburg-Harburg zur Ligninfällung aus der Aufschlusslösung durch Einleiten von überkritischem CO_2. Im Verlauf der Untersuchungen stellte sich heraus, dass in Aceton gelöstes Lignin durch CO_2-Einleitung durchaus fällbar war. Das Prinzip funktionierte jedoch nicht mit nativem, in Ethanol-Wasser gelöstem Lignin. Deshalb wurden am vTI auch im 10-kg-Maßstab das Lignin durch Zutropfen der Aufschlusslösung in kaltes Wasser gefällt, wobei das Endverhältnis Aufschlusslösung:Wasser = 1:1 betrug. Das gefällte Lignin wurde anschließend auf einer Nutsche gewaschen und im Vakuumtrockenschrank bei 40 °C getrocknet.

Das ICT entwickelte eine Lösung zur Fällung des Lignins mittels pH-Shift aus einer basischen Lösung durch Salzsäure-Zugabe. Bei dieser Vorgehensweise erhielt man einen sehr groben Niederschlag, welcher sich gut filtrieren ließ. Wegen des hohen Chemikalienbedarfs wurde dann auch am ICT auf die Methode zurückgegriffen, in der das gelöste Lignin durch schnelle, definierte Wasserzugabe aus der wässrig-ethanolischen Fraktion gedrängt wird. Die Rückgewinnung des Lösungsmittels erfolgt nach der Abtrennung des Lignins.

Alternative Möglichkeiten der Lignin/Hemicellulosentrennung wurden durch BTS untersucht. Dabei konnten weder mit kuchenbildender Filtration, noch mit Zentrifugation oder Flockungshilfsmitteln eine ausreichende Trennung erzielt werden, die in einer großtechnischen Anlage so verfahrenstechnisch und wirtschaftlich sinnvoll realisiert werden könnte (wie in den Abb. 2-39 und Abb. 2-40 deutlich wird)

BTS schlägt vor, die Art der Fällung und Zugabestrategie zu optimieren mit dem Ziel, das Lignin in eine Form zu bringen, die die Filtrierbarkeit ermöglicht bzw. erleichtert.

Folgende Varianten sind möglich, wurden allerdings Projektzeitraum nicht realisiert:

- Verdüsen nach Frischdampfzugabe im Dampfstripper, um die Partikel direkt bei der Entstehung voneinander zu trennen
- Ultrafiltration mit nachgeschalteter Diafiltration zum Auswaschen der Hemicellulose und anschließender Verdampfung des Restwassergehaltes
- Adsorption an geeignetem Adsorbens und anschließende Desorption, z.B. mit THF

Der Einsatz von nicht-ionischen (N3100L), anionischen (A3040L) und kationischen (233L) Flockungshilfsmitteln erbrachte ebenfalls nur geringen bis gar keinen Effekt, der Überstand war nach wie vor stark trüb. Lediglich die Zugabe größerer Mengen (1 ml FHM-Lösung auf 10 ml Suspension) führte zu einem leichten Effekt beim Einsatz des kationischen Typs.

Eine Beurteilung dieser Ergebnisse ergibt allerdings, dass die Anwendung von Flockungsmitteln zur Verbesserung der Trennung wegen des geringen Effekts in großtechnischen Anlagen wirtschaftlich nicht sinnvoll ist.

Im Zentrifugalfeld:		
Beurteilung:	Lignin-Suspension nach Aufschluss, Celluloseabtrennung, Fällung mit Wasser ?:? und Ethanoldestillation wässrige Suspension abzentrifugiert keine Trennung nach 16 min bei 3500 g	Lösung nach Aufschluss und Celluloseabtrennung ethanolische Lösung mit Wasser 1:1 gefällt, entstandene Lignin-Suspension abzentrifugiert, keine Trennung nach 16 min bei 3500 g
	→ Keine Abtrennung durch Sedimentation möglich	

Abb. 2-39: Ergebnisse der Trennung des Lignins aus der Fraktion nach Aufschluss und Abtrennung der unlöslichen Cellulose (Quelle: BTS)

Messungen der Partikelgrößenverteilung ergaben folgendes Bild (Abb. 2-40), welches eine sehr breite Verteilung zeigt. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit den Schwierigkeiten bei der Abtrennung in Einklang bringen.

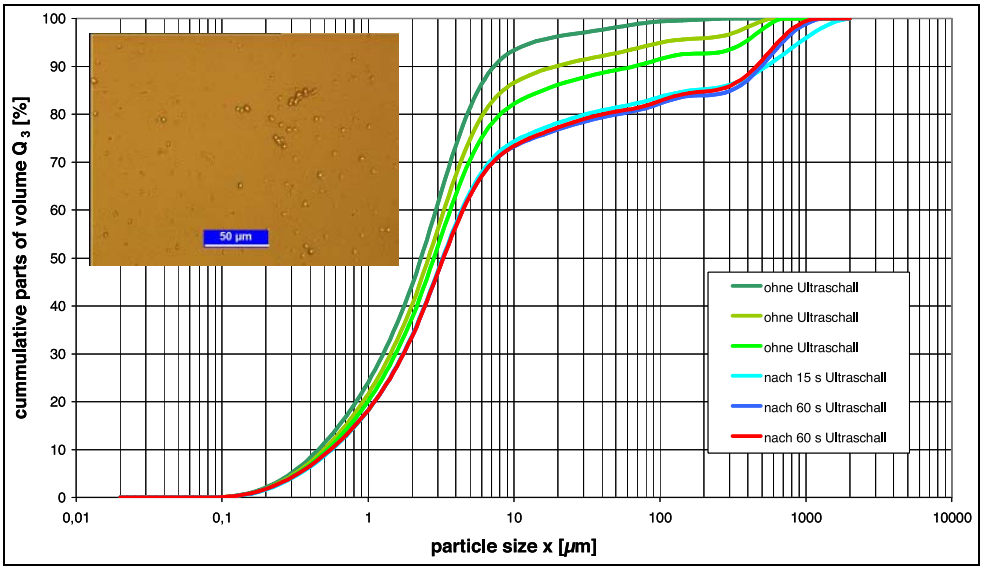


Abb. 2-40: Partikelgrößenverteilung der gelieferten Lignin-Probe, sowie mikroskopische Aufnahme (Quelle: BTS)

Die Möglichkeit einer Fällung ohne Wasserzugabe über eine Rektifikationskolonne wurde bei BTS geprüft. Details finden sich im AP2-2.2 zur kontinuierlichen Komponententrennung.

Da sich anfangs die Komponententrennung, insbesondere eine gleichbleibende Fällung von Lignin aus der Aufschlusslösung, als schwierig herausgestellt hat, wurde in der zweiten Phase des Projektes dieser Punkt verstärkt untersucht.

Am Fraunhofer ICT erfolgte eine Messung des Zeta-Potentials von Organosolv-Buchenlignin unter verschiedenenen Annahmen, die zum Teil mit Literaturdaten unterstützt wurden. Das Ergebnis zeigt Abb. 2-43.

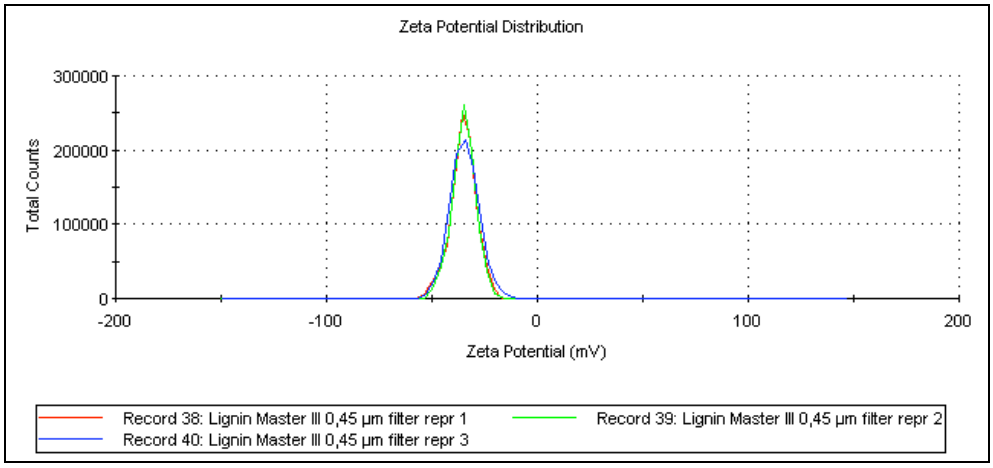


Abb. 2-41: Zeta-Potentialverteilung von Organosolv-Buchenlignin (Quelle: ICT)

Im Mittelwert beträgt das Zeta-Potential der Probe unter Berücksichtigung verschiedener Näherungen ca. -35 mV. Außerhalb des Intervals -30 mV bis 30 mV gelten Partikel als elektrostatisch stabilisiert.

Diese Messung bestätigt die Vermutungen, das Lignin eine negativ geladene Oberfläche besitzt, die eine Agglomeration erschwert. Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen von gefälltem Produkt zeigen, dass sich die Aglomerate aus nanoscaligen Primärpartikeln zusammensetzen (siehe Abb. 2-42).

Die Ligninfällung durch Zugabe von Wasser wurde ausführlich untersucht. Dabei zeigte sich ein großer Temperatureinfluss bei der Fällung: Je höher die Temperatur bei der Fällung, desto geringer ist die Agglomeration der Partikel. Als Grenzwert wird eine Temperatur von ca. 40 °C angenommen.

Auch die Art der Zugabe von Wasser ist entscheidend für die Fällung. So konnte eine Methode zur kontinuierlichen Fällung von Lignin durch Mischen von Aufschlusslösung mit der vierfachen Menge Wasser in einem statischen Mischer entwickelt werden.

Die Wassermenge, welche zur Fällung notwendig ist (um die Ethanolkonzentration schlagartig zu senken) kann reduziert werden, wenn die Aufschlusslösung von einem Anteil von 50% Ethanol auf einen Ethanolgehalt von 30% aufkonzentriert wird. Diese Aufkonzentrierung kann durch Flashen oder durch Fallfilmverdampfung erfolgen.

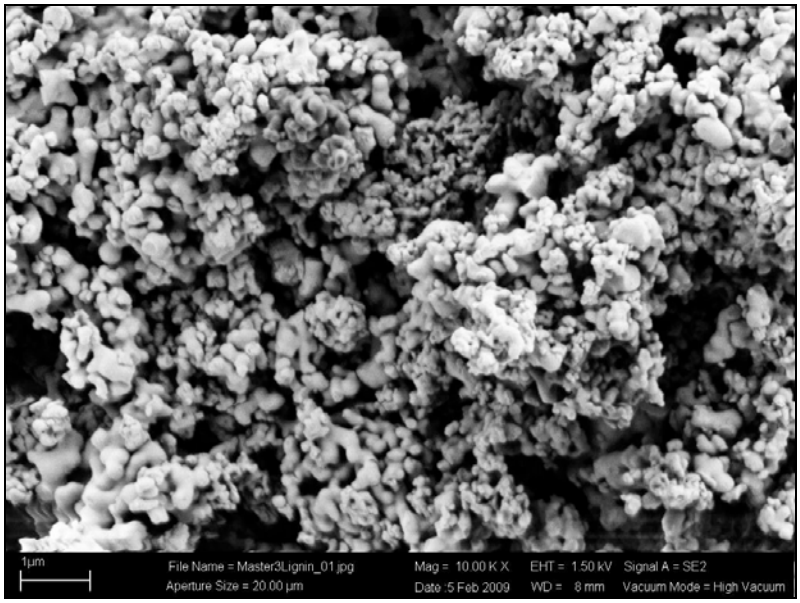


Abb. 2-42: REM von gefälltem Buchenholzlignin (Quelle: ICT)

Da eine Fällung ganz ohne Wasserzugabe angestrebt wird, wurden Versuche zur Destillation der Aufschlusslösung gemacht: Im Sumpf wurde Wasser vorgelegt. Bei 35 °C und < 200 mbar erfolgte dann die Destillation, indem immer so viel Aufschlusslösung in den Sumpf gefahren wurde, wie Ethanol/Wasser-Azeotrop über Kopf abdestilliert wurde. Dabei konnte eine filtrierbare, hell-beige Ligninfraktion gewonnen werden. Dieses Ergebnis wurde von BTS auf eine Rektifikation übertragen (s. AP2-2.2).

AP2-2.1.2 Komponententrennung nach Lösung in ionischen Flüssigkeiten (Uni Rostock, Uni Erlangen)

Aus der Literatur ist bekannt, dass in IL gelöste Cellulose durch Eintrag von Antisolventien (Wasser oder Ethanol) wieder ausgefällt werden kann. Entsprechend wurde die heiße Holzlösung in die 4-fache Menge heißes Lösungsmittel (Wasser, Wasser/Ethanol, Ethanol) eingerührt. Dabei fielen sofort die Cellulose und das Lignin aus. Die Hemicellulosen blieben zusammen mit der IL in Lösung. Das gefällte Material wurde filtriert, gewaschen, getrocknet und analytisch gekennzeichnet (Hydrolyse und HPLC-Quantifizierung der Zucker am vTI).

Die Ergebnisse zeigten, dass je nach Wahl des Fällungsmittels sich die Verhältnisse von gefällter Cellulose zu gefälltem Lignin stark unterscheiden. Die Verwendung von Ethanol resultierte in einem Cellulose:Lignin-Verhältnis von 9:1. Ethanol/Wasser-Gemische ergaben 6:1 und reines Wasser 3:2. In allen drei genannten Fällen blieben die Hemicellulosen zusammen mit der IL in Lösung.

AP2-2.2 Entwicklung und Optimierung eines kontinuierlichen Verfahrens zur Komponententrennung nach dem Aufschluss von Buche und Pappel, Lösungsmittelrückgewinnung und Bereitstellung von Proben für anwendungstechnische Untersuchungen (AP 2.2.2)

Im Bereich der Aufschlussbedingungen lieferte BTS konzeptionell als auch apparativ Unterstützung der anderen Partner z.B. zur Apparateauswahl und den Stoffeigenschaften.

Bei BTS wurden Versuche zur Abtrennung der Ligninfraktion ohne Wasserzugabe in einer Destillationskolonne durchgeführt. Die Tab. 2-11a-c zeigen die verschiedenen Variationen und eine qualitative Interpretation der Ergebnisse. Die Trennung mittels Destillation scheint unter gewissen Bedingungen möglich, die apparative Realisierung gestaltet sich allerdings u.a. aufgrund von im Verlauf ausfallendem Lignin als schwierig. Eine Beschichtung der Kolonne zur Vermeidung von Anhaftungen sowie die Austragsmöglichkeit für den evtl. anfallenden Feststoff sollten bedacht werden. Die Bildung des teerartigen Feststoffs in der Kolonne und des pulverförmigen nach Zentrifugation des Sumpfs scheint zu zwei Qualitäten an Lignin zu führen. Zu dieser Tatsache, sowie der apparativen Realisierung ist im beantragten Folgeprojekt eine weitere eingehende Betrachtung zu empfehlen.

Tab. 2-11a:Ergebnisse der Destillationsversuche unter Laborbedingungen (Einsatz: Aufschlusslösungen des ICT, Wasser/Ethanol 50:50, verschiedene Ligningehalte, Lsg1: 3%, Lsg2: 3%, Lsg3: 9%) (Quelle: BTS)

Versuch:	**Eindampfung unter Rühren (Einsatz Lsg 1)**
Durchführung:	Im Becherglas
Ergebnis:	Ausfallen einer teerartigen Substanz
Verlauf:	Nach Destillation von ca. 30 % der Gesamtlösung
Bemerkung:	Vgl Anmerkung vom ICT (s.o.), Fällung des Restlignins durch Wasserzugabe in den Überstand → nur unvollständig. Fällung in Säure führt zu klarem Überstand und max. Feststoffgehalt (vgl. ICT (Kap. AP2-2.1.1))
Versuch:	**Eindampfung unter Wasserzugabe (Einsatz Lsg 1)**
Durchführung:	Im Rotationsverdampfer bei Np
Ergebnis:	Ausfallen einer teerartigen Substanz
Verlauf:	Nach Destillation von knapp 20 % der Gesamtlösung. Konstanthaltung des Füllstand im Sumpf durch Zugabe von Wasser entsprechend des destillierten Ethanol-Anteils
Bemerkung:	Der hellbraun milchig trübe Überstand konnte via Zentrifugation (15 s bei 3000 U/min) vollständig geklärt werden

Tab. 2-11b:Ergebnisse der Destillationsversuche in der Flashverdampfungsanlage (Medieneinsatz: s. Tab. 2-11a) (Quelle: BTS)

Versuch:	**Überhitzt mit Dampf, über Düse verdampft (Einsatz Lsg 1)**
Durchführung:	**T=90 °C, 2 bar vor Düse**
Ergebnis:	Ganz fein dispers, teerartig
Verlauf:	Verhältnis EthOH/Wasser verschoben →1,2 L abdestilliert, 70 % Ethanol
Bemerkung:	Kein hellbraunes und gut abtrennbares Produkt erzeugbar
Versuch:	**Überhitzt mit Dampf, über Düse verdampft (Einsatz Lsg 1)**
Durchführung:	**Umlauf reduziert, T=128 °C, 6,8 bar**
Ergebnis:	Ganz fein dispers, teerartig
Verlauf:	→ 3,6 L abdestilliert, 70 % Ethanol
Bemerkung:	Kein hellbraunes und gut abtrennbares Produkt erzeugbar
Versuch:	**Überhitzt mit Dampf, über Düse verdampft (Einsatz Lsg 1)**
Durchführung:	**Direkte Zugabe, T=170 °C, 11 bar**
Ergebnis:	Ganz fein dispers, teerartig
Verlauf:	Wasser vorgelegt und Produkt zugefahren
Bemerkung:	Kein hellbraunes und gut abtrennbares Produkt erzeugbar

Tab. 2-11c:Ergebnisse der Destillationsversuche in der Destillationskolonnenanlage
(Medieneinsatz: s. Tab. 2-11a) (Quelle: BTS)

Versuch:	**Einsatz Lsg 2**
Durchführung:	**Kolonne mit Glockenböden**
Ergebnis:	Ausfallen einer teerartigen Substanz im Bodenbereich
Verlauf:	Zusetzen der Böden, hellbraun milchig trübe Lösung im Sumpf
Bemerkung:	Funktion gegeben → apparative Optimierung nötig
Versuch:	**Einsatz Lsg 2**
Durchführung:	**Umbau: Einbau von Traufenböden**
Ergebnis:	hellbraun milchig trübe Lösung in der gesamten Kolonne
Verlauf:	Kavitation der Umlaufpumpe, Kompression des spontan ausfallenden Lignin → teerartiger Feststoff
Bemerkung:	Funktion gegeben → weitere apparative Optimierung nötig
Versuch:	**Einsatz Lsg 3**
Durchführung:	**Frische Lösung, Anpassung des Pumpenzulaufs und der Kühlung**
Ergebnis:	Ausfällung auf den Böden als polymeratig fadenziehende Substanz (anderes Produkt?)
Verlauf:	Sumpfprobe in mehreren Durchgängen zentrifugiert (Überstand nie klar) und getrocknet → Produkt an ICT zur Analyse
Bemerkung:	Gegentest mit Ausfällung in Wasser (2:1) und Zentrifugation ergab keine Auffälligkeiten, 9 % Feststoff erhalten

AP2-2.3 Analytische Charakterisierung der erhaltenen Fraktionen für die anwendungstechnischen Untersuchungen (AP 2.2.3)

AP2-2.3.1 Cellulosefraktion

Die Cellulosefraktionen wurden auf ihre Zugänglichkeit für die Enzyme des Cellulasekomplexes bestimmt. Hierfür wurde das Material in 2 %iger Stoffdichte mit 20 FPU/g (Celluclast und Novozyme 188) über 24 h, 48 h und 72 h bei 40 °C bei pH 4.8 inkubiert und die freigesetzten Monosaccharide durch HPLC quantifiziert. Aus AP 2.1.4 (s. AP2-1.5) war die Kohlenhydratzusammensetzung der Cellulosefraktion bekannt. Entsprechend konnte die enzymatisch freigesetzte Zuckermenge mit den tatsächlich vorhandenen Kohlenhydraten in Verbindung gesetzt werden.

Es wurden vom vTI Cellulosefraktionen an die Partner BTS, TU Kaiserslautern, Biopos und TU München für anwendungstechnische Untersuchungen gegeben.

Es wurden vom ICT Cellulosefraktionen für weitere Untersuchungen an die Partner vTI, TU Kaiserslautern und BTS gegeben.

AP2-2.3.2 Hemicellulosenfraktion

Nach Ausfällen des Lignins und Ethanolrückgewinnung (Destillation) wurde ein aliquoter Anteil der wässrigen Fraktion gefriergetrocknet. Das Material wurde wiederum durch analytische saure Hydrolyse in seine Monosaccharide überführt, die durch HPLC quantifiziert wurden. Parallel hierzu

wurde auch eine Bestimmung der Zuckerzusammensetzung in der wässrigen Lösung durchgeführt. Gleichzeitig erfolgte eine Quantifizierung der erhaltenen Furfural- und Essigsäureanteile. Für einige Hemicellulosenfraktionen erfolgte eine Bestimmung der Kettenlängenverteilung durch Größenausschlusschromatographie (SEC). Es zeigte sich, dass die Hemicellulosenketten im Verlauf des Aufschlusses bereits intensiv zu Oligosachariden fragmentiert worden waren.

Es wurden vom vTI Hemicellulosenfraktionen an die Partner BTS und TU Kaiserslautern für anwendungstechnische Untersuchungen gegeben.

Es wurden vom ICT Hemicellulosenfraktionen für weitere Untersuchungen an die Partner vTI, TU Kaiserslautern und BTS gegeben.

Eine der Hemicellulosenfraktionen vom ICT wurde bei BTS einer Membranfiltration unterzogen. Dabei sollte die Frage geklärt werden, ob eine Aufkonzentrierung unter wirtschaftlichen Bedingungen möglich ist.

Der Einsatz einer Membranfiltration an dieser Stelle im Prozess kann folgende Effekte haben bzw. Möglichkeit eröffnen:

- Erhöhung der Produktkonzentration (hier Hemicellulose)
- Rückführung des Wasserstroms (Permeat ohne HC) in den Prozess
- mögliche Fraktionierung der Teilkomponenten HC und Lignin in einem nachgeschalteten Schritt, dadurch
- Verringerung der Ligninverluste in der HC-Fraktion
- Abtrennung der sich anreichernden Nebenkomponenten wie Furfurale oder Essig- und Ameisensäure.

Manche der Effekte sind allerdings gegenläufig. Bei einer näheren Betrachtung dieser Verfahrensoption sollte die Trenngrenze der Membran entsprechend ausgewählt werden.

Die folgende Abb. 2-43 zeigt den Verlauf einer Konzentrierung unter Einsatz einer Nanofiltrationsmembran (Hersteller: GE Osmonics, CutOff = 300 – 400 g/mol) bei Drücken von 10 – 40 bar bei sinkendem Fluss. Die Flüsse sind verhältnismäßig klein, und geringe Mengen an dunkelbraunem Präzipitat (vermutlich Lignin) fallen an. Eine Aufkonzentrierung bis hin zu einem Faktor von 35 ist jedoch möglich. Im Konzentrat scheint aufgrund der Farbe ebenfalls Lignin vorhanden zu sein. Eine qualitative Analyse konnte im Projektzeitraum nicht mehr durchgeführt werden.

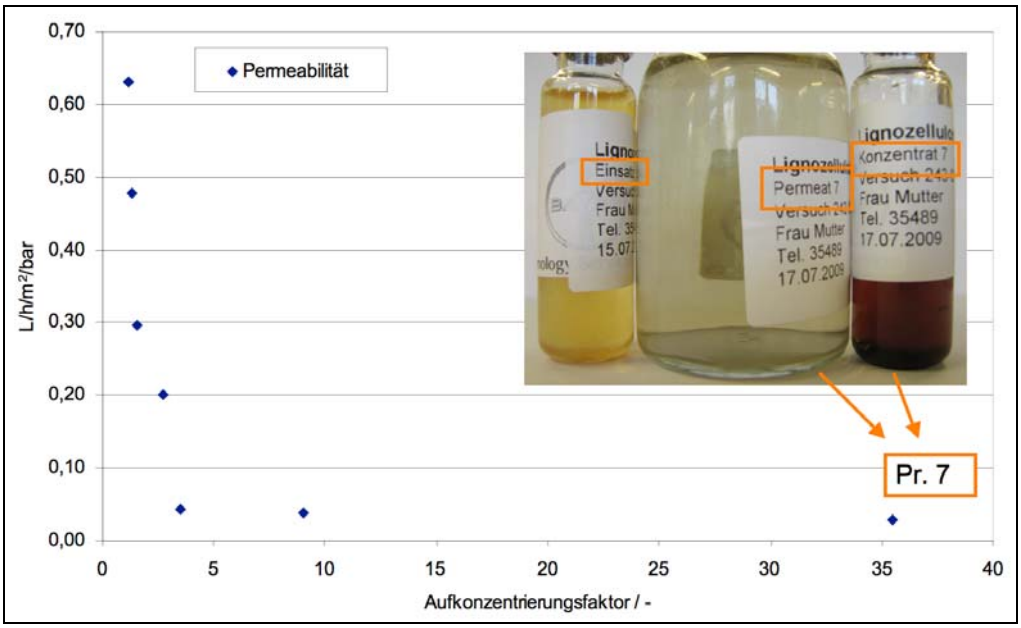


Abb. 2-43: Verlauf einer Nanofiltration der Hemicellulosenfraktion. Augetragen ist die Permeabilität in L/h bezogen auf die eingesetzte Membranfläche in m² und den aufgebrachten Druck in bar über dem Aufkonzentrierungsfaktor im Laufe des Versuchs (Quelle: BTS)

Diese Verfahrensvariante kann auf Basis dieses Versuchs zur generellen Machbarkeit für eine Optimierung der Verwertung der HC-Fraktion in Betracht gezogen und unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten betrachtet werden.

AP2-2.3.3 Ligninfraktion

Die generelle analytische Charakterisierung der erhaltenen Ligninfraktion wurde in Kap. AP2-1.5.3 dokumentiert Spezielle analytische Charakterisierungen für die anwendungstechnischen Untersuchungen wurden direkt von den Partnern ICT, Dynea und Uni-Erlangen durchgeführt und in den Kapiteln zu den anwendungstechnischen Untersuchungen mit dokumentiert (s. Kap. AP3-3).

Es wurden von vTI Ligninfraktionen an Dynea und BTS und TU Kaiserlautern gegeben. Eine weitere Ligninprobe wurde dem Institut für Technische und Makromolekulare Chemie (ITMC), RWTH Aachen überlassen.

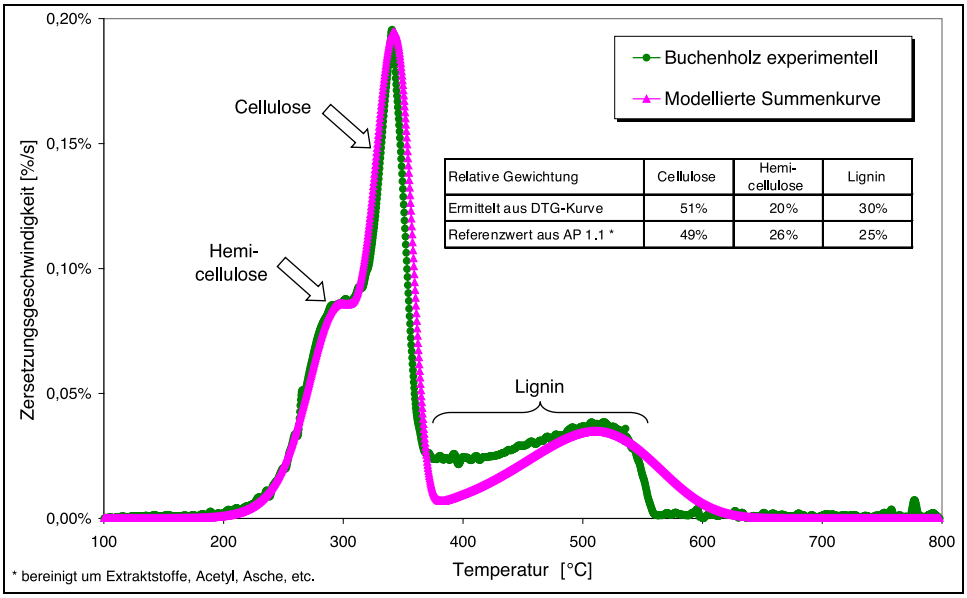
Es wurden von ICT Ligninfraktionen für weitere Untersuchungen an vTI, TU Kaiserlautern, BTS und Uni Erlangen gegeben.

AP2-2.4 Entwicklung einer thermogravimetrischen Methode zur Komponentenbestimmung (Uni Erlangen)

In Erlangen wurde eine schnelle Methode zur ungefähren quantitativen Bestimmung (± 5 Gew-%) der Holzkomponenten Hemicellulosen, Cellulose, Lignin entwickelt (Abb. 2-44).

Vorgehensweise:

- Durchführung einer thermogravimetrischen Analyse (benötigte Probenmenge ca. 10 mg).
- Auftragung der 1. Ableitung (prozentualer Massenverlust/Zeiteinheit) der thermogravimetrischen Kurve gegen die Temperatur (→ DTG-Kurve).
- Mathematische Annäherung der DTG-Kurve mittels Zerfallskinetiken einzelner Holzkomponenten; hierfür muss die Aktivierungsenergie und der Stoßfaktor bekannt sein (Literaturwerte).
- Die prozentuale Gewichtung der modellierten Kurven gibt in etwa den Anteil der Komponenten in der untersuchten Biomasse wieder.
- Hemicellulose und Cellulose lassen sich gut modellieren; Lignin wegen Zersetzung in einem breiten Temperaturbereich eher schlecht.



Relative Gewichtung	Cellulose	Hemi-cellulose	Lignin
Ermittelt aus DTG-Kurve	51%	20%	30%
Referenzwert aus AP 1.1 *	49%	26%	25%

Abb. 2-44: Experimentell ermittelte und kinetisch modellierte DTG-Kurve der Zersetzung von Buchenholz (Netzsch TG 209 F3; Atmosphäre: Luft; Heizrate: 10 K/min) (Quelle: Uni Erlangen)

AP2-3 Literatur

Bozell, J.J., J.O. Hoberg, D.R. Dimmel: Heteropolyacid Catalyzed Oxidation of Lignin and Lignin Models to Benzoquinones, Journal of Wood Chemistry and Technology 20:1,19-41 (2000)

Ebner, G., S. Schiehser, A. Potthast, Th. Rosenau: Side reaction of cellulose with common 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids. Tetrahedron Lett. 49, 51, 7322-7324) (2008)

Freger, V., T. C. Arnot, J. A. Howell: Separation of concentrated organic/inorganic salt mixtures by nanofiltration. Journal of Membrane Science; 178, 185-193 (2000)

Fukaya, Y., Hayashi, D., Wada, M., H. Ohno: Cellulose dissolution with polar ionic liquids under mild conditions: required factors for anions. Green Chemistry 10, 44-46 (2008)

Kröckel, J.: Diplomarbeit, Universität Rostock (2001)

Roginsky, V.A., G. Bruchelt, H.B. Stegmann: Fully Reversible Redox Cycling of 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinone Induced by Ascorbate.
<http://www.maik.ru/abstract/biochmsc/98/biochmsc0200_abstract.pdf> (1997) (last accessed: 09.02.2009)

Söderholm, P., R. Lundmark: Forest-based biorefineries: Implications for market behaviour and policy. Forest Prod. J. 59, 6-16 (2009)

Yawalata D., L. Paszner: Characteristics of NAEM salt-catalyzed alcohol organosolv pulping as a biorefinery. Holzforschung 60, 239-244 (2006)

AP2-4 Fazit

Die Arbeiten für den **Meilenstein 3** *„Optimale Aufschlussbedingungen im diskontinuierlichen Maßstab ermittelt und Fraktionen charakterisiert“* konnten erfolgreich abgeschlossen werden:

- Die Aufschlussbedingungen konnten in Bezug auf Lösungsmittelzusammensetzung, Katalysatorzusatz, Flottenverhältnis und Verweildauer im 1-kg-Maßstab optimiert werden.
- Die optimierten Aufschlussbedingungen konnten in den 10-kg-Maßstab übertragen werden.
- Der Aufschluss in ionischen Flüssigkeiten wurde durch Kochen, Mikrowelle und Ultraschall untersucht und das Lösungsvermögen unterschiedlicher IL erfolgreich getestet. Primär durch die hohen Kosten der IL (gegenüber Organosolv) erscheint eine technische Anwendung nicht sinnvoll.
- Die erhaltenen Fraktionen Cellulose, Hemicellulose und Lignin wurden für die Weiterverarbeitung charakterisiert und den entsprechenden Partnern des AP 3 zur Verfügung gestellt.

Die Ergebnisse flossen in die Konzeption des kontinuierlichen Aufschlussverfahrens ein. Der **Meilenstein 4** *„Kontinuierliches Aufschlussverfahren konzipiert und validiert“* konnte ebenfalls erfolgreich abgeschlossen werden.

Ergebnisse zur Komponententrennung nach erfolgtem Aufschluss können wie folgt zusammengefasst werden:

- Bei der Komponententrennung nach dem OrganoSolv-Aufschluss hat sich die Fällung des Lignins als der kritische Schritt bei der Aufarbeitung herausgestellt. Die negativ geladenen Lignin-Partikel sind elektrostatisch stabilisiert. Dadurch wird bei der Fällung eine Agglomeration der Teilchen verhindert. Verschiedene Fällungsstrategien mittelt Wasserzugabe wurden geprüft, die allerdings im technischen Maßstab ungeeignet erscheinen. Versuche zur Abtrennung der Ligninfraktion ohne Wasserzugabe in einer Destillationskolonne wurden in Hinblick auf den geplanten Pilotmaßstab durchgeführt. Die Ergebnisse bescheinigen bereits eine grundsätzliche Eignung des Verfahrens.
- Die Komponententrennung nach Lösung des Holzes in ionischen Flüssigkeiten war ebenfalls möglich. Die heiße Holzlösung wurde in die 4-fache Menge heißes Lösungsmittel (Wasser, Wasser/Ethanol, Ethanol) eingerührt. Dabei fielen sofort die Cellulose und das Lignin aus. Die Hemicellulosen blieben zusammen mit der IL in Lösung.
- Zur Verbesserung der Delignifikation der Faserfraktion wurde auch ein zweistufiger Prozess (OrganoSolv + Waschung mit NaOH) mit Erfolg getestet.

AP3: Weiterverarbeitung der erhaltenen Fraktionen und anwendungstechnische Untersuchungen: Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

AP3-1 Cellulose-Fraktion (AP 3.1)

AP3-1.1 Auswahl der Enzyme (TU Kaiserslautern)

Es wurden drei dem Lehrgebiet für Bioverfahrenstechnik der TU Kaiserslautern zur Verfügung stehende kommerziell erhältliche Cellulasen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die vom vTI bereitgestellten Faserstoffproben zu hydrolysieren. Es handelte sich um die Cellulase-Präparate Rohament CL (SERVA), Cellupract (Biopract) und NS 500 13 (Novozymes). Dabei wurde festgestellt, dass bei der Hydrolyse des Faserstoffes mit NS 500 13 der größte Hydrolysegrad erzielt werden konnte (siehe Abb. 3-1).

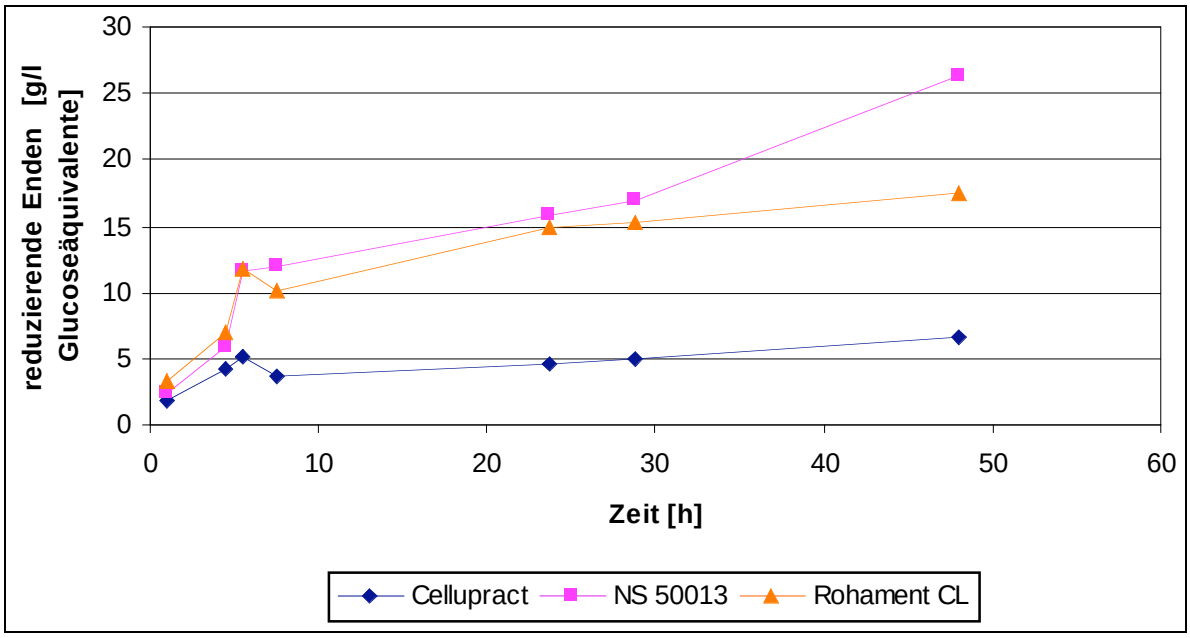


Abb. 3-1: Darstellung des Glucosekonzentrationsverlaufes der Hydrolyse der Faserstoffraktion BFH19F (40 g TS/l) mittels kommerzieller Cellulasen (0,18 g/l); Citronensäure-Phosphat-Puffer pH 5,0 (25 ml); 50-ml-Reaktionsgefäße; 50 °C; Überkopfschüttler (24 rpm);(Quelle: TU KL)

Um eine Inhibierung der Cellulasen durch entstehende Cellobiose zu verhindern und eine vollständige Umsetzung zu Glucose zu ermöglichen, wird bei der Hydrolyse ergänzend β-Glucosidase zugegeben. Des Weiteren wurden sechs thermostabile Cellulasen getestet, welche von der Biocat-Collection bezogen wurden. Sowohl unter den optimalen Bedingungen der jeweiligen Enzyme, als auch bei Bedingungen welche für die anderen Enzyme verwendet wurden, konnte allerdings keine hydrolytische Aktivität mit dem verwendeten Substrat (Faserstoff) beobachtet werden. Die Hydrolysen mit den kommerziell erhältlichen Enzymen erfolgen in Citronensäure-Phosphat-Puffer bei pH 5,0 und 50 °C. Dabei wird eine Substratmenge von 40 g_{TS}/l und Enzymmengen von 0,18 g/l (Cellulase) und 0,018 g/l (β-Glucosidase) eingesetzt.

AP3-1.2 Auswahl der Enzyme (FI Biopos e.V.)

Bei FI Biopos wurden zwei kommerziell erhältliche Enzymgemische auf ihren Einsatz zur Hydrolyse der vom vTI aus dem Organosolv-Aufschluss bereitgestellten Buchenholz-Cellulose (Probennummer BFH19F) untersucht. Für den Einsatz der beiden Enzymgemische CelluPract® AL 70 und CelluPract® AL 100 liegen in der Praxis Erfahrungen zur Hydrolyse von cellulosereichen Rohstoffen (ca. 50 % Cellulose und Hemicellulose) für die Biogas-Produktion vor. Dabei werden 100 g Enzymlösung (TS: 50 %) pro Tonne Substrat eingesetzt. Zu beachten ist, dass es sich hierbei nicht um einen Vollaufschluss, sondern um eine den Abbauprozess unterstützende Hydrolyse handelt. Die eingesetzten Enzyme sind in Tab. 3-1 hinsichtlich ihrer Enzymaktivitäten und pH-Werte charakterisiert.

Tab. 3-1: Charakteristische Daten der eingesetzten kommerziellen Enzym-Lösungen (Quelle: Biopos)

Enzym	β-Glucanase [U/g]*	Xylanase [U/g]*	CMCase [U/g]*	pH-Wert
CelluPract® AL 70	3200	3100	1600	4,4
CelluPract® AL 100	3660	3200	2000	4,4

* U = Unit ist die Enzymmenge, die 1 µmol Substrat pro min unter Standardbedingungen umsetzt; U = IE = $16{,}67 \times 10^9$ kat

Weiterhin wurden folgende kommerziell erhältlichen Enzyme für die Hydrolyse der Buchenholz-Cellulose aus dem Organosolv-Aufschluss (Probennummer BFH19F) eingesetzt: Shearzyme 2X, Celluclast 1.5L, Novozym188 und BAN 480L. Dargestellt sind in der Tab. 3-2 die Zuordnung zu Enzymklassen und ihre optimalen Wirkbereiche für Temperatur und pH-Wert.

Tab. 3-2: Eingesetzte Enzyme und Enzymgemische und ihre charakteristischen Daten (nach Angaben des Herstellers Novozymes)

Name	Enzymklassen	Temperatur	pH-Wert
Celluclast 1.5L	Cellulase, Cellobiohydrolase, Cellobiase und Endoglucanase	55 – 67 °C	4,0 – 6,0
Novozym188	Cellobiase	40 – 59 °C	4,0 – 6,0

AP3-1.3 Enzymatische Hydrolysierbarkeit der Faserstoff-Proben (TU Kaiserslautern)

Um den Einfluss der thermochemischen Vorbehandlung auf die enzymatische Hydrolyse zu untersuchen, wurden Proben aus unterschiedlichen Aufschlussversuchen mittels Cellulase in Kombination mit β-Glucosidase für 48 h hydrolysiert und die dabei entstandene Glucosemenge bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 3-2 dargestellt und zeigen ähnliche Ergebnisse, wie am vTI durchgeführte Hydrolysen.

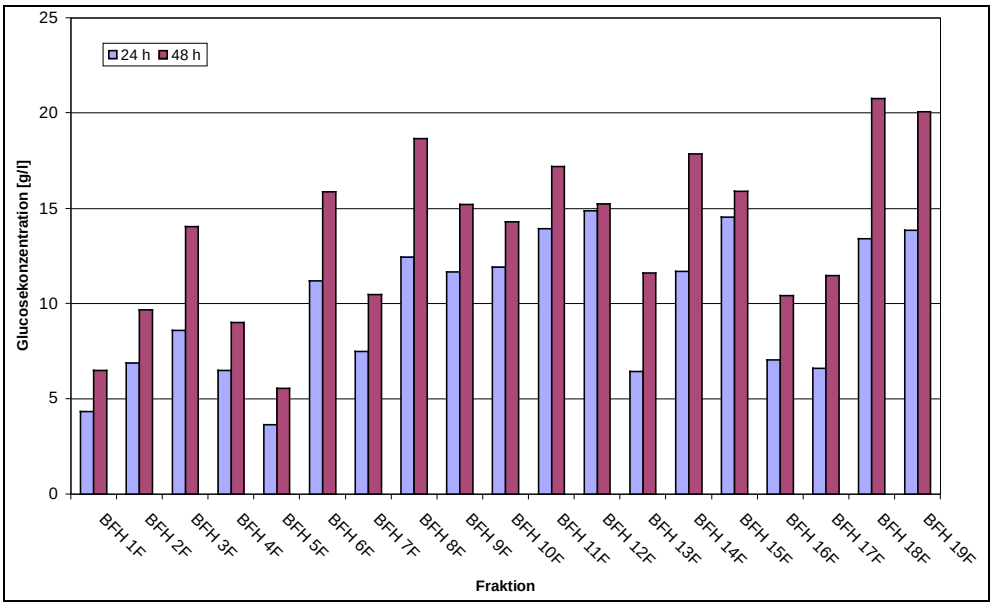


Abb. 3-2: Darstellung der Glucosekonzentrationen während der Hydrolyse der vTI-Faserstofffraktionen (40 g TS/l) mittels kommerzieller Cellulasen (0,18 g/l) nach 24 bzw. 48 h; Citronensäure-Phosphat-Puffer pH 5,0 (25 ml); 50-ml-Reaktionsgefäße; 50 °C; Überkopfschüttler (24 rpm); (Quelle: TU KL)

Die vom ICT vorbehandelten Faserstoffproben ließen sich im geringeren Maße enzymatisch hydrolysieren, als die vom vTI aufgeschlossen Proben. Allerdings wurde am ICT ein weiterer Aufreinigungsschritt hinzugefügt, welcher eine Behandlung der Faserstofffraktion mit Natronlauge vorsieht (ICT bleached, s. Abb. 2-25, S. 49). Hier zeigte sich, dass die Ausbeuten der Hydrolyse, im Vergleich zum unbehandelten Faserstoff (ICT Master), um etwa 25 % gesteigert werden konnte. Damit liegen die Umsätze in derselben Größenordnung wie die Probe BFH55 (Abb. 3-3).

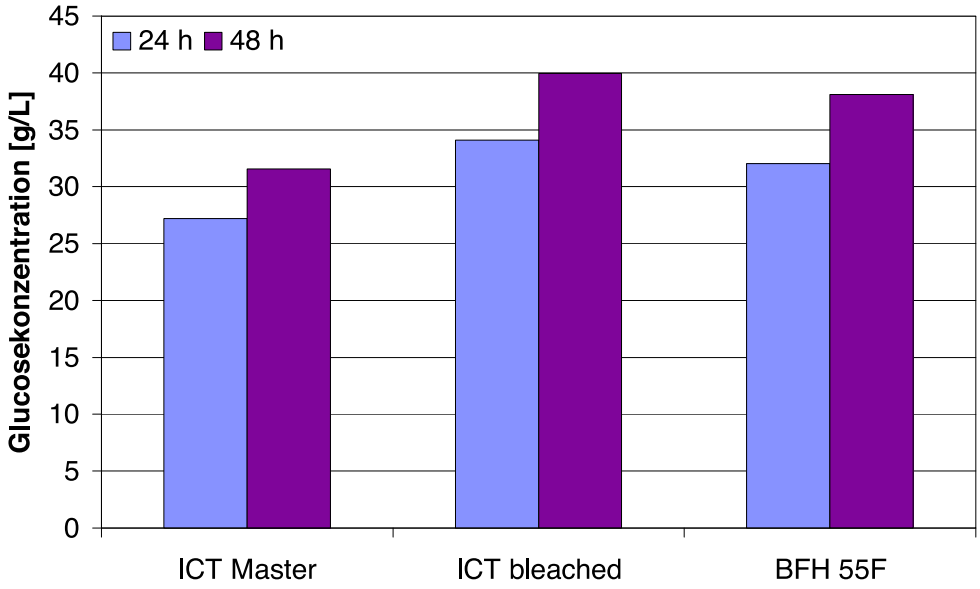


Abb. 3-3: Darstellung der Glucosekonzentration nach enzymatischer Hydrolyse von verschiedenen Faserstofffraktionen (100 g/L); pH 5,0 (25 ml); 50-ml-Reaktionsgefäße; 50 °C; Überkopfschüttler (24 rpm) (Quelle: TU KL)

AP3-1.4 Enzymatische Hydrolysierbarkeit der Faserstoff-Proben BFH19F aus dem Organosolv-Aufschluss (FI Biopos e.V.)

AP3-1.4.1 Durchgeführte Arbeiten

Es wurden systematische Untersuchungen der Hydrolyse der Faserstoff-Fraktion BFH19F aus dem Organosolv-Verfahren zunächst ausschließlich mittels der beiden kommerziellen Enzymgemische CelluPract® AL 70 und CelluPract® AL 100 durchgeführt.

Um die Ergebnisse reproduzierbar zu erhalten, wurden 46 Ansätze unter Variation des Substrat-Einsatzes (A) gemahlen und ungemahlen sowie (B) Reaktionszeiten t zwischen 16 und 168 Stunden durchgeführt. Die erhaltenen Rohzuckerfraktionen wurden mittels Fällung aus Wasser/ Ethanol und anschließende Auskristallisation fein gereinigt und mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC untersucht. Da die Untersuchungen zunächst auf den Erhalt optimaler Umsätze und Ausbeuten unter Einsatz ausschließlich kommerziell erhältlicher Enzyme in Batch-Ansätzen geführt worden ist, ist ein Substrat-Enzym-Einsatz von 2:1 gewählt worden. Die gewählten Verfahrensschritte zur Hydrolyse und Feinreinigung der Zucker sind im Folgenden aufgelistet:

1) Mahlen des Zellstoffes bzw. alternativ Einsatz von ungemahlenen Zellstoff
2) Zellstoff, H_2O (entionisiert), Enzymgemisch (m[g]=1:40:0,5) homogenisieren
3) T=60°C, t=16 h, 24 h, 36 h, 48 h, 120 h, 216 h, 168 h
4) T=90°C, t=0,5 h
5) Filtration, Waschen
6) Trocknen, Rückstandsbestimmung
7) Destillation (Rotationsverdampfer)
8) Kristallisation der Zucker mittels H_2O/C_2H_5OH
9) Feinreinigung der Zucker mittels Aceton
10) Trocknen der Zucker, Analytik

Nach Feinreinigung der Zucker (Überprüfung mittels Dünnschichtchromatographie) wurden die Zuckergemische einer quantitativen Analyse mittels HPLC unterworfen. Die gewählte Säule, Detektor und Analysenbedingungen werden im Folgenden aufgelistet:

- Kationenaustauschersäule ET 300/7,8 Nucleogel® Sugar Pb (Machery Nagel), 300 mm × 7,8 mm
- Mobile Phase: entionisiertes H_2O, T: 80 – 90°C, Flussrate 0,4 ml/min
- KNAUER–HPLC Pumpe Typ 364.00
- Detektor: Bischoff Differentialfraktometer 8100

Die Enzyme Celluclast 1.5L und Novozym 188 wurden in drei Versuchsreihen im folgenden Substrat-Enzymverhältnis eingesetzt:

- (A) Celluclast 1.5L + Novozym188 1 mg : 0,08 mg : 0,02 mg
- (B) Celluclast 1.5L + Novozym188 1 mg : 0,083 mg : 0,083 mg

Zum Celluclast 1.5L wurde Novozym188 zugegeben, da die Vorversuche zeigten, dass die oligomeren Zucker nicht ausreichend abgebaut wurden. Für die Versuchsreihe (A) wurde Novozym188 mit 1/4 der Celluclast-Menge zugegeben und für Versuchsreihe (B) in gleichem Mengenverhältnis.

Durch die Auswertung der systematischen Untersuchungen der vorherigen Arbeiten in diesem Projekt konnten nach Verbesserungen bei der Zusammensetzung der Enzymgemische auch Optimierungen bezüglich der Reaktionszeit und der Temperatur vorgenommen werden.

Die gewählten Verfahrensschritte zur Hydrolyse sind im Folgenden aufgelistet:

1) 3 g ungemahlener Zellstoff
2) Zellstoff, H2O (1:25) und Enzym homogenisieren
3) Einstellung pH-Wert = 5 mit 5%iger Zitronensäurelösung
4) bei T= 60°C, 55°C, 50°C, 45°C und 40°C für 48 h gerührt
5) bei T= 90°C für 0,5 h im Wasserbad denaturiert
6) Filtration und HPLC-Analytik des Filtrats

Die Analyse der Zucker wurde mit folgenden Geräten und unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- HPLC-Säule: Nucleogel® Sugar Pb (Machery Nagel), 300 mm × 7,8 mm
- Mobile Phase: entionisiertes H_2O, T: 80-90°C, Flussrate 0,4 ml/min
- KNAUER- HPLC Pumpe Typ 364.00
- Detektor: Smartline RI Detector 2300

AP3-1.4.2 Ergebnisse und erste Auswertung

Abb. 3-4 zeigt die Abhängigkeit der enzymatischen Hydrolyse mit den beiden Enzymgemischen CelluPract® AL 70 und CelluPract® AL 100 bei Einsatz einer Substratkonzentration von 35 g/l von der Reaktionszeit. Dabei wurden die quantifizierten feingereinigten Zucker (Saccharose, Glucose, Xylose, Fructose) entsprechend den oben genannten Reaktionszeiten aufgetragen. Auswertend sind beide Enzymgemische CelluPract® AL 70 und CelluPract® AL 100 für weitere Untersuchungen gleichermaßen zu empfehlen. Die Reaktion sollte für die Auslegung der Technologie nach 48 Stunden (Ausbeute der feingereinigten Zucker: 65% bez. auf eingesetzten Zellstoff) abgebrochen werden, da die Raum-Zeitausbeute im weiteren Reaktionsverlauf geringer wird.

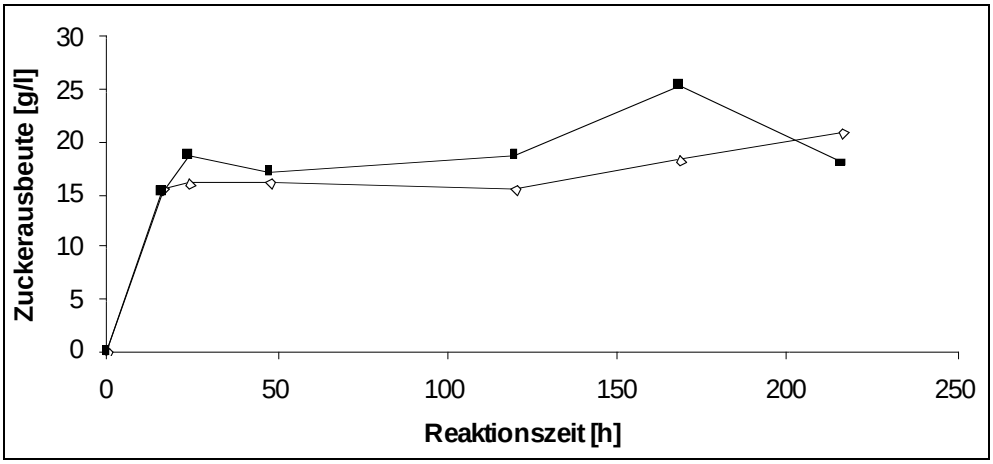


Abb. 3-4: Darstellung der Hydrolyse von BFH19F (35 g/l) in Enzym-Lösungen AL-100 (pH 5.1, offene Symbole) und AL 70 (pH 5.0, gefüllte Symbole). Batch Ansätze: T = 60 ºC, Enzym:Substrat [g/g] = 1:2,1 Magnetrührer, Rührgeschw.: 300 min^{-1} (Quelle: FI Biopos)

Abb. 3-5 zeigt die Abhängigkeit der enzymatischen Hydrolyse mit dem Enzymgemisch CelluPract® AL 100 bei Einsatz gemahlenen bzw. ungemahlenen Substrats bei einer Konzentration von 35 g/l von der Reaktionszeit. Dabei wurden die quantifizierten feingereinigten Zucker (Saccharose, Glu-

cose, Xylose, Fructose) entsprechend den oben genannten Reaktionszeiten aufgetragen. Auswertend ist mit Blick auf die Zuckerausbeute eine vorgeschaltete Mahlung des Zellstoffes zu empfehlen. Analog der in Abb. 3-4 dargestellten Untersuchungen resultiert auch hier die Empfehlung, die Reaktion für die Auslegung der Technologie nach 48 h abzubrechen (Ausbeute der feingereinigten Zucker: 65 % bez. auf eingesetzten Zellstoff),da die Raum-Zeitausbeute im weiteren Reaktionsverlauf geringer wird. Aus den durchgeführten Untersuchungen der enzymatischen Hydrolyse wird die Variante der Wahl, d.h. eine Reaktionszeit von 48 h als Verfahrensfließbild dargestellt (Abb. 3-6)

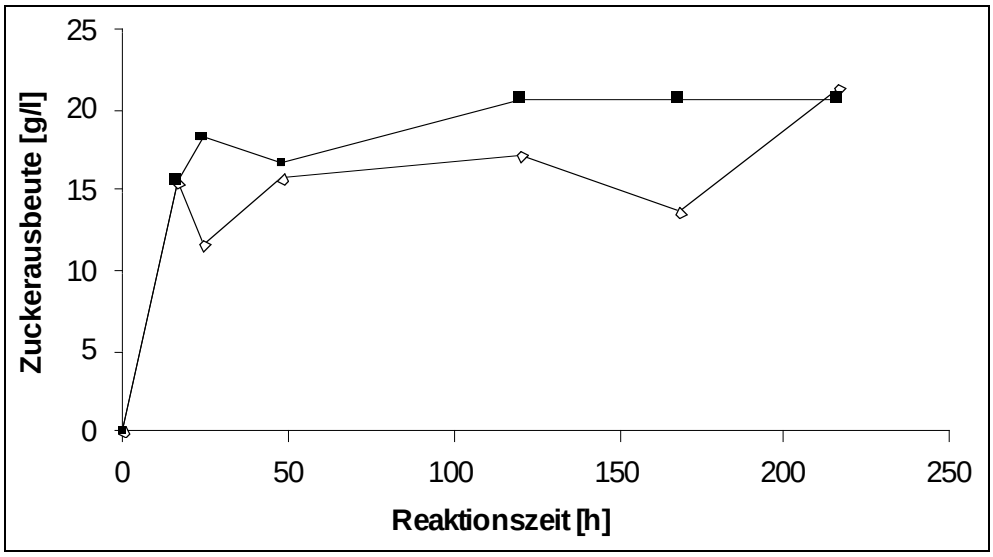


Abb. 3-5: Darstellung der Hydrolyse von BFH19F (35 g/l) in Enzym-Lösung AL 100, pH=5.1, Einsatz von gemahlenen (gefüllte Symbole) und ungemahlenen Substrat (offene Symbole), Batch-Ansätze, Magnetrührer, Rührgeschw.: 300 min^{-1} (Quelle: FI Biopos)

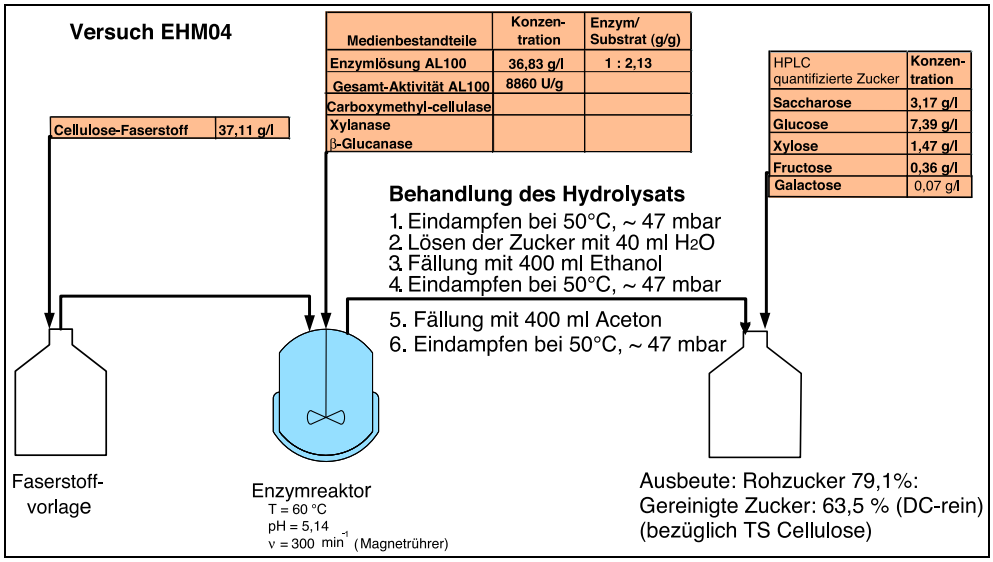


Abb. 3-6: Verfahrensfliessbild der enzymatischen Hydrolyse (t=48 h) Versuch: EHM-04 unter Einbeziehung der Analysenergebnisse (Quelle: FI Biopos)

Im Vergleich der zwei Enzymgemische (A) und (B) aus Celluclast 1.5L und Novozym 188 bei den verschiedenen Temperaturen konnten mit dem Enzymgemisch (B) bei 45 °C die besten Ergebnisse in der Ausbeute an Gesamtzucker erreicht werden. In Abb. 3-7 sind die Ergebnisse für die Zucker Glucose, Xylose und Cellobiose dargestellt.Die Ausbeute an Gesamtzucker ist bei Enzymgemisch (A) (Hydrolysetemperatur 50° C) mit 71 % etwas geringer als bei Versuch (B) mit der Ausbeute: 74,56 % (bei Hydrolysetemperatur 45°C), liegt aber in einem vergleichbaren Bereich.

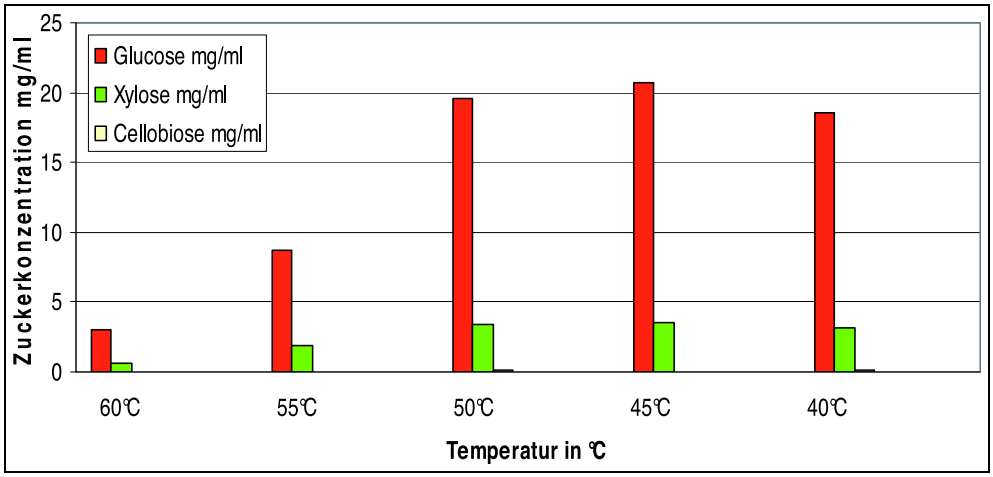


Abb. 3-7: Darstellung der Ergebnisse mit Enzymgemisch (B) bei ausgewählten Temperaturen während der Hydrolyse (Quelle: FI Biopos)

Betrachtet man jedoch die Ausbeute an Zucker pro Gramm eingesetztem Enzym, werden bei Variante (A) 5,44 g/g und bei Variante (B) 3,41 g/g erreicht. Der Unterschied entsteht durch die geringere Konzentration des Enzyms bei der Variante (A). Da die benötigte Enzymmenge für Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen eine wesentliche Einflussgröße darstellt, wäre für eine technologische Umsetzung die Variante (A) zu empfehlen. In der folgenden Abb. 3-8 sind die Ergebnisse von Enzymgemisch (A) für die Zucker Glucose, Xylose und Cellobiose dargestellt.

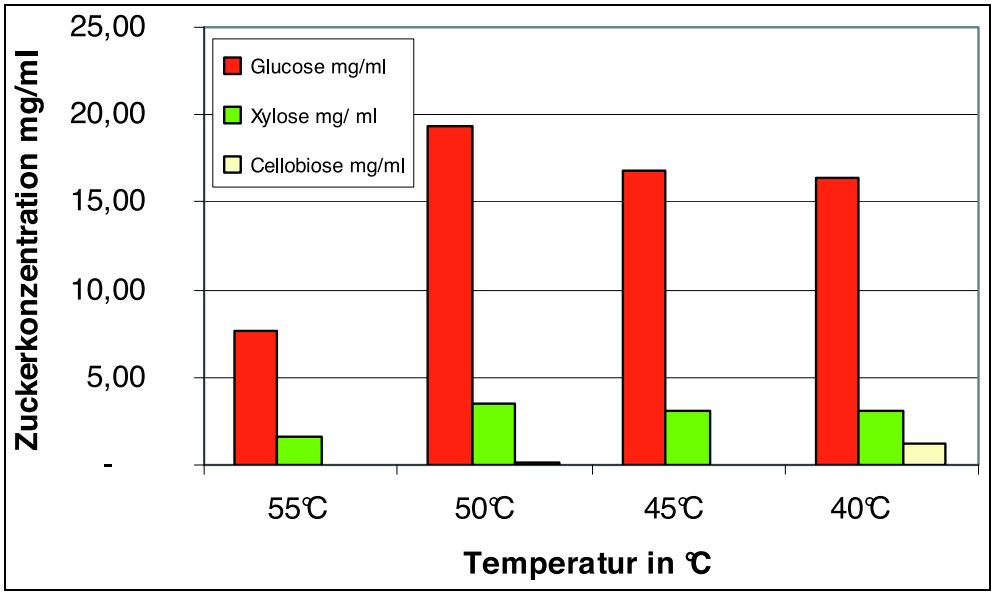


Abb. 3-8: Darstellung der Ergebnisse mit Enzymgemisch (A) bei ausgewählten Temperaturen während der Hydrolyse (Quelle: FI Biopos)

AP3-1.5 Enzymatischer Abbau der Buchenholzfraktion (TU-München)

C. thermocellum, ein thermophiles, strikt anaerobes, sporenbildendes, grampositives Bakterium, wird in der Literatur als einer der effizientesten Celluloseverwerter beschrieben und ist somit von großer Bedeutung für den Lignocelluloseabbau aus pflanzlicher Biomasse. Die Hydrolyse von kristalliner Cellulose erfolgt durch einen großen, zelloberflächengebundenen Enzymkomplex, dem Cellulosom. *C. thermocellum* bildet Endoglucanasen, Exoglucanasen, Xylanasen und andere Hemicellulasen. Die cellulolytische Aktivität von *C. thermocellum* wird durch die vorhandene Kohlenstoffquelle als Substrat reguliert. Für die Untersuchung der cellulolytischen Aktivität der Exoenzyme von *C. thermocellum* auf Buchenholz wurden die Cellulosom-Proteine aus den auf Cellobiose gewachsenen Batch-Kulturen mit *C. thermocellum*-Stamm F7, sowie mit der neu isolierten Kultur K aus den zellfreien Kulturüberständen isoliert (Abb. 3-9). Zusätzlich wurde die Kultur K auf kristalliner Cellulose (Avicel) kultiviert und aus der späten exponentiellen Wachstumsphase heraus die Cellulosomen-Proteine isoliert. Die Aktivitätsbestimmung der hydrolytischen Enzyme erfolgte nach Inkubation auf Buchenholz-Cellulose (Charge 35 bzw. F38) als Substrat mit dem DNSA-Test zur Bestimmung reduzierender Zucker.

Glucane mit β-glykosidischen Bindungen werden durch hydrolytische Enzyme zu Bruchstücken mit jeweils einer reduzierenden Hemiacetalgruppe hydrolysiert, deren Konzentration mit 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNSA) bestimmt wird. Der dabei auftretende Farbumschlag ist proportional zur Zahl der vorhandenen Oligosaccharidmoleküle, die damit quantitativ bestimmt werden kann. Die entstehenden Abbauprodukte bei der Inkubation mit Cellulose, Hemicellulose oder einem entsprechenden Modellsubstrat wurden in der Dünnschichtchromatographie analysiert. Die DC erlaubt die Auftrennung von Mono- und Oligosacchariden nach hydrolytischer Spaltung durch z.B. Cellulasen und Xylanasen. Als Sprüh-Reagenz wurde eine Naphtoresorcinol/Schwefelsäure-Lösung verwendet.

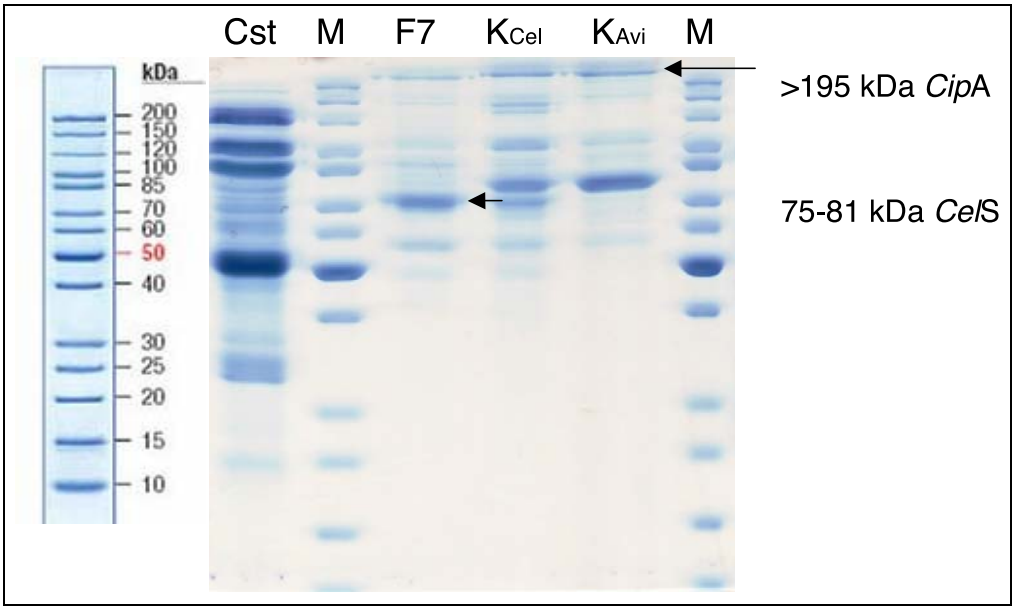


Abb. 3-9: SDS-Page der isolierten extrazellulären Proteine von *C. stercorarium* (DSM8532T), *C. thermocellum* (F7) und der Kultur K. (M: Page-Ruler prestained Protein Ladder (Fermentas), Cst: *C. stercorarium* (Wachstum auf 0,25% Cellobiose), F7: *C. thermocellum* (Wachstum auf 0,25 % Cellobiose), Kcel: Kultur K (Wachstum auf 0,25% Cellobiose), Kavi: Kultur K (Wachstum auf 0,25% Avicel) (Quelle: TUM)

Für die Hydrolyse der Cellulosefraktion wurde die Gesamtheit der isolierten, extrazellulären Proteine (die Cellulosomen enthalten) von den *Clostridien*-Kulturen *C. thermocellum* F7 und der *C. thermocellum* enthaltenden Kultur K in verschiedenen Enzym-Konzentrationen untersucht. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine sind in Abb. 3-9 gezeigt. Unterschiede im Cellulosomen-Profil lassen sich in Abhängigkeit von der Kohlenstoff-Quelle während des Wachstums der Bakterienzellen in Batch-Kultur feststellen: K_{Cel} zeigt das Protein-Bandenmuster von der auf dem Substrat Cellobiose gewachsenen Kultur K_{Cel}, während K_{Avi} die Cellulosom-Proteine der gleichen Bakterienkultur zeigt, welche auf Avicel gewachsen ist.

In der Literatur wird *Cip*A als die größte cellulosomale Komponente von *C. thermocellum* mit einer Molekülgröße von > 195 kDa beschrieben, *Cel*K und *Cel*S als die am häufigsten vorkommenden cellulosomalen Proteine bei auf Avicel gewachsenem *C. thermocellum* ATCC27405 bzw. *Xyn*A, *Xyn*Z und *Xyn*C bei auf Cellobiose gewachsenem *C. thermocellum* ATCC27405-Kultur. Die *Cip*A- bzw. *Cel*S-entsprechenden Proteinbanden sind in Abb. 3-9 gekennzeichnet. Eine genaue Charakterisierung der einzelnen Proteinbanden wurde nicht durchgeführt.

Die hydrolytische Aktivität der isolierten Enzym-Komplexe von *C. thermocellum* auf den eingesetzten Cellulosefraktionen von Buchenholz wurde bei 60 °C mit verschiedenen Enzymkonzentrationen und Hydrolysezeiten getestet und durch die DNSA-Methode quantifiziert. Nach 1 h Hydrolysezeit wurde eine cellulolytische Aktivität des Cellulosoms von *C. thermocellum* F7 bzw. der Kultur K_{Cel} auf Buchenholz-Cellulose von 23,2 mU/ml bzw. 25,5 mU/ml bei 200 µl Enzymvolumen bestimmt (Tab. 3-3a). Bei Verwendung von 50 µl Enzymvolumen wurde beispielsweise eine Enzymaktivität von 92 mU/ml der Cellulosompräparation von *C. thermocellum* F7 auf dem Substrat Buchenholz-Cellulose nachgewiesen, bei Avicel 102 mU/ml, bei CMC 250 mU/ml und bei dem Modellsubstrat β-1,3-1,4-Glucan (Gerste) von 1.410 mU/ml (Tab. 3-3b).

Tab. 3-3a: Bestimmung der cellulolytischen Aktivität des Cellulosoms von *C. thermocellum* F7 und der Kultur K_{Cel} nach 1 Stunde Inkubationszeit. Wachstum auf 0,25% Cellobiose; 200 µl Enzym; 60 °C; Proteinkonzentration für F7: 1,44 mg/ml; K_{Cel}: 1,82 mg/ml (Quelle: TUM)

200 µl Enzym	OD [575 nm]	Glucose [µg/µl]	Enzymaktivität [U/ml]	Spezif. Aktivität [U/mg]
Mischkultur K_{Cel}				
Buche (1%)	0,09	55	0,0255	0,014
Avicel (2%)	0,34	80	0,037	0,0204
CMC (1%)	1,76	245	0,1134	0,0623
β-Glucan (1%)	2,9	>500		
***C. thermocellum* F7**				
Buche (1%)	0,05	50	0,0232	0,016
Avicel (2%)	0,15	60	0,028	0,02
CMC (1%)	1,78	245	0,1134	0,079
β-Glucan (1%)	2,87	>500		

Tab. 3-3b: Bestimmung der cellulolytischen Aktivität des Cellulosoms von *C. thermocellum* F7 und der Kultur K_{Cel} nach 1 Stunde Inkubationszeit. Wachstum auf 0,25% Cellobiose; 50 µl Enzym; 60 °C; Proteinkonzentration für F7: 0,169 mg/ml; K_{Cel}: 0,196 mg/ml (Quelle: TUM)

50 µl Enzym (neue Präparation)	OD [575 nm]	Glucose [µg/µl]	Enzymaktivität [U/ml]	Spezif. Aktivität [U/mg]
Mischkultur K_{Cel}				
Buche (1%) 100*	0,01	zu gering		
Buche (1%)	0	0		
Avicel (2%)	0,17	62	0,115	0,586
CMC (1%)	0,86	135	0,25	1,2755
β-Glucan (1%)	1,12**	165	1,22	6,24
***C. thermocellum* F7**				
Buche (1%) 100*	0,03	40	0,037	0,219
Buche (1%)	0,05	50	0,092	0,548
Avicel (2%)	0,11	55	0,102	0,603
CMC (1%)	0,86	135	0,25	1,48
β-Glucan (1%)	1,37**	190	1,41	8,33

* 100 µl Enzym ** 1:4 verdünnt

Die cellulolytische Aktivität des Cellulosoms von der auf Avicel gewachsenen Mischkultur KAvi wurde bei verschiedenen Enzymkonzentrationen nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 60 °C bestimmt (Tab. 3-4).

Die hydrolytische Aktivität auf Buchenholz-Cellulose betrug bei 50 µl Enzymvolumen 4 mU/ml und vergleichsweise auf Avicel 14,7 mU/ml, bei den leicht abbaubaren Modellsubstraten CMC und β-1,3-1,4-Glucan wurde eine Enzymaktivität von 20,8 mU/ml bzw. 44,4 mU/ml ermittelt. Die Ergebnisse bestätigen, dass die Buchenholzcellulose ein schwerer zu hydrolysierendes Substrat darstellt. Nach 24 Stunden Reaktionszeit wurde die höchste enzymatische Aktivität des Cellulosoms auf Buchenholz-Cellulose bei 50 µl Enzymvolumen bestimmt.

Tab. 3-4: Bestimmung der hydrolytischen Aktivität des Cellulosoms der Kultur KAvi nach 24 Stunden Inkubationszeit – Konzentrationsreihe des Enzyms. KAvi: Wachstum auf 0,25% Avicel; 60 °C; Proteinkonzentration für KAvi: 0,1155 mg/ml (Quelle: TUM)

	Enzym [µl]	OD [575 nm]	Glucose [µg/µl]	Enzymaktivität [U/ml]	Spezif. Aktivität [U/mg]
Mischkultur KAvi					
Buche (1%)	**10**	0	0	0	0
	50	0,07	52	0,004	0,035
	100	0,30	70	0,003	0,023
	200	0,45	80	0,002	0,013
Avicel (2%)	**10**	0,43	80	0,0309	0,269
	50	1,38	190	0,0147	0,1273
	100	1,91	260	0,01	0,0869
	200	1,11*	165	0,0064	0,055
CMC (1%)	**10**	1,72	240	0,0926	0,8017
	50	2,00	270	0,0208	0,1804
		0,95*	150	0,023	0,2
	100	n.d.			
	200	n.d.			
β-Glucan (1%)	**10**	2,09*	280	0,216	1,871
	50	2,13*	285	0,044	0,381
	100	n.d.			
	200	n.d.			

* 1:2 verdünnt n.d. nicht durchgeführt

Die in Tab. 3-5 zusammengefassten Ergebnisse der Versuche mit dem cellulolytischen Enzymkomplex der Mischkultur KAvi in einer Zeitreihe von 6 bis 54 Stunden zeigen, dass die maximale hydrolytische Aktivität auf Buchenholz-Cellulose von 9,3 mU/ml bei 100 µl Enzymvolumen nach 6 Stunden erreicht ist und sich nach 24 Stunden um mehr als das Vierfache verringerte. Auf dem Modellsubstrat Avicel wurde nach 6 Stunden die doppelte hydrolytische Aktivität im Vergleich zur Buchenholz-Cellulose bestimmt. Dies liegt wahrscheinlich an der abnehmenden Anzahl angreifbarer Substratbestandteile. Abb. 3-10 veranschaulicht die zeitliche Zunahme der reduzierenden Zucker (Glucoseäquivalente) während der enzymatischen Hydrolyse der Buchenholz-Cellulose und Avicel, die durch die DNSA-Methode bestimmt wurden.

Tab. 3-5: Bestimmung der hydrolytischen Aktivität der Cellulosomenpräparation der Kultur KAvi – Zeitreihe. KAvi: Wachstum auf 0,25% Avicel; 24 Stunden Reaktionszeit bei 60 °C; Proteinkonzentration für KAvi: 0,1155 mg/ml (Quelle: TUM)

100 µl Enzym	Zeit [h]	OD [575 nm]	Glucose [µg/µl]	Enzymaktivität [U/ml]	Spezif. Aktivität [U/mg]
Mischkultur KAvi					
Buche (1%)	6	0,15	60	0,0093	0,08
	24	0,25	65	0,0025	0,0217
	30	0,3	70	0,0022	0,0187
	48	0,38	72	0,0014	0,012
	54	0,43	75	0,0013	0,0111
Avicel (2%)	6	0,62	110	0,017	0,147
	24	1,77	240	0,009	0,08
	30	1,19*	175	0,011	0,094
	48	1,20*	180	0,007	0,06
	54	1,52*	215	0,0074	0,064

* 1:2 verdünnt

Die hydrolytischen Aktivitäten der isolierten Cellulosomen der Kultur K nach Wachstum auf den Kohlenstoffquellen Cellobiose bzw. Avicel zeigten keine nennenswerten Unterschiede (Tab. 3-6). Dagegen werden in der Literatur beispielsweise unterschiedliche Enzymaktivitäten für *C. thermocellum* ATCC27405 in Abhängigkeit von der eingesetzten C-Quelle als Wachstumssubstrat beschrieben.

Nach 40 Stunden Hydrolysezeit wurde eine cellulolytische Enzymaktivität auf Buchenholz-Cellulose von 12 mU/ml für *C. thermocellum* F7 bzw. 9 mU/ml für die Kultur K nachgewiesen, nach mehr als 68 Stunden 1 mU/ml bzw. ca. 1,7 mU/ml (50 µl Enzymvolumen). Dies ist wohl auf die Abnahme der Enzymaktivität bei längerer Inkubation durch die „Erschöpfung des Substrats“ zurückzuführen.

Die Analyse der Abbauprodukte nach enzymatischer Hydrolyse erfolgte in der DC. Nach 1-stündiger enzymatischer Hydrolyse mit dem Cellulosom-Komplex von *C. thermocellum* F7 bzw. der Kultur K wurde bei den Substraten Buchenholzcellulose und Avicel Cellobiose in der DC detektiert. Cellotriose, Cellotetraose und Cellobiose wurden in der dünnschichtchromatographischen Auftrennung als Hydrolyseprodukte für CMC und β-Glucan analysiert (Abb. 3-11).

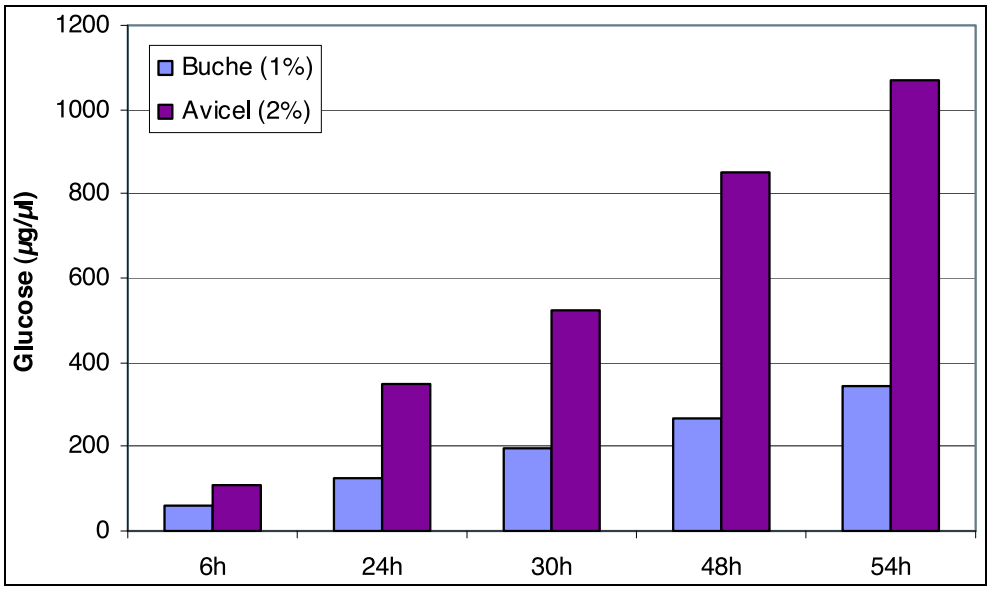


Abb. 3-10: Abbau von Buchenholz-Cellulose und Avicel nach 6- bis 54-stündiger Hydrolyse bei 60 °C (Messung der Glucoseäquivalente über die DNSA-Methode) (Quelle: TUM)

Tab. 3-6: Bestimmung der hydrolytischen Aktivität des Cellulosoms der Kultur K nach 24 Stunden Hydrolysezeit – Wachstum auf Cellobiose bzw. Avicel. K_{Cel}: Wachstum auf 0,25% Cellobiose, K_{Avi}: Wachstum auf 0,25% Avicel; 50 µl Enzym; 60 °C; Proteinkonzentration für K_{Cel}: 0,196 mg/ml; K_{Avi}: 0,228 mg/ml (Quelle: TUM)

50 µl Enzym	OD [575 nm]	Glucose [µg/µl]	Enzymaktivität [U/ml]	Spezif. Aktivität [U/mg]
Mischkultur K_{Cel}				
Buche (1%) 100*	0,40	75	0,003	0,015
Avicel (2%)	0,93	145	0,011	0,057
CMC (1%)	1,14	171	0,0132	0,067
β-Glucan (1%)	1,51**	213	0,066	0,335
***C. thermocellum* F7**				
Buche (1%) 100*	0,43	80	0,0031	0,014
Avicel (2%)	1,02	160	0,012	0,054
CMC (1%)	1,33	188	0,0145	0,064
β-Glucan (1%)	1,50**	210	0,065	0,284

* 100 µl Enzym ** 1:4 verdünnt

Durch die cellulolytische Aktivität der Cellulosom-Proteine von *C. thermocellum* F7 bzw. der Mischkultur K wurde ein größerer Anteil an Cellobiose im Vergleich zum Monomer Glucose nach 24-stündiger Hydrolyse der Buchenholzcellulose nachgewiesen (Abb. 3-11). β-Glucan wurde in der enzymatischen Hydrolyse zu verschiedenen oligomeren Zuckern abgebaut, z.B. zu einem größeren Anteil an Cellotetraose und Cellotriose, sowie auch zu Cellobiose und Glucose in

geringerem Maße. Ein vollständiger Abbau zum C6-Zucker Glucose wurde nicht detektiert. Die Fähigkeit der *C. thermocellum*-Cellulase, Cellobiose oder Glucose zu bilden, bestätigt das Vorhandensein einer Cellulase-Aktivität. Die Zugabe einer exogenen β-Glukosidase zur *C. thermocellum*-Cellulase würde die Glucosebildung während der Cellulose-Hydrolyse erhöhen.

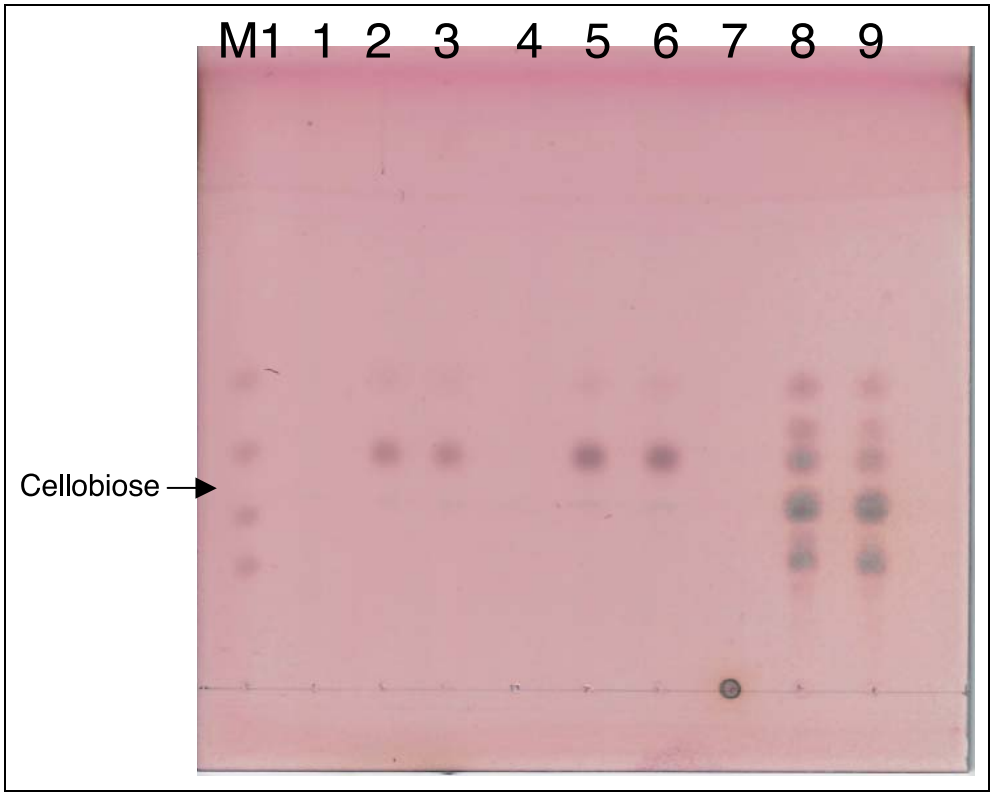


Abb. 3-11: Dünnschichtchromatogramm der Abbauprodukte der Buchenholz-cellulose-Fraktion nach 24 h enzymatischer Hydrolyse. M1: Marker Glucose bis Cellotetraose (C1-C4: 0,025µg/µl); Spur 1: Kontrolle Buchenholz (1%); Spur 2, 3: Cellulosom-Protein (50 µl) der Mischkultur KCel bzw. KAvi auf Buchenholz; Spur 4: Kontrolle Avicel (1%); Spur 5, 6: Cellulosom-Protein (50 µl) der Mischkultur KCel bzw. KAvi auf Avicel; Spur 7: Kontrolle β-Glucan (1%); Spur 8, 9: Cellulosom-Protein (50µl) der Mischkultur KCel bzw. KAvi auf β-Glucan (1%); Spur (0,4 µl Marker und 1µl Probe aufgetragen). (Quelle: TUM)

Unter optimalen Reaktionsbedingungen wurden vergleichbare Cellulase-Aktivitäten von *C. thermocellum* und dem Pilz *Trichoderma reesei* in der Literatur beschrieben. Beide Cellulasen bilden Cellobiose zu einem hohen Anteil, während bei der *T. reesei*-Cellulase ein höherer Anteil an Glucose nach der Hydrolyse entsteht. Der bakteriellen *C. thermocellum*-Cellulase wird eine größere Stabilität und Aktivität bei höheren Temperaturen (60 °C – 70 °C) im Vergleich zur Pilz-Cellulase zugeordnet. Bisher wurden die hydrolytischen Aktivitäts-Tests bei 60 °C durchgeführt. Erwähnenswert ist die doppelt so große Wachstumsrate von *C. thermocellum* auf Cellulose im Vergleich zu *T. reesei*.

AP3-1.6 Ergänzung: Celluloseabbau der Buchenholzfraktion mit Bakterienkulturen (TU München)

Die bakterielle Hydrolyse der bereits mit Pilzenzymen vorbehandelten Buchenholzfraktion der TU KL wurde mit *C. thermocellum* ATCC27405 durchgeführt und verglichen. Die Abbauraten von 73 – 99 % der Cellulose, von 75 – 99 % der Hemicellulose und von 25 – 50% der Ligninfraktion sind in Tab. 3-7 zusammengefaßt. Somit konnte durch den Einsatz der Bakterienkultur *C. thermocellum* ATCC27405 ein weiterer Abbau der bereits mit Pilzenzymen vorbehandelten Proben erzielt werden. Zu berücksichtigen gilt, daß aufgrund des geringen Probenmaterials nur eine Einfachbestimmung der Analysen durchgeführt werden konnte. Der Abbau in der Trockensubstanz im Vergleich zum Kontrollansatz ist in Abb. 3-12 dargestellt.

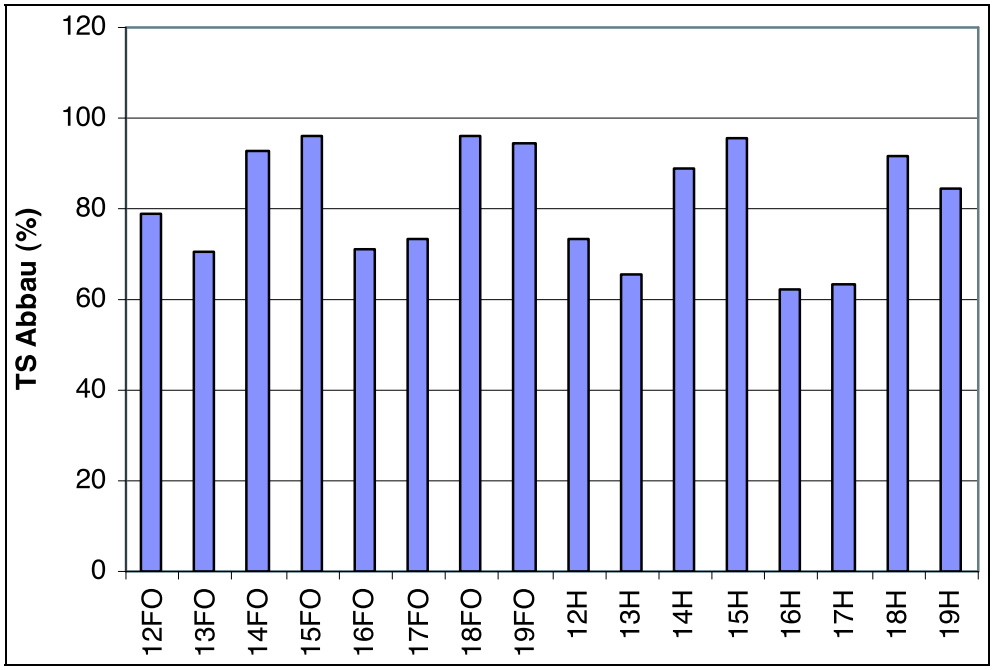


Abb. 3-12: Prozentualer Abbau der Buchenholzcellulose mit *C. thermocellum* ATCC27405 unter Berücksichtigung der Kontrollansätze. O: Originalprobe, H: mit Pilzenzymen vorbehandelt (Quelle: TUM)

Tab. 3-7: Prozentualer Abbau der Fraktionen Hemicellulose, Cellulose und Lignin durch *C. thermocellum* ATCC27405. O: Originalprobe, H: mit Pilzenzymen vorbehandelt (Quelle: TUM)

Probe	TS [%]	Hemicellulose [%]	Ligninfraktion [%]	Cellulose [%]
12FO	79,06	60,87	28,96	89,86
13FO	70,43	65,22	2,63	82,26
14FO	93,03	96,32	67,25	98,33
15FO	95,89	98,44	81,97	99,3
16FO	71,23	68,85	11,71	84,51
17FO	73,08	63,16	19,68	85,4
18FO	96,35	99,21	74,04	99,38
19FO	94,43	91,85	70,54	99,24
12H	73,48	81,64	45,83	84,18
13H	65,66	77,57	44,49	74,42
14H	88,94	97,55	36,71	96,07
15H	95,68	99,68	50,67	99,46
16H	62,37	75,23	30,2	73,06
17H	63,2	75,55	30,18	73,05
18H	91,89	98,04	25,74	97,63
19H	84,35	98,72	36,49	96,52

Schlussfolgerung: Die Buchenholz-Cellulosefraktion kann durch die bakteriellen Enzymkomplexe von *Clostridium thermocellum* gut abgebaut werden. Selbst die durch Pilz-Enzyme bereits vorverdauten Cellulose-Fraktionen können durch die bakteriellen Enzyme, die einen unterschiedlichen Enzymmechanismus besitzen, noch weiter abgebaut werden, sodass diese Enzymsysteme in Verbindung mit den Pilzenzymen große Chancen für die Hydrolyse eingeräumt werden müssen. Sie werden deshalb an der TUM in anderen Projekten weiter verfolgt.

AP3-1.7 Optimierung der enzymatischen Hydrolyse (TU Kaiserslautern)

Die durchgeführten Optimierungen im Bereich der enzymatischen Hydrolyse beziehen sich hauptsächlich auf eine Verbesserung des Hydrolysegrades und damit der Ausbeute an fermentierbaren Zuckern. Des Weiteren soll die Optimierung eine direkte Verwendung der Hydrolysate ohne aufwändige Zwischenschritte für die Fermentation ermöglichen. Neben der eingesetzten Enzymmenge wurde auch die verwendete Substratmenge variiert.

AP3-1.7.1 Schrittweise Zugabe von Substrat zum Hydrolyseansatz

Um eine möglichst hohe Glucose-Konzentration in den Hydrolysaten zu erreichen, wurde zum einen die schrittweise Zugabe von Substrat zum Hydrolyseansatz durchgeführt. Dies konnte eine Erhöhung der Glucosekonzentration herbeiführen, wobei allerdings der resultierende Hydrolysegrad etwas geringer war (siehe Abb. 3-13).

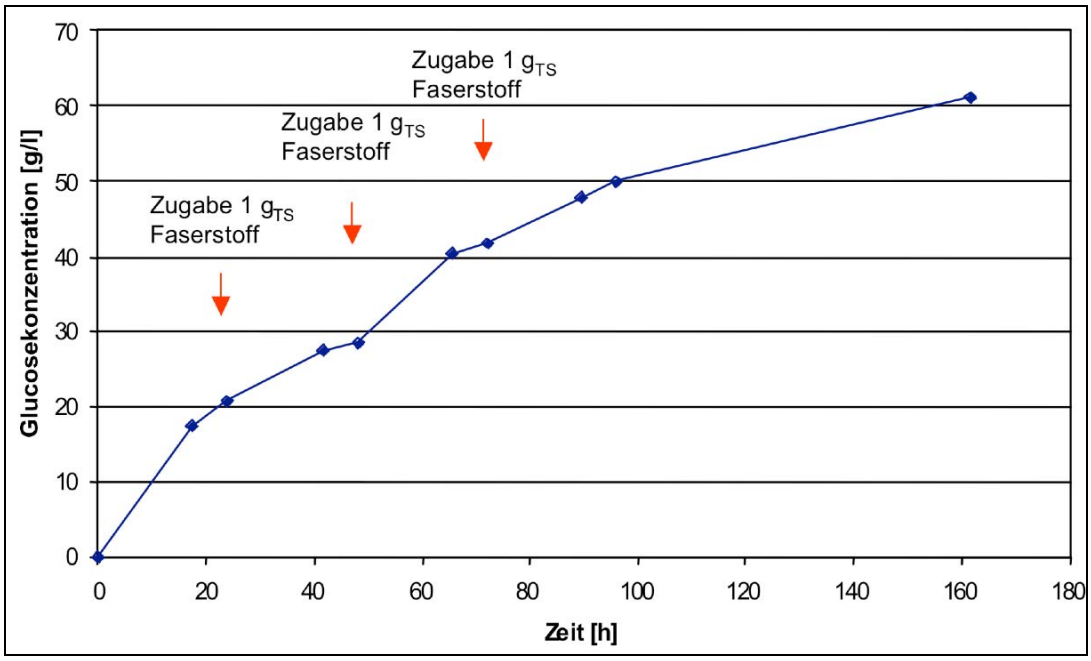


Abb. 3-13: Darstellung des Glucosekonzentrationsverlaufes der Hydrolyse der Faserstofffraktion BFH34F (1 g TS) mittels kommerzieller Cellulasen (0,18 g/l); nach je 24 h erfolgte Zugabe von neuem Substrat (1 g TS);Citronensäure-Phosphat-Puffer pH 5,0 (40 ml); 50-ml-Reaktionsgefäße; 50 °C; Überkopfschüttler (24 rpm) (Quelle: TU KL)

AP3-1.7.2 Repeated-Fed-Batch-Verfahren

Zum anderen wurde der Versuch unternommen sowohl die Konzentration an Glucose im Hydrolysat als auch den Hydrolysegrad zu steigern. Das hierfür verwendete Repeated-Fed-Batch-Verfahren (RFB) ist in Abb. 3-14 dargestellt und erzielte einen Hydrolysegrad von 80 % des Ausgangssubstrates (Abb. 3-15).

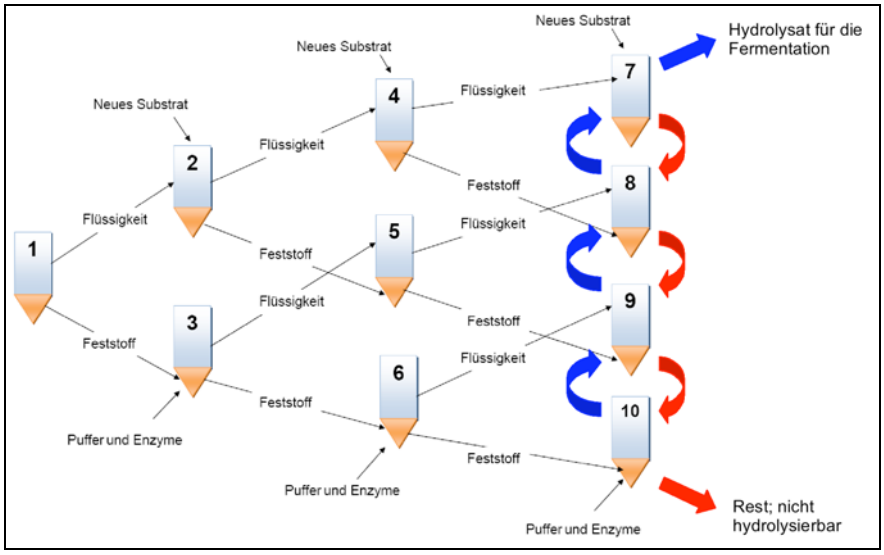


Abb. 3-14: Schematische Darstellung des Repeated-Fed-Batch-Versuches; das System verfügt über 10 virtuelle Reaktorsstufen und benötigt vier reale Reaktoren (Quelle: TU KL)

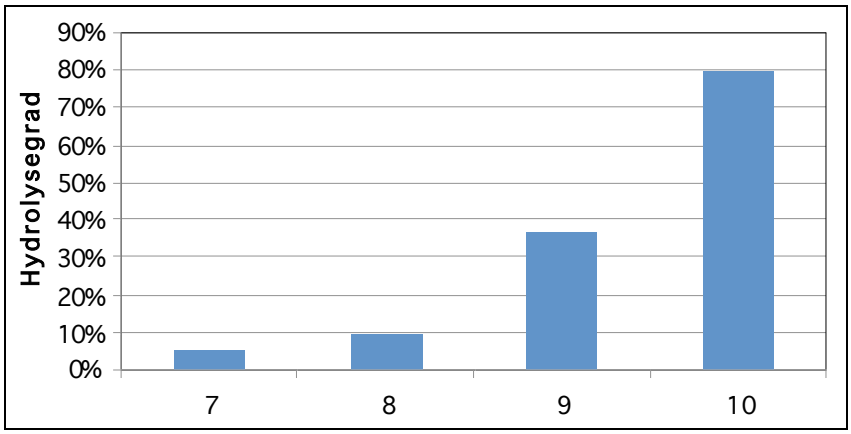


Abb. 3-15: Darstellung der Hydrolysegrade in den entsprechenden Reaktoren des Repeated-Fed-Batch-Versuches (Quelle: TU KL)

AP3-1.7.3 Zugabe von Hemicellulasen

Die Zugabe von Hemicellulasen zum Hydrolyseansatz des Faserstoffs ermöglicht die Freisetzung von Xylose aus der noch im Faserstoff enthaltenen Hemicellulose (Abb. 3-16). Dies bedeutet, dass in den Hydrolysaten größere Mengen an Zuckern (Glucose und Xylose) für die sich anschließende Fermentation zur Verfügung stehen.

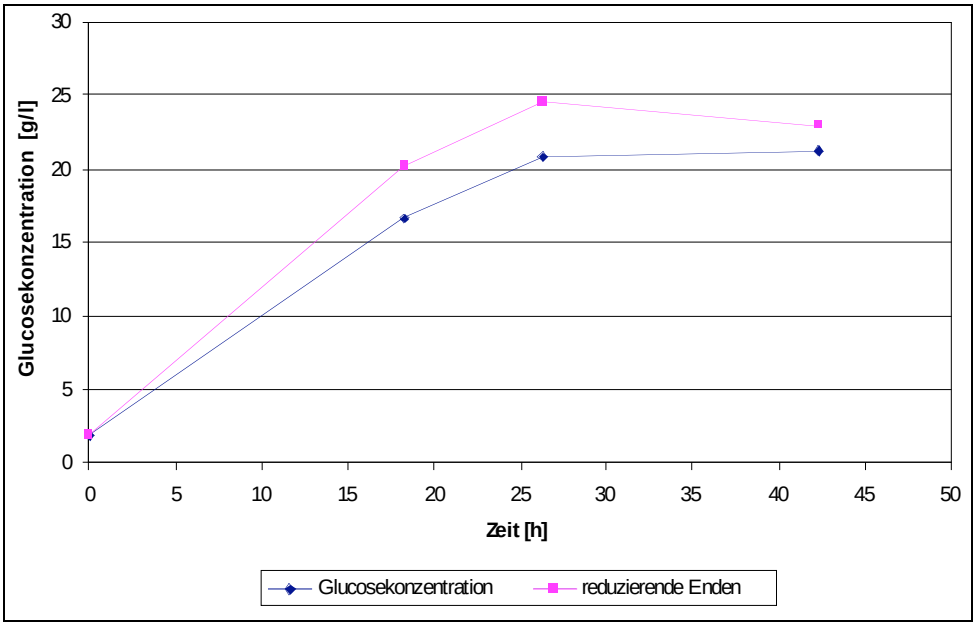


Abb. 3-16: Darstellung der Hydrolyse von BFH34F mit Hemicellulasen und Cellulase; Citronensäure-Phosphat-Puffer pH 5,0 (25 ml); 50-ml-Reaktionsgefäße; 50 °C; Überkopfschüttler (24 rpm) (Quelle: TU KL)

Des Weiteren konnte ein erfolgreicher *Scale up* vom 25 ml in den 1,5-l-Maßstab durchgeführt werden, wobei ähnliche Hydrolysegrade erreicht wurden (siehe Abb. 3-17)

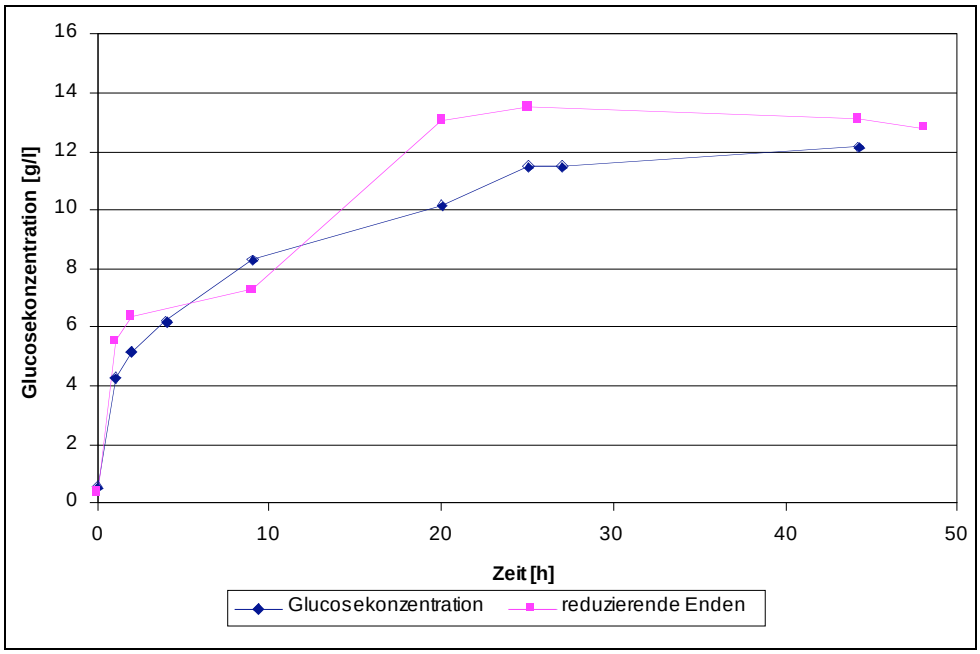


Abb. 3-17: Darstellung des Glucosekonzentrationsverlaufes der Hydrolyse der Faserstofffraktion BFH34F (40 g TS/l) mittels kommerzieller Cellulasen (0,18 g/l); Citronensäure-Phosphat-Puffer pH 5,0 (1,5 l); 2-l-Bioreaktor; 50 °C; 300 rpm (Quelle: TU KL)

Die Hemicellulosefraktion enthält schon nach der Vorbehandlung einen relativ hohen Anteil an fermentierbaren Zuckern, deren Konzentration durch Zugabe von Xylanase nicht weiter gesteigert werden konnte. Somit wird die Hemicellulaselösung ohne weitere enzymatische Behandlung direkt für eine Fermentation der darin enthaltenen Zucker zu Ethanol eingesetzt. Eine Abtrennung des unhydrolysierten Feststoffes aus dem Hydrolysat ist nicht zwingend notwendig, wird aber momentan zur besseren Überprüfung der Fermentation durchgeführt. Unumgänglich ist die Ergänzung der Hydrolysate mit Vitaminen und Spurenelementen

Um eine wirtschaftlichere Durchführung der enzymatischen Hydrolyse zu erreichen, konnte auf die Verwendung von Pufferlösungen verzichtet werden. Aus diesem Grund sind die nachfolgend dargestellten Ergebnisse in dest. Wasser statt in Pufferlösung durchgeführt worden, welches auf den für die Enzyme notwendigen pH-Wert von 5,0 eingestellt wurde.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Ergänzung der Vorbehandlungslösung für den Holzaufschluss mit Schwefelsäure keinen negativen Effekt auf die enzymatische Hydrolyse hat (siehe Abb. 3-18).

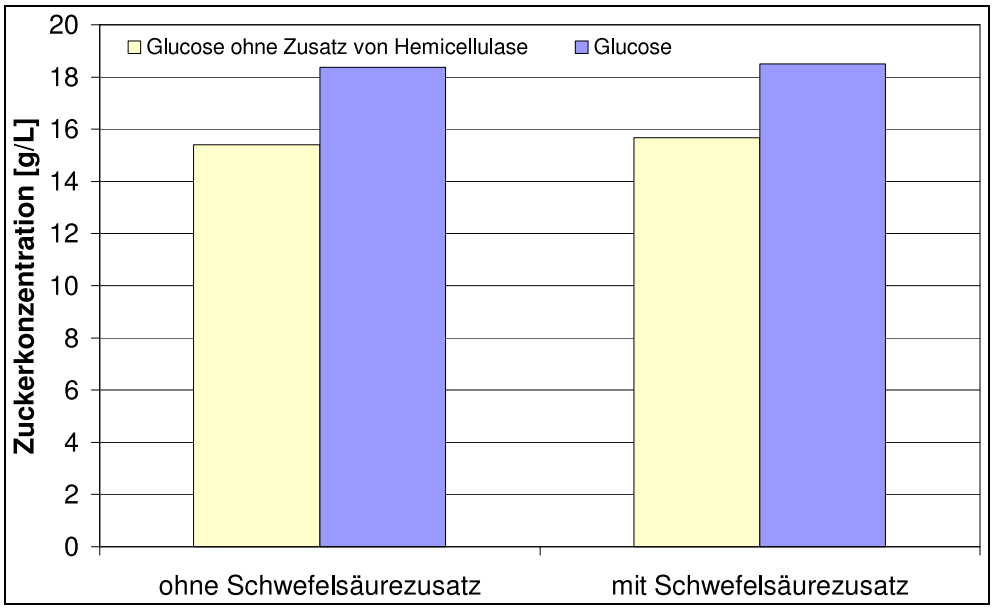


Abb. 3-18: Darstellung der Glucosekonzentration nach enzymatischer Hydrolyse von verschiedenen Faserstofffraktionen (100 g/L); pH 5,0 (25 ml); 50-ml-Reaktionsgefäße; 50 °C; Überkopfschüttler (24 rpm) (Quelle: TU KL)

Um die Zugänglichkeit der Cellulose für die Cellulase zu verbessern, wurde der Hydrolyseansatz um eine Hemicellulase ergänzt. Diese dient dem Abbau der noch im Faserstoff enthaltenen Hemicellulose und ermöglicht damit eine bessere Hydrolyse der Cellulose. In den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass dabei die Glucosekonzentration im Vergleich zum Ansatz ohne Hemicellulase um etwa 20 % gesteigert werden kann (Abb. 3-19)

AP3-1.7.4 Einfluss der Substratkonzentration

Zur Steigerung der in den Hydrolysaten enthaltenen Zuckerkonzentration, welche für spätere Fermentationen möglichst hoch sein soll, wurde untersucht, in wie weit sich die eingesetzte Substratmenge erhöhen lässt. Dabei zeigte sich, dass dies nur begrenzt möglich ist, da der Faserstoff in der Reaktionslösung stark quillt und somit eine gute Durchmischung erschwert wird. Eine Steigerung der Substratkonzentration ist bis 100 g/L möglich, wenn die Hydrolyse innerhalb von 24 h durchgeführt wird (Abb. 3-19). Die Steigerung der Substratkonzentration bis 200 g/L ist prinzipiell möglich, resultiert aber in einer deutlich längeren Hydrolysedauer (mind. 48 – 72 h).

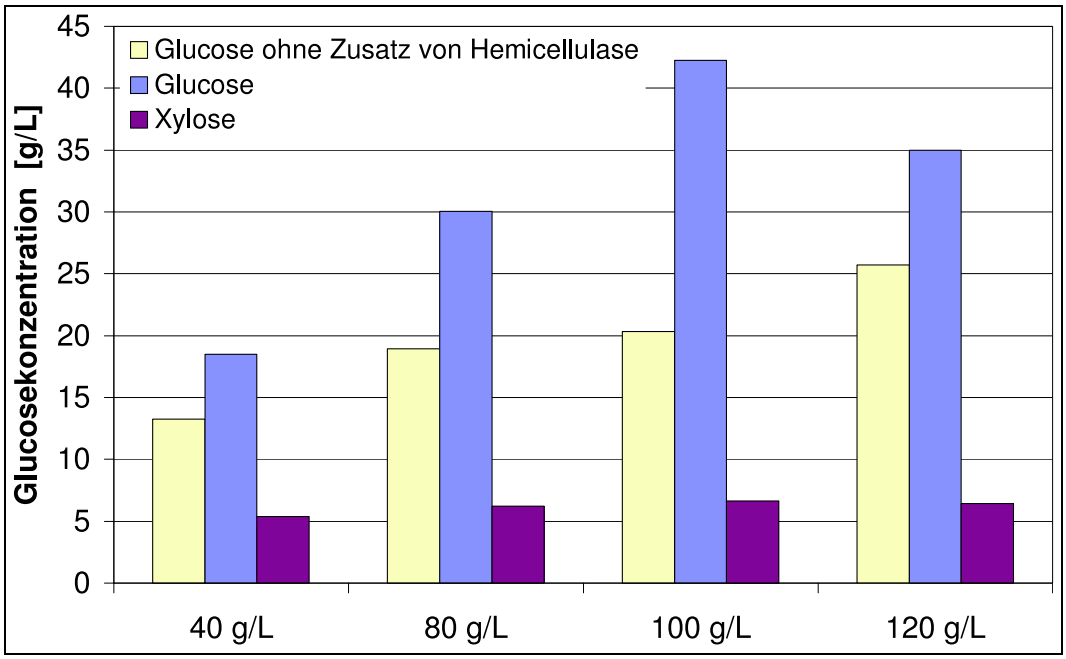


Abb. 3-19: Darstellung der Glucosekonzentration nach 24 h enzymatischer Hydrolyse der BFH 55F Faserstofffraktion in unterschiedlichen Konzentrationen; pH 5,0 (25 ml); 50-ml-Reaktionsgefäße; 50 °C; Überkopfschüttler (24 rpm) (Quelle: TU KL)

Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine höhere Substratkonzentration bei längerer Hydrolysedauer der Betriebsweise des Repeated-fed-Batch (s.o.) vorzuziehen ist. Beim RFB können nur innerhalb der Anfahrphase höhere Ausbeuten erzielt werden, danach stellt sich die erhaltene Glucosekonzentration in der gleichen Größenordnung ein, wie sie beim Batch-Betrieb erhalten wird (Abb. 3-20).

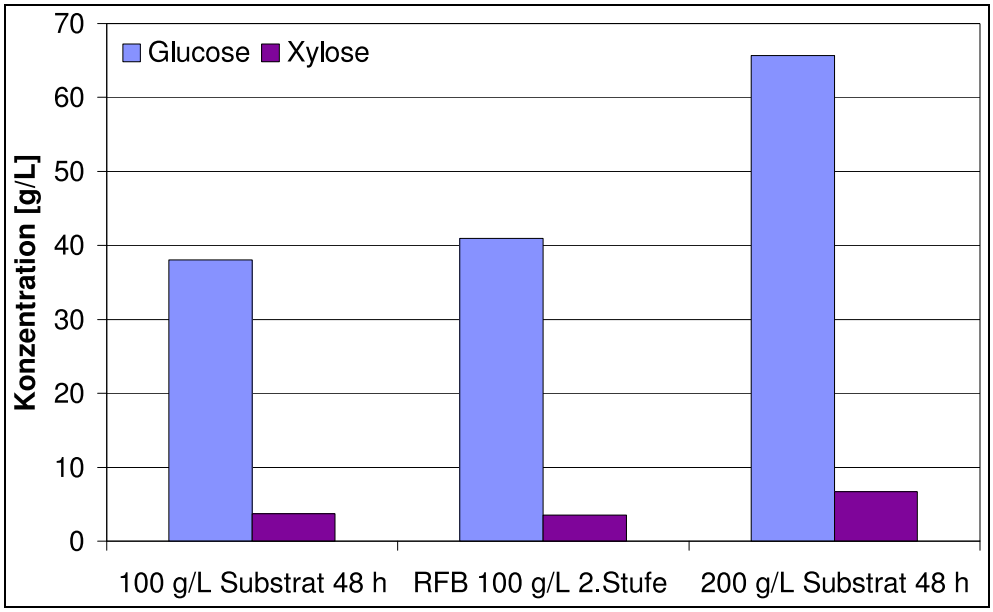


Abb. 3-20: Vergleich der Glucosekonzentration nach 48 h enzymatischer Hydrolyse der BFH 55F Faserstofffraktion in unterschiedlichen Konzentrationen und mit der 2-stufigen RFB-Betriebsweise; pH 5,0 (25 ml); 50-ml-Reaktionsgefäße; 50 °C; Überkopfschüttler (24 rpm)(Quelle: TU KL)

Da bei höheren Substratkonzentrationen eine längere Reaktionszeit nötig ist, bietet sich hier die Möglichkeit, die Hydrolyse in einem Fed-Batch Betrieb zu fahren (Abb. 3-21). Dabei kann eine möglichst gute Durchmischung von Anfang an gewährleistet und gleichzeitig eine gute Glucoseausbeute erzielt werden.

AP3-1.7.5 Einfluss der Enzymmenge

Um die Verzuckerung der Cellulose-Faserstoffe weiter zu optimieren, wurde untersucht, ob eine Steigerung der verwendeten Enzymmenge zu besseren Glucoseausbeuten führt. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Vervierfachung der Enzymmenge in einer etwa 30 % höheren Glucoseausbeute resultiert. Wird die Hydrolyse nach 24 h beendet, können aus dem restlichen Substrat bei Behandlung mit frischen Enzymen in neuem Wasser weitere 10 g/l Glucose erhalten werden. Das bedeutet, dass im besten Falle ein Umsatz von etwa 80 % der im Faserstoff enthaltenen Cellulose erzielt werden kann.

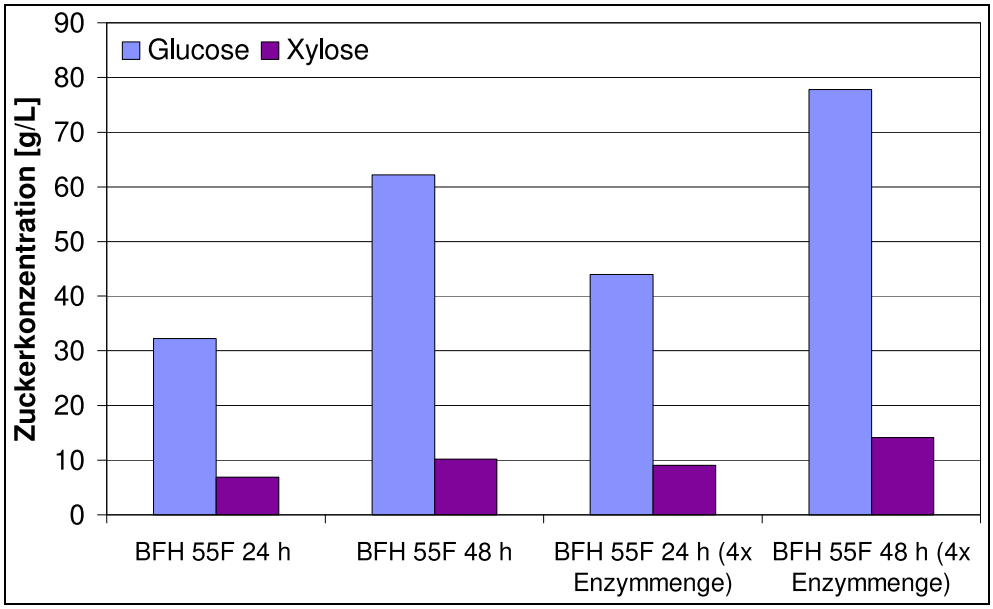


Abb. 3-21: Vergleich der Glucosekonzentration nach enzymatischer Hydrolyse von 100 g/l Faserstoff mit der einfachen bzw. vierfachen Enzymmenge; nach 24 h erneute Substratzugabe (100 g/l); pH 5,0 (25 ml); 50-ml-Reaktionsgefäße; 50 °C; Überkopfschüttler (24 rpm) (Quelle: TU KL)

AP3-1.7.6 Einfluss der Durchmischung

Da bei hohen Substratkonzentrationen die Durchmischung durch das Quellen des Faserstoffes schwierig ist, wurde versucht die Hydrolyse in einem Kneter durchzuführen. Dieser Kneter ist in der Lage, die gequollene Cellulose sehr intensiv mit den Enzymen zu mischen. Es wurde dafür eine Substratkonzentration von 200 g/l eingesetzt. Hierbei zeigte sich allerdings, dass dies kaum einen Einfluss auf die Hydrolyse hat. Nach Kneten und weiterer Hydrolyse für 48 h wurde weniger Glucose freigesetzt als bei der gleichen Substratkonzentration für 72 h im Überkopfschüttler (Abb. 3-22).

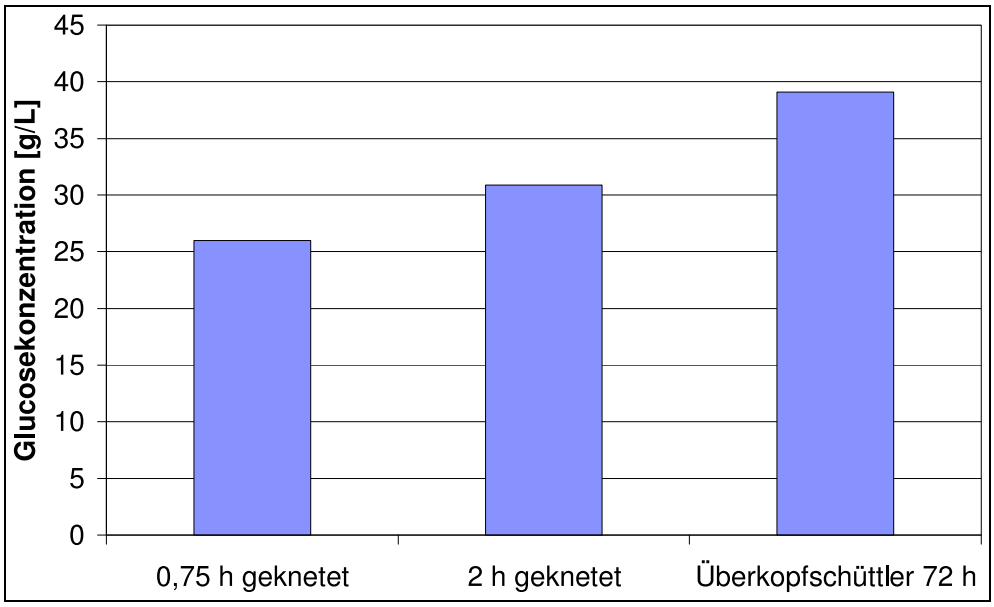


Abb. 3-22: Darstellung der Glucosekonzentration nach unterschiedlicher Knetdauer und 48-h-stehen-lassen bei 50 °C im Vergleich zur Hydrolyse im Überkopfschüttler für 72 h; 200 g/l Substrat (Quelle: TU KL)

AP3-1.7.7 Hydrolyse mit immobilisierter Cellulase

Mit dem Ziel der Katalysatorwiedergewinnung wurden die hydrolysierenden Cellulasen auf Partikelträgern immobilisiert. Hierzu wurden sowohl nanoskalige, magnetisierbare Träger, als auch mikroskalige Teilchen verwendet. Bei den Nanopartikeln handelt es sich um Core-Shell-Systeme mit einem superparamagnetischen Magnetitkern und einer Schale aus Gold. Die Partikel haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 80 nm. Die Goldhülle dient als Schutzschicht für den Kern und als Bindungsoberfläche für weitere Funktionalisierungen. So können Proteine aufgrund der in ihren Aminosäuren enthaltenen Schwefelatome kovalente Bindungen zu Goldoberflächen ausbilden.

Um eine höhere Beweglichkeit (Induced-Fit) der Cellulasen, die mit dem Substrat Cellulose interagieren müssen, zu gewährleisten, wurde auch mit Spacern mit Thiolgruppen gearbeitet. Die Spacer wurden mit ihrer Thiolgruppe auf den Goldoberflächen gebunden. Eine Anbindung der Cellulasen erfolgte über kovalente Bindungen zwischen Carboxyl- und Aminogruppen der Proteine und Spacer. Nach demselben Mechanismus wurden die Cellulasen auf mikroskaligen Partikeln gebunden. Diese verfügen über eine Carboxylfunktionalisierung, die mit den Aminogruppen der Proteine kovalent verknüpft werden konnte. Eine Aufstellung der erzielten spezifischen Bindungsmengen ist in Tab. 3-8 gegeben. Es ist zu erkennen, dass auf die Nano- und Mikropartikel vergleichbare Proteinmengen gebunden werden können.

Die Aktivität der Cellulaseimmobilisate wurde unter den bereits beschriebenen Reaktionsbedingungen untersucht. Hierbei erfolgte ein Vergleich der nativen Cellulasen mit den auf verschiedenen Nanopartikeln (Goldkolloid und Core-Shell-Nanopartikel) gebundenen. Die eingesetzten Mengen an nativem und immobilisiertem Enzym sind hierbei identisch. Ein Vergleich der gebildeten Glucosekonzentrationen ist in Abb. 3-23 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei dem Einsatz der Immobilisate eine erhebliche Verringerung der Glucosekonzentration eintritt. Die Hydrolysereaktion findet mit 10 % der Ausbeute im Vergleich zu dem Einsatz nativer Enzyme statt.

Tab. 3-8: Proteinbindungskapazitäten (Cellulase) von nano- und mikroskaligen Trägersystemen. Bilanzierung der gebundenen Proteinmenmge aus Fluoreszenz-Messungen; Einsatz von jeweils 500 µg Cellulase (Quelle: TU KL)

Probenbezeichnung	gebundenes Protein pro Beads [mg/g]
Nanopartikel ohne Spacer	22,7
Nanopartikel mit Spacer	48,8
µ-Partikel	46,6

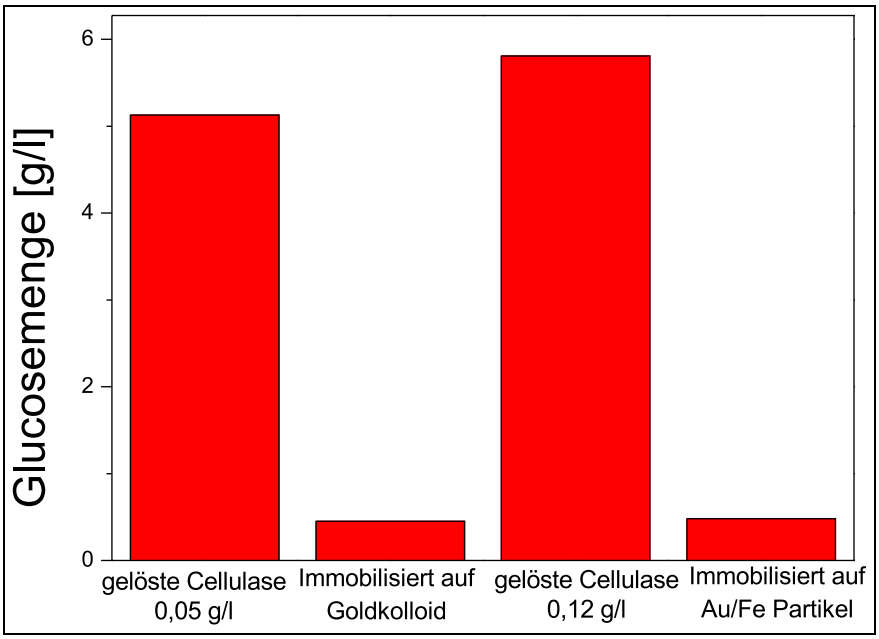


Abb. 3-23: Immobilisierte Cellulase besitzt etwa 10 % der Aktivität nativer Cellulase. Dies gilt sowohl für das Goldkolloid als auch für die Au/Fe_3O_4-Partikel (Quelle: TU KL)

Die Ursache für die verringerte Aktivität der immobilisierten Cellulasen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit in der geringen Zugänglichkeit des Enzyms durch sterische Hinderung der Partikel zum unlöslichen Substrat Cellulose zu suchen. Aus diesem Grund wurden die Cellulaseimmobilisate mit löslicher Carboxymethylcellulose als Substrat untersucht. Eine Übersicht der Glucoseausbeuten mit nativer und immoblisierter Cellulase ist in Tab. 3-9 dargestellt.

Die Immobilisate wurden vier Mal magnetisch abgetrennt und mit neuem Substrat eingesetzt. Im Fall der nativen Cellulase wurde vier Mal in Folge neues Enzym zu den Reaktionsansätzen gegeben. Es ist zu erkennen, dass die Nanopartikelimmobilisate für drei vollständige Hydrolysereaktionen ohne einen bedeutenden Abfall der Katalyseaktivität eingesetzt werden können. Die Aktivität der Immobilisate ist mit ca. 75 % bei Hydrolyse des löslichen Substrats bedeutend höher als die mit der unlöslichen Cellulose. Somit sind sterische Hinderungen ein limitierender Faktor der Cellulosehydrolyse.

Tab. 3-9: Vergleich der Partikelsysteme mit gelöster Cellulase (Quelle: TU KL)

Probenbezeichnung	Vergleich zu gelöster Cellulase [%]			
	1. Abbau	2. Abbau	3. Abbau	4. Abbau
Gelöste Cellulase	100	100	100	100
Nanopartikel ohne Spacer	79	85	81	32
Nanopartikel mit Spacer	74	79	67	28
µ-Partikel	75	77	38	25

AP3-1.7.8 Hydrolyse im Crossflowbetrieb

Da der Einsatz mit wasserunlöslicher Cellulose in einer Aktivitätsverminderung um ca. 90 % resultiert, wurde ein zweistufiger Aufbau mit einer Membranrückhaltung nativer Cellulasen entwickelt. Zur simultanen Rückhaltung der hydrolysierenden Enzyme und Umgehung einer Produktinhibierung der katalytischen Reaktion wurde die Hydrolyse unter Abtrennung des Hydrolysats durch eine keramische Membran (Cut-off: 30 kDa) im Crossflowbetrieb untersucht. Hierbei wurde das Lignocellulosesubstrat zuerst im Satzbetrieb mit Cellulasen hydrolysiert, bis keine Steigerung der Glucosekonzentration mehr zu beobachten war. Im Anschluss folgte eine Querstromfiltration unter Austausch des filtrierten Permeats mit einem äquivalenten Volumen an Citronensäurepuffer. Der Verlauf der im Retentat gebildeten Glucosemenge ist in Abb. 3-24 dargestellt.

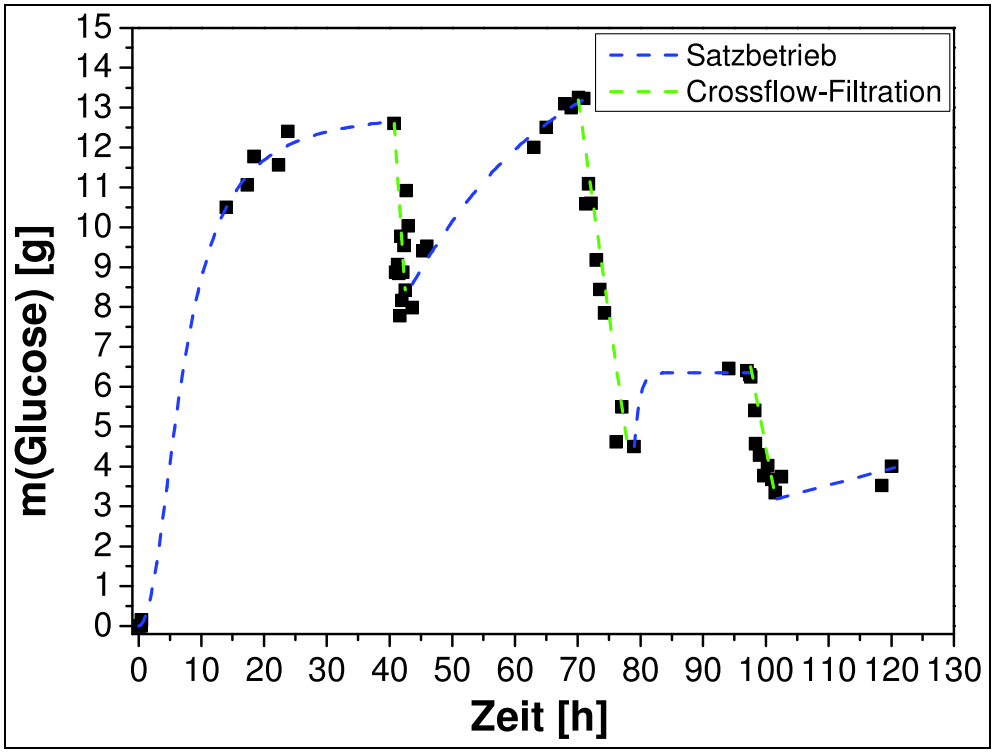


Abb. 3-24: Verlauf der Glucosemasse im Hydrolysereaktor im Satzbetrieb und während der Crossflow-Filtration (Quelle: TU KL)

Wie in Abb. 3-24 zu sehen ist, läuft die erste Stufe der Cellulosehydrolyse über einen Zeitraum von 40 h. Die lange Reaktionszeit wurde gewählt, um sicher zu stellen, dass die Hydrolysereaktion möglichst vollständig abläuft. Im Laufe dieser Reaktionszeit konnten 12,6 g Glucose freigesetzt werden. Im Anschluss wurde die erste Crossflow-Filtration des Reaktorinhalts begonnen.

Insgesamt wurde dreimal filtriert (nach 40 h, 75 h und 95 h). Es ist zu sehen, dass die Glucosemasse nach jedem der drei Filtrationsschritte wieder ansteigt. Während die Masse nach der ersten Filtration mit einem Wert von 13,3 g wieder den Wert der ersten Hydrolysestufe erreicht, ist die Zunahme der Glucosemenge nach den folgenden beiden Filtrationen geringer. Nach der zweiten Filtration wird lediglich eine Glucosemenge von 6,3 g und nach der dritten Filtration von 3,3 g erzielt. Bei einem Abbruch der Hydrolyse durch Denaturierung der Enzymkatalysatoren wäre eine erneute Bildung von Glucose nach den jeweiligen Filtrationen nicht zu erwarten gewesen. Es ist somit davon auszugehen, dass zuerst eine Produktinhibierung die Hydrolysereaktion hemmt, während im späteren Verlauf (hier nach ca. 80 h) eine Denaturierung der Enzyme eintritt.

Das Permeat der oben beschriebenen Filtrationen kann neben Glucosemonomeren auch nicht vollständig hydrolysierte Oligosaccharide enthalten. Für eine vollständige Umsetzung der Zucker wurde eine zweite Reaktionsstufe an die Filtration angeknüpft. Hierbei erfolgte der Einsatz von Glucosidasen, die durch Immobilisierung auf Magnetpartikeln zurückgehalten wurden. Der Anstieg der Glucosekonzentration in dem Permeat ist in Abb. 3-25 dargestellt.

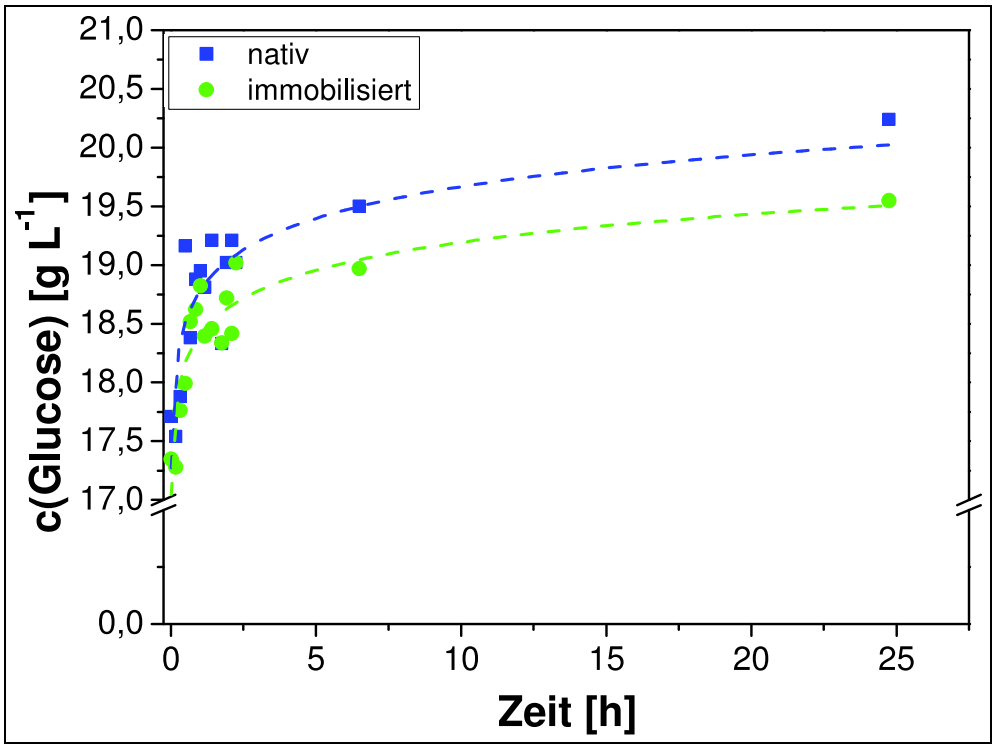


Abb. 3-25: Bildung von Glucose durch Einsatz von nativer und immobilisierter Glucosidase im Permeat des Cellulosehydrolysats (Quelle: TU KL)

Um den Einfluss der Immobilisierung des Enzyms auf den Trägerpartikeln zu untersuchen, wurden Aliquots des Permeats mit nativen Glucosidasen behandelt. Beide Reaktionsverläufe sind in Abb. 3-25 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sowohl durch das native also auch durch das immobilisierte Enzym eine Steigerung der Glucosekonzentration im Permeat erreicht werden kann. Hierbei tritt innerhalb der ersten 2,5 h eine Glucosekonzentrationserhöhung um 1,5 $g \cdot L^{-1}$ (nativ) bzw. 1,1 $g \cdot L^{-1}$ (immobilisiert) ein. Im Laufe der gesamten betrachteten Reaktionszeit von 25 h

konnte die Glucosekonzentration durch Zugabe des nativen Enzyms um 2,53 $g \cdot L^{-1}$ und somit 14,3 % bzw. um 2,2 $g \cdot L^{-1}$ (12,7%) gesteigert werden.

AP3-1.7.9 Zusammenfassung

Die optimiert hergestellten Faserstofffraktionen lassen sich zu Glucose umsetzen und durch Behandlung des Faserstoffes mit Natronlauge noch verbessern. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine enzymatische Hydrolyse ohne Zusatz von Puffersubstanzen möglich ist. Im besten Fall konnten ca. 80 % der im Faserstoff enthaltenen Cellulose umgesetzt werden. Die beste Möglichkeit hohe Glucosekonzentrationen zu erreichen, ist die Betriebsweise als Fed-Batch Hydrolyse.

AP3-1.8 Optimierung der enzymatischen Hydrolyse (FI Biopos e.V.)

Zur grundsätzlichen Testung der Enzymgemische CelluPract® AL 70 und CelluPract® AL 100 wurde ein Substrat/Enzym-Verhältniss von 2:1 gewählt. Für die weiteren Untersuchungen mit dem Ziel des Einsatzes einer katalytischen Menge von Enzymlösung ist die Kinetik der Hydrolyse von Cellulose mittels Cellulase zu betrachten. Die Hydrolyse von Cellulose durch Cellulase wird massiv durch die Cellobiose gebremst. So erklärt sich die extreme Verlangsamung der Cellulosehydrolyse im Batch-System und der hohe Enzym-Einsatz. Die Cellobiosekonzentration kann durch Zugabe von β-Glucosidase im Reaktionssystem verringert werden.

Mit Zugabe von β-Glucosidase in Batch-Reaktionen konnten wir die Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen. Die Hydrolyse wurde bei einem Verhältnis von Substrat/Enzym/Zusatz-Glucosidase von 38,8 g/l zu 0,15 g/l und 0,015 g/l durchgeführt (Abb. 3-26).

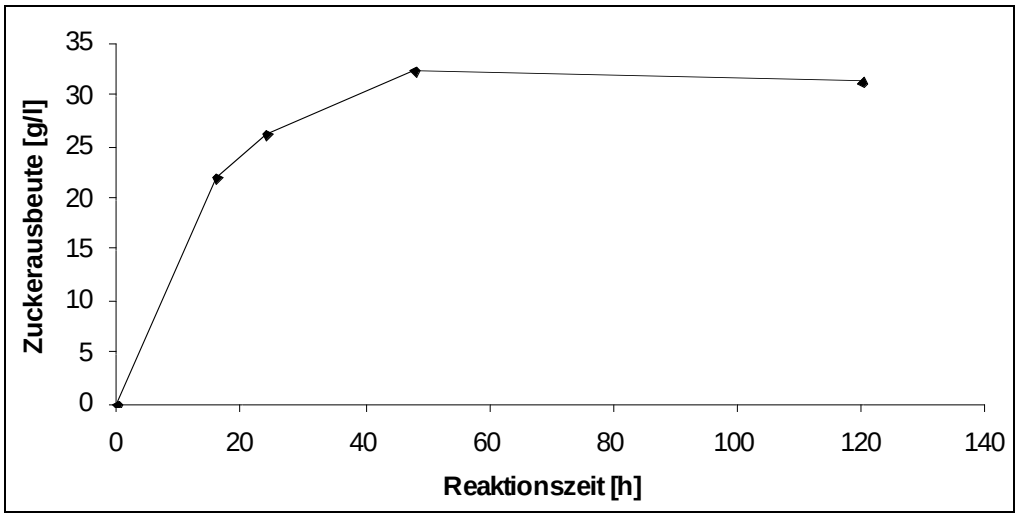


Abb. 3-26: Darstellung der Hydrolyse von BFH19F (38 g/l) in Enzym-Lösung AL 100 (0,15 g/l), und β-Glucosidase (0,015 g/l), pH 5.1, Batch-Ansätze, Magnetrührer, Rührgeschw.: 300 min^{-1} (Quelle: FI Biopos)

Aus den durchgeführten Untersuchungen der enzymatischen Hydrolyse wird die nach Enzymgemisch, Reaktionstemperatur und Ausbeute optimierte Variante als Verfahrensfließbild (Abb. 3-27) dargestellt.

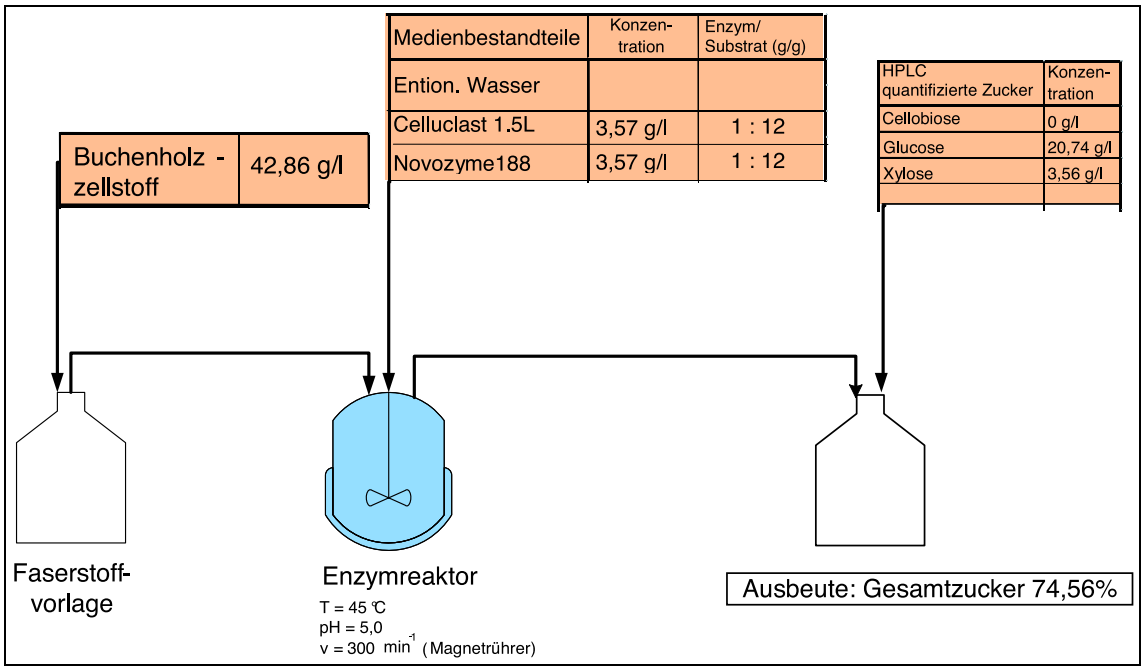


Abb. 3-27: Verfahrensfließbild der optimierten Variante (B) (t=48) (Quelle: FI Biopos)

Mit Enzymgemisch (B) wurden zwar die höchsten absoluten Ausbeuten erzielt, aus wirtschaftlichen Erwägungen heraus empfiehlt sich jedoch der Einsatz des Enzymgemisches (A), wie unter Kapitel AP3-1.4.2 erläutert.

Die mit Variante (A) erreichte Ausbeute von 71 % wird durch den Einsatz in einer Kaskade (Repeated Fed batch) optimiert und für die vorgesehene Pilotanlage technologisch weiter umgesetzt werden können.

AP3-1.9 Fermentation von Cellulose-Hydrolysat und Hemicellulose-Fraktion (TU Kaiserslautern, AP 3.1.4)

Im nächsten Verfahrensschritt werden die entstandenen Zuckermonomere aus der Hydrolyse der Cellulose-Fraktion weiter für die Fermentation zu Ethanol verwendet. Da im Holz nicht nur Glucose (Cellulose-Fraktion) sondern auch die Pentosen wie Xylose (Hemicellulose-Fraktion) in großen Mengen vorhanden sind, musste eine Auswahl von geeigneten Mikroorganismen getroffen werden. Diese sollten in der Lage sein, beide Zuckerarten zu Ethanol metabolisieren zu können. Dadurch kann eine effizientere Nutzung des gesamten Holzzuckers für die Ethanol-Produktion mit höheren Ausbeuten erzielt werden.

AP3-1.9.1 Screening von geeigneten Mikroorganismen (TU Kaiserslautern)

In ersten Experimenten wurde die Hefe *Pachysolen tannophilus*, das Bakterium *Escherichia coli* und die Co-Fermentation der Hefen *Pachysolen tannophilus* und *Saccharomyces cerevisiae* (1:1) auf die Ethanolbildung aus den Substraten Xylose und Glucose in einem komplexen Medium getestet.

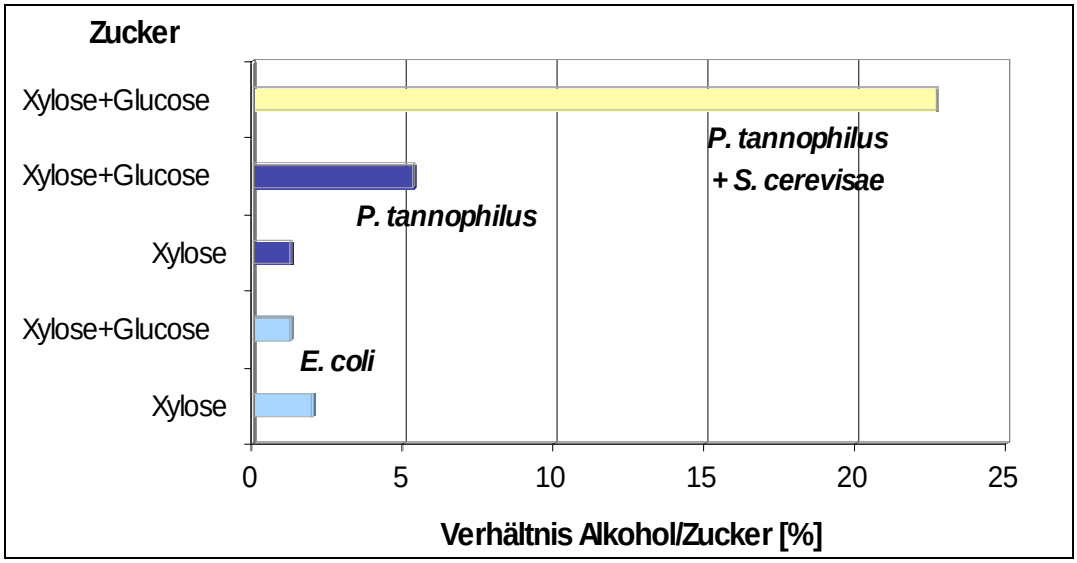


Abb. 3-28: Ethanolbildung verschiedener Stämme nach 24 h; Kultivierungsbedingungen: 30 °C; 50 ml; 130 rpm; pH 5 (Quelle: TU KL)

In Abb. 3-28 ist zu erkennen, dass bei der Co-Fermentation von *Pachysolen tannophilus* und *Saccharomyces cerevisiae* das beste Verhältnis zwischen produziertem Ethanol (ca. 20%) und den zugegebenen Zuckern erreicht werden konnte. Bei der Fermentation mit der Hefe *P. tannophilus* war vergleichsweise nur ein Viertel der EtOH-Ausbeute möglich. Aus diesem Grund wurden die Hefen *Pachysolen tannophilus* und *Saccharomyces cerevisiae* (Siehe Abb. 3-29) für die weiterführende Experimente ausgewählt.

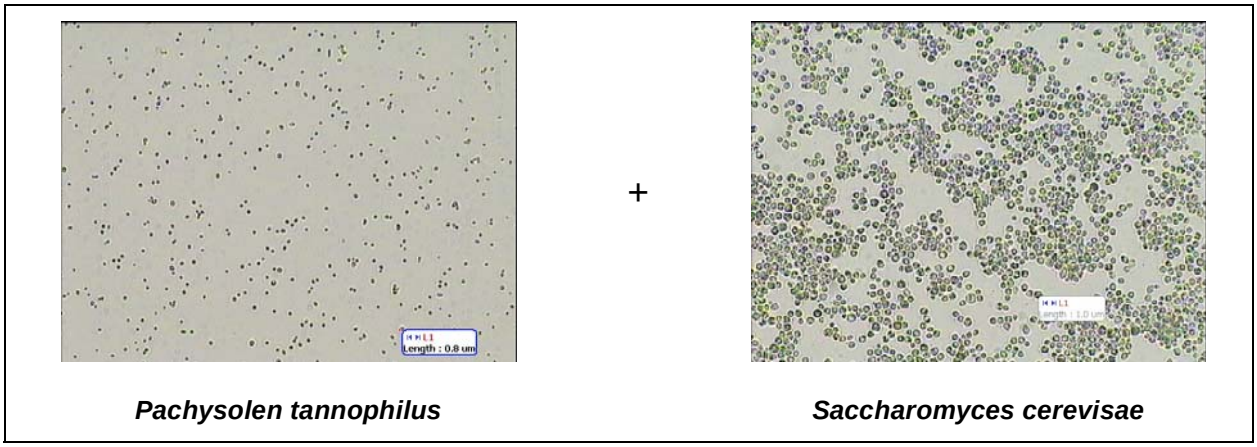


Abb. 3-29: Mikroskopische Aufnahme von ausgewählten Mikroorganismen für Co-Fermentationen (Quelle: TU KL)

AP3-1.9.2 Screening von geeigneten Mikroorganismen zur Biomassebildung (TU Kaiserslautern, Evonik)

Neben der Produktion von Chemikalien, wie das Modellprodukt Ethanol, kann das Hydrolysat ebenfalls zur Produktion von Biomasse verwendet werden. Hierfür erfolgten Versuche mit drei unterschiedlichen Mikroorganismen. Die Ergebnisse hierzu sind im Folgenden aufgeführt.

AP3-1.9.2.1 *Escherichia coli*

E. coli wurde als Mikroorganismus zur Kultivierung auf den Cellulose-Hydrolysaten ausgewählt, da dieser für eine mögliche Anwendung als rekombinanter Produzent in Frage kommt. Für die Kultivierungen wurde das Hydrolysat in diesem Fall mit Ammoniumsulfat, Di-Natriumhydrogenphosphat, Natriumchlorid und Spurenelementen ergänzt. Dabei konnte eine Biotrockenmasse von ca. 2 g/L erzielt werden (Abb. 3-30). Dies zeigt, dass eine Kultivierung von *E.coli* auf den Cellulose-Hydrolysaten prinzipiell möglich ist, allerdings weiter optimiert werden muss.

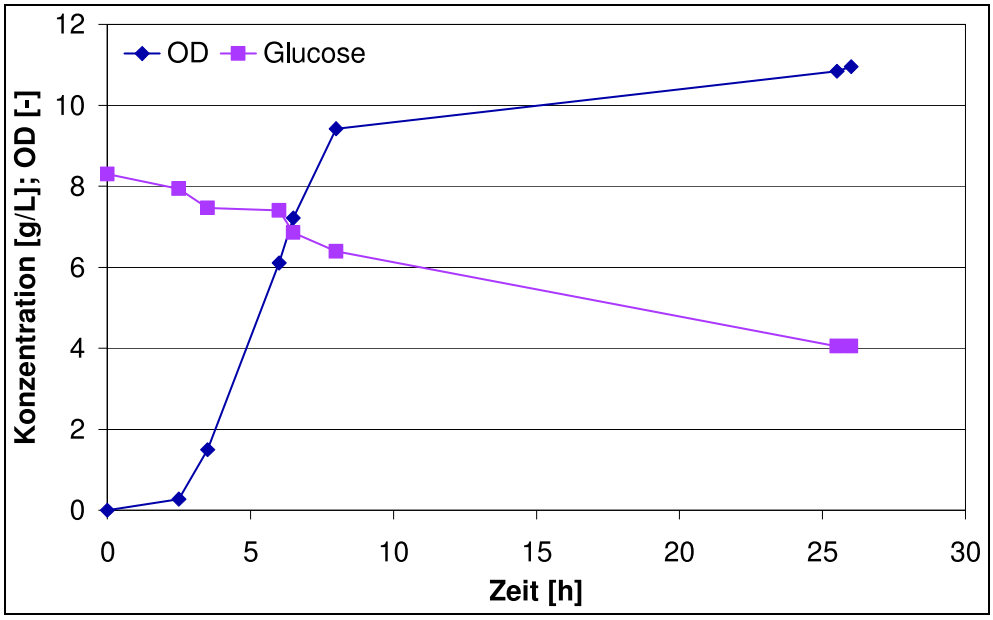


Abb. 3-30: Darstellung der Konzentrationsverläufe einer aeroben Batch-Kultivierung von *E.coli* auf Faserstoff-Hydrolysat im 100-mL-Maßstab (300-mL-Schüttelkolben) zur Biomasseproduktion; pH 7,5; 37 °C; 150 rpm (Quelle: TU KL)

AP3-1.9.2.2 VH-Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

Ein weiterer Organismus, dessen Biomasseproduktion von industriellem Interesse ist, ist die Bäckerhefe *S.cerevisiae*. Für die durchgeführten Versuche zur Biomasseproduktion wurden zwei Industriestämme von der VH-Berlin (Versuchsanstalt der Hefeindustrie e.V.) für die Hefeproduktion zur Verfügung gestellt. In der Batch-Betriebsweise konnten damit Biomasseproduktionsraten erreicht werden, welche nahe dem theoretisch maximal möglichen liegen (Abb. 3-31). Allerdings sind für eine industrielle Verwendung die Glucosekonzentrationen zu gering, da normalerweise eine Fed-Batch-Betriebsweise gefahren wird, bei welcher im Feed etwa die zehnfache Glucosekonzentration vorliegt als in den Hydrolysaten.

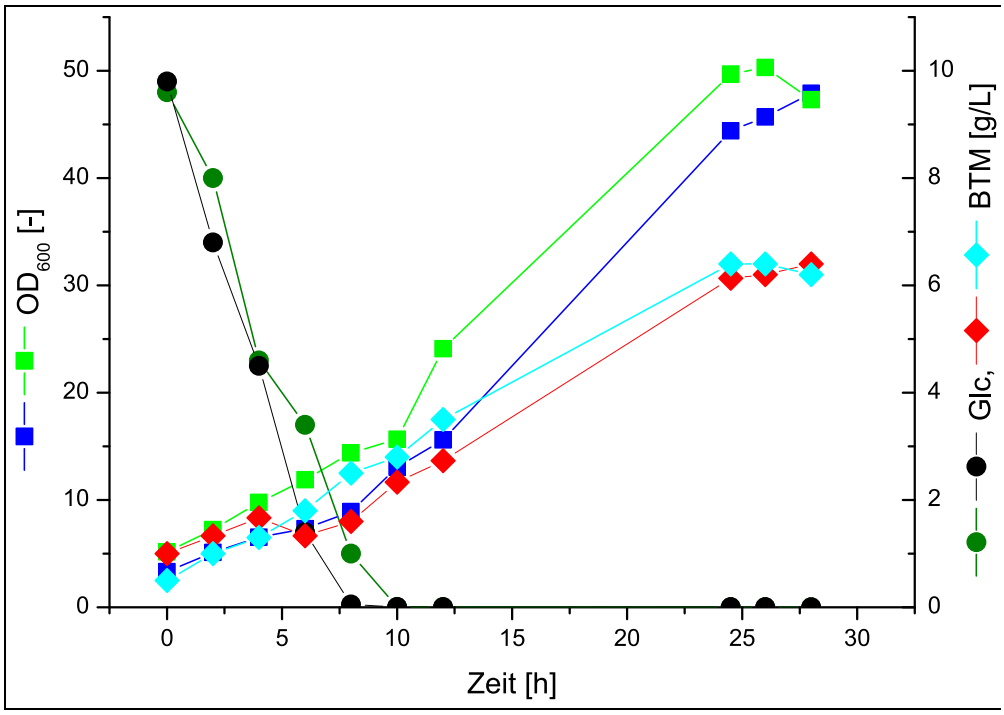


Abb. 3-31: Darstellung der Konzentrationsverläufe einer aeroben Batch-Kultivierung zweier industrieller *S.cerevisiae* Stämme auf Faserstoff-Hydrolysat im 1-L-Maßstab zur Biomasseproduktion; pH 5,0; 30 °C (Quelle: TU KL)

AP3-1.9.2.3 Corynebacterium

Anwendungstechnische Untersuchungen zur Fermentierbarkeit wurden von Evonik mit Hydrolysaten des Projektpartners TU KL auf Basis eines Corynebacterium-Stammes durchgeführt. Die Beurteilung der anwendungstechnischen Eignung wurde an Hand der Profile der Sauerstofftransferrate OTR, der Biomassebildung (OD/BTM), des Substrats und pHs sowie an Hand des Produktspektrums vorgenommen. Neben der Vorlage des Lignocellulose-Aufschlusses als C-Quelle wurde als Referenz definierte Glucoselösung als Substrat benutzt und die Fermentation in Schüttelkolben (RAMOS-System) über die Partialdruckänderungen des Sauerstoffs ausgewertet. Die Fermentationen wurden als Dublette ausgeführt.

Allgemein führte bei dem Lignocelluloseaufschluss (C_6-Fraktion) eine ausgeprägte lag-Phase zu einer wesentlich geringeren Raum-Zeit-Ausbeute, wobei die integral verbrauchte Sauerstoffmenge und die Biomassebildung auf die Referenz bezogen gleich blieben (Abb. 3-32). Das Produktspektrum der beiden Ansätze unterscheidet sich dabei nur geringfügig. Das Ergebnis deutet insgesamt darauf hin, dass die Fraktion aus dem Aufschlussverfahren noch starke Inhibitoren enthält. Wenn diese Inhibitoren entfernt werden, entfällt diese lag-Phase und der OTR-Verlauf entspricht der Referenz. Durch eine in der Aufschlusslösung unerwünscht aufgetretenen Kontamination konnte diese Vermutung bestätigt werden.

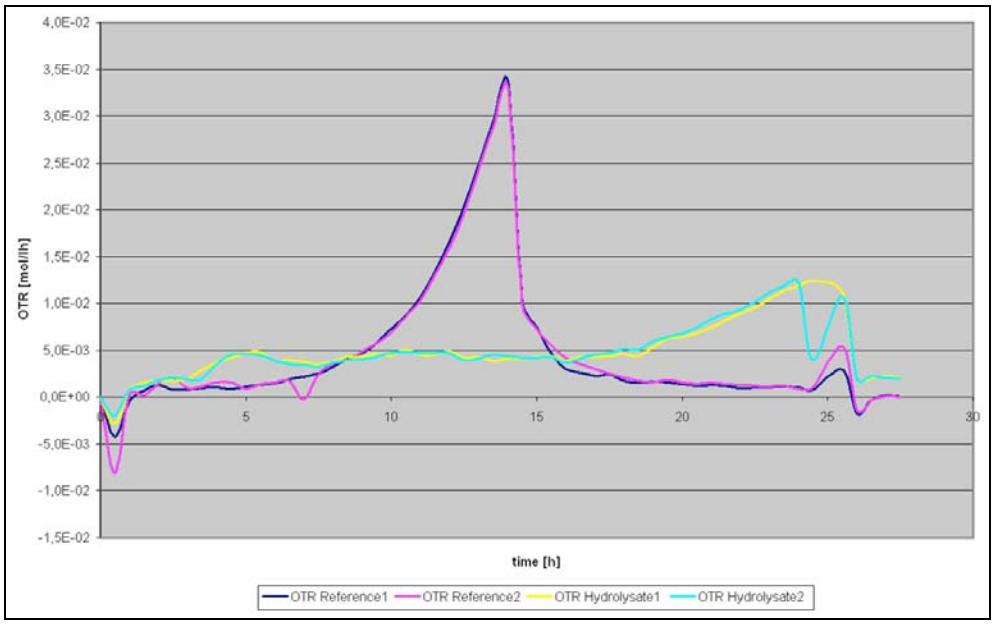


Abb. 3-32: OTR Verlauf einer Schüttelkolbenfermentation (RAMOS) auf Basis eines Lignocellulose-Hydrolysates (Quelle: Evonik)

AP3-1.9.3 Fermentationen in Schüttelkolben (TU Kaiserslautern)

In dieser Versuchsreihe wurden Co-Kultivierungen mit den ausgewählten Hefen im Schüttelkolben-Maßstab realisiert. Dabei wurden die Modellsubstrate Glucose und Xylose, die zuvor hydrolysierte Cellulose-Fraktion und die entstandene Hemicellulose-Fraktion aus dem Holzaufschluss beim Zusatz von $(NH_4)_2SO_4$ als Stickstoff-Quelle, Spurenelementen und Vitaminlösungen fermentiert.

Wie in Abb. 3-33 zu sehen ist, ergeben sich ähnliche Ausbeuten von Ethanol sowohl aus der Fermentation mit den Modellzuckern als auch mit dem enzymatischen Hydrolysat als Substrat. Im Falle des Experimentes mit der Hemicellulose-Fraktion wurde eine geringere Ausbeute erreicht. Dies kann möglicherweise durch inhibierende Substanzen in der Hemicellulose-Lösung verursacht worden sein.

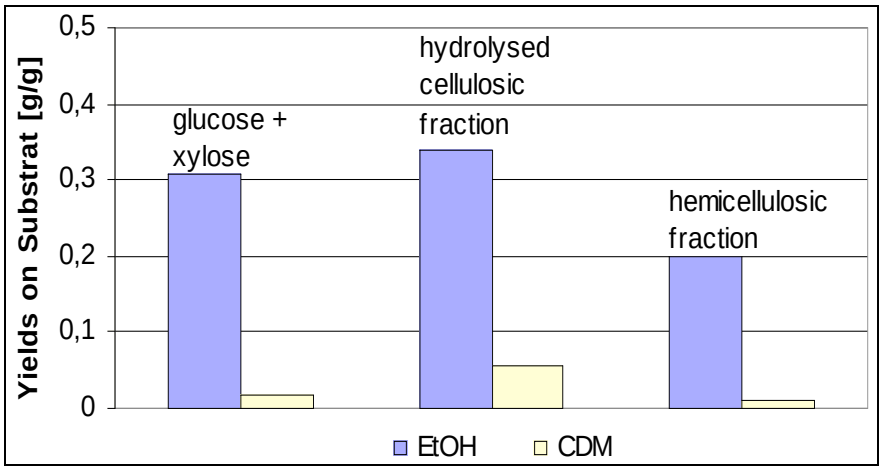


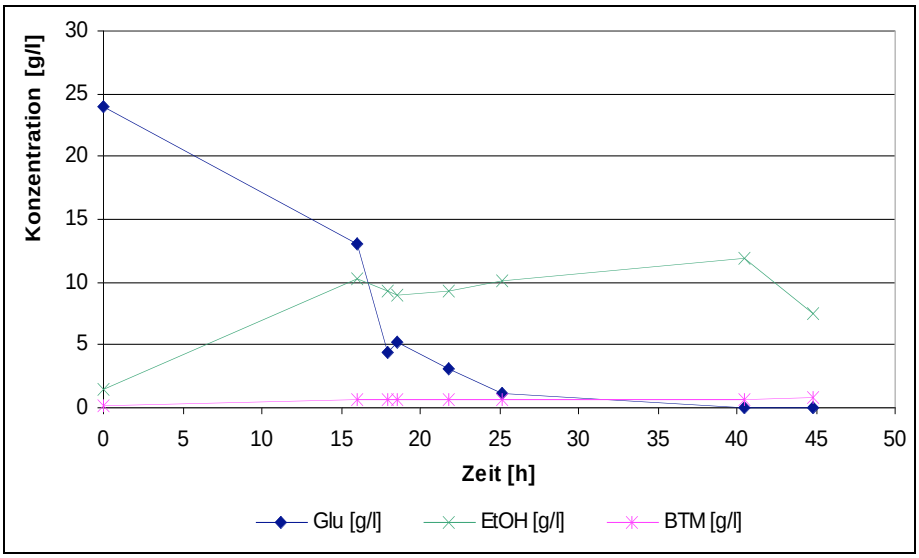
Abb. 3-33: Produktausbeuten aus Co-Fermentationen in Schüttelkolben nach 24 h; 30 °C; 100 ml; 130 rpm; pH 5; *P. tannophilus*: *S. cerevisae* (1:1) Inokulum 10% (Quelle: TU KL)

AP3-1.9.4 Fermentationen in Bioreaktoren (TU Kaiserslautern)

Ziel der Untersuchungen war die Übertragung und Optimierung der Ergebnisse aus den Schüttelkolbenversuchen im größeren Maßstab. Für diesen Zweck wurden Bioreaktoren des Typs Labfors (Infors AG, Schweiz) mit 4-l-Arbeitsvolumen verwendet. Kultivierungsparameter waren jeweils 30 °C, 150 rpm, pH 5 und ein Inokulum von 10 % des Arbeitsvolumens (*P. tannophilus*:*S.cerevisae* im Verhältnis 1:1).

AP3-1.9.4.1 Batch Fermentationen (TU Kaiserslautern)

Als erstes wurden Versuche mit Glucose als Substrat unter aeroben und anaeroben Bedingungen durchgeführt. Als Medium wurde das Minimalmedium M104 (2 g $MgSO_4 \times 7H_2O$, 3 g $(NH_4)_2SO_4$, 14,63 g Na_2HPO_4, 10,19 g $C_6H_8O_7 \times H_2O$, 1 ml Spurenelemente Lösung, 3 ml Vitaminen Lösung und 100 µl Antischaummittel pro Liter) verwendet.



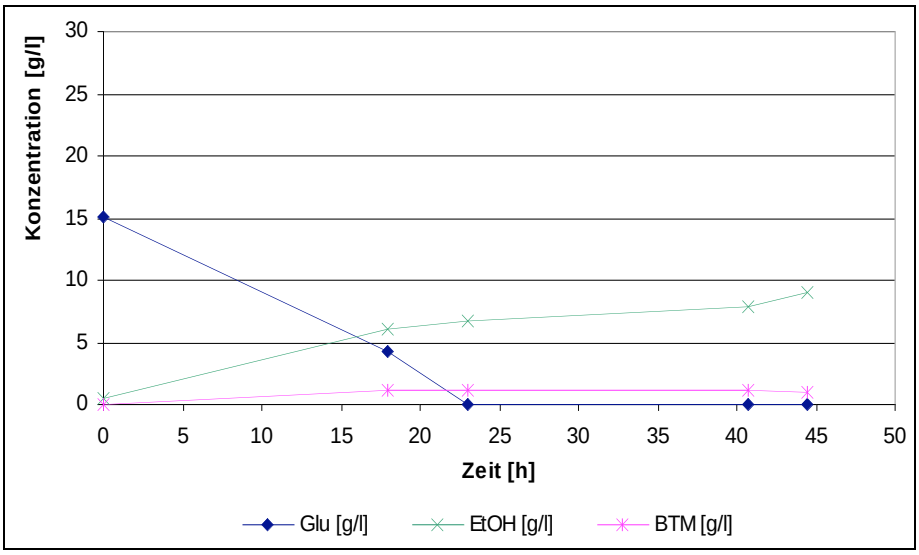


Abb. 3-34: Aerobe (unten) und anaerobe (oben) Batch Fermentationen mit Glucose als Substrat; 30 °C; 4 l; 150 rpm; pH 5; *P. tannophilus*:*S. cerevisae* (1:1) Inokulum 10% (Quelle: TU KL)

Aus den Konzentrationsverläufen während der Fermentationen in Abb. 3-34 ist zu sehen, dass wie erwartet mehr Biomasse unter aeroben Bedingungen gebildet wurde. Die Konzentrationen des Ethanols erreichten nach ca. 24 h Werte von ca. 6,6 g/l bzw. ca. 10 g/l. Im Falle der anaeroben Kultivierung konnte eine Ethanolausbeute von 0,45 g/g verbrauchte Glucose erzielt werden. Die in diesen Versuchen erreichten Werte liegen nahe an der maximalen theoretischen Ethanolausbeute von 0,51 g/g.

Es wurden ebenfalls Fermentationen mit dem enzymatischen Hydrolysat als Substrat durchgeführt. Dabei sollte überprüft werden, ob bei Verwendung des Hydrolysats Inhibierungen im Stoffwechsel der Hefen auftreten.

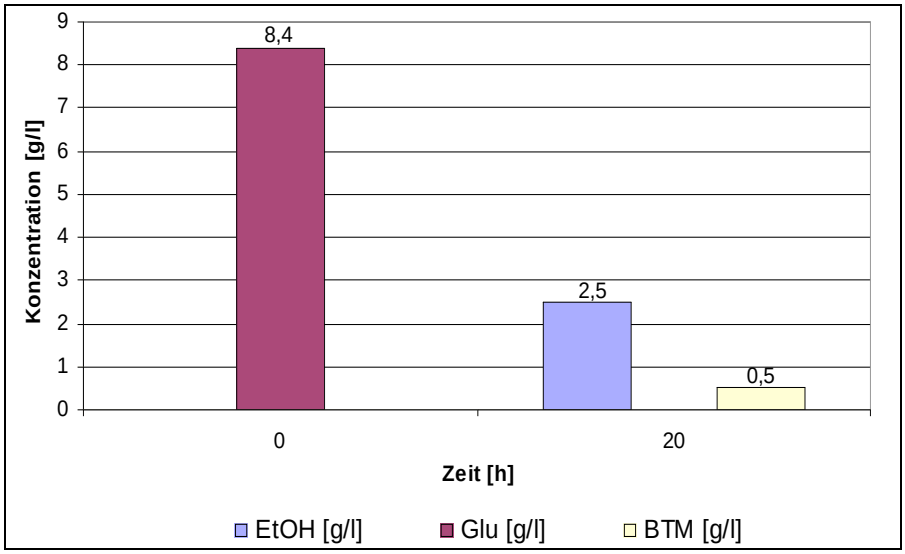


Abb. 3-35: Batch Fermentation mit Hydrolysat als Substrat; 30 °C; 4 l; 150 rpm; pH 5; *P. tannophilus*:*S. cerevisae* (1:1) Inokulum 10 %; Legende: EtOH – Ethanol; Glu – Glucose; BTM – Biotrockenmasse (Quelle: TU KL)

Wie in Abb. 3-35 dargestellt, konnte die enthaltene Glucose im Hydrolysat zu Ethanol metabolisiert werden. Die Ausbeute an Ethanol betrug nach 20 h 0,3 g/g verbrauchter Glucose. Dieser Wert ist um ca. 32% niedriger als bei der Verwendung von reinen Kohlenhydratlösungen. Die Untersuchungen zeigen aber, dass eine Verwendung des nicht aufgearbeiteten Hydrolysates in Fermentationen möglich ist.

Zur Fermentation der Faserstoff-Hydrolysate wurde eine Co-Kultivierung von *S.cerrevisiae* und *P.tannophilus* durchgeführt, um sowohl die Glucose als auch die Xylose, welche durch den enzymatischen Aufschluss erhalten werden, in Ethanol umzusetzen (Abb. 3-36). Hierfür wurden die Hydrolysate nur geringfügig um die notwendigen Medienbestandteile ergänzt (Ammoniumsulfat [3 g/l], Di-Natriumhydrogenphosphat [2,5 g/l], Magnesiumsulfat [2 g/l], Spurenelemente [1 ml/l] und Vitamine [30 µl/l]).

Bei den Batch-Fermentationen konnten Ethanolausbeuten zwischen 0,3 und 0,4 g Ethanol pro g Zucker erreicht werden. Dies entspricht etwa 60 – 80 % des theoretisch maximal möglichen Umsatzes. Allerdings war zu beobachten, dass die Umsetzung der Xylose sehr lange dauert.

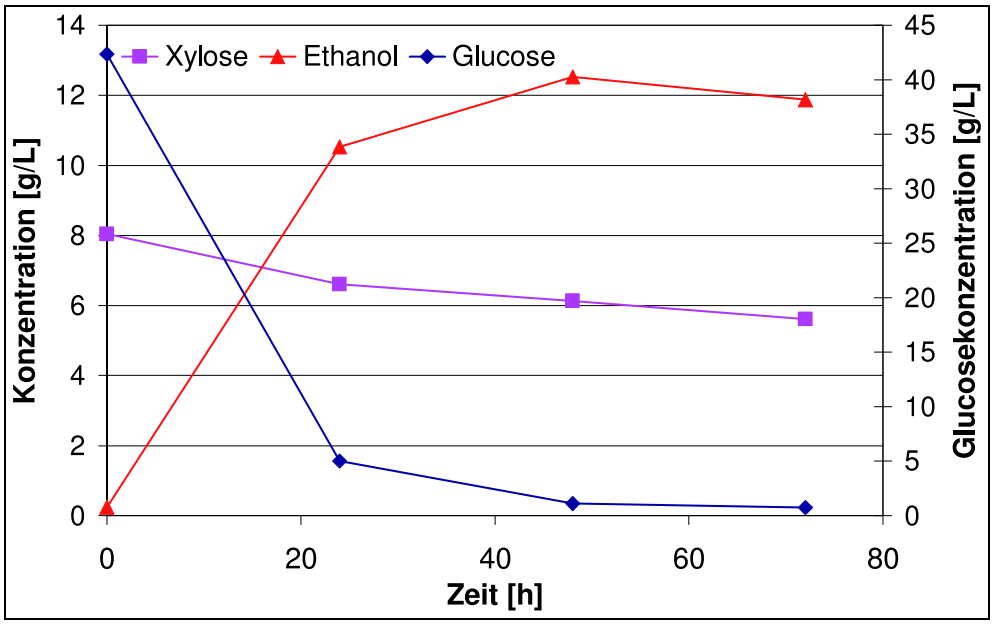


Abb. 3-36: Darstellung der Konzentrationsverläufe einer anaeroben Co-Kultivierung auf Faserstoff-Hydrolysat im 50-mL-Maßstab zur Ethanolproduktion; pH 5,0; 30 °C (Quelle: TU KL)

AP3-1.9.4.2 Fed-Batch-Fermentationen

Zur Produktion von Ethanol aus den Cellulose-Hydrolysaten wurde wie oben beschrieben eine Co-Fermentation durchgeführt. Neben der Batch- wurde hierfür auch die Fed-Batch-Betriebsweise untersucht. Hierfür wurde ein Biostat Q Reaktorsystem (Volumen 900 mL) verwendet. Das Startvolumen betrug 300 mL und der Feed wurde mit einem konstanten Volumenstrom von 0,5 mL/min gefahren. Hierbei wurden sowohl für die anfängliche Batch-Phase als auch im Feed Cellulose-Hydrolysat verwendet (Abb. 3-37).

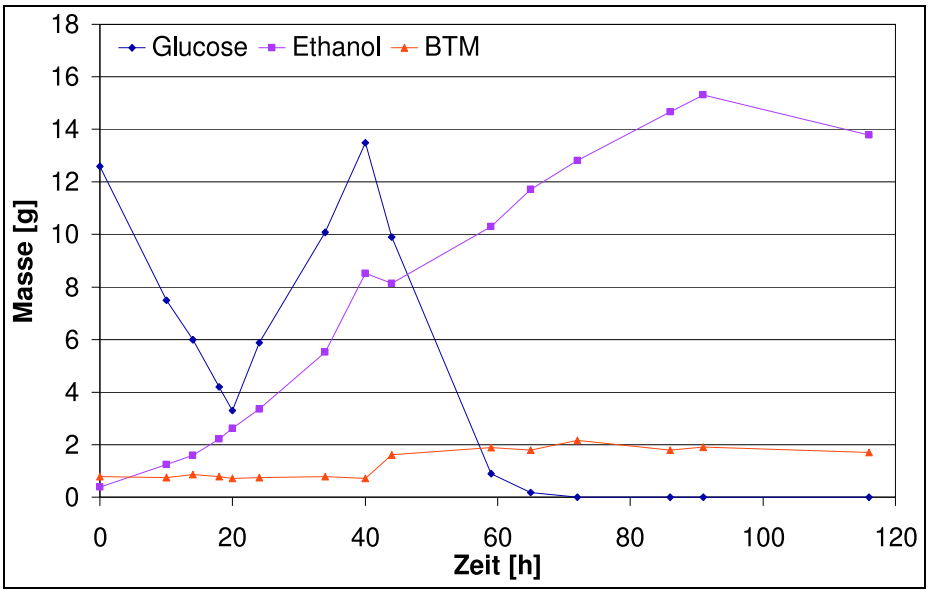


Abb. 3-37: Darstellung der Masseverläufe einer anaeroben Fed-Batch Co-Kultivierung auf Faserstoff-Hydrolysat im 50-mL-Maßstab zur Ethanolproduktion; pH 5,0; 30 °C (Quelle: TU KL)

Zum Vergleich wurde parallel eine Kultivierung mit einem Glucose-haltigen Minimalmedium durchgeführt. Hierbei wurde die Zuckerkonzentration an die des Hydrolysates angepasst. Es konnte gezeigt werden, dass die berechneten Ausbeuten in gleichen Größenordungen und – mit Ausnahme der spezifischen Produktivität – im Bereich der theoretischen Werte liegen (Tab. 3-10). Dabei entspricht die Ausbeute etwa 80 % der theoretisch möglichen.

Tab. 3-10: Kenngrößen einer anaeroben Fed-Batch Co-Kultivierung auf Faserstoff-Hydrolysat im 50-mL-Maßstab zur Ethanolproduktion; pH 5,0; 30 °C (Quelle: TU KL)

Verfahren	Parameter	Minimal Medium	Hydro-lysat	Theore-tisch
Batch-Bereich	**Volum. EtOH Produktivität [g L^{-1} h^{-1}]**	0,3928	0,3730	
	Volum. BM Produktivität [g L^{-1} h^{-1}]	0,0700	0	
	Spez. Produktivität [g g^{-1} h^{-1}]	0,2619	0,1435	
	Ausbeute YP/S [g g^{-1}]	0,2543	0,2244	
	Ausbeute YX/S [g g^{-1}]	0,0453	0	
Feed-Bereich	**Volum. EtOH Produktivität [g L^{-1} h^{-1}]**	0,3304	0,4912	
	Volum. BM Produktivität [g L^{-1} h^{-1}]	0,0300	0,0060	
	Spez. Produktivität [g g^{-1} h^{-1}]	0,2448	0,3721	
	Ausbeute YP/S [g g^{-1}]	0,3478	0,3930	
	Ausbeute YX/S [g g^{-1}]	0,0316	0,0048	
Gesamt	**Volum. EtOH Produktivität [g L^{-1} h^{-1}]**	0,1866	0,1822	
	Volum. BM Produktivität [g L^{-1} h^{-1}]	0,0216	0,0137	
	Spez. Produktivität [g g^{-1} h^{-1}]	0,0933	0,0863	0,4335
	Ausbeute YP/S [g g^{-1}]	0,4246	0,3947	0,51
	Ausbeute YX/S [g g^{-1}]	0,0492	0,0296	0,15

AP3-1.9.4.3 Simultane Verzuckerung und Fermentationen (SSF) (TU Kaiserslautern)

Um den Gesamtprozess zu vereinfachen, ist die simultane Verzuckerung und Fermentation eine Möglichkeit. Hierbei werden sowohl die enzymatische Hydrolyse als auch die fermentative Umsetzung zu Ethanol in einem Reaktionsschritt durchgeführt. Um einen möglichen Einfluss der Ethanolkonzentration die Enzymaktivität zu untersuchen, wurden Hydrolysen in Gegenwart von Ethanol durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Gegenwart von Ethanol die enzymatische Hydrolyse nicht inhibiert (Abb. 3-38).

Des Weiteren wurde der Einfluss der geringeren Temperatur (30°C) auf die Geschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die Reaktion wie zu erwarten langsamer abläuft, allerdings ähnliche Glucosekonzentrationen erhalten werden (Abb. 3-39).

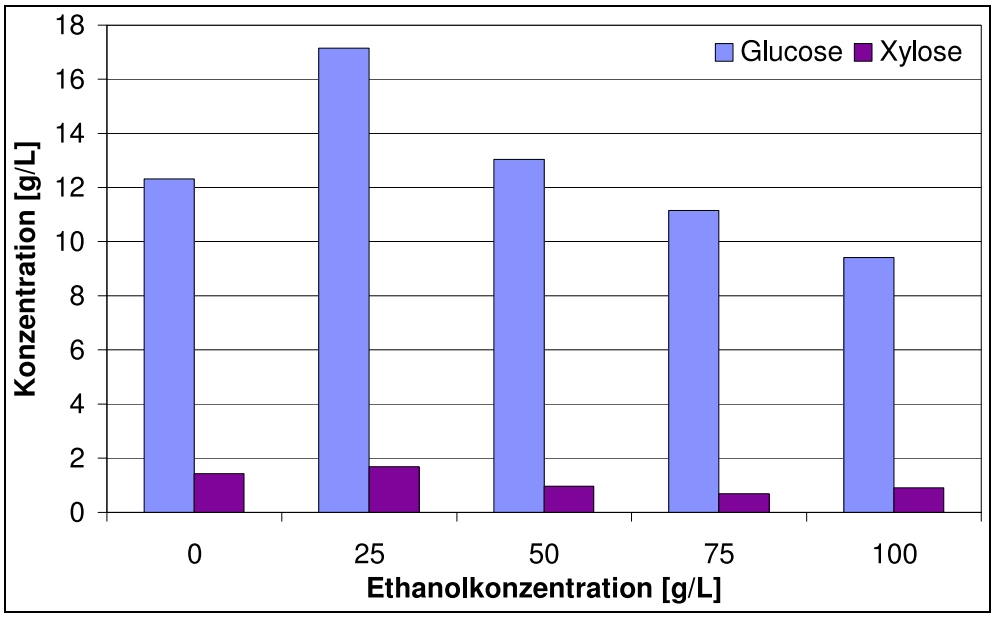


Abb. 3-38: Darstellung der Glucosekonzentration nach enzymatischer Hydrolyse von BFH 55F (40 g/L) in unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen; pH 5,0 (25 ml); 50 ml Reaktionsgefäße; 50 °C; Überkopfschüttler (24 rpm) (Quelle: TU KL)

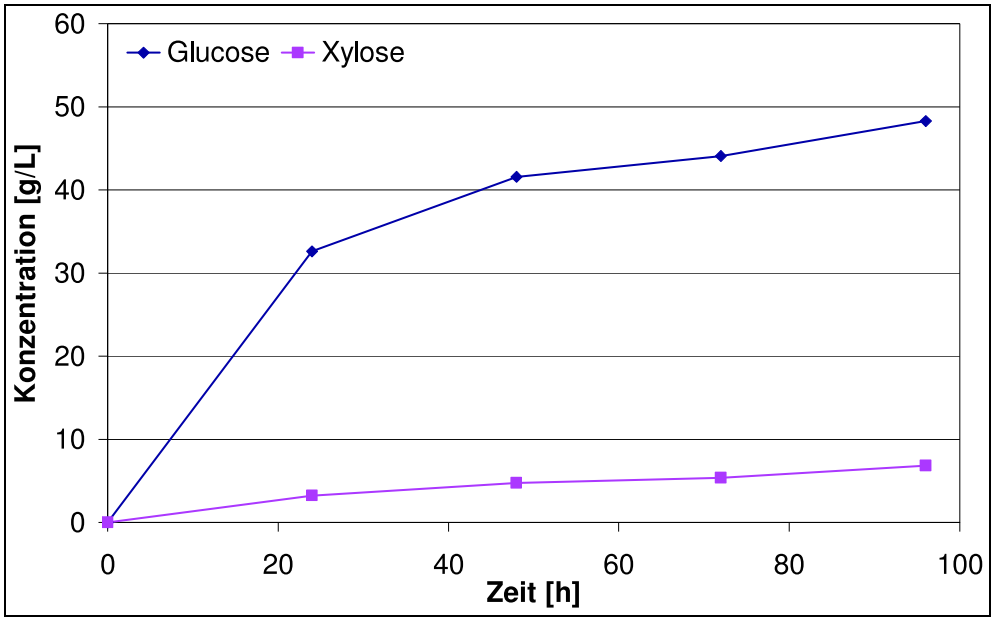


Abb. 3-39: Darstellung der Zuckerkonzentrationsverläufe der enzymatischer Hydrolyse von BFH 55F (100 g/L) mit den Bedingungen der SSF; pH 5,0 (50 ml); 100-ml-Reaktionsgefäße; 30 °C; Schüttelinkubator (150 rpm) (Quelle: TU KL)

Die SSF wurde unter anaeroben Bedingungen im 50 mL Maßstab, mit einer Substratkonzentration von 100 g/L durchgeführt. Die Ergänzung der Ansätze um notwendige Medienbestandteile wurde dabei analog zur Fermentation der Hydrolysate durchgeführt. Dabei konnten Ethanolkonzentrationen über 20 g/L erreicht werden (Abb. 3-40). Wird die bei der Hydrolyse erreichte Glucosemenge zu Grunde gelegt, entspricht das einer Ethanolausbeute, welche nahe der theoretisch

möglichen liegt. Außerdem ist die erzielte Ethanolmenge bei dieser Betriebsweise größer als bei separaten Hydrolyse- und Fermentationsschritten.

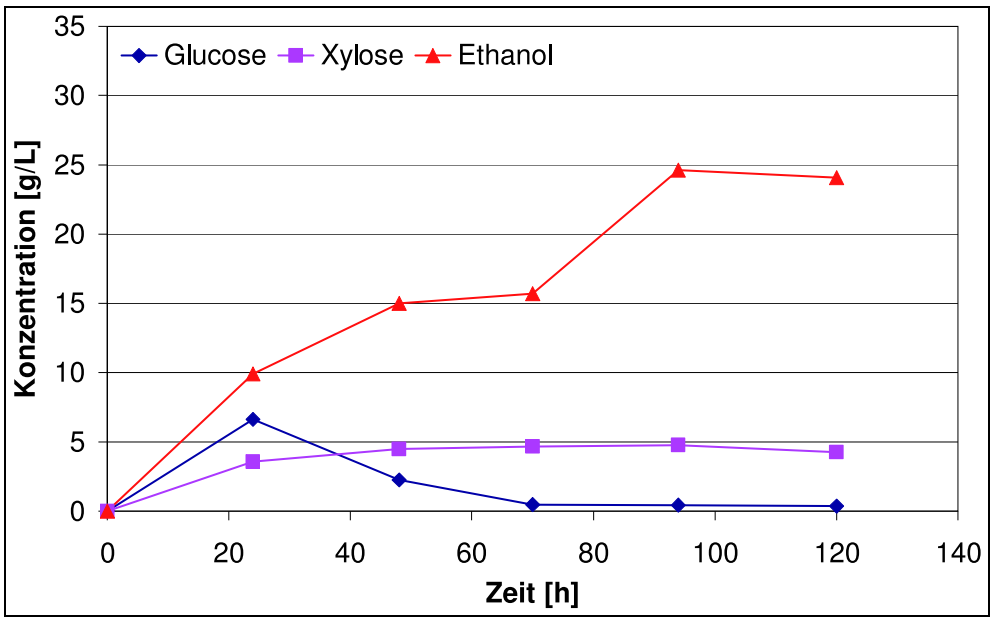


Abb. 3-40: Darstellung der Konzentrationsverläufe der SSF auf BFH 55F (100 g/L); pH 5,0 (50 ml); 100-ml-Reaktionsgefäße; 30 °C; Schüttelinkubator (150 rpm) (Quelle: TU KL)

Um die Ethanolkonzentration weiter zu erhöhen, wurde versucht, die SSF zusätzlich als Fed-Batch zu fahren. Dabei zeigte sich, dass die erneute Substratzugabe die Umsetzung zu Ethanol verlangsamt und dadurch kein vollständiger Umsatz mehr möglich ist (Abb. 3-41).

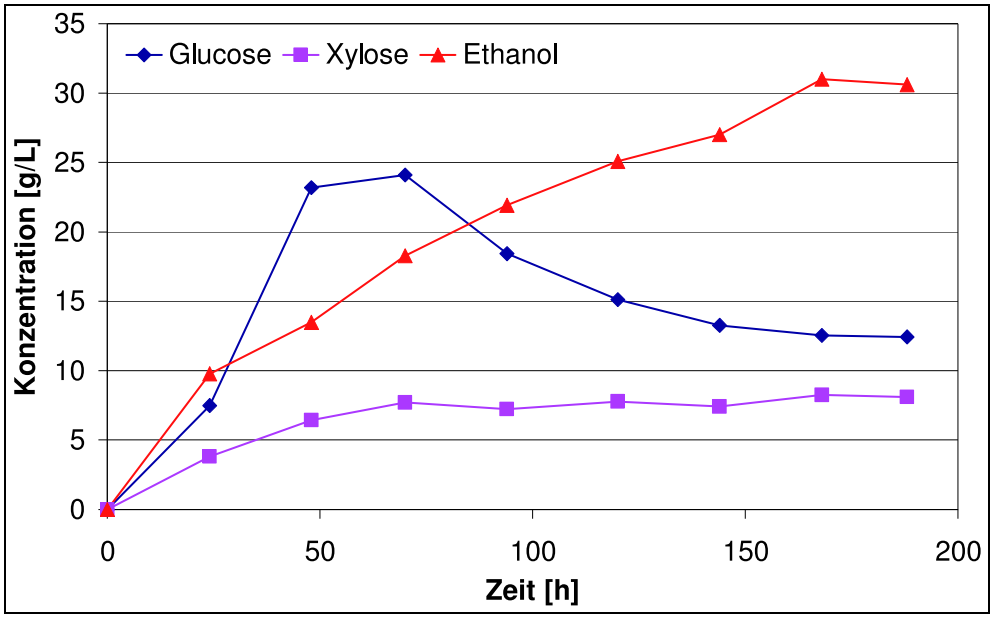


Abb. 3-41: Darstellung der Konzentrationsverläufe der SSF auf BFH 55F (100 g/L) mit Zugabe weitere 100 g/L Substrat nach 24 h; pH 5,0 (50-ml); 100-ml-Reaktionsgefäße; 30 °C; Schüttelinkubator (150 rpm)(Quelle: TU KL)

AP3-1.9.5 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass die Fermentation der Hydrolysate zu Ethanol möglich ist und bei verschiedenen Betriebsweisen Ausbeuten von 60 – 80 % der theoretisch möglichen Ausbeute erzielt werden können. Zusätzlich wurde erfolgreich verifiziert, dass die Hydrolysate zur Biomassebildung verwendet werden können. Dabei wurde festgestellt, dass beispielsweise die Kultivierung von Hefen in hohen Biomasseausbeuten resultierte. Bei Einsatz anderen Mikroorganismen waren die Kultivierung weniger ergiebig und bedürfen weiterer Optimierungen. Auf Grund dieser Ergebnisse lässt sich sagen, dass bei Verwendung der Hydrolysate im Einzelfall überprüft und für den jeweiligen Organismus optimiert werden muss.

Die abschließenden Versuche zur simultanen Verzuckerung und Fermentation zeigten sich als ein Erfolg versprechender Ansatz für einen weiteren Prozess. Weder die geringere Temperatur bei dieser Betriebsweise, noch das dabei entstehende Ethanol scheinen die Umsetzung zu beeinträchtigen. Des Weiteren können dabei deutlich höhere Ethanolkonzentrationen erreicht werden, als bei getrennter Hydrolyse und Fermentation.

AP3-1.10 Weiterverarbeitung der Cellulosefraktion und anwendungstechnische Untersuchungen – Auswahl geeigneter cellulolytischer Bakterienkulturen für Hydrolyse der Buchenholzfraktion (AP 3.1.2 und AP 3.1.4, TU München)

Ziel des Teilprojektes der TU München ist es, geeignete cellulolytische Bakterienkulturen und deren Enzyme für eine optimierte Hydrolyse der Cellulose- bzw. Hemicellulosefraktion (s. AP3-2) von Buchenholz auszuwählen. Neben den verfahrenstechnisch ausgerichteten Arbeiten werden neue, effizient arbeitende Enzympräparationen entwickelt für die Unterstützung des Aufschlusses, die Monomerisierung der polymeren Komponenten und die downstream-Verarbeitung der Spaltprodukte zu hochwertigen Substanzen.

Die unlösliche Cellulosefraktion aus der Komponententrennung mit alkoholischen Lösungsmitteln (Aufschluss 35 und 38) wurde auf ihre Hydrolysierbarkeit durch cellulolytische Bakterienkulturen getestet. Dazu wurden verschiedene *Clostridien*-Kulturen in Batch-Kultur eingesetzt, die anaeroben Kultivierungsbedingungen im Labormaßstab optimiert und die Effizienz der Hydrolyse durch Analyse der unverdauten Reststoffe/Faserfraktion bestimmt.

Die höchsten Abbauraten der Cellulosefraktion von ca. 90 % in der Trockensubstanz (TS) wurden bei 60 °C Kultivierungstemperatur und einer 1 %-igen Substratkonzentration erzielt (Abb. 3-42), während bei 55 °C und 75 °C mit identischer Inkubationszeit nur < 30 % der Buchenholzfraktion abgebaut wurden.

In Abb. 3-43 zeigen die dargestellten Durchschnittswerte eine Verringerung der prozentualen Abbauraten der Cellulosefraktion mit steigender Substratkonzentration. Zu berücksichtigen ist dabei, dass es bei den im Labormaßstab durchgeführten Batch-Ansätzen zu einer Hemmung des Bakterienwachstums durch Anreicherung von Produkten kommen kann. Diese Hemmung kann durch alternative Verfahrensführung minimiert werden und wird bei dem geplanten *in-vitro*-Einsatz der Enzyme auch anders aussehen. *C. thermocellum* ATCC27504, *C. thermocellum* F7 sowie die Mischkultur K erreichten die höchsten hydrolytischen Aktivitäten beim Abbau der Cellulosefraktion.

Abb. 3-42: Hydrolyse der Buchenholzfraktion durch cellulolytische Bakterienkultur (60 °C, 7 d, 0,5 %) (Quelle: TUM)

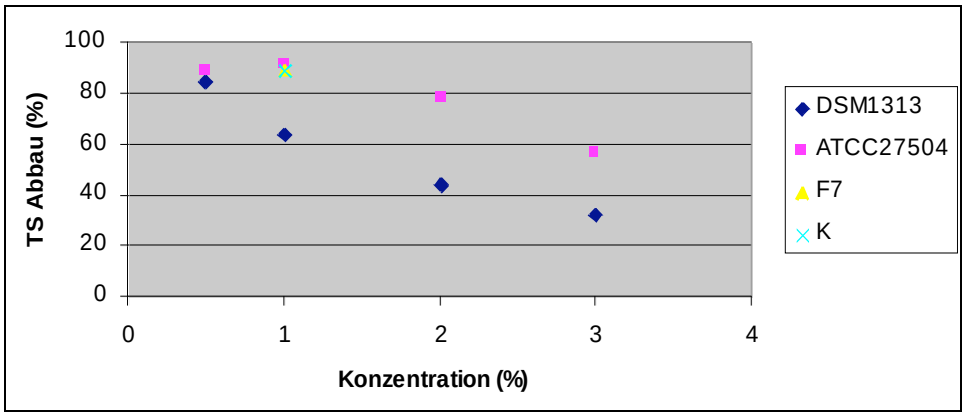


Abb. 3-43: Abbau der Buchenholz-Faserfraktion in der Trockensubstanz bei 60 °C und 7 d Kultivierung (Durchschnittswerte) (Quelle: TUM)

Tab. 3-11 fasst die Ergebnisse der Faserstoffbestimmungen für den Cellulose-, Hemicellulose- bzw. Ligninanteil durch die cellulolytische Aktivität der Mischkultur K nach 7-tägiger Kultivierung bei 60 °C zusammen. Bei einem Abbau der Cellulosefraktion von 92,8 % in der TS wurden 99,0 % der Cellulose, 73,4 % der Hemicellulose bzw. 47,4 % der Lignin-Fraktion solubilisiert. Dies entspricht einer Verschiebung der einzelnen Restanteile in der Faserstofffraktion auf nur noch 11,6 % Cellulose, 6,4 % Hemicellulose und 70,6 % Lignin-Fraktion. Somit wurden geeignete cellulolytische Bakterienkulturen, sowie optimierte Kultivierungsbedingungen für eine sehr effiziente Hydrolyse der Cellulosefraktion des Laubholzes Buche gefunden. Das Ergebnis zeigt auch, dass die Präparation der Buchenholz-Cellulosefraktion zu einem Material führt, das sowohl für die enzymatische Hydrolyse der Cellulose, wie auch als Substrat für die mikrobielle Umsetzung durch lebende cellulolytische Bakterienkulturen hervorragend geeignet ist.

Die Durchführung von Zeitreihen mit 1- bis 7-tägiger Kultivierung der Hydrolyseansätze führte zu dem Ergebnis, dass nach 5 Tagen bereits der höchste Abbau der Buchenholzfraktion mit cellulolytischen Bakterienkulturen erreicht wurde.

Tab. 3-11: Faserstoffanalytik Ansatz von 1,1 g Buchenholzfraktion mit der cellulolytischen Mischkultur K (in 200ml GS2-Medium, 0,5%, 60 °C, 7d, pH7)

	TS [g]	TS Abbau [%]	NDF [g]	ADF [g]	Hemicellulose [g]	ADL-Fraktion [g]	Cellulose [g]
Kultur K	0,0735	93,32	0,0651	0,0604	0,0047	0,0519	0,0085
Kontrolle	1,0276	6,5818	1,0015	0,9838	0,0177	0,0986	0,8852
Abbau	***0,9541***	***92,8%***			***73,4%***	***47,4%***	***99,0%***
Kultur K					**6,4%**	**70,6%**	**11,6%**
Kontrolle					1,7%	9,6%	86,1%

Weitere Abbauversuche werden unter folgenden optimierten Bedingungen durchgeführt:

- 60 °C Kultivierungstemperatur
- 5 d Kultivierungszeit
- Einsatz der hocheffizienten, cellulolytischen *Clostridien*-Kulturen ATCC27504, F7, sowie die Mischkultur K.

Die weiterführende bakterielle Hydrolyse von bereits mit Pilzenzymen behandelten Proben (Uni Kaiserlautern), sowie weiteren, ebenfalls enzymatisch vorbehandelten Proben des Projektpartners Biopos (Potsdam) erreichte Abbauraten von bis zu 60 % bzw. 75 % in der TS des Restmaterials. Diese Ergebnisse liefern einen Hinweis auf die hohe, cellulolytische Aktivität der bakteriellen Enzyme der eingesetzten *Clostridien*-Kulturen, die über die der bisher eingesetzten Enzympräparationen weit hinausgeht. Zu berücksichtigen ist, dass nur eine Einfachanalyse aufgrund des geringen Probenmaterials durchgeführt werden konnte.

Nächster Schritt der Untersuchungen wird die Isolierung der *Clostridien*-Enzyme sein, sowie deren Einsatz mit der Buchenholzfraktion *in vitro*. Die gebildeten monomeren und oligomeren Zuckerprodukte sollen mittels Dünnschichtchromatographie (DC) analysiert werden. Die einzelnen, in den Ansätzen vorhandenen Enzymaktivitäten der isolierten Cellulosom-Proteine werden mit Modellsubstraten verglichen und durch DNSA-Aktivitätstests zur Bestimmung der freigesetzten Zucker analysiert.

AP3-2 Hemicellulose-Fraktion (AP 3.2)

AP3-2.1 Weiterverarbeitung der Hemicellulosefraktion und anwendungstechnische Untersuchungen – Enzymatischer Abbau der oligomeren Hemicellulosefraktion (AP 3.2.1 und AP 3.2.2, TU München)

Bisher sind Hemicellulasepräparationen speziell zur Hydrolyse von Hemicellulose aus Laubholz kommerziell nicht erhältlich. Ziel der Enzymauswahl ist es, Enzymgemische zu finden, die das Substrat möglichst vollständig in monomere Zucker umwandeln, für die Immobilisierung geeignet sind und eine möglichst hohe Zuckerkonzentration für die nachfolgende Fermentation ermöglichen (Endprodukthemmung). Das Bakterium *Clostridium stercorarium* DSM8532 wurde für diese Untersuchungen ausgewählt und auf die Eignung zur Hydrolyse der Hemicellulosefraktion aus Buchenholz (Organosolv-Aufschluss 34) geprüft.

Das Wachstum dieser Bakterienkultur in der unverdünnten Hemicellulosefraktion (pH 6,25) bei 60 °C wurde gehemmt. 1:2- bzw. 1:3-Verdünnungsstufen der Originalfraktion mit GS2-Medium

(pH 7) ermöglichte ein Wachstum des Endoglucanase-, Exoglucanase- und Xylanase-bildenden Bakterienstammes *C. stercorarium* bei 60 °C nach 4 Tagen (Abb. 3-44).

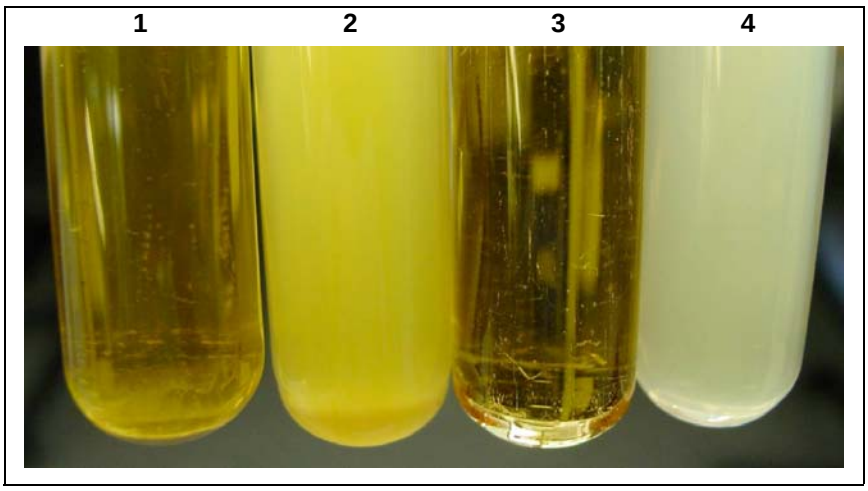


Abb. 3-44: Wachstum von *C. stercorarium* nach 4d bei 60 °C
1: Kontrolle, 2: Hemicellulosefraktion (pH 7, 1:2 verd.)
3: Kontrolle, 4: Hemicellulosefraktion (pH 7, 1:3 verd.) (Quelle: TUM)

Clostridium stercorarium, wie *C. thermocellum* ein thermophiles, strikt anaerobes, sporenbildendes, Gram-positives Bakterium, bildet eine Vielfalt an Hydrolasen, z.B. Endo-Xylanasen, Mannanasen, Glycosidasen (z.B. Xylosidasen, Arabinosidasen, Glucuronosidasen) und Xylan-Esterasen, für den Abbau verschiedener Polysaccharide aus pflanzlicher Biomasse und ist besonders für die Hydrolyse von Hemicellulose geeignet. Die Hauptkomponente der Hemicellulose ist Xylan, ein lineares, β-1,4-verknüpftes Polysaccharid. Der erste Schritt in der enzymatischen Xylan-Hydrolyse erfolgt durch Endoxylanasen, die eine Depolymerisierung des Xylangerüstes bewirken. β-Xylosidasen bauen dann die entstehenden Xylooligosaccharide weiter ab, während spezifische Glucosidasen (z.B. β-Glucuronidase, α-Arabinosidase) die Abspaltung der Seitengruppen durchführen. Die aus zellfreien Kulturüberständen isolierten und aufkonzentrierten, hemicellulolytischen Enzyme von *C. stercorarium* wurden für den Abbau der oligomeren Hemicellulosefraktion (34H) eingesetzt. Die Proteinbanden von *C. stercorarium* in der SDS-PAGE (nicht gezeigt) ergeben ein anderes Bandenmuster im Vergleich zu den isolierten Cellulosom-Proteinen von *C. thermocellum*.

Für den Abbau der Hemicellulosefraktion erfolgte das Austesten verschiedener Substrat- und Enzymkonzentrationen im Hinblick auf die hydrolytische Aktivität der isolierten xylanolytischen Exoenzyme von *C. stercorarium*. Die hemicellulolytischen Enzymaktivitäten von *C. stercorarium* auf dem Substrat Hemicellulose wurden mittels der DNSA-Methode bestimmt. Zu berücksichtigen ist, dass bereits reduzierende Zuckerenden durch die in der Hemicellulosefraktion vorliegenden oligomeren Zucker zu einer Braunfärbung der Kontrollansätze führen und die photometrische Messung erschwerten. Die entstehenden Abbauprodukte wurden mittels der DC analysiert.

Nach 1 h Hydrolysezeit wurde eine Enzymaktivität der xylanolytischen Enzyme von *C. stercorarium* auf der oligomeren Hemicellulosefraktion (1:8 verd.) von 126 mU/ml bei einem Enzymvolumen von 50 µl nachgewiesen (Tab. 3-12). Die fast 4-fache hydrolytische Aktivität wurde vergleichsweise auf dem Modellsubstrat Xylan bestimmt.

Tab. 3-12: Bestimmung der hydrolytischen Aktivität des Enzym-Komplexes von *C. stercorarium* auf Hemicellulose nach 1 Stunde Reaktionszeit. Cst: Wachstum auf 0,25% Cellobiose; 60 °C; Xylose-Eichkurve; Proteinkonzentration für Cst: 1,75 mg/ml (Quelle: TUM)

1 h	Enzym [µl]	OD [575 nm]	Xylose [µg/µl]	Enzymakt. [U/ml]	Spezif. Aktivität [U/mg]
***C. stercorarium* (Cst)**					
Hemicellulose (1:8 verd.)	50	0,285	75	0,139	0,079
	100	0,76	122	0,113	0,065
Hemicellulose (1:16 verd.)	50	0,279	72	0,133	0,0762
	100	0,52	95	0,088	0,05
Xylan (oat spelts, 1%)	50	1,62*	217	0,402	0,23
	100	1,799*	245	0,227	0,13

* 1:4 verdünnt

Tab. 3-13 fasst die Enzymaktivitäten nach 24 bzw. 48 Stunden Hydrolyse zusammen. Nach 24 Stunden wurde nur noch eine hemicellulolytische Aktivität von 9 mU/ml auf dem oligomeren Hemicellulosesubstrat (1:8 verd.) bestimmt, die sich nach 48 Stunden um die Hälfte verringerte. Somit zeigte der xylanolytische Enzym-Komplex von *C. stercorarium* die höchste Enzymaktivität nach 1 Stunde in dieser Testreihe, nach 24 Stunden hat sich die hydrolytische Aktivität durch Ausschöpfung des Substrats bereits um das 14-fache verringert.

Tab. 3-13: Bestimmung der hydrolytischen Aktivität des Enzym-Komplexes von *C. stercorarium* auf Hemicellulose nach 24 bzw. 48 Stunden Reaktionszeit. Cst: Wachstum auf 0,25% Cellobiose; 60 °C; Xylose-Eichkurve; Proteinkonzentration für Cst: 1,75 mg/ml (Quelle: TUM)

50 µl Enzym	OD [575 nm]	Xylose [µg/µl]	Enzymaktivität [U/ml]	Spezif. Aktivität [U/mg]
24 h				
***C. stercorarium* (Cst)**				
Hemicellulose (1:8 verd.)	0,729	120	0,0093	0,0053
Hemicellulose (1:16 verd.)	0,507	93	0,007	0,0041
48 h				
***C. stercorarium* (Cst)**				
Hemicellulose (1:8 verd.)	0,701	119	0,0046	0,0026
Hemicellulose (1:16 verd.)	0,573	105	0,0041	0,0023

Eine cellulolytische Enzymaktivität konnte auch für die aus dem Kulturüberstand von *C. stercorarium* isolierten Enzymkomplexe auf der Buchenholzcellulosefraktion von 4,4 mU/ml bestimmt

werden (Tab. 3-14), auf dem Substrat Hemicellulose wurde die 3-fache Enzymaktivität quantifiziert. Dieser Bakterienstamm zeigte kein Wachstum auf der Buchenholzfraktion bei 60 °C; dafür war die Cellulase-Aktivität nicht ausreichend.

Weiterhin wurde die hydrolytische Aktivität des Cellulosoms der Kultur K auf der Hemicellulosefraktion nach 24 Stunden getestet und durchschnittlich 3 mU/ml nachgewiesen. Die Kultur K konnte auf dem Substrat Hemicellulose (1:2 verd., pH 7) bei 60 °C wachsen im Gegensatz zu *C. thermocellum* ATCC27405. Der mesophile *Clostridien*-Stamm *C. saccharobutylicum* war ebenfalls in der Lage, auf der Hemicellulosefraktion (1:2 verd., pH 7) bei 37 °C zu wachsen. *C. thermocellum* ATCC27405, *C. thermocellum* F7 sowie die Kultur K stellten für die Hydrolyse der Buchenholzcellulosefraktion die effizientesten Celluloseverwerter in den durchgeführten Laborversuchen dar, während *C. stercorarium* besonders für die Hydrolyse der Hemicellulose geeignet war.

Tab. 3-14: Bestimmung der hydrolytischen Aktivität des Cellulosoms der Mischkultur K auf Hemicellulose und des hemicellulolytischen Enzymkomplexes von *C. stercorarium* auf Buchenholzcellulose nach 24 Stunden Reaktionszeit. K, Cst: Wachstum auf 0,25% Cellobiose; 60 °C; Proteinkonzentration für Cst: 1,75 mg/ml; K: 0,196 mg/ml (Quelle: TUM)

100 µl Enzym	OD [575 nm]	Zucker* [µg/µl]	Enzymaktivität [U/ml]	Spezif. Aktivität [U/mg]
24 h				
***C. stercorarium* (Cst)**				
Buche (1%)	0,73	115	0,0044	0,0025
Mischkultur K_{Cel}				
Hemicellulose (1:4 verd.)	0,24	65	0,0025	0,0128
Hemicellulose (1:8 verd.)	0,51	90	0,0035	0,0177

* Zucker wurden als reduzierende Zucker bestimmt (Glucose-Äquivalente)

Die während der enzymatischen Hydrolyse entstandenen Abbauprodukte wurden mittels der DC analysiert. Abb. 3-45 zeigt die oligomere Hemicellulosefraktion (1:2 bzw. 1:4 verd.) nach durchgeführter enzymatischer Hydrolyse für 1 h bzw. 24 h Reaktionszeit. Die Anteile der bereits in der Kontrolle enthaltenen oligomeren Zucker nahmen durch die hemicellulolytische Enzymaktivität des Enzym-Komplexes von *C. stercorarium* während der Hydrolyse zu. Xylotetraose, Xylobiose und Xylose liegen als Abbauprodukte nach 1-stündiger bzw. 24-stündiger Hydrolyse vor. Xylotriose wurde zu Xylobiose und Xylose abgebaut. Arabinose, Glucuronsäure und Mannose konnten mit diesen Chromatogrammen nicht nachgewiesen werden.

Eine ähnliche Zusammensetzung der Abbauprodukte ergab sich nach 45 Stunden enzymatischer Hydrolyse in der dünnschichtchromatographischen Auftrennung, wobei der Anteil an Xylotetraose, Xylobiose und Xylose mit steigender Enzymkonzentation zunahm (nicht gezeigt). Die Ergebnisse der DC weisen darauf hin, dass durch die xylanolytische Enzymaktivität vermehrt Oligomere entstehen und dass keine vollständige Hydrolyse der Hemicellulose zum Monomer, dem C5-Zucker Xylose, abläuft. Dazu müsste evtl. der Anteil der β-Xylosidasen am Enzymgemisch erhöht werden.

Die Analyse der einzelnen, in der Hemicellulosefraktion 34H enthaltenen Zucker wurde mittels der HPLC durchgeführt (Tab. 3-15 Arbeitsgruppe Dr. Puls, vTI). Cellobiose wurde in der Originalfraktion nicht detektiert.

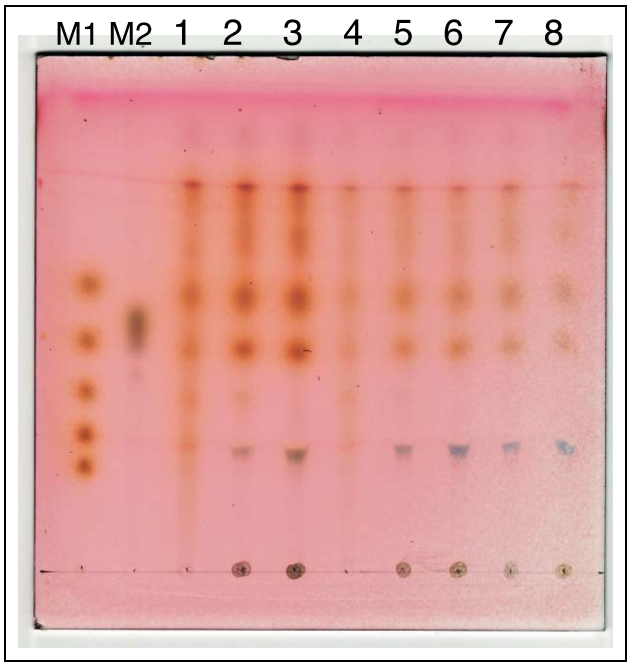


Abb. 3-45: Dünnschichtchromatogramm der Abbauprodukte der Hemicellulosefraktion nach 1h bzw. 24h enzymatischer Hydrolyse. M1: Xylose bis Xylopentose (X1-X5: 0,1µg/µl); M2: Standards (D-Arabinose, D-Glucuronsäure, D-Mannose); Spur 1: Kontrolle Hemicellulose (1:2- verd. nach 24h); Spur 2: Exoenzym (50µl) von *C. stercorarium* (1:2-verd. Hemicellulose) nach 24h; Spur 3: Exoenzym (100µl) von *C. stercorarium* (1:2-verd. Hemicellulose) nach 24h; Spur 4: Kontrolle Hemicellulose (1:4- verd. nach 24h); Spur 5, 6: Exoenzyme 50µl bzw. 100µl von *C. stercorarium* (1:4-verd. Hemicellulose) nach 1h; Spur 7, 8: Exoenzyme 50µl bzw. 100µl von *C. stercorarium* (1:4 verd. Hemicellulose) nach 24h; Spur (0,3 µl Marker bzw. 1µl Probe aufgetragen)**.** (Quelle: TUM)

Tab. 3-15: Zuckerbestimmung der Hemicellulosefraktion 34H (Quelle: vTI)

Zuckerbestimmung 34H	**[g/l abs.]**
(Hydrolyse-Rückstand 0,10 %)	
Xylose	6,47
Glucose	0,23
Mannose	0,15
Galactose	0,32
Arabinose	0,06
Rhamnose	0,11
Fructose	–
Cellobiose	–
4-O-Me	–
Summe Zucker	**7,33**

AP3-2.1.1 Schlussfolgerung

Wachstum einer Palette von thermophilen Clostridien-Stämmen auf der Hemicellulose-Fraktion ist möglich. Diese Fraktion besteht aus einer Mischung von Oligosacchariden, die ein gutes Substrat für Fermentationen von Mikroorganismen sind, die Glykosidasen für deren Hydrolyse ausscheiden und die überwiegend vorliegenden Pentosen (besonders Xylose) gut verwerten können. Am LS Mikrobiologie der TUM sind Versuche zur Verstoffwechselung der Xylose im Rahmen anderer Projekte geplant.

AP3-2.2 Fermentation der Hemicellulosefraktionen (TU Kaiserslautern)

Die Fermentation der Hemicellulose-Fraktion erfolgte ohne vorangehende enzymatische Hydrolyse und unter analoger Ergänzung mit den für die Kultivierung notwendigen Medienbestandteilen. Dabei musste besonders auf die Einstellung des pH-Wertes geachtet werden, da die Hemicellulose-Fraktion stark sauer ist und für die Fermentation ein pH-Wert von 5 benötigt wird.

Frühe Versuche wurden mit der Hemicellulosefraktion BFH 19 als Substrat durchgeführt. In Abb. 3-46 ist zu sehen, dass nach 43 h ca. 9 g/l Ethanol aus einer Gesamtzuckerkonzentration in der Hemicellulosefraktion von 18,7 g/l gebildet wird. Nach 116 h ist keine Änderung dieser Konzentration zu sehen. Die erreichte Ethanolausbeute beträgt 0,49 g/g verbrauchter Zucker nach 43 h Fermentationszeit. Dieser Wert liegt nahe bei der maximalen theoretischen Ethanolausbeute von 0,51 g/g.

Spätere Kultivierungen mit der Hemicellulosefraktion BFH 76 zeigten abweichende Ergebnisse. Während der Fermentation zeigte sich, dass die Xylose nur sehr langsam abgebaut wird und dabei keine Bildung von Ethanol zu beobachten ist. Gegenteilig ist eine Abnahme der Ethanolkonzentration zu verzeichnen (Abb. 3-47). Im aeroben Fall ist dies zu erwarten, da Ethanol bei diesen Bedingungen *S.cerevisiae* als Substrat dient. Es ist anzunehmen, dass hier eine Inhibierung der Mikroorganismen durch eine Variation des Holzaufschlussverfahrens auftritt.

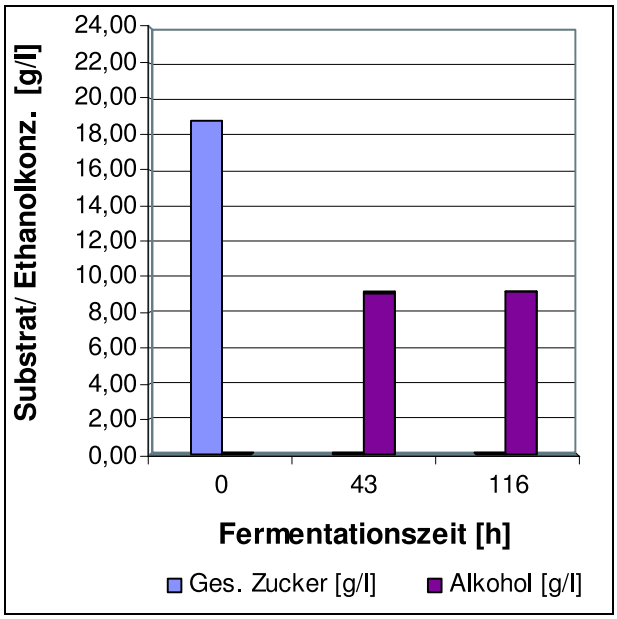


Abb. 3-46: Ethanolproduktion aus den gesamten Zuckern in der Hemicellulosefraktion BFH 19. Kultivierung bei 30 °C; 120 rpm; pH 6, *P. tannophilus* und *S. cerevisae* (1:1), Inokulum 10% (Quelle: TU KL)

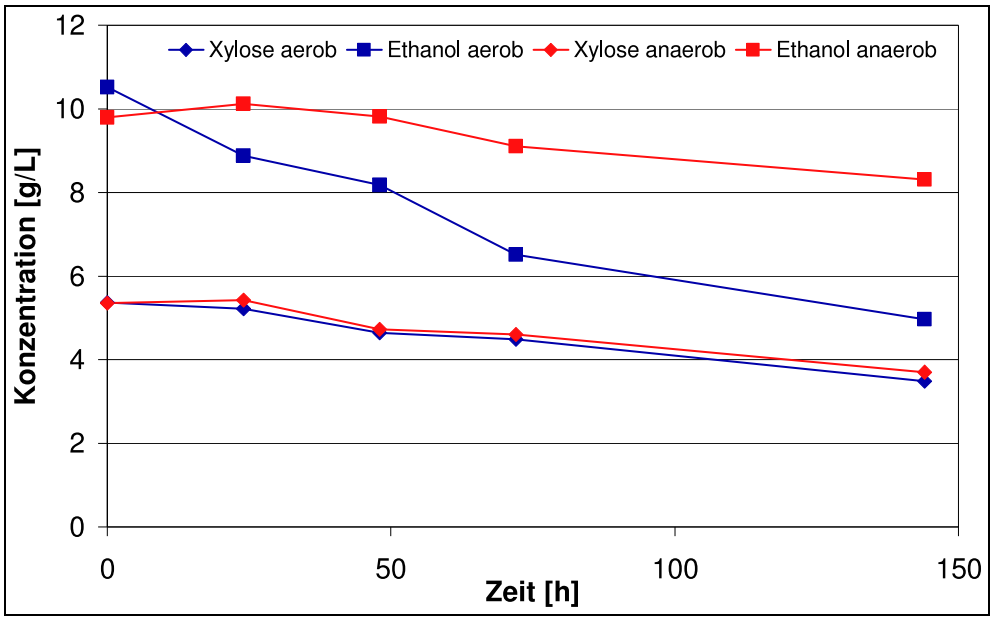


Abb. 3-47: Darstellung der Konzentrationsverläufe der Co-Fermentation auf BFH-Hemicellulose Fraktion 76; pH 5,0 (50 ml); 100-ml-Reaktionsgefäße; 30 °C; Schüttelinkubator (150 rpm) (Quelle: TU KL)

AP3-2.3 Enzymtische Verzuckerung und Fermentation (BTS)

Beim Aufschluss von Buchenholz fällt nach Abtrennung von Cellulose-Zellstoff und der Fällung von Lignin mittels Ethanol eine wässerige Hemicellulosefraktion in großen Mengen an. Diese soll einer fermentativen Ethanol-Erzeugung zugänglich gemacht werden. Letztendlich muss Ethanol aus entsprechenden Fermentationskulturen destillativ gewonnen werden, dies kann nur dann wirtschaftlich erfolgen wenn der Gehalt an Ethanol mindestens 10 – 12 % (v/v) beträgt. Aus Sicht von BTS kann dies nur durch Fermentation mit dem Organismus *Saccharomyces cerevisiae* erreicht werden.

Hemicellulose aus Buchenholz besteht fast ausschließlich aus wenig verzweigten Xylanen und enthält, nach vollständiger chemischer Hydrolyse (vTI, Hamburg), zu ca. 88 % (bezogen auf den Feststoffgehalt) das Monosaccharid Xylose. Von *Saccharomyces cerevisiae* kann Xylose jedoch nicht als Kohlenstoffquelle verwertet werden.

Es wurde die Idee verfolgt, durch einen weiteren enzymatischen Schritt den Zucker Xylose in den Zucker Xylulose umzuwandeln, der anschließend durch *Saccharomyces cerevisiae* vergärt werden kann. Hierzu bietet sich das Enzym Xylose-Isomerase an, da es keine Co-Faktoren benötigt (s. Abb. 3-48).

Basierend auf den vorangegangen Arbeiten wurde eine HPLC-Methode zur Analyse der Hemicellulosen-Fraktion (vTI, Hamburg) aufgebaut (s. Tab. 3-24), das Enzym Xylose-Isomerase aus *Thermus thermophilus* kloniert und rekombinant in *Escherichia coli* ausgeprägt, durch Hochzelldichtefermentation in größeren Mengen produziert und aufgereinigt. Anschließend wurde ein Aktivitätstest auf Xylose-Isomerase-Aktivität aufgebaut und Umsetzungen der Hemicellulosen-Fraktion durchgeführt und die Ausbeuten an verfügbar gemachter Xylulose bestimmt.

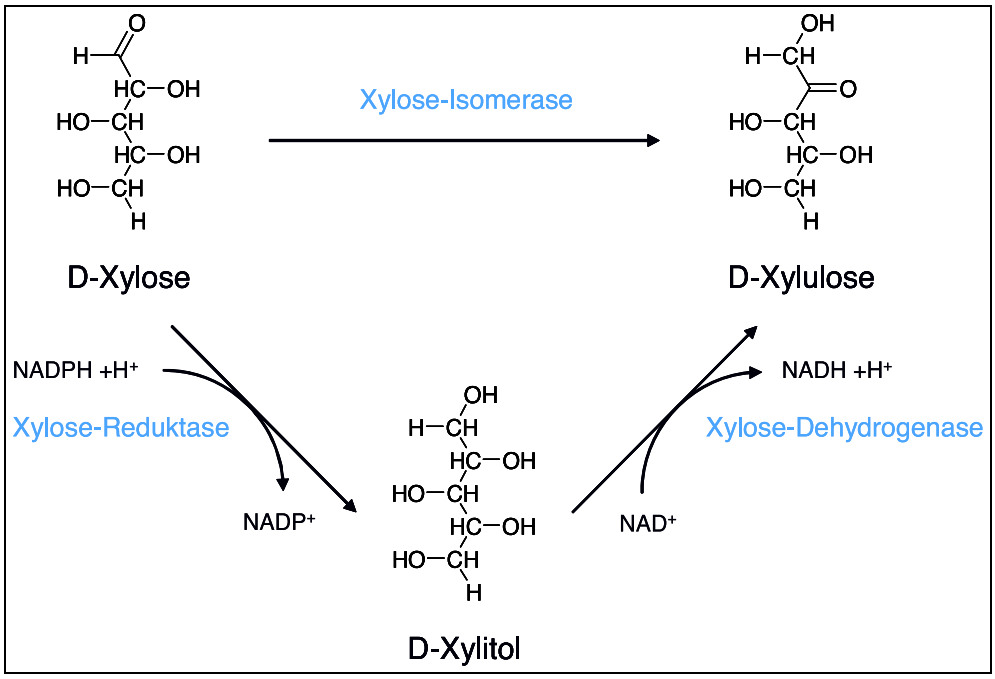


Abb. 3-48: Von Xylose zu Xylulose durch das Enzym Xylose-Isomerase (Quelle: BTS)

AP3-2.3.1 Aufbau einer HPLC Analytik zur Analyse der Hemicellulosen-Fraktion

Folgende HPLC-Konditionen wurden zur Analyse der Hemicellulosen-Fraktion entwickelt (Tab. 3-16):

Tab. 3-16: HPLC Analytik zur Analyse der Hemicellulosen-Fraktion (Quelle: BTS)

Säule:	Säule: Metacarb H^{plus}
Mobile Phase:	0,5 M Schwefelsäure (H_2SO_4)
Fließgeschwindigkeit:	0,3 ml/min
Laufzeit:	60 min

Zwischenzeitlich wurde im vTI, Hamburg die Methode des Holzaufschlusses optimiert. Die Analysen zeigten, dass durch die veränderten Bedingungen deutlich mehr Xylose aus dem Xylan freigesetzt werden konnte als zuvor. Der Anteil an Polysacchariden ging entsprechend zurück (Abb. 3-49).

Diese Ergebnisse konnten durch entsprechende Standards von Xylose, Xylobiose, Xylotriose und Xylotetraose verifiziert werden (Abb. 3-50).

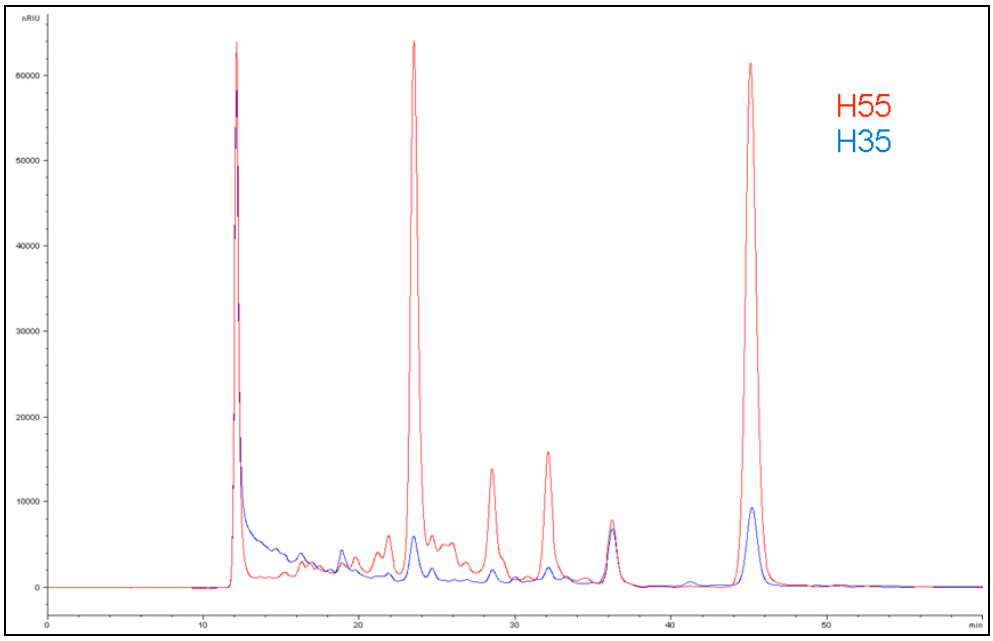


Abb. 3-49: Vergleich „alter“ Hemicellulosenfraktion H35 und „neuer Hemicellulosenfraktion H55 (Quelle: BTS)

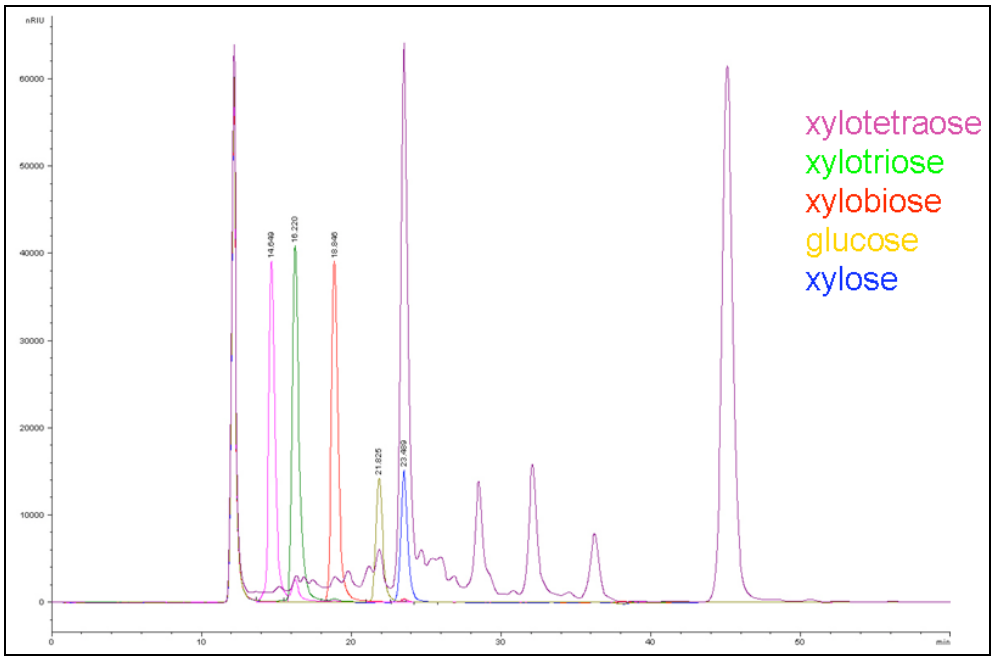


Abb. 3-50: Hemicellulosenfraktion H55 und Standards von Xylose und entsprechenden Polysacchariden (Quelle: BTS)

In geringen Mengen konnte auch Glucose in der Hemicellulosefraktion nachgewiesen werden.

Xylose-Isomerase kann sowohl Glucose (Produkt: Fruktose, Anwendung in der Lebensmittelindustrie) als auch Xylose (Produkt: Xylulose) umsetzen. Auch aus diesen Substanzen wurden entsprechende Standards analysiert um potentielle Produkte der Umsetzung identifizieren und qualifizieren zu können (Abb. 3-51).

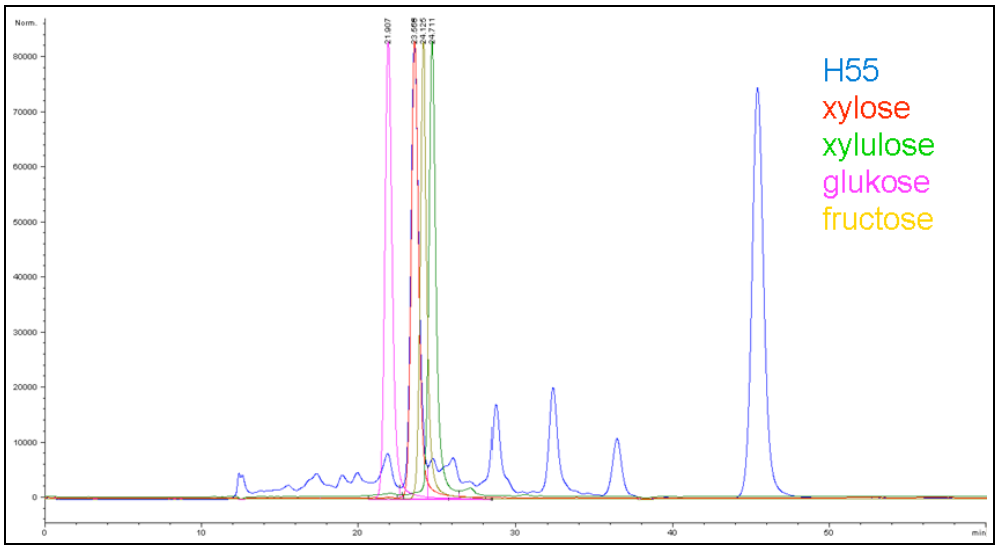


Abb. 3-51: Hemicellulosefraktion H55, Standard von Xylose, Xylulose, Glucose und Fruktose (Quelle: BTS)

AP3-2.3.2 Klonierung der Xylose-Isomerase in *E. coli*

Die DNA-Sequenz des Enzyms Xylose-Isomerase aus *Thermus thermophilus* ist in Datenbanken hinterlegt. Es wurden entsprechende Primer bestellt, um das entsprechende Gen in das bei der Bayer Technology Services GmbH verwendete Expressionsystem auf *E. coli*-Basis klonieren zu können.Der Stamm *Thermus thermophilus* wurde von der DMSZ bezogen, die PCR-Amplifikation des Gens erfolgte direkt aus den lyophilisierten Zellen.

Insgesamt wurden vier Konstrukte kloniert, mit/ohne StrepTag, zur Identifikation bei geringer Expression, mit/ohne Leader-Sequenz zur Expression des Enzyms im Periplasma. Konstrukte mit StrepTag konnten gar nicht exprimiert werden, bei den Konstrukten ohne StrepTag zeigte sich eine wesentlich höhere Proteinexpression unter Verwendung der Leader-Sequenz, die die Proteinexpression ins Periplasma leitet (Abb. 3-52). Der Klon, der in der Abbildung grün umrandet ist, wurde für die Hochzelldichte-Fermentation ausgewählt.

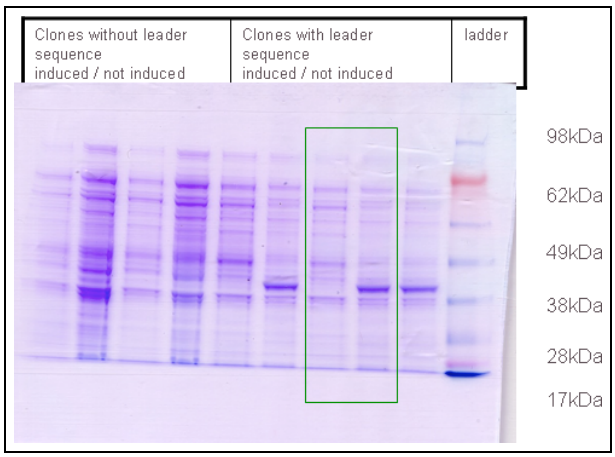


Abb. 3-52: Proteinexpression der Konstrukte (Quelle: BTS)

Die Hochzelldichte-Fermentation wurde nach dem BTS-eigenen Verfahren durchgeführt (Daten werden nicht veröffentlicht). Hierbei zeigte sich, dass die Xylose-Isomerase nicht als lösliches,

aktives Protein anfiel, sondern in Form sog. inclusion-bodies. Im Prinzip vereinfachte dies die Reinigung des Proteins, da es nach Aufschluss der Zellen leicht durch Zentrifugation in relativ reiner Form gewonnen werden konnte. Für die anwendungstechnischen Untersuchungen in diesem Projekt musste jedoch eine Methode entwickelt werden, diese inclusion-bodies in aktives Protein zurückzufalten.

AP3-2.3.3 Rückfaltung der Inclusion-bodies in aktives Protein

Um die Rückfaltung des Enzyms unter verschiedenen Bedingungen beurteilen zu können, muss die Aktivität des Enzyms durch einen möglichst einfachen Test nachweisbar sein. Hier bot sich die sog. Seliwanow-Reaktion an, hierbei reagieren Ketosen (Xylulose, Fruktose) mit Resorcin zu einem Farbstoff, Aldosen (Xylose, Glucose) nicht (Abb. 3-53 und Abb. 3-54).

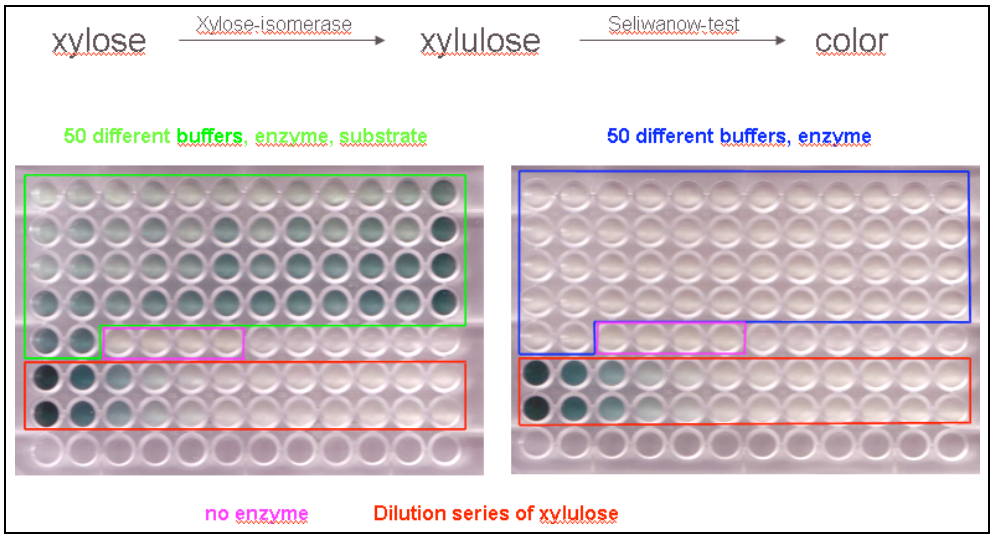


Abb. 3-53: Identifikation der Rückfaltungsbedingungen (Quelle: BTS)

Abb. 3-54: Seliwanow-Reaktion mit Ketosen und mit durch Xylose-Isomerase umgestzten Aldosen (Quelle: BTS)

Mit Hilfe dieser Reaktion konnten geeignete Bedingungen zur Rückfaltung der inclusion-bodies gefunden werden und eine größere Menge aktives Protein erzeugt werden.

Mit diesem Protein wurden entsprechende Umsetzungen mit der Hemicellulosefraktion H55 durchgeführt, eine mögliche Kombination mit dem Biomass-Conversion-Kit der Fa. Novozymes wurde geprüft.

AP3-2.3.4 Anwendungstechnische Untersuchungen mit der Hemicellulosefraktion H55

Zunächst wurde geprüft, welche Menge an Monosacchariden durch den Biomass-Conversion-Kit (Fa. Novozymes) aus der Hemicellulosefraktion H55 noch freigesetzt werden kann. Hierbei zeigte sich, dass durch Veränderung der Aufschlussbedingungen ein Einsatz von Enzymen zur Verzuckerung der Hemicellulosen nicht wirtschaftlich erscheint (Abb. 3-55 und Abb. 3-56).

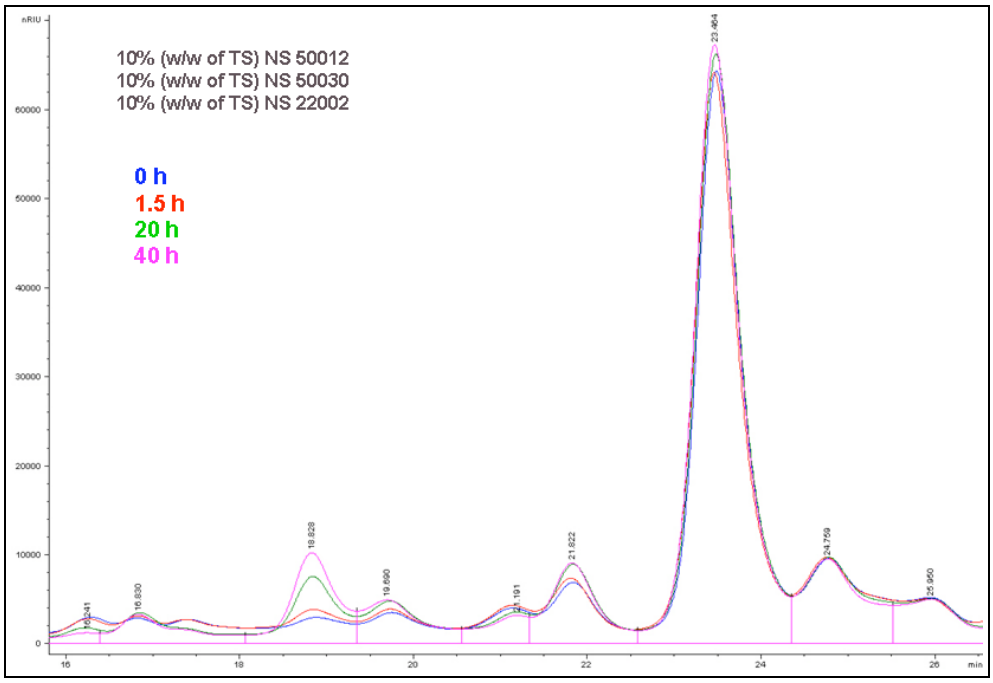


Abb. 3-55: Freisetzung von Monosacchariden und Di-Sacchardien durch den Biomass-Conversion (Quelle: BTS)

Die Ausbeute an Xylose konnte um 4,9 %, an Glucose um 19,9 % gesteigert werden. Die Höhe an verwertbaren Zuckern konnte insgesamt lediglich um 0,77 g/l gesteigert werden (Abb. 3-56).

Durch Umsetzungen der Hemicellulosefraktion H55 mit isolierter Xylose-Isomerase konnten nur geringen Mengen an Xylulose erzeugt werden (Abb. 3-57). Auch in Kombination von Xylose-Isomerase und dem Biomass Conversion Kit (Fa. Novozymes) konnten keine Ausbeutesteigerung erzielt werden.

Der Grund der geringen Ausbeute liegt wahrscheinlich an der für dieses Enzym (stammt aus thermophilem Organismus) zu geringen Temperatur. Je höher die Temperatur, desto weiter kann man das Gleichgewicht zur Seite der Ketose, also der Xylulose verschieben. Denkbar wäre auch ein simultaner Einsatz während der Fermentation, so dass die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* Xylulose kontinuierlich aus dem Gleichgewicht entzieht, dies bedingt jedoch eine weitere Verringerung der Temperatur.

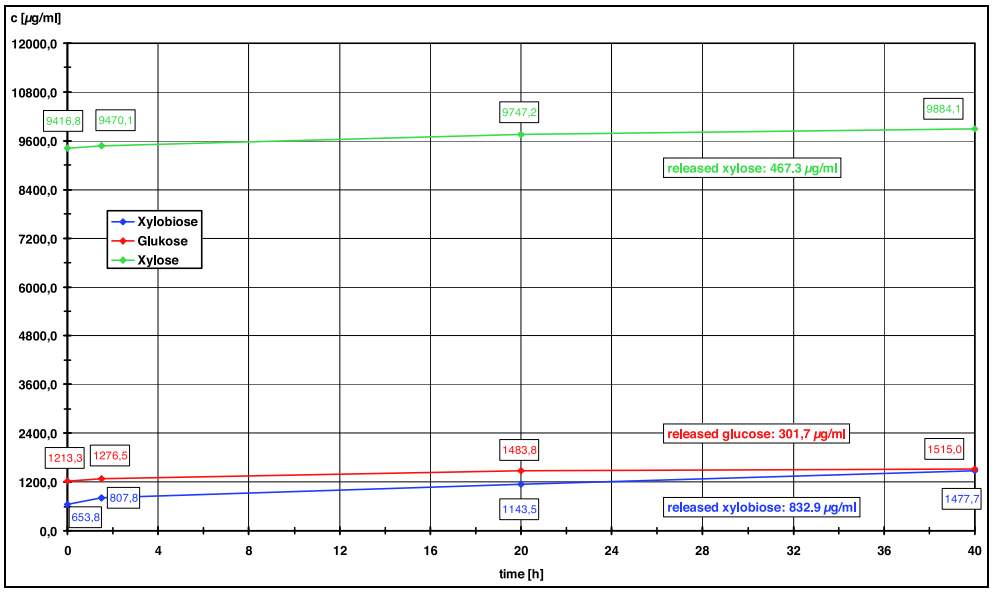


Abb. 3-56: Quantifizierung der freigesetzten Monosaccharide (Quelle: BTS)

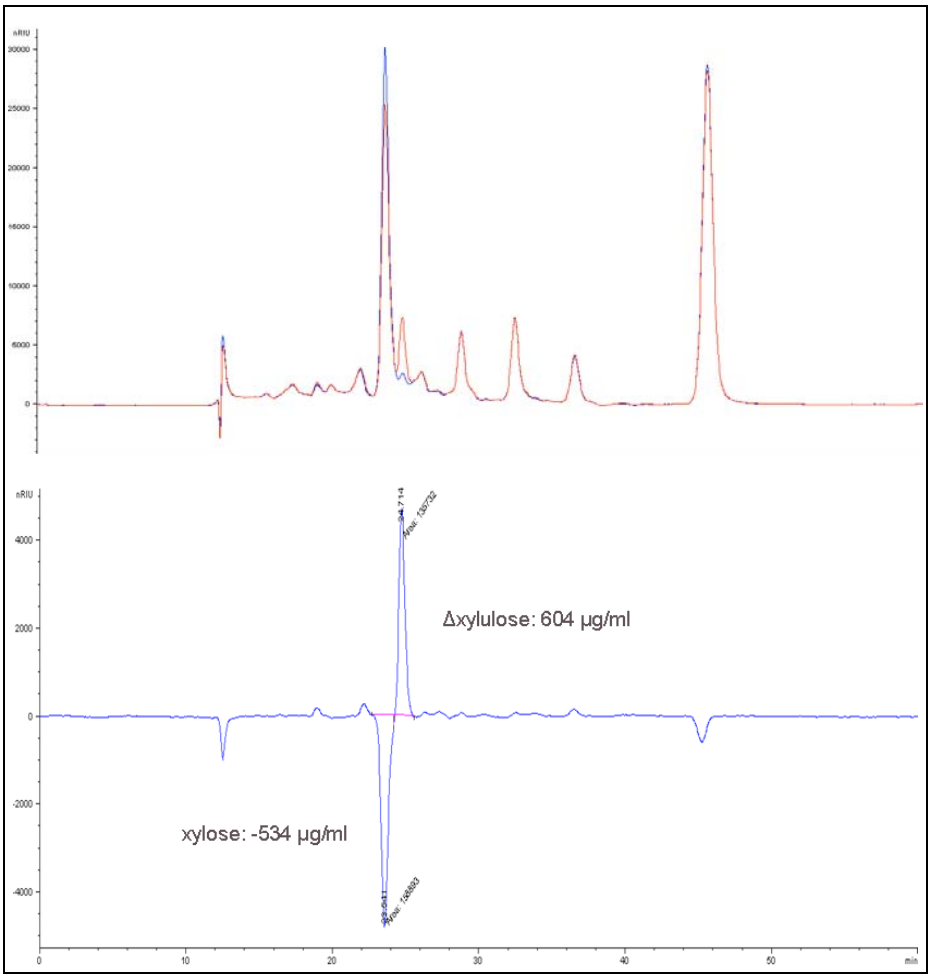


Abb. 3-57: Freisetzung von Xylulose aus der Hemicellulosefraktion H55 bei 50°C (ungefähre Temperatur, bei der die Hemicellulosefraktion im Prozess anfallen würde) (Quelle: BTS)

AP3-2.3.5 Zusammenfassung

Eine HPLC-Analytik zur Analyse der Hemicellulosefraktion konnte erfolgreich etabliert werden. Dadurch war es möglich zu zeigen, dass die veränderten Aufschlussbedingungen des vTI, Hamburg, zu einer deutlichen Erhöhung des Monosaccharidgehalts, insbesonders Xylose, führen. Dies vereinfacht wesentlich die stoffliche Verwertung dieser Fraktion.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Enzymen (Novozymes Biomass Kit) zur Verzuckerung der Hemicellulosen keine wesentliche Steigerung der Ausbeute an Monosacchariden erzielt werden kann, so dass die Kosten für dieses Enzymprodukt im zukünftigen Prozess eingespart werden können.

Das Gen für das Enzym Xylose-Isomerase konnte erfolgreich aus Zellen von *Thermus thermophilus* amplifiziert und in *Escherichia coli* transfiziert werden. Xylose-Isomerase konnte rekombinant ausgeprägt und mittels Hochzelldichtefermentation in größerer Menge hergestellt werden. Die Aufreinigung für anwendungstechnische Untersuchungen an der Hemicellulosefraktion gelang.

Die Umsetzungen von Xylose-Isomerase mit der Hemicellulosefraktion zeigte zwar die prinzipielle Machbarkeit der Umsetzung von Xylose zu Xylulose, die erreichten Ausbeuten an Xylulose sind jedoch gering.

AP3-3 Lignin-Fraktion (AP 3.3)

AP3-3.1 Verarbeitung zu thermoplastischen Systemen (AP 3.3.1, ICT)

Das Fraunhofer ICT ist im AP 3 seit der Übernahme der Aufgaben der Tecnaro GmbH in diesem Projekt an der thermoplastischen Verarbeitung von Lignin (AP 3.3.1) beteiligt. Der Hauptteil der Aktivitäten im Bereich Thermoplaste, welcher von Tecnaro übernommen wurde, wird im Produktbereich Polymer Engineering durchgeführt.

Bei der Verarbeitung des Lignins in duroplastischen Systemen wurden in enger Zusammenarbeit mit Dynea Erkner im Berichtszeitraum Möglichkeiten eruiert, die Ligninfraktion zur Synthese von Resolen einzusetzen. Dafür wurden Dynea Erkner trockene Lignine und eine Ligninsuspension zur Verfügung gestellt, welche dort einem Eignungstest unterzogen wurden (siehe Kapitel AP3-3.2).

Im Berichtszeitraum wurde mit den Arbeiten zur Testung der Ligninfraktion in thermoplastischen Systemen begonnen. Abweichend von der ursprünglichen Aufgabenstellung der Tecnaro GmbH einen Compound mit Lignin und Naturfasern herzustellen, steht nun aufgrund von patentrechtlichen Fragestellungen zunächst die Nutzung von Lignin als Additiv in thermoplastischen Systemen im Vordergrund. Dazu soll die aus AP 2 stammende Ligninfraktion in verschiedenen Thermoplasten getestet werden, ob sich durch deren Zugabe besondere Werkstoffeigenschaften, wie z.B. Flammschutz oder herbizide/fungiziede Eigenschaften, erreichen lassen.

Hierzu wurde eine Compoundierung von Polymilchsäure (PLA) mit einer Ligninfraktion aus AP 2 mit Maleinsäure als Koppler durchgeführt. Zum Vergleich wurde das PLA mit ansonsten gleichen Bedingungen als reines Polymer verarbeitet. Die Zusammensetzung ist in Tab. 3-17 aufgelistet.

Tab. 3-17: Zusammensetzung der Prüfkörper (Quelle: ICT)

No.	wt.-%	PLA	wt.-%	Flame retardment	wt.-%	Coupling agent
hz060508-01	100	Nature Works	x	x	x	x
hz060508-02	77,5	Nature Works	20	Lignin	2,5	Fusabond A ME-556D

Zur Compoundierung wurde ein gleichläufiger Doppelschneckenextruder Leistritz ZSE 27HP – 52D verwendet (Durchmesser 27 mm, L/D = 52). Alle Materialien wurden über den Haupttrichter dosiert. Die Schneckengeometrie zeigt Abb. 3-58.

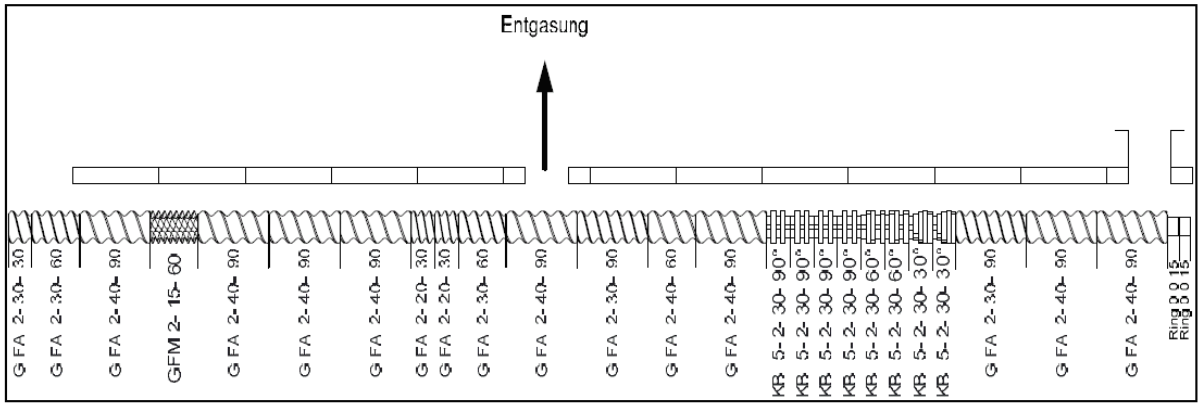
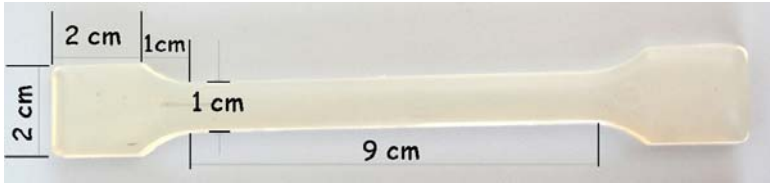


Abb. 3-58: Verwendete Schneckengeometrie zur Compoundierung (Quelle: ICT)

Das reine PLA, sowie das PLA-Compound wurden anschließend bei 60 °C für 5 h in einem Umluft-trockner getrocknet. Für die Herstellung der Prüfkörper (CAMPUS-Zugstab) wurde eine Engel-Spritzgießmaschine eingesetzt. Die Prozesstemperatur betrug bei der Verarbeitung 210 °C. An den fertigen Zugprüfstäben wurde ein Entflammbarkeitstest nach UL 94 V (siehe Tab. 3-18a-c) und die Schlagfestigkeit nach Charpy (siehe Tab. 3-19) durchgeführt.

Tab. 3-18a: Protokoll des Entflammbarkeitstests nach UL 94 V: Probenbeschreibung

Probenbezeichnung	Probe 1: hz 060508-01 (transparent)	Probe 2:hz 060508-02 (braun)
Aussehen		
Maße		
Rohdichte bzw. Flächengewicht	Probe 1: 10,06 g	Probe 2 : 9,78 g
Dicke der Proben	0,4 cm	
Versuchsdurchführung	In Anlehnung an UL 94 V	
Anzahl der Versuche	5	

Tab. 3-18b: Protokoll des Entflammbarkeitstests nach UL 94 V: Versuchsbeschreibung Probe 1

Versuchsbeschreibung	**Probe 1 (hz 060508-01)**				
	Versuch 1	**Versuch 2**	**Versuch 3**	**Versuch 4**	**Versuch 5**
1. Beflammungsdauer	10 s	10 s	10 s	10 s	10 s
Dauer von Nachbrennen + Nachglühen der Probe nach der 1. Beflammung	45 s	168 s	170 s	155 s	148 s
2. Beflammungsdauer	10 s	–	–	–	–
Dauer von Nachbrennen + Nachglühen der Probe nach der 2. Beflammung	100 s	–	–	–	–
Brennendes Abtropfen (Entflammen der Watte)	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Völliges Abbrennen der Probe	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Besondere Beobachtungen	Die Probe brannte in den meisten Fällen bereits nach der ersten Beflammung vollständig ab, weshalb eine zweite Beflammung nicht durchgeführt werden konnte				

Tab. 3-18c: Protokoll des Entflammbarkeitstests nach UL 94 V: Versuchsbeschreibung Probe 2

Versuchsbeschreibung	Probe 2 (hz 060508-02)				
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5
1. Beflammungsdauer	10 s	10 s	10 s	10 s	10 s
Dauer von Nachbrennen + Nachglühen der Probe nach der 1. Beflammung	164 s	172 s	156 s	159 s	171 s
2. Beflammungsdauer	–	–	–	–	–
Dauer von Nachbrennen + Nachglühen der Probe nach der 2. Beflammung	–	–	–	–	–
Brennendes Abtropfen (Entflammen der Watte)	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Völliges Abbrennen der Probe	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Besondere Beobachtungen	Die Probe brannte in allen Fällen bereits nach der ersten Beflammung vollständig ab, weshalb eine zweite Beflammung nicht durchgeführt werden konnte				

Tab. 3-19: Ergebnisse der Schlagprüfung nach Charpy

Nr.	Schlagzähigkeit [kJ/m^2]			
	gekerbt		ungekerbt	
	x	s	x	s
hz060508-01	3,1	0,3	19,1	2,4
hz060508-02	2,4	0,1	14,3	1,3

Beide Proben erfüllten den Entflammbarkeitstest leider nicht, so dass noch keine Aussage über den Effekt der Ligninzugabe getroffen werden konnte. Es werden momentan neue Prüfkörper mit einem anderen PLA als Matrixmaterial durchgeführt, welches den Entflammbarkeitstest bestehen sollte. Mit diesem neuen Material werden entsprechend neue Tests durchgeführt.

In der zweiten Projekthälfte wurden in zwei weiteren Versuchskampagnen weitere Polymercompounds mit Lignin und weiteren Additiven hergestellt, durch Spritzgießen in Normprüfstäbe verarbeitet und mittels verschiedener Methoden analysiert. Die Zusammensetzung der verschiedenen Materialien der zweiten Versuchskampagne sind in Tab. 3-20 und die verwendete Schneckengeometrie bei der Compoundierung in Abb. 3-59 dargestellt.

An den Proben wurde ein Schlagbiegeversuch nach Charpy, die Wärmeformbeständigkeit und die Entflammbarkeit nach UL 94 getestet. Die Ergebnisse zeigen Tab. 3-21 und Tab. 3-22.

Tab. 3-20: Materialzusammensetzung 2. Versuchsreihe (Quelle: ICT)

Nummer	wt.-%	Polymer	wt.-%	Lignin
hz070808-01	100	PP	–	–
hz070808-02	90	PP	10	Lignin
hz070808-03	80	PP	20	Lignin
hz070808-04	100	PLA	–	–
hz070808-05	90	PLA	10	Lignin
hz070808-06	80	PLA	20	Lignin
hz070808-07	100	HD-PE	–	–
hz070808-08	90	HD-PE	10	Lignin

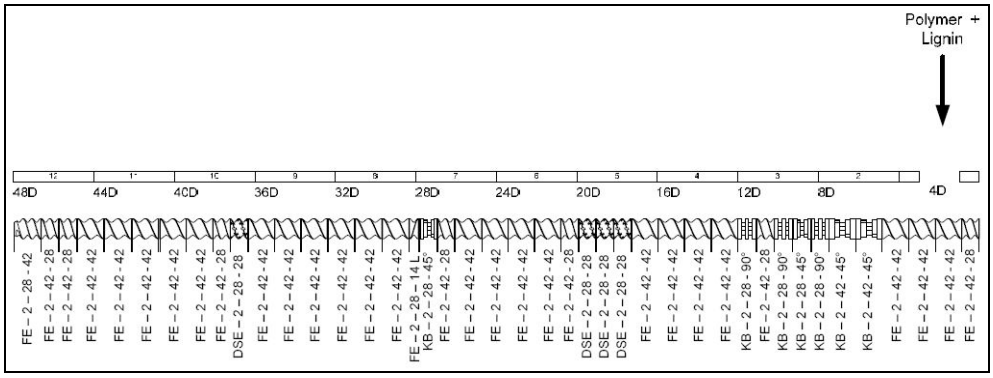


Abb. 3-59: Verwendete Schneckengeometrie 2. Versuchsreihe (Quelle: ICT)

Tab. 3-21: Schlagbiegeversuch nach Charpy – 2. Versuchsreihe (Quelle: ICT)

Nummer	Schlagbiegeversuch Schlagzähigkeit				Zugversuch					
	Gekerbt [kJ/m²]		Ungekerbt [kJ/m²]		σ-Bruch [MPa]		ε-Bruch [%]		E-Modul [MPa]	
	x	s	x	s	x	s	x	s	x	s
hz-070808-01	5,4	1,0	**NB**	**NB**	18,3	0,1	30,0	0,6	1104	78
hz-070808-02	3,7	0,3	34,2	4,1	16,8	0,3	16,8	7,1	1176	96
hz-070808-03	3,0	0,1	21,0	3,3	14,3	0,3	7,5	1,6	1319	90
hz-070808-04	3,3	0,5	18,4	1,7	63,7	2,4	2,9	0,6	3406	231
hz-070808-05	2,4	0,2	13,0	1,2	63,4	1,0	2,0	0,1	3825	308
hz-070808-06	2,0	0,2	10,1	1,4	50,2	3,7	1,5	0,1	3202	455
hz-070808-07	50,8	12,5	**NB**	**NB**	23,7	0,6	13,7	1,9	822	44
hz-070808-08	31,3	1,0	**NB**	**NB**	18,3	2,8	23,2	8,8	899	32

x = Mittelwert; s = Standardabweichung; NB = Nicht-Bruch

Tab. 3-22: Wärmeformbeständigkeit – 2. Versuchsreihe (Quelle: ICT)

Nummer	Wärmeformbeständigkeit HDT A [°C]	
	x	s
hz070808-01	49,6	1,0
hz070808-02	49,4	0,4
hz070808-03	53,7	1,9
hz070808-04	49,8	0,5
hz070808-05	48,9	0,5
hz070808-06	48,5	0,2
hz070808-07	47,0	0,6
hz070808-08	46,7	1,5

x = Mittelwert; s = Standardabweichung

Alle Proben hatten keine Flammschutzwirkung nach UL 94.

Mit steigendem Ligninanteil in den Matrixpolymeren wird der Compound immer spröder, die Bruchdehnung und die Zugspannung bei Höchstkraft nehmen ab. Die Wärmeformbeständigkeit (HDT) ändert sich nur geringfügig.

Die Zusammensetzung der Materialien der dritten Versuchskampagne ist in Tab. 3-23 aufgelistet.

Tab. 3-23: Materialzusammensetzung – 3. Versuchsreihe (Quelle: ICT)

No.	wt.-%	PLA	wt.-%	Lignin	wt.-%	Chainextender	wt.-%	Additiv
1	100	PLA	–	–	–	–	–	–
2	95	PLA	–	–	5	Nr. 1	–	–
3	95	PLA	–	–	5	Nr. 2	–	–
4	95	PLA	–	–	5	Nr. 3	–	–
5	65	PLA	30	Lignin	5	Nr. 1	–	–
6	65	PLA	30	Lignin	5	Nr. 2	–	–
7	65	PLA	30	Lignin	5	Nr. 3	–	–
8	30	PLA	30	Lignin	–	–	40	Nr. 1
9	30	PLA	30	Lignin	–	–	40	Nr. 2
10	30	PLA	30	Lignin	–	–	40	Nr. 3
11	30	PLA	30	Lignin	–	–	40	Nr. 4

PLA = NatureWorks 3051D

Bei diesen Versuchen wurde die Schneckengeometrie angepasst. Diese ist in Abb. 3-60 zu sehen. Des Weiteren wurden die Compounds „unter Wasser“ granuliert und nicht, wie in den vorherigen Versuchen im Strang granuliert.

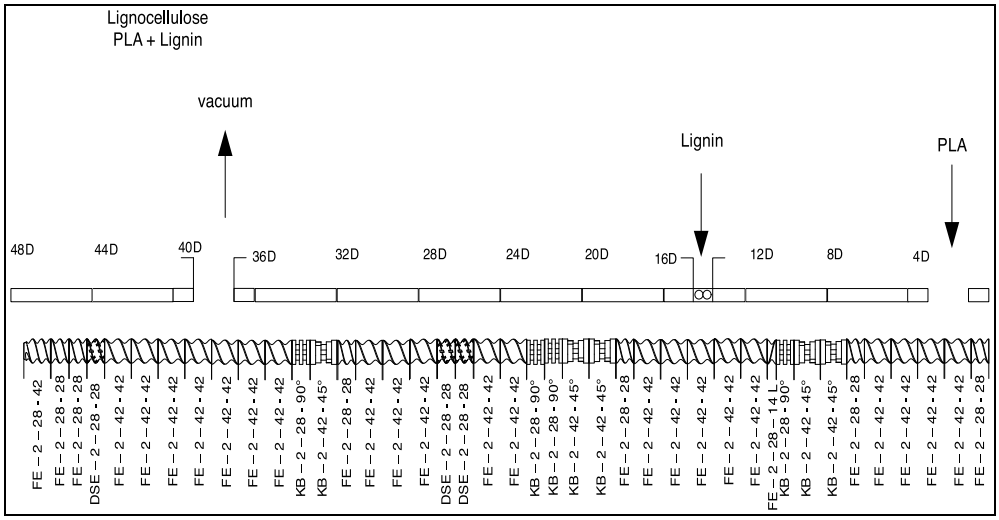


Abb. 3-60: Verwendete Schneckengeometrie 3. Versuchsreihe (Quelle: ICT)

Die Ergebnisse des Schlagbiegeversuchs nach Charpy und die Wärmeformbeständigkeit (HDT) der verarbeitbaren Mischungen zeigt Abb. 3-61.

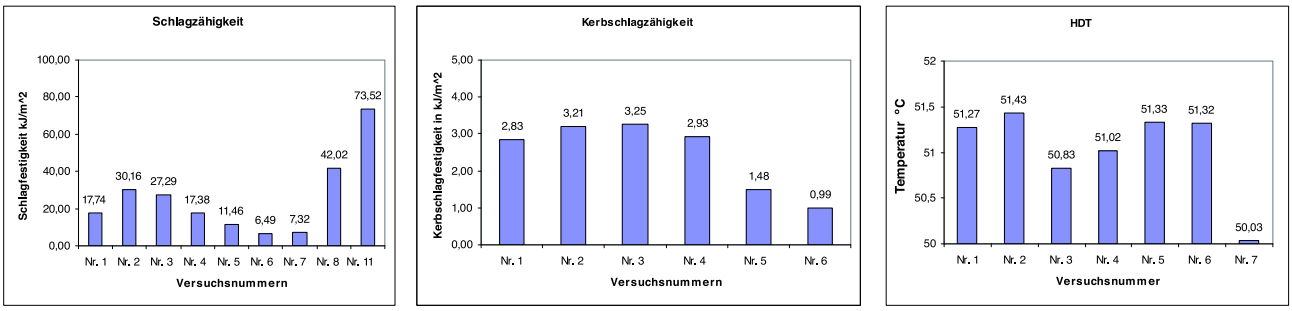


Abb. 3-61: Ergebnisse des Schlagbiegeversuchs und der Wärmeformbeständigkeit (Quelle: ICT)

Vergleicht man die Schlag- und die Kerbschlagzähigkeit der Proben mit steigendem Ligningehalt, so ist derselbe Trend, wie in der zweiten Versuchsreihe zu beobachten. Auffällig ist, dass beim Vergleich der Proben 1, 4 und 7 keine Änderung durch den „chain extender“ hervorgerufen wird.

Die Proben 8 und 11 enthalten als weiteres Additiv einen Schlagzähigkeitsmodifier. Daher nimmt diese bei den Proben stark zu.

Die Probe 11 besitzt weiterhin sehr viele Lufteinschlüsse, was vermutlich durch eine unzureichende Dispergierung verursacht wurde. Die Oberfläche des Prüfkörpers ist außerdem sehr rauh und bietet eine gute Haftungsgrundlage. Von dieser Probe wurden ergänzend noch REM-Aufnahmen angefertigt. Diese zeigt Abb. 3-62.

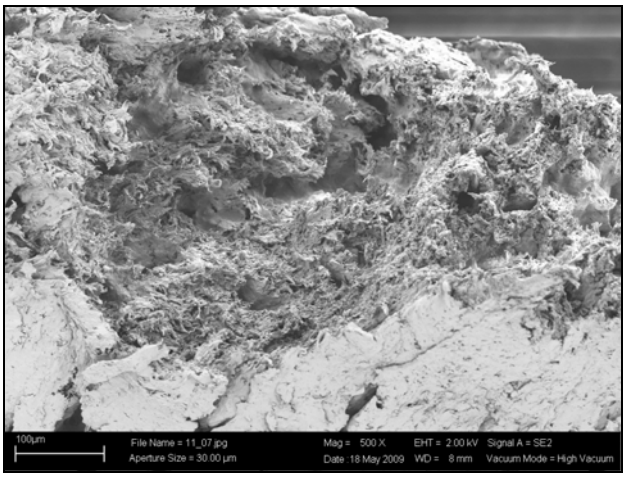


Abb. 3-62: REM-Aufnahme der Probe 11, 3. Versuchsreihe (Quelle: ICT)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zwei vollkommen unterschiedliche Materialklassen mit Ligninzusatz denkbar sind:

- elastische, dehnbare Kunststoffe
- feste, spröde Kunststoffe

AP3-3.2 Verarbeitung zu duroplastischen Systemen (AP 3.3.2, Dynea Erkner GmbH)

Das Ziel der Arbeiten bestand in der Prüfung der vom ICT oder anderen Projektpartnern bereitgestellten Ligninfraktionen auf ihre Verwendbarkeit als phenolischer Rohstoff bei der Synthese von Duromeren. Im Focus standen dabei Phenolharz-Bindemittel für Anwendungen in Holzwerkstoffen wie z.B. MDF, Spanplatten oder Sperrholz.

Lignin selbst kann aufgrund seiner Struktur (Abb. 3-63) als ein aus phenolischen Grundbausteinen aufgebautes Biopolymer aufgefasst werden.

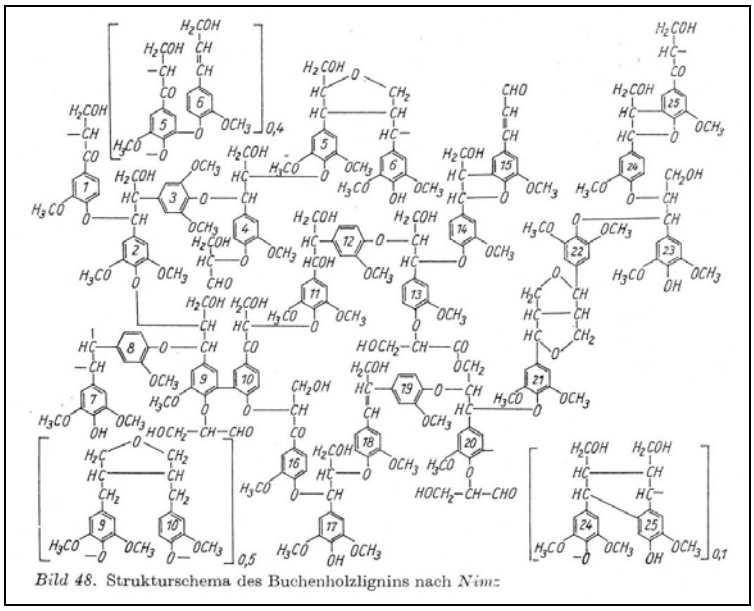
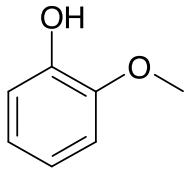
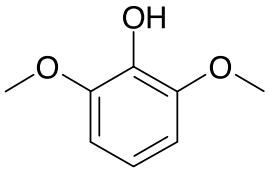


Abb. 3-63: Struktur des Buchenlignins aus „Chemie des Holzes“ (Blazej)

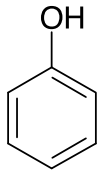
Die Grundbausteine sind substituierte Phenole, Guaiacol und Syringol, die dem Phenol, bzw. den nach der Umsetzung mit Formaldehyd entstehenden Methylolierungsprodukten ähneln. Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit liegt es nahe, dieses Makromolekül in synthetischen Phenolharzen einsetzen zu wollen.



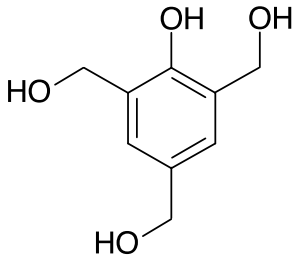
Guaiacol



Syringol



Phenol



2,4,6-tri(hydroxymethyl) -phenol

Neben der Möglichkeit, Lignin als Füllstoff mit fertigen Phenolharzen zu mischen, es also zur Substitution von vollständigem Phenolharz zu nutzen, sollte in diesem Projekt der Ansatz verfolgt werden, das Lignin als phenolischen Rohstoff bei der Synthese dieser Harze einzusetzen, damit also Phenol als Rohstoff zu substituieren.

Das bedeutet, dass für die partielle oder vollständige Substitution des Phenols bei der alkalischen Kondensation von Phenolen mit Formaldehyden (Herstellung von Resolen) Lignin als Rohstoff bestimmte Anforderungen erfüllen muss.

So sollte das Material in Wasser bzw. im Reaktionsgemisch löslich sein. Das bedeutet, dass es in kleinerer Molekülgröße vorliegen sollte. Ebenso darf es kein organisches Lösemittel enthalten und sollte gegenüber Formaldehyd reaktiv sein. Darüber hinaus muss es geruchsarm sein. Um für technische Anwendungen in Betracht gezogen werden zu können, sollte das Lignin mit reproduzierbarer Qualität in größeren Mengen verfügbar sein.

Eine tatsächliche Verwendung als Rohstoff wird nur dann sinnvoll, wenn die Qualität der Bindemittel und der daraus hergestellten Produkte nicht negativ beeinträchtigt wird und ökonomisch nur denkbar, wenn der Preis in angemessener Relation zum aktuellen Phenolpreis liegt.

Verwendbar könnten flüssige oder feste Ligninfraktionen sein, auch mit Kohlenhydraten als Begleitstoff, bzw. bei fehlender Reaktivität aufgrund zu hoher Molmasse auch Gemische von Spaltprodukten.

Organosolvlignin, wie es zunächst als Produkt aus dem Bioraffinerieprozess anfällt, scheint aufgrund seiner erwarteten Reinheit und damit Freiheit von störenden Begleitstoffen und seiner vorhergesagten Molekülgröße für dieses Vorhaben prinzipiell geeignet zu sein.

AP3-3.2.1 Verwendete Ligninfraktionen

Für die Untersuchungen zur partiellen Substitution von Phenol wurden Lignin-Fraktionen aus den Prozessen der Projektpartner ICT und vTI verwendet. Die Tab. 3-24 gibt eine Übersicht über die zur Verfügung gestellten Fraktionen, ihre Herkunft und die Dynea-interne Bezeichnung.

Tab. 3-24: Ligninfraktionen aus dem Bioraffinerieprojekt (Quelle: Dynea)

interne Bezeichnung	Bezeichnung	Herkunft
Lignin 1	MP 34/35 (Jan 08)	vTI
Lignin 2	Buchenholz Lignin (Febr. 08)	ICT
Lignin 3	Raf 4, Suspension mit 21,4% FS (April 08)	ICT
Lignin 4	OrganosolvLignin +16% Rinde (Juni 08)	vTI
Lignin 5	Buchenholz Lignin (Okt. 08)	ICT
Lignin 6	Buchenholz Lignin, abrotiert (Okt. 08)	ICT
Lignin 7	MP 113-116 (Okt. 08)	vTI

Die Zuckeranalyse der Ligninfraktion 1 vom Projektpartner vTI Hamburg (Mischfraktion 34/35) ergab einen sehr kleinen Anteil an C6- bzw. C5-Zuckern (Tab. 3-25), was jedoch für die Verwendung der Ligninfraktion als phenolischen Rohstoff in der Synthese von Phenolharzen keinen Nachteil bedeutet.

Tab. 3-25: Analysendaten Restzuckergehalt des Lignin 1 (Quelle: vTI)

Zuckerbestimmung 34H	[% abs.]
(Hydrolyse-Rückstand 89,1 %)	
Xylose	1,7
Glucose	1,2
Mannose	0,1
Galactose	0,1
Arabinose	0,1
Rhamnose	0,1
4-O-Me	0,02

AP3-3.2.2 Anwendungsbezogene Untersuchungen der Ligninfraktionen

AP3-3.2.2.1 Löslichkeit

Bei der Untersuchung der Löslichkeit der Lignine im Reaktionsmedium, bzw. in den einzelnen Rohstoffen stellte sich heraus, dass alle Fraktionen in den relevanten Medien für die Resolsynthese schwer lösbar sind und sich nur mit Phenol zu einem homogenen Gemisch verarbeiten lassen (Tab. 3-26). Die anschließende Dosierung anderer Rohstoffe und Katalysatoren zum Phenol/Lignin Gemisch ist problemlos möglich, so dass die bisher geprüften Ligninfraktionen als Rohstoff für die Resolsynthese nach Berücksichtigung dieser Erkenntnisse bei der Handhabung verwendbar waren.

Es wurde ebenfalls versucht, die Ligninfraktionen in fertige Basisharze einzumischen. Aufgrund der Unlöslichkeit der Lignine war es allerdings mit den zur Verfügung stehenden Fraktionen nicht möglich, homogene Harzmixturen herzustellen.

Tab. 3-26: Löslichkeitsprüfung der Ligninfraktionen (Quelle Dynea)

Lignin	Wasser kalt	Wasser heiß	NaOH (45%ig) kalt/heiß	Phenol (100%ig)	Phenolat PhOH + NaOH	Phenol + Lignin lösen dann NaOH dazu
1	Bodensatz, schwarze Krümel	Bodensatz, wird feste Kruste	schwarze, krümlige Flüssigkeit	**löslich**	wenig löslich, Klumpen	**löslich**
2	unlöslich, Bodensatz, schwarze Krümel	kaum löslich, leichte Färbung, Bodensatz	unlöslich, schwarze Krümel oben	**löslich**	wenig löslich, Klumpen	**löslich**
3	unlöslich, Bodensatz	kaum löslich, Bodensatz	unlöslich, schwarze Klumpen	**löslich**	wenig löslich, Klumpen	**löslich**
4	wenig löslich, Bodensatz	wenig löslich, Bodensatz	teilw. löslich, schwarze Klümpchen	**löslich**	wenig löslich, Klumpen	**löslich**
5	wenig löslich, Bodensatz	wenig löslich, Bodensatz	teilw. löslich, schwarze Klümpchen	**löslich**	wenig löslich, Klumpen	**löslich**
6	wenig löslich, Bodensatz, Lignin schwimmt oben	wenig löslich, Bodensatz, Lignin schwimmt oben	teilw. löslich, schwarze Klümpchen	**löslich**	wenig löslich, Klumpen	**löslich**
7	wenig löslich, Bodensatz	wenig löslich, Bodensatz	unlöslich, schwarze Klumpen	**löslich**	wenig löslich, Klumpen	**löslich**

AP3-3.2.2.2 Simultane Thermoanalyse (STA)

Mittels simultaner Thermoanalyse wurden die Ligninfraktionen hinsichtlich ihres Wassergehaltes, der thermischen Beständigkeit sowie des Restmassegehaltes untersucht (Abb. 3-64a, b). Die Messungen wurden mittels einer STA 409 von der Firma Netzsch mit einer Heizrate von 10 K/min im Temperaturbereich von 25 – 850 °C unter Luft durchgeführt. Ausgewertet wurden die Masseverluste bis 140 °C (Maß für den Verlust an Feuchte) sowie die Restmasse am Ende der Messungen (Tab. 3-27).

Die Analyse der Massekurven (Abb. 3-64a) zeigt für die pulverförmigen Ligninfraktionen Feuchtegehalte zwischen 3 und 7 %. Die Aschegehalte liegen zwischen 1 und 4,5 %. Die Fraktion 3 war eine Lignindispersion mit einem Wassergehalt von ca. 74 % entsprechend der STA-Ergebnisse.

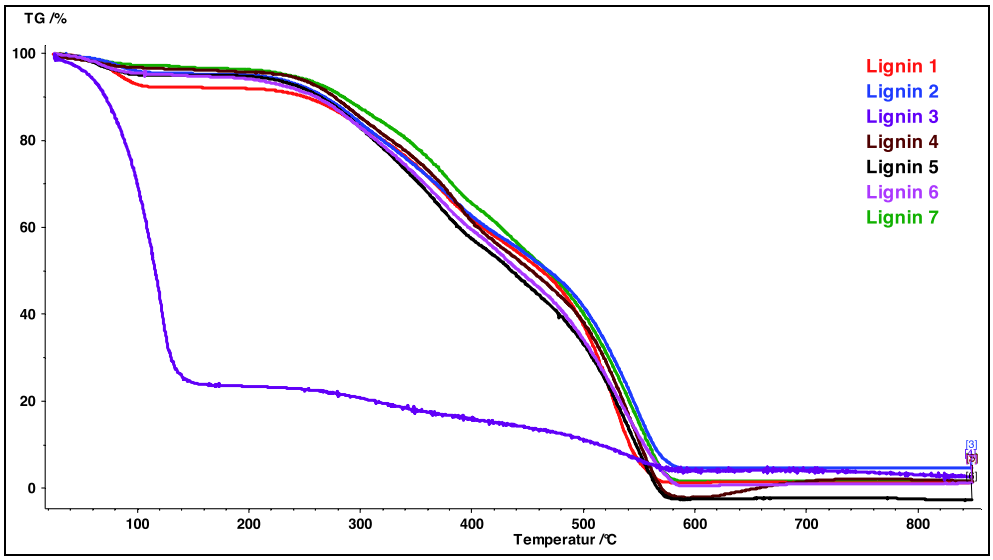


Abb. 3-64a: Thermoanalytische Untersuchung der Lignine – Masseverluste (Quelle: Dynea)

Aus den DSC-Kurven kann man den Beginn der exothermen Verbrennungsvorgänge oberhalb von 200°C ablesen (Abb. 3-64b).

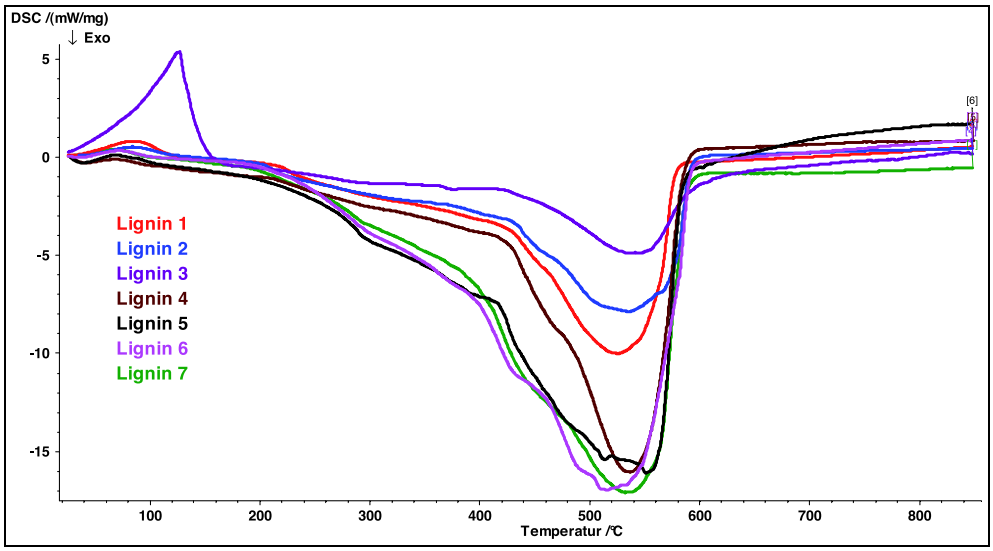


Abb. 3-64b: Thermoanalytische Untersuchung der Lignine – DSC-Kurven (Quelle: Dynea)

Tab. 3-27: Masseverluste der Ligninfraktionen – Auswertung der STA-Messungen (Quelle: Dynea)

Lignin	Masseverlust bis 140°C [%]	Masseverlust bis 850°C [%]
1	7,0	1,2
2	4,2	4,5
3	73,7	2,5
4	3,7	1,4
5	5,0	2,9
6	5,0	1,1
7	3,0	1,5

AP3-3.2.3 Auswahl der Referenzharze für Syntheseversuche

Für die Erprobung der Ligninfraktionen als Phenolsubstitut wurden Bindemittel aus Holzwerkstoffapplikationen ausgewählt. Dabei werden für die unterschiedlichen Anwendungen wie mitteldichte oder hochdichte Faserplatte (MDF/HDF), Spanplatte oder oriented strand board (OSB) zwar immer Resole verwendet, die sich allerdings aufgrund unterschiedlicher Anforderungen bei der Verarbeitung hinsichtlich ihres Kennwertespektrums unterscheiden.

Typische Dynea-Bindemittel für die entsprechenden Applikationen sind in Tab. 3-28 zusammengestellt. Dabei stellen mit "EXP" bezeichnete Typen Bezeichnungen für Entwicklungsprodukte dar, wie sie auch im Rahmen dieses Projektes verwendet worden sind. Je ein typisches Kennwertespektrum zu diesen Harztypen ist in Tab. 3-29 zu finden.

Tab. 3-28: Dynea-Basisharze für Holzwerkstoffapplikationen (Quelle: Dynea)

Applikationsgebiet	Dynea-Bindemittel
MDF/HDF	Prefere 11J255, EXP 050, EXP 071
Spanplatte	Prefere 10J227, EXP 5E8404
Sperrholz	Prefere14J175, EXP 5E8403

Tab. 3-29: Typische Kennwertespektren der als Referenz verwendeten Basisharze (Quelle: Dynea)

	MDF/HDF Prefere 11J255	Spanplatte Prefere 10J227	Sperrholz Prefere 14J175
Viskosität	391 mPas	520 mPas	228 mPas
NfA H1	54,0 %	60,2 %	44,9 %
pH- Wert	12,0	12,1	11,7
Alkalität	3,3 %	4,8 %	7,0 %
Härtung bei 130°C (BZ)	56 s	60 s	62 s
Härtung bei 100°C (GZ)	1002 s	910 s	2150 s

Tab. 3-30 gibt einen Überblick über die in diesem Bericht verwendeten Abkürzungen und Analysenmethoden sowie der zugrundeliegenden Normen.

Tab. 3-30: Verwendete Abkürzungen und Methoden

Abkürzung	Methode	Prüfnorm
Visk.20°C RS	Viskosität mit dem Rheometer bei 20°C	RD272/1
NfA-H1	Nichtflüchtige Anteile bei 135°C	DIN EN ISO 3251
PhOH	Gehalt an freiem Phenol	DIN EN ISO 8974
CH_2O	Gehalt an freiem Formaldehyd	DIN EN ISO 11402
pH-Wert	pH-Wert von Phenolharzen	DIN ISO 8975
WV 20°C	Wasserverdünnbarkeit bei 20°C	DIN EN ISO 8989
BZ bei 130°C	B-Zeit bei 130 °C	DIN EN ISO 8987
GZ bei 100°C	Gelierzeit bei 100 °C	RD 103
Alkalität	Alkalität alkalisch kondensierter Phenolharze	RD001

AP3-3.2.4 Syntheseversuche für ligninmodifizierte Bindemittel

Die Herstellung der ligninmodifizierten Harze, bei denen das Lignin als phenolischer Rohstoff verwendet wird, erfolgte unter Einhaltung des für jeden Harztyp geltenden Technologischen Reglements der Dynea Erkner GmbH. Die Ligninmenge wurde auf die Menge Phenol bezogen und zu Beginn der Kondensations-reaktion zusammen mit dem Phenol vorgelegt. Anschließend wurden die anderen Rohstoffe dosiert.

Der Vergleich der Harze wurde zunächst mit einem Phenol-Substitutionsgrad von 9 % bzw. 10 % vorgenommen. Die standardgemäßen Harzkennwerte (siehe Tab. 3-29) wurden untersucht.

An ausgewählten Beispielen wurden höhere Substitutionsgrade für Phenol erprobt und je nach Harzsorte bis zu 30 % bzw. 50 % erreicht. Allen ligninmodifizierten Produkten gemein ist die tiefdunkelbraune bis schwarze Farbe, die für bestimmte Applikationen ein Ausschlusskriterium darstellen kann. Die Abb. 3-65a und b zeigen den farblichen Vergleich zwischen Syntheseansätzen ohne bzw. mit 10% Lignin zu Beginn des Kondensationsprozesses.

Abb. 3-65a: Farbvergleich: Ligninfreies Referenzharz (Quelle: Dynea)

Abb. 3-65b: Farbvergleich: Harz mit 10% Phenol-Substitution durch Lignin (Quelle: Dynea)

AP3-3.2.5 Untersuchung der Klebeigenschaften der modifizierten Bindemittel

Zur Untersuchung der modifizierten Bindemittel hinsichtlich ihrer Eignung als Klebstoff in Holzwerkstoffen ist der von P.E. Humphrey entwickelte und von Adhesive Evaluation Systems Corvallis, Oregon kommerzialisierte ABES-Test (Automated Bond Evaluation System) verwendet worden. Eine detaillierte Beschreibung ist in US 5.176.028 zu finden.

Für diesen Test werden (Buchen)-Furniere überlappend mit dem zu prüfenden Bindemittel verklebt und die Klebfestigkeit dieser Verbindung in Abhängigkeit der Pressdauer bei definierter Klebtemperatur und Anpressdruck mittels eines Zugversuches bestimmt. Aus den Ergebnissen lassen sich Rückschlüsse auf das Aushärteverhalten des Harzes unter den gewählten praxisorientierten Bedingungen (Kleben von Holz) ziehen. Durch Veränderung der Parameter Temperatur, Druck oder Presszeit können die unter diesen Versuchbedingungen optimalen Bedingungen zum Erreichen ausreichender Klebefestigkeiten ermittelt werden. Bei Konstanz der Parameter lassen sich verschiedene Bindemittel mit dieser Methode einfach miteinander vergleichen. Die ABES Tests wurden hauptsächlich am Dynea-Standort in Krems durchgeführt.

AP3-3.2.6 Herstellung von Holzwerkstoffen mit ligninmodifizierten Bindemitteln und deren Prüfung

Holzwerkstoffe aus den Applikationen Spanplatte und Sperrholz wurden im Labormaßstab unter praxisrelevanten Bedingungen hergestellt und den produktbezogen üblichen Prüfungen unterzogen.

AP3-3.2.6.1 Applikation MDF/HDF

Abb. 3-66: MDF-Platten (Quelle: Dynea)

Als Referenz für die Versuche zur Ligninmodifizierung von MDF/HDF-Harzen wurde das Dynea-Produkt Prefere 11J255 verwendet. Alle Ligninfraktionen wurden in der Standardformulierung verwendet. Der Vergleich der unterschiedlichen Fraktionen wurde durchgeführt, indem 10 % der Phenolmenge von Beginn der Synthese an ersetzt wurde. Die Kennwerte der Harze (Tab. 3-31a) wurden normiert und in Abb. 3-67 dargestellt.

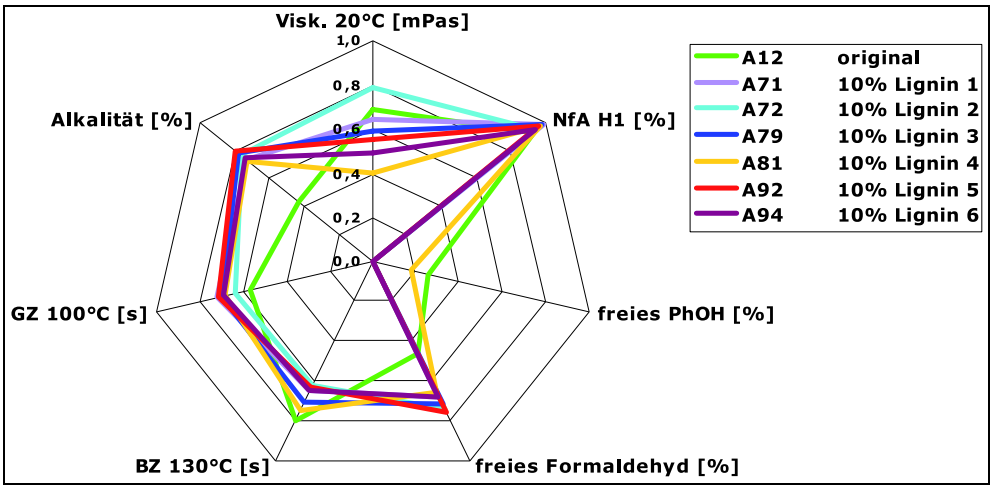


Abb. 3-67: Normierte Kennwerte der ligninmodifizierten MDF/HDF-Harze im Vergleich mit der Referenz (Quelle: Dynea)

Die Kennwerte sind für die verschiedenen Harzansätze nicht identisch, was einerseits mit der nicht optimierten Formulierung zu erklären ist, andererseits jedoch im üblichen Rahmen der Kennwertestreuung liegt. Alle Harze ergaben jedoch ein akzeptables Kennwertspektrum, wie es die technische Herstellung von HDF/MDF erfordert. Sollte es nötig sein, bestimmte Werte oder Eigenschaften anzupassen, kann das durch Variationen der Formulierung bzw. der Synthese im üblichen Maße realisiert werden.

Für ausgewählte Ligninfraktionen (Fraktion 1 und 5) wurde getestet, in welchem Anteil Phenol substituiert werden kann und wie sich ein steigender Anteil an Lignin auf die Harzkennwerte auswirkt. Die Kennwerte sind in Tab. 3-31b bzw. Tab. 3-31c aufgelistet sowie als normierte Werte in Abb. 3-68 und Abb. 3-69 dargestellt.

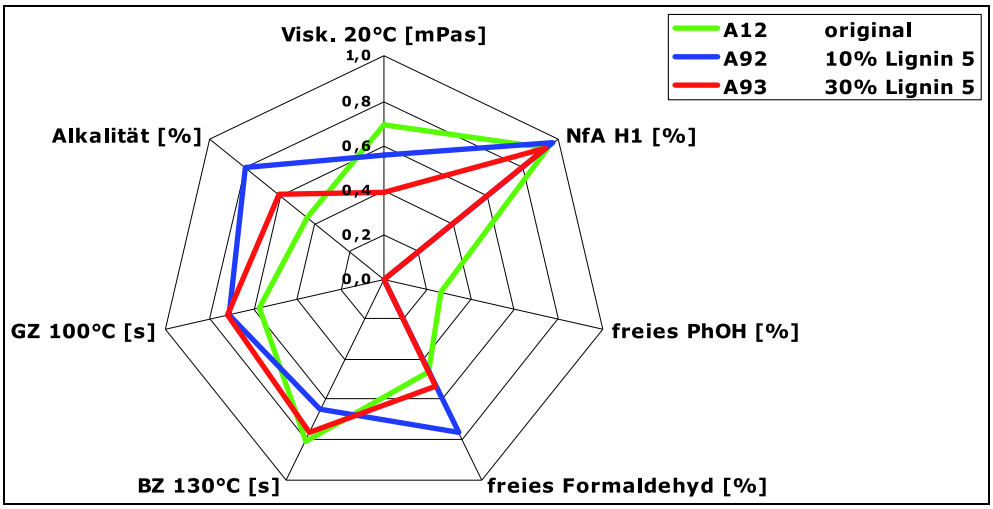


Abb. 3-68: Normierte Kennwerte eines ligninmodifizierten MDF/HDF-Harzes im Vergleich mit der Referenz (Lignin 5) (Quelle: Dynea)

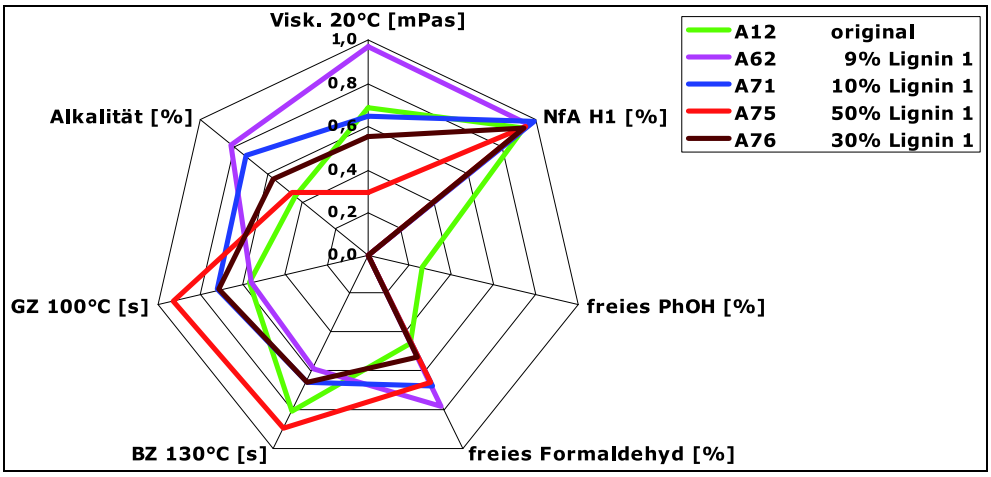


Abb. 3-69: Normierte Kennwerte eines ligninmodifizierten MDF/HDF-Harzes im Vergleich mit der Referenz (Lignin 1) (Quelle: Dynea)

Selbst mit einem Anteil von 50 % Lignin anstelle des Phenols sind Harze synthetisiert worden, die zwar von der Referenz abweichende Kennwerte aufweisen, aber nach evtl. durchzuführender gezielter Optimierung der Formulierung oder Anpassung der Synthesebedingungen für die Applikation akzeptabel sein würden.

Tab. 3-31a: Versuchsansätze mit Harzkenndaten – Vergleich verschiedener Ligninfraktionen

Ansatz	Substitution Phenol	Visk.20°C RS [mPas]	NfA-H1 [%]	PhOH [%]	CH_2O [%]	pH-Wert	BZ 130°C [s]	GZ 100°C [s]	Alkalität [%]
A71	10% Lignin 1	258	54,56	n. n.	0,68	12,2	65	1440	3,7
A72	10% Lignin 2	315	52,05	n. n.	0,74	12,1	62	1270	3,8
A79	10% Lignin 3	237	54,15	n. n.	0,72	12,1	71	1400	3,9
A81	10% Lignin 4	162	53,80	0,09	0,66	12,2	75	1360	3,6
A92	10% Lignin 5	222	53,16	n. n.	0,76	12,2	64	1420	4,0
A94	10% Lignin 6	198	51,92	n. n.	0,68	12,2	65	1385	3,7

Tab. 3-31b: Versuchsansätze mit Harzkenndaten – Vergleich in Abhängigkeit vom Substitutionsgrad für Phenol (Lignin 5)

Ansatz	Substitution Phenol	Visk.20°C RS [mPas]	NfA-H1 [%]	PhOH [%]	CH_2O [%]	pH-Wert	BZ 130°C [s]	GZ 100°C [s]	Alkalität [%]
A12	original	275	51,32	0,13	0,46	10,5	80	1140	2,2
A92	10% Lignin 5	222	53,16	n. n.	0,76	12,2	64	1420	4,0
A93	30% Lignin 5	157	51,20	n. n.	0,53	11,9	76	1425	3,0

Tab. 3-31c: Versuchsansätze mit Harzkenndaten – Vergleich in Abhängigkeit vom Substitutionsgrad für Phenol (Lignin 1)

Ansatz	Substitution Phenol	Visk.20°C RS [mPas]	NfA-H1 [%]	PhOH [%]	CH_2O [%]	pH-Wert	BZ 130°C [s]	GZ 100°C [s]	Alkalität [%]
A12	original	275	51,32	0,13	0,46	10,5	80	1140	2,2
A62	9% Lignin 1	387	53,00	n. n.	0,78	12,2	58	1125	4,1
A71	10% Lignin 1	258	54,56	n. n.	0,68	12,2	65	1440	3,7
A76	30% Lignin 1	222	51,70	n. n.	0,53	11,7	65	1415	2,8
A75	50% Lignin 1	116	52,00	n. n.	0,66	11,5	90	1855	2,3

Letztendlich entscheiden verarbeitungsrelevante Tests, bzw. die praktische Verwendung in der Applikation darüber, ob das Harz als Bindemittel geeignet ist.

Gut geeignet, um unterschiedliche Bindemittel hinsichtlich ihrer verarbeitungsrelevanten Klebeigenschaften miteinander zu vergleichen, ist der ABES-Test. Bei 110°C werden Holzfurniere überlappend verklebt und die Kraft in Abhängigkeit von der Klebedauer gemessen, bei der die Klebefuge zerreißt.

In Abb. 3-70 sind die Kraftkurven von mit unterschiedlichen Ligninfraktionen hergestellten Bindemitteln (Anteil jeweils von 10 % der Phenolmenge) mit der unmodifizierten Referenz verglichen. Ein kontinuierliches Ansteigen der Klebkraft mit zunehmender Presszeit ist ein Ausdruck sowohl für das Aushärte - als auch des Penetrationsgeschehens innerhalb der Klebefuge. Deutlich sichtbar ist eine Erhöhung des Festigkeitsniveaus der Verklebungen für ligninhaltige Bindemittel gegenüber der Referenz.

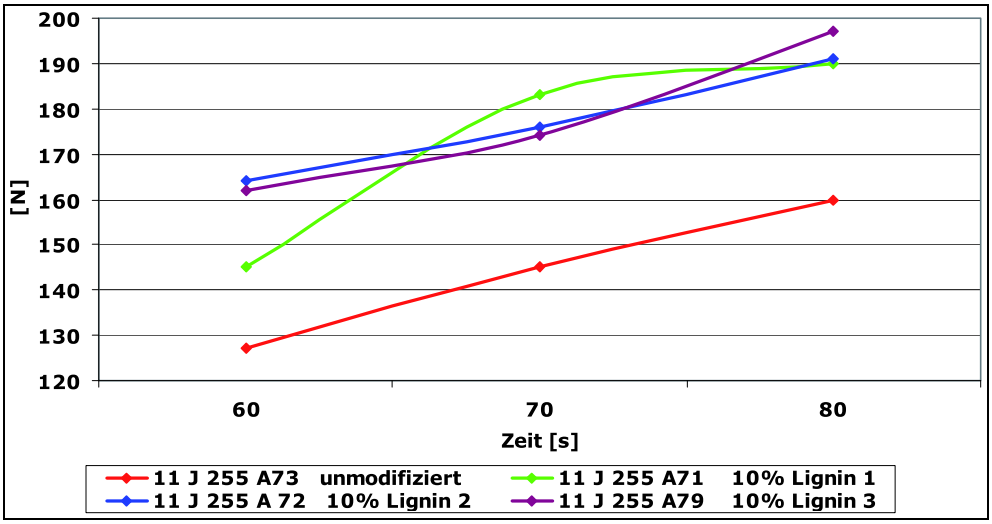


Abb. 3-70: ABES-Ergebnisse der modifizierten MDF-Harze – verschiedene Ligninfraktionen (Quelle: Dynea)

Die Staffelung entsprechend der Ligninmenge wird in Abb. 3-71 deutlich, in dem zunehmende Phenolmengen durch eine Ligninfraktion ersetzt wurden und die Festigkeit nach gleicher Presszeit dadurch zunimmt. Nur das mit 50 % Lignin anstelle des Phenols hergestellte Bindemittel liegt auf einem tieferen Niveau. Die Zunahme der Klebkraft mit steigender Pressdauer verläuft in allen Versuchen mehr oder weniger ähnlich. Diese Ergebnisse lassen zunächst keine Einschränkung für die Eignung der modifizierten Bindemittel als Klebstoffe für MDF/HDF-Werkstoffe erkennen.

Neben der Eignung als Bindemittel an sich, muss ein Harz für MDF/HDF –Anwendungen aber auch noch weitere technologische Parameter erfüllen um entsprechend der gängigen Technik per Blasleitung auf die Fasern aufgesprüht werden zu können. Aufgrund der großen Spezifität der Verarbeitung wurde ein Anwendungstest im Rahmen dieses Projektes nicht durchgeführt.

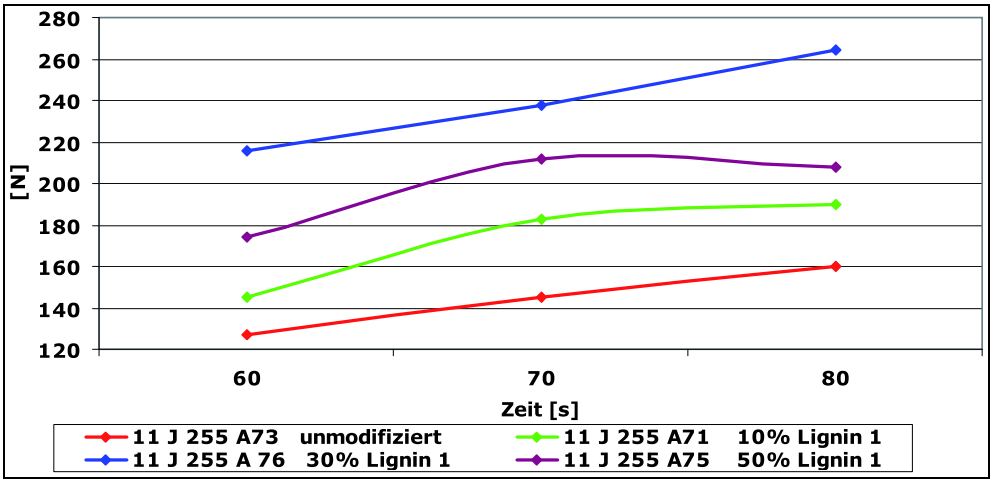


Abb. 3-71: ABES-Ergebnisse der modifizierten MDF-Harze – unterschiedlicher Ligningehalt (Quelle: Dynea)

AP3-3.2.6.2 Applikation Spanplatte

Abb. 3-72: Spanplatten (Quelle: Dynea)

Als Referenz diente das Dynea-Produkt Prefere 10J227. Auf der Grundlage der technischen Rezeptur dieses Produktes wurden 10 % des Phenols durch verschiedene Ligninfraktionen ausge-

tauscht und ohne Veränderung der Synthesevorschrift Harze hergestellt. Die erzielten Kennwerte (Tab. 3-32a) wurden normiert und mit der Referenz verglichen (Abb. 3-73).

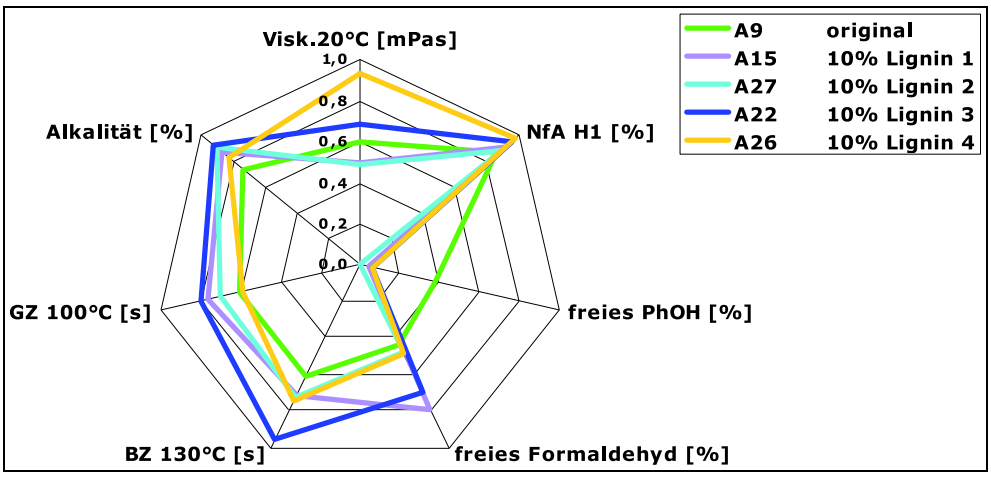


Abb. 3-73: Normierte Kennwerte für ligninmodifizierte Spanplattenbindemittel im Vergleich mit der Referenz (Quelle: Dynea)

Für Ligninfraktion 1 wurden Syntheseversuche durchgeführt, bei denen die Auswirkungen einer Veränderung der substituierten Phenolmenge ermittelt wurden. Neben dem Erfassen und Beurteilen der üblichen Kennwerte (normiert in Abb. 3-74 dargestellt) wurde ermittelt, wie viel Phenol durch Lignin ersetzbar ist. Während ein Austausch von 10 % oder auch 30 % der Phenolmenge ohne nennenswerte Beeinträchtigungen des Syntheseablaufs möglich ist, steigt die Viskosität des Reaktionsgemisches mit 50 % Lignin anstelle von Phenol drastisch an, so dass dieser Versuch abgebrochen werden musste. Die Kennwerte sind aus Tab. 3-32b) ablesbar.

Alle mit Lignin hergestellten Harze wiesen ein Eigenschaftsspektrum auf, das mit den Kennwerten der Standardharze vergleichbar war. Die Differenzen in den einzelnen Kennwerten liegen im Rahmen der üblichen Streuungen, bzw. könnte man ihnen mit gezielter Optimierung entgegenwirken.

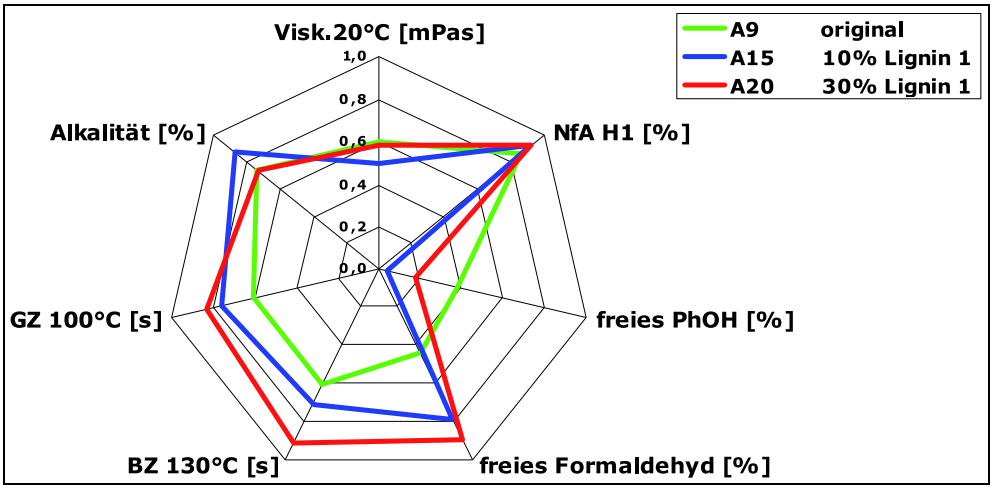


Abb. 3-74: Normierte Kennwerte für ein ligninmodifiziertes Spanplattenbindemittel im Vergleich mit der Referenz (Lignin 1) (Quelle: Dynea)

Tab. 3-32a: Vergleich verschiedener Ligninfraktionen

Ansatz	Substitution Phenol	Visk.20°C RS [mPas]	NfA-H1 [%]	PhOH [%]	CH_2O [%]	pH-Wert	WV 20°C	BZ 130°C [s]	GZ 100°C [s]	Alkalität [%]
A15	10% Lignin 1	494	64,24	0,02	0,79	11,9	>1:20	71	1139	4,4
A16	10% Lignin 2	622	65,58	n. n.	0,67	11,9	>1:20	75	1094	4,6
A22	10% Lignin 3	688	67,20	0,03	0,69	12,0	>1:20	95	1190	4,6

Tab. 3-32b: Vergleich in Abhängigkeit vom Substitutionsgrad für Phenol

Ansatz	Substitution Phenol	Visk.20°C RS [mPas]	NfA-H1 [%]	PhOH [%]	CH_2O [%]	pH-Wert	WV 20°C	BZ 130°C [s]	GZ 100°C [s]	Alkalität [%]
A15	10% Lignin 1	494	64,24	0,02	0,79	11,9	>1:20	71	1139	4,4
A20	30% Lignin 1	584	64,37	0,09	0,89	11,6	>1:20	91	1254	3,7
A19	50% Lignin 1	Abbruch, da zu viskos								

Als verarbeitungsrelevante Eigenschaft wurden die Klebfestigkeiten der einzelnen Bindemittel mit Hilfe des ABES-Tests untersucht.In Abb. 3-75 sind die Kraftkurven für Harze mit 10 % der unterschiedlichen Ligninfraktionen anstelle von Phenol dargestellt. Die Untersuchungen wurden wieder bei 110 °C Presstemperatur durchgeführt. Im Unterschied zu den Harzen für die MDF/HDF-Anwendung liegen hier die Festigkeitsniveaus der modifizierten Harze unter der der Referenz. Das Ansteigen der Festigkeit mit steigender Presszeit ist für die einzelnen Bindemittel vergleichbar.

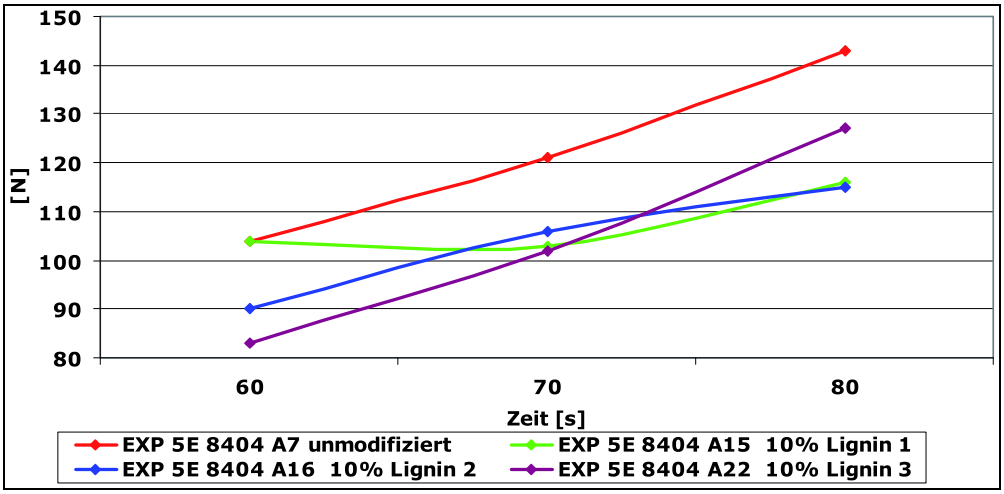


Abb. 3-75: ABES-Ergebnisse der modifizierten Spanplattenharze – verschiedene Ligninfraktionen (Quelle: Dynea)

Die in Abb. 3-76 ablesbaren Kurven für Bindemittel mit unterschiedlichem Substitutionsgrad des Phenols bestätigen das niedrigere Festigkeitsniveau der modifizierten Harze. Die Kurven steigen jedoch alle mit steigender Pressdauer, so dass man letztendlich die gleichen Festigkeitswerte der Verklebungen erreichen kann. Für die praktische Herstellung von Spanplatten bedeutet das möglicherweise die Notwendigkeit zu leichten Veränderungen der Pressparameter um die gleiche Qualität der Platten zu erhalten.

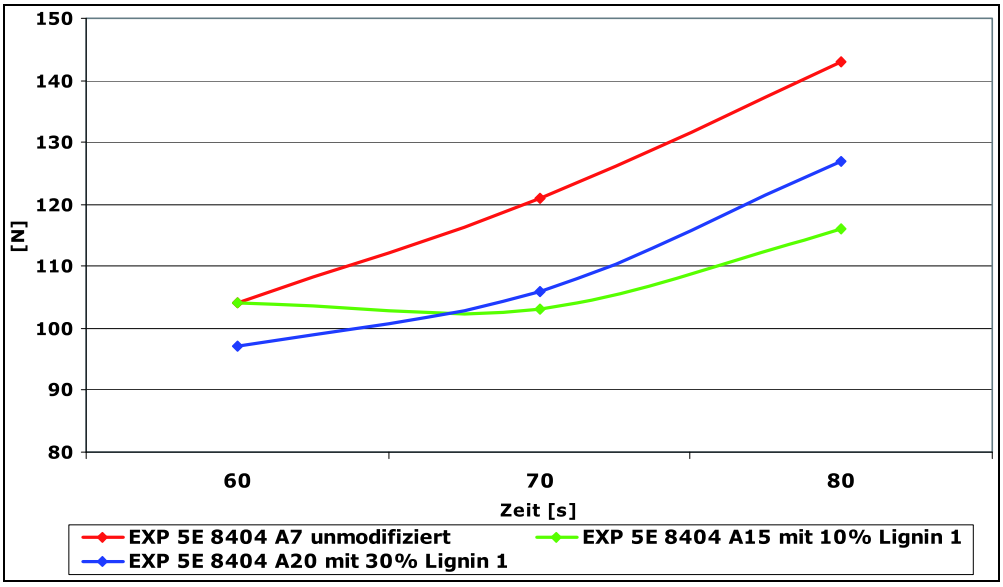


Abb. 3-76: ABES-Ergebnisse der modifizierten Spanplattenharze – unterschiedlicher Ligningehalt (Quelle: Dynea)

Die Erhöhung der Presstemperatur von 110 °C auf 130 °C (Abb. 3-77) bewirkt höhere Absolutwerte der Klebfestfestigkeit und zeigt eine größere Differenzierung der Werte in Abhängigkeit von dem durch Lignin substituierten Anteil an Phenol während der Synthese.

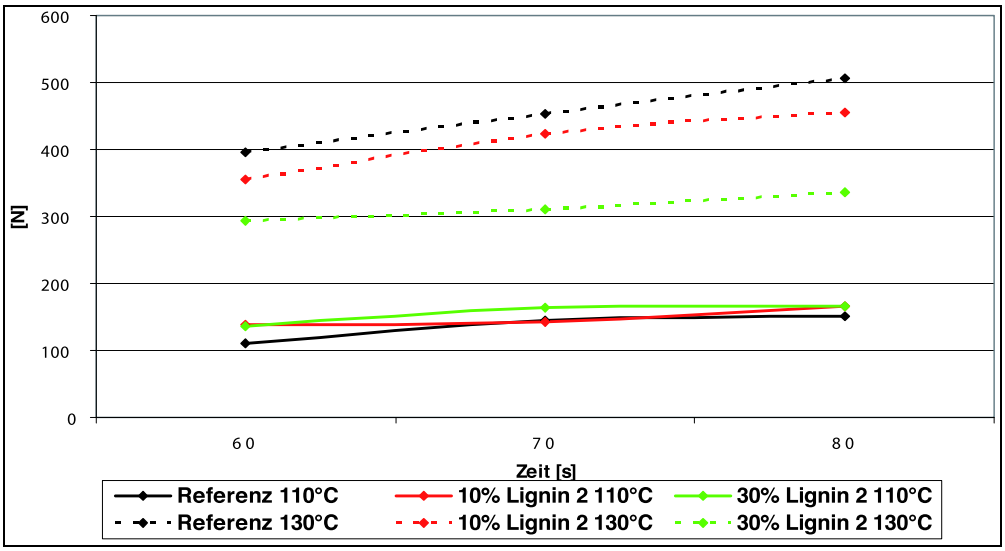


Abb. 3-77: ABES-Ergebnisse von ligninmodifizierten Spanplattenbindemitteln bei 110 °C und 130 °C im Vergleich mit der Referenz (Quelle: Dynea)

Je höher der Ligninanteil im Harz war, desto geringere Festigkeitswerte konnten ermittelt werden. Jedoch liegen alle Werte bei 130°C an der oberen Messgrenze der Prüfapparatur, so dass die Ergebnisse eher akademische denn praktische Bedeutung haben. Die Festigkeiten, auch schon bei 110 °C, sind für alle Bindemittel im für die praktische Verarbeitung akzeptablen Bereich.

Mit Bindemitteln, die unter Austausch von 10 % bzw. 30 % der Phenolmenge durch Lignin hergestellt worden sind, konnten im labortechnischen Maßstab Spanplatten hergestellt werden. Diese Versuche wurden im Vergleich mit dem Referenzharz 10J227 unter den für die laufende Produktentwicklung üblichen Bedingungen am österreichischen Dynea-Standort Krems durchgeführt. Die Beleimung der Späne erfolgte im Mischer.

Ohne Veränderungen an den Herstellungsparametern konnten Spanplatten mit allen drei Harzvarianten produziert werden, die dann den standardgemäßen Werkstoffprüfungen unterzogen wurden. Sowohl die Herstellungsparameter als auch die Prüfergebnisse sind in Tab. 3-33 zusammengefasst.

Tab. 3-33: Herstellungsparameter und Prüfergebnisse von Laborspanplatten mit ligninhaltigen Bindemitteln im Vergleich zur Referenz (Quelle: Dynea)

Leim:	**EXP5E8227 Referenz**	**EXP5E8404 10% Lignin**	**EXP5E8404 30% Lignin**
Trockensubstanz [%]:	60,2	62,4	53,7
Viskosität [mPas]:	520	491	433
Presszeit [s/mm]:	11	11	11
Pressdruck [bar]:	90	90	90
Presstemperatur [° C]:	220	220	220
Feuchte [%]:	6,24	5,66	6,82
phot. gefunden [mg/100g]:	0,59	0,63	0,84
Perforatorwert (ph.korr.)[mg/100g]:	**0,60**	**0,70**	**0,80**
Dichte [kg/m³]:	718	736	681
V20-Mittelwert [N/mm²]:	**zu hoch**	**zu hoch**	**0,53**
V100-Mittelwert [N/mm²]:	**0,13**	**0,18**	**0,07**
mittlere Plattendicke [mm]:	15,73	15,60	15,77
Mittelwert 24h-Quellung [%]:	**22,91**	**26,05**	**28,77**

Die leichte Erhöhung der Perforatorwerte (bestimmt gemäß DIN EN120) mit steigendem Substitutionsgrad kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die Reaktivität des Lignins im Vergleich zu der des Phenols doch geringer ist. Das bedeutet letztendlich, dass das Molverhältnis Phenol zu Formaldehyd in der Synthese zugunsten des dann bei der Prüfung entweichenden Formaldehyds verschoben ist. Jedoch liegen die Emissionswerte für Formaldehyd auch bei der 30 % Lignin enthaltenden Bindemittelvariante noch überaus deutlich unter der Norm für die E1-

Klassifizierung (max. 2,5 mg/100 g). Sie tendieren eher zum Bereich der AsWood-Klassifikation[2] (Emissionslevel wie natürlich gewachsenes Holz).

Die etwas geringere Dichte bei steigendem Ligninanteil kann mit der Verringerung der Klebfestigkeit erklärt werden. Ebenso könnte auch der leicht erhöhte Wert für die Quellung nach 24-stündiger Wasserlagerung damit zusammenhängen genauso wie die höhere Hydrophilie des Lignins gegenüber dem Phenolharz eine Erklärung wäre. Ebenso ist auch denkbar, dass Lignin eher wie ein Füllstoff wirkt und damit der Anteil an Phenolharz anteilig verringert ist. Insgesamt liegen die Quellwerte relativ hoch, da für diese Versuche kein Hydrophobierungsmittel verwendet worden ist.

Die Ergebnisse der entsprechend DIN EN 319 durchgeführten mechanischen Prüfung (Querzugfestigkeit bei 20 °C bzw. in kochendem Wasser - ehemalig V20 und V100-Bedingungen) sind im Abb. 3-78 veranschaulicht.

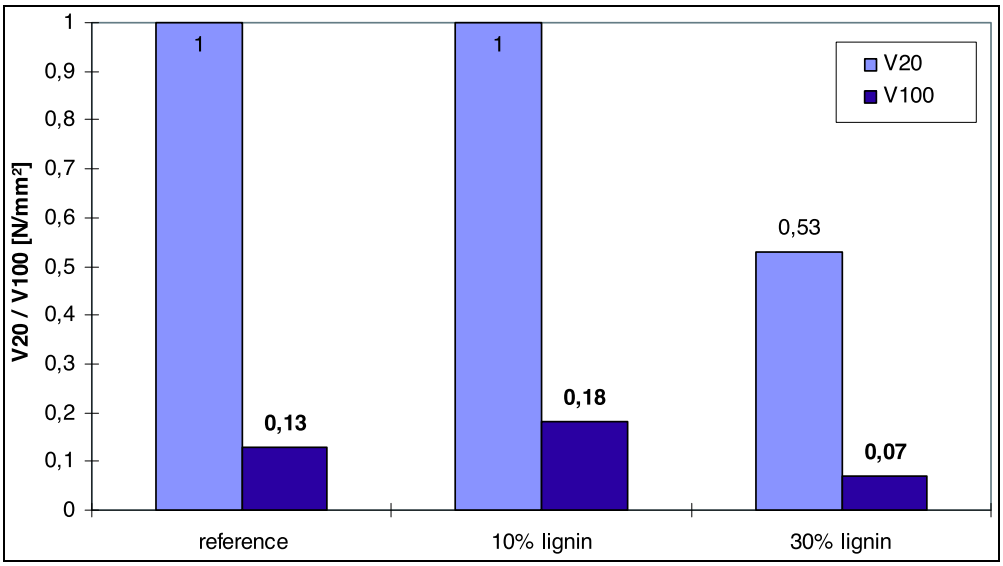


Abb. 3-78: Prüfergebnisse der Spanplatten nach DIN EN 319 (Querzugfestigkeit) (Quelle: Dynea)

Entsprechend der DIN EN 312 werden Spanplatten anhand dieser Prüfergebnisse bestimmten Eignungsklassen zugeordnet. Nach Beurteilung der V20 und V100-Werte (siehe Tab. 3-34) erfüllen alle hergestellten Platten die Anforderungen von P4, was bedeutet, dass sie für tragende Zwecke im Trockenbau geeignet sind. Die Prüfergebnisse der Platte mit 10% Lignin anstelle von Phenol im Bindemittel lassen sogar die höhere Einstufung P5 zu, was eine Eignung für tragende Zwecke auch im Feuchtbereich aus Sicht dieser Werte bedeutet.

So lassen diese ersten praxisrelevanten Labortests zur Herstellung von Spanplatten mit modifizierten Bindemitteln den Schluss zu, dass für die Herstellung der spezifischen Phenolharzbindemittel bis zu 30% der Phenolmenge durch Organosolv-Lignin aus dem Bioraffinerieprozess ersetzt werden kann.

[2] AsWood ™– Markenzeichen für Dynea-Bindemittel, mit denen emissionsarme Produkte hergestellt werden können, deren Emissionswerte denen von unbehandeltem natürlichen Holz entsprechen

Tab. 3-34: Gemäß DIN EN 312 erforderliche Werte der Querzugfestigkeiten (Quelle: Dynea)

Eignungsklasse	V20	V100
P4 – tragende Zwecke im Trockenbereich	> 0,35	nicht relevant
P5 – tragende Zwecke im Feuchtbereich	> 0,45	> 0,14

Mit diesen Bindemitteln können Spanplatten unter den üblichen Bedingungen hergestellt werden. Nach ersten Prüfungen sind die Platten für Einsatzzwecke mit mittleren bis höheren Anforderungen verwendbar. Inwieweit die deutlich dunklere Farbe der Bindemittel von Belang ist, kann erst nach Kontaktaufnahme zu potentiellen Kunden aus der Holzwerkstoffbranche entschieden werden.

AP3-3.2.6.3 Applikation Sperrholz

Abb. 3-79: Sperrholz (Quelle: Dynea)

Ligninmodifizierte Harze zur Herstellung von Sperrholzleimen wurden auf der Grundlage der Rezeptur des Dynea-Standardproduktes Prefere 14J175 synthetisiert, welches gleichzeitig als Referenz diente. Die Kennwerte der Harze mit je 10 % Substitution der Phenolmenge (Tab. 3-35a) stimmen relativ gut überein, wobei die Abweichungen sowohl innerhalb der normalen Synthese- und Analytiktoleranz liegen als auch auf nicht hinsichtlich des Ligningehaltes optimierte Rezepturen zurückzuführen sind. Der Vergleich der normierten Kennwerte ist in Abb. 3-80 dargestellt.

Erhöht man den Ligninanteil, durch den Phenol ersetzt wird, so verringert sich die real vorliegende Menge Phenol, was eine Veränderung des Molverhältnisses Phenol zu Formaldehyd bedeutet und damit eine Veränderung der Kondensationsbedingungen zur Folge hat. So wird möglicherweise nach der gleichen Reaktionszeit ein anderer Kondensationsgrad erreicht. Es können sich aber auch Kondensationsprodukte mit veränderten Strukturen herausbilden.

Die Kennwerte der Harze mit unterschiedlichem Ligninanteil sind in Tab. 3-35b, die normierten Werte befinden sich in Abb. 3-81. Deutliche Unterschiede zur Referenz und auch zu den mit weniger Lignin hergestellten Bindemitteln zeigen die Kennwerte des Ansatzes 22, bei dem 30 %

der Phenolmenge ersetzt worden sind. Besonders der hohe Anteil an freiem Formalin deutet auf deutliche Unterschiede im Reaktionsgeschehen während der Kondensation hin. So muss geschlussfolgert werden, dass die Reaktivität des Lignins gegenüber Formaldehyd keineswegs mit der des Phenols vergleichbar ist. Die hohe Viskosität des Harzes führt zu scheinbar schnellerer Härtung, was jedoch eher auf den Füllstoffcharakter des Lignins zurückzuführen ist.

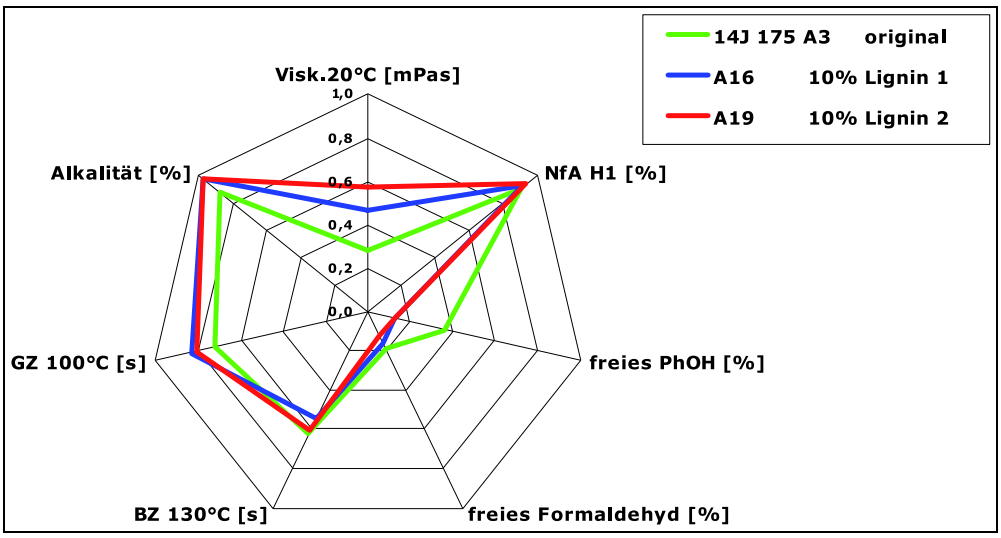


Abb. 3-80: Normierte Kennwerte für ligninmodifizierte Sperrholzbindemittel im Vergleich mit der Referenz (Quelle: Dynea)

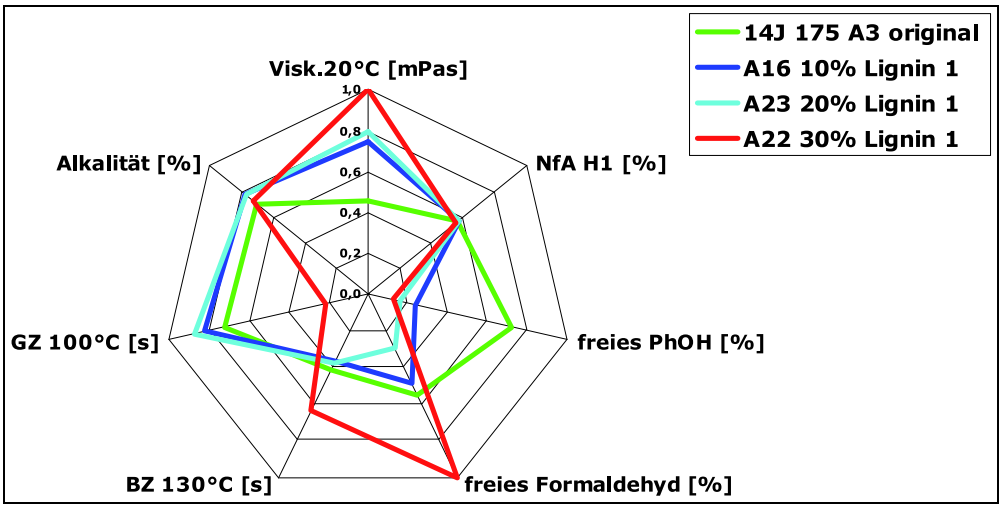


Abb. 3-81: Normierte Kennwerte für ein ligninmodifiziertes Sperrholzbindemittel im Vergleich mit der Referenz (Lignin 1) (Quelle: Dynea)

Tab. 3-35a: Versuchsansätze mit Harzkenndaten – Vergleich verschiedener Ligninfraktionen (Quelle: Dynea)

Ansatz	Substitution Phenol	Visk.20°C RS [mPas]	NfA-H1 [%]	PhOH [%]	CH_2O [%]	pH-Wert	WV 20°C	BZ 130°C [s]	GZ 100°C [s]	Alkalität [%]
A3	original	228	44,90	0,18	0,55	11,8	>1:20	62	2150	7,0
A16	10% Lignin 1	371	45,90	0,06	0,49	13,1	>1:20	54	2490	7,8
A19	10% Lignin 2	460	46,40	0,06	0,37	13,1	>1:20	60	2425	7,8

Tab. 3-35b: Versuchsansätze mit Harzkenndaten – Vergleich in Abhängigkeit vom Substitutionsgrad für Phenol (Lignin 1) (Quelle: Dynea)

Ansatz	Substitution Phenol	Visk.20°C RS [mPas]	NfA-H1 [%]	PhOH [%]	CH_2O [%]	pH-Wert	WV 20°C	BZ 130°C [s]	GZ 100°C [s]	Alkalität [%]
A3	original	228	44,90	0,18	0,55	11,8	>1:20	62	2150	7,0
A16	10% Lignin 1	371	45,90	0,06	0,49	13,1	>1:20	54	2490	7,8
A23	20% Lignin 1	396	45,90	0,04	0,30	13,1	>1:20	57	2635	7,7
A22	30% Lignin 1	20530	44,50	0,03	2,59	13,7	>1:20	95	635	7,2

Anhand der Darstellung in Abb. 3-82 kann noch einmal deutlich verfolgt werden, inwieweit sich die Substitution des Phenols durch Lignin auf den Gehalt an restlichen Monomeren im Harz auswirkt.

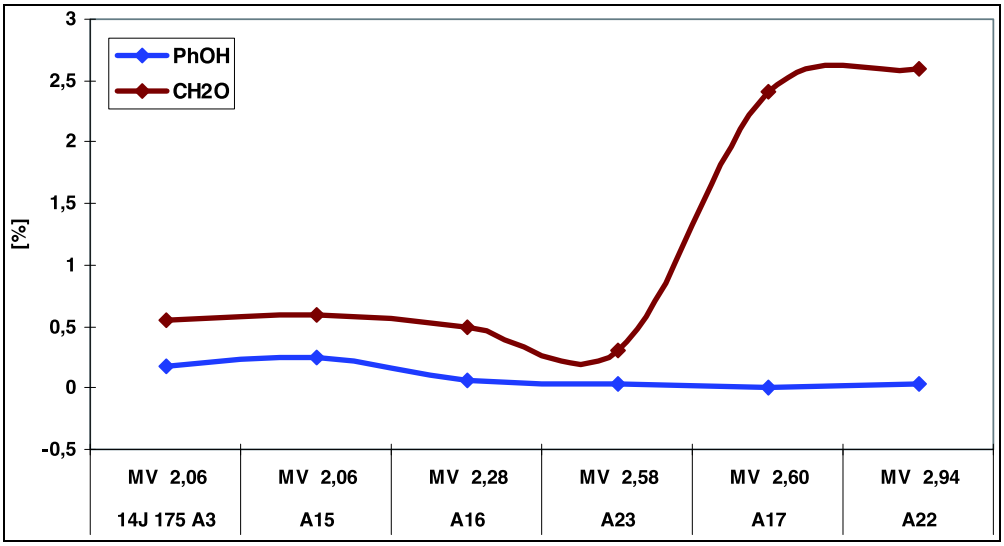


Abb. 3-82: Restmonomergehalt in Sperrholzbindemitteln in Abhängigkeit vom Molverhältnis Phenol/Formaldehyd (Quelle: Dynea)

Mit steigendem Substitutionsgrad des Phenols verschiebt sich das Molverhältnis zugunsten des Formaldehyds. Während sich im unmodifizierten Harz bzw. mit 9 % Lignin (niedrigeres Molverhältnis) noch freies Phenol nachweisen lässt, ist dieser Wert bei höherem Substitutionsgrad, bzw. bei Korrektur des Molverhältnisses durch einen höheren Anteil an Formaldehyd während der Synthese (höheres Molverhältnis) unterhalb der Nachweisgrenze.

Insbesondere bei den beiden höchsten Molverhältnissen (größter Überschuss an Formaldehyd) ist ein vergleichsweise drastisch erhöhter Wert für freies Aldehyd im Harz nachweisbar. Das bedeutet, dass der dort ersatzweise vorliegende Ligninanteil keineswegs mit einer vergleichbaren Reaktivität in die Synthese einbezogen ist (siehe bereits Abb. 3-80).

In der Tab. 3-36 sind die Werte aufgelistet. Die Ansätze 15 und 17 haben beide einen Ligninanteil von 9 % der Phenolmenge. Beim Ansatz 17 wurde aber das Molverhältnis durch Zugabe von mehr Formaldehyd verändert. Dieser Überschuss reagiert offenbar mit dem vorhandenen Phenol bis zum vollständigen Verbrauch und anschließend bleibt der Überschuss an Aldehyd bestehen. Das verdeutlicht, dass die Bindemittel Potential für Optimierungen bieten, was für eine tatsächliche technische Nutzung ausgeschöpft werden müsste.

Tab. 3-36: Versuchsansätze mit Harzkenndaten – Vergleich verschiedener Ligninfraktionen (Quelle: Dynea)

Ansatz	Molverhältnis	PhOH [%]	CH_2O [%]	Ligninanteil [%]
A3	MV 2,06	0,18	0,55	0
A15	MV 2,06	0,25	0,60	9
A16	MV 2,28	0,06	0,49	10
A23	MV 2,58	0,04	0,30	20
A17	MV 2,60	0,00	2,41	9*
A22	MV 2,94	0,03	2,59	30

* mit zusätzlichem Formaldehyd

In ABES-Tests wurden die Klebeigenschaften im Vergleich zur Referenz untersucht. Abb. 3-83 zeigt die Festigkeitsentwicklungen der Verklebungen mit Harzen unterschiedlicher Ligninfraktionen bei einem Substitutionsgrad von 10 %. Die Festigkeit der Referenzverklebung steigt schneller an, als bei dem unmodifizierten Bindemittel.

Der Einfluss des Lignins zeigt sich deutlich bei Veränderung des Substitutionsgrades, wie es in Abb. 3-84 dargestellt ist. Sowohl der Kurvenverlauf unterscheidet sich von dem der Referenz als auch das Niveau der gemessenen Festigkeit.

Die unter den Standardbedingungen erreichten Klebfestigkeiten sind aber für alle hier untersuchten Bindemittel auf einem ausreichend hohen Level und erlauben praxisrelevante weitere Tests. Für die Weiterführung der Untersuchungen mit ligninhaltigen Bindemitteln für Sperrholzleime wurden aufgrund der Syntheseergebnisse Harze mit Substitutionsgrad 5 bis 20 % verwendet.

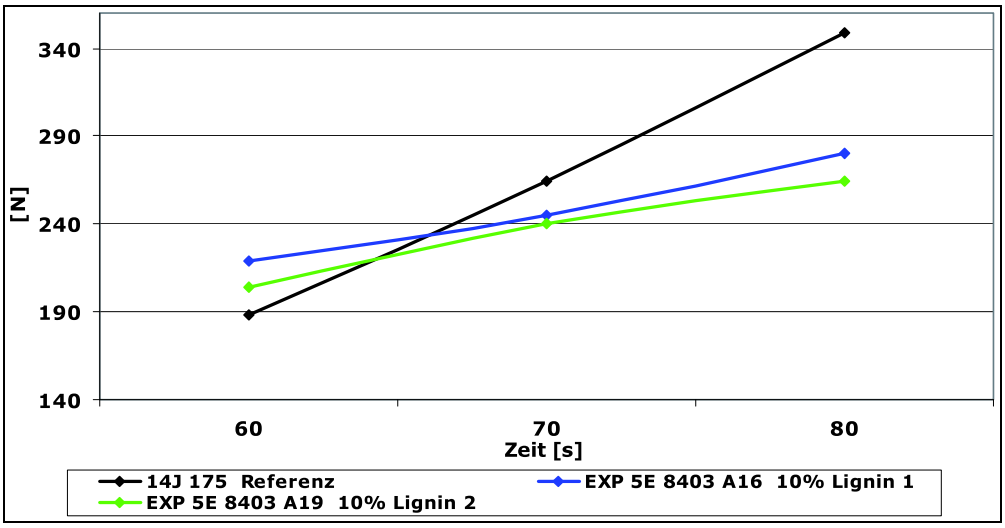


Abb. 3-83: ABES-Ergebnisse der modifizierten Sperrholzharze – unterschiedliche Ligninfraktionen (Quelle: Dynea)

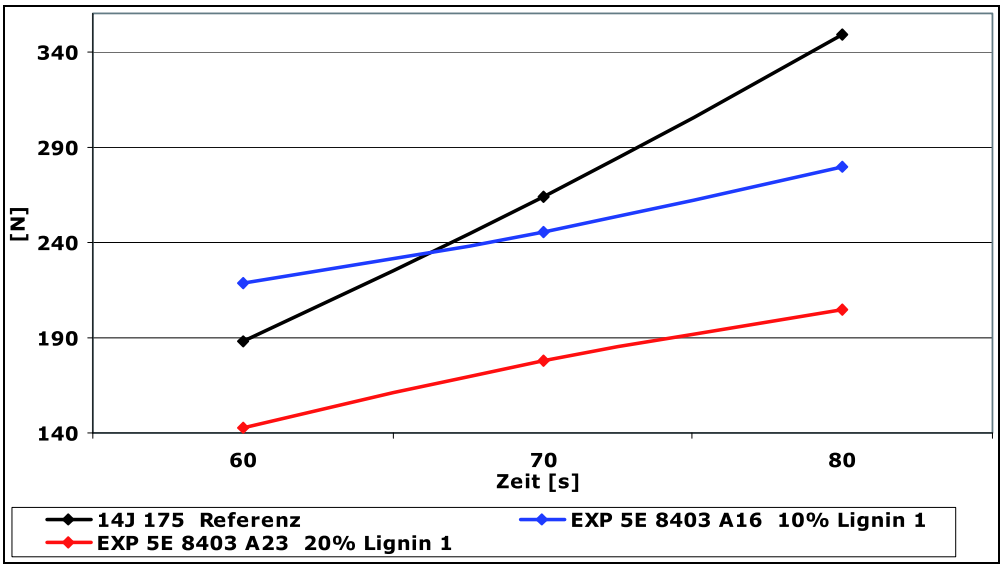


Abb. 3-84: ABES-Ergebnisse eines modifizierten Sperrholzharzes – unterschiedlicher Ligningehalt (Quelle: Dynea)

Die normierten Kennwerte sind in Abb. 3-85 dargestellt. Die Tab. 3-37 gibt einen Überblick über die zugrunde liegenden Analysendaten.

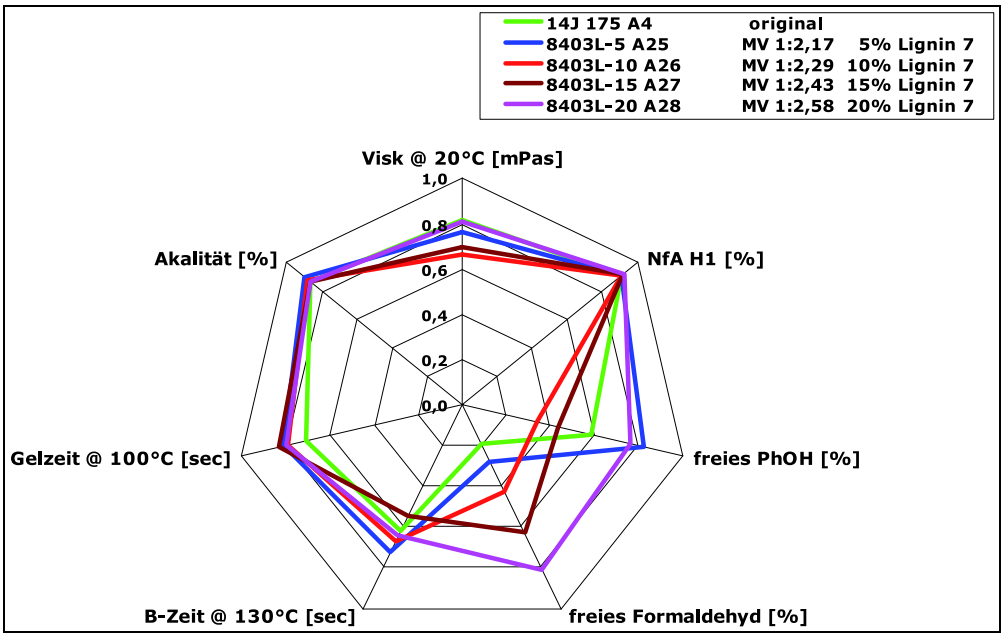


Abb. 3-85: Normierte Kennwerte für ligninmodifizierte Sperrholzharze im Vergleich mit der Referenz (Lignin 7) (Quelle: Dynea)

Tab. 3-37: Kennwerte der ligninmodifizierten Sperrholzharze (Lignin 7) (Quelle: Dynea)

	14J 175 A4 original	8403L-5 A25 MV 1:2,1 5% Lignin 7	8403L-10 A26 MV 1:2,29 10% Lignin 7	8403L-15 A27 MV 1:2,43 15% Lignin 7	8403L-20 A28 MV 1:2,58 20% Lignin 7
Visk @ 20°C [mPas]	245	228	199	208	242
NfA H1 [%]	45,00	45,47	45,30	45,63	46,00
freies PhOH [%]	0,29	0,41	0,17	0,22	0,38
freies Formaldehyd [%]	0,38	0,56	0,85	1,26	1,61
B-Zeit @ 130°C [sec]	62	72	67	54	64
Gelzeit @ 100°C [sec]	2120	2428	2360	2485	2380
Akalität [%]	6,90	7,16	6,98	6,91	6,88

An Bindemittel für die Herstellung von Sperrholzleimen werden hohe Anforderungen hinsichtlich der Wasser- bzw. Feuchtebeständigkeit gestellt. Daher wurden die ligninmodifizierten Harze einem Hydrolysetest unterzogen und die Ergebnisse mit denen der Referenz verglichen.

Für diesen Versuch werden ca. 3 g des Resols in Aubachschalen gleichmäßig verteilt und innerhalb von 30 Minuten bei 135 °C im Trockenschrank gehärtet. Das gehärtete Harz wird nach dem Erkalten im Mörser zerkleinert und die exakt bestimmte Menge in 50 g destilliertes Wasser gegeben. Nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur, bzw. nach 2-stündiger Kochbelastung wird der Feststoff filtriert, bei 120 °C getrocknet und nach Erreichen der Massekonstanz zurückgewogen.

In Abb. 3-86 sind die ermittelten Restmassen nach Lagerung im kalten bzw. im kochenden Wasser veranschaulicht. Es zeigt sich eine geringe Abnahme der Hydrolysebeständigkeit bei Raumtem-

peratur, die mit steigendem Substitutionsgrad zunimmt. Die Hydrolysebeständigkeit nach Kochbelastung nimmt in unterschiedlichem Ausmaß ab, was an dieser Stelle nicht weiter diskutiert werden soll, da diese Ergebnisse vor der Herstellung und Ausprüfung von Sperrholzplatten eher informativ sind.

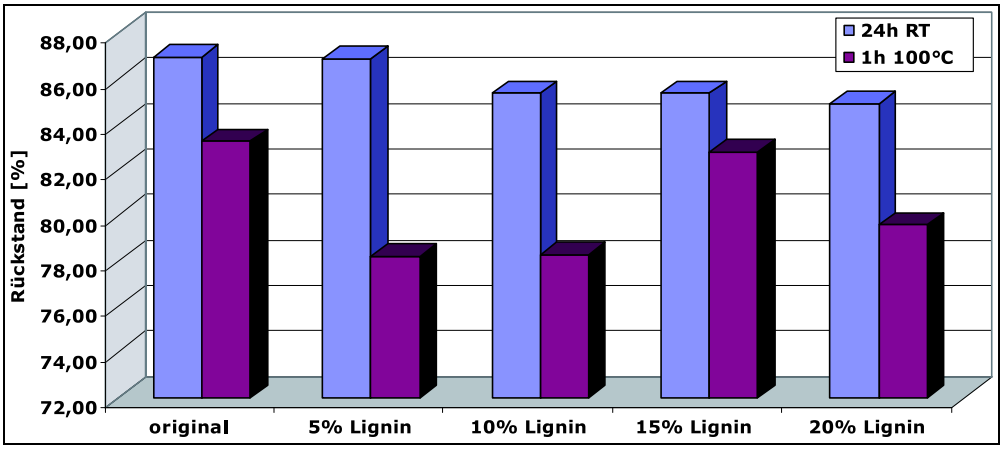


Abb. 3-86: Ergebnisse der Hydrolysetests von ligninmodifizierten Bindemitteln für die Sperrholzherstellung (Quelle: Dynea)

Die Harze mit 5 % und 15 % Lignin anstelle des Phenols wurden zur Herstellung von Sperrhölzern im Labormaßstab verwendet. Unter praxisrelevanten Bedingungen wurden diese Versuche am Institut für Holztechnik Dresden (IHD) durchgeführt. Die Sperrholzleime wurden nach Rezepturen (Tab. 3-38) des finnischen Dynea-Standortes Hamina angerührt und den üblichen Prüfungen unterzogen.

Tab. 3-38: Rezeptur der Sperrholzleime (Quelle: Dynea)

Harz (ligninmodifiziert, bzw. Referenz)	1000 Teile
Härter und Extender (Prefere 24J 686)	144 Teile
Wasser	95 Teile

Die Entwicklung der Viskosität während des Reifeprozesses wurde bei 20 °C sowie bei 25 °C über mehrere Stunden verfolgt (Abb. 3-87 und Abb. 3-88).

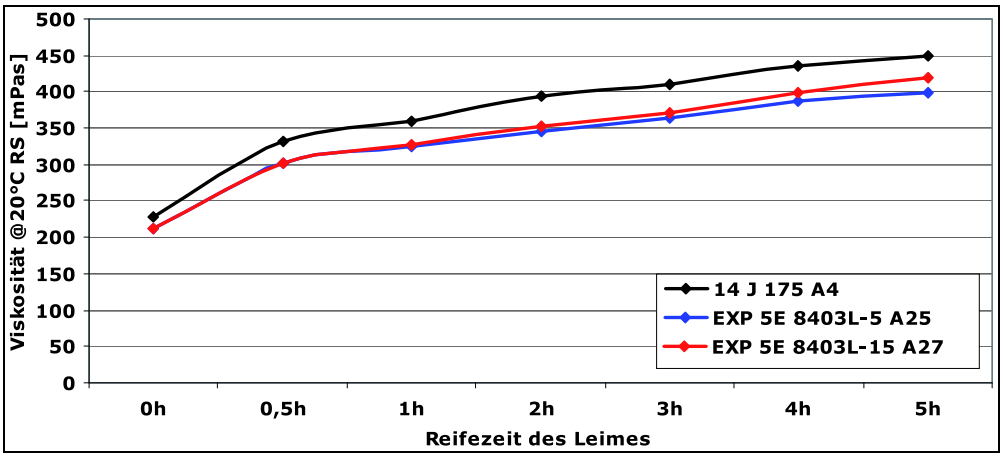


Abb. 3-87: Viskosität der Sperrholzleime während der Reifezeit (bei 20°C) (Quelle: Dynea)

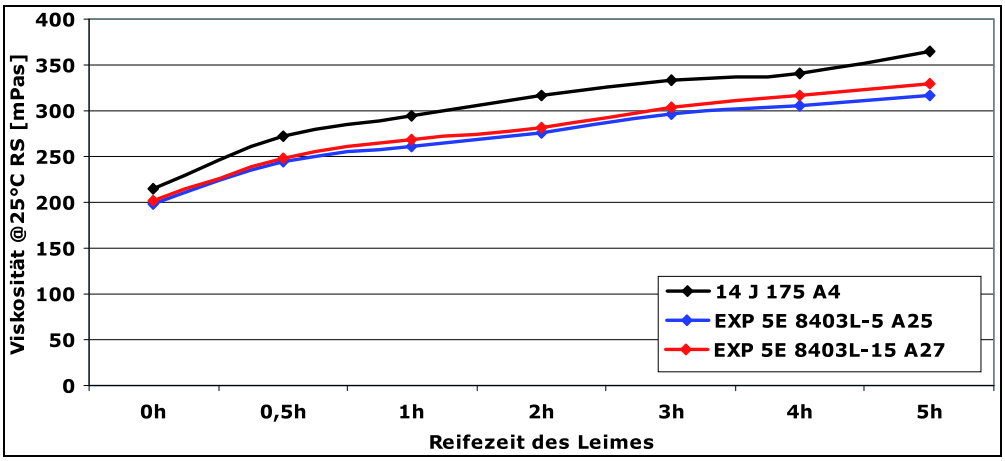


Abb. 3-88: Viskosität der Sperrholzleime während der Reifezeit (bei 25°C) (Quelle: Dynea)

Zur Beurteilung der Klebeigenschaften auf Holz wurden ABES-Tests mit den fertigen Leimen nach Abschluss der Reifezeit bei 110 °C und auch bei 130 °C durchgeführt (Abb. 3-89)

Während bei 110°C der Leim mit dem höchsten Anteil an Lignin bereits nach 60 s Klebzeit höhere Festigkeitswerte als die unmodifizierte Referenz aufweist, ist dieser Effekt bei 130 °C eher gegenteilig. Die Festigkeitswerte bei 130 °C liegen jedoch so hoch, dass die Grenze der Gerätebelastung erreicht ist und die Differenzierung zwar für wissenschaftliche Interpretationen interessant ist, für die praktische Anwendung der Leime jedoch ohne Belang sein dürfte. Das Festigkeitsniveau der Leime bei 110 °C ist für eine Verarbeitung nach den üblichen industriellen Gepflogenheiten ausreichend, zumal kein Anhaltspunkt für eine Verschlechterung der Ergebnisse durch die Modifizierung der Harze mit Lignin besteht.

Nach einer Reifezeit von 2 h wurden die Leime im Handverfahren mittels eines Rakels auf die Birkenfurniere aufgetragen. Fünf Lagen der gleichmäßig beleimten Veneers wurden dann um je 90 ° versetzt, schichtweise aufeinander gestapelt und in einer beheizten Presse zu Sperrholz verarbeitet. Die Parameter sind in Tab. 3-39 zusammengefasst.

Die Herstellung der Sperrholzplatten (60 × 40 cm) war mit allen Leimvarianten ohne Beeinträchtigungen möglich. Es konnte kein Unterschied zwischen ligninhaltigen Leimen und der Referenz festgestellt werden. Selbst die Farbe der Leimfugen war sehr ähnlich (siehe Abb. 3-90).

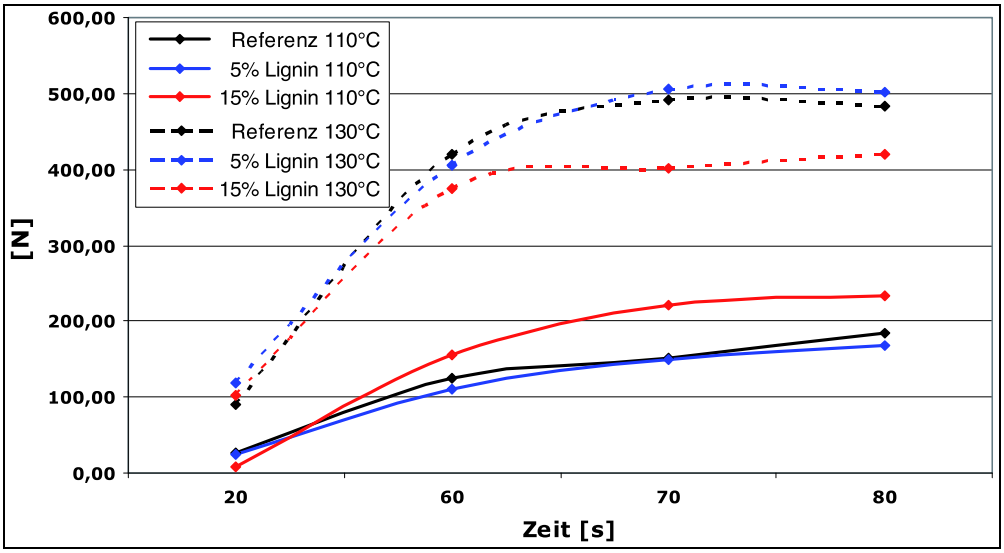


Abb. 3-89: ABES-Ergebnisse der modifizierten Sperrholzharze bei 110 °C und 130 °C (Quelle: Dynea)

Tab. 3-39: Parameter zur Herstellung von Sperrholz (IHD) (Quelle: Dynea)

Furniere	Birke, 1,5 mm
Anzahl der Lagen	5
Temperatur bei Beleimung	20 – 25 °C
Leimauftrag mittels Rakel	155 g/m^2
Temperatur der Presse	128 °C
Presszeit	9 min
Pressdruck	1,2 Mpa (12 bar)
Parallelversuche	2

Abb. 3-90: Profile der Sperrholzplatten (676-Referenz, 677-5 % Lignin, 678-15 % Lignin) (Quelle: Dynea)

Die Platten wurden am IHD den standardgemäßen mechanischen Prüfungen unterzogen. Es wurden die Längszugscherfestigkeiten nach DIN EN 314 nach Lagerung in kaltem und heißem Wasser bestimmt. Aus je 10 Messungen an der oberen und auch an der unteren Klebefuge wurden die Mittelwerte gebildet und in Abb. 3-91 veranschaulicht.

Die Werte zeigen ein mindestens gleiches Eigenschaftsbild für alle Platten. Für die mit 5 % Lignin anstelle Phenols im Bindemittel wurden etwas höhere Scherfestigkeiten sowohl bei Kaltwasserlagerung als auch nach Kochbeanspruchung gemessen.

Anhand des Rissbildes wird der Holzfehler beurteilt. Ein hoher Holzfehler wird angestrebt, da das ein Gütemerkmal für die Klebverbindung darstellt. Die Ergebnisse dieser Prüfungen befinden sich in Tab. 3-40.

Tab. 3-40: Ergebnisse der mechanischen Prüfungen nach DIN EN 314 der ligninmodifizierten Sperrholzplatten (IHD) (Quelle: Dynea)

Bezeichnung	**676**		**677**		**678**	
Bindemittel	**Referenz**		**mit 5% Lignin**		**mit 15% Lignin**	
Lagerung bei	**24°C**	**100°C**	**24°C**	**100°C**	**24°C**	**100°C**
Längszugscherfestigkeit* [N/mm²]	1,79	1,45	2,10	1,54	1,76	1,52
Holzfehler [% obere/untere Schicht]	30/0	60/20	90/80	80/5	90/10	80/0

* Mittelwert aus 20 Wiederholungen

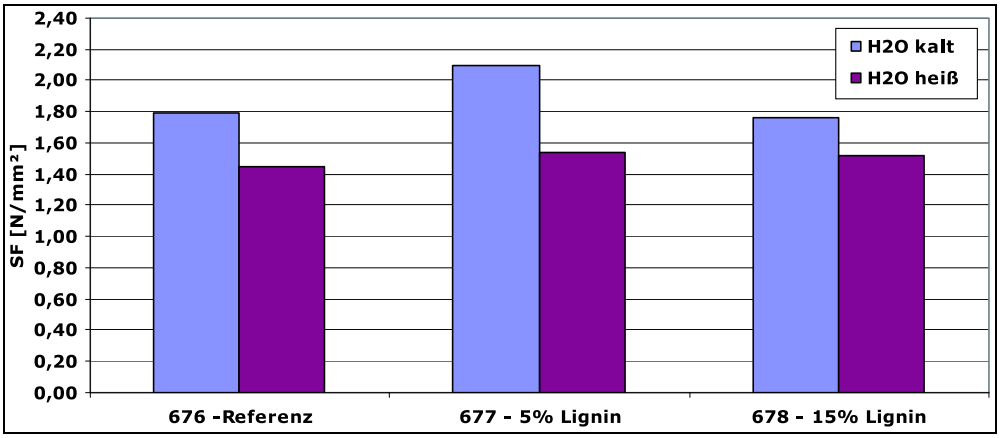


Abb. 3-91: Sperrholzprüfung – Mechanische Kennwerte nach DIN EN 314 – Längszugscherfestigkeiten (Quelle: Dynea)

Die unterschiedlichen Werte für die Beurteilung der oberen und unteren Klebefuge sind auf die inhomogene Wärmeverteilung in der Presse zurückzuführen. Nur die untere Platte ist beheizt und so ergab sich ein Gradient für die Temperatur/Zeit-Kurven der einzelnen Furnierlagen und damit ein unterschiedlicher Aushärtegrad der Schichten. Betrachtet man aus diesem Grund nur Ergebnisse der unteren Schicht, die offenbar unter den verwendeten Parametern ausreichend ausgehärtet ist, so erreichen die Sperrhölzer mit den ligninmodifizierten Bindemitteln sogar bessere Ergebnisse als die Referenz. Das bedeutet auch, dass die etwas schlechtere Hydrolysestabilität hier keinen Einfluss mehr ausübt (siehe oben Abb. 3-86).

Biegefestigkeiten sowie die Zug-E-Moduli wurden nach DIN EN 310 in 0° bzw. 90° zur Faserrichtung an je 2 Prüfkörpern bestimmt (Tab. 3-41). Die Ergebnisse werden in Abb. 3-92 gezeigt. Auch diese Ergebnisse zeigen mindestens gleiche Eigenschaften für alle verwendeten Leimvarianten. Die mit ligninhaltigen Bindemitteln hergestellten Platten wiesen eher leicht verbesserte Festigkeiten auf.

Tab. 3-41: Ergebnisse der mechanischen Prüfungen nach DIN EN 310 der ligninmodifizierten Sperrholzplatten (lHD) (Quelle: Dynea)

Bezeichnung	Winkel zur Faserrichtung	Biegefestigkeit	E -Modul
676 Referenz	0°	91,55	10.567
	90°	56,18	4.231
677 mit 5% Lignin	0°	105,75	11.100
	90°	62,95	4.623
678 mit 15% Lignin	0°	102,35	12.050
	90°	61,10	4.498

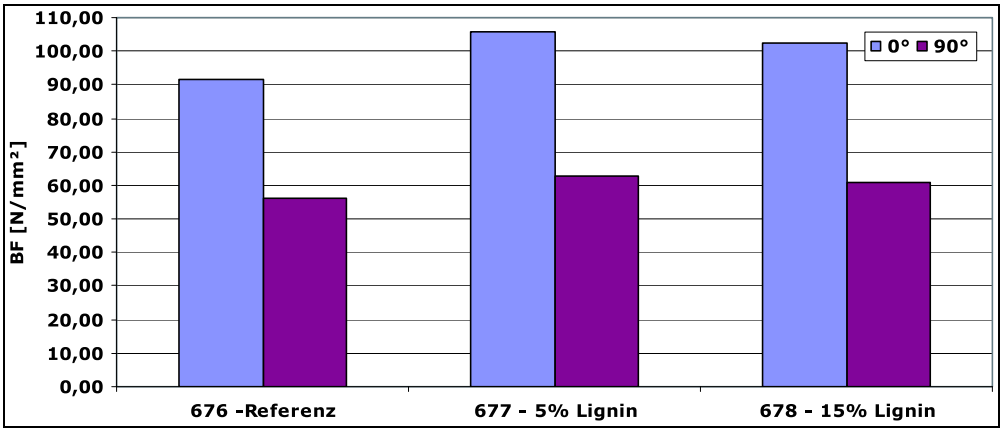


Abb. 3-92: Sperrholzprüfung – Mechanische Kennwerte nach DIN EN 310 – Biegefestigkeiten (Quelle: Dynea)

Vergleichbare Aussagen liefern auch die Ergebnisse für die Zug-E-Moduli. Mit steigendem Ligninanteil wurden insbesondere für die Moduli in Faserrichtung ebenfalls steigende Werte festgestellt (Abb. 3-93).

Nach den vorliegenden Ergebnisse dieser ersten Testreihe erscheint aus derzeitiger Sicht ein Einsatz von ligninmodifizierten Sperrholzharzen durchaus vorstellbar zu sein. Die Ergebnisse der Werkstoffprüfung sind viel versprechend und die dunklere Farbe ist im Endprodukt nur noch schwer wieder zu finden.

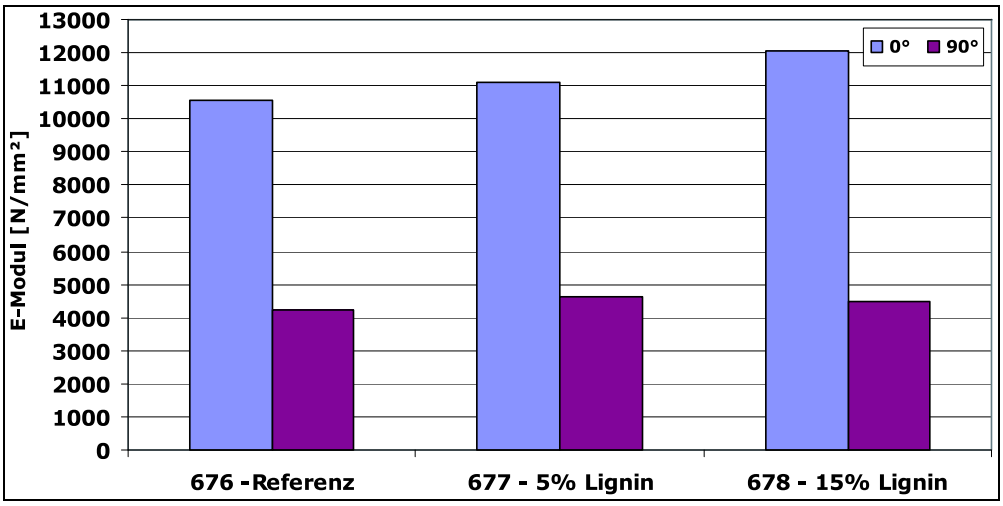


Abb. 3-93: Sperrholzprüfung – Mechanische Kennwerte nach DIN EN 310 – Zug-E-Moduli (Quelle: Dynea)

AP3-3.2.6.4 Zusammenfassung der Versuchsergebnisse für Holzwerkstoffapplikationen

Für alle untersuchten Anwendungsgebiete aus dem Holzwerkstoffsektor ergeben sich positive Erfahrungen zur Verwendung von Lignin als Ersatz von Phenol während der Resolsynthese. Besonders die Ergebnisse der anwendungsnahen Labortests für Spanplatten und auch für Sperrholz haben gezeigt, dass der Anspruch, mindestens gleichwertige, wenn nicht sogar qualitativ verbesserte Harze und vor allem daraus hergestellte Endprodukte herstellen zu können, erfüllbar ist.

Aus technischer Sicht können die durchgeführten Arbeiten als Grundlage für teilweise notwendige Optimierungen der Rezepturen genutzt werden. Weitere applikationsbezogene Labor- aber auch Industrieversuche wären nötig, um modifizierte Produkte in solider und konstanter Qualität in den Markt einzuführen.

AP3-3.2.7 Technische Applikationen

Es wurde neben den Erprobungen auf dem Holzwerkstoffsektor auch untersucht, inwieweit die partielle Substitution des Phenols durch Organosolv-Lignin aus dem Bioraffinerieprozess für Phenolharze in technischen Applikationen anwendbar ist.

- Es ist möglich, Novolake mit Lignin zu synthetisieren, jedoch fehlte für weitere Tests ein konkreter Hintergrund.
- Für Harze, die im Gießereisektor eingesetzt werden, genauso wie in Bindemitteln zur Mineralwolleherstellung, schlugen die Versuche fehl. Es ergaben sich für die Harze, in denen ein niedriger Kondensationsgrad nötig ist, verschiedene Löslichkeitsprobleme. Hier scheint die Molekülmasse des Lignins zu groß zu sein, um homogene Bindemittel herstellen zu können.
- Gute Ergebnisse ergaben sich bei Versuchen, die am finnischen Dynea-Standort Kitee zur Herstellung von Oberflächenfilmen durchgeführt wurden, bei denen oftmals die dunkle Farbe des Lignins willkommen ist.

AP3-3.2.8 Zusammenfassung

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass alle bisher untersuchten Ligninfraktionen –unabhängig von den Bedingungen ihrer Gewinnung aus dem Bioraffinerieprozess – als Rohstoff für die Kondensation von Phenolharzen für Holzwerkstoffapplikationen prinzipiell geeignet sind.

Das Organosolv-Lignin aus diesem Prozess kann daher aus Sicht der Synthese als auch nach den Ergebnissen der ersten anwendungstechnischen Laborprüfungen als partieller Phenolersatz in diesen Bindemitteln verwendet werden.

Es konnten bis zu 30 % (je nach Harztyp auch bis zu 50 %) der Phenolmenge ersetzt werden. Dabei ist die Farbe der modifizierten Harze extrem dunkel, was möglicherweise zu Einschränkungen in bestimmten Anwendungen führen könnte.

Für die Verwendung als Rohstoff auch in anderen Applikationen der Phenolharze wie Feuerfestharze oder Bindemittel für den Reibbelagsektor gibt es Potential, das noch erschlossen werden müsste.

In einigen speziellen Anwendungen wie dem Glaswollebereich oder den Gießereiharzen sind die derzeit untersuchten Ligninfraktionen nicht ohne weitere Verringerung der Molekülgröße, bzw. chemische Funktionalisierung anwendbar.

Die bei den Untersuchungen erzielten Resultate dienen als grundlegende Orientierung. Für konkrete technische Nutzung der modifizierten Bindemittel bei Phenolharzverarbeitern müssen gezielt Eigenschaften, vor allem das Härtungs/Zeit-Fenster aber auch verarbeitungsrelevante Eigenschaften wie z.B. Viskosität und deren Stabilität optimiert werden.

Neben dem prinzipiellen Interesse von Phenolharzkunden an modifizierten Harzen ist deren Bereitschaft zu Industrieversuchen nötig.

Die Ergebnisse solcher Versuche entscheiden letztendlich neben einer akzeptablen Preisgestaltung und einer dauerhaften Verfügbarkeit dieses natürlichen nachwachsenden Rohstoffes in ausreichender und konstanter Qualität ob es zu einer tatsächlichen Nutzung des Lignins in Duromeren kommen wird.

AP3-3.3 Anwendungstechnische Untersuchungen der Ligninfraktion mit ionischen Flüssigkeiten (Uni Erlangen)

Zur Depolymerisation des Lignins in monomere Komponenten wurden Hydrierungsversuche und Versuche zur oxidativen Spaltung unternommen, die im Folgenden beschrieben werden.

AP3-3.3.1 Hydrierungsversuche zur Spaltung von Lignin

Vom ICT erhaltenes Lignin wurde in EMIM-OAc bzw. BMIM-$FeCl_4$ gelöst und bei 80 bar / 100 °C mit Ru/C hydriert. Die Versuche mit BMIM-$FeCl_4$ führten zu keiner Depolymerisation des Lignins sondern eher zu einer weiteren Polymerisation, so dass teerartige Produkte erhalten wurden. Die Hydrierung in EMIM-OAc führte zumindest teilweise zu einer Depolymerisation; es wurden verschiedene phenolische Komponenten erhalten.

AP3-3.3.2 Screeningversuche zur oxidativen Spaltung von Lignin

Um einen geeigneten Katalysator und eine ionische Flüssigkeit für die oxidative Spaltung von Lignin zu finden, wurde zu Beginn dieser Arbeit ein Screening durchgeführt. Es wurden pro Screening 10 Proben einer 10 %igen Ligninlösung in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten mit unterschiedlichen Katalysatoren angesetzt. Dazu wurden jeweils in einem 10-ml-GC-Gläschen 250 mg Lignin in 2.5 g ionischer Flüssigkeit gelöst und mit 20 Gew-% (bezogen auf Lignin) Katalysator versetzt. Das GC-Gläschen wurde anschließend mit einem Aluminiumdeckel mit Septum verschlossen.

Zur Durchführung des Screenings wurde eine 10-fach-Batchanlage (Abb. 3-94) mit zehn 21-ml-Autoklaven verwendet. Die Autoklaven befinden sich in einem Heizblock, unter dem ein 10-fach-Magnetrührer angebracht ist. Der Heizblock ist an einen Temperaturregler angeschlossen. Diese Anordnung gewährleistet, dass in jedem einzelnen Autoklaven die gleiche Temperatur und Rührgeschwindigkeit herrscht.

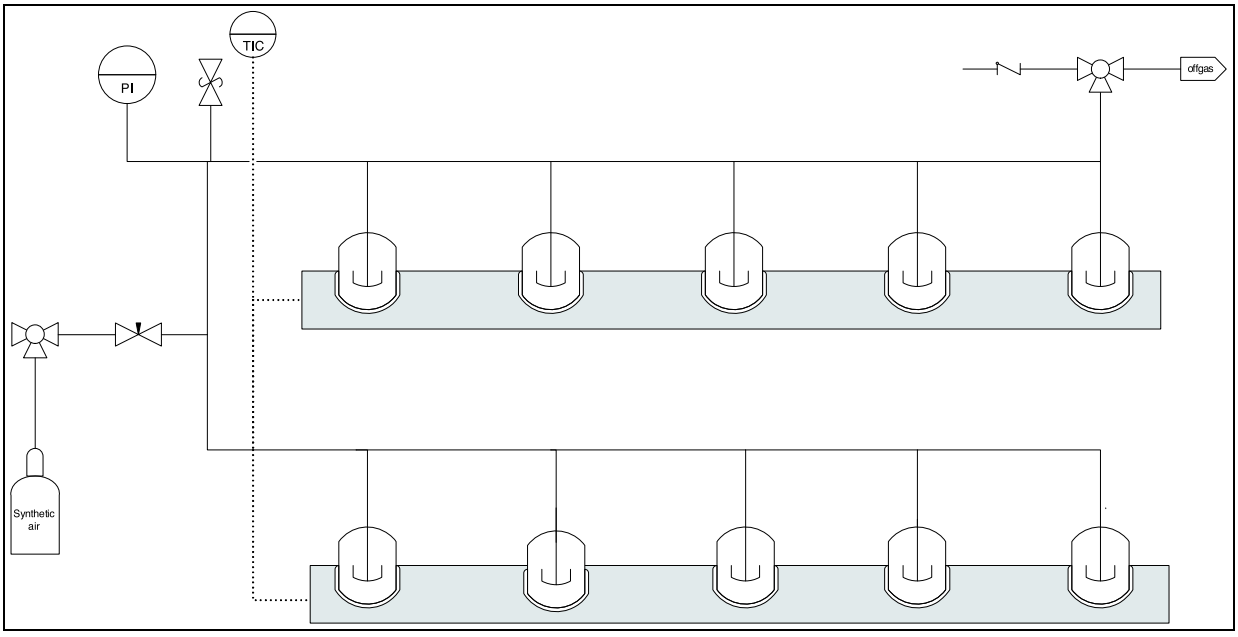


Abb. 3-94: Fließbild des 10-Fach-Batch-Reaktors (Quelle: Uni Erlangen)

Jeder Autoklav wurde mit einem Probengläschen versehen und fest zugeschraubt. Der Rührer wurde auf Position 6 gestellt und die Anlage auf 100 °C hochgeheizt. Der Druck in der Anlage wurde auf 80 bar eingestellt. Die Versuche im Screening wurden Semi-Batch gefahren, das heißt, der Gaseinlass wurde während der Reaktion nicht geschlossen, damit bei der Reaktion verbrauchter Sauerstoff nachgeliefert werden konnte. Die Reaktionsdauer in allen vier durchgeführten Screenings betrug 17 h. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde davon ausgegangen, dass durch die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches ein geringer Fehler bei der Bestimmung des Rest-Lignins auftrat. Dieser Fehler wurde durch einen Ligninverlust während der Aufarbeitung verursacht. Der Verlust wird auf maximal 10 mg Lignin geschätzt. Dies entspricht einer Schwankung des berechneten Ligninumsatzes von maximal + 4 %.

Im <u>ersten Screening</u> sollten verschiedene ionische Flüssigkeiten in Verbindung mit zwei Katalysatoren untersucht werden (Tab. 3-42). Dazu wurden die ionischen Flüssigkeiten [EMIM][$EtSO_4$], [EMIM][OTf], [BMIM][Cl], [EMIM][OTos], [EMIM][NTf_2] und als Katalysatoren CuSO4 und $Mn(NO_3)_2$ getestet.

Tab. 3-42 Screening 1: Umsatz von Lignin in IL mit Katalysatoren (Quelle: Uni Erlangen)

IL	Kata-lysator*	Masse IL	Masse Kat	Masse Lignin	Rest-Lignin	Masse Produkt	Lignin-umsatz	
		[g]	[mg]	[mg]	[mg]	[mg]	[%]	[mg]
[EMIM][$EtSO_4$]								
KS1-Cu	$CuSO_4$	2,5	50,0	250,0	188,5	87,3	24,5	61,5
KS1-Mn	$Mn(NO_3)_2$	2,5	50,0	250,0	155,0	51,1	38,0	95,0
[EMIM][OTf]								
KS2-Cu	$CuSO_4$	2,5	50,0	250,0	159,7	86,8	36,1	90,3
KS2-Mn	$Mn(NO_3)_2$	2,5	50,0	250,0	147,4	107,6	41,0	102,6
[BMIM][Cl]								
KS3-Cu	$CuSO_4$	2,5	50,0	250,0	179,4	90,3	28,2	70,6
KS3-Mn	$Mn(NO_3)_2$	2,5	50,0	250,0	167,5	45,7	33,0	82,5
[EMIM][OTos]								
KS4-Cu	$CuSO_4$	2,5	50,0	250,0	-	-	-	-
KS4-Mn	$Mn(NO_3)_2$	2,5	50,0	250,0	186,1	39,3	25,6	63,9
[EMIM][NTf_2]								
KS6-Cu	$CuSO_4$	2,5	50,0	250,0	-	-	-	-
KS6-Mn	$Mn(NO_3)_2$	2,5	50,0	250,0	-	-	-	-

* Das verwendete $Mn(NO_3)_2 \times H_2O$ liegt als Tetra-, Penta- oder Hexahydrat vor und wird mit $Mn(NO_3)_2$ abgekürzt.

Bei den Proben [EMIM][NTf_2] / $Mn(NO_3)_2$ und [EMIM][NTf_2] / $CuSO_4$ erwies sich die Aufarbeitung als schwierig und sie wurde daher abgebrochen. Der Grund dafür ist, dass [EMIM][NTf_2] nicht wasserlöslich ist und somit einerseits vom gefällten Lignin nicht vollständig abgetrennt werden konnte und andererseits mit dem Filtrat ein Zweiphasengemisch gebildet wurde. Der Deckel der Probe [EMIM][OTos] / $CuSO_4$ wurde beim Einschrauben in den Autoklaven nicht durchstochen; dadurch war die Probe nicht auf die gewünschte Weise dem Oxidationsmittel ausgesetzt. Da in der ionischen Flüssigkeit [EMIM][OTos] mit $Mn(NO_3)_2$ ein schlechterer Umsatz erreicht wurde als in den anderen getesteten ionischen Flüssigkeiten, wurde die Untersuchung des Systems [EMIM][OTos] / $CuSO_4$ nicht wiederholt.

Im zweiten Screening wurden die ionischen Flüssigkeiten AMMOENG 111, [BMIM][$FeCl_4$], [MMIM][Me_2PO_4], [EMIM][Oc-SO4], AMMOENG 110 den gleichen Katalysatoren wie im ersten Screening ($CuSO_4$ und $Mn(NO_3)_2$) getestet (Tab. 3-43). Anhand der Ergebnisse des ersten Screenings wurde ein besserer Umsatz der Systeme mit $Mn(NO_3)_2$ als Katalysator erwartet.

Tab. 3-43 Screening 2: Umsatz von Lignin in IL mit Katalysatoren (Quelle: Uni Erlangen)

IL	Kata-lysator*	Masse IL	Masse Kat	Masse Lignin	Rest-Lignin	Masse Produkt	Lignin-umsatz	
		[g]	[mg]	[mg]	[mg]	[mg]	[%]	[mg]
AMMOENG 111								
KS5-Cu	$CuSO_4$	2,5	50,0	250,0	-	-	-	-
KS5-Mn	$Mn(NO_3)_2$	2,5	50,0	250,0	-	-	-	-
[BMIM][$FeCl_4$]								
KS7-Fe	$FeCl_4$	2,5	50,0	250,0	-	-	-	-
[MMIM][Me_2PO_4]								
KS9-Cu	$CuSO_4$	2,5	50,0	250,0	214,1	69,2	14,5	35,9
KS9-Mn	$Mn(NO_3)_2$	2,5	50,0	250,0	188,5	40,3	24,5	61,5
[EMIM][Oc-SO_4]								
KS10-Cu	$CuSO_4$	2,5	50,0	250,0	-	-	-	-
KS10-Mn	$Mn(NO_3)_2$	2,5	50,0	250,0	-	-	-	-
AMMOENG 110								
KS11-Cu	$CuSO_4$	2,5	50,0	250,0	169,1	390,0	-	-
KS11-Mn	$Mn(NO_3)_2$	2,5	50,0	250,0	181,6	463,7	-	-

* Das verwendete $Mn(NO_3)_2 \times H_2O$ liegt als Tetra-, Penta- oder Hexahydrat vor und wird mit $Mn(NO_3)_2$ abgekürzt.

Alle Proben aus dem zweiten Screening, außer [MMIM][Me_2PO_4] / $CuSO_4$, [MMIM][Me_2PO_4] / $Mn(NO_3)_2$, AMMOENG 110 / $CuSO_4$ und AMMOENG 110 / $Mn(NO_3)_2$ konnten nicht vollständig aufgearbeitet werden.

- Bei [BMIM][$FeCl_4$] / $FeCl_4$, [EMIM][Oc-SO_4] / $CuSO_4$ und [EMIM][Oc-SO_4] / $Mn(NO_3)_2$ erwies sich das Abfiltrieren des gefällten Lignins auch nach dreimaliger Wiederholung als unmöglich, da das Lignin stets durch den Filter in das Filtrat lief.
- Bei den Proben AMMOENG 111 / $CuSO_4$ und AMMOENG 111 / $Mn(NO_3)_2$ trat beim Versetzen des Filtrats mit konz. H_2SO_4 eine weiße Trübung auf. Beim Extrahieren mit DCM fiel ein weißer, gallertartiger Niederschlag in der DCM-Phase aus.
- AMMOENG 110 / CuSO4 und AMMOENG 110 / $Mn(NO_3)_2$ ergaben zu viel Produkt. Dies lässt darauf schließen, dass bei der Aufarbeitung das Produkt nicht vollständig von anderen Bestandteilen getrennt wurde.

Der Sinn dieses Screenings lag darin, ein System zu finden, das gute Umsätze liefert und das sich in der geplanten Weise einfach aufarbeiten lässt. Daher wurden keine weiteren Versuche unternommen, die genannten Proben aufzuarbeiten.

Das <u>dritte Screening</u> beschränkte sich auf die Untersuchung von vier ionischen Flüssigkeiten und drei Katalysatoren (Tab. 3-44).

Hier wurden aufgrund der guten Umsätze, die [EMIM][OTf] und $Mn(NO_3)_2$ im ersten Screening lieferten, die ähnliche aber preiswertere ionische Flüssigkeit [EMIM][$MeSO_3$] und ein weiteres Mn-Salz $MnCl_2 \times 4H_2O$ getestet. Außerdem wurde ein Fe-Katalysator $Fe_2(SO_4)_3 \times H_2O$ und der

Einfluss der Katalysatormenge auf den Umsatz anhand des Systems [EMIM][OTf] / $Mn(NO_3)_2$, untersucht. Darüber hinaus sollte eine Probe, die eine 14 %ige Ligninlösung enthielt, zeigen, ob eine Erhöhung der Ligninmenge, ohne Reduktion der IL-Menge, einen Einfluss auf den Umsatz hat. Leider ist bei diesem Versuch der Druck in der Anlage durch eine Undichtigkeit über Nacht auf 74 bar abgefallen. Damit sind die erhaltenen Ergebnisse nicht vollständig mit den ersten beiden Screenings vergleichbar.

Tab. 3-44 Screening 3: Umsatz von Lignin in IL mit Katalysatoren (Quelle: Uni Erlangen)

IL	Katalysator*	Masse IL	Masse Kat	Masse Lignin	Rest-Lignin	Masse Produkt	Lignin-umsatz	
		[g]	[mg]	[mg]	[mg]	[mg]	[%]	[mg]
[EMIM][$MeSO_3$]								
KS12-MnCl	$MnCl_2 \times 4H_2O$	2,5	50,0	250,0	182,4	31,7	27,0	67,6
KS12-Mn	$Mn(NO_3)_2$	2,5	50,0	250,0	174,7	33,2	30,1	75,3
KS12-Fe	$Fe_2(SO_4)_3 \times H_2O$	2,5	50,0	250,0	179,7	62,2	28,1	70,3
[EMIM][OTf]								
KS13-Mn1	$Mn(NO_3)_2$	2,5	25,0	250,0	181,9	52,5	27,2	68,1
KS13-Mn2	$Mn(NO_3)_2$	2,5	15,0	250,0	197,3	76,3	21,1	52,7
KS13-Mn3	$Mn(NO_3)_2$	2,5	50,0	**350,0**	246,1	77,2	29,7	103,9
KS13-MnCl	$MnCl_2 \times 4H_2O$	2,5	50,0	250,0	168,6	78,2	32,6	81,4
KS13-Fe	$Fe2(SO_4)_3 \times H_2O$	2,5	50,0	250,0	177,8	61,2	28,9	72,7
[EMIM][$EtSO_4$]								
KS14-Fe	$Fe_2(SO_4)_3 \times H_2O$	2,5	50,0	250,0	185,7	50,8	25,7	64,3
[BMIM][Cl]								
KS15-Fe	$Fe_2(SO_4)_3 \times H_2O$	2,5	50,0	250,0	185,0	-	26,0	65,0

* Das verwendete $Mn(NO_3)_2 \times H_2O$ liegt als Tetra-, Penta- oder Hexahydrat vor und wird mit $Mn(NO_3)_2$ abgekürzt.

Das vierte Screening beschäftigte sich mit dem Einfluß der Katalysatormenge auf den Umsatz (Tab. 3-45). Außerdem wurden zwei andere Lignine untersucht. Dieses waren ein Organosolv-Lignin (KS17-L2) und ein Ligninsulfonat (KS17-L1) von Aldrich. Der Druck in der Anlage wurde auf 85 bar eingestellt, um die Druckabhängigkeit der Reaktion zu untersuchen. Zu erwarten war, dass durch eine Druckerhöhung und einen dadurch höheren Sauerstoffpartialdruck der Umsatz zunimmt.

Da das in Probe [EMIM][OTf] / $Mn(NO_3)_2$ L1 verwendete Ligninsulfonat wasserlöslich ist, konnte die Probe nicht aufgearbeitet werden.

Tab. 3-45 Screening 4: Umsatz von Lignin in IL mit Katalysatoren (Quelle: Uni Erlangen)

IL	Katalysator*	Masse IL	Masse Kat	Masse Lignin	Rest-Lignin	Masse Produkt	Lignin-umsatz	
		[g]	[mg]	[mg]	[mg]	[mg]	[%]	[mg]
[EMIM][EtSO4]								
KS16-75	$Mn(NO_3)_2$	2,5	75,0	250,0	242,2	45,6	3,1	7,8
KS16-50	$Mn(NO_3)_2$	2,5	50,0	250,0	158,2	48,9	36,7	91,8
[EMIM][OTf]								
KS17-75	$Mn(NO_3)_2$	2,5	75,0	250,0	176,6	49,9	29,4	73,4
KS17-50	$Mn(NO_3)_2$	2,5	50,0	250,0	181,0	48,1	27,6	69,0
KS17-25	$Mn(NO_3)_2$	2,5	25,0	250,0	183,3	60,6	26,7	66,7
KS17-L1	$Mn(NO_3)_2$	2,5	50,0	250,0	-	-	-	-
KS17-L2	$Mn(NO_3)_2$	2,5	50,0	250,0	215,0	52,5	14,0	35,0
[EMIM][MeSO3]								
KS18-75	$Mn(NO_3)_2$	2,5	75,0	250,0	188,5	32,9	24,6	61,5
KS18-50	$Mn(NO_3)_2$	2,5	50,0	250,0	189,8	32,0	24,1	60,2
KS18-25	$Mn(NO_3)_2$	2,5	25,0	250,0	178,7	-	27,6	71,3

* Das verwendete $Mn(NO_3)_2 \times H_2O$ liegt als Tetra-, Penta- oder Hexahydrat vor und wird mit $Mn(NO_3)_2$ abgekürzt.

Im Ergebnis der vier Screeningversuche konnten mit den meisten verwendeten Katalysatoren und ionischen Flüssigkeiten Umsätze von 20 % bis bestenfalls 41 % erreicht werden. Beachtet man den Schwankungsbereich des Ligninumsatzes von 4 %, ergaben die verschiedenen Übergangsmetallsalze ähnliche Umsätze. Aus den Ergebnissen aller vier durchgeführten Screenings ist dennoch eine bessere katalytische Wirksamkeit der Mn-Salze erkennbar. Der hohe Umsatz von maximal 41 %, den das System [EMIM][OTf] / $Mn(NO_3)_2$ lieferte, wurde von keinem der anderen getesteten Systeme übertroffen.

AP3-3.3.3 Batch-Versuche zur oxidativen Spaltung von Lignin

Die Batch-Versuche wurden mit dem Katalysator und der ionischen Flüssigkeit, die die besten Umsätze im Screening lieferten, durchgeführt. Dazu wurde in einem Glasliner eine 10 %ige Ligninlösung in der ionischen Flüssigkeit [EMIM][OTf] angesetzt und mit 20 Gew-% (bezogen auf Lignin) $Mn(NO_3)_2$ als Katalysator versehen. Die Batch-Versuche wurden in einem 300 ml (bzw. 600 ml) Parr-Autoklaven aus Edelstahl des Typs T316 durchgeführt (s. Abb. 3-95).

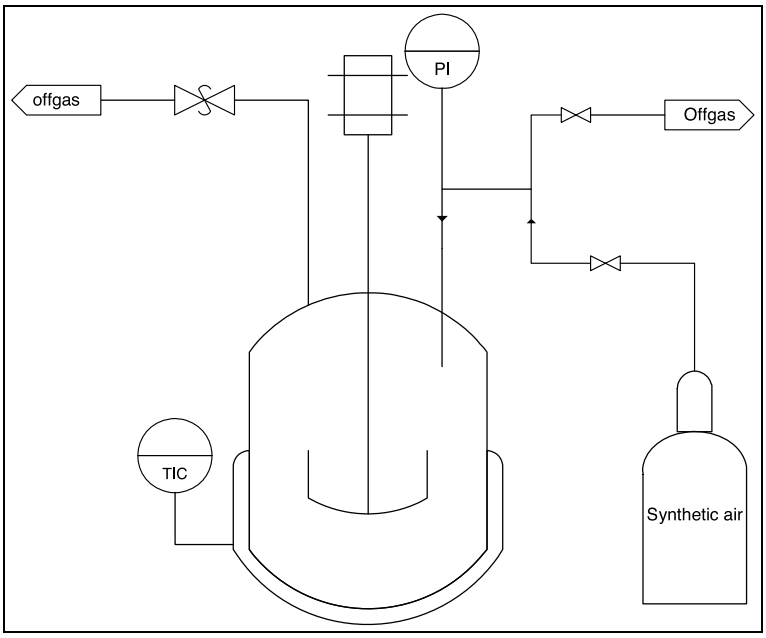


Abb. 3-95: Fließbild für die Batch-Versuche (Quelle: Uni Erlangen)

Das Reaktionsgemisch wurde in einem Glasliner in den Reaktortopf eingebracht und der Reaktor anschließend verschlossen. Die Drehzahl des Gaseintragsrührers wurde auf 1.000 U/min eingestellt. Mit Hilfe eines Heizmantels wurde das System auf 100 °C hochgeheizt, der Druck in der Anlage auf etwa 83,7 bar eingestellt und der Gaseinlass geschlossen. Die Reaktionsdauer wurde in den verschiedenen Versuchen variiert.

Nach Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit dest. Wasser versetzt, um nicht umgesetztes Lignin, welches wasserunlöslich ist, auszufällen. Das gefällte Lignin wurde abfiltriert, mit dest. Wasser gewaschen, im Ofen getrocknet und anschließend gewogen. Das Filtrat wurde mit konz. H_2SO_4 angesäuert (pH = 1), um die darin gelösten, deprotoniert vorliegenden Depolymerisationsprodukte zu protonieren. Nach dreimaliger Extraktion des Filtrats mit DCM wurde die DCM-Phase einrotiert und anschließend die Menge an Produktgemisch bestimmt. Die Analyse der erhaltenen Produkte erfolgte mittels GC/MS (s. Abb. 3-96).

Für die Batch-Versuche wurde aufgrund der guten Ergebnisse aus den Screenings das System [EMIM][OTf] / $Mn(NO_3)_2$ verwendet.

Die beiden ersten Batch-Versuche untersuchten den <u>Einfluss der Katalysator-Konzentration</u> auf den Umsatz und die entstehenden Produkte. Der erste Batch-Versuch KS-B1 wurde über eine Dauer von 24 h gefahren. Die Eduktverhältnisse entsprachen denen des Screenings (10 %ige Ligninlösung mit 20 Gew-% Katalysator). Der Katalysator löste sich schon bei Raumtemperatur komplett in der ionischen Flüssigkeit. Im zweiten Versuch KS-B3 wurde die Katalysatormenge auf 1/10 reduziert, um zu überprüfen, ob sich die Erkenntnisse aus den Screenings auch auf den Batch-Versuch übertragen lassen. Die Ergebnisse sind in Tab. 3-46 dargestellt.

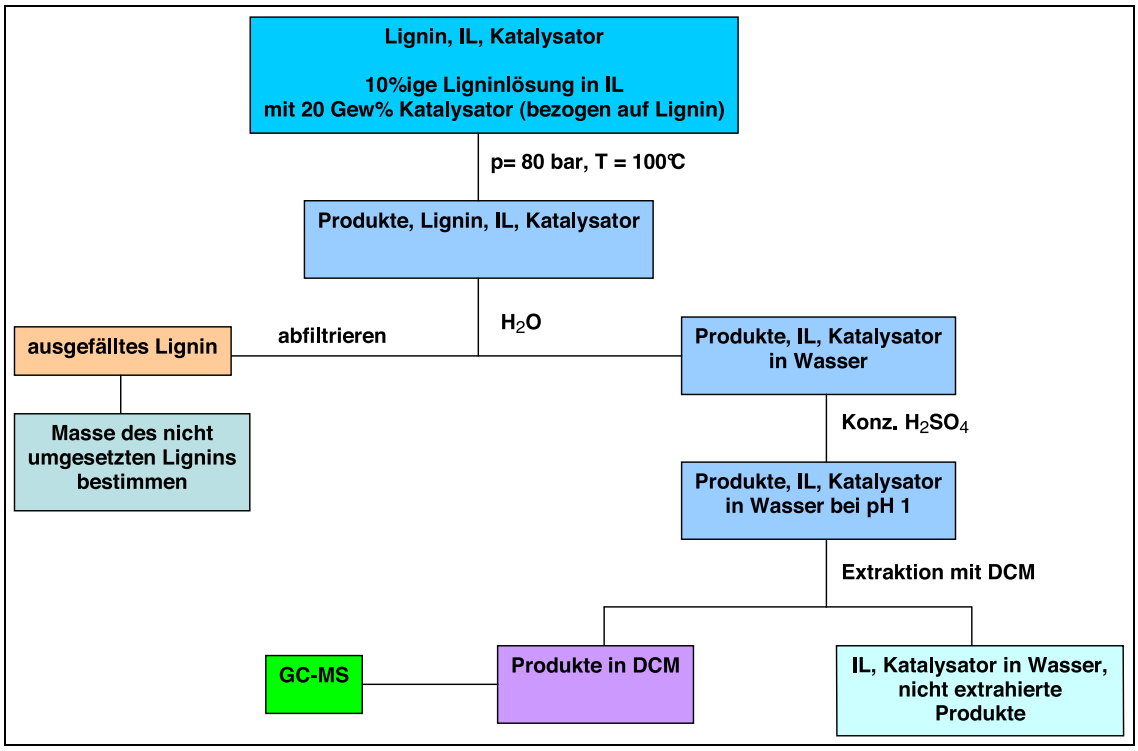


Abb. 3-96: Fließbild zur Aufarbeitung des Reaktionsgemisches (Quelle: Uni Erlangen)

Tab. 3-46: Ergebnisse der ersten beiden Batch-Versuche (Quelle: Uni Erlangen)

Batch	Dauer	Masse IL	Volumen IL	Masse Lignin	Masse Kat	Rest-Lignin	Lignin-Verbrauch		Produkt
	[h]	[g]	[ml]	[g]	[g]	[g]	[%]	[g]	[g]
KS-B1	24	111,2	80,0	11,12	2,22	3,75	66,3	7,37	3,61
KS-B3	21	111,2	80,0	11,12	0,22	4,13	63,0	6,99	3,03

Beide Versuche liefern um etwa 25 % höhere Ligninumsätze als der höchste im Screening erreichte Umsatz von 41,0 %. Dies ist vor allem auf die wesentlich bessere Durchmischung des Systems zurückzuführen, die mit einem Gaseintragsrührer im Vergleich zu einem Magnetrührer in dem Screening-Reaktor erreicht wird. Bemerkenswert ist, dass im Versuch KS-B3 trotz solch einer starken Reduktion der Katalysatormenge (10 % von KS-B1), dennoch ein nur um 3,3 % geringerer Umsatz bei einer um 12 % geringeren Reaktionszeit erreicht wird. In Screening 3 führte bereits eine Reduktion auf 60 % zu einem 6,1 % schlechteren Ligninumsatz. Dies legt nahe, dass die mögliche oxidative Wirkung von $Mn(NO_3)_2$ keinen entscheidenden Einfluss auf die Höhe des Umsatzes hat. Als Produktgemisch werden aus Versuch KS-B1 nur 49,0 % des verbrauchten Lignins, aus Versuch KS-B3 nur 43,3 % erhalten. Als Gründe für die nicht geschlossene Massenbilanz sind folgende Möglichkeiten denkbar:

- Entstehung wasserlöslicher Spezies, die nicht aus der ionischen Flüssigkeit extrahiert werden können.
- Überoxidation von Ligninanteilen zu CO und CO_2, die nicht untersucht wurden.

Das Gaschromatogramm von KS-B1 weist einen sehr intensiven Peak für DMBQ auf, wobei die Peaks für die restlichen Produkte schwach ausgeprägt sind. Im Gaschromatogramm von KS-B3 hingegen erscheint ein Peak geringer Intensität für DMBQ. Dafür zeigt es aber einen sehr intensiven Peak für Syringaldehyd und zwei Peaks mittlerer Intensität für Syringol und Vanillin.

Die Katalysatormenge hat also keinen bedeutenden Einfluß auf den Ligninumsatz, jedoch auf die Produktzusammensetzung. Eine Erklärung für das beobachtete Verhalten ist, dass der Katalysator $Mn(NO_3)_2$ den Oxidationsgrad beeinflusst, indem er selbst als Oxidationsmittel wirkt. Syringaldehyd ist zwar ein sich schnell bildendes Depolymerisationsprodukt, reagiert jedoch bei zu starker Oxidation auch rasch weiter zu der entsprechenden Säure. Ein hoher Gehalt an Syringaldehyd kann daher auf mildere Oxidationsbedingungen, die bei Einsatz geringer Mengen an $Mn(NO_3)_2$ herrschen, zurückgeführt werden. Widersprüchlich ist in diesem Zusammenhang aber die Bildung von Vanillinsäure in KS-B3, die in KS-B1 nicht gebildet wird, da die Entstehung von aromatischen Säuren normalerweise durch eine starke Oxidation verursacht wird. Daher muss angenommen werden, dass der Katalysator $Mn(NO_3)_2$ eine gewisse Selektivität für die Bildung von DMBQ besitzt.

Da in den meisten veröffentlichten Arbeiten über die Depolymerisation von Lignin der Höhepunkt des Umsatzes bereits nach kurzen Reaktionszeiten im Sekunden- bis Minutenbereich erreicht wurde, sollte die Zeitabhängigkeit der hier durchgeführten Reaktion untersucht werden. Eine Reaktionszeit von wenigen Minuten konnte in dem verwendeten Reaktor nicht verwirklicht werden. Probenahmen während der laufenden Reaktion waren in dem verwendeten Versuchsaufbau praktisch nicht möglich. Daher wurde die Reaktionszeit zwischen 0,5 und 3,5 h variiert. Die ersten drei Versuche zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Reaktion wurden in einem 300 ml-Reaktor, der letzte Versuch in einem 600 ml-Reaktor durchgeführt (s. Tab. 3-47).

Tab. 3-47: Ergebnisse der Batch-Versuche im 300 ml-Reaktor (Quelle: Uni Erlangen).

Batch	Dauer	Masse IL	Volumen IL	Masse Lignin	Masse Kat	Rest-Lignin	Lignin-Verbrauch*		Produkt
	[h]	[g]	[ml]	[g]	[g]	[g]	[%]	[g]	[g]
B 5-2	0,5	111,2	80,0	11,12	2,22	-	-	-	1,02
B 4	1,5	111,2	80,0	11,12	2,22	-	-	-	1,60
B 2	3,0	111,2	80,0	11,12	2,22	-	-	-	1,19

* Restlignin und Ligninverbrauch konnten nicht bestimmt werden (s. Text)

Das Ziel der durchgeführten Versuche war das Erreichen eines höheren Umsatzes durch Verkürzung der Reaktionszeiten. Beim Öffnen des Reaktors wurde nach Ablauf der Reaktion eine starke Schaumentwicklung festgestellt, die in den ersten Batch-Versuchen mit langer Reaktionsdauer nicht auftrat. Etwa die Hälfte des Reaktionsgemisches wurde beim Ablassen des Druckes in die Rohrleitungen der Anlage gezogen. Dies wurde erst nach Durchführung des dritten Versuches KS-B5-2 bemerkt.

Um das Überschäumen im Reaktor zu vermeiden wurde auf einen 600 ml-Reaktor umgestiegen und die Ansatzgröße erhöht, da sonst der Rührer nicht in das Reaktionsgemisch eingetaucht wäre.

Tab. 3-48: Ergebnisse der Batch-Versuchs im 600 ml-Reaktor (Quelle: Uni Erlangen).

Batch	Dauer	Masse IL	Volumen IL	Masse Lignin	Masse Kat	Rest-Lignin	Lignin-Verbrauch*		Produkt
	[h]	[g]	[ml]	[g]	[g]	[g]	[%]	[g]	[g]
B 5	3,5	156,2	112,0	15,62	3,12	-	-	-	4,30

* Restlignin und Ligninverbrauch konnten nicht bestimmt werden (s. Text)

Die Vergrößerung des Reaktorvolumens brachte keinerlei Verbesserung und ein Überschäumen konnte nicht verhindert werden. Die im Reaktortopf übriggebliebenen Reaktionsgemische aller Versuche wurden dennoch aufgearbeitet und die Produktzusammensetzung analysiert (s.u.).

Leider können anhand der Ergebnisse keine Aussagen über den Umsatz bei kurzen Reaktionszeiten gemacht werden. Grundsätzlich ist bei kurzer Reaktionsdauer ein höherer Umsatz zu erwarten, da mit zunehmender Reaktionszeit mit dem Einsetzen der Repolymerisation der Ligninbruchstücke zu rechnen ist. Diese Repolymerisationsprodukte haben eine größere molare Masse als das Ausgangslignin und sind kaum mehr zu spalten.

Es müssen jedoch nach kurzer Reaktionszeit Reaktionen ablaufen, durch die Produkte gebildet werden, die zu der beobachteten starken Schaumentwicklung führen. Solche Produkte können entweder Gase wie CO_2 und CO sein, aber auch Polymere, die ebenfalls ursächlich für Schaumbildung sein können.

Um dennoch eine Bestimmung der Zeitabhängigkeit durchführen zu können müsste ein Reaktor mit geeignetem Probenahmeventil, welches nicht durch das Reaktionsgemisch verstopft wird, verwendet werden.

Zur Auftrennung des komplexen Produktgemisches wurden Löseversuche in verschiedenen organischen Lösungsmitteln unternommen. Es wurde erwartet, dass die einzelnen Monomere aufgrund ihrer leicht unterschiedlichen Polarität in verschieden polaren Lösungsmitteln unterschiedliches Lösungsverhalten zeigen. Hierbei war jedoch mit einer Auftrennung des Gemisches in kleinere Gruppen von Monomeren zu rechnen, da die Unterschiede in Struktur und Polarität nur gering sind. Anlass für diese Art der Produkttrennung war eine zufällige Entdeckung. Bei der Vorbereitung einer GC/MS-Probe fiel beim Lösen des Produktgemisches in EtOH eine gelbe Substanz aus. Daher wurden die beschriebenen Löseversuche auch nicht, wie normalerweise üblich, von unpolaren zu polaren Lösungsmitteln hin durchgeführt, sondern mit polarem EtOH begonnen. Die einzelnen Lösungsmittelfraktionen wurden wiederum mittels GC/MS analysiert.

Aufgetrennt wurden die Produktgemische der Batch-Versuche KS-B1, KS-B3 und KS-B5. KS-B1 wurde sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet, KS-B3 und KS-B5 nur qualitativ. Die Trennung wurde nach folgendem Schema vollzogen:

1. Das Produktgemisch wurde in Ethanol gelöst, wobei eine gelbe Substanz unlöslich blieb.
2. Der Ethanol lösliche Anteil wurde in Toluol gelöst. Dabei entstanden eine gelbe Toluollösung und ein braunes, unlösliches Öl.
3. Beim Lösen des gelben Toluolrückstandes in Methanol fiel wiederum eine gelbe Substanz aus.
4. Das in Toluol unlösliche Öl wurde mit Wasser versetzt, wobei ein brauner Niederschlag ausfiel, der abfiltriert wurde.

Die Zusammensetzung der einzelnen Lösungsmittelphasen wurde mittels GC/MS analysiert und den entsprechenden Referenzsubstanzen zugeordnet. Nicht zugeordnete Substanzen werden durch ihre typischen Massenfragmente bezeichnet (Tab. 3-49a-c).

Tab. 3-49a: Qualitative Auswertung der Produkttrennung von KS-B1 (Quelle: Uni Erlangen).

Lösungs -mittel	Polarität des Lösungsmittels [εT,n]	Lösliche Substanzen	Unlösliche Substanzen
EtOH	0,88	Syringaldehyd, Vanillin, DMBQ	DMBQ
Toluol	0,29	Syringaldehyd, Vanillin, DMBQ	m/z = 129,175,163,157
MeOH	0,95	Syringaldehyd, Vanillin, DMBQ	DMBQ
Wasser	> 1	Nicht identifizierbar	Restlignin, Polymere

Tab. 3-49b: Qualitative Auswertung der Produkttrennung von KS-B3 (Quelle: Uni Erlangen).

Lösungs -mittel	Polarität des Lösungsmittels [εT,n]	Lösliche Substanzen	Unlösliche Substanzen
EtOH	0,88	Syringaldehyd, Vanillin, Syringol, DMBQ	Keine
Toluol	0,29	Syringaldehyd, Vanillin, Syringol, DMBQ	Nicht identifizierbar
MeOH	0,95	Syringaldehyd, Vanillin, Syringol	m/z = 203
Wasser	> 1	Syringaldehyd, Vanillin, Syringol	Restlignin, Polymere

Tab. 3-49c: Qualitative Auswertung der Produkttrennung von KS-B5 (Quelle: Uni Erlangen).

Lösungs -mittel	Polarität des Lösungsmittels [εT,n]	Lösliche Substanzen	Unlösliche Substanzen
EtOH	0,88	Syringaldehyd, Vanillin, Syringol	DMBQ
Toluol	0,29	Syringaldehyd, Vanillin, Syringol	Nicht identifizierbar
MeOH	0,95	Syringaldehyd, Vanillin, Syringol	m/z = 203
Wasser	> 1	Syringaldehyd, Vanillin, Syringol	Restlignin, Polymere

Die Substanz DMBQ konnte durch Kristallisieren in Ethanol und Methanol als Reinstoff isoliert werden. Außerdem konnten Syringaldehyd, Vanillin und Syringol von den restlichen, nicht identifizierbaren Stoffen abgetrennt werden. Eine weitere Trennung dieser drei Stoffe voneinander war jedoch mit Hilfe eines Lösungsmittels nicht zu erreichen.

Bei der Auftrennung des aus Versuch KS-B1 erhaltenen Produktgemisches wurden die einzelnen abgetrennten Substanzen auch quantitativ bestimmt. Die angegebenen Gewichtsprozente beziehen sich auf das Gesamtproduktgemisch (s. Abb. 3-97).

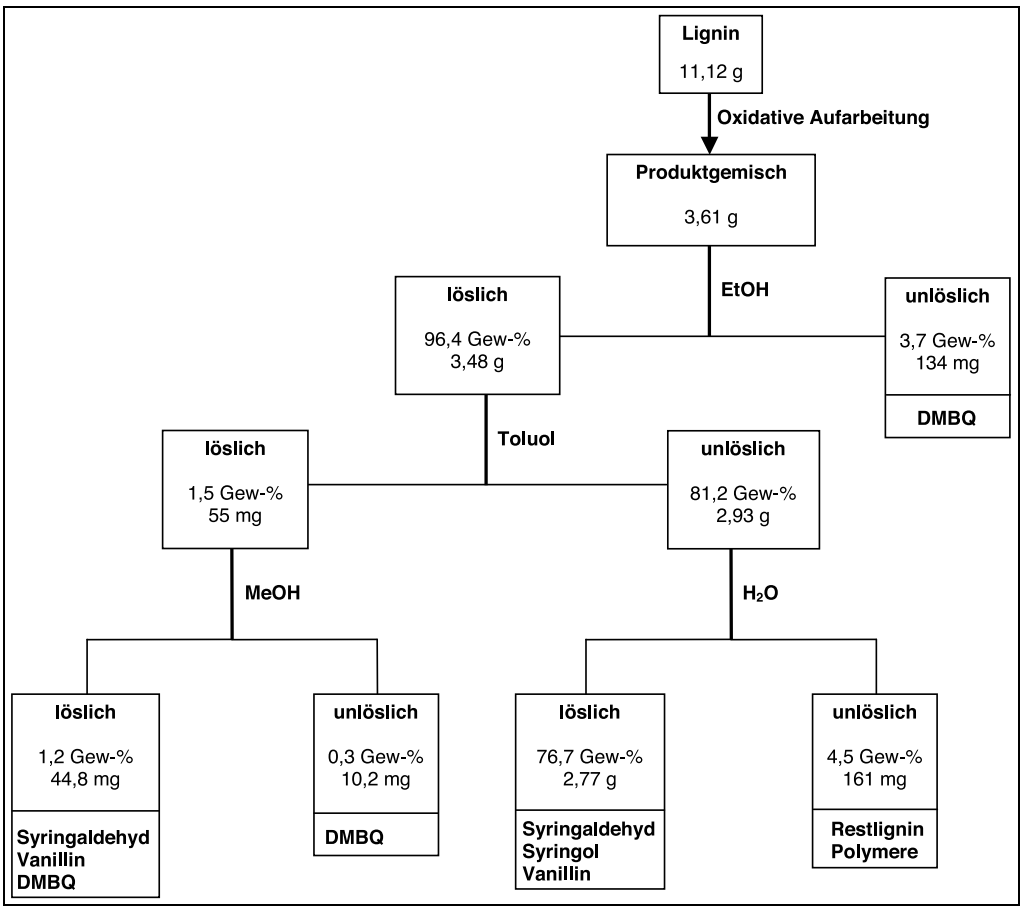


Abb. 3-97: Quantitative Auswertung der Produkttrennung von KS-B1 (Quelle: Uni Erlangen)

Den Großteil des Produktgemisches machen die drei Substanzen Syringaldehyd, Vanillin und Syringol aus. Sie liegen am Ende des Trennungsganges als relativ reines, wasserlösliches Gemisch vor und haben in dieser Form einen Anteil von 76,7 Gew-% am Gesamtproduktgemisch. Das einzige als Reinstoff isolierbare Produkt ist DMBQ (2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon), welches durch Fällung in Ethanol oder Methanol in Form eines gelben Pulvers erhalten wurde. Es konnten 4,0 Gew-% (bezogen auf das Gesamtproduktgemisch) des Reinstoffes isoliert werden. Dies entspricht 1,3 Gew-% der eingesetzten Ligninmenge. Dabei muss bedacht werden, dass, wie aus Abb. 3-97 ersichtlich wird, nicht die gesamte Menge an entstandenem DMBQ isoliert werden konnte.

DMBQ ist als Pflanzenmetabolit (SCHUHMANN, 2005) und effektives Antitumormittel (ROGINSKY et al. 1997) bekannt. Die Isolation von DMBQ aus Lignin wurde bereits in einer Publikation aus dem Jahr 2000 (BOZELL et al. 2000) beschrieben. Darin wurde Lignin mit H_2O_2 und einer Heteropolysäure in Essigsäure mit reinem Sauerstoff oxidiert und das DMBQ mit Diethylether aus dem Reaktionsgemisch herausgewaschen. Auf diese Weise konnten 2 – 3 Gew-% DMBQ isoliert werden. Aus dieser Veröffentlichung ist leider nicht eindeutig erkennbar, ob sich die 2-3 Gew% auf das eingesetzte Lignin oder das Produktgemisch beziehen. Die Charakterisierung des in der vorliegenden Arbeit isolierten Stoffes erfolgte mittels NMR-Spektroskopie und GC/MS-Analyse.

AP3-3.3.4 Zusammenfassung

Es wurde eine geeignete Methode gefunden, um ein Organosolv-Lignin in einer ionischen Flüssigkeit oxidativ mit Luftsauerstoff in definierte Monomere zu spalten.

Als geeignetes Reaktionssystem stellte sich die Kombination aus der ionischen Flüssigkeit [EMIM][OTf] und dem Katalysator $Mn(NO_3)_2$ heraus, mit welchem unter milden Bedingungen von 80 bar Druckluft und 100 °C ein maximaler Ligninumsatz von 66.3 % erreicht werden konnte.

Eine Antrennung des Produktgemisches durch Lösen und Fällen in verschiedenen Lösemitteln ist möglich. Als Reinstoff konnte eine Fraktion 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon gewonnen werden.

AP3-4 Fazit

Der **Meilenstein 5** *„Weiterverarbeitung und anwendungstechnische Untersuchungen“* wurde erreicht. Folgende Ergebnisse lassen sich aus den Untersuchungen ableiten:

- Die enzymatische Hydrolyse der Cellulosefraktion konnte in Bezug auf verfahrenstechnische Anwendung in der Pilotanlage optimiert werden. Dabei kamen vor allem kommerzielle Enzymgemische zum Einsatz.
- Die Rekonstruktion des Cellulosoms aus Clostridien eröffnet dabei weitere Chancen, die Zuckerausbeute aus der Restfaserfraktion weiter zu erhöhen.
- Die Fermentation der Hydrolysate zu Ethanol ist mit Ausbeuten von 60 – 80 % der theoretisch möglichen Ausbeute möglich. Die Hydrolysate können gut zur Biomassebildung von Hefen verwendet werden. Die Kultivierung anderen Mikroorganismen war weniger ergiebig. Auf Grund dieser Ergebnisse lässt sich sagen, dass bei Verwendung der Hydrolysate im Einzelfall überprüft und für den jeweiligen Organismus optimiert werden muss.
- In der Hemicellulosefraktion liegen die Zucker bereits überwiegend als Monomere vor. Mit Hilfe von Enzympräparationen aus thermophilen Clostridien-Stämmen konnten auch die restlichen, di- oder oligomer vorliegenden Zucker hydrolysiert werden. Das Wachstum dieser Stämme auf der Hemicellulose-Fraktion ist ebenfalls möglich.
- Die Umwandlung des Hauptmonomers Xylose in Xylulose durch rekombinante Enzyme eröffnet die Möglichkeit der Vergärung der C5-Fraktion durch (Industrie-)hefen.
- Anwendungstechnische Untersuchungen von Organosolv-Ligninen wurden mit mehreren Matrices und verschiedenen Additiven durchgeführt. Verschiedene Anwendungen konnten dabei identifiziert werden.
- Die oxidative Depolymerisierung von Lignin in IL wurde untersucht. Dabei wurden starke Einflüsse von Katalysator und IL auf das Produktspektrum festgestellt. Untersuchungen zur Depolymerisierung durch Hydrierung stehen noch aus.
- Organosolv-Lignin ist aus Sicht der Harzsynthese und nach den Ergebnissen erster anwendungstechnischer Laborprüfungen als Rohstoff für die Kondensation von Phenolharzen für Holzwerkstoffapplikationen geeignet. Damit kann Organosolv-Lignin als partieller Phenolersatz in diesen Bindemitteln verwendet werden

AP4: Ökonomische und ökologische Bewertung des Verfahrens: Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

AP4-1 Übersicht zur Vorgehensweise im AP 4

Zielsetzung von Arbeitspaket 4 war die Abschätzung der Wirtschaftlichkeit und der ökologischen Wirkung des Verfahrens bereits in einer frühen Phase der Prozessentwicklung. Es wurden frühzeitig ökonomische und ökologische Schlüsselgrößen ermittelt, welche in den weiteren Entwicklungen der übrigen Arbeitspakete im Hinblick auf eine wirtschaftlich sowie ökologisch effiziente Verfahrenskonzeption sowie der Entwicklung der zur Förderung beantragten Pilotanlage Berücksichtigung fanden. Nach einer ersten Abschätzung der ökonomischen Machbarkeit des Verfahrens wurde das im Rahmen des Projektes entwickelte Verfahren sowohl ökonomisch als auch ökologisch bewertet. Des Weiteren wurden im AP 4 mögliche Anlagenstandorte für eine großtechnische Realisierung ausgewählt. Im Rahmen einer erweiterten Standortanalyse wurde das regionale Holzaufkommen dem aktuellen Verbrauch gegenübergestellt. Abb. 4-1 zeigt die inhaltliche Vorgehensweise im Arbeitspaket 4. Im oberen Teil der Abbildung sind die durchgeführten Arbeiten bis zum Meilenstein 0 zur ersten Abschätzung der Wirtschaftlichkeit der Lignocellulose-Bioraffinerie dargestellt. Es wurden zunächst die Systemgrenzen und die Teilprozesse entlang der Wertschöpfungskette der Lignocellulose-Bioraffinerie definiert und es wurden verschiedene Rohstoffalternativen hinsichtlich ihrer Verfügbarkeit und Kosten beurteilt. Aus diesen Informationen wurde ein Basisfall für die Lignocellulose-Bioraffinerie ermittelt. Für den Basisfall sowie verschiedene Szenarien wurden die Massen- und Energiebilanzen modelliert und darauf aufbauend eine erste Abschätzung der Wirtschaftlichkeit sowie eine Sensitivitätsanalyse durchgeführt.

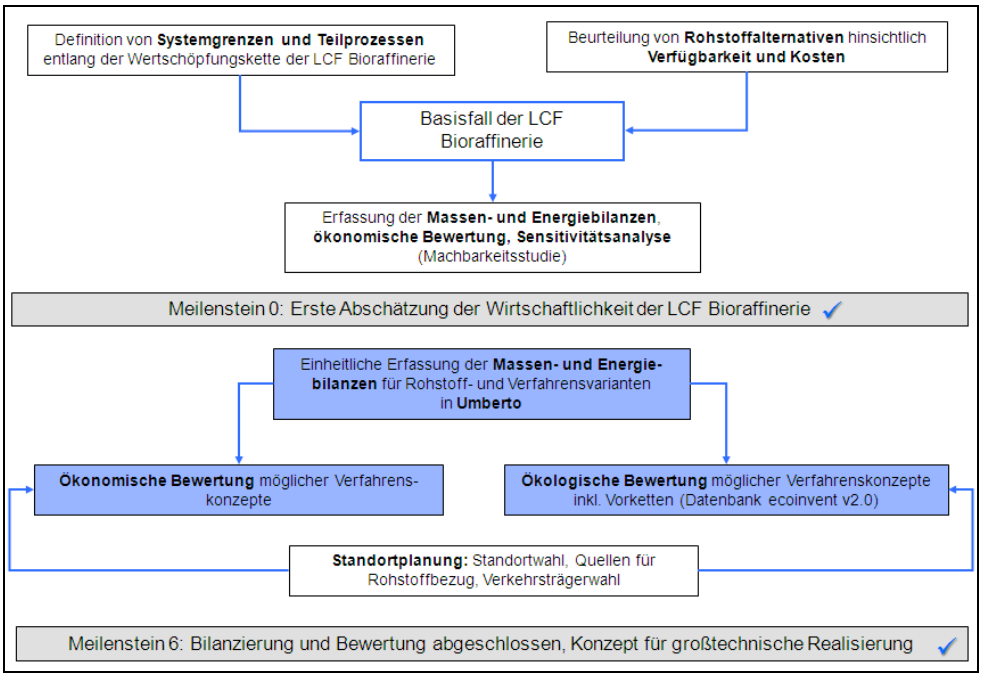


Abb. 4-1: Übersicht zur Vorgehensweise im AP 4 (Quelle: IIP)

Der untere Teil der Abb. 4-1 zeigt einen Überblick der durchgeführten Arbeiten bis zum Meilenstein 6. Aufbauend auf einer einheitlichen Erfassung der Massen- und Energiebilanzen in Umberto und unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Standortplanung, d.h. möglicher Einzugsgebiete, Rohstoffbezug und Verkehrsträgerwahl werden die Verfahrensalternativen ökonomisch sowie ökologisch bewertet. Im Folgenden werden die wesentlichen Ergebnisse des AP 4 vorgestellt.

AP4-2 Definition von Systemgrenzen und Teilprozessen entlang der Wertschöpfungskette der Lignocellulose-Bioraffinerie (AP 4.1)

Im Rahmen des AP 4.1 wurden die Systemgrenzen und die zu untersuchenden Teilprozesse definiert. In Abb. 4-2 sind die betrachteten Teilprozesse entlang der Wertschöpfungskette der Lignocellulose Bioraffinerie und deren Systemgrenzen dargestellt. Für diese Teilprozesse wurden die Schnittstellen zu vor- und nachgelagerten Prozessen sowie in enger Abstimmung mit den jeweiligen Laborpartnern die möglichen technischen Ausgestaltungsmöglichkeiten der Prozessschritte definiert.

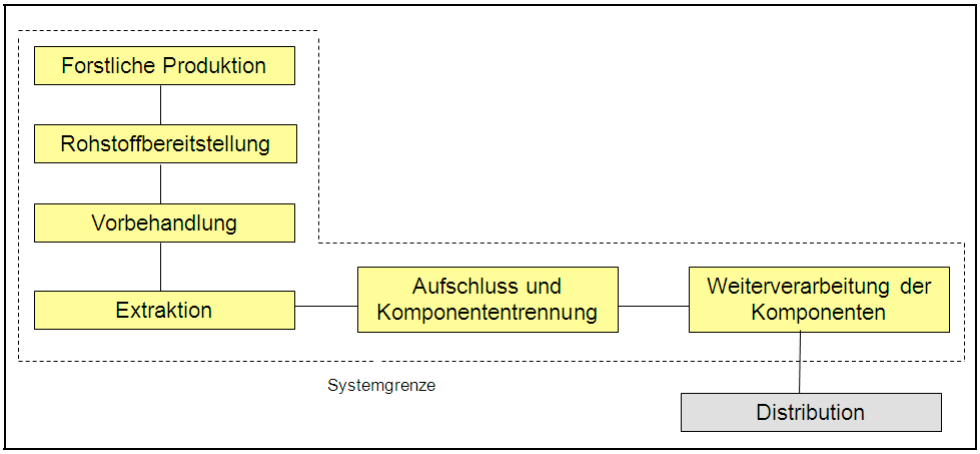


Abb. 4-2: Wertschöpfungskette der Lignocellulose-Bioraffinerie (Quelle: IIP)

Die Wertschöpfungskette der Bioraffinerie beginnt mit der forstlichen Produktion und dem Holztransport zur Anlage. Wie in Abb. 4-3 dargestellt, umfasst die forstliche Produktion und die Holzbereitstellung die biologische Produktion des Holzes, die Waldpflege und die Holzernte inkl. Zerkleinerung sowie den Holztransport zur Prozessanlage.

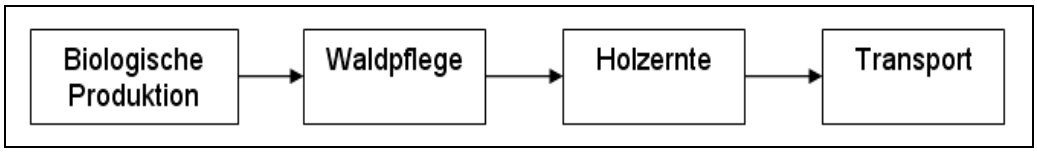


Abb. 4-3: Teilprozesse Forstliche Produktion und Holzbereitstellung

In der Prozessanlage findet zunächst der Holz-Aufschluss und die Auftrennung in die Komponenten Cellulose, Hemicellulose und Lignin statt. Es wurden auf Basis von Labordaten im AP 2 die zwei Aufschlussvarianten "Organosolv" und "Ionische Flüssigkeiten" mit den in Abb. 4-4 und Abb. 4-5 dargestellten Haupt-Prozessschritten mit in die Betrachtungen eingeschlossen. Für die Aufschlussvariante „Organosolv“ ist keine weitere Vorbehandlung des Holzes notwendig, die angelieferten Waldholzhackschnitzel können direkt verarbeitet werden. Bei der Aufschlussvariante "Ionische Flüssigkeiten" müssen die Holzhackschnitzel vorher weiter zerkleinert sowie getrocknet werden.

Für die Machbarkeitsstudie (Meilenstein 0) sowie die weiteren Betrachtungen zur ökonomischen und ökologischen Bewertung bis zum Meilenstein 6 wurde der Holzaufschluss mittels ionischer

Flüssigkeiten im AP 4 nicht weiter betrachtet, da hierfür derzeit keine ausreichende Datengrundlage existiert. Die Betrachtung einer Rohstoffvorbehandlung (z.B. Holzzerkleinerung, Trocknung) ist daher für den Basisfall als auch die betrachteten Szenarien (vgl. Kapitel AP4-5 und AP4-6.3) nicht notwendig.

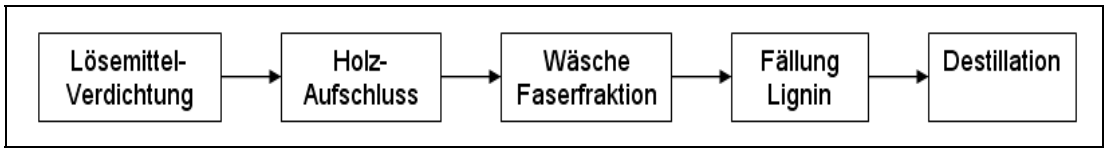


Abb. 4-4: Prozessschritte Holzaufschluss und Komponententrennung (Aufschlussvariante Organosolv)

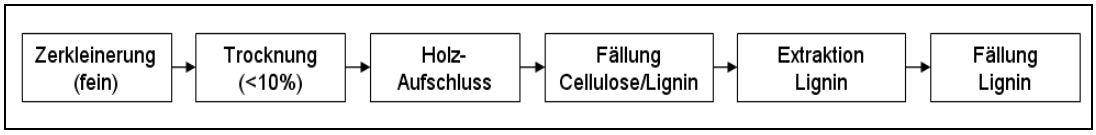


Abb. 4-5: Prozessschritte Holzaufschluss und Komponententrennung (Aufschlussvariante Ionische Flüssigkeiten)

Eine dem Holzaufschluss vorangehende Extraktion des Holzes kann zum derzeitigen Informationsstand nicht in die ökonomische und ökologische Bewertung eingeschlossen werden, da bei den Versuchen zur Definition des Zielproduktes und des zugehörigen Extraktionsverfahrens keine dazu ausreichenden Ergebnisse erzielt wurden. Wenn der Extraktionsschritt ausschließlich einen Mehrwert für das Verfahrenskonzept der Lignocellulose-Bioraffinerie darstellt und entsprechende Ergebnisse vorliegen, kann dieser in das bestehende Modell und die damit verknüpften Bewertungen problemlos integriert werden.

Die Weiterverarbeitung der Komponenten aus dem Organosolv-Verfahren umfasst die Umsetzung der Cellulose zu Glucose sowie die Trocknung des Lignins. Im Fall der Hemicellulose-Fraktion wird auf Basis der Laborergebnisse davon ausgegangen, dass in dieser Fraktion fermentierbare Zucker-Monomere und -Oligomere vorliegen und die Fraktion direkt fermentiert werden kann. Es wird daher zunächst kein Enzymschritt für die Hemicellulose-Fraktion betrachtet.

AP4-3 Rohstoffbereitstellung und –kosten (AP 4.2)

Die verfügbare Menge und der für den Rohstoff zu zahlende Preis sind wichtige Kriterien für die Wahl des Standorts eines Holz bearbeitenden Betriebes. Dies gilt natürlich auch für eine Lignocellulose-Bioraffinerie. Im Rahmen dieses Projektes sollte schon zu einem frühen Zeitpunkt der Projektlaufzeit abgeschätzt werden, ob in Deutschland unter Berücksichtigung der bereits vorhandenen Rohholzverbraucher ausreichend Rohholz zur Verfügung stehen würde, um eine Lignocellulose-Bioraffinerie mit 400.000 t atro Jahresbedarf nachhaltig mit Rohholz zu versorgen.

Da sich Buchen- und Pappelholz besonders für den Holzaufschluss mit einem Ethanol-Wassergemisch eignen (siehe AP 2), wird zunächst das regionalisierte Aufkommenspotenzial an Buchenholz ermittelt, um daraus erste Schwerpunkte für eine Standortwahl abzuleiten. Zur erweiterten Standortanalyse wird dem regionalen Aufkommenspotenzial der ausgewählten Standorte der Verbrauch als Nutzungskonkurrenz gegenübergestellt. Da Pappelholz, wie die zweite Bundeswaldinventur (BWI[2]) zeigt, nur in vergleichsweise geringen Mengen verfügbar ist, erfolgt eine qualitative

Abschätzung des zukünftigen Potenzials aus sog. Kurzumtriebsplantagen (KUP) auf landwirtschaftlichen Flächen zusammen mit einer Analyse der Kosten des Anbaus von KUP. Da nicht absehbar ist, wie viel Pappelholz aus KUP in Zukunft verfügbar sein wird, ist dessen mögliche Verfügbarkeit nicht in die Standortanalyse einbezogen worden. Weiterhin wird eine erste Abschätzung der Rohstoffkosten vorgenommen, die als Eingangsgröße für die ökonomische Bewertung einer geplanten Lignocellulose-Bioraffinerie dienen.

AP4-3.1 Regionales Buchenholz-Aufkommen und -Bereitstellung

Die Datengrundlage zur Berechnung des regionalisierten Buchenholz-Aufkommens bilden die Bundeswaldinventuren von 1987 (BWI[1]) und von 2002 (BWI[2]). Auf Basis dieser Inventurdaten wurde ein Modell entwickelt, das das potenzielle Rohholzaufkommen bis zum Jahr 2042 quantifiziert (SCHMITZ et al., 2005). Eine Untergliederung der Prognosedaten liegt in Fünf-Jahres-Intervallen vor. Für die nachfolgenden Berechnungen des Buchenholz-Aufkommens wird der Fünfjahreszeitraum von 2008 bis 2012 verwendet.

Nach Angaben der BWI[2] ist Buche mit einem Anteil von 15 % an der gesamten Holzbodenfläche – das entspricht 1,6 Mio. Hektar – nach Fichte und Kiefer die dritthäufigste Baumart in der Bundesrepublik Deutschland. Der Anteil am gesamten Holzvorrat liegt mit 17 % etwas höher. Der spezifische Vorratswert lag im Jahr 2002 bei 352 m^3/ha. Der Zuwachs im Zeitraum 1987 bis 2002 betrug 11,7 m^3/(ha × a) und war damit deutlich höher als die im selben Zeitraum erfolgte Nutzung von 6,7 m^3/(ha × a). Dies hat im Zeitraum zwischen den beiden Bundeswaldinventuren (1987 bis 2002) zu einem deutlichen Anstieg des Vorrats um 26 % (104,9 Mio. m^3) geführt.

Wie die Buchenholzvorräte räumlich verteilt und wie sie strukturiert sind, wird anhand des Basisszenarios der im Rahmen der Clusterstudie Forst- und Holzwirtschaft durchgeführten Holzaufkommensmodellierung skizziert (POLLEY/KROIHER, 2007). Die regionalisierte Darstellung der Buchenholzvorräte erfolgt für 44 Regionen Deutschlands. Diese entsprechen vorhandenen bzw. ehemaligen Gebietseinteilungen (z. B. Regierungsbezirken) oder wurden in einigen Bundesländern, in Ermangelung einer existierenden Untergliederung, durch Zusammenführung von Landkreisen in vergleichbare Regionen eingeteilt. In Abb. 4-6 werden die Ergebnisse dieser Regionalisierung differenziert nach Eigentumsarten für das Bundesgebiet dargestellt.

Wie Abb. 4-6 zeigt, sind die Buchenholzvorräte vor allem in Baden-Württemberg, im Nordwesten Bayerns, im östlichen Rheinland-Pfalz, im östlichen Nordrhein-Westfalen, in Hessen, im westlichen Thüringen und in den südlichen Regionen von Niedersachsen besonders hoch. In den Regionen Hannover, Detmold, Thüringen-Nordwest, Gießen und Unterfranken hat Buche den höchsten Vorratsanteil von allen Baumartengruppen (POLLEY/KROIHER, 2007). Aufgrund dieser hohen Buchenholzvorräte und des daraus resultierenden potenziell hohen Buchenholzaufkommens kommen die genannten Regionen in die engere Wahl für einen Bioraffinerie-Standort.

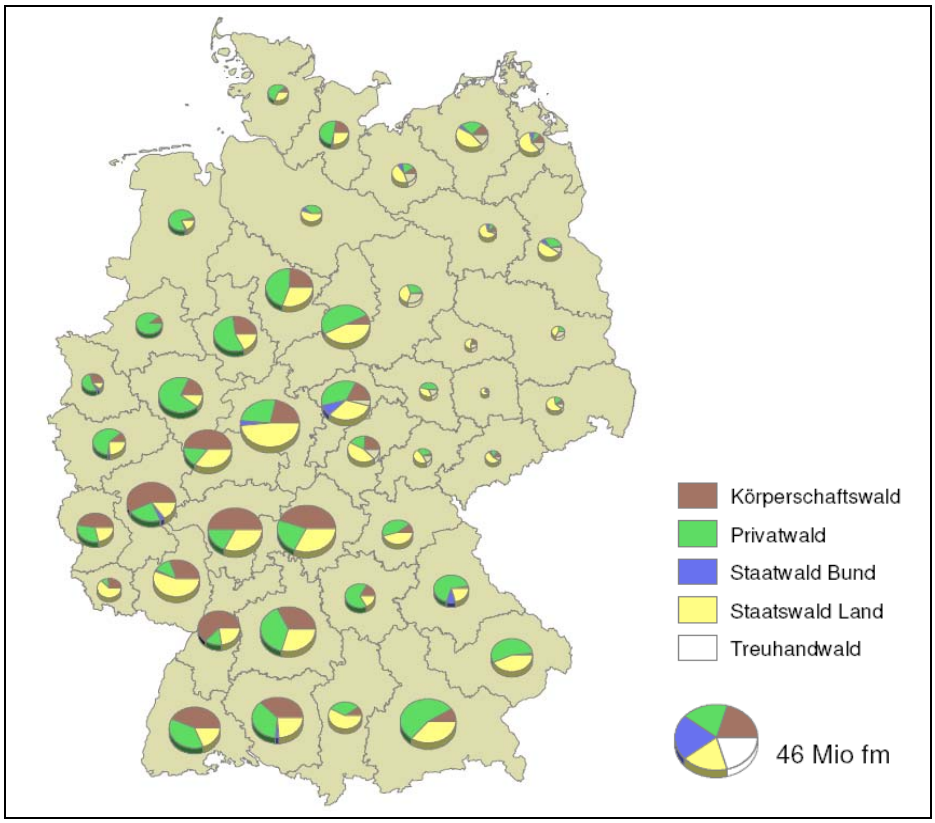


Abb. 4-6: Vorrat der Baumartengruppe Buche nach Eigentumsarten (Quelle: vTI, nach Polley/Kroiher (2007))

AP4-3.1.1 Sortimente

Wichtig für eine differenzierte Darstellung des Buchenholzpotenzials ist neben der Abschätzung des Gesamtpotenzials auch das Aufkommen der Buchensortimente, die potenziell bevorzugt in einer Lignocellulose-Bioraffinerie eingesetzt werden können. Das müssen, wie AP4-6 (s.u.) zeigt, aus Gründen der Wirtschaftlichkeit Sortimente mit geringem Preisniveau wie Industrie- und Waldrestholz sowie Stammholz geringer Qualität sein. Die zu erwartende Sortimentsstruktur wird durch ein Sortierungsmodell ermittelt, das es ermöglicht, das potenzielle Rohholzaufkommen nach Sorten gemäß der Handelsklassensortierung aufzuteilen (SCHMITZ et al., 2005). Abb. 4-7 stellt schematisch die Aufteilung der oberirdischen Holzmasse und des Holzaufkommens in die Sortimente Stammholz, Industrieholz und Waldrestholz dar. Letzteres setzt sich aus X-Holz und sonstigem Derbholz > 7 cm sowie Nicht-Derbholz < 7 cm zusammen. Das Stammholz wird in Abhängigkeit von der Mittenstärke zusätzlich in die Stärkeklassen 1 bis 6 unterteilt. Dies entspricht einem Mittendurchmesserbereich von 10 bis > 60 cm.

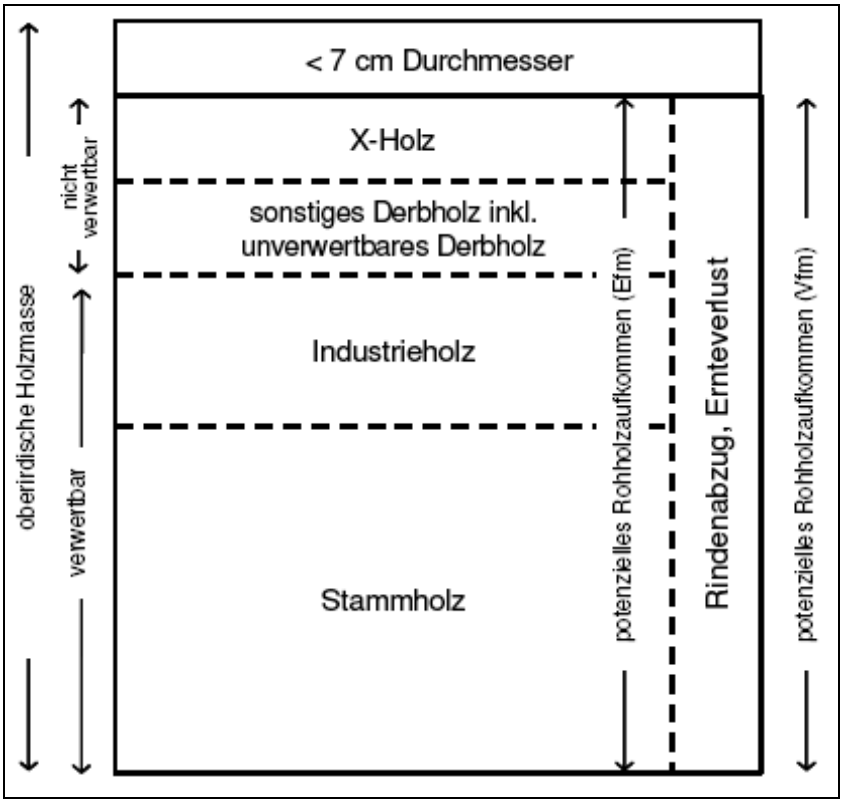


Abb. 4-7: Oberirdische Holzmasse und potenzielles Rohholzaufkommen (Quelle: vTI, nach POLLEY/KROIHER (2007))

Durch Kombination der regionalen Aufkommensmodellierung mit dem Sortierungsmodell kann auch die Sortenstruktur des Buchenholzpotenzials regional abgeschätzt und bei der nachfolgenden Standortanalyse berücksichtigt werden.

Für die Rohstoffversorgung der Bioraffinerie werden zunächst alle Sortimente mit Ausnahme von Laubstammholz ab der Klasse 3a (Mittendurchmesser ab 30 cm) berücksichtigt, weil davon ausgegangen werden kann, dass stärkeres Stammholz aufgrund des vergleichsweise hohen Preises in erster Linie von der Sägeindustrie genutzt wird. Der Schwerpunkt für die Versorgung der Bioraffinerie liegt, wie bereits erwähnt, auf den Sortimenten mit relativ niedrigem Preisniveau: dem Industrieholz und den Waldrestholzsortimenten.

Für die Potenzialanalyse der Bioraffinerie ist zu berücksichtigen, dass von den Waldrestholzsortimenten aufgrund naturaler, technischer und ökonomischer Restriktionen lediglich ein Teil des berechneten Aufkommens genutzt werden kann bzw. mobilisierbar ist. Um dies bei den nachfolgenden Berechnungen zu berücksichtigen, wird für die Waldrestholzsortimente neben dem Gesamtpotenzial auch ein durch Nutzungs- bzw. Mobilisierungshemmnisse um 50 % eingeschränktes Potenzial ausgewiesen.

Neben den Potenzialangaben der Bundeswaldinventur wird für die nachfolgenden Berechnungen zusätzlich das regionale Aufkommen an Sägenebenprodukten einbezogen. Sägenebenprodukte sind Koppelprodukte der Sägeindustrie. Hierzu zählen Hackschnitzel, Schwarten und Spreißel sowie Sägespäne. Im Vergleich zu frischem Waldholz sind die Sägenebenprodukte Hackschnitzel und Sägespäne in der Regel frei von Rinde und weisen eine geringere Feuchte auf. Bei gleichem oder geringerem Preisniveau als Waldholz sind Sägenebenprodukte demnach eine zusätzliche Rohstoffquelle für eine Lignocellulose-Bioraffinerie. Die Option einer Partnerschaft zwischen einem

großen Holz verarbeitenden Betrieb, der eine Lignocellulose-Bioraffinierie teilweise oder ganz mit Rohstoff versorgt, ist durchaus denkbar.

Die Daten für die regionalisierte Darstellung des Aufkommens an Sägenebenprodukten wurden aus der Struktur- und Marktanalyse der 1. Verarbeitungsstufe der Cluster-Studie Forst und Holz abgeleitet (OCHS et al., 2007).

AP4-3.1.2 Standortanalyse

Bei der regionalisierten Betrachtung zur Standortwahl wird zwischen einer Kernregion und einer erweiterten Region unterschieden. Die Kernregion umfasst die Fläche innerhalb eines Radius von etwa 100 km um einen gedachten Standort. Die erweiterte Region wird durch einen Radius von 200 km begrenzt.

Das Gebiet mit dem größten Potenzial an Buchenindustrie- und Buchenwaldrestholz in der Kernregion befindet sich in Nordhessen. Das Kerngebiet umfasst die in Abb. 4-8 (a) dunkel markierte Region. Das erweiterte Einzugsgebiet ist beige hervorgehoben.

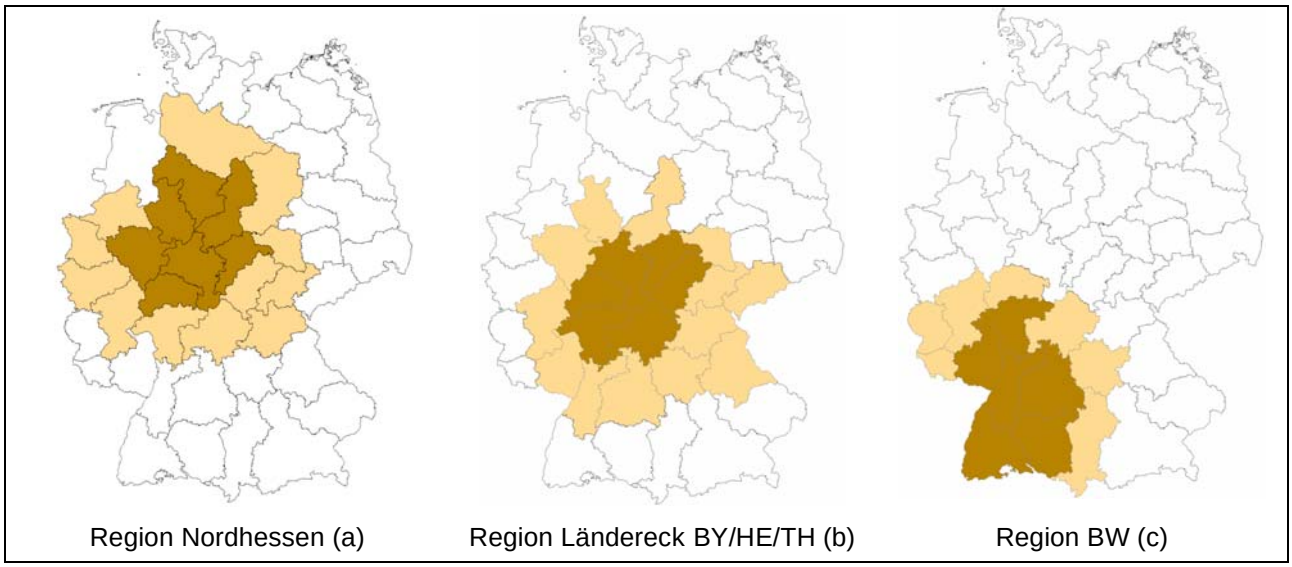


Abb. 4-8: Ausgewählte Regionen zur Standortanalyse (Quelle: VTI)

Das Gesamtaufkommen der Kernregion (ohne Nutzungseinschränkungen) im Zeitraum 2008 – 12 liegt bei 2,9 Mio. m^3. Unter Berücksichtigung der Nutzungseinschränkungen bei Waldrestholz reduziert sich der Wert auf 2,2 Mio. m^3. Mit dem erweiterten Einzugsgebiet erhöht sich das Gesamtpotential auf 5,6 Mio. m^3, bzw. 4,4 Mio. m^3 bei verringertem Potential (Tab. 4-1).

Tab. 4-1: Regionales Buchenholz-Aufkommen Nordhessen (Quelle: VTI)

Mio. m³	**Aufkommen**	
Region Nordhessen	**WRH + IH + SNP**	**WRH 50 % + IH + SNP**
Kerngebiet	2,889	2,229
Erweitertes Gebiet	2,703	2,119
Gesamtregion	5,592	4,348

WRH = Waldrestholz; IH = Industrieholz; SNP = Sägenebenprodukte

Ein weiterer potenzieller Bioraffineriestandort könnte im Dreiländereck Hessen, Bayern und Thüringen liegen. Dieses Gebiet weist das größte Potenzial in der Gesamtregion mit einem Radius von 200 km aus. Im Kerngebiet umfasst dies die Regierungsbezirke Kassel, Gießen, Darmstadt, Unterfranken, Thüringen-Mitte und Thüringen-Nordwest. In der erweiterten Region zählen die Regierungsbezirke Braunschweig, Detmold, Arnsberg, Koblenz, Rheinhessen-Pfalz, Karlsruhe, Stuttgart, Mittelfranken, Oberpfalz, Oberfranken, Thüringen-Südost, Chemnitz und Halle dazu (Abb. 4-8 (b)). Das Aufkommen (ohne Nutzungseinschränkungen) liegt hier bei 6,6 Mio. m³. Bei eingeschränkter Nutzung der Waldrestholzsortimente liegt das Aufkommen bei 5,2 Mio. m³. Das Aufkommen im Kerngebiet um diesen Standort ist mit 2,7 Mio. m³ geringfügig niedriger als in der Kernregion Nordhessen (Tab. 4-2).

Tab. 4-2: Regionales Buchenholzaufkommen Dreiländereck Bayern/Hessen/ Thüringen (Quelle: VTI)

Mio. m³	**Aufkommen**	
Region BY/HE/TH	**WRH + IH + SNP**	**WRH 50 % + IH + SNP**
Kerngebiet	2,710	2,131
Erweitertes Gebiet	3,933	3,072
Gesamtregion	6,642	5,203

WRH = Waldrestholz; IH = Industrieholz; SNP = Sägenebenprodukte

Als drittes Gebiet mit hohem Buchenholzaufkommen wird eine Region in Baden-Württemberg betrachtet. Das Kerngebiet umfasst die Regierungsbezirke Karlsruhe, Darmstadt, Rheinhessen-Pfalz, Freiburg, Tübingen und Stuttgart. In der erweiterten Region sind die Regierungsbezirke Gießen, Koblenz, Trier, Saarland, Schwaben, Mittelfranken und Unterfranken dazuzuzählen (Abb. 4-8 (c)).

Im Kerngebiet berechnet sich das Gesamtaufkommen auf 2,9 Mio. m³. In der erweiterten Region erhöht sich der Wert auf 5,0 Mio. m³. Unter Berücksichtigung von Nutzungs- und Mobilisierungshemmnissen reduziert sich das Aufkommen im Kerngebiet auf 2,3 Mio. m³ und in der Gesamtregion auf 3,9 Mio. m³ (Abb. 4-8 (c)).

Tab. 4-3: Regionales Buchenholz-Aufkommen Baden-Württemberg (Quelle: VTI)

Mio. m^3	**Aufkommen**	
Region BW	**WRH + IH + SNP**	**WRH 50 % + IH + SNP**
Kerngebiet	2,867	2,267
Erweitertes Gebiet	2,134	1,651
Gesamtregion	5,001	3,918

WRH = Waldrestholz; IH = Industrieholz; SNP = Sägenebenprodukte

Neben den o. a. Regionen, die wegen des großen regionalen Buchenholzpotenzials für die Ansiedlung einer Lignocellulose-Bioraffinierie in Frage kommen, kann bei einer Standortanalyse auch die Option geprüft werden, eine Lignocellulose-Bioraffinerie in der Nähe eines Sägewerksbetriebs mit einem hohen Buchenholz-Einschnitt anzusiedeln, um deren Aufkommen an Sägenebenprodukten in die Versorgungskonzeption einbeziehen zu können. Sägewerksbetriebe mit einer ausreichend hohen Einschnittskapazität befinden sich in:

- Mecklenburg-Vorpommern,
- Thüringen
- und Bayern

Während sich der Betrieb in Mecklenburg-Vorpommern in einer Region mit vergleichsweise niedrigem Buchenholzpotenzial befindet, sind die anderen Betriebe in der Region Bayern/Hessen/ Thüringen angesiedelt. Zu beachten ist, dass sich in der Nähe des bayrischen Standortes bei Aschaffenburg ein Zellstoffwerk befindet, das ausschließlich die Holzart Buche verwendet. Wie das nachfolgende Kapitel zeigt, besteht damit zwar die Möglichkeit eine Bioraffinerie in der Nähe eines der bestehenden Sägewerke anzusiedeln und mit diesem zu kooperieren, die Ansiedlung einer zweiten Bioraffinerie in den Regionen ist aber aufgrund der bereits existierenden Nachfrager nach Buchenholz keine Option.

Um abschätzen zu können, wie viele Lignocellulose-Bioraffinerien auf der Basis Buchenholz insgesamt in Deutschland nachhaltig mit Rohstoff versorgt werden könnten, wird im nachfolgenden Kapitel dem theoretischen Buchenholzaufkommen der derzeitige Verbrauch gegenübergestellt.

AP4-3.1.3 Nutzungskonkurrenz

Für eine umfassende Betrachtung der Verfügbarkeit von Buchen-Rohholz zur Versorgung einer Bioraffinerie müssen neben den Rohstoffpotenzialen auch bereits bestehende Nutzungsstrukturen berücksichtigt werden, die in Konkurrenz zu der geplanten Anlage stehen. Zu diesem Zweck wird die Methodik der Holzrohstoffbilanzierung angewendet (MANTAU, 2004). Dazu wird den regionalen Aufkommenspotenzialen der Verbrauch gegenübergestellt. Als Bezugsjahr für die Berechnungen der Verbraucher wird 2006 angenommen. Für eine Nutzungskonkurrenz sind vor allem die Sektoren relevant, die Industrieholz, Sägenebenprodukte und Waldrestholz einsetzen. Dies sind einerseits die Holzwerkstoffindustrie und die Holz- und Zellstoffindustrie als stoffliche Nutzer sowie Biomassefeuerungen und private Haushalte, welche Holz zur Strom- und Wärmegewinnung einsetzen.

Zu beachten ist, dass die Berechnungen für die Nutzungskonkurrenz in den Regionen keine geschlossene Bilanz darstellen können. Dazu wäre es notwendig, den Außenhandel der jeweils betrachteten Region mit abzubilden wie dies z. B. auf Bundesebene möglich ist. Bei regionalen Be-

trachtungen kann der Mengenaustausch über die betrachteten Grenzen hinweg jedoch nicht bestimmt werden. Dies ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen. So kann die Versorgung von industriellen Standorten, die innerhalb der Region liegen, durch Rohstoffe von außerhalb erfolgen. Ebenso ist es beim umgekehrten Fall, dass sich Standorte außerhalb der Region mit Mengen aus dem betrachteten Gebiet versorgen. Mit einer regionalen Bilanzierung (bzw. einer Bilanzierung ohne Berücksichtigung des Außenhandels) können daher nicht die tatsächlichen Verbrauchsstrukturen für die Region nachgezeichnet werden, sondern lediglich die Aufkommens- und Nachfragemengen der regionalen Marktteilnehmer.

Die Daten der industriellen stofflichen Verwerter der Holzwerkstoff- und der Holz- und Zellstoffindustrie werden aus den Studien von SÖRGEL und MANTAU abgeleitet (2006a, 2006b). Ein wieterer industrieller Nachfrager von Buche ist die Sägeindustrie. Deren Fokus liegt jedoch auf Stammholz-Sortimenten, die für das Versorgungskonzept der Bioraffinerie nicht berücksichtigt werden. Die im Produktionsprozess anfallenden Sägenebenprodukte bedeuten jedoch eine Rohstoffquelle, die in den weiteren Berechnungen zu berücksichtigen sind. Als Datengrundlage für die Sägeindustrie dient die Cluster-Studie Forst und Holz, die Einschnittzahlen von Rundholz der Sägeindustrie auf regionaler Ebene ausweist (OCHS et al., 2007). Über technische Koeffizienten der Sägeproduktion (nach SÖRGEL et al., 2006) kann das Aufkommen der Buche-Sägenebenprodukte bestimmt werden.

Im Gegensatz zu den industriellen stofflichen Verwertern liegen für die energetische Verwertung keine Regionaldaten für den Laubholz- oder Buchenholzverbrauch vor. Für den bundesweiten Verbrauch der Energiesektoren stehen Untersuchungen von WEIMAR/MANTAU (2006), MUSIALCZYK/MANTAU (2007) und MANTAU/SÖRGEL (2006) zur Verfügung. Ausgehend von diesen Angaben wird ein Laubholz- bzw. Buchenanteil am Gesamtverbrauch für das Jahr 2006 ermittelt und anhand der forstlichen Potenzialstruktur auf regionale Verbrauchsdaten übertragen. Die Ergebnisse der regionalen Bilanzierungen werden in den nachfolgenden Tabellen für eine bessere Vergleichbarkeit innerhalb des Projektes in der Masseeinheit Tonne, absolut trocken (atro) dargestellt.

In der Region Nordhessen liegt der Verbrauch im Kerngebiet bei 0,9 Mio. t atro. Im erweiterten Gebiet erhöht sich dieser Wert um 1,1 Mio. t atro auf 2 Mio. t atro. Als Saldo in der Kernregion berechnet sich beim vollständigen Waldrestholzpotenzial ein Wert von 0,7 Mio. t atro in der Kernregion bzw. 1,1 Mio. t atro in der erweiterten Region. Reduziert man das Waldrestholz-Potential um 50 % reduziert sich die verfügbare Menge auf 0,3 Mio. t atro bzw. 0,5 Mio. t atro (Tab. 4-4).

Tab. 4-4: Bilanzierung in der Region Nordhessen

Mio. t atro	Aufkommen		Verbrauch	Saldo	
Region Nordhessen	**WRH+IH+SNP**	**WRH 50 %**		**WRH100%**	**WRH50%**
Kerngebiet	1,612	1,244	0,912	0,700	0,332
Erweitertes Gebiet	1,508	1,182	1,063	0,446	0,120
Gesamtregion	3,121	2,426	1,974	1,146	0,452

WRH = Waldrestholz; IH = Industrieholz; SNP = Sägenebenprodukte

Die Bilanzierung in der Region des Länderecks Bayern/Hessen/Thüringen stellt Tab. 4-5 dar. Der Verbrauch in der Kernregion im Ländereck liegt bei 0,9 Mio. t atro. In der erweiterten Region erhöht sich der Wert auf 2,4 Mio. t atro. Der Saldo beträgt damit bei vollständigem Waldrestholzpotential 0,6 Mio. t atro in der Kernregion und 1,3 Mio. t atro im erweiterten Einzugsgebiet. Bei reduziertem Waldrestholzpotential verringert sich der Saldo auf 0,3 Mio. t atro bzw. 0,5 Mio. t atro.

Tab. 4-5: Bilanzierung in der Region Ländereck Bayern/Hessen/Thüringen

Mio. t atro	Aufkommen		Verbrauch	Saldo	
Region BY/HE/TH	**WRH+IH+SNP**	**WRH 50 %**		**WRH100%**	**WRH50%**
Kerngebiet	1,512	1,189	0,929	0,583	0,260
Erweitertes Gebiet	2,194	1,714	1,434	0,761	0,281
Gesamtregion	3,706	2,904	2,363	1,344	0,541

WRH = Waldrestholz; IH = Industrieholz; SNP = Sägenebenprodukte

Die Bilanz der Region Baden-Württemberg zeigt Tab. 4-6. Der Verbrauch in der Kernregion liegt bei 1 Mio. t atro bzw. 1,9 Mio. t atro in der 200-km-Region. Der Saldo bei vollständigem Potenzial berechnet sich auf 0,6 Mio. t atro in der Kernregion und auf 0,9 Mio. t atro in der erweiterten Region. Bei einer Reduzierung des Waldrestholzpotenzials beträgt der Saldo 0,3 Mio. t atro sowohl in der Kernregion als auch in der erweiterten Region, da das erweiterte Gebiet eine ausgeglichene Bilanz aufweist.

Tab. 4-6: Bilanzierung in der Region Baden-Württemberg

Mio. t atro	Aufkommen		Verbrauch	Saldo	
Region BY/HE/TH	**WRH+IH+SNP**	**WRH 50 %**		**WRH100%**	**WRH50%**
Kerngebiet	1,600	1,265	0,982	0,618	0,283
Erweitertes Gebiet	1,191	0,921	0,921	0,269	0,000
Gesamtregion	2,791	2,186	1,904	0,887	0,283

WRH = Waldrestholz; IH = Industrieholz; SNP = Sägenebenprodukte

Die Gegenüberstellung von Buchenholz-Aufkommen und -verbrauch macht deutlich, dass nur in den Regionen Nordhessen und Dreiländereck Bayern/Hessen/Thüringen das Buchenholz-Aufkommen groß genug ist, um jeweils eine Lignocellulose-Bioraffinerie mit 400.000 t atro Jahresbedarf zusätzlich zu den schon vorhandenen Verbrauchern nachhaltig mit Rohstoff zu versorgen. Nur in diesen beiden Regionen stehen rechnerisch jährlich jeweils rund 500.000 t atro Buchenholz zur Verfügung. In der Region Baden-Württemberg reicht das Aufkommen bei Berücksichtigung der vorhandenen Verbraucher nicht aus.

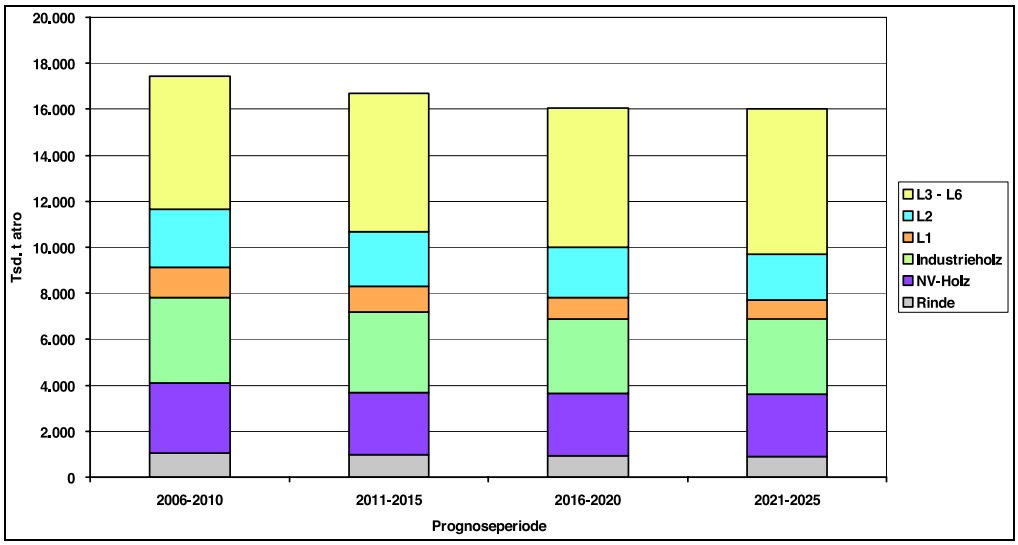


Abb. 4-9: Entwicklung des Buche-Rohholzpotenzials bis zum Jahr 2025 (Quelle: vTI)

Ein Ausblick des Buche-Rohholzpotenzials bis ins Jahr 2025 (Abb. 4-9) zeigt, dass sich das Buchenholz-Aufkommen gemäß der Holzaufkommensmodellierung in den nächsten Jahrzehnten nur geringfügig verringern wird. Vor allem das Aufkommen von Industrie- und Waldrestholz (NV-Holz) bleibt nahezu unverändert. Für die nachhaltige Versorgung einer Lignocellulose-Bioraffinerie steht also mittelfristig ausreichend Rohstoff zur Verfügung.

AP4-3.1.4 Buchenholz-Bereitstellung

Für die Bereitstellung von Waldholz gibt es unterschiedliche Systeme, die sich hinsichtlich eingesetzter Technik und Verfahren unterscheiden. Grundsätzlich kann zwischen Rundholz- und Hackschnitzelketten unterschieden werden. Da in der im Kapitel AP4-5 skizzierten Anlage Hackschnitzel eingesetzt werden sollen, werden nachfolgend Technik, Arbeitsabläufe und Bereitstellungskosten von Waldhackschnitzeln detaillierter beschrieben und analysiert.

Eine Bereitstellungskette für Waldhackschnitzel untergliedert sich in die Bereiche Ernte und ggf. Vorliefern, Hackschnitzelproduktion, Rücken und Transport zur Raffinerie. Zur Ernte von Waldholz sind das Fällen des Baumes und das Rücken vom Fällort zur Waldstraße notwendig. Eine zusätzliche Untergliederung in Vorliefern wird dann vorgenommen, wenn der Transport nach dem Fällen in zwei Arbeitsschritten mit unterschiedlichen Geräten und Verfahren erfolgt (DREINER et al., 1994). Je nach Erntesystem oder Anforderungen an den Rohstoff kann es erforderlich sein, die Aufarbeitung des geernteten Holzes in Form von Entasten, Zopfen, Ablängen oder auch Entrinden gesondert zu betrachten.

Beim Hackvorgang wird das Holz mechanisch auf die erforderliche Größe zerkleinert. Die Produktion der Hackschnitzel kann entweder direkt im Bestand (auf der Rückegasse), mit dem gerücktem Material an der Waldstraße oder am Anlagestandort erfolgen. Der Transport umfasst die Materialbewegung von der Waldstraße zum Anlagestandort.

Die gesamte Rohstoffbereitstellung muss an die spezifischen Erfordernisse des forstlichen Bestandes, der Transportmöglichkeiten und der Rohstoffqualität angepasst sein. Bei der Rohstoffqualität ist zu berücksichtigen, ob eine Entrindung des Materials erforderlich ist. Dies hat Auswirkungen auf

die Eingliederung des Hackvorgangs in die Bereitstellungskette. Ist eine Entrindung erforderlich, wird neben der Entrindung auch der Hackvorgang am Anlagestandort auszuführen sein.

AP4-3.1.5 Ernte

Für die Produktion von Waldhackschnitzeln werden in der Regel Schwachholzsortimente und das sogenannte Waldrestholz, das sich aus „nicht verwertbaren“ (NV)-Sortimenten und zum Teil auch Nicht-Derbholz (Durchmesser < 7 cm) zusammensetzt, genutzt. Die nachfolgenden Ausführungen stellen daher zunächst Leistung und Kosten zur Gewinnung von Waldhackschnitzeln dar.

AP4-3.1.5.1 Waldhackschnitzel

Eine breite Übersicht möglicher Ernteverfahren stellen die Untersuchungen der Bayerischen Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft (LWF) in Freising dar. In den Arbeiten von WITTKOPF et al., (2003) bzw. WITTKOPF (2005), die auf Studien von REMLER/FISCHER (1996) und DREINER et al. (1994) aufbauen, werden verschiedene Bereitstellungsketten von Waldhackschnitzeln behandelt. Die einzelnen Produktionsabläufe der Ernte werden zu Erntesystemen kombiniert, die sich vor allem hinsichtlich der Anforderungen an die benötigte Erntetechnik unterscheiden. Bei den angeführten Erntesystemen ist das Hacken des Materials meist integrierter Bestandteil der Prozesskette. Die Leistungsdaten der Prozessschritte sind in Schüttraummeter angegeben. Als Kalkulationsgrundlage für die Berechnungen werden maschinenspezifische Kosten sowie die zum Zeitpunkt der Untersuchungen aktuellen Lohnsätze unterstellt. Als Eigenleistung von Waldbesitzern bzw. bei Maschinenringeinsatz werden 10 € je Stunde, als Unternehmereinsatz 25 € je Stunde angesetzt.

Den größten Einfluss auf die Leistung einer Erntemaßnahme hat, bei sonst gleichen Parametern (z. B. Topografie oder Größe des Bestandes), der Brusthöhendurchmesser (BHD) des ausscheidenden Bestandes. Je größer der BHD desto größer die Leistung. Für einen differenzierteren Vergleich der unterschiedlichen Erntesysteme werden daher die Ergebnisse für die BHD-Werte 10, 15 und 20 cm angegeben. Unterschiede ergeben sich bei dieser Betrachtung vor allem auch durch den Mechanisierungsgrad des Ernteprozesses. Die Erntesysteme umfassen Ernte und Rücken des Materials zur Waldstraße sowie das Hacken des Materials.

Insgesamt stellt WITTKOPF (2005) zehn verschiedene Verfahren vor:

1. Fällen mit Motorsäge, Vorliefern von Hand, Hacken auf der Rückegasse mit Anbauhacker (teilmechanisiert)
2. Fällen mit Motorsäge, Vorliefern/Rücken mit Seilschlepper im Seillinienverfahren, Hacken auf Waldstraße mit kranbeschicktem Anhängehacker (teilmechanisiert)
3. Fällen mit Motorsäge, Vorliefern mit Seilschlepper im Seillinienverfahren, Rücken mit Rückewagen, Hacken auf Waldstraße mit kranbeschicktem Anhängehacker (teilmechanisiert)
4. Fällen mit Motorsäge, Vorliefern mit Zangenschlepper aus Zangenzone und mit Seilschlepper aus Seilzone, Rücken mit Zangenschlepper, Hacken auf Waldstraße mit kranbeschicktem Anhängehacker (teilmechanisiert)
5. Fällen mit Motorsäge, Vorliefern mit Seilschlepper im Seillinienverfahren, Hacken auf der Rückegasse und rücken zur Waldstraße mit kranbeschicktem Aufbauhacker (teilmechanisiert)
6. Fällen, Aufarbeiten, Vorliefern mit Harvester; Rücken mit Forwarder; Hacken auf Waldstraße mit Großhacker auf LKW (vollmechanisiert)
7. Fällen, Aufarbeiten, Vorliefern, Hacken mit Hackschnitzel-Harvester; Rücken mit Transportfahrzeug (Shuttle) zur Waldstraße (vollmechanisiert)

8. Fällen, Aufarbeiten, Vorliefern mit Mehrfachfällkopf; Rücken mit Forwarder; Hacken auf Waldstraße mit Großhacker auf LKW (vollmechanisiert)
9. Nach Rücken des Stammholzes: Aufsammeln der Kronen mit Rückewagen; Hacken mit Anhängehacker auf Waldstraße (vollmechanisiert)
10. Nach Rücken des Stammholzes: Aufsammeln der Kronen durch Forwarder und Konzentration an Waldstraße; Bündeln durch Bündelmaschinen; Hacken der Bündel auf der Waldstraße mit Großhacker auf LKW (vollmechanisiert)

Tab. 4-7 gibt eine Übersicht der Leistung der verschiedenen Verfahren nach BHD.

Tab. 4-7: Vergleich der Leistung der Erntesysteme nach BHD (Quelle: Berechnungen vTI nach WITTKOPF (2005))

Ernte bis Waldstr. inkl. Hacken	Verfahren - Leistung									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BHD	[Srm/h]									
10 cm	1,58	2,30	3,90	2,14	5,22	4,29	5,98	4,40	5,66	5,80
15 cm	1,85	3,61	6,21	3,42	10,57	8,89	10,07	8,01	9,17	8,71
20 cm	1,97	4,72	7,83	4,41	15,79	12,69	12,31	11,26	11,36	10,55

Beim Leistungsvergleich zeigt sich, dass die höher mechanisierten Verfahren deutlich produktiver sind als die geringer mechanisierten Verfahren. Einzig das Verfahren 5 mit dem Hackvorgang auf der Rückegasse zeigt Leistungswerte wie die vollmechanisierten Ernteverfahren. Bei einem BHD von 10 cm fallen die Unterschiede geringer aus als bei größeren BHD-Werten. Die höher mechanisierten Prozesse erreichen vor allem bei größeren BHD-Werten deutliche Produktivitätsvorteile.

Tab. 4-8 stellt die Kosten der verschiedenen Erntesysteme in Abhängigkeit vom BHD dar. Bei den Verfahren 1 bis 3 wurde als Kalkulationsgrundlage ein Maschinenringsatz bzw. eine Eigenleistung von 10 € je Stunde unterstellt. Die übrigen Verfahren wurden mit Lohnsätzen von 25 € berechnet.

Tab. 4-8: Vergleich der Kosten der Erntesysteme nach BHD (Quelle: Berechnungen vTI nach Wittkopf (2005))

Ernte bis Waldstr. inkl. Hacken	Verfahren - Kosten									
	Teilmechanisiert					Vollmechanisiert				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BHD	[Eur/t_{atro}]									
10 cm	48,56	60,18	68,17	76,94	110,89	119,86	105,72	113,58	67,29	100,28
15 cm	41,84	43,01	44,68	59,45	68,43	55,01	55,51	60,63	41,51	75,74
20 cm	39,54	35,49	36,14	50,23	49,63	37,74	42,13	42,50	33,52	67,07

Die Kostenberechnung der Erntesysteme zeigt, entsprechend der Leistungsdaten aus Tab. 4-7, eine deutliche Abhängigkeit vom BHD. Mit steigendem BHD und damit steigender Stück-Masse verringern sich die Erntekosten zum Teil deutlich. Bei den teilmechanisierten Verfahren fällt die

Kostenverringerung etwas geringer aus als bei den höher mechanisierten Verfahren. Bei Anstieg des BHD von 10 auf 20 cm reduzieren sich die Kosten um bis zu zwei Drittel.

Die Berechnungen zu den Erntesystemen in Tab. 4-8 beinhalten neben den Erntekosten auch die Hackkosten. Der Anteil der Hackkosten an den Verfahrenskosten schwankt zum Teil erheblich. Tab. 4-9 gibt dazu eine Übersicht. Für die Verfahren 5 (Hacken auf der Rückegasse) und 7 (Hackschnitzel-Harvester) können die Hackkosten nicht separat dargestellt werden.

Tab. 4-9: Anteil der Hackkosten an den Erntekosten (Quelle: Berechnungen vTI nach Wittkopf (2005))

Ernte bis Waldstr. inkl. Hacken	Anteil Hackkosten									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BHD	[Eur/t_{atro}]									
10 cm	41,0%	25,1%	22,2%	23,9%	-	20%	-	21,4%	27,3%	24,3%
15 cm	47,6%	35,1%	33,8%	30,9%	-	26%	-	23,7%	44,2%	19,0%
20 cm	50,4%	42,6%	41,8%	36,5%	-	27%	-	24,0%	54,8%	15,2%

Der Anteil der Hackkosten am gesamten Erntevorgang der beschriebenen Bereitstellungssysteme liegt je nach Verfahren zwischen 15 % und 55 %. Bei den teilmechanisierten Verfahren (1 bis 4) erhöht sich der Anteil mit steigendem BHD um 10 % bis 20 %. Bei den beiden vollmechanisierten Verfahren (6 und 8) beträgt die Erhöhung des Anteils nur 3 % bis 7 %. Dies verdeutlicht, dass mit steigendem BHD des ausscheidenden Bestandes vor allem die Ernteleistung erhöht werden kann, während die Hackerleistung nicht in gleichem Maß durch den BHD beeinflusst wird.

AP4-3.1.6 Untersuchungen in Laubholzbeständen

CREMER et al. (2006) untersuchten die Ernte von Scheitholz und Waldhackschnitzeln in einem Laubholzbestand. Das Fällen erfolgte durch einen Forwarder mit Fällgreifer. Das Fällaggregat kann Ablängen, jedoch keine weiteren Aufarbeitungsmaßnahmen durchführen. Die Untersuchung erfolgte in zwei Beständen mit unterschiedlichem Rückegassenabstand (40 m und 20 m). Die BHD der ausscheidenden Bestände lagen bei 19,0 cm und 17,3 cm. Die beiden ausgehaltenen Sortimente Scheitholz und Hackmaterial wurden jeweils getrennt zur Waldstraße gerückt und gepoltert. Die Ergebnisse der Studie fasst Tab. 4-10 zusammen.

Tab. 4-10: Vergleich der Ernte- und Hackkosten in zwei Laubholzbeständen (Quelle: CREMER et al. (2006))

Erntekosten frei Waldstraße	Brennholz	Hackmaterial		
	Ernte	Ernte	Hacken	Anteil
	[€/t_{atro}]	[€/t_{atro}]	[€/t_{atro}]	[%]
BHD 19,0 cm: Fällen	27,4	48,4		
Vorliefern Rückegasse	25,4	16,1		
BHD 19,0 cm (Gasse 40 m) Gesamt	52,9	64,5	18,5	22,2
BHD 17,3 cm (Gasse 20 m)	52,3	47,7	17,6	26,9

Für die Ernte von Scheitholz liegen die Kosten zwischen 52 bis 53 € je Tonne atro. Für die Ernte von Waldhackschnitzeln fallen Kosten von 48 € bzw. 65 € je Tonne atro an. Hier ist jedoch zu berücksichtigen, dass sich die Bestände deutlich unterscheiden. Der Bestand mit einem Rückegassenabstand von 40 m hat einerseits eine deutlich höhere Stück-Masse andererseits aber höhere Erntekosten durch das erforderliche Vorliefern. Die Hackkosten liegen in beiden Beständen bei etwa 18 €/t atro. Der Anteil an den Gesamtkosten für die Hackschnitzel liegt damit bei 22 % bzw. 27 %.

In einer weiteren Untersuchung widmen sich LECHNER et al. (2007) der Frage, wie sich der Hackort auf die Kosten von Waldhackschnitzeln auswirkt (Tab. 4-11). Untersucht wurden die beiden alternativen Hackorte im Bestand und an der Waldstraße. In den Versuchsbeständen sollte zunächst Buchen-Industrieholz ausgehalten werden. Für die Produktion von Waldhackschnitzeln wurde das restliche nicht für die Aushaltung von Industrieholz verwertbare Derbholz und Kronenmaterial genutzt. Die Untersuchungen wurden in drei verschiedenen Beständen mit unterschiedlicher Baumartenverteilung durchgeführt.

Tab. 4-11: Erntekosten von NV-Holz und Kronenmaterial (Quelle: LECHNER et al. (2007))

	Bestand 1		Bestand 2		Bestand 3	
Baumartenanteile	Bu 97/Fi 3		Bu 65/Fi 15/Lä 20		Bu 57/Lä 40/Fi 3	
mittl. BHD ausscheidender Bestand	16,6 cm		21,0 cm		17,4 cm	
Hackort	Bestand	Waldstr	Bestand	Waldstr	Bestand	Waldstr
Einschlag/Aufarbeitung	1,82	1,82	2,99	1,91	2,40	2,19
Vorliefern	3,64	3,64	2,09	3,34	3,33	3,33
Rückekosten [€/Srm]	-	4,49	-	3,51	-	3,58
Hackkosten [€/Srm]	7,35	3,82	7,32	3,12	6,03	5,04
Ermtekosten Gesamt [€/Srm]	12,81	13,77	12,40	11,88	11,76	14,14
Gesamtkosten [€/t atro]	57,39	61,69	55,56	53,23	52,69	63,35

Die Gesamtkosten für Waldhackschnitzel frei Waldstraße liegen zwischen 53 und 63 € je t atro. In zwei von drei Fällen sind die Kosten beim Hacken im Bestand niedriger als beim Hacken an der Waldstraße. Für eine weitergehende Interpretation der Zahlen ist jedoch zu berücksichtigen, dass die mittlere Rückeentfernung bei der Verfahrensvariante Hacken an der Waldstraße zwischen

21 % und 129 % höher lag als bei der Alternativvariante Hacken im Bestand. In diesen Fällen sind die Rückekosten in den Hackkosten enthalten und müssten für eine bessere Vergleichbarkeit der Daten angepasst werden.

AP4-3.1.7 Waldhackschnitzeltransport

Der Transport umfasst die Strecke von der Waldstraße zum Holz verarbeitenden Betrieb. In der Regel werden für den Holztransport LKW eingesetzt. Auf längeren Strecken (> 200 km) und für größere Mengen kommen aber auch Züge und Schiffe zum Einsatz. Für kurze Entfernungen (< 50 km) sind auch landwirtschaftliche Schlepper für den Transport von Waldhackschnitzeln eine Alternative (LEIBLE et al., 2007).

Der Transport von Waldhackschnitzeln erfolgt am rationellsten mit einem Abrollcontainer-Transportsystem (ACTS). Dieses System besteht aus 2 – 4 Containern pro LKW. Während 1 oder 2 Container zum Beladen an der Waldstraße abgesetzt werden, fährt der LKW mit 1 oder 2 befüllten Containern zum Holz verarbeitenden Betrieb. Leistung und Kosten eines solchen Systems in Abhängigkeit von der Transportentfernung sind in Abb. 4-10 dargestellt[3].

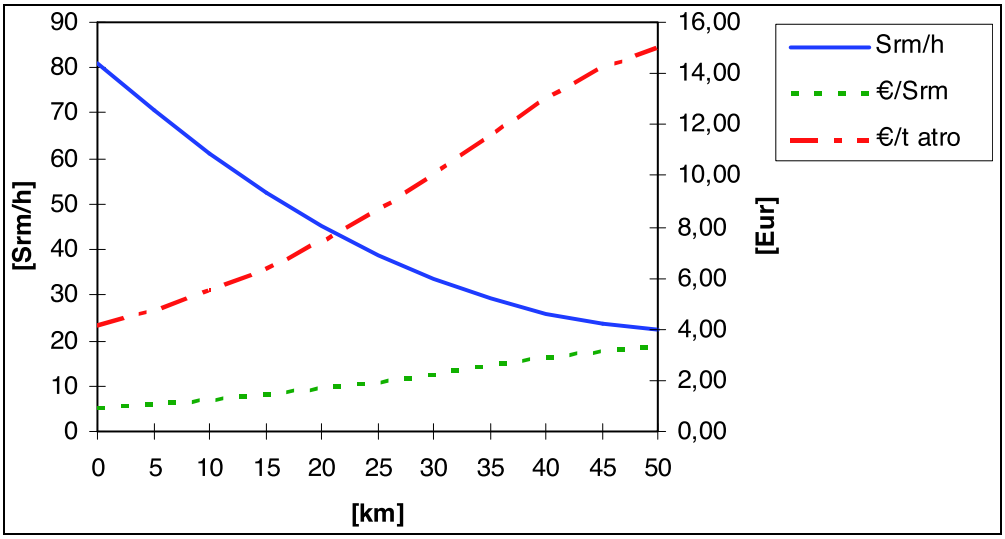


Abb. 4-10: Leistung und Kosten des Hackschnitzeltransports mit LKW und zwei Container (Quelle: nach WITTKOPF (2005))

Wie Abb. 4-10 zeigt, liegen die Transportkosten bei einer Entfernung von 30 km bei 2,24 € je Srm bzw. 10 € je t atro. Bei einer Entfernung von 50 km erhöhen sich die Kosten auf 3,35 € je Srm bzw. 15 € je t atro. Das Transportmittel, ein LKW mit Anhänger, hat eine Ladekapazität von 70 bis 80 m³ bzw. 35 bis 40 m³ je Container. Die Zuladung bei diesem Transportsystem liegt bei maximal 22 Tonnen. Bei einem Wassergehalt von 50 % können somit 11 Tonnen atro Buchenhackschnitzel

[3] Die Leistungsdaten basieren auf Untersuchungen von PATZAK (1984), der dazu anmerkt, dass es sich um erste und nur wenige Versuche handele

transportiert werden. Dies entspricht wiederum etwa 49 Srm. Bei geringerem Wassergehalt kann ein entsprechend höherer Anteil der Trockenmasse transportiert werden.

WITTKOPF et al. (2003) untersuchen neben dem Transport von Hackschnitzel auch den Transport von Hackgut in Form von Vollbäumen oder baumfallenden Längen (betrachtet worden sind hier nur Nadelbäume). Die Leistung dieser Variante liegt mit 11 Srm/h bei einer Entfernung von 10 km, 7,5 Srm/h bei einer Entfernung von 30 km und 5 Srm/h bei 50 km um den Faktor vier bis fünf niedriger als beim Hackschnitzeltransport. Entsprechend höher sind die Kosten: Gut 8 €/Srm bei 30 km und knapp 12 €/Srm bei 50 km. Den Berechnungen von WITTKOPF et al. (2003) und WITTKOPF (2005) liegen Kostensätze für das Transportmittel LKW mit Anhänger von 50 € pro Stunde zuzüglich Lohnkosten von 25 € pro Person und Stunde zugrunde.

Weitere Berechnung zu Transportkosten stellen LEIBLE et al. (2007) an. Untersucht wird dabei ebenfalls das System eines LKWs mit Anhänger zum Containertransport von Hackschnitzeln. Die Kosten nach diesen Berechnungen liegen bei 18 €/t atro für eine Entfernung von 30 km, bei 24 €/t atro bei einer Entfernung von 50 km und bei 34 €/t atro bei einer Entfernung von 100 km. Bei diesen Berechnungen wird ein Wassergehalt der Waldhackschnitzel von 50 % unterstellt. Die Gesamtkosten für einen 100-km-Transport inkl. leerer Rückfahrt werden mit 320 € angegeben.

LEIBLE et al. (2007) nehmen weiterhin Vergleichsrechnungen für Waldhackschnitzel mit einem Wassergehalt von 35 % vor. Gegenüber 9 Tonnen atro je Fracht bei 50 % Wassergehalt erhöht sich der Wert nun auf über 12 t atro. Tab. 4-12 gibt in einer Übersicht die Ergebnisse der angeführten Studien wieder.

Tab. 4-12: Kostenübersicht für den LKW-Transport von Hackschnitzeln und Hackgut (Quelle: WITTKOPF et al. (2003), WITTKOPF (2005), LEIBLE et al. (2007))

	Bestand 1		Bestand 2		Bestand 3	
Baumartenanteile	Bu 97/Fi 3		Bu 65/Fi 15/Lä 20		Bu 57/Lä 40/Fi 3	
mittl. BHD ausscheidender Bestand	16,6 cm		21,0 cm		17,4 cm	
Hackort	Bestand	Waldstr	Bestand	Waldstr	Bestand	Waldstr
Einschlag/Aufarbeitung	1,82	1,82	2,99	1,91	2,40	2,19
Vorliefern	3,64	3,64	2,09	3,34	3,33	3,33
Rückekosten [€/Srm]	-	4,49	-	3,51	-	3,58
Hackkosten [€/Srm]	7,35	3,82	7,32	3,12	6,03	5,04
Ermtekosten Gesamt [€/Srm]	12,81	13,77	12,40	11,88	11,76	14,14
Gesamtkosten [€/t atro]	57,39	61,69	55,56	53,23	52,69	63,35

Die Gegenüberstellung zeigt, dass der Transport von Hackgut in Form von Vollbäumen (Hackgut) etwa zwei- bis dreimal so hohe Kosten verursacht wie der von Hackschnitzeln.

Mautgebühren sind bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt. Überschlägig kann bei längeren Strecken etwa 1,50 Euro je Tonne addiert werden. Tab. 4-13 zeigt eine Übersicht der Mautsätze für LKW-Transporte.

Tab. 4-13: Mautsätze pro Kilometer (ab 01. Januar 2009) (Quelle: Toll Collect (2008))

Schadstoffklasse	Kategorie A	Kategorie B	Kategorie C
Bis zu drei Achsen*	0,141 €	0,169 €	0,190 €
Vier oder mehr Achsen*	0,155 €	0,183 €	0,204 €

* Die Tandem-Achse zählt als zwei Achsen, die Tridem-Achse zählt als drei Achsen. Lift- und Hubachsen werden stets berücksichtigt, unabhängig davon, ob eine Fahrzeugachse während der Beförderung beansprucht oder hochgefahren ist, also keinen Fahrbahnkontakt hat.

AP4-3.1.8 Zusammenfassende Bewertung

Wie die vorgestellten Untersuchungen zeigen, gibt es kein eindeutig überlegenes Ernteverfahren. Der mittlere BHD des ausscheidenden Bestandes, die Bestandesstruktur und die topographischen Verhältnisse bestimmen den möglichen Mechanisierungsgrad des Ernteverfahrens und die daraus resultierenden Erntekosten. Bei jungen Beständen mit geringem mittleren BHD liegen die Erntekosten häufig unter den zu erzielenden Marktpreisen für Industrie- und/oder Waldhackschnitzel. Dies ist besonders bei der Mobilisierung von Holz aus dem Kleinprivatwald von Bedeutung, da kleine Waldbesitzer kein Interesse daran haben, notwendige Durchforstungen durchzuführen, wenn keine Kostendeckung erreicht werden kann. Im größeren Waldbesitz werden diese nicht Kosten deckenden Maßnahmen dagegen durchgeführt und als notwendige Investition in die Betriebssicherheit betrachtet. Dieser Umstand ist bei der Planung eines Logistikkonzeptes für die Versorgung einer Lignocellulose-Bioraffinerie zu beachten. Soll die Rohstoffbeschaffung in Eigenregie durchgeführt werden, sind die entstehenden Transaktionskosten für die Mobilisierung des Holzes und die Koordination der Erntemaßnahmen nicht zu unterschätzen. Aus diesem Grund sollten – wenn möglich und für beide Seiten sinnvoll – bei der Rohstoffbeschaffung Kooperationen mit bereits existierenden Holz bearbeitenden Betrieben angestrebt werden.

Während für die Ernte kein eindeutig vorzügliches Verfahren existiert, ist der Transport von Hackschnitzel dem Transport von Vollbäumen oder Kronenmaterial vorzuziehen. Das Abrollcontainer-Transportsystem hat sich hinsichtlich Flexibilität und Kosten als System der Wahl erwiesen.

Fasst man die Ergebnisse der zahlreichen Untersuchungen zusammen, kann die Bereitstellung von Waldhackschnitzeln frei Werk zwischen 50 € pro t atro und 150 € pro t atro kosten. Es sei an dieser Stelle aber darauf hingewiesen, dass dies Gestehungskosten und keine Marktpreise sind. Wie sich die Marktpreise in den letzten Jahren entwickelt haben, wird in Kapitel AP4-3.3 erläutert.

AP4-3.2 Pappelholz-Aufkommen

Da Pappelholz aufgrund seiner Eigenschaften ebenso gut wie Buchenholz für den Ethanol-Wasser Aufschluss geeignet ist (vgl. AP 2) und dessen Anbau auf landwirtschaftlichen Flächen im Hinblick auf einen sich verschärfenden Wettbewerb um den nachwachsenden Rohstoff Holz eine viel versprechende Alternative darstellt, nachfolgend einige grundsätzliche Erläuterungen zu Kurzumtriebsplantagen, zum derzeitigen und zukünftig möglichen Pappelholzaufkommen sowie zu den Bereitstellungskosten von Pappelhackschnitzeln.

AP4-3.2.1 Anbau und Ernte von Kurzumtriebsplantagen (KUP)

Kurzumtriebsplantagen (KUP) sind mit schnellwachsenden Baumarten bestockte (landwirtschaftliche) Flächen, die im Abstand von 2 – max. 20 Jahren beerntet werden. KUP beruhen auf dem hohen Stockausschlagvermögen (der Fähigkeit nach dem Fällen aus dem verbleibenden Stock immer wieder mit sehr wüchsigen Trieben auszuschlagen) und dynamischem Jugendwachstum bestimmter Baumarten. Unter den klimatischen Bedingungen Deutschlands sind Pappeln, Weiden, Aspen und Robinien hierfür am besten geeignet.

Ist eine ausreichende Wasserversorgung gewährleistet, das ist auf Standorten mit Grundwasseranschluss in der Regel der Fall, erreichen Pappeln durchschnittliche Erträge von 8 – 12 t atro pro Hektar und Jahr (RÖHLE et al., 2005). Auf guten Standorten kann die Leistung auch 20 t atro pro Hektar und Jahr erreichen, auf trockenen Standorten ist der Ertrag deutlich geringer.

Für den Anbau vom KUP eignen sich grundsätzlich alle landwirtschaftlich genutzten Flächen. Hanglagen sollten allerdings vermieden werden, da hier eine voll mechanisierte Ernte nicht oder nur mit deutlicher Leistungseinbuße möglich ist. Nach dem Ausbringen eines Vorauflaufmittels erfolgt im Frühjahr je nach Produktionsziel die Begründung einer KUP durch das maschinelle Stecken von 5.000 bis 10.000 unbewurzelten Stecklingen. Soll Industrieholz produziert werden, sind 5.000 Stecklinge ausreichend. 10.000 Stecklinge sind erforderlich, wenn eine maximale Biomasseproduktion erreicht werden soll. Nach dem Stecken ist in der Regel im Frühsommer eine nochmalige mechanische oder chemische Unkrautbekämpfung erforderlich. Bis zur ersten Ernte müssen dann keine weiteren Bewirtschaftungsmaßen erfolgen (HOFMANN, 1998).

Die erste Ernte erfolgt bei KUP mit dem Produktionsziel „Biomasse“ gewöhnlich nach drei Jahren mit einem voll mechanisierten Ernteverfahren. Zum Einsatz kommen Maishäcksler mit einem modifizierten Schneidvorsatz, die in einem Arbeitsgang den Aufwuchs abschneiden, hacken und die Hackschnitzel auf einen parallel fahrenden Schlepper mit Anhängecontainer fördern. Die Hackschnitzel können entweder direkt zum Verbraucher transportiert oder zunächst an anderer Stelle zwischengelagert werden. Bis zur nächsten Ernte sind dann keine weiteren Bewirtschaftungsmaßnahmen erforderlich.

Wie lange eine KUP ohne Ertragseinbußen bewirtschaftet werden kann, wird derzeit noch erforscht. Auf Düngung kann aber nach bisherigen Erfahrungen verzichtet werden. Die Rückwandlung einer KUP kann mechanisch durch Mulchen oder durch den Einsatz eines Herbizids erfolgen.

AP4-3.2.2 Pappelholz-Aufkommen aus Kurzumtriebsplantagen (KUP)

KUP werden in Deutschland bislang nur in sehr geringem Umfang angebaut. Die mit KUP bestockte Fläche wird derzeit auf ca. 2.000 ha geschätzt. Dies ist in einer Reihe von wirtschaftlichen, betrieblichen und rechtlichen Restriktionen begründet. KUP müssen im Vergleich zu konkurrierenden Früchten wettbewerbsfähig sein. D. h., der Anbau von KUP muss mindestens die gleichen Gewinnbeiträge erwirtschaften wie der Anbau konkurrierender Früchte. Dies ist in Jahren mit hohen Weltmarktpreisen für Weizen, Soja, Raps, und Mais nur schwer möglich (WAGNER et al., 2009). Allerdings erschwert die hohe Volatilität der Agrarpreise eine eindeutige Aussage darüber, ob eine KUP über die gesamte Standdauer wirtschaftlicher ist, als der Anbau von konventionellen Marktfrüchten. Abb. 4-11 zeigt, dass der Anbau von KUP im Jahr 2007 aufgrund der hohen Erzeugerpreise im Vergleich zu Roggen und Gerste unwirtschaftlich war. Bei den Erzeugerpreisen für Gerste und Roggen des Jahres 2008 war der Anbau dagegen, laut WAGNER et al. (2009), wirtschaftlicher.

Sicher ist, dass wegen der vergleichsweise konstanten Erträge und der weniger stark schwankenden Preise für Hackschnitzel KUP einen relativ sicheren Beitrag zum Betriebsergebnis leisten.

Für landwirtschaftliche Betriebe, deren Hauptziel Gewinnmaximierung ist, sind KUP daher weniger attraktiv als für solche Betriebe, die auf eine Harmonisierung des Einkommens Wert legen.

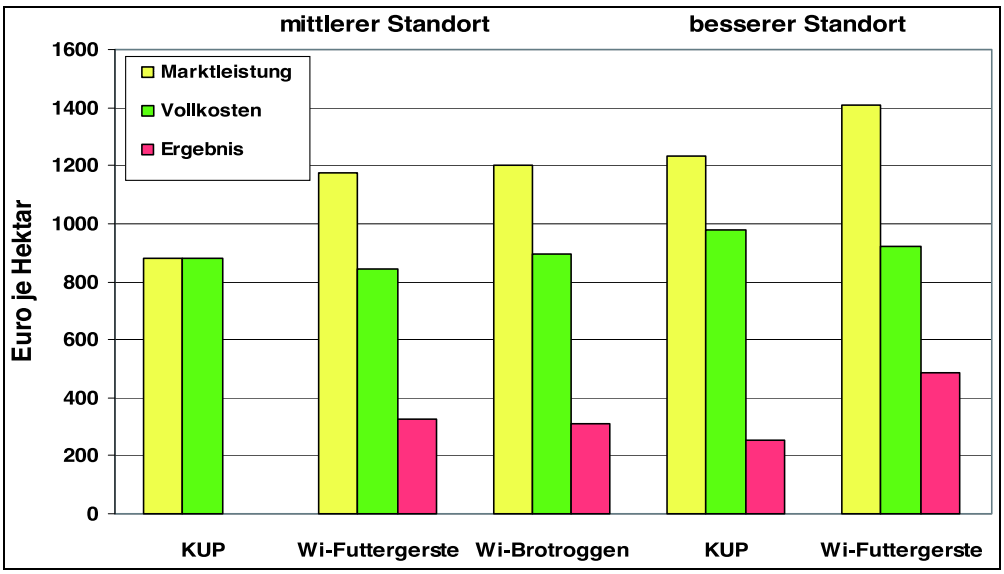


Abb. 4-11: Wirtschaftlichkeitsvergleich von Energieholz (KUP) mit Winterfuttergerste und Winterbrotroggen auf mittlerem und besserem Standort in Sachsen (Quelle: WAGNER et al. (2009))

Eine weitere Restriktion für den Anbau von KUP ist, dass Märkte für Biomasse aus KUP noch schwach und unvollständig entwickelt sind. Dies ändert sich aber zurzeit durch das Engagement einiger Energieversorgungsunternehmen (EVU), die, um die Versorgung ihrer Biomassekraftwerke zu sichern, verstärkt in die Anlage von KUP investieren. Anstoß dazu hat die in den letzten Jahren angespannte Lage auf den Holzmärkten gegeben. Die EVU haben erkannt, dass die gesicherte Versorgung mit Biomasse aus KUP nur durch enge Kooperationen mit Landwirten zu erreichen ist. Die Gewährleistung der Abnahme der produzierten Biomasse und Unterstützung bei der Bewirtschaftung von KUP scheint ein Erfolg versprechender Weg zu sein, den Anbau von KUP auszubauen.

Eine potenzielle rechtliche Restriktion, die dem Anbau von schnellwachsenden Bäumen auf landwirtschaftlichen Flächen im Wege steht, ist das Bundeswaldgesetz. Bisher sind KUP nämlich nicht ausdrücklich vom Waldbegriff ausgenommen. Es besteht allerdings politischer Konsens darüber, dass das Bundeswaldgestz bei der anstehenden Novellierung dahingehend verändert werden soll, um sicher zu stellen, dass KUP nicht zu Wald werden und landwirtschaftliche Fläche bleiben.

Die Frage, wie sich der Anbau von KUP in Zukunft entwickeln wird, hängt von der Entwicklung der geschilderten Kriterien ab. Eine weiter steigende Nachfrage nach Rohholz, wird den Anbau von KUP sicher fördern. Untersuchungen von THRÄN et al. (2005) zeigen, dass in Deutschland bis zum Jahr 2020 durch Ertragsfortschritt und wegen der abnehmenden Bevölkerung rund 7 Mio. ha der 17 Mio. ha landwirtschaftlich genutzten Fläche dem Anbau von Biomasse für die stoffliche oder energetische Nutzung zur Verfügung stehen könnte. Unterstellt man den derzeit durchschnittlichen Ertrag von 10 t atro pro Hektar und Jahr, so könnten auf 1 Mio. ha der frei werdenden Fläche jährlich 10 Mio. t atro an Biomasse produziert werden. Diese Menge würde die Holzmärkte deutlich entlasten.

Bei der Konzeption einer Lignocellulose-Bioraffinerie auf Basis von KUP hängt die Standortwahl von der Verfügbarkeit landwirtschaftlicher Flächen ab. Die Anzahl der möglichen Standorte ist

damit im Vergleich zu einer Raffinerie, die überwiegend auf Waldholz basiert, sehr viel größer, da der Anbau von KUP, wie bereits ausgeführt, auf fast jeder landwirtschaftlichen Fläche möglich ist. Für die Versorgung einer Lignocellulose-Bioraffinerie mit dem in Kapitel AP4-5 (s.u.) skizzierten Rohstoffbedarf von 400.000 t atro pro Jahr würde eine vergleichsweise kleine Fläche von 40.000 ha ausreichen. Nicht zuletzt deswegen und wegen der sich bereits positiv verändernden Rahmenbedingungen und dem in Zukunft wieder knapper werden Rohstoff Holz sollte die Option KUP für die Planung zukünftiger Bioraffinerien nicht außer Acht gelassen werden.

AP4-3.2.3 Pappelholz-Bereitstellung aus Kurzumtriebsplantagen (KUP)

Im Gegensatz zur Bereitstellung von Rohholz aus dem Wald ist die Bereitstellung von Pappelholz oder anderer schnellwachsender Baumarten aus KUP in Deutschland bisher nur vergleichsweise wenig erprobt. Erfahrungen aus Schweden lassen sich aufgrund der anderen klimatischen Verhältnisse und des ausschließlichen Anbaus von Weide nicht direkt auf deutsche Verhältnisse übertragen. Vor allem die größeren Durchmesser von Pappeln können bei den derzeit verfügbaren Häckslern zu technischen Schwierigkeiten führen. Alle verfügbaren Angaben zu Kosten und Leistungen der Ernte stammen von den wenigen derzeit vorhandenen Versuchsflächen und sind daher nur eingeschränkt repräsentativ.

Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, erfolgt die Ernte mit modifizierten Maishäckslern, die das Pappelholz hacken und auf einen parallel fahrenden Schlepper mit Anhängecontainer fördern (s. Abb. 4-12). Der Weitertransport vom Feld zum Zwischenlager oder Abnehmer erfolgt am besten wie der Transport von Waldhackschnitzeln mit einem Abrollcontainer-Transportsystem (s. Kap. AP4-3.1.7).

Abb. 4-12: Beerntung einer Kurzumtriebsplantage (Quelle: vTI)

Die aus einem Studium der veröffentlichten Kosten- und Leistungsdaten zu Ernte und Transport von Hackschnitzeln aus KUP herleitbaren Kosten sind in Tab. 4-14 zusammengestellt. Im Mittel

liegen sie für die Ernte mit Häcksler und parallel fahrendem Schlepper demnach bei rund 13 € t atro. Im Minimum wurden 10 € t atro und im Maximum 17 € t atro errechnet.

Die Transportkosten über eine Entfernung von 50 km lagen im Mittel bei 12,50 € je t atro und unterscheiden sich – wie zu erwarten – nicht von den Transportkosten für Waldhackschnitzel (vgl. Kap. AP4-3.1.7).

Tab. 4-14: Ernte und Transportkosten von Hackschnitzeln aus Kurzumtriebsplantagen (Quelle: nach Angaben von ANONYMUS (2006), BOELCKE (2006), BURGER (2006), ECKEL (2006), FRIEDRICH (1999), HOFMANN (1998), LANDGRAF et al. (2005), SCHAERFF (2007), SCHELER (1991), VETTER et al. (2006a, 2006b), WIPPERMANN (1999))

	Minimum [€/t_{atro}]	**Maximum [€/t_{atro}]**	**Mittelwert [€/t_{atro}]**
Ernte	10,23	17,33	13,32
Transport	10,00	15,62	12,53

Die Gesamtproduktionskosten lassen sich basierend auf den in WAGNER et al. (2009) aufgeführten Angaben für eine KUP mit 10.000 maschinell gepflanzten Stecklingen, 21 jähriger Nutzungsdauer und 3 jähriger Rotation, vollmechanisierter Ernte und durchschnittlichem Ertrag von 10 t atro pro Hektar und Jahr inkl. Gemein- und Pachtkosten aber ohne Kapitalverzinsung auf rund 65 € pro t atro veranschlagen.

AP4-3.3 Rohstoffpreise

Da sich die derzeit verfügbaren Preisangaben für Waldhackschnitzel auf die Lieferung vergleichsweise kleiner Mengen beziehen, sind diese nur wenig repräsentativ für den deutlich größeren Rohstoffbedarf einer Lignocellulose-Bioraffinerie. Da dieser eher mit dem eines Großsägewerks oder eines Betriebes der Holzwerkstoffindustrie zu vergleichen ist und in einer Lignocellulose-Bioraffinerie auch Buchenindustrieholz verarbeitet werden könnte, kann man davon ausgehen, dass sich die Preise für die Abnahme von Waldhackschnitzeln am Preisniveau von Buchenindustrieholz orientieren werden. Das Gleiche kann man auch für Pappelholz aus KUP unterstellen, solange es keine deutlichen Qualitätsunterschiede gibt, die einen höheren oder niedrigeren Marktpreis rechtfertigen.

Insgesamt ist aufgrund des zusätzlichen Holzbedarfs durch Lignocellulose-Bioraffinerien und bei weiter steigendem Bedarf für die energetische Nutzung nach Ausschöpfung der noch ungenutzten Potenziale mittelfristig mit insgesamt steigenden Marktpreisen zu rechnen.

Nachfolgend ein Überblick über die Preisentwicklung für Buchenindustrieholz der vergangenen Jahre. Die Angaben beruhen auf Preiserhebungen der inzwischen in Folge eines Verfassungsgerichtsbeschlusses zum Holzabsatzfondsgesetz aufgelösten ZMP (Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle, Bonn). Die Berichterstellung der ZMP erfolgte auf Grundlage der Meldungen der Landesforstbetriebe. Abb. 4-13 gibt eine Übersicht zur Preisentwicklung von Buchen-Industrieholz im Staatswald der Bundesländer mit einem hohen Buchenpotenzial.

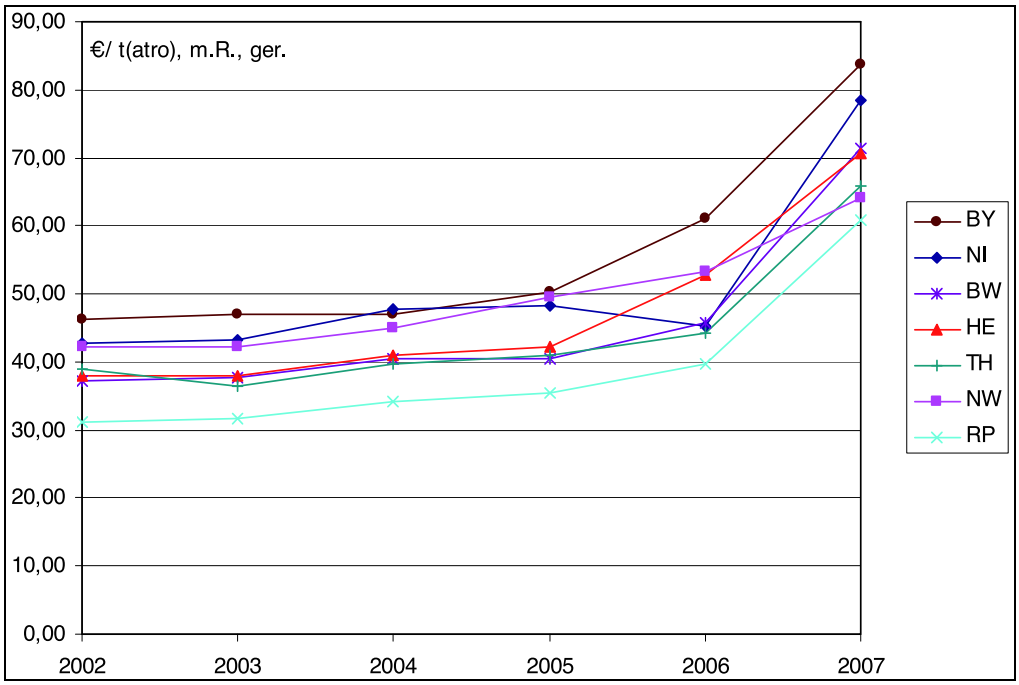


Abb. 4-13: Preisentwicklung für Buchen-Industrieholz (IL) nach Bundesländern (€/t_{atro}, gerückt), (Datenquelle: ZMP (2007) und vTI)

Für das Jahr 2007 lag der bundesweite Mittelwert für Buchen-Industrieholz (IL) demnach bei 73 €/t atro (2006: 50 €/t atro). Je nach Bundesland lagen die Preise im Bereich zwischen 61 € und 84 € je t atro (2006: 40 € bis 60 € je t atro) (Tab. 4-15). Transportkosten sind je nach Entfernung in einer Größenordnung von 5 bis 20 Euro je Tonnen atro zu den genannten Preisen zu addieren.

Tab. 4-15: Preise für Buchen-Industrieholz in €/Tonne atro

Meldedatum	Sortiment	Berichtspreis	Preis in €/t_{atro}	Bemerkungen
2008/03/05	BU, ICH	64,50 – 65,50 €/t_{atro}	64,50 – 65,50	Rheinland-Pfalz
2008/05/07	HLH, IH	28,20 €/Rm	84	Sachsen
2008/05/14	BU, IH	29 – 32 €/Rm	87 – 96	Niedersachsen
2008/06/04	BU, IH	30 €/Rm	90	Mecklenb.-Vorpommern
2008/07/02	LH, IH	46 – 47 €/Fm	82 – 84	Niedersachsen
2008/08/13	IH, alle	60 €/t_{atro}	60	BW, Preis gilt für 2009
2008/10/22	BU, IH	54 €/t_{atro}	54	BW, gilt bis Ende 2009
2008/12/10	LH, IH, F, K	23 €/Rm	69	Sachsen
2008/12/17	BU, IH	44 €/Fm	79	NRW
2008/12/17	BU, IH	37 €/Fm	55,50 (66)	NI, bis Ende 2009
2009/02/18	BU, IH	36,50 – 38,50 €/Fm	65 – 69	Thüringen

Abk.: alle = alle Baumarten; BU = Buche; BW = Baden-Württemberg; F = Leicht anbrüchig, grobastig, krumm; HLH = Hartlaubholz; IH = Industrieholz; K = stark anbrüchig, jedoch gewerblich verwendbar; LH = Laubholz; NI = Niedersachen; NRW = Nordrhein-Westfalen (Quelle: ZMP).

Aktuellere Preisabschlüsse für 2008 und 2009 liegen unter den Werten für 2007. Nachfolgend eine Übersicht zu aktuelleren Meldungen der ZMP, berichtet im Holz-Journal. Die Preise beziehen sich meist auf gelieferte Mengen:

Da die ZMP in der Zwischenzeit ihre Arbeit einstellen musste, liegen derzeit keine aktuelleren Preismeldungen vor. Aufgrund der allgemeinen konjunkturellen Lage ist für dieses Jahr aller Voraussicht nach nicht mit ansteigenden Preisen zu rechnen. Basierend auf den o. a. Preisabschlüssen, wird in der nachfolgenden Wirtschaftlichkeitsberechnung für Waldhackschnitzel frei Werk ein Preis von 70 € pro t atro angesetzt.

AP4-4 Stoff- und energiestromorientierte Erfassung der Teilprozesse entlang der Wertschöpfungskette (AP 4.3)

Grundlage für die Ermittlung der Anlagendimensionierung, die Schätzung der betriebsmittelverbrauchsabhängigen Kosten und notwendigen Investitionen sowie für die ökologische Bewertung der Bioraffinerie-Prozesskette stellen die Stoff- und Energiebilanzen entlang der Wertschöpfungskette der Bioraffinerie dar. Für die Modellierung der Stoff- und Energieströme wird die Software *UMBERTO*[4] sowie die Software *ASPEN PLUS*[5] eingesetzt. Die Teilprozesse entlang der Wertschöpfungskette werden in *UMBERTO* als sog. Subnetze spezifiziert. Diese Subnetze können als Bibliotheksmodule abgespeichert werden und auf diese Weise zwischen verschiedenen Bearbeitern ausgetauscht und zu einem integrierten Prozessmodell zusammengefügt werden. Die Erfassung der Stoff- und Energiebilanzen basiert auf den Ergebnissen der Betrachtungen zur Rohstoffbereitstellung (s. Kap. AP4-3), den Versuchsergebnissen der Laborpartner, der thermodynamischen Modellierung mit *ASPEN PLUS* (vgl. Abschnitt AP4-4.2) sowie zum Teil auf Literaturdaten (PAN et al.; 2006; TOLAN et al., 2006; UNITED STATES PATENT, 1988; UNITED STATES PATENT, 1998). Die Modellierung der Stoff- und Energieströme bezieht sich auf die verfahrenstechnische Umsetzung in einer großtechnischen Anlage und wird bis zum jeweiligen Aggregat verfeinert.

AP4-4.1 Modellierung der Prozesskette in UMBERTO

Die im Abschnitt AP4-2 beschriebenen und als Subnetze modellierten Teilprozesse werden zu einem übergeordneten *UMBERTO*-Stoffstromnetz zusammengefügt (vgl. Abb. 4-14). Über Parametervariationen können die Input-/Output-Bilanzen für verschiedene Holz-Wassergehalte (50 %, 70 %, 100 %) und Holzarten (Industrieholz, Waldholzhackschnitzel) sowie unterschiedliche Verhältnisse von Holz zu Lösemittel beim Organosolv-Aufschluss (Szenario 1:4, 1:6 und 1:8) und unterschiedliche Prozessführungen (Szenario 1:4opt) berechnet werden. In Abb. 4-15 ist exemplarisch das Sankey-Diagramm der Matarialflüsse für das Subnetz der Prozessanlage für die Basiskonfiguration der Aufschlussvariante „Organosolv“ dargestellt.

---

[4] Kommerzielle Software zur Modellierung und Visualisierung von Stoff- und Energieflüssen mit dem Ziel der Analyse und Optimierung von Prozessketten.

[5] Kommerzielle Software zur Simulation von Stoffumwandlungs- und Aufbereitungsprozessen mit kontinuierlichen Stoff- und Energieströmen (Advanced System for Process Engineering).

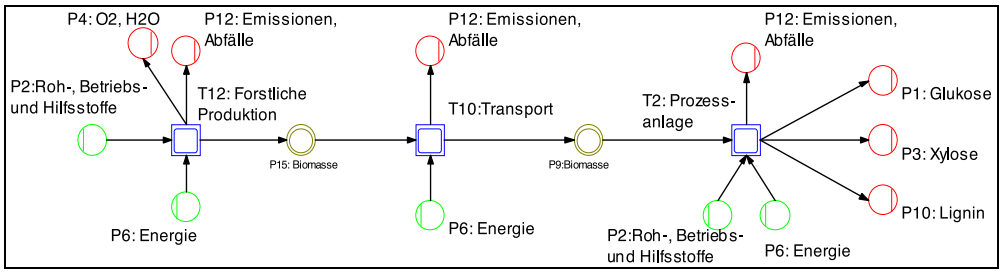


Abb. 4-14: Übergeordnetes *UMBERTO*-Stoffstromnetz (Quelle: IIP)

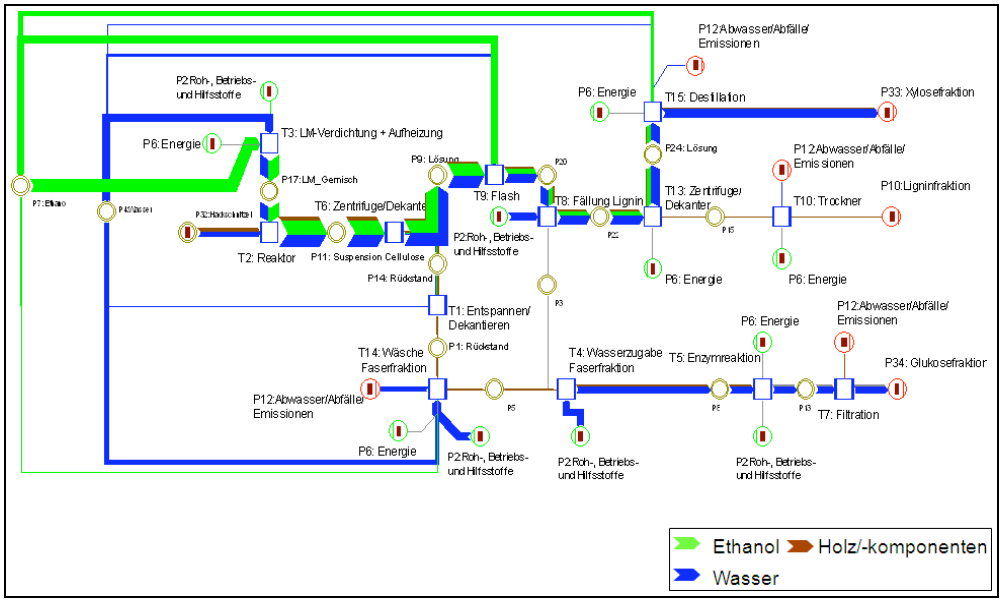


Abb. 4-15: Sankey-Diagramm der Materialflüsse für das Subnetz der Prozess-anlage (Basiskonfiguration) (Quelle: IIP)

Aus dieser Darstellung wird bereits deutlich, dass sehr große Mengen an Ethanol und Wasser in der Anlage im Kreis geführt werden müssen, was große Anlagenkomponenten erfordert als auch einen hohen Energiebedarf hervorruft. Die Massen- und Energiebilanzen dienen als Grundlage für die ökonomische (vgl. Kapitel AP4-6) sowie die ökologische (vgl. Kapitel AP4-7) Bewertung der Prozesskette.

AP4-4.2 Prozesssimulation mit *ASPEN PLUS*

Basierend auf dem Blockfließbild und den Ergebnissen der Stoffstromsimulation mit *UMBERTO* wurde ein Prozessmodell in *ASPEN PLUS* erstellt. Hierbei macht man sich sowohl die thermodynamische Datenbank (insbesondere das Flüssig-Dampf-Gleichgewicht für Reinstoffe und Stoffgemische) als auch die rigorosen Apparatemodelle (z.B. Destillationskolonne, Wärmetauscher, usw.) in *ASPEN PLUS* zunutze. Die Simulationsergebnisse aus *ASPEN PLUS* zur Schätzung des Energiebedarfs und der notwendigen Apparategröße fließen wiederum in die Modellierung mit *UMBERTO* ein. Diese Schätzung bildet außerdem auch die Grundlage für die Energiekosten- und Investitionsschätzung.

Physikalische Größen, die sich nicht oder nur schlecht durch thermodynamische Stoffdaten schätzen lassen (z.B. Zusammensetzung der Reaktionsprodukte, Ausbeute, Verweilzeit, usw.),

werden als Eingabeparameter für die *ASPEN*-Simulation benötigt. Diese Parameter stammen aus experimentellen Ergebnissen der Projektpartner, aus der Literatur und aus der Stoffstromsimulation in *UMBERTO*. Im Rahmen des Projektes wurde *ASPEN PLUS* neben der Kostenschätzung auch in der Sensitivitätsanalyse und zur Identifizierung der Optimierungspotentiale eingesetzt.

AP4-5 Basiskonfiguration der Lignocellulose-Bioraffinerie

Die Kapazität der Anlage wurde auf 400.000 t $Holz_{atro}$/a festgelegt, was in etwa einer Produktionsmenge von 138.000 t Glucose/a entspricht. Bei einer Auslastung von 8.000 h/a ergibt sich ein Holzdurchsatz von 50 t $Holz_{atro}$/h. Als Ausgangsmaterial werden Waldholzhackschnitzel angenommen mit einer Partikelgrößenverteilung von P 100[6] und einer Feuchte von 50 %. Als Endprodukte wurden fermentierbare Zucker und Lignin definiert. Hauptprodukt ist eine Glucoselösung von etwa 16 Masse-% (gelöst in Wasser), Nebenprodukte eine Xyloselösung (inkl. Hemicellulose-Oligomere) von ca. 5 Masse-% (gelöst in Wasser) und getrocknetes Lignin. Für das Ausgangsmaterial wird eine Zusammensetzung von 42 % Cellulose, 29 % Hemicellulosen, 24 % Lignin und 5 % übrige Holzinhaltsstoffe angenommen.

In Abb. 4-16 sind die Haupt-Prozessschritte entlang der gesamten Wertschöpfungskette der Lignocellulose Bioraffinerie dargestellt. Die forstliche Produktion umfasst die Waldpflege, sowie die Holzernte und das Holz-Häckseln im Wald. Die Waldholz-Hackschnitzel werden mit Lastwagen zu Anlage transportiert.

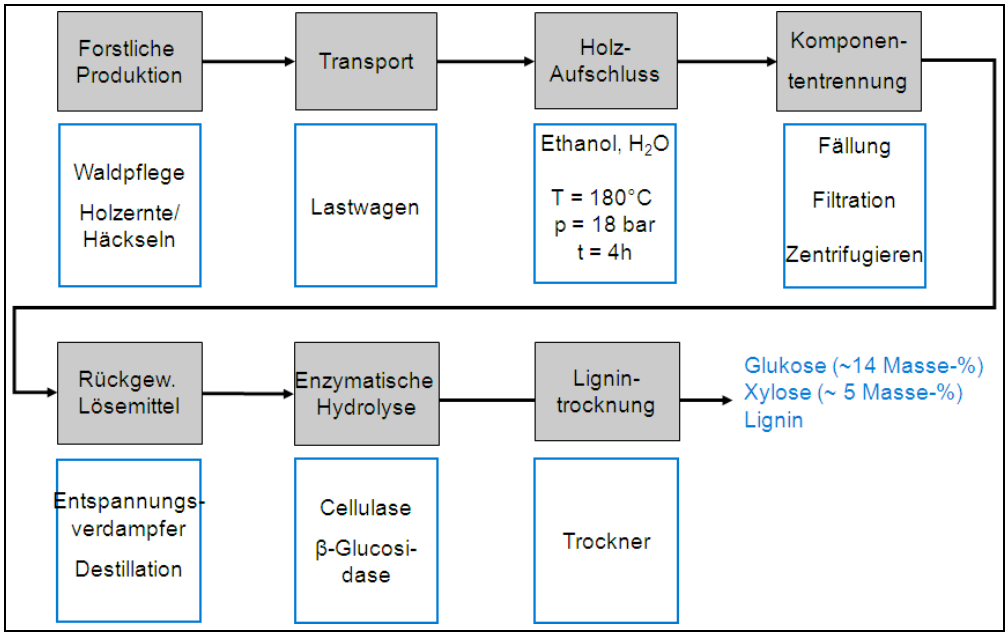


Abb. 4-16: Haupt-Prozessschritte der Lignocellulose-Bioraffinerie (Quelle: IIP)

[6] Größenverteilung biogener Festbrennstoffe nach DIN CEN/TS 14961.
Hauptfraktion (> 80 % Masse): 3,15 – 100 mm
Feinfraktion (< 5 % Masse): 1 mm
Grobfraktion (< 1 % Masse): > 200 mm

In der Prozessanlage wird das Holz zunächst aufgeschlossen. Als Aufschlussverfahren wird das Organosolv-Verfahren (T = 180 °C, p = 18 bar, t = 4 h) mit einem Verhältnis von Holz zu Lösemittel von 1:6 und einem Verhältnis von Ethanol zu Wasser von 1:1 angenommen. Die unlösliche Cellulose-Fraktion wird nach dem Aufschluss abgetrennt. Aus der Lösung nach dem Aufschluss wird das Lignin durch die Zugabe von Wasser ausgefällt (Ethanol-Konzentration < 20 % in der Lösung) und ebenfalls abgetrennt. Das Lösungsmittel wird mittels Entspannungsverdampfer und Destillation zurückgewonnen. Der enzymatische Umsatz von Cellulose zu Glucose wird auf 82 % festgelegt.

In Abb. 4-17 sind die wesentlichen Edukt- und Produktströme sowie Rückführungen für die Basiskonfiguration der Prozessanlage dargestellt:

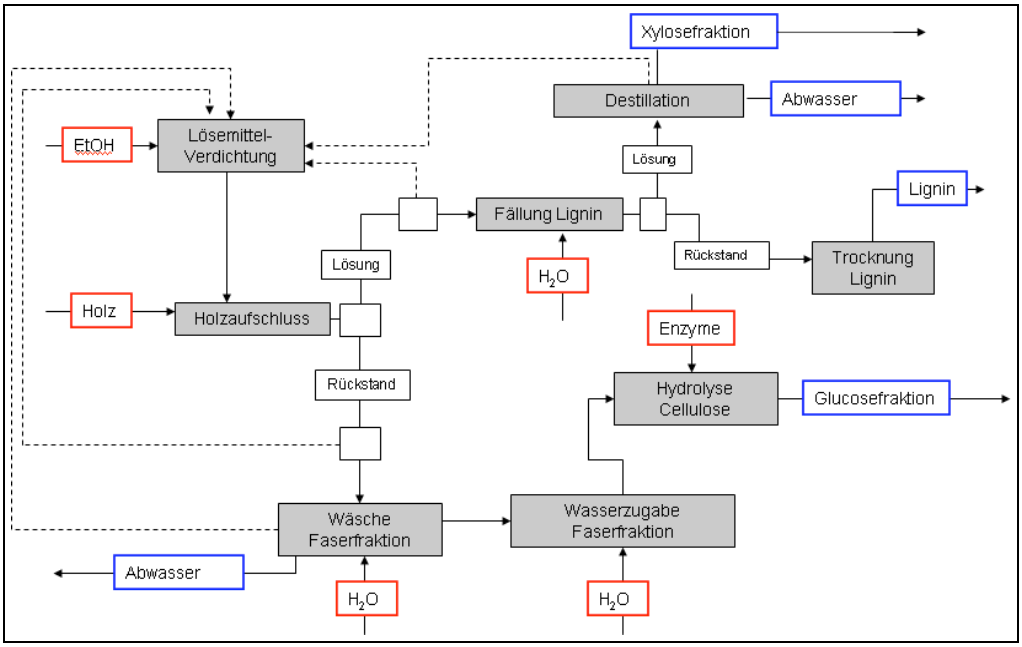


Abb. 4-17: Edukt-, Produktströme und Rückführungen für die Basiskonfiguration der Lignocellulose-Bioraffinerie (Quelle: IIP)

Auf der Inputseite (rot) wird Prozesswasser benötigt zur Wäsche der Faserfraktion, für die Ligninfällung und die Cellulose-Hydrolyse. Des Weiteren muss die aus dem Prozess mit den Abwasser- und Produktströmen ausgetragene Ethanolmenge jeweils für den Holzaufschluss nachgefüllt werden und es werden Enzyme für die Cellulose-Hydrolyse benötigt. Neben den Produktströmen treten auf der Outputseite Abwasserströme bei der Destillation (inkl. Furfural) und der Cellulose-Wäsche auf. Nach dem Aufschluss werden die Lösung und der Rückstand heiss entspannt, wodurch ein Teil des Lösemittels zurück gewonnen werden kann. Das Waschwasser aus der Cellulose-Wäsche wird ebenfalls zurückgeführt. Des Weiteren wird Ethanol destillativ aus der Lösung nach Fällung und Abtrennung des Lignins zurück gewonnen. Das dampfförmige Ethanol wird verdichtet, gekühlt und verflüssigt und anschließend zusammen mit den übrigen Rückführungsströmen und der neu zugeführten Lösemittelmenge auf eine Temperatur von 180 °C und einen Druck von 18 bar gebracht.

AP4-6 Machbarkeitsstudie – Ökonomische Bewertung und Sensitivitätsanalyse (AP 4.3)

Im Rahmen der Machbarkeitsstudie (Meilenstein 0) wird eine erste Abschätzung der Wirtschaftlichkeit für den in AP4-5 dargestellten Basisfall sowie verschiedene Szenarien der Lignocellulose-Bioraffinerie durchgeführt. Auf Basis der Massen- und Energiebilanzen werden die energie- und stoffstrominduzierten Kosten sowie die Herstellkosten für Glucose ermittelt. Im Rahmen einer Sensitivitätsanalyse wird der Einfluss, den verschiedene Preisannahmen (insbes. Holz, Lignin, Ethanol, Enzyme) und die Höhe der Investitionen auf die Höhe der Herstellkosten haben, bestimmt. Im Verlauf des Projektes wurden verschiedene Möglichkeiten zur Prozessoptimierung identifiziert und mit in die Betrachtungen eingeschlossen.

AP4-6.1 Energie- und stoffstrominduzierte Kosten und Erlöse für den Basisfall

Die Angaben der Kosten und Erlöse werden auf eine Produktionsmenge von ca. 138.000 t Glucose/a bzw. 17,2 t Glucose/h bezogen. Für die Berechnung der Kosten und Erlöse wurden die in Tab. 4-16 aufgeführten Preise zu Grunde gelegt.

Tab. 4-16: Preise für Produkte, Einsatzstoffe, Entsorgung und Rohstoffe

Produkte		**Einsatzstoffe/Abwasser**	
Lignin	500 €/t	Enzyme	1.977 €/t
Lignin (thermisch)	151 €/t	Ethanol	400 €/t
Glucose	207 €/t	Prozesswasser	0,14 €/m^3
Xylose	207 €/t	Abwasser	2 €/m^3
Energie		**Rohstoffe**	
Dampf (Erdgas)	17 €/t	Buchenholz	70 €/t atro
Kühlwasser	0,043 €/m^3		
Strom	0,06 €/kWh		

In Tab. 4-17 sind die kostenrelevanten Input- und Outputströme aus Abb. 4-17 in t/h angegeben sowie die sich ergebenden stoff- und energiestrominduzierten Kosten und Erlöse je t Endprodukt (Glucose). Insgesamt ergeben sich für den Basisfall stoffstrominduzierte Kosten von 304 €/t_{Gluk} und Energiekosten von 121 €/t_{Gluk}. Energie- und stoffstrominduzierte Kosten werden zusammengefasst als betriebsmittelverbrauchsabhängige Kosten. Die stoffstrominduzierten Erlöse für die Nebenprodukte Xylose (inkl. Oligomere) und Lignin gehen als sog. "Gutschriften" in die Herstellkostenschätzung mit ein (vgl. Kapitel AP4-6.2).

Tab. 4-17: Stoff- und Energiestrominduzierte Kosten und Erlöse (Basisfall)

Stoffstrominduzierte Kosten									
Holz		Enzyme		Ethanol		Wasser		Abwasser	
[t/h]	[€/t_{Gluk}]	[t/h]	[€/t_{Gluk}]	[t/h]	[€/t_{Gluk}]	[t/h]	[€/t_{Gluk}]	[t/h]	[€/t_{Gluk}]
50	**203**	0,56	**64**	1,2	**28**	291	**2,0**	55	**6**

Energiestrominduzierte Kosten						Stoffstrominduzierte Erlöse			
Heizbedarf		Kühlbedarf		Elektrizität		Lignin		Xylose	
[MW]	[€/t_{Gluk}]	[MW]	[€/t_{Gluk}]	[t/h]	[€/t_{Gluk}]	[t/h]	[€/t_{Gluk}]	[t/h]	[€/t_{Gluk}]
42	**71**	38	**13**	11	**37**	7,8	**226**	12	**143**

AP4-6.2 Herstellkostenschätzung und Sensitivitätsanalyse für den Basisfall

Die Herstellkosten werden für die verdünnte Glucose-Lösung (ca. 16 Masse-%) für eine Kapazität von ca. 138 kt/a auf Basis der in Kap. AP4-5 und Kap. AP4-6.1 getroffenen Annahmen, den modellierten Massen- und Energieströmen (s. Kap. AP4-4) und den geschätzten Investitionen mit Hilfe von Apparatelisten berechnet.

Die Investitionen für den Basisfall belaufen sich auf ca. 48 Millionen Euro. Die Investitionen für die einzelnen Module können Abb. 4-18 entnommen werden. Die Investitionen für die Module beinhalten hierbei den eigentlichen Apparat mit entsprechendem Gebäudeanteil, Rohrleitung und Prozessleittechnik. Bei den Modulinvestitionen handelt es sich nur um eine Schätzung in der frühen Konzeptentwicklungsphase. Für die Planungskosten wurde ein Aufschlag von 20 % auf die Investition berücksichtigt. Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass bislang keine Investitionen für die Nebenanlagen (OSBL = *outside battery limits*) wie z.B. Gleise, Straßen, Abwasserreinigungsanlagen, externe Sicherheitsanlagen, Energieversorgung etc. berücksichtigt wurden.

Die Herstellkosten umfassen die folgenden Kostenpositionen:

- Investitionsabhängige Kosten (Abschreibung, Steuern und Versicherungen, Instandhaltung, Kapitalkosten)
- Variable Kosten und Erlöse
  - Kosten für Roh- und Betriebsstoffe (Holz, Wasser, Ethanol, Enzyme)
  - Energiekosten (Dampf, Strom, Kühlwasser)
  - Kosten für die Abwasserentsorgung
  - Erlöse für die Nebenprodukte (Lignin für die stoffliche Nutzung und gelöste C5-Zucker)
- Personalkosten (direkte und indirekte Personalkosten)
- Herstellungsgemeinkosten („plant overhead“)

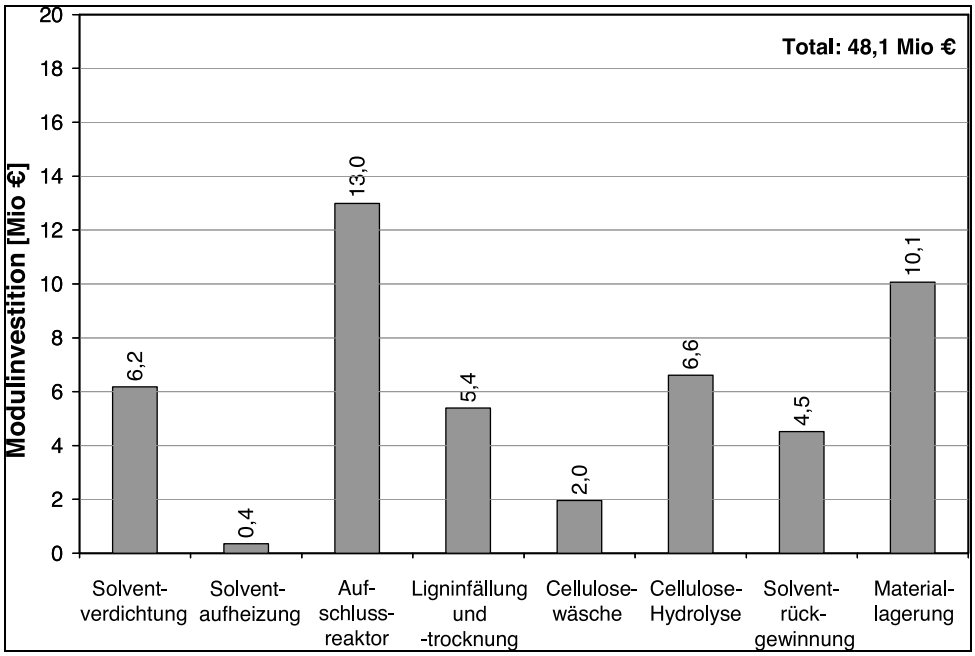


Abb. 4-18: Investitionen in Euro für die einzelnen Schritte des Holzaufschlussprozesses inkl. Verarbeitung bis zu den Produkten Glucose-/Xylose-Lösung und Lignin (Basisfall) (Quelle: BTS)

Für die Personalkosten wird ein 4-Schichtsystem mit jeweils 5 Personen je Schicht angenommen. Nach anerkannter Methode von SRI Consulting (<http://www.sriconsulting.com>) betragen die indirekten Personalkosten 30 % von den direkten Personalkosten, die Herstellungsgemeinkosten 80 % von (Personalkosten + 40 % von Instandhaltung), Steuern und Versicherung 2 % der Investition (ISBL = *inside battery limits*) und die Instandhaltung 2,5 % der Prozessanlage. Die Hauptanlage wird auf 10 Jahre abgeschrieben. Für die Kapitalkosten werden 4 % der Investition (ISBL = *inside battery limits)* angenommen. Die Herstellkosten werden primär durch Material- und Energiekosten bestimmt, wobei der Anteil der Einsatzstoffe deutlich höher ist (s. Abb. 4-19). Die Kosten für Vertrieb, Verwaltung und Forschung wurden bislang nicht ermittelt.

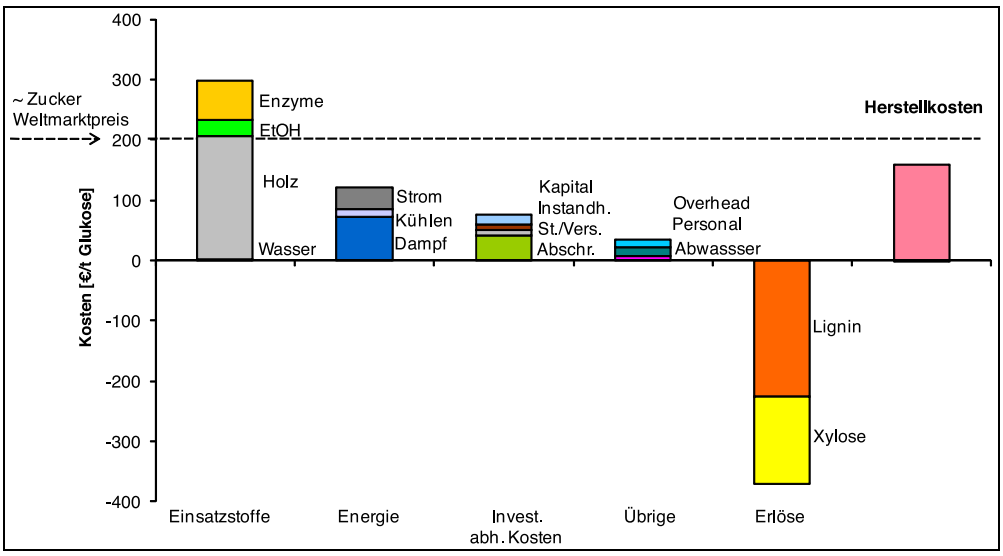


Abb. 4-19: Herstellkosten für die Glucose-Lösung aus "Organosolv-Holzaufschluss" (Basisfall) (Quelle: IIP)

Als Kriterium für eine erste Abschätzung der Wirtschaftlichkeit müssen die Herstellkosten für die gelöste Glucose deutlich unter dem Weltmarktpreis für Zucker nach OECD-FAO liegen (ca. 207 €/t) (vgl. OECD-FAO, 2007). Der Prozess für die Herstellung einer Glucose-Lösung aus Holz mittels Organosolv-Verfahren kann mit Herstellkosten von ca. 160 €/t in erster Näherung als wirtschaftlich beurteilt werden, wenn man eine stoffliche Umsetzung der Lösung vornimmt, bspw. eine Umsetzung zu Ethanol. Ansonsten müssten zusätzliche Kosten für die Abtrennung des Wassers berücksichtigt werden. Die aus dem Prozess resultierenden Koppelprodukte, die Xylose-Lösung (C5-Zucker) und das trockene, schwefelfreie Lignin stellen hierbei mit einer Gutschrift von ca. 370 €/t Glucose den entscheidenden Faktor für die Wirtschaftlichkeit des Prozesses dar. Speziell das Koppelprodukt Lignin, mit einem geschätzten Wert von 500 €/t für eine stoffliche Verwertung und einer Jahresproduktion von 62.400 t/a, woraus eine Gutschrift von ca. 226 €/t resultiert, ist entscheidend für die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens. Eine thermische Verwertung des Lignins würde zu Glucose-Herstellkosten von ca. 301 €/t führen und fast 50 % über dem Marktpreis von kristallinem Zucker liegen und hiermit das Verfahren unwirtschaftlich werden lassen.

Neben dem Ligninerlös stellen der Erlös für Xylose (inkl. Oligomere) und die Kosten für den Einsatzstoff Holz die stärksten Einflussgrößen auf die Herstellkosten dar. In Abb. 4-20 ist der Einfluss verschiedener Preise bzw. Kosten sowie Erlöse auf die Herstellkosten dargestellt. Der starke Einfluss des Ligninerlöses auf die Herstellkosten (± 32 % bei einer Preisänderung von ± 20 %) verdeutlicht die Tatsache, dass die Wirtschaftlichkeit der betrachteten Anlage sehr stark von der Ligninverwertung abhängt.

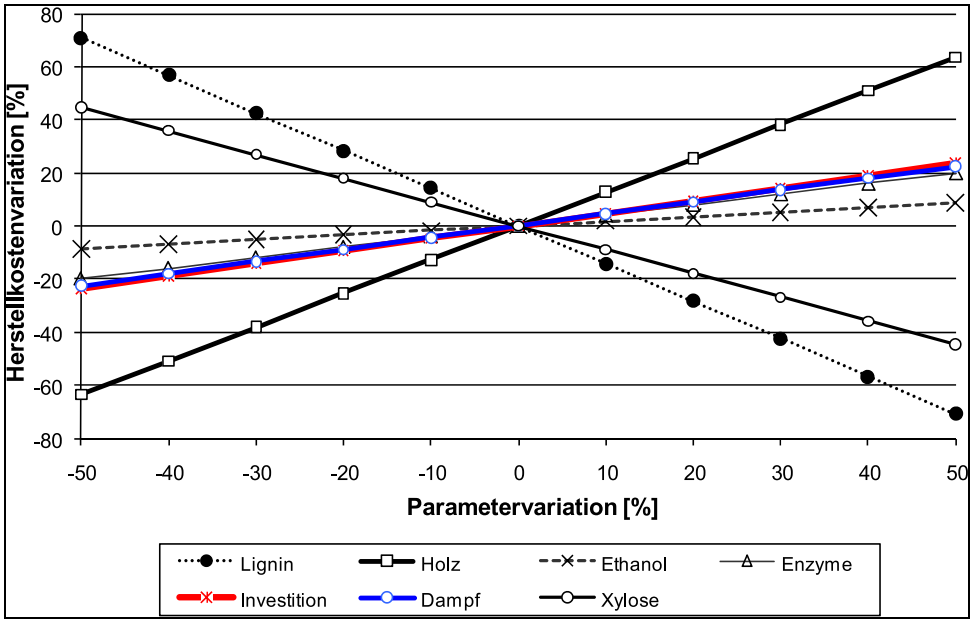


Abb. 4-20: Sensitivitätsanalyse für den Basisfall (Quelle: IIP)

AP4-6.3 Identifizierung von Optimierungspotentialen und Betrachtung von Szenarien

Der Aufschlussprozess wird maßgeblich durch das eingestellte Massenverhältnis zwischen Holz und Lösungsmittel (Flotte) beeinflusst, da die Größe der Apparate und der Energiebedarf linear mit der Flotte wachsen. Um diesen kritischen Parameter auch wirtschaftlich zu hinterfragen wurden für drei verschiedene Flottenverhältnisse (Szenario 1:6, 1:4 und 1:8) die Massen- und Energiebilanzen mittels *ASPEN*-Simulation berechnet. Diese Ergebnisse wurden in *UMBERTO* übernommen und anschließend die Herstellkosten geschätzt. Zusätzlich wurde ausgehend vom "Best case"-

Szenario (Flottenverhältnis 1:4) nach weiteren Optimierungspotentialen gesucht, um zu prüfen, inwieweit zusätzliche Kosteneinsparungen durch Prozessverbesserungen möglich sind.

Die erste mögliche Prozessoptimierung besteht darin, den Ethanolverlust zu reduzieren. Der nach dem Aufschluss- bzw. Fällungsverfahren zurückgebliebene Feststoff enthält eine gewisse Menge Restfeuchte und somit Ethanol. Um möglichst wenig Ethanol über die Ausschleusung des Endproduktes Lignin zu verlieren, wird das gefällte Lignin vor dem Trockenschritt mit Wasser gewaschen.

Die Reduktion des Wasserverbrauchs sowie die Vermeidung von Ethanolverlust mit dem Abwasser birgt weiteres Optimierungspotential. Das Abwasser aus der Ligninreinigung wird zum Waschen der Cellulosefraktion weiterverwendet. Somit kann der Frischwasserbedarf für diesen Reinigungsschritt vermindert werden als auch der Ethanolverlust mit dem Abwasserstrom. Das Wasser aus dem Waschvorgang der Cellulosefraktion wird ebenfalls nicht verworfen, sondern für die Ligninfällung wiederverwendet. Dadurch kann Frischwasser, das ansonsten für die Verdünnung des Ethanolanteils bei der Ligninfällung benötigt wird, eingespart werden sowie ebenfalls der Ethanolverlust mit dem Abwasserstrom vermindert werden.

Die dritte mögliche Prozessoptimierung wurde durch die Optimierung des anlageninternen Wärmeaustausches mittels Pinchpoint- und HEN (Heat Exchanger Network)-Analyse identifiziert. Es wird z.B. beim Verfahrensschritt der Solventverdichtung eine Wärmemenge auf einem hohen Energieniveau frei, so dass sie zum Heizen des Sumpfes der Destillationskolonne verwendet werden kann bzw. lässt sich die Abwärme des Nebenstromes der Destillationskollonne zum Vorheizen des Zulaufs nutzen.

In Abb. 4-21 ist das optimierte Gesamtverfahren mit den einzelnen Verfahrensschritten eingeschlossen der optimierten Wärmeintegration (mit roten Pfeilen gekennzeichnet) und der Waschwasserrückführung als Fließbild dargestellt. Bei der optimierten Wärmeintegration wurden sowohl mögliche zusätzliche Verringerungen des Heiz- und Kühlbedarfs der Anlage, als auch die dafür notwendigen Investitionen für zusätzliche Wärmetauscher berücksichtigt.

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Szenarien bezüglich ihrer Kosten verglichen. Die beschriebenen Szenarien 1-3 (Vergleich verschiedener Flottenverhältnisse) und ein mögliches optimiertes Szenario 4 sind in Tab. 4-18 zusammengefasst. Szenario 4 beschreibt hier lediglich das Recycling des Waschwassers aus der Cellulosewäsche zur Ligninfällung sowie die optimierte Wärmeintegration. Alle übrigen Annahmen für die dort aufgeführten Szenarien, insbesondere auch die Fraktionsausbeuten, entsprechen dem Basisfall. Die oben genannten weiteren Optimierungsmaßnahmen bezüglich der Minimierung des Ethanolverlustes und der Verminderung des Frischwasserbedarfs werden in Kapitel AP 4-8.2 zusammen mit aktualisierten Fraktionsausbeuten berücksichtigt.

Insgesamt ergeben sich für den Basisfall stoffstrominduzierte Kosten von insgesamt 304 €/t_{Gluk}, für Szenario 2 von 296 €/t_{Gluk}, für Szenario 3 von 312 €/t_{Gluk} und für Szenario 4 von 283 €/t_{Gluk} (vgl. Tab. 4-19). Mit kleinerem Flottenverhältnis (Szenario 1 bis 3) wird aufgrund des kleineren Wasserbedarfs weniger Wasser aus der Cellulosewäsche für den Aufschluss rückgeführt. Damit steigt der Abwasserstrom und mit diesem auch der Ethanolverlust. Der sinkende Wasserbedarf mit kleinerer Flotte (Szenario 1 bis 3) ergibt sich aus dem sinkenden Wasserbedarf für die Ligninfällung, welcher sich aus dem geringeren Ethanolgehalt in der Lösung ergibt.

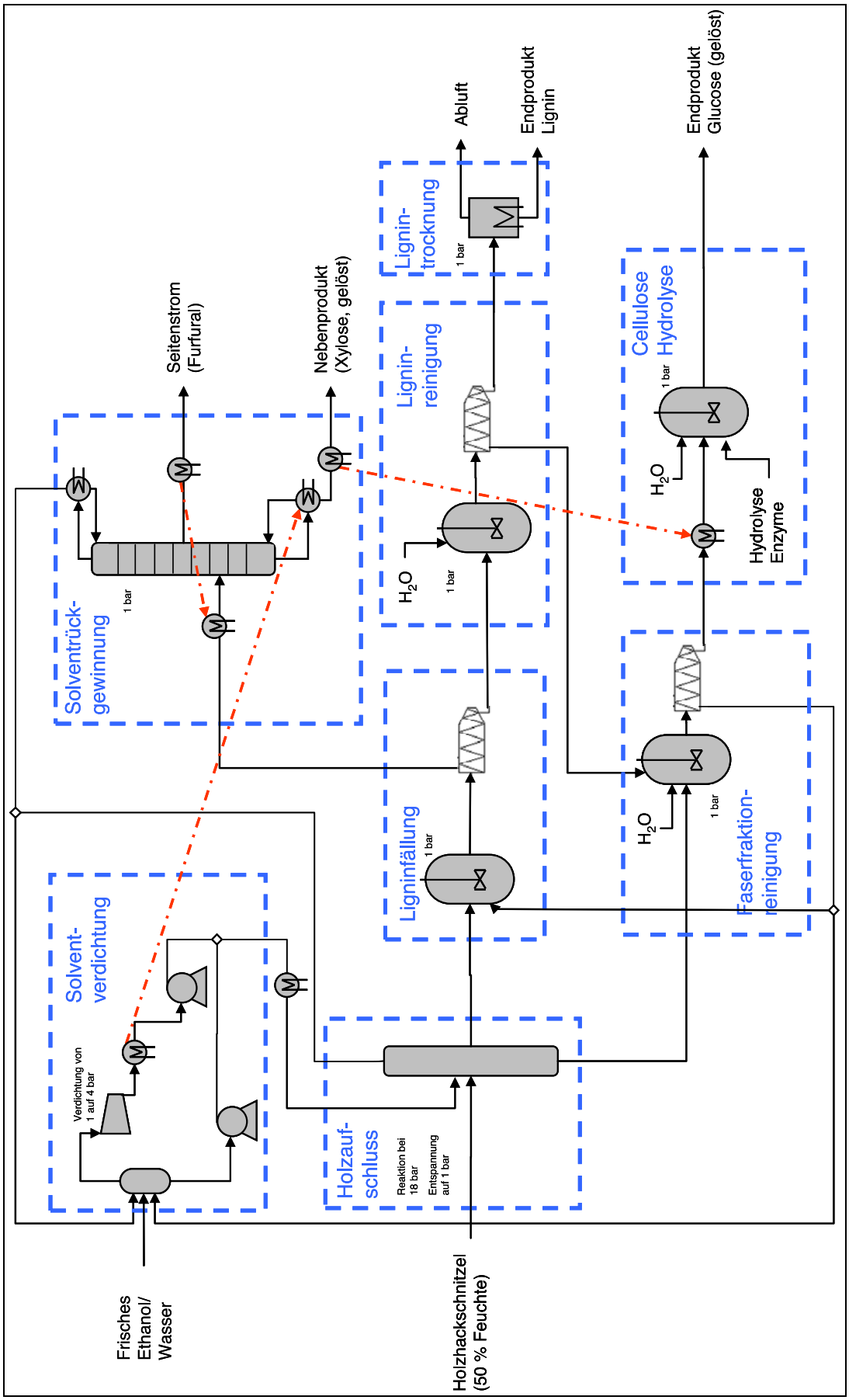


Abb. 4-21: Fließbild des optimierten Verfahrens mit Wasserrückführung und Wärmeintegration (rot gekennzeichnet) (Quelle: BTS)

Tab. 4-18: Betrachtete Szenarien (Quelle: IIP)

Szenario	Verhältnis Holz : LM	Bemerkung
Basisfall (Szenario 1)	1 : 6	
Szenario 2	1 : 8	
Szenario 3	1 : 4	
Szenario 4	1 : 4	• Recycling des gesamten Waschwassers aus der Cellulosewäsche zur Ligninfällung • Optimierte Wärmeintegration (zus. Wärmetauscher)

Tab. 4-19: Vergleich der stoffstrominduzierte Kosten (Quelle: IIP)

	Holz		Enzyme		Ethanol		Wasser		Abwasser	
	[t/h]	[€/t_{Gluk}]	[t/h]	[€/t_{Gluk}]	[t/h]	[€/t_{Gluk}]	[t/h]	[€/t_{Gluk}]	[t/h]	[€/t_{Gluk}]
Szenario 1 1:6 (Basisfall)	50	203	0,56	64	1,2	28	291	2,4	55	6,4
Szenario 2 1:8					1,0	23	308	2,5	21	2,4
Szenario 3 1:4					1,4	32	278	2,3	89	10
Szenario 4 1:4 optimiert					0,6	14	196	1,6	2,0	0,2

In Tab. 4-20 sind die Energiekosten, aufgeschlüsselt nach Heiz- und Kühlbedarf sowie Elektrizität, für den Basisfall und die beschriebenen Szenarien angegeben. Die Energiekosten steigen mit größerem Flottenverhältnis, was sich aus dem höheren Heizbedarf für die Lösemittelaufheizung und -rückgewinnung sowie dem erhöhten Elektrizitätsbedarf für die Lösemittelverdichtung und dem erhöhten Kühlbedarf für die Lösemittelrückgewinnung ergibt. Insgesamt geben die sinkenden Energiekosten den Ausschlag für die sinkenden betriebsmittelverbrauchsabhängigen Kosten bei kleinerem Flottenverhältnis. Die Erlöse für die Nebenprodukte gelöste Xylose (inkl. Oligomere) und getrocknetes Lignin entsprechen für alle Szenarien denen des Basisfalls (vgl. AP4-5). In Abb. 4-22 sind die Herstellkosten der beschriebenen Szenarien dargestellt. Es ist ersichtlich, dass eine Reduzierung des Flottenverhältnisses und die Implementierung der in Tab. 4-18 aufgeführten Maßnahmen zur Prozessverbesserung zu einer Senkung der Herstellkosten um ca. 42 % führen.

Tab. 4-20: Vergleich der Energiekosten (Quelle: IIP)

	Heizbedarf		Kühlbedarf		Elektrizität		GESAMT
	[MW]	[€/t_{Gluk}]	[MW]	[€/t_{Gluk}]	[MW]	[€/t_{Gluk}]	[€/t_{Gluk}]
Basisfall 1:6	42	**71**	38	**13**	11	**37**	**121**
Szenario 2 1:8	51	**87**	52	**15**	14	**49**	**151**
Szenario 3 1:4	41	**70**	32	**10**	7	**26**	**106**
Szenario 4 1:4 optimiert	29	**50**	31	**10**	8	**26**	**86**

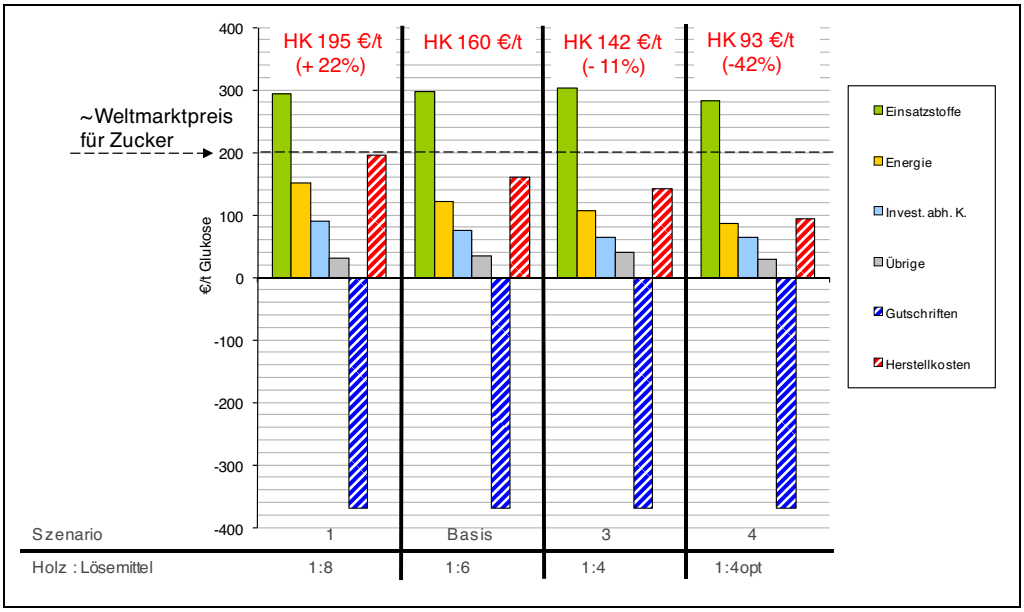


Abb. 4-22: Herstellkosten Glucose-Lösung für die betrachteten Szenarien (Quelle: IIP)

AP4-7 Ökologische Bewertung der Verfahrenskonzepte (AP 4.3)

Zur ökologischen Bewertung der Prozesskette wird die Methode der Ökobilanzierung angewandt. Zunächst werden der Untersuchungsrahmen definiert und die Umweltwirkungskategorien ausgewählt. Für die gewählten Wirkungskategorien werden die Emissionsäquivalente entlang der gesamten Wertschöpfungskette abgeschätzt. Zur Minderung der CO_2-Emissionsequivalente wird zusätzlich zu den in Tab. 4-18 definierten Szenarien ein Szenario für eine geänderte Dampferzeugung betrachtet. Darüber hinaus wird die Prozesskette im Rahmen der ökologischen Bewertung mit ausgewählten Referenzprozessen verglichen.

AP4-7.1 Untersuchungsrahmen und Wirkungskategorien der ökologischen Bewertung

Es wird eine sog. „*cradle-to-gate*“ („von der Wiege bis zum Fabrik-Tor“) – Analyse durchgeführt, d.h. es wird der gesamte Lebensweg der Produkte von der Rohstoffgewinnung bis zur Fertigstellung betrachtet. In Abb. 4-23 ist der Untersuchungsrahmen für die ökologische Bewertung der Prozesskette dargestellt. Neben den bereits in Kap. AP4-5 beschriebenen Prozessschritten *Forstliche Produktion*, *Transport* und *Prozessanlage* werden zusätzlich die Stoff- und Energieströme der Bereitstellungsketten für Betriebsmittel (Wasser, Ethanol, Enzyme) und Energie (Dampf, Strom, Kraftstoff) berücksichtigt. Die Prozesse der Abwasserentsorgung sowie der Kühlwasserbereitstellung werden vernachlässigt. Die Daten für den Transport sowie für die Bereitstellungsketten für Strom, Dampf, Kraftstoffe, Ethanol und Wasser wurden der *ecoinvent* Datenbank entnommen (vgl. ECOINVENT CENTRE, 2007). Im Basisfall kommt Ethanol auf Zuckerrohrbasis zum Einsatz, der Prozessdampf wird auf Basis einer Erdgasfeuerung bereitgestellt und die Stromerzeugung bezieht sich auf den Strommix in Deutschland (Versorgungsmix Deutschland, Basisjahr 2004). Die Kraftstoffbereitstellung bezieht sich in Bezug auf die Holzernte und den Holztransport auf konventionellen Dieselkraftstoff und bei der Waldpflege zusätzlich auf Gemischtkraftstoff und Kerosin[7]. Für den Holztransport wurde eine mittlere Transportentfernung von 100 km angenommen. Die Daten der forstlichen Produktion stammen aus Studien des Johann Heinrich von Thünen-Instituts (vgl. SCHWEINLE, 2000), wobei es sich bei der Holzernte um ein hochmechanisiertes Verfahren unter Einsatz von Erntemaschinen handelt. Die Daten für die Bereitstellung der Enzyme Celluclast 1.5 L (Cellulase) und Novozyme 188 (β-Glucosidase) beziehen sich auf Abschätzungen auf Basis von Veröffentlichungen und persönlichen Mitteilungen von Novozymes (vgl. NIELSEN et al., 2007 und NIELSEN, 2009).

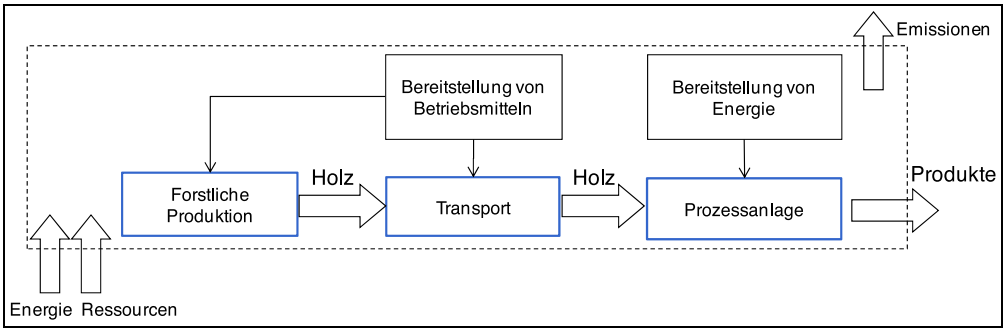


Abb. 4-23: Untersuchungsrahmen der ökologischen Bewertung (Quelle: IIP)

Zur Wirkungsabschätzung der Bioraffinerie werden die Wirkungskategorien *Klimaänderung*, *Versauerung* und *Eutrophierung* nach CML[8] mit den Wirkungsindikatoren CO_2-, SO_2- und PO_4-Emissionsäquivalenten ausgewählt (vgl. Tab. 4-21).

[7] Kerosin wird für die mit Helikopter durchgeführten Bodenschutzkalkungen eingesetzt.

[8] Centrum voor Milieuwetenschappen Leiden

Tab. 4-21: Wirkungskategorien, Wirkungsindikatorwerte und wesentliche Schadstoffe (Quelle: CML)

Wirkungs-kategorie	Wirkungs-indikatorwert	Relevante Emissionen
Klimaänderung	CO_2-Äq.	Luft: CO_2 (fossil), CH_4, N_2O, CCl_4, SF_6
Versauerung	SO_2-Äq.	Luft: SO_2, NO_X, NH_3, HCl
Aquatische Eutrophierung	PO_4-Äq	Luft: NO_X, NH_3 Wasser: NH^{4+}, N_{ges}, PO_4^{3-}, P, COD

AP4-7.2 Ermittlung von Emissionsäquivalenten entlang der Wertschöpfungskette

In Abb. 4-24 sind die prozentualen Beiträge der verschiedenen Prozessschritte zu den Emissionsäquivalenten der jeweiligen Wirkungskategorie dargestellt. Während ca. 40 % bzw. 30 % der CO_2-Äq. durch die Bereitstellung von Dampf bzw. Strom verursacht werden, stammen ca. 40 % der SO_2-Äq. aus den Prozessen zur Bereitstellung von Betriebsmitteln (Enzyme und Ethanol) und ca. 20 % werden durch die Bereitstellung von Strom verursacht. Bei den PO_4-Äq. dominieren mit ca. 70 % die Emissionen aus der Bereitstellung der Betriebsmittel (insbes. Enzyme).

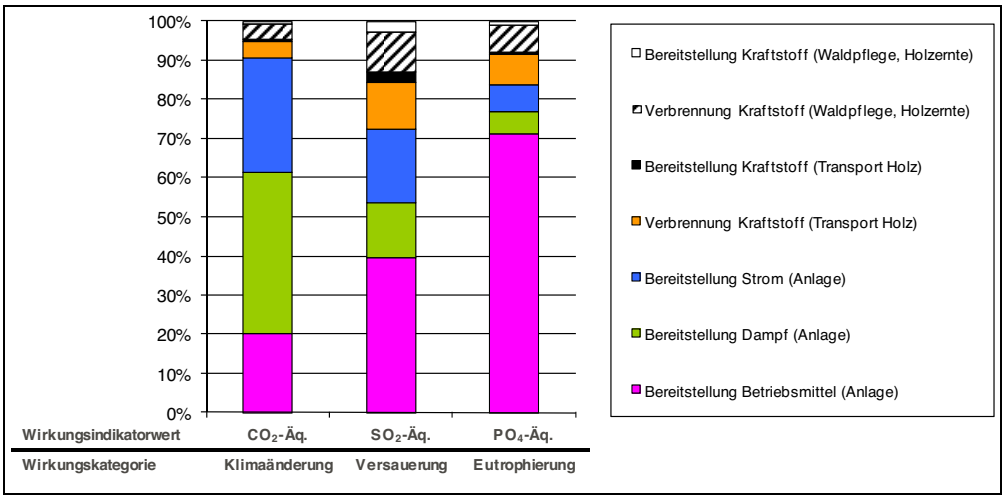


Abb. 4-24: Beiträge verschiedener Prozessschritte zu den Emissionsäquivalenten (Quelle: IIP)

Die wesentlichen Emissionen der betrachteten Prozesskette in Bezug auf die CO_2-Äq. stellen die fossilen CO_2-Emissionen aus der Dampf- und Stromerzeugung dar (jeweils ca. 94 % der CO_2-Äq.). In Bezug auf die SO_2-Äq. gehen im Fall der Ethanolbereitstellung ca. 42%, 31% bzw. 27% auf NO_X, NH_3 und SO_2 Emissionen zurück und im Fall der Strombereitstellung betragen die Anteile der genannten Schadstoffe 40 %, 2 % und 57 %. Bei den PO_4-Äq. aus der Ethanolbereitstellung gehen 35 %, 26 % und 22 % auf NO_X-, NH_3- und PO_4 -Emissionen zurück. Für die Enzymbereitstellung können aufgrund fehlender detaillierterer Daten keine näheren Angaben zu den Beiträgen einzelner Schadstoffe gemacht werden.

AP4-7.3 Holz zur Dampferzeugung zur Minderung der CO_2-Emissionsäquivalente

Im Rahmen der ökologischen Bewertung wurde die Möglichkeit zur Reduzierung der CO_2-Emissionsäquivalente durch eine im Hinblick auf fossile CO_2-Emissionen neutrale Dampferzeugung auf Basis einer Holzfeuerung untersucht (Szenario „Holz zur Dampferzeugung“). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 4-25 dargestellt.

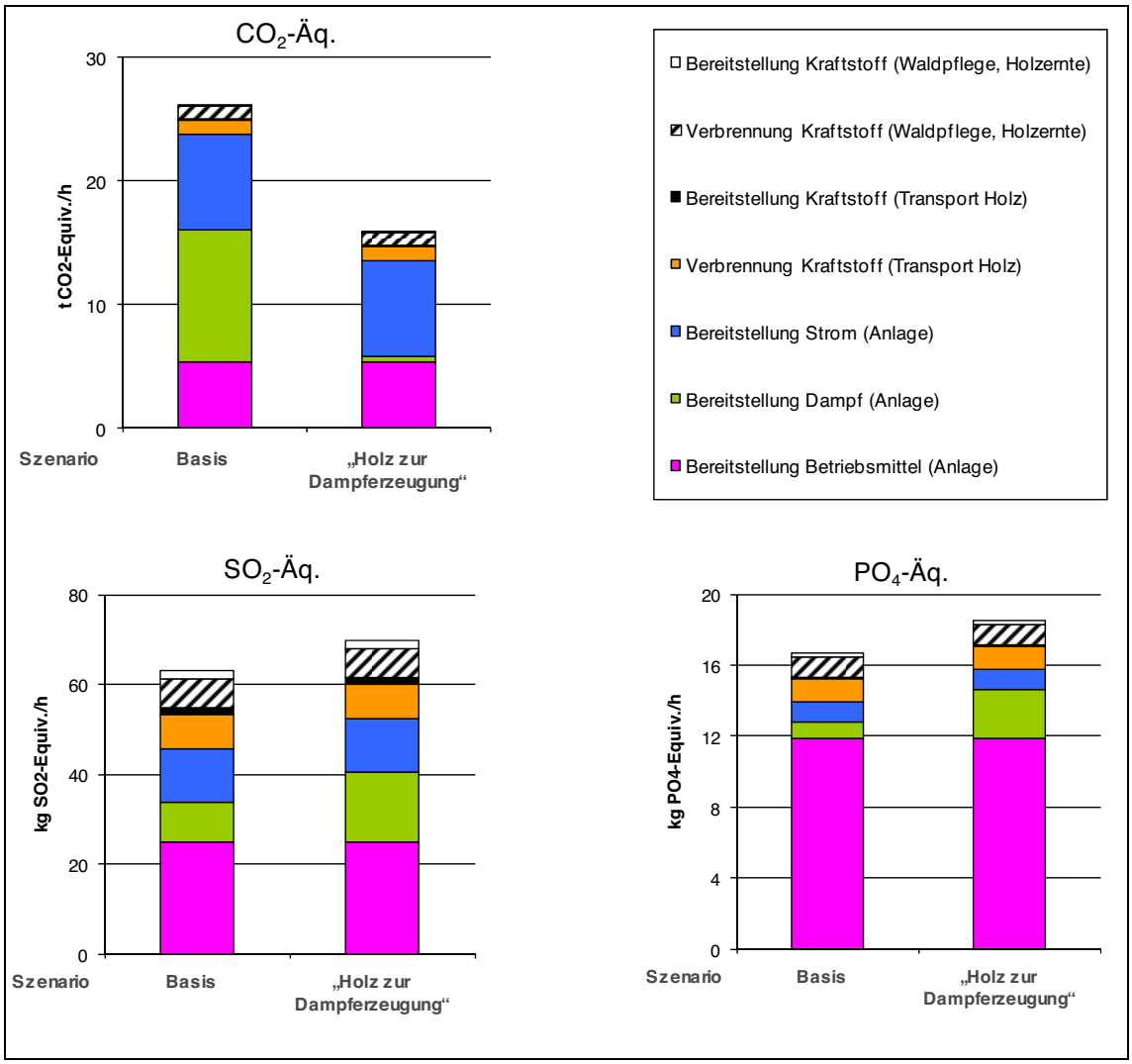


Abb. 4-25: Darstellung der Emissionsäquivalente bei geänderter Dampferzeugung (Quelle: IIP)

Während die CO_2-Äq. um die fossilen CO_2-Emissionen aus der Erdgasfeuerung zur Dampferzeugung reduziert werden, steigen die SO_2- sowie die PO_4-Äq. an. Der Anstieg in den genannten Wirkungskategorien geht insbesondere auf die erhöhten NO_X-Emissionen aus der Holzfeuerung im Vergleich zur Erdgasfeuerung zurück. Durch die genannte Maßnahme zur Minderung der CO_2-Äq. entsteht ein Zielkonflikt für den Fall, dass die Emissionsäquivalente in allen betrachteten Wirkungskategorien reduziert werden sollen. Bei Einbeziehung der veränderten Dampferzeugung in die ökonomische Bewertung der Prozesskette steigen die Herstellkosten im Basisfall um ca. 10 % auf ca. 176 €/t Glucose aufgrund der höheren Dampfkosten von 21 €/t Dampf im Vergleich zu 17 €/t

Dampf für die Erdgasfeuerung im Basisfall. Die höheren Kosten für die Dampferzeugung aus Holz resultieren aus höheren Fixkosten der Dampferzeugung, aufgrund höherer Brennerkosten und der erforderlichen Rauchgasreinigung zur Reduzierung von Partikelemissionen.

AP4-7.4 Vergleich der Prozesskette mit ausgewählten Referenzprozessen

Zur Einordnung der Ergebnisse aus Kapitel AP4-7.3 wird im Rahmen einer vergleichenden ökologischen Bewertung die Bioraffinerie-Prozesskette mit ausgewählten Referenzprozessen verglichen.

Für das Endprodukt Lignin wird die Herstellung von Phenol aus Cumol (Hock-Prozess) als Referenzprozess gewählt (vgl. Abb. 4-26) und für die Zuckerlösungen aus der Bioraffinerie wird die Herstellung von Zucker-Rohsaft aus Zuckerrüben (vgl. Abb. 4-27). Diesem Vergleich liegt des Weiteren die Annahme zu Grunde, dass 1 kg der Produkte aus der Bioraffinerie 1 kg der gewählten Referenzprodukte ersetzen können. Datengrundlage für die Darstellung der Referenzprozesse bildet die Datenbank ecoinvent v2.0 (vgl. ECOINVENT CENTRE, 2007). Für den Vergleich werden die CO_2-, die SO_2- und die PO_4-Emissionsäquivalente der Bioraffinerie, bezogen auf eine Stunde, mit der Herstellung der gleichen Menge an Referenzprodukten verglichen.

In Abb. 4-28 sind die Ergebnisse der Bioraffinerie für die Szenarien 1 bis 4 (vgl. AP4-6.3) den Ergebnissen für die Referenzprodukte gegenübergestellt. Die Emissionen der Bioraffinerie wurden in dieser Abbildung auf die drei Produkte Lignin, Glucose und Xylose (inkl. Oligomere) jeweils nach der produzierten Menge aufgeteilt. Insgesamt ergeben sich für die Bioraffinerie niedrigere Gesamtemissionen für die dargestellten Wirkungsindikatoren im Vergleich zu den gewählten Referenzprozessen.

Bei der Herstellung von Phenol aus Cumol stammen ca. 80 % der CO_2- und SO_2-Äq. und 65 % der PO_4-Äq. aus der Bereitstellung von Cumol. Ca. 25 % der PO_4-Äq. sind auf prozessimmanente Emissionen org. Schadstoffe (angegeben als COD[9]) zurückzuführen. Insgesamt sind die Emissionen aus der Herstellung von Phenol für die dargestellten Wirkungskategorien höher als für die Herstellung von derselben Menge Lignin aus der Bioraffinerie.

Bei der konventionellen Herstellung von Zucker-Rohsaft (13 – 15 Masse-% Saccharose) aus Zuckerrüben stammen ca. 95 % der CO_2-Äq. und 98 % der SO_2- und PO_4-Äq. aus der Vorkette für den Zuckerrüben-Anbau. Insgesamt liegen die Treibhausgas-Emissionen insbesondere aufgrund des geringeren Energiebedarfs unter denen der Herstellung der Zuckerlösungen in der Bioraf–finerie. Die versauernden und eutrophierenden Emisssionen liegen deutlich über denen der Her–stellung der Zuckerlösungen in der Bioraffinerie. Im Wesentlichen kann das auf den Zuckerrüben–anbau und die damit verbundenen NH_3-Emissionen zurückgeführt werden.

[9] Chemical oxygen demand

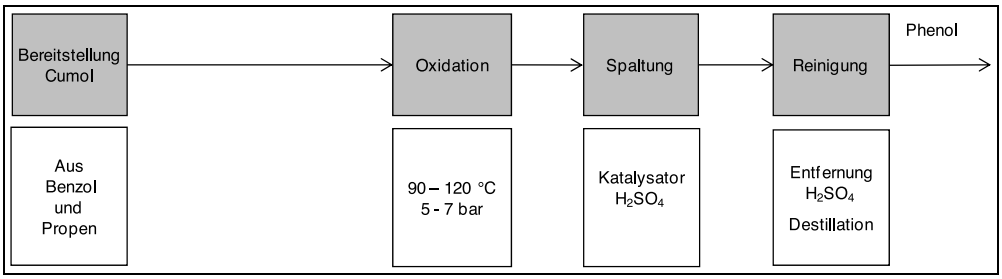


Abb. 4-26: Herstellung von Phenol als Referenzprozess für Lignin (Quelle: IIP)

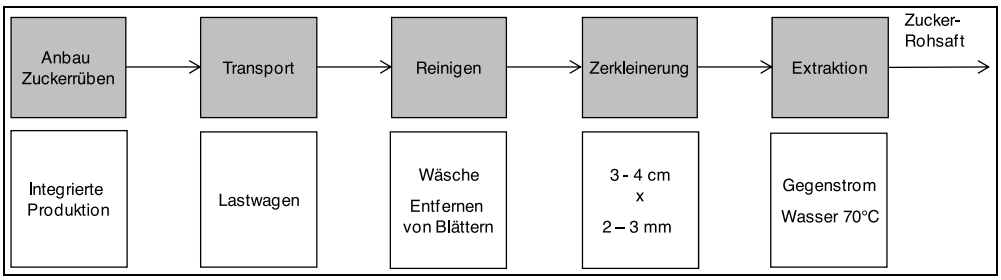


Abb. 4-27: Herstellung von Zucker-Rohsaft als Referenzprozess für die Zuckerlösungen (Quelle: IIP)

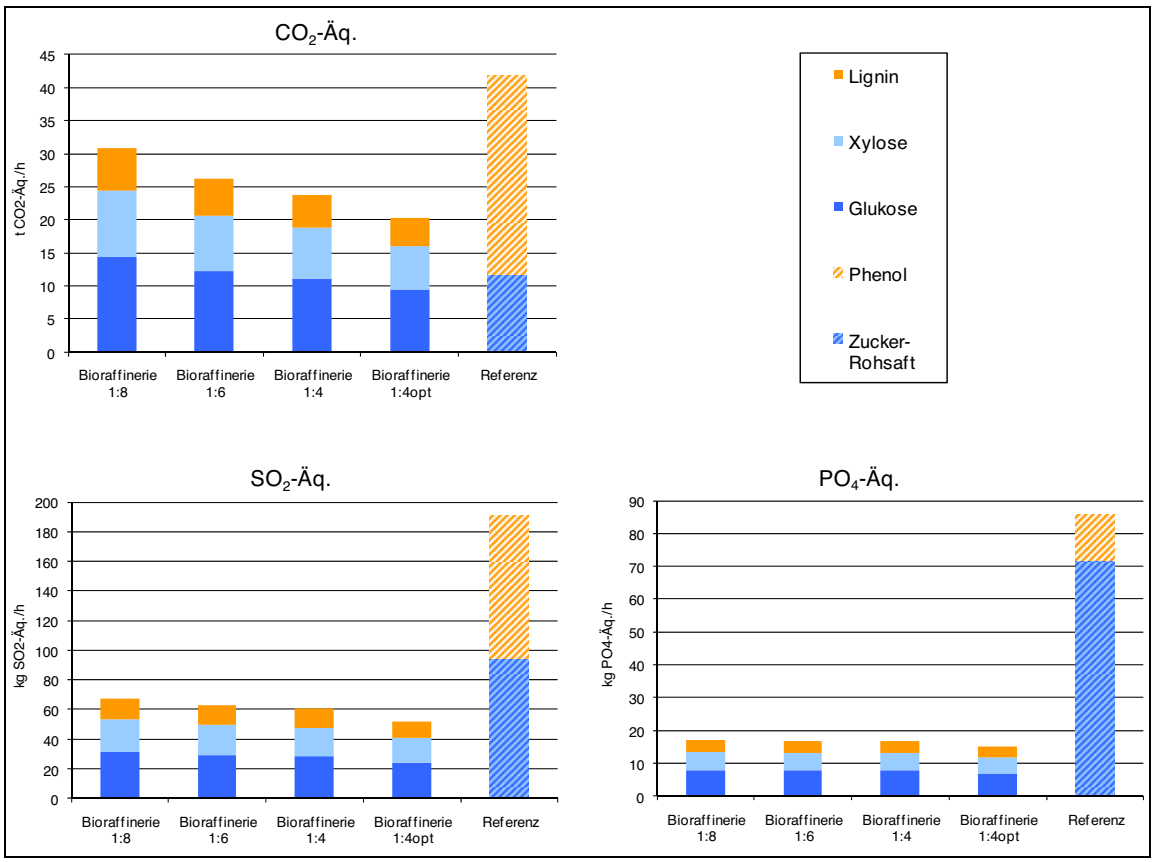


Abb. 4-28: Vergleich der Bioraffinerie mit ausgewählten Referenzprozessen (Quelle: IIP)

AP4-8 Ökonomische und ökologische Bewertung der Prozesskette auf Basis detaillierter Massenbilanzen (AP 4.4)

Ausgehend von dem in Kapitel AP4-6.3 und Tab. 4-18 beschriebenen Szenario 4 wurden auf Basis von in den Laborversuchen (AP 2) aktualisierten und spezifizierten Massenbilanzen die Modellierungen in *ASPEN PLUS* und *UMBERTO* überarbeitet. Des Weiteren wurde der Einsatz von Schwefelsäure als Katalysator für den Holzaufschluss bei einer verminderten Verweilzeit von 2 h untersucht. Die Ergebnisse der ökonomischen und der ökologischen Bewertung auf Basis der aktualisierten Massen- und Energiebilanzen für den Holzaufschluss mit und ohne Schwefelsäure bei 2 h bzw. 4 h Verweilzeit werden in diesem Kapitel vorgestellt. Im Zuge dieser Überarbeitung wurden auch die der ökonomischen Bewertung zu Grunde liegenden Preise überprüft und zum Teil angepasst. Darüber hinaus wird im Rahmen der ökonomischen Bewertung der Einfluss einer angenommenen Preisspanne für Lignin auf das Ergebnis dargestellt.

AP4-8.1 Aktualisierung der Massen- und Energiebilanzen

Auf der Grundlage neuer, Experiment-basierter Ergebnisse bezüglich des Holzaufschlusses (AP 2) konnten die Massenströme für die Prozesssimulation aktualisiert werden.

Einerseits ist nun die typische Zusammensetzung des verwendeten Holzes bekannt. Der Ligningehalt des eingesetzten Holzes wurde zu 21,2 % bestimmt, der Celluloseanteil liegt bei 43,9 %, der Hemicelluloseanteil bei 25,8 % und der Anteil übriger Holzinhaltsstoffe bei 9,1 %. Der größere Anteil an übrigen Holzinhaltsstoffen im Vergleich zu den bisherigen Annahmen (vgl. Kapitel AP4-5) wirkt sich insgesamt negativ auf die Produkterlöse aus. Lediglich die Ausbeute an Glucose wird durch den höheren Cellulose-Anteil erhöht.

Andererseits wurde das Aufschlussverfahren sowie die entstehenden (Neben-) Produkte genauer untersucht und quantifiziert (vgl. Abb. 4-29 und Abb. 4-30). So wird beispielsweise Hemicellulose nicht vollständig zu Xylose hydrolisiert. Der unvollständig hydrolysierte Anteil kann nun quantifiziert werden und wird als Oligopentose zusammengefasst. Es wird weiterhin davon ausgegangen, dass die Xylose sowie die Oligopentosen fermentierbar sind. Die Summe beider geht in die ökonomische und ökologische Bewertung ein. Beim Holzaufschluss entstehen aus der Hemicellulose neben Xylose und Oligopentosen auch Essigsäure, Ameisensäure und Furfural, welche ebenso quantifiziert wurden. Diese Anteile stellen Verluste in der Produktausbeute dar. Deren Anteile sowie der in der Faserfraktion verbleibende Lignin- und Hemicellulosenanteil sowie der Ligninverlust durch unvollständige Fällung können Abb. 4-29 und Abb. 4-30 entnommen werden.

Es stellte sich heraus, dass die Zugabe von einprozentiger Schwefelsäure die Qualität der Aufschlussprodukte verbessert sowie die Verweilzeit im Aufschlussreaktor von vier auf zwei Stunden verkürzt. Das Endprodukt Lignin kann bei kürzerer Verweilzeit auf einem vergleichbaren Niveau gewonnen und der Anteil an Oligopentose reduziert werden. Der Anteil der abgeschiedenen Cellulose für die Hydrolyse bleibt hiervon unberührt (43,9 %). Eine Gesamtübersicht über den Verbleib der bei dem Aufschluss entstandenen Komponenten ist in Abb. 4-29 sowie Abb. 4-30 dargestellt.

Die Umsetzung der Cellulose zu Glucose wird auf Basis der Laborergebnissen in AP 3 auf 80 % festgelegt.

Aufgrund der aktualisierten Massenströme ändern sich die nötigen Heiz- und Kühlleistungen sowie der Elektrizitätsbedarf nur geringfügig. Die entsprechenden Wärmeleistungen und der Elektrizitätsbedarf für die einzelnen Prozessschritte sind in Tab. 4-22 zusammengefasst.

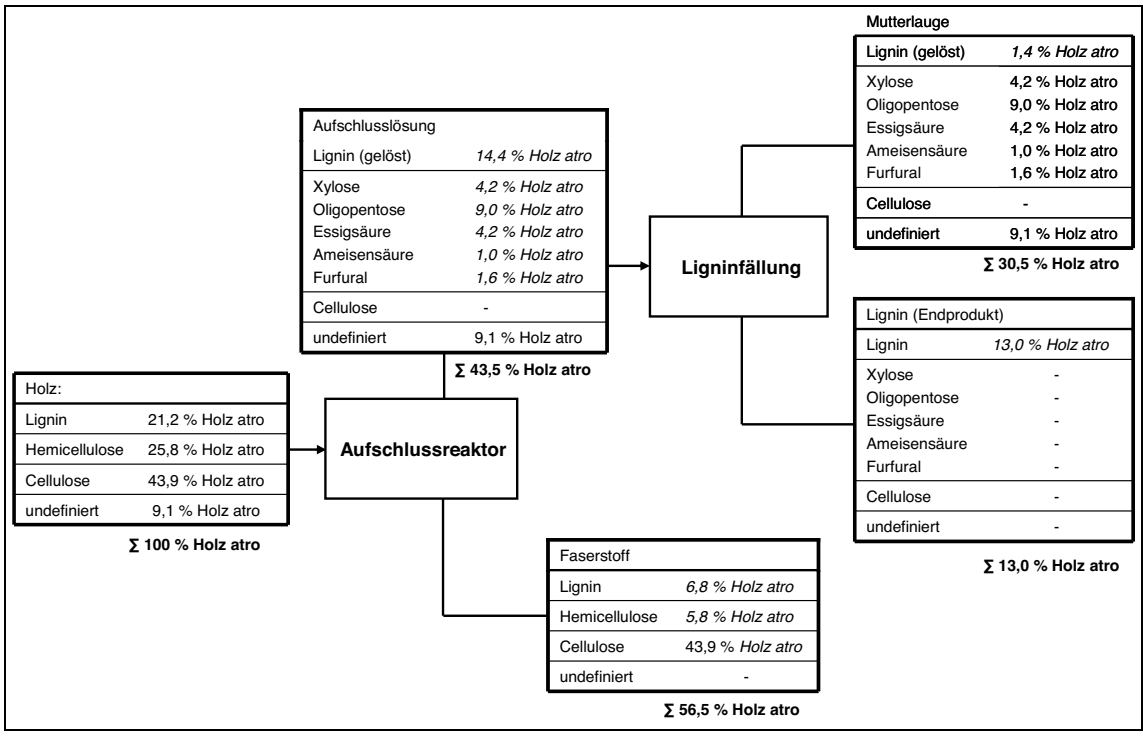


Abb. 4-29: Übersicht Komponentenströme bei Holzaufschluss ohne Schwefelsäure, Verweilzeit 4 h (Flotte 1:4) (Quelle: BTS)

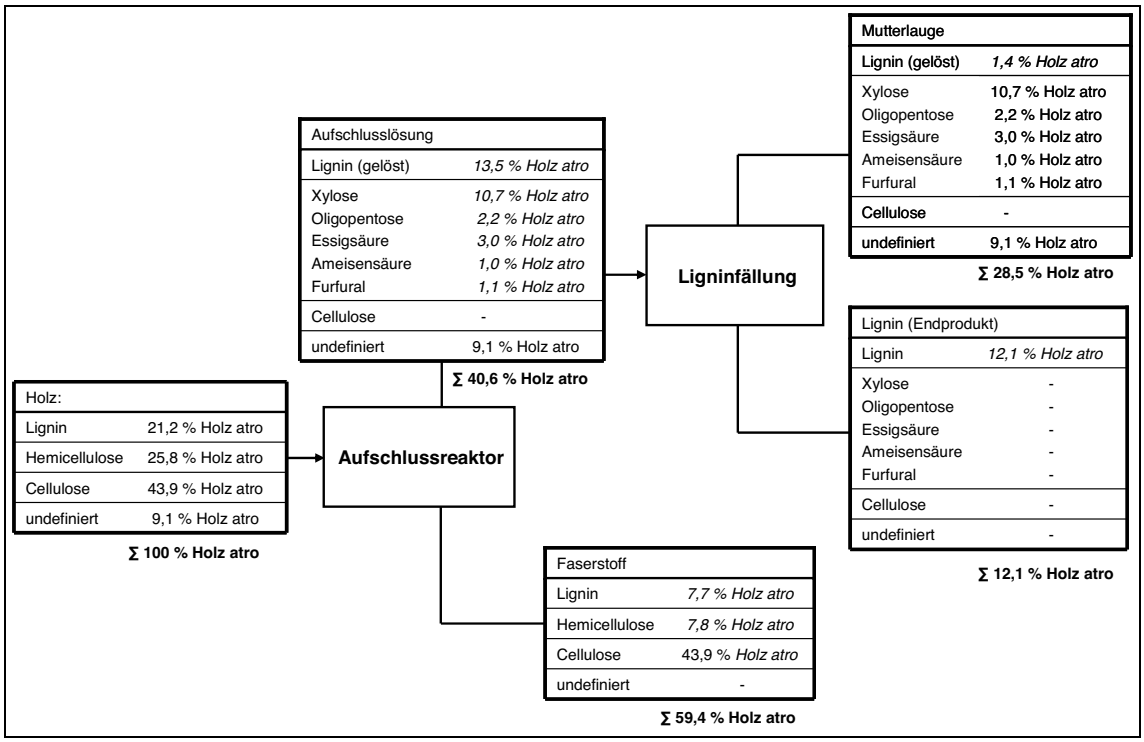


Abb. 4-30: Übersicht Komponentenströme bei Holzaufschluss mit Schwefelsäure, Verweilzeit 2h (Flotte 1:4) (Quelle: BTS)

Tab. 4-22: Aufstellung des Energiebedarfs für den optimierten Prozess (Quelle: IIP)

	Wärmeleistung [MW]	Elektrizitätsbedarf [MW]
Solventrückgewinnung:		
Solventverdichtung	- 40	6,0
Destillationskolonne Verdampfer	40	
Destillationskolonne Kondensator	- 18,5	
Destillationskolonne Vorheizen des Zulaufs	7,4	
Genutzte Abwärme Seitenstrom	- 7,4	
Genutzte Abwärme Sumpfprodukt (Xylose)	- 2,38	
Holzaufschluss:		
Solventaufheizung	28	
Cellulose-Hydrolyse:		
Vorheizen Reaktorzulauf	2,38	
Cellulosereinigung		0,4
Ligninverarbeitung:		
Ligninfällung	-2,1	
Ligninreinigung		0,4
Lignintrocknung	3,7	

AP4-8.2 Ökonomische Bewertung der Prozesskette auf Basis detaillierter Massenbilanzen und aktualisierter Preise

Auf Basis der in Kapitel AP4-8.1 vorgestellten aktualisierten Massen- und Energiebilanzen wurden die Investitionen und Herstellkosten nach der in Kapitel AP4-6 vorgestellten Methodik neu geschätzt.

In Abb. 4-31 und Abb. 4-32 sind die Investitionen für die einzelnen Module der Prozessanlage mit und ohne Einsatz von Schwefelsäure dargestellt. Ohne Einsatz von Schwefelsäure kann von Investitionen von 46,2 Millionen Euro ausgegangen werden. Den größten Anteil der Investitionen nimmt der Holzaufschluss-Reaktor ein (vgl. Abb. 4-31). Deshalb können mit einem Aufschlussverfahren, bei dem Schwefelsäure eingesetzt und damit die Verweilzeit im Reaktor von vier auf zwei Stunden reduziert wird, die Investitionen gesenkt werden. Aufgrund des kleineren notwendigen Volumens sinken die Investitionen für den Reaktor auf Basis der getroffenen Annahmen voraussichtlich von 15,6 Millionen Euro auf 10 Millionen Euro und die Investitionen insgesamt auf 41 Millionen Euro (vgl. Abb. 4-32).

Im Zuge der Anpassung der ökonomischen Bewertung in Bezug auf die Massen- und Energiebilanzen wurden auch die den Berechnungen zu Grunde liegenden Preise überprüft und den aktuellen Marktentwicklungen angepasst. Im Fall von Glucose und Xylose (inkl. Oligomere) wird der Preis von 207 €/t auf 200 €/t leicht nach unten korrigiert, im Fall von Ethanol und Strom nach oben, von 400 €/t auf 500 €/t bzw. von 0,06 €/kWh auf 0,07 €/kWh (vgl. Tab. 4-23).

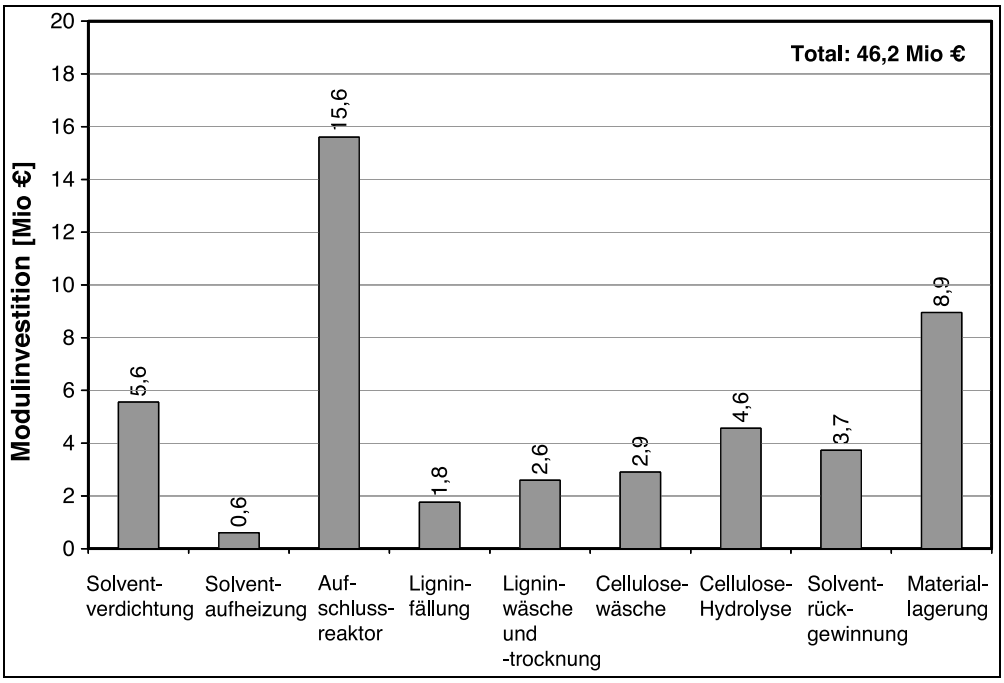


Abb. 4-31: Investitionen in Euro für den Holzaufschluss ohne Schwefelsäure (Quelle: BTS)

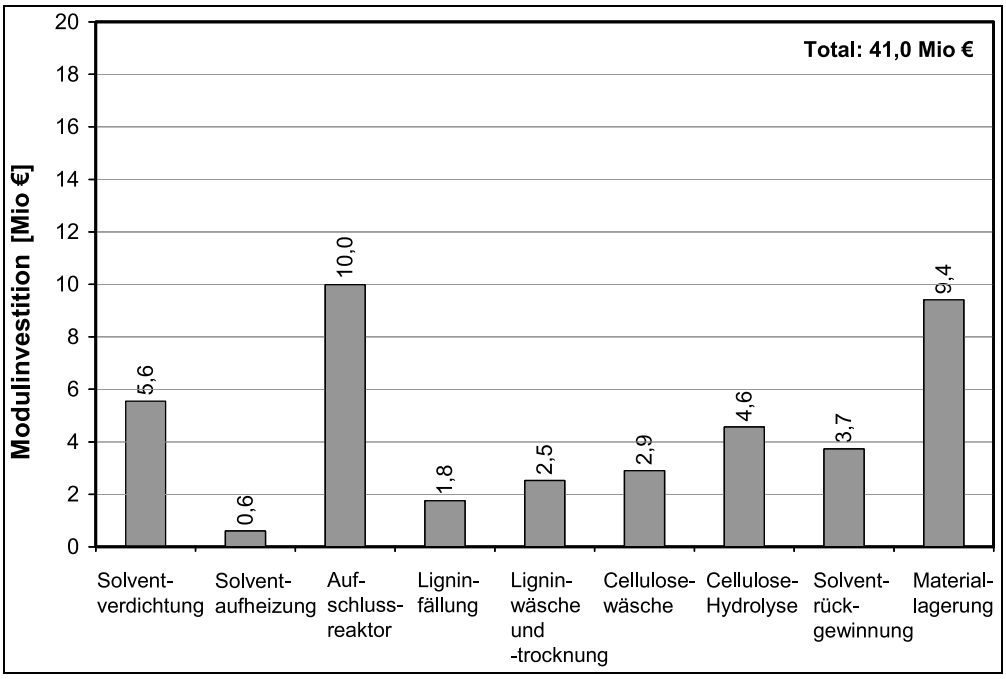


Abb. 4-32: Investitionen in Euro für den Holzaufschluss mit Schwefelsäure (Quelle: BTS)

Tab. 4-23: Bisherige und aktualisierte Preisannahmen

Produkte	bisher	neu
Lignin [€/t]	500	500
Lignin (thermisch) [€/t]	151	151
Glucose [€/t]	207	200
Xylose [€/t]	207	200
Energie		
Dampf (Erdgas) [€/t]	17	17
Kühlwasser [€/m^3]	0,043	0,043
Strom [€/kWh]	0,06	0,07

Einsatzstoffe/Abwasser	bisher	neu
Enzyme [€/t]	1.977	2.000
Ethanol [€/t]	400	500
Prozesswasser [€/m^3]	0,14	0,14
Schwefelsäure [€/t]	–	100
Abwasser [€/m^3]	2	2
Rohstoffe		
Buchenholz [€/t]	70	70

In Tab. 4-24 sind die kostenrelevanten Input- und Outputströme in t/h angegeben sowie die sich ergebenden stoff- und energiestrominduzierten Kosten und Erlöse je t Endprodukt (Glucose). Die Angaben der Kosten und Erlöse für die detaillierten Massen- und Energiebilanzen werden auf eine Produktionsmenge von ca. 141.000 t Glucose/a bzw. 17,6 t Glucose/h bezogen.

Tab. 4-24: Stoff- und Energiestromstrominduzierte Kosten und Erlöse (Szenario 4, ohne H_2SO_4)

Stoffstrominduzierte Kosten									
Holz		**Enzyme**		**Ethanol**		**Wasser**		**Abwasser**	
[t/h]	**[€/t_{Gluk}]**	**[t/h]**	**[€/t_{Gluk}]**	**[t/h]**	**[€/t_{Gluk}]**	**[t/h]**	**[€/t_{Gluk}]**	**[t/h]**	**[€/t_{Gluk}]**
50	**203**	0,58	**70**	1	**28**	209	**1,7**	14	**2**

Energiestrominduzierte Kosten						**Stoffstrominduzierte Erlöse**			
Heizbedarf		**Kühlbedarf**		**Elektrizität**		**Lignin**		**Xylose**	
[MW]	**[€/t_{Gluk}]**	**[MW]**	**[€/t_{Gluk}]**	**[t/h]**	**[€/t_{Gluk}]**	**[t/h]**	**[€/t_{Gluk}]**	**[t/h]**	**[€/t_{Gluk}]**
32	**53**	21	**4**	8	**30**	6,4	**182**	6,5	**74**

In Abb. 4-33 sind die Herstellkosten für Glucose für das Szenario 4 mit und ohne Einsatz von Schwefelsäure für die aktualisierten Preisannahmen dargestellt. Insgesamt resultieren aus den aktualisierten Massen- und Energiebilanzen Herstellkosten, welche über dem Weltmarktpreis für Zucker liegen. Es ergeben sich Herstellkosten von 229 €/t Glucose ohne den Einsatz von Schwefelsäure bei 4 h Verweilzeit im Reaktor und Herstellkosten von 241 €/t Glucose mit Einsatz von Schwefelsäure bei 2 h Verweilzeit. Die Minderung der investitionsabhängigen Kosten bei Einsatz von Schwefelsäure durch die kleinere Verweilzeit wird durch die zusätzlichen Kosten für die Schwefelsäure kompensiert. Zusammen mit den nur leicht verminderten Produktausbeuten, insbesondere dem leicht erhöhten Ligninverlust mit der Faserfraktion bei einer Aufschlusszeit von 2 h, ergeben sich die höheren Herstellkosten für das Szenario unter Einsatz von Schwefelsäure.

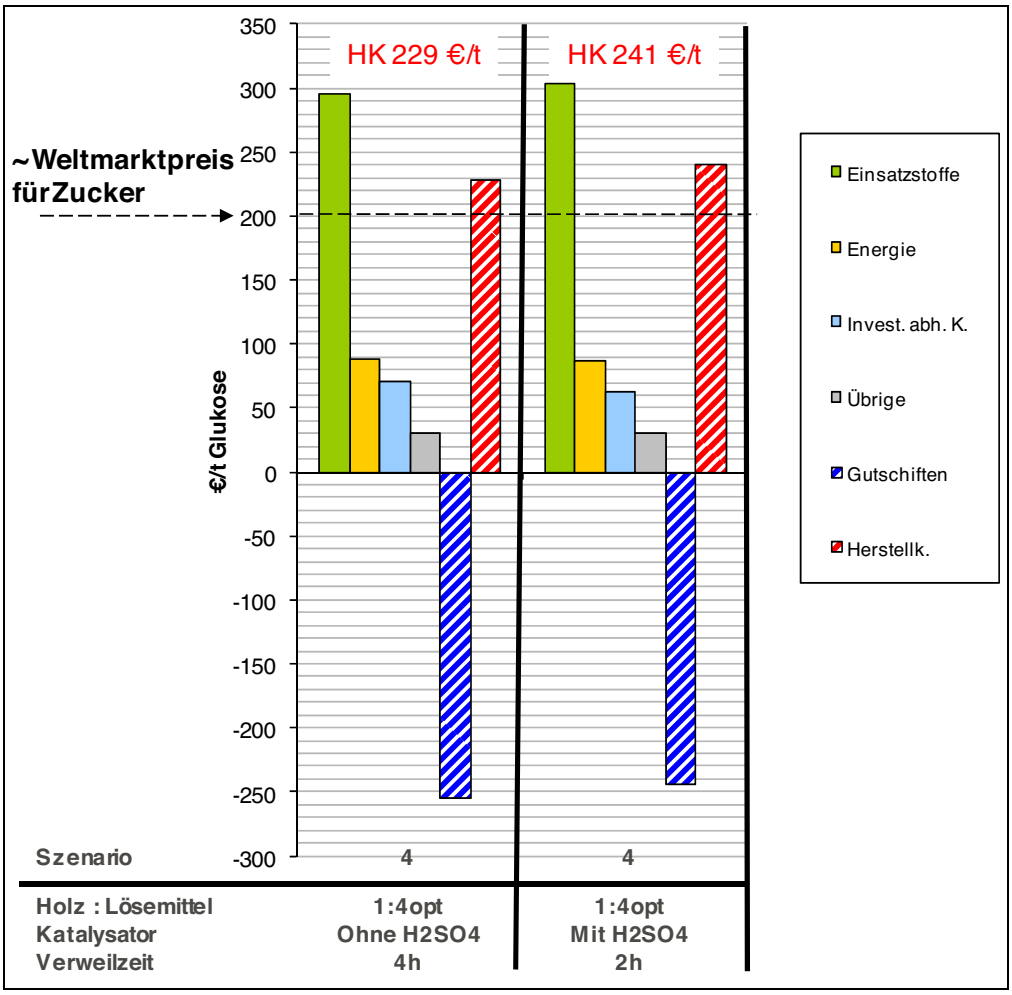


Abb. 4-33: Vergleich der Herstellkosten für die detaillierten Massenbilanzen und aktualisierte Preisdaten (Quelle: IIP)

Für den Ligninpreis wurde des Weiteren eine Preisspanne von 400 bis 800 €/t definiert. Diese Preisspanne orientiert sich am Phenolpreis, welcher sich in den Jahren 2002 bis 2009 zwischen 550 €/t und 1.000 €/t bewegte. Für verschiedene Anwendungsbereiche kann 1 kg Phenol durch 1 kg Lignin substituiert werden. Beispielsweise ist es nach Angaben von Dynea in einigen Anwendungsgebieten zur Herstellung von Phenol-Formaldehydharzen möglich, bis zu 30 % der benötigten Phenolmenge durch Lignin zu ersetzen (vgl. Kapitel AP3-3.2).

Unter der Annahme des maximalen Ligninpreises (800 €/t) liegen die Herstellkosten mit 119 €/t Glucose deutlich unter dem Weltmarktpreis für Zucker (vgl. Abb. 4-34).

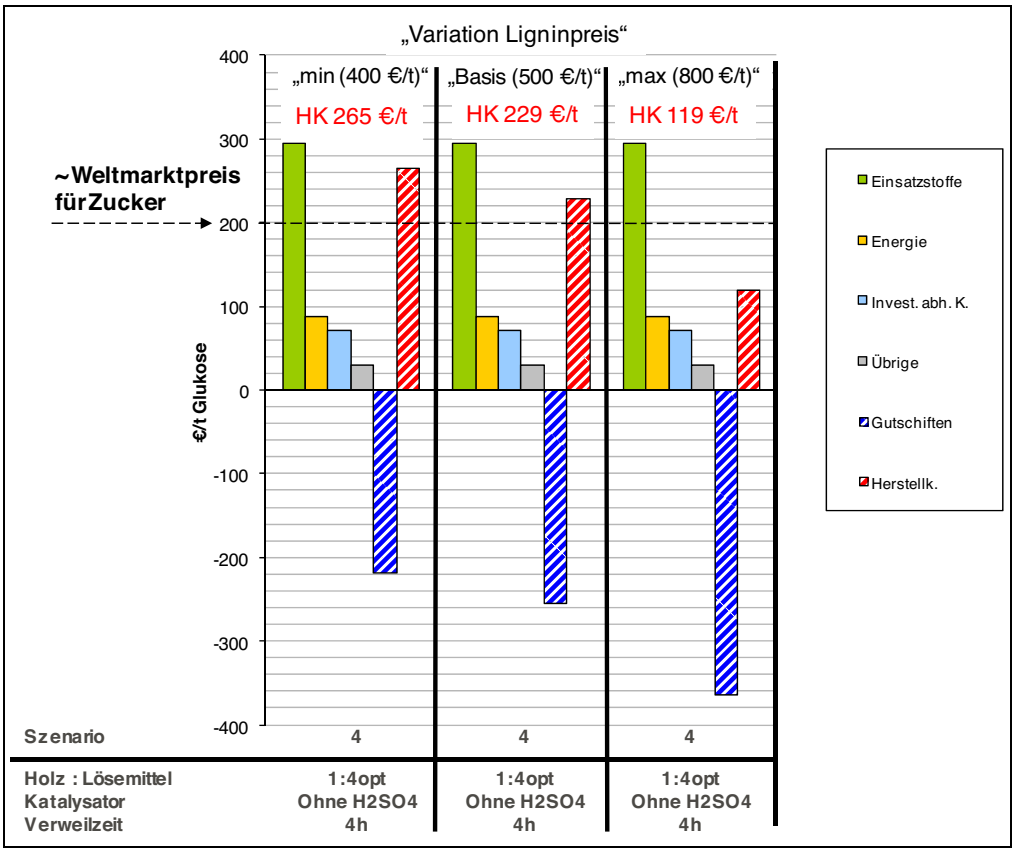


Abb. 4-34: Vergleich der Herstellkosten für die detaillierten Massenbilanzen bei Variation des Ligninpreises (Quelle: IIP)

AP4-8.3 Ökologische Bewertung der Prozesskette auf Basis detaillierter Massenbilanzen

Auf Basis der in Kapitel AP4-8.1 vorgestellten aktualisierten Massen- und Energiebilanzen werden die Auswertungen zur ökologischen Bewertung angepasst. In Abb. 4-35 sind die Ergebnisse der Szenarien 5 und 6 (Holzaufschluss mit und ohne Schwefelsäure bei 2 h bzw. 4 h Verweilzeit im Reaktor) den Referenzprozessen (vgl. AP4-7.4) gegenübergestellt. Aufgrund der insgesamt leicht verminderten Ausbeuten bzw. Produktmengen im Bioraffinerie-Prozess bei leicht gestiegenen Emissionen sinken die Emissionen der Referenzprozess in diesem dargestellten Vergleich derselben Produktmengen. In Folge dessen ist der Vorteil der Bioraffinerie-Prozesskette im Vergleich zu den ausgewählten Referenzprozessen weniger stark ausgeprägt. Ein negativer Einfluss des Einsatzes von Schwefelsäure als Katalysator für den Holzaufschluss macht sich insbesondere in der Wirkungskategorie *Versauerung* bemerkbar. Dies kann im Wesentlichen auf SO_2-Emissionen bei der Herstellung von Schwefelsäure zurückgeführt werden. Trotz der genannten Einschränkungen besteht insgesamt ein deutlicher Vorteil der Bioraffinerie-Prozesskette im Vergleich mit den gewählten Referenzprozessen.

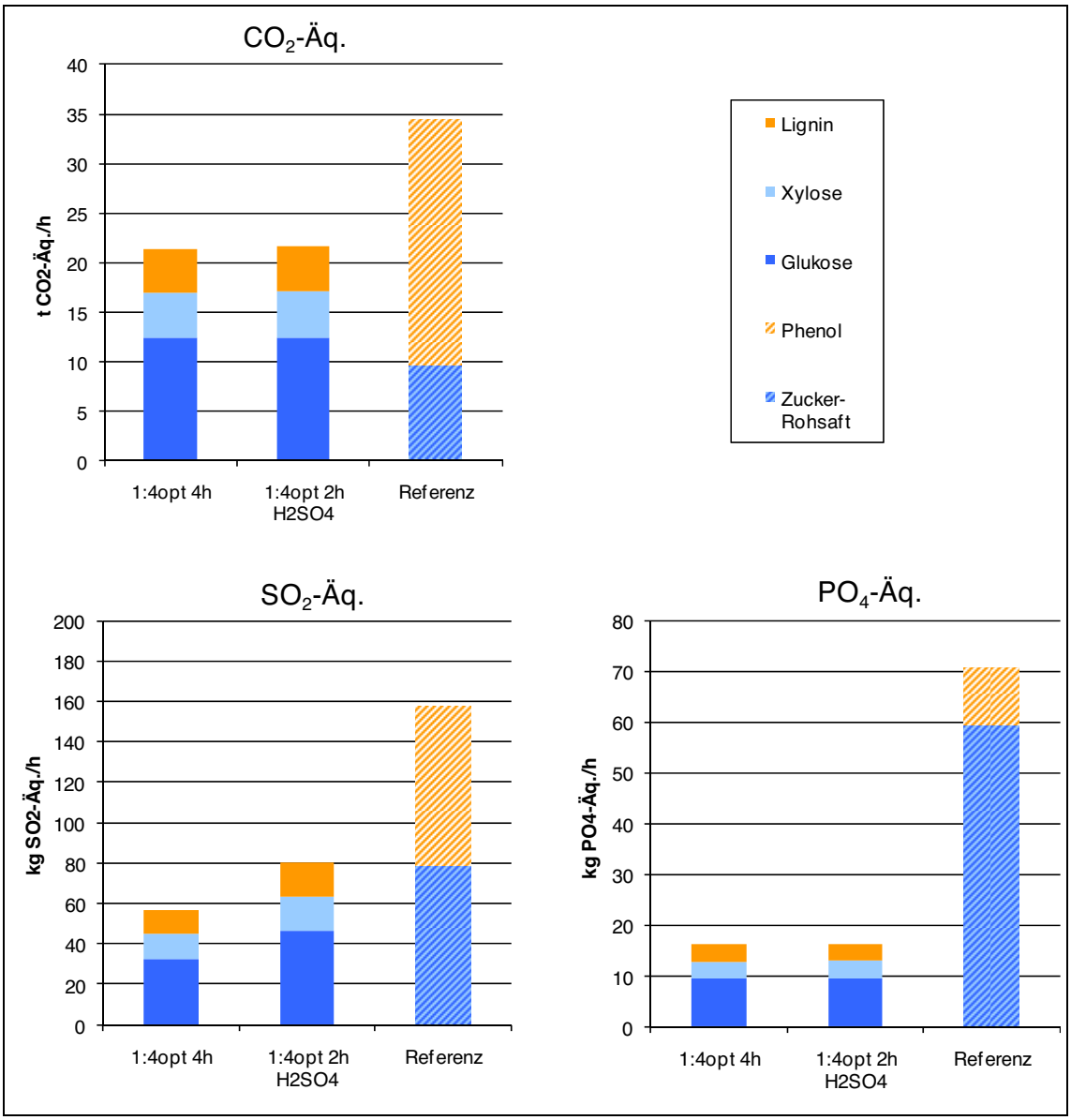


Abb. 4-35: Vergleich der Emissionsäquivalente auf Basis detaillierter Massenbilanzen mit den Referenzprozessen (Quelle: IIP)

AP4-9 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der Untersuchungen zu einer ersten Abschätzung der Wirtschaftlichkeit der Lignocellulose-Bioraffinerie für den Meilenstein 0 des Projektes wurden zunächst die Systemgrenzen und die zu untersuchenden Teilprozesse sowie deren Schnittstellen zu vor- und nachgelagerten Prozessen definiert. Nach der Beurteilung verschiedener Rohstoffalternativen hinsichtlich Verfügbarkeit und Kosten wurde in enger Abstimmung mit den jeweiligen Laborpartnern ein Basisfall für die Lignocellulose-Bioraffinerie definiert. Dieser Basisfall beschreibt den großtechnischen Aufschluss von Buchenholz-Hackschnitzeln (Holzsortiment Waldrestholz und Industrieholz) mittels Organosolv-Verfahren sowie die Weiterverarbeitung der erhaltenen Fraktionen zu den Endprodukten gelöste Glucose und Xylose (inkl. Oligomere) und getrocknetem, schwefelfreiem Lignin. Im weiteren Projektverlauf wurden ausgehend von diesem Basisfall verschiedene Optimierungspotentiale für den Prozess ermittelt und in Form von Szenarien mit in die Betrachtungen zur ökonomischen und ökologischen Bewertung eingeschlossen. Neben der Optimierung der Wärmeintegration wurde der Prozess auch im Hinblick auf eine Reduzierung des Lösemittel- und Wasch-

wasser-Einsatzes optimiert. Neben der ersten Abschätzung der Wirtschaftlichkeit zum Meilenstein 0 des Projektes dienen die Ergebnisse und Berechnungen des AP 4 auch der Unterstützung der Verfahrensentwicklung im Hinblick auf eine wirtschaftliche und ökologisch sinnvolle Prozessentwicklung.

Bereits zu einem frühen Projektzeitpunkt sollte abgeschätzt werden, ob in Deutschland ausreichend Rohstoff zur Verfügung steht, um eine Lignocellulose-Bioraffinerie nachhaltig zu versorgen. Hierzu wurden die Ergebnisse der beiden Bundeswaldinventuren von 1987 (BWI[1]) und von 2002 (BWI[2]) herangezogen. Auf Basis dieser Inventurdaten wurde ein Modell entwickelt, das das potentielle Rohholzaufkommen bis zum Jahr 2042 quantifiziert. Eine Untergliederung der Prognosedaten liegt in Fünf-Jahres-Intervallen vor. Die Abschätzung des Buchenholz-Aufkommens erfolgte für den Fünfjahreszeitraum von 2008 bis 2012.

Wichtig für eine differenzierte Darstellung des Buchenholzpotenzials ist jedoch neben der Abschätzung des Gesamtpotenzials auch das Aufkommen der Buchensortimente, die potentiell bevorzugt in einer Lignocellulose-Bioraffinerie eingesetzt werden können. Das müssen, wie Kapitel AP4-6 gezeigt hat, aus Gründen der Wirtschaftlichkeit Sortimente mit geringem Preisniveau wie Industrie- und Waldrestholz sowie Stammholz geringer Qualität sein. Die zu erwartende Sortimentsstruktur wird durch ein Sortierungsmodell ermittelt, das es ermöglicht, das potentielle Rohholzaufkommen nach Sorten gemäß der Handelsklassensortierung aufzuteilen (SCHMITZ et al., 2005).

Für eine umfassende Betrachtung der Verfügbarkeit von Buchen-Rohholz zur Versorgung einer Bioraffinerie müssen aber neben den Rohstoffpotenzialen auch bereits bestehende Nutzungsstrukturen berücksichtigt werden, die in Konkurrenz zu der geplanten Anlage stehen. Zu diesem Zweck wurde die Methodik der Holzrohstoffbilanzierung angewendet (MANTAU, 2004). Dazu wurde den regionalen Aufkommenspotenzialen der Verbrauch gegenübergestellt. Für eine Nutzungskonkurrenz sind vor allem die Sektoren relevant, die Industrieholz, Sägenebenprodukte und Waldrestholz einsetzen. Dies sind einerseits die Holzwerkstoffindustrie und die Holz- und Zellstoffindustrie als stoffliche Nutzer und andererseits Biomassekraftwerke und private Haushalte, welche Holz zur Strom- und Wärmegewinnung einsetzen.

Die Analyse des Buchenholz-Aufkommens und der Nutzungskonkurrenz hat gezeigt, dass in den Regionen Nordhessen und Bayern/Hessen/Thüringen jeweils eine Lignocellulose-Bioraffinerie betrieben werden könnte, ohne mit den bereits bestehenden Betrieben in Konkurrenz um Rohstoff treten und ohne das Waldrestholzpotenzial voll ausschöpfen zu müssen. In Baden-Württemberg ist dies bei den derzeitigen Nutzungsstrukturen nicht möglich.

Neben der Standortanalyse sollten auch Bereitstellungsverfahren und -kosten für Buchenholzhackschnitzel untersucht werden. Während sich bei den Ernteverfahren kein eindeutig vorzügliches definieren ließ, konnte das Abrollcontainer-Transportsystem aufgrund seiner Flexibilität als Verfahren der Wahl für den LKW-Transport identifiziert werden. Je nach Bestandesstruktur und Topographie können Waldhackschnitzel inkl. Transport über 50 km zu Kosten von 50 – 150/t atro bereitgestellt werden.

Zum Pappelholz-Aufkommen aus Kurzumtriebsplantagen auf landwirtschaftlichen Flächen als alternativer Rohstoff konnten keine qualifizierten Schätzungen abgegeben werden. Sofern die derzeit noch existierenden ökonomischen, technischen und rechtlichen Restriktionen beseitigt werden können, spricht nichts dagegen, dass Biomasse von Kurzumtriebsplantagen mittelfristig einen Beitrag zu Entlastung der Holzmärkte leisten können und bei der Planung einer Lignocellulose-Bioraffinerie als Rohstoffquelle nicht außer Acht gelassen werden sollten.

Mit der derzeit verfügbaren Erntetechnologie (modifizierte Maishäcksler) können in Kurzumtriebsplantagen Pappelhackschnitzel inkl. Transport über 50 km zu Gesamtproduktionskosten von rund 65 €/t atro bereitgestellt werden.

Da die Rohstoffkosten ein entscheidender Kostenfaktor für den Betrieb einer Lignocellulose-Bioraffinerie sind, war es abschließende Aufgabe des AP 4.3 die Rohstoffpreise zu analysieren. Nach einer Phase hoher Preise im Jahr 2007 sind die Preise für das Leitsortiment Buchenindustrieholz in 2008 und 2009 wieder deutlich auf das Niveau von 2006 zurück gegangen, so dass die Wirtschaftlichkeitsberechnung mit einem Rohstoffpreis von 70 €/t atro frei Werk realistisch erscheint.

Grundlage der ökonomischen und ökologischen Bewertung der Prozesskette stellen die Stoff- und Energiebilanzen der einzelnen Prozessschritte dar. Zur Ermittlung der Stoff- und Energiebilanzen für den Basisfall und die Szenarien wurden die Stoff- und Energieströme der Teilprozesse entlang der gesamten Wertschöpfungskette der Lignocellulose Bioraffinerie modelliert. Hierzu wurde ein *UMBERTO*-Stoffstromnetz sowie ein Prozessmodell in *ASPEN PLUS* erstellt.

Aufbauend auf den ermittelten Stoff- und Energiebilanzen wurde im Rahmen der ökonomischen Bewertung eine Schätzung der Investitionen, der stoffstrominduzierten Kosten, der Erlöse für die Nebenprodukte, der Energie-, Personal- und sonstigen Kosten sowie der investitionsabhängigen Kosten durchgeführt. Daraus wurden die Herstellkosten für Glucose ermittelt, wobei die Erlöse für die Nebenprodukte gelöste Xylose (inkl. Oligomere) und Lignin als Gutschriften berücksichtigt wurden. In erster Näherung konnte das Verfahren bereits zum Meilenstein 0 als wirtschaftlich beurteilt werden, wobei insbesondere die Produktausbeuten und Erlöse sowie der Preis für die Holz-Hackschnitzel die Schlüsselgrößen der ökonomischen Bewertung darstellen.

Im Rahmen der ökologischen Bewertung wurden die Umweltwirkungen anhand der CML-Wirkungskategorien *Klimaänderung*, *Versauerung* und *aquatische Eutrophierung* entlang der gesamten Prozesskette abgeschätzt. Ein Vergleich der Prozesskette mit möglichen Referenzprozessen zeigt Vorteile der Bioraffinerie in allen drei genannten Kategorien. Den Hauptbeitrag zu den Emissionsäquivalenten der genannten Kategorien leisten die Bereitstellungsketten für Strom, Dampf, Ethanol und Enzyme.

Auf Basis von im Projektverlauf von den Laborpartnern ermittelten detaillierteren Massenbilanzen konnte die ökonomische sowie die ökologische Bewertung unter Einbeziehung der genannten Prozessoptimierungen aktualisiert und spezifiziert werden. Die geschätzten Herstellkosten für Glucose liegen mit ca. 229 €/t Glucose über dem Weltmarktpreis für Zucker, welcher ca. 200 €/t beträgt. Insbesondere im Hinblick auf eine Steigerung der Produktausbeuten durch eine Verbesserung des Holzaufschlusses kann von einer weiteren Reduzierung der Herstellkosten ausgegangen werden. Erste Hinweise auf diese Möglichkeit können aus den Laborergebnissen zur Untersuchung des Einsatzes von Schwefelsäure als Katalysator für den Holzaufschluss abgeleitet werden. Es zeigt sich, dass unter Einsatz von Schwefelsäure bei einer Verweilzeitreduktion im Aufschlussreaktor von vier auf zwei Stunden das Endprodukt Lignin in einer vergleichbaren Größenordnung gewonnen und der Anteil an Oligopentosen in der Xylose-Fraktion reduziert werden kann. Beispielsweise würde bereits ein um 50 % verminderter Verlust von Lignin und Hemicellulose mit dem Faserstoff Herstellkosten von 170 €/t Glucose ergeben (inkl. Berücksichtigung zusätzlicher Kosten für Schwefelsäure).

Die Bilanzierung und Bewertung der Prozesskette für eine mögliche großtechnische Realisierung wurde im AP4 damit abgeschlossen (Meilenstein 6). Zur Bestätigung bzw. Anpassung der getroffenen Annahmen, welche der Wirtschaftlichkeit zu Grunde liegen, insbesondere im Hinblick auf Produktqualitäten und Produktausbeuten, sowie zur Einbeziehung weiterer Möglichkeiten der Prozessverbesserung sind weitere Experiment-basierte Ergebnisse notwendig.

Im Hinblick auf das AP 5 dienen das vorgestellte Fließbild, die Prozessparameter (Flotte 1:4, T=180°C, p=18bar, t=4h) sowie die vorgestellten Massen- und Energiebilanzen des optimierten Szenarios (1:4opt) nach Aktualisierung der Massenbilanzen als Grundlage für die Planung der Pilotanlage.

Es sei an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen, dass unter den getroffenen Annahmen alle drei Produktfraktionen maßgeblich zu den Erlösen der Prozesskette beitragen, wobei Lignin eine zentrale Stellung einnimmt.

AP4-10 Literatur

Anonymus (2006): Die Pflanzdichte bestimmt den Ertrag. In: top agrar (Hrsg.): Jahrbuch neue Energie für Investoren und Betreiber. Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster: 95

Boelcke, B. (2006): Schnellwachsende Baumarten auf landwirtschaftlichen Flächen. Leitfaden zur Erzeugung von Energieholz. Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft, Forsten und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, Schwerin, 44 S.

Burger, F. (2006): Erzeugung von Holzbiomasse – Die Produktion von Energieholz auf landwirtschaftlichen Flächen. In: DLG (Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft e.V.) (Hrsg.): Aufbruch in ein neues Zeitalter – Nahrung und Energie. DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt/Main: 145-156

Eckel, H. (2006): Energiepflanzen. Daten für die Planung des Energiepflanzenanbaus. KTBL (Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V.), Darmstadt, ATB (Leibnitz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V.), Potsdam, 372 S.

Ecoinvent Centre (2007): Ecoinvent data v2.0. ecoinvent reports No. 1 – 25. Swiss Centre for Life Cycle Inventories, Dübendorf.

Euwid (2008): Pollmeier siedelt sich vorerst nicht in Heimsheim an. Euwid Holz und Holzwerkstoffe, 82 (12/20.03.2008), S. 20.

Friedrich, E. (1999): Anbautechnische Untersuchungen in forstlichen Schnellwuchsplantagen und Demonstration des Leistungsvermögens schnellwachsender Baumarten. In: FNR (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe) (Hrsg.): Modellvorhaben „Schnellwachsende Baumarten“ – Zusammenfassender Abschlussbericht, Schriftenreihe „Nachwachsende Rohstoffe“ Band 13, Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster: 19-150

Hofmann, M. (1998): Bewirtschaftung schnellwachsender Baumarten auf landwirtschaftlichen Flächen im Kurzumtrieb. Merkblatt 11. Forschungsinstitut für schnellwachsende Baumarten. Hannoversch Münden, 28 S. http://www.dendrom.de/daten/downloads/hofmann_merkblatt. pdf

Landgraf, D., Böcker, L., Haschke, P., Thomas, S. (2005): Energieholz aus Agrarbetrieben. Bauernzeitung 46 (41): 27-28

Mantau, U. (2004): Holzrohstoffbilanz Deutschland. Bestandsaufnahme 2002. Abschließender Forschungsbericht, Hamburg, 75 S.

Mantau, U.; C. Sörgel (2006): Energieholzverwendung in privaten Haushalten. Marktvolumen und verwendete Holzsortimente. Abschlussbericht Hamburg, 23 S.

Musialczyk, C.; U. Mantau (2007): Standorte der Holzwirtschaft. Die energetische Nutzung von Holz in kommunalen und gewerblichen Kleinanlagen. Universität Hamburg, Zentrum Holzwirtschaft. Arbeitsbereich Ökonomie der Holz- und Forstwirtschaft. Hamburg, 46 S.

Nielsen, P.; Oxenboll,K.; Wenzel,H. (2007): Cradle-to-Gate Environmental Assessment of Enzyme Products Produced Industrially in Denmark by Novozymes A/S. In: International Journal of Life Cycle Assessment, 12, 6.

Nielsen, A. M. (2009): Persönliche Mitteilung von Anne Merete Nielsen, Senior Life Cycle Economist, Novozymes A/S, Denmark

Ochs, T.; C. Duschl; B. Seintsch (2007): Struktur und Rohstoffbedarf der Holzwirtschaft. Teil I der Studie – Regionalisierte Struktur- und Marktanalyse der 1. Verarbeitungsstufe der Holzwirtschaft. Holz-Zentralblatt, 133 (10), S. 269-271.

OECD-FAO (2007): Agricultural Outlook 2007-2016. Organisation for economic and co-operation and development, food and agriculture organization of the United Nations.

Pan et al. (2006): Bioconversion of Hybrid Poplar to Ethanol and Co-Products Using Organosolv Fractionation Process: Optimization of Process Yields. In: Biotechnology and Bioengineering, 94, 5.

Polley, H.; F. Kroiher (2006): Struktur und regionale Verteilung des Holzvorrates und des potenziellen Rohholzaufkommens in Deutschland im Rahmen der Clusterstudie Forst- und Holzwirtschaft. Arbeitsbericht des Instituts für Waldökologie und Waldinventuren, no. 3, Hamburg, Germany, BFH, 2006, 129 S.

Röhle, H., Hartmann, K.-U., Steinke, C., Wolf, H. (2005): Wuchsleistung von Pappel und Weide im Kurzumtrieb. AFZ-DerWald 60 (14): 745-747

Schaerff, A. (2007): Betriebswirtschaftliche Fragen des Anbaus von schnellwachsenden Baumarten auf Ackerland. Vortrag, gehalten auf der Fachtagung „Schnellwachsende Baumarten“, 17.04.07, Köllitsch. http://www.landwirtschaft.sachsen.de/de/wu/ Landwirtschaft/lfl/inhalt/download/SWB_KUP_170407_Schaerff_2_Kennwortschutz.pdf (Abrufdatum: 19.04.07)

Scheler, F. (1991): Schnellwachsende Baumarten im Vergleich. DLZ 42 (5): 30-35

Schmitz, F.; H. Polley; P. Hennig; K. Dunger, H. Englert (2005): Das potenzielle Rohholzaufkommen 2003 bis 2042 – Das Wichtigste in Kürze / Tabellen und Methode. Zu den Bundeswaldinventur-Erhebungen 2001 bis 2002 und 1986 bis 1988. Hrsg.: Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL), Berlin (Germany). Referat Öffentlichkeitsarbeit.

Schweinle, J. (2000): Analyse und Bewertung der forstlichen Produktion als Grundlage für weiterführende forst- und holzwirtschaftliche Produktlinien-Analysen, Hamburg: Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft. Mitteilungen der BFH, Nr. 184. 2. veränderte Auflage.

Sörgel, C.; U. Mantau (2006a): Standorte der Holzwirtschaft – Holz- und Zellstoffindustrie – Abschlussbericht. Universität Hamburg, Zentrum Holzwirtschaft, Arbeitsbereich Ökonomie der Holz- und Forstwirtschaft. Hamburg, 2006.

Sörgel, C.; U. Mantau (2006b): Standorte der Holzwirtschaft – Holzwerkstoffindustrie – Abschlussbericht. Universität Hamburg, Zentrum Holzwirtschaft, Arbeitsbereich Ökonomie der Holz- und Forstwirtschaft. Hamburg, 2006.

Sörgel, C.; U. Mantau; H. Weimar (2006): Standorte der Holzwirtschaft – Aufkommen von Sägenebenprodukten und Hobelspänen. Universität Hamburg, Zentrum Holzwirtschaft, Arbeitsbereich Ökonomie der Holz- und Forstwirtschaft. Hamburg, 2006

Thrän, D.; Scheuermann, A.; Fröhlich, N.; Weber, M.; Zeddies, J.; Henze, A.; Schweinle, J.; Thoroe, C.; M.; Jenseit, W.; Fritsche, U. R.; Rausch, L.; Schmidt, K. (2006): Sustainable Strategies for Biomass Use in the European Context. Leipzig: Institut für Energetik und Umwelt 2006, 359 S. = IE-Report, Leipzig, Edition 1/2006.

Tolan (2006): Alcohol production from cellulosic biomass: the Iogen process, a model system in operation. In: Biorefineries – Industrial Processes and Products, Volume 1

Toll Collect (2009): Mautsätze pro Kilometer für verschiedene Schadstoffklassen und Achszahlen von LKW. <http://www.toll-collect.de> (Zugriff August 2009)

United States Patent (1988): Patent Number 4,764,596: Recovery of Lignin

United States Patent (1998): Patent Number 5,788,812: Method of recovering furfural from organic pulping liquor

Vetter, A., Werner, A., Hering, T. (2006a): Energieholz vom Acker. Neue Landwirtschaft 2006 (6): 64-66

Vetter, A., Werner, A., Reinhold, G. (2006b): Leitlinie zur effizienten und umweltverträglichen Erzeugung von Energieholz. Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Jena, 21 S. http://www.tll.de/ainfo/pdf/holz1206.pdf (Abrufdatum: 15.01.07)

Wagner P., Heinrich J., Kröber M., Schweinle J., Große W. (2009): Ökonomische Bewertung von Kurzumtriebsplantagen und Einordnung der Holzerzeugung in die Anbaustruktur landwirtschaftlicher Unternehmen. In: Reeg, T.et al. (Hrsg.): Anbau und Nutzung von Bäumen auf landwirtschaftlichen Flächen. Wiley VCH Weinheim S.135-146.

Weimar, H.; Mantau, U. (2006): Standorte der Holzwirtschaft. Einsatz von Holz in Biomasse- und Holzfeuerungsanlagen. Abschlussbericht. Universität Hamburg, Zentrum Holzwirtschaft. Arbeitsbereich Ökonomie der Holz- und Forstwirtschaft. Hamburg, 25 S.

Wippermann, H.J. (1999): Verfahrenstechnik zur Biomasse-Ernte auf Kurzumtriebsflächen. In: FNR (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe) (Hrsg.): Modellvorhaben „Schnellwachsende Baumarten“ – Zusammenfassender Abschlussbericht, Schriftenreihe „Nachwachsende Rohstoffe“ Band 13, Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster: 314-340

ZMP (2007): ZMP-Marktbilanz Forst und Holz 2007. Bonn: Zentrale Markt- und Preisberichtstelle GmbH, 147 S.

AP4-11 Fazit

Im Rahmen der Untersuchungen zu einer ersten Abschätzung der Wirtschaftlichkeit der Lignocellulose-Bioraffinerie für den **Meilenstein 0** *„Die Wirtschaftlichkeit des gewählten Verfahrenskonzeptes ist unter Berücksichtigung der Rohstoffalternativen und erster technischer Ergebnisse erreichbar“* wurden die Systemgrenzen und die zu untersuchenden Teilprozesse sowie deren Schnittstellen zu vor- und nachgelagerten Prozessen definiert und darauf aufbauend die Wirtschaftlichkeit abgeschätzt.

- Dabei hat sich gezeigt, dass die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens maßgeblich von Preis und Verfügbarkeit der Holzhackschnitzel und insbesondere dem Verkaufspreis, dem Verkaufsvolumen sowie der Qualität des Lignins bestimmt wird.
- Die Analyse des Buchenholz-Aufkommens und der Nutzungskonkurrenz hat gezeigt, dass in den Regionen Nordhessen und Bayern/Hessen/Thüringen jeweils eine Lignocellulose-Bioraffinerie betrieben werden könnte.
- Schwefelfreiem Lignin kommt als mengenmäßig großem und hochpreisigem Produkt eine Schlüsselgröße in der ökonomoschen und ökologischen Bewertung zu. Das Konzept der geplanten Pilotanlage wird dementsprechend auf die Ligninproduktion ausgerichtet.

Das Teilziel *„Bilanzierung und Bewertung abgeschlossen“* des **Meilensteins 6** wurde im AP 4 erreicht. Die Prozessparameter und Massenbilanzen des Szenarios (1:4opt) haben als Grundlage für die Planung der Pilotanlage (Teilziel *„Konzept für verfahrenstechnische Umsetzung erstellt“* im Meilenstein 6) gedient.

AP5: Entwicklung eines Konzepts für die technische Umsetzung in einer Pilotanlage

AP5-1 Verfahrenskonzept Pilotanlage (BTS)

Basis des Verfahrenskonzeptes für die Pilotanlage (s. Abb. 5-1) sind die vorangegangenen Arbeiten zur Wirtschaftlichkeitsbetrachtung. Für die geplante technische Anlage wurde als Kalkulationsbasis das Produktionsäquivalent von 100 jato Bioethanol festgelegt, um einen realistischen Anlagenvergleich zu erhalten. Da bei der Pilotierung nicht nur die technische Machbarkeit, sondern auch die wirtschaftliche Umsetzbarkeit zu bestätigen ist, muss der Bezug zum technischen Konzept gewahrt bleiben. Dies bedeutet unter Umständen, insbesondere bei möglichen Optimierungsansätzen, Einschränkungen oder spezifische Vorgaben für einzelne Verfahrensteile.

Berücksichtigung finden dabei die Hauptverfahrensschritte:

- Holzaufschluss: Flotte 1:4, 180 ºC, 18 bar, 50/50 Ethanol/Wasser, Aufschlusszeit 4 h.
- Entspannung auf 1 bar und Kondensation der entstandenen Ethanol-haltigen Brüden
- Abtrennung und Reinigung der Faserfraktion
- Ligninfällung mit Ligninabtrennung und Reinigung sowie anschließender Lignintrocknung
- Lösungsmittelrückgewinnung durch Destillation

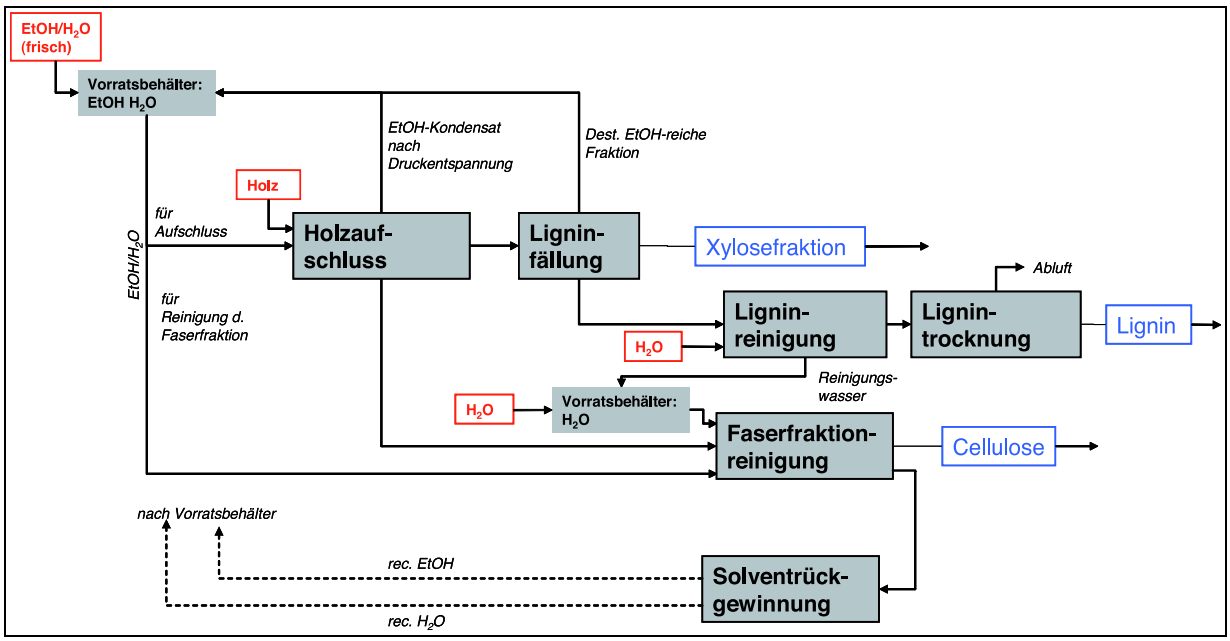


Abb. 5-1: Blockdiagramm Pilotanlage (Quelle: BTS)

Auf die Einbindung einer vorgeschalteten Extraktion zur Abtrennung anderer Holzinhaltsstoffe wie Triterpene wurde verzichtet. Wie Untersuchungen in AP 1 zeigten, konnte das erwartete Potenzial nicht bestätigt werden.

Folgende Verfahrensoptimierungen wurden bei der Konzeptionierung berücksichtigt bzw. übernommen:

- Ligninfällung: Ethanolgehalt < 20 %, T < ~ 70 °C (je geringer die Temperatur, desto besser die Qualität des Lignins).
- Handhabung des Aufschlussreaktors: Beschränkung der Größe (einfachere und flexiblere Bedienbarkeit).
- Ethanolrückgewinnung: Mittels Destillation wird Ethanol für den Holzaufschluss zurückgewonnen.

AP5-1.1 Pilotanlage

Unter Einbeziehung der Versuchsergebnisse und optimierten Prozessbedingungen für den Holzaufschluss und die Ligninfällung aus AP 2 erfolgte die Festlegung der apparativen und verfahrenstechnischen Randbedingungen für die Pilotanlage. Das in der Pilotanlage umzusetzende Konzept ist als entsprechendes Fließbild in Abb. 5-2 dargestellt.

AP5-1.1.1 Pilotkapazität

Die gewählte Anlagengröße für die Pilotierung resultiert aus den erforderlichen Einzelprodukten zur Versorgung der betreffenden Projektteilnehmer und handhabbaren Apparategrößen. Die Ligninkapazität zeigte sich dabei als Schlüsselprodukt und maßgebliche Skalierungs-Größe.

Mit diesen Überlegungen und Randbedingungen ergibt sich die berücksichtigte Produktionskapazität mit 50 – 80 kg/Woche Lignin, aus der sich eine aufzuarbeitende Menge Buchenholz von ca. 1.300 kg/Woche errechnet.

AP5-1.1.2 Verfahrensschritte und -optimierung in der Pilotanlage

AP5-1.1.2.1 Holzaufschluss

Gemäß den Untersuchungen in AP 2 wird für den Holzaufschluss ein Umlaufperkolator verwendet. Aus der optimierten Flotte resultiert die Verwendung von relativ grobem Holzeinsatzmaterial, also Hackschnitzeln.

Da Befüll- und Entleerungsvorgänge des Perkolators die Handhabbarkeit dieses Apparates maßgeblich bestimmen, wurde seine Größe hinsichtlich dieser Aspekte eingeschränkt.

Derzeit ist auf dem Markt keine komplette Einheit für einen solchen Einsatz verfügbar, so dass ein entsprechender Apparat, nach Vorlage des in Hamburg eingesetzten Apparates von Voith, konzipiert und gebaut werden muss.

Es wird vorgeschlagen den Perkolator so zu gestalten, dass Befüllung und Entleerung weitestgehend manuell erfolgen. Die Frage, ob eine einfache oder eine doppelte Ausführung mit reduziertem Durchmesser für die Anlage gewählt wird, bleibt vorerst offen.

Die Entspannung nach dem Aufschluss kann ebenfalls im Perkolator stattfinden. Danach werden die Flüssigkeit zur Ligninfällung und die Faserfraktion zur Reinigung geführt.

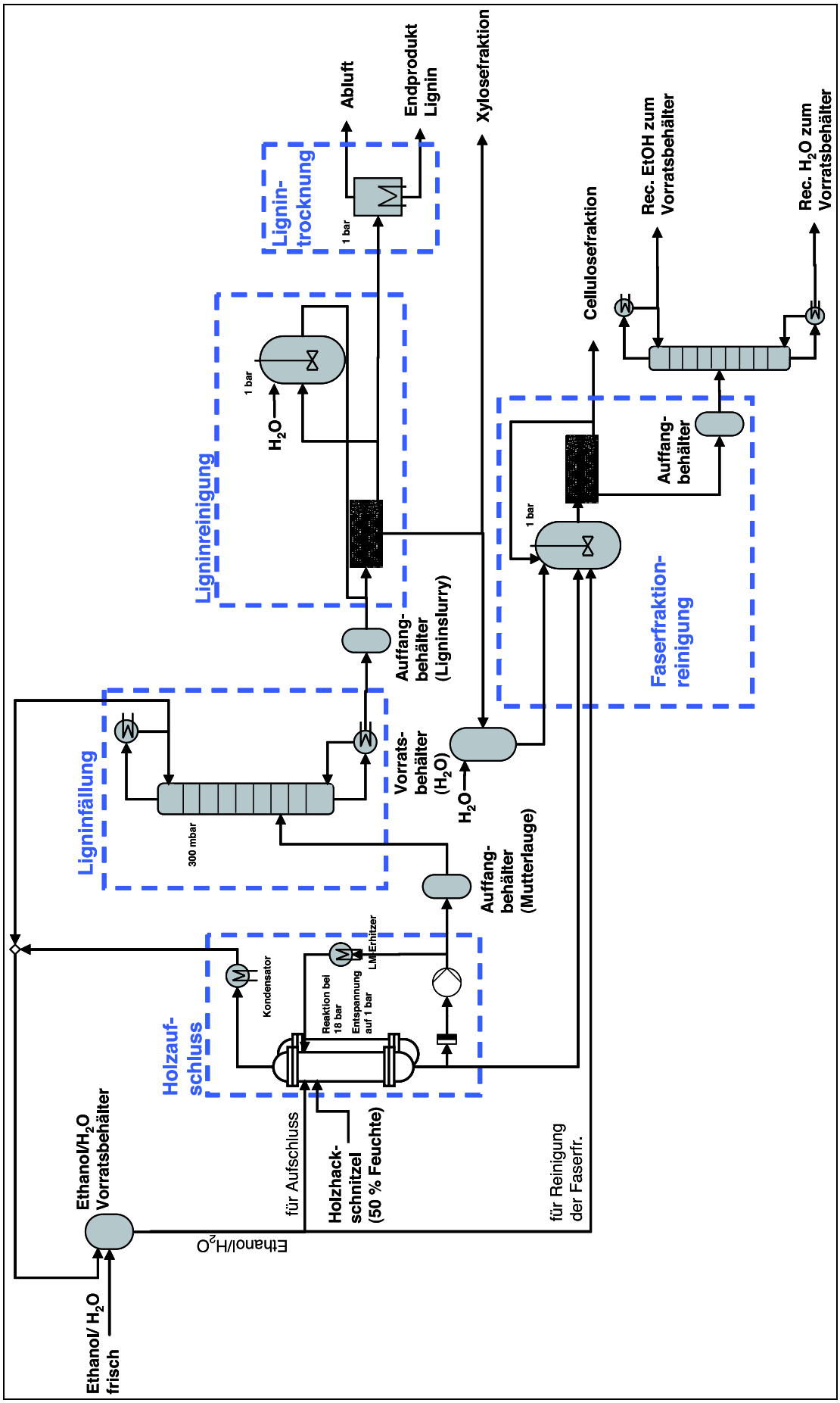


Abb. 5-2: Blockdiagramm Pilotanlage (Quelle: BTS)

AP5-1.1.2.2 Reinigung der Faserfraktion

Um die Effektivität der Faserfraktionsreinigung zu steigern, wird diese zunächst mit einem Ethanol-Wasser-Gemisch gereinigt. Dann wird sie mehrmals mit teils Frischwasser, teils Wasser aus der Ligninreinigung gewaschen. Für die verschiedenen Reinigungsschritte wird die Faserfraktion zunächst mit der jeweiligen Reinigungsflüssigkeit vermengt und anschließend von dieser mittels eines Dekanters wieder getrennt. Das Abwasser aus dem Reinigungsschritt kann zur Rückgewinnung des Ethanols einer Destillationskolonne zugeführt werden. Die saubere Faserfraktion steht zur Weiterverarbeitung (enzymatische Hydrolyse) bereit.

AP5-1.1.2.3 Ligninfällung / Abtrennung

Der Ligninfällung kommt im Konzept der Pilotanlage aufgrund der Relevanz des Produktes Lignin und dessen Qualität eine gesonderte Bedeutung zu.

Die erfolgreiche Fällung von Lignin und dessen Produktqualität hängen von folgenden Prozessparametern ab: der Ethanolkonzentration der Mutterlauge, dem pH und der Temperatur. Die Reduktion der Ethanolkonzentration soll hierbei möglichst schnell von Statten gehen und die Temperatur möglichst niedrig gehalten werden, um die gewünschte Produktqualität zu erreichen.

Für die Fällung des Lignins aus der Mutterlauge stehen mehrere Verfahrensalternativen zur Diskussion:

- Schlagartige Verdünnung der Lösung mit Wasser unter die erforderliche Ethanolkonzentration von 20 % (niedrige Temperatur).
- Abdampfen des Ethanol aus der Lösung unter die gewünschte Konzentration (erhöhte Temperatur).
- Hybrid-Verfahren: teilweise wird das Ethanol verdampft und dann das Wasser zugeführt.

Durch eine schlagartige Verdünnung mit Wasser können auf einfache Weise günstige Fällungsbedingungen eingestellt werden (z.B. eine niedrige Temperatur), die zu einer guten Ligninqualität führen. Die Verfahrensvariante weist aber einen erheblichen Nachteil auf. Bezogen auf die technische Umsetzung würde dieses Verfahren dem Prozess zusätzlich ca. 150 m³/h bis 200m³/h Wasser zuführen. Dies führt neben einer erhöhten Abwassermenge sowie einer enormen hydraulischen Steigerungen im Prozess zu einer deutlichen Steigerung des Aufwandes für die Ethanolwiedergewinnung.

Dieser Nachteil würde beim Abdampfen des Ethanols aus der Lösung vermieden. Allerdings muss hier mit einer längeren Konzeptentwicklungszeit gerechnet werden, um sowohl eine hohe Anlagenverfügbarkeit als auch eine hohe Ligninqualität zu garantieren.

Für die Abtrennung des Lignins wird zusätzlich ein Dekanter bzw. ein Tellerseparator vorgesehen. Dieser Apparat dient darüber hinaus der Reinigung des Lignins.

AP5-1.1.2.4 Ligninreinigung und -trocknung

Der Reinigungsvorgang für das Lignin ist weitgehend identisch mit der Reingung der Faserfraktion (siehe AP5-1.1.2.2) mit der Ausnahme, dass hier nur Wasser als Waschflüssigkeit Verwendung findet. Das Abwasser wird nicht verworfen sondern der Faserfraktionsreinigung zugeführt. Das Produkt enthält nach der Abwassertrennung eine Restfeuchte und wird in einer Trocknungsanlage (z.B. Schaufeltrockner) getrocknet.

AP5-1.1.3 Modulkosten

Die Modulkosten für die konzipierte Pilotanlage belaufen sich auf ca. 2,3 Millionen Euro ohne und ca. 2,7 Millionen Euro mit einer Destillationskolonne zur Lösungsmittelrückgewinnung (Tab. 5-1). Die Modulkosten beinhalten die Kosten für die Apparate, die internen Rohrleitungen, die PLT-Ausrüstung und Gebäudeanteile. Bei den Modulkosten handelt es sich nur um eine Schätzung in der frühen Kozeptentwicklungsphase.

Tab. 5-1: Auflistung der Modulkosten für die konzipierte Pilotanlage (mit Solventrückgewinnung (Quelle: BTS).

Anzahl	Bezeichnung	Parameter	Zwischensumme [Mio Euro]	Verfahrens-block
1	Kreiselpumpe mit Magnetantrieb	Wst1.4408, H = 30 m, Volstr. = 0,48 m³/h		
1	Kreiselpumpe mit Magnetantrieb	Wst1.4408, H = 30 m, Volstr. = 1,8 m³/h		
2	Percolator	Wst1.4571, PN = 18 bar, 220 L		
2	Sammler / Verteiler	Wst1.4404, Sammler/Verteiler, D = 400 mm, N = 1 Stück		
2	Boden	Wst1.4404, Ventil, D = 400 mm, N = 1 Stück		
1	Rohrbündelwärmeübertrager	Wst1.4571, p = 18 bar, A = 0,8 m²		
1	Kondensator	Wst1.4571, p = 1 bar, A = 2,4 m²	*0,50*	Holzaufschluss
1	Lagerbehälter ohne Beheizung	Wst1.4571, drucklos, V = 0,63 m³		
1	Rührbehälter mit Rührer und Motor	Wst1.4571, p = 1 bar, V = 0,63 m³		
1	Kolonnenkörper	Wst1.4571, PN = 3 bar, D = 174 mm, h = 8,5 m		
1	Boden	Wst1.4404, MVG, D = 174 mm, N = 10 Stück		
1	Kreiselpumpe mit Magnetantrieb	Wst1.4408, H = 30 m, Volstr. = 0,02 m³/h		
1	Kreiselpumpe mit Magnetantrieb	Wst1.4408, H = 30 m, Volstr. = 0,02 m³/h		
1	Kondensator	Wst1.4571, p = 3 bar, A = 0,3 m²		
1	Umlaufverdampfer	Wst1.4571, p = 3 bar, A = 0,1 m²	*0,62*	Destillation und Lignin-Präzipitation
1	Zentrifuge (Separator)	Volstr.: 100 - 400 L/h		
1	Kreiselpumpe mit Magnetantrieb	Wst1.4408, H = 30 m, Volstr. = 0,3 m³/h		
1	Kreiselpumpe mit Magnetantrieb	Wst1.4408, H = 30 m, Volstr. = 0,2 m³/h		
1	Rührbehälter mit Rührer und Motor	Wst1.4571, p = 1 bar, V = 0,1 m³	*0,42*	Lignin-Wäsche
1	Dekanter Zentrifuge	Volstr.: 100 - 400 L/h		
1	Kreiselpumpe mit Magnetantrieb	Wst1.4408, H = 30 m, Volstr. = 0,3 m³/h		
1	Kreiselpumpe mit Magnetantrieb	Wst1.4408, H = 30 m, Volstr. = 0,3 m³/h		
1	Kreiselpumpe mit Magnetantrieb	Wst1.4408, H = 30 m, Volstr. = 0,2 m³/h		
1	Rührbehälter mit Rührer und Motor	Wst1.4571, p = 1 bar, V = 0,25 m³	*0,37*	Cellulose-Wäsche
1	Lagerbehälter ohne Beheizung	Wst1.4571, drucklos, V = 0,63 m³		
1	Kolonnenkörper	Wst1.4571, PN = 1 bar, D = 140 mm, h = 3,8 m		
1	Boden	Wst1.4404, MVG, D = 140 mm, N = 3 Stück		
1	Kreiselpumpe mit Magnetantrieb	Wst1.4408, H = 30 m, Volstr. = 0,01 m³/h		
1	Kreiselpumpe mit Magnetantrieb	Wst1.4408, H = 30 m, Volstr. = 0,01 m³/h		
1	Kondensator	Wst1.4571, p = 1 bar, A = 0,1 m²		
1	Umlaufverdampfer	Wst1.4571, p = 1 bar, A = 0,3 m²	*0,45*	Lösungsmittel-Rückgewinnung
1	Schaufeltrockner	Kapazität: ca. 100L	*0,10*	Lignin-Trock-nung
1	Lagerbehälter ohne Beheizung	Wst1.4571, drucklos, V = 2,8 m³		
1	Lagerbehälter ohne Beheizung	Wst1.4571, drucklos, V = 1,6 m³	*0,21*	Lager-Behälter

AP5-1.1.4 Produktionsablauf

Die Apparate wurden so abgestimmt, dass die gewünschten Produktmengen im Zweischichtbetrieb (16 h/Tag, bei 5 Tagen/Woche) zu erzielen sind. Damit ergeben sich für den späteren Betrieb Möglichkeiten der Kapazitätserweiterung durch eine vollkontinuierliche Produktionszeit. Außerdem ergeben sich durch die begrenzte Haltbarkeit der Zwischenprodukte weitere Einschränkungen für die Konzeptionierung des Produktionsablaufes. Nur gereinigte Feststoffe (Lignin- oder Faserfraktion) oder ethanolhaltige Lösungen dürfen über das Wochenende gelagert werden. Die letzte Ligninfällung muss daher vor dem letzten Wochentag eingeleitet werden. So kann das Lignin mit Ablauf der Arbeitswoche gereinigt und getrocknet werden. Aus diesem Grund wird die Ligninfällung durch das Abdampfen des Ethanols in der Destillationskolonne nur halb-kontinuierlich

betrieben (88 Stunden/ Woche). Der Holzaufschluss wird auf 9 Ansätze pro Woche verteilt, um die Reaktorgröße zu reduzieren. Der Produktionsablauf für die Pilotanlage ist in Abb. 5-3 dargestellt.

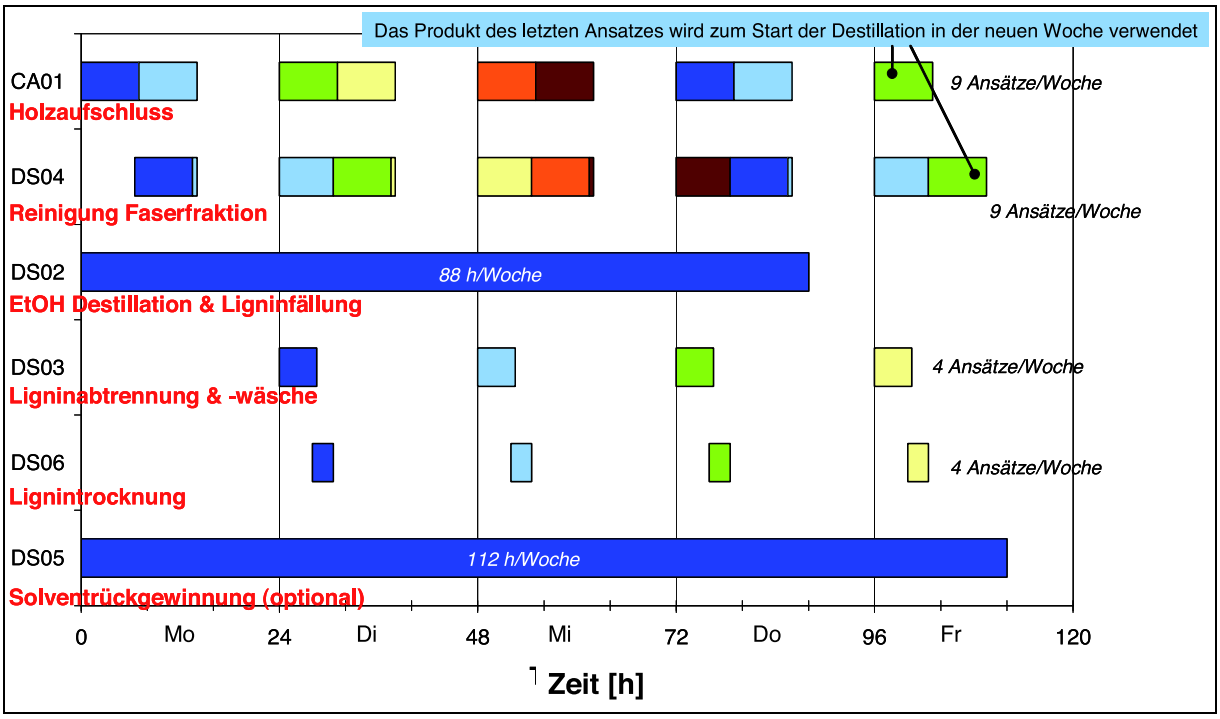


Abb. 5-3: Wöchentlicher Produktionsplan für die Pilotanlage. Die Destillationskolonne für die Ethanoldestillation und Ligninfällung wird halbkontinuierlich betrieben. (Quelle: BTS)

AP5-1.2 Offene Verfahrensmerkmale

Bezogen auf die Verfahrenschritte Holzaufschluss und Ligninfällung bleiben Fragen zur Methodik und den gültigen Verfahrensbedingungen offen, die einer späteren Anpassung bedürfen.

Beim Holzaufschluss liegt das Problem zunächst in der Verfügbarkeit eines Apparates mit den geforderten Abmessungen und dessen Handhabung. Für den technischen Maßstab liegt aus dem Bereich der Papierherstellung genügend Expertenwissen vor, um einen solchen Apparat zu konzipieren. In der Pilotanlage könnte es jedoch sinnvoll werden, den Perkolator z.B. gegen einen Extruder oder eine Kombination Extruder/ Seierschnecke auszutauschen, um den Prozess effizienter zu gestalten. Mittels einer solchen Anordnung könnten der Aufschluss und die Cellulosewäsche kontinuierlich im Gegenstrom betrieben werden. Im Rahmen des Folgeprojektes sollte die Überprüfung einer solchen Möglichkeit Gegenstand der Arbeiten sein.

Bezüglich der Ligninfällung bleibt nach wie vor offen, welches Verfahren und welche Betriebsbedingungen einzustellen sind. Es muss ein störungsfreier wie auch effizienter Betrieb der Anlage gewährleistet werden. Derzeit wird bei der Ligninfällung das Abdampfen des Ethanols favorisiert und konzeptioniert. Darüber hinaus sollte das Potenzial für die Ligninabtrennung (mögliche Filtration) festgestellt werden. Es bleibt zu klären ob hierfür ein Zentrifugalapparat notwendig ist, oder ob alternativ günstigere Filtrationseinheiten eingesetzt werden können.

Die beim Holzaufschluss entstandenen Nebenprodukte wie z.B. Furfural, Ameisensäure und Essigsäure, die sich in der Xylosefraktion befinden, könnten die Fermentation beeinträchtigen. Diese Stoffe können destillativ als Zwischenstrom beim Abdampfen von Ethanol zur Ligninfällung entfernt werden.

Sicherlich ergeben sich im Bereich der Gesamtverschaltung, der Energieausnutzung, der Minimierung der Ethanolverluste etc ebenfalls Ansatzpunkte, um weitere Optimierungen zu ermöglichen und ggf. auch die Kapazität zu steigern.

AP5-2 Verfahrenskonzept Hydrolyse

AP5-2.1 Entwicklung eines Konzepts für die technische Umsetzung der enzymatischen Hydrolyse in einer Pilotanlage (Biopos)

Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Konzepts für die technische Umsetzung der enzymatischen Hydrolyse in einer Pilotanlage war die Nutzung von 600 kg Holz pro Woche[10]. Durch die Vorbehandlung des Holzes wurden Lignin und Hemicellulose weitgehend abgetrennt, sodass die Cellulose Fraktion des Holzes für den enzymatischen Abbau separat zur Verfügung stand. Durch die Auswertung der Analysenergebnisse aus den Untersuchungen in diesem Projekt kann für die enzymatische Verzuckerung der Cellulose bei vollständiger Umsetzung folgende Bilanz erstellt werden:

Rohstoff:	Holz (atro)	600	kg/Wo.	d.h.:	85,7	kg/d bzw.	3,57 kg/h
Zwischenprodukt:	Cellulose	270	kg/Wo.		38,57	kg/d	1,6 kg/h
Produkt:	Glucose	221,4	kg/Wo.		31,63	kg/d	1,32 kg/h

In Abb. 5-4 ist schematisch eine zweistufige Rührreaktorkaskade dargestellt, die mit Regelung von:

- Temperatur (45 – 50°C),
- pH-Wert (Einstellung auf 5,0 mit 5%iger Citronensäurelösung) und
- Substrat- bzw. Enzymzuführung auszustatten ist.

Die Zugabe von jeweils 25,6 kg frischer Cellulose erfolgt in einem 16 Stunden-Rhythmus abwechselnd in die Reaktoren 1 und 2. Dort findet die Haupthydrolyse statt. Das Enzym-Wassergemisch wird aus Reaktor 3 zugeführt. Nach 32 Stunden ist die Haupthydrolyse beendet und das Reaktionsgemisch wird einer Fest/Flüssig-Trennung zugeführt. Die abgetrennten Feststoffe werden für eine Nachhydrolyse (Reaktor 3) mit frischer Enzymlösung weitere 16 Stunden gerührt. Die flüssige Phase (Zucker-Enzymgemisch) kann aufkonzentriert und gereinigt oder direkt einer Fermentation zugeführt werden. Der Inhalt des Reaktors 3 wird nach Beendigung der Nachhydrolyse in den Reaktor 1 oder 2 überführt und eine neue Haupthydrolyse mit 25,6 kg Cellulose angesetzt. In jedem Reaktor ist mit Hilfe des Rührers (mind. 300 min^{-1}) für eine gute Durchmischung zu sorgen um eine optimale Verteilung von Substrat und Enzym zu erreichen und damit die Ausbeute zu erhöhen.

Durch den Einsatz der Enzyme zuerst in der Nachhydrolyse und anschließend in der Haupthydrolyse wird eine höhere Ausbeute an Glucose pro eingesetzter Enzymmenge erreicht. Da die Feststoffe im System gehalten werden, ist es möglich die Cellulose nahezu vollständig umzusetzen.

[10] Eine Kapazität von ca. 600 kg Holz atro pro Woche war die Ausgangsbasis für die Konzeptentwicklung der Pilotanlage.

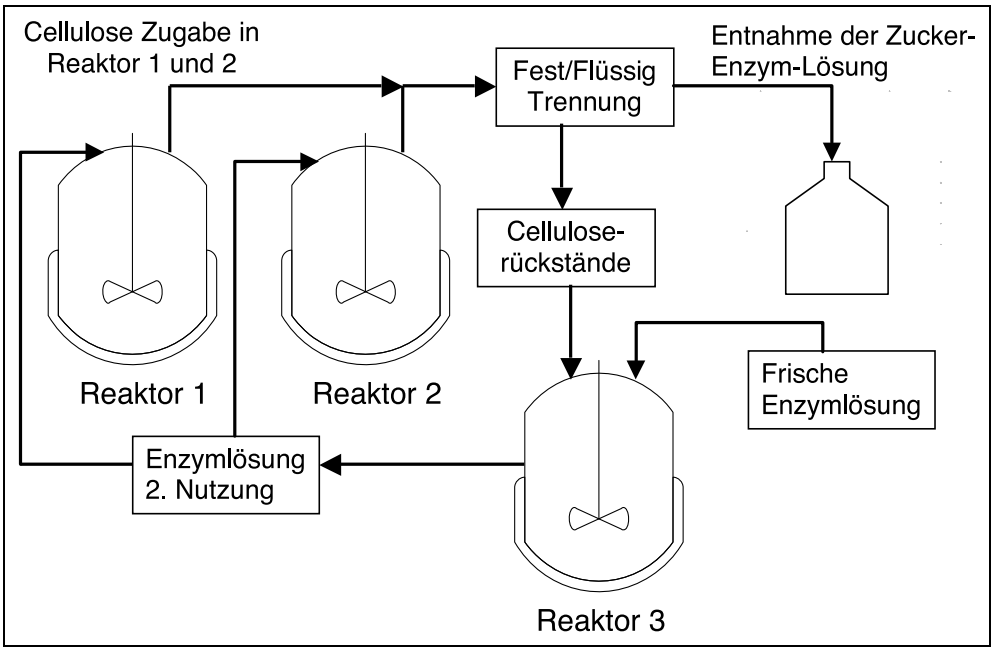


Abb. 5-4: Zweistufige Rührreaktorkaskade zur enzymatischen Hydrolyse (Quelle: Biopos)

AP5-2.2 Konzept einer enzymatischen Faserstoffhydrolyse im Pilotmaßstab (TU Kaiserslautern)

Die Konzeption der Pilotanlage zur Umsetzung von Holz zu fermentierbarer Glucose basiert auf einem wöchentlichen Umsatz von 600 kg Holz. Hieraus können nach aktuellem Kenntnisstand ca. 340 kg Faserstoff gewonnen werden. Unter Annahme einer Wochenkampagne mit fünf Arbeitstagen sind vier Faserstoffchargen zu je 85 kg umsetzbar. Die enzymatische Umsetzung erfolgt innerhalb von 24 h. Es ist von einer Glucoseausbeute von 153 kg pro Woche auszugehen.

Eine Skalierung der an der TU Kaiserlautern gewonnen Daten zu Umsatzrate und Ausbeute der enzymatischen Hydrolyse des Faserstoffs resultiert (s. AP3-1.7) in einem notwendigen Reaktorvolumen von 0,85 m^3. Der Einsatz eines einzigen Reaktors ist nach den bisherigen Versuchsergebnissen ausreichend und entspricht der Forderung nach einem möglichst robusten und einfachen Aufbau der Pilotanlage. Durch geringe Modifikationen der Zuführungsleitungen in dem unten dargestellten Konzept ist ein quasi-kontinuierlicher oder ein SSF-Betrieb der Hydrolyse ebenso möglich wie der anfangs vorgesehene Satzbetrieb. Je nach Erfolg der Betriebsarten kann in weiteren Skalierungen der Anlage eine einfachere Verfahrensauslegung gewählt werden.

Der Einsatz eines Knetmischers zur simultanen Vermengung und dem Transport von Faserstoff und Enzymen ist vorgesehen. In Abhängigkeit von der Verweilzeit des Reaktionsansatzes in dem Kneter kann die Reaktionsdauer im Hydrolysereaktor nach Möglichkeit vermindert werden. Des Weiteren lässt durch Einsatz des Kneters voraussichtlich der Energieeintrag des Reaktorrührsystems vermindern.

Dem Hydrolysereaktor ist eine Querstromfiltrationsanlage nachgeschaltet, die Filtration wird über eine Durchlaufpumpe mit vorgeschaltetem Grobpartikelfilter betrieben. Somit ist bei Bedarf eine Abtrennung der gebildeten Monosaccharide unter Rückhaltung von Substrat und Enzymen möglich. Nach Abschluss der Hydrolysereaktion kann eine Volumenverminderung durch Filtration und eine Vortrocknung des verbliebenen Feststoffs durch einen Separator erfolgen. Das Hydrolysat wird vor dessen Zuführung in eine Fermentation nach Hitzesterilisation zwischengelagert.

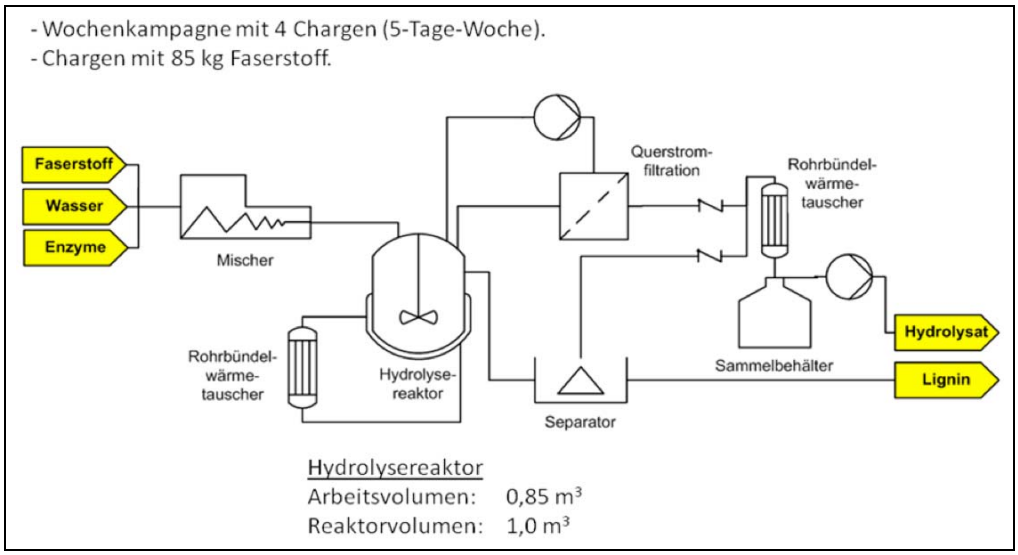


Abb. 5-5: Verfahrensfließbild des Konzepts zur enzymatischen Hydrolyse im Pilotmaßstab (Quelle: TU Kaiserslautern)

AP5-3 Fazit

Das Teilziel „*Konzept für die verfahrenstechnische Umsetzung*“ im **Meilenstein 6** wurde im AP 5 erreicht, indem ein tragfähiges Konzept für Anlage und Betrieb der Pilotanlage vorgelegt werden konnte. Zwei alternative Konzepte der Hydrolysestufe für die Faserfraktion konnten ebenfalls skizziert werden.