Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Herstellung organischer Säuren für die Polyestersynthese
ERA-IB: "Production of Organic Acids for Polyester Synthesis (POAP)"

Zuwendungsempfänger:

Teilvorhaben 1: Thünen-Institut für Agrartechnologie
Teilvorhaben 2: ASA Spezialenzyme GmbH

Förderkennzeichen:

Teilvorhaben 1: 22029312
Teilvorhaben 2: 22029412

Laufzeit:

01.05.2013 bis 31.10.2016

Datum der Veröffentlichung:

12.06.2017

Gefördert durch:

Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Inhaltsverzeichnis

I. Ziele 1

1. Aufgabenstellung 1

Projektschema und Projektpartner 2

Planung und Ablauf des Vorhabens 3

2. Stand der Technik 5

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen 6

II. Ergebnisse 7

WP 1. Rohstoffe (TI, ASA) 7

Charakterisierung der Rohstoffe (TI) 7

Optimierung der Vorbehandlung ligninarmer, agrarischer Reststoffe (TI) 8

Vergleich der chemischen und enzymatischen Hydrolyse ligninarmer Reststoffe (TI, ASA) 12

Optimierung der Hydrolyse ligninarmer Reststoffe (TI) 12

WP 2. Screening für Enzyme und Mikroorganismen (TI, ASA) 17

Entwicklung neuer Enzyme für die Hydrolyse von ligninarmen Reststoffen (ASA) 17

Screening nach neuen Hydrolasen für die Freisetzung von Monosacchariden und Zuckersäuren (ASA) 17

Verbesserung ausgewählter Enzyme durch Mutagenese (ASA) 25

Entwicklung spezieller Enzyme durch Gen-Knockout (ASA) 30

Charakterisierung neuer Cellulasen und Hemicellulasen (ASA) 38

Bereitstellung von Enzymen 43

MO Screening für die IA Produktion mit Glycerin als Substrat (TI) 46

Entwicklung einer Screeningmethode mit Schnelltest auf Itaconsäureproduktion 46

Screening von Umweltproben 47

Screening von Mikroorganismen der Abteilung Basidomycota 48

MO Screening für die IA Produktion mit Glycerin als Substrat 49

MO Screening für die IA Produktion mit Hydrolysaten ligninarmer Reststoffe als Substrat (TI) 50

Verwertbarkeit unterschiedlicher Monosaccharide aus ligninarmen Reststoffen 50

Einflüsse unterschiedlicher Zuckerabbauprodukten aus Hydrolysaten ligninarmer Reststoffe 51

Synthetische Hydrolysate 53

A. terreus - Synthetisches Organgenschalenhydrolysat 54

A. terreus - Synthetisches Kaffhydrolysat 55
WP 3. Fermentation für IA Produktion (TI) 55
Auswahl und Verbesserung von Biokatalysatoren für die IA Produktion 55
Produktion von IA mit freien und immobilisierten Zellen 57
Simultane Verzuckerung und Fermentation für die IA Produktion 57
WP 4. Prozessentwicklung und Scale-up (TI) 59
Auswahl der am besten geeigneten Rohstoff / Stamm / Fermentation Kombination 59
Kinetische Analyse und Prozessmodellierung 60
Optimierung der Fermentationsprozesse 60
Optimierung der Aufreinigung 60
Scale up der Fermentationen unter optimierten Bedingungen 62
WP 5: Produkt-Isolierung, Reinigung und Veredelung (TI) 63
Entwicklung von Produktisolierung und Aufreinigungstechniken 63
Katalytische Veredelung von Itaconsäure durch Derivatisierung und Herstellung von Polymeren 66
Epoxidierung von Itaconsäure zu Epoxyitaconsäure 66
Decarboxylierung von Itaconsäure zu Methacrylsäure 68
Hydrierung von Itaconsäure 73
Polykondensation von Itaconsäure und Methylbernsteinsäure mit 1,3- Propandiol 81
WP 7. Projektmanagement 86
Meilensteine 86
Verwertung 87
Erkenntnisse von Dritten 88
Veröffentlichungen 92
Literaturverzeichnis 94
Erzielte Ergebnisse der nicht deutschen Projektpartner 97
Biopolis 97
UCM 98
H2B 99
EKO 101
Fazit des Gesamtvorhabens 102

I. Ziele

Ziel des Projektes war die Entwicklung von effizienten und wirtschaftlichen biotechnischen Prozessen zur fermentativen Herstellung von D-Milchsäure (D-MS) und Itaconsäure (IA) aus den ligninarmen agrarischen Reststoffen (LAR) Weizenkaff, Orangenschalenresten (OPW) und Rohglycerin sowie deren Veredelung und Polymerisation.

D-MS und IA werden gegenwärtig durch Fermentation aus teuren Stärke-, Glucose- oder Saccharose-Quellen hergestellt. Alternative Rohstoffe wie lignocellulosehaltige Substrate wurden bisher vielfach getestet, die hohen Kosten für die Verzuckerung dieser Substrate verhindern gegenwärtig jedoch ihren industriellen Einsatz. Weizenkaff und Orangenschalen sind preiswerte Reststoffe, die in großen Mengen verfügbar sind. Ihr geringer Ligningehalt wirkt sich im Vergleich zu herkömmlichen lignocellulosehaltigen Substraten kostenreduzierend auf die Vorbehandlungs- und Hydrolyseprozesse aus. D-MS und IA sind wertvolle Chemikalien und zählen zu den favorisierten biobasierten Plattformchemikalien, die langfristig auf Erdöl basierende ersetzen können und auf deren Basis neuartige Polyester hergestellt werden können.

Das Projekt trägt daher unmittelbar dazu bei, fossile Rohstoffe zu schonen und substantielle Beiträge zum Klimaschutz zu leisten.

1. Aufgabenstellung

In diesem Projekt sollen die Substrate Weizenkaff und Orangenschalen durch eine Kombination von enzymatischen, chemischen und physikalischen Prozessen in vergärbare Zucker überführt werden, wobei neuartige Enzyme für die Hydrolyse von Cellulose, Hemicellulosen und Pektin eingesetzt werden. Als ein weiteres Substrat soll Rohglycerin aus der Biodieselproduktion eingesetzt werden.

Im Rahmen eines Screenings nach Mikroorganismen sollen Organismen identifiziert werden, die besonders für die Produktion von D-MS und IA aus diesen Substraten geeignet sind. Die Optimierung der fermentativen Herstellung von D-MS und IS soll auf verschiedenen Ebenen in gewöhnlichen Submerskulturen sowie als kombinierte Verzuckerung und Fermentation (simultaneous saccharification and fermentation, SSF) untersucht und optimiert werden.

Weiterhin sollen durch katalytische Derivatisierung andere potenziell für die Polyestersynthese geeignete Monomere aus Itaconsäure hergestellt und deren Eignung geprüft werden. Schließlich werden die im Projekt untersuchten Wertschöpfungsketten mittels Life Cycle Assessment (LCA) auf Ihre Nachhaltigkeit hin analysiert.

Projektschema und Projektpartner

Das Vorhaben deckte die gesamte Wertschöpfungskette ausgehend von verschiedenen agrarischen Reststoffen über die Biokonversion zu den Primärprodukten D-Milchsäure und Itaconsäure, deren Isolierung und Aufarbeitung bis hin zur Veredelung von Itaconsäure ab. Das Projektschema in Abbildung 1 zeigt die Abfolge der einzelnen Arbeitspakete entlang der Wertschöpfungskette und die Partner, die die Bearbeitung der verschiedenen Aufgabenbereiche durchführten. Die Betrachtung zur Prozessökonomie und zur Nachhaltigkeit (WP 6) betrachtete die gesamte Wertschöpfungskette, während das Projektmanagement (WP 7) das gesamte Projekt zusammenführte.

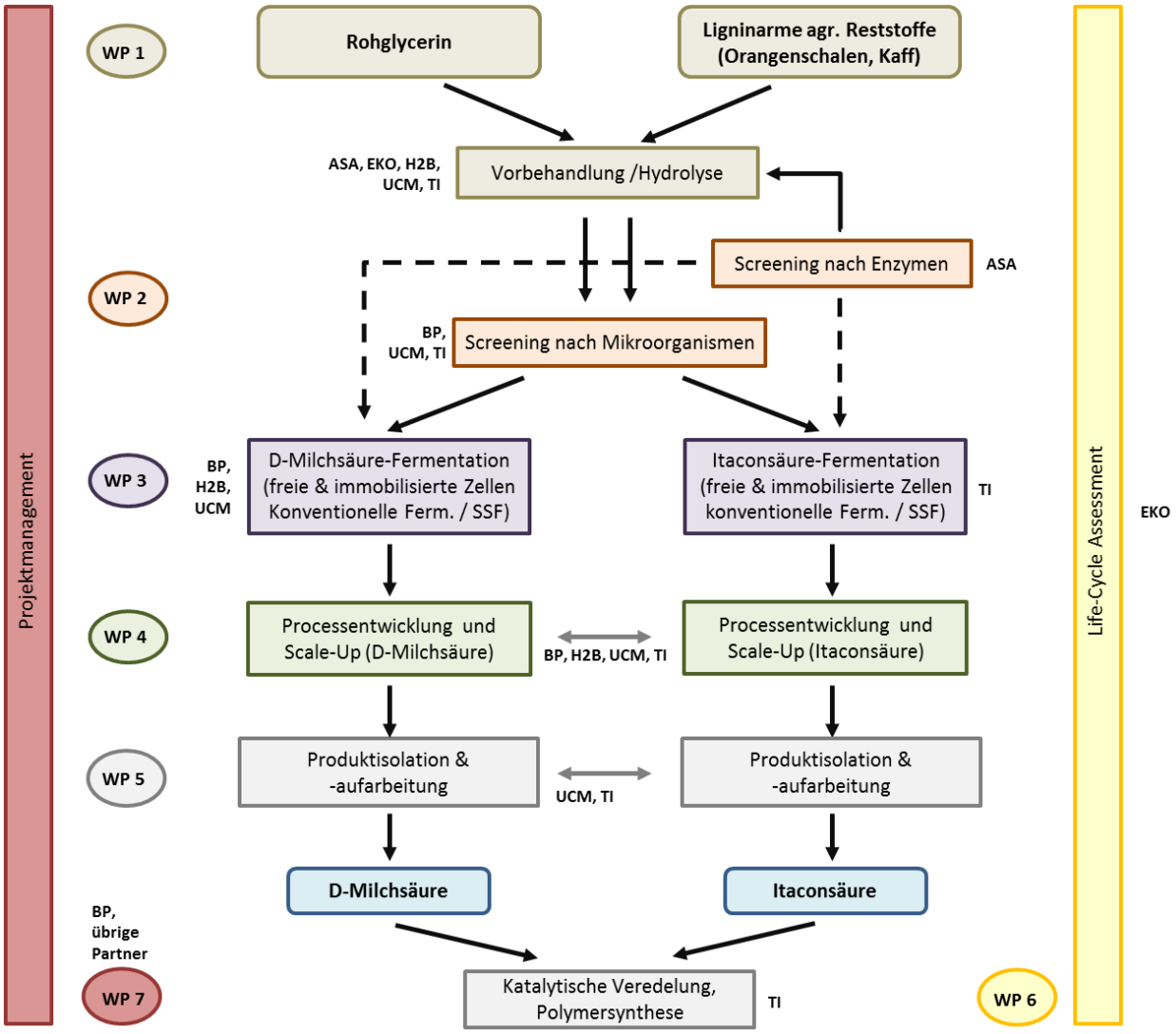


Abbildung 1: Projektschema

Das gesamte Projektkonsortium bestand aus folgenden 6 Projektpartnern:

Tabelle 1: Beteiligte Projektpartner am POAP-Projekt

#	Partner	Akronym
1	BIOPOLIS, S.L. Paterna, Spanien	BP
2	Johann Heinrich von Thünen-Institut (TI) Institut für Agrartechnologie Braunschweig, Deutschland	TI
3	Complutense University Faculty Chemical Science – Department of Chemical Engineering Madrid, Spanien	UCM
4	ASA Spezialenzyme GmbH Wolfenbüttel, Deutschland	ASA
5	H2Biyotek Ltd Sti Ankara, Türkei	H2B
6	Ekodenge Ankara, Türkei	EKO

Damit bestand das Konsortium aus zwei akademischen und vier Industriepartnern aus Deutschland, Spanien und der Türkei. Die umfangreiche Beteiligung von Industriepartnern stellt nicht nur eine anwendungsorientierte Forschung sicher, sondern erlaubt zudem eine schnelle und direkte Verwertung aussichtsreicher Projektergebnisse.

Planung und Ablauf des Vorhabens

Der Zeitplan der durchgeführten Arbeiten ist in Tabelle 2 dargestellt. Die Arbeitspakete wurden entsprechend Tabelle 2 bearbeitet. Besondere Schwerpunkte während der Laufzeit dieses Vorhabens wurden auf die Untersuchung der Vorbehandlungsmethoden der Rohstoffe und auf die Prozessoptimierung gelegt.

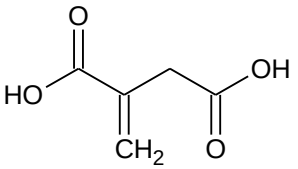
Tabelle 2: Zeitlicher Ablauf und bearbeitete Arbeitspakete des Projekts

Arbeitspaketbeschreibung		Jahr 1				Jahr 2				Jahr 3			
		3	6	9	12	3	6	9	12	3	6	9	12
WP 1	Rohstoffe												
Task 1.1	Charakterisierung der Rohstoffe												
Task 1.2	Optimierung der Rohglycerinvobehandlung												
Task 1.3	Optimierung der Vorbehandlung ligninarmer agrarischer Reststoffe												
Task 1.4	Vergleich der chemischen und enzymatischen Hydloyse ligninarmer agrar. Reststoffe												
Task 1.5	Optimierung der Hydrolyse ligninarmer agrarischer Reststoffe												
WP 2	Screening für Enzyme und Mikroorganismen												
Task 2.1	Entwicklung neuer Enzyme für die Hydrolyse von ligninarmen Reststoffen												
Task 2.2	Screening nach neuen Hydrolasen für d. Freisetzung von Monosacch und Zuckersäuren												
Task 2.3	Verbesserung ausgewählter Enzyme durch Mutagenese												
Task 2.4	Entwicklung spezieller Enzyme durch Gen-Knockout												
Task 2.5	Charakterisierung neuer Cellulasen und Hemicellulasen												
Task 2.6	MO Screening für die D-MS Produktion mit Glycerin als Substrat												
Task 2.7	MO Screening für die D-MS Prod. mit Hydrolysaten ligninarmer Reststoffe als Substrat												
Task 2.8	MO Screening für die IS-Produktion mit Glycerin als Substrat												
Task 2.9	MO Screening für die IS-Produktion mit Hydrolysaten ligninarmer Reststoffe als Substrat												
WP 3	Fermentation für D-MS- und IS-Produktion												
Task 3.1	Auswahl und Verbesserung von Biokatalysatoren für die D-MS- und IS-Produktion												
Task 3.2	Produktion von D-MS mit freien und immobilisierten Zellen												
Task 3.3	Produktion von IS mit freien und immobilisierten Zellen												
Task 3.4	Simultaneous Saccharification and Fermentation für die D-MS-Produktion												
Task 3.5	Simultaneous Saccharification and Fermentation für die IS-Produktion												
WP 4	Prozessentwicklung und Scale-up												
Task 4.1	Auswahl der am besten geeig. Rohstoff/Stamm/Fermentation Kombination (D-MS, IS)												
Task 4.2	Kinetische Analyse und Prozessmodellierung (D-MS, IS)												
Task 4.3	Optimierung der Fermentationsprozesse (D-MS, IS)												
Task 4.4	Scale up der Fermentationen unter optimierten Bedingungen												
WP 5	Produkt-Isolierung, Reinigung und Veredelung												
Task 5.1	Entwicklung von Produktisolations- und Reinigungstechniken (D-MS, IS)												
Task 5.2	Kat. Veredelung der Monomere durch Derivatisierung und Herstellung von Polymeren												
WP 6	Wirtschaftlichkeit des Verfahrens und Nachhaltigkeit												
Task 6.1	Goal und Scope Definition												
Task 6.2	Datensammlung und Bestandsanalyse												
Task 6.3	Folgenabschätzung												
WP 7	Projektmanagement												

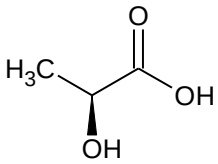
2. Stand der Technik

Itaconsäure (IA) und Michsäure (MS) sind wichtige chemische Grundchemikalien deren Gewinnung biotechnologisch aus nachwachsenden Rohstoffen durchgeführt werden kann. Die Strukturformeln und die Eigenschaften der Säuren sind in Tabelle 3 dargestellt.

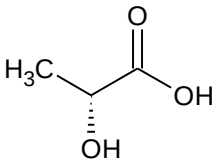
Tabelle 3: Eigenschaften von Itaconsäure und Milchsäure



Itaconsäure



L-Milchsäure



D-Milchsäure

Molekulargewicht:	130,10 g/mol	90,08 g/mol
Schmelzpunkt:	162-167 °C	17 °C (Racemat) 54 °C (Enantiomere)
Siedepunkt:	Zersetzung ab 268 °C	122 °C (20 hPa) (Racemat)
Dichte:	1,63 g/cm^3	1,21 g/cm^3
Wasserlöslichkeit:	83 g/L (20 °C)	Vollständig mischbar mit Wasser Löslich in Ethanol

IA ist eine C5-Dicarbonsäure und wird fermentativ mit Pilzen wie z.B. *Aspergillus terreus* oder *Aspergillus niger* aus Zuckern oder Melassen hergestellt. Dabei können bereits Produktkonzentrationen von 90-100 g/L Itaconsäure aus reiner Glucose hergestellt werden (Kuenz et al. 2012). Hauptanwendungen umfassen die Verwendung als Copolymer mit Acrylsäure und in Styrol-Butadien-Systemen. Die wichtigsten technischen Hürden für die Entwicklung der IS als Baustein für Rohstoffchemikalien sind die Entwicklung von kostengünstigen Fermentationsrouten. Hierbei werden Zitrusfruchschalen, ligninarme agrarische Reststoffe, und Rohglycerin als alternative Rohstoffe betrachtet.

Zitrusfrüchte sind die bedeutendste Fruchtpflanze der Welt mit einer Gesamtmenge von > 88 Mio. t / Jahr (2006). Zitrusschalenreste (ZSR) die 40% des anfänglichen Fruchtgewichts ausmachen, können nur teilweise in der Viehfütterung verwendet werden. Signifikante Mengen werden entsorgt, wodurch ernsthafte Umweltbelange entstehen. Hinzu kommen Kosten aus Handling und Transport. Allerdings sind ZSR ein interessanter Rohstoff für Bioraffinerieprozesse aufgrund ihres geringen Lignin- und Aschegehaltes (Lohrasbi et al. 2010). Wegen seiner intensiven antimikrobiellen Wirkung muss Limonen zur weiteren Verarbeitung in einer Vorbehandlung entfernt werden.

Der Ernterückstand Weizenkaff ist ein reichlich vorhandener agrarischer Reststoff. In 2009 betrug die Weltproduktion von Weizen $682 \cdot 10^6$ t, wobei $150 \cdot 10^6$ t in der europäischen Union produziert wurden. Weizen besteht zu 15-20 % aus Weizenkaff, einem Reststoff mit geringem Ligningehalt (Bledzki et al. 2010). Trotz dieser großen vorhandenen Menge ist Weizenkaff bislang eine sehr wenig genutzte Ressource und bislang kaum hinsichtlich der Eignung als Fermentationseinsatzmaterial untersucht worden. Um Lignocellulosen wie Weizenkaff als Zuckerquelle für Fermentationen nutzen zu können werden diese zunächst vorbehandelt und anschließend Hydrolysiert. Diese Schritte stellen sehr kostenintensive Prozesse dar, weshalb häufig einfach zu hydrolysierende Substrate wie z.B. Stärke aus Mais eingesetzt werden.

Vorbehandlungen für Lignocellulosen umfassen mechanische und thermochemische Verfahren, bei denen Säuren, Basen oder Lösungsmittel eingesetzt werden. Je nach Verfahren entstehen bei der Vorbehandlung Zuckerdegradationsprodukte die durch kostenintensive Downstreamprozesse wieder entfernt werden müssen, um die Folgeprozesse (z.B. Fermentation) nicht zu beeinträchtigen (Wymann 2013, Palmqvist 2000). Die vorbehandelte Biomasse kann anschließend sowohl säurekatalytisch als auch mit Hilfe von Enzymen hydrolysiert werden. Da säurekatalysierte Verfahren erneut Inhibitoren generieren, werden zunehmend schonende, enzymatische Verfahren entwickelt (Nevel 1976, Medie 2012, Barcelos 2015).

Rohglycerin ist ein Nebenprodukt aus der Biodieselproduktion und fällt am Ende des Transesterifizierungsprozesses mit einem Anteil von 10 % des ursprünglich eingesetzten Fettsäuremethylesters oder –ethylesters an. Die Biodieselproduktion betrug im Jahr 2011 $9 \cdot 10^6$ t . Rohglycerin steht somit in großen Mengen zur Verfügung. Eine große Anzahl an biotechnologischen Anwendungen des Rohglycerins wurde in den letzten zehn Jahren entwickelt, um eine kostspielige Aufreinigung des Rohglycerins zu verhindern.

Milchsäure kann sowohl biotechnologisch über eine Fermentation von Kohlenhydraten (Zucker, Stärke) wie auch synthetisch auf der Basis petrochemischer Rohstoffe (Acetaldehyd) hergestellt werden. Verwendung findet die Milchsäure und ihre Derivate in der Lebensmittel-, Kosmetik,- Pharma- sowie Lederindustrie (Wang et al. 2011). Polymerisation von Lactiden resultiert in Polylactiden, wobei Lactide aus L-Milchsäure, D-Milchsäure und Gemische dieser verwendet werden und zu den jeweiligen Polymeren Poly-L-Milchsäure (PLLA) und Poly-D-Milchsäure (PDLA) und Polymilchsäure (PLA) führen. Der Schmelzpunkt für die reinen Polymilchsäuren ist mit 175 °C zu gering für viele Anwendungen. Eine Kombination der PLLA und PDLA liefert einen teilkristallinen isotaktischen Stereokomplex der mit einer Schmelztemperatur von 220-230 °C eine um 50 °C erhöhte Schmelztemperatur aufweist (Ikada et al. 1987). Die hochselektive und zugleich kostengünstige Produktion von D-Milchsäure ist somit von großer Relevanz für eine effektive Herstellung von PDLA.

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Zusammenarbeit erfolgte mit den Projektpartnern TI, ASA, UCM, EKODENGE und BIOPOLIS. ASA lieferte mehrere kommerziell erhältliche und auch einige maßgeschneiderte Enzymmischungen. Um vergleichbare Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse zu erhalten, wurden Verfahren zur Charakterisierung der Enzyme von ASA, UCM und TI etabliert. OPW wurden von BIOPOLIS und Weizenkaff von TI den Projektpartnern zur Verfügung gestellt. UCM führte steam-explosionExperimente mit Weizenkaff (bereitgestellt von TI) und Orangenschalen (bereitgestellt von BIOPOLIS) durch. Die vorbehandelten Biomassen wurden sowohl von UCM als auch von TI zur gemeinsamen Optimierung der Vorbehandlung und Hydrolyse eingesetzt. OPW-Hydrolysat eines optimierten Verfahrens durch UCM wurde auf Itaconsäure-Produktion (TI) getestet. Daten und Literatur für die LCA wurden von allen Partnern gesammelt und EKODENGE zur Verfügung gestellt.

II. Ergebnisse

Das ERA-IB POAP Gesamtprojekt ist in 7 Arbeitspakete (Work Package = WP) unterteilt, in denen unterschiedliche Aufgaben bearbeitet wurden. Die bearbeiteten Arbeitspakete sind in Abbildung 1 und Tabelle 2 beschrieben. Dabei ist durch das jeweilige Akronym angegeben, welche Partner an welchen Arbeitspaketen beteiligt sind. Die deutschen Projektpartner haben in den nachfolgend aufgelisteten Arbeitspaketen (WP)gearbeitet. Die Ergebnisse der Arbeitspakete sind nachfolgend erläutert.

WP 1. Rohstoffe (TI, ASA)

Charakterisierung der Rohstoffe (TI)

Ziel der Rohstoffcharakterisierung ist es, das Weizenkaff hinsichtlich der fermentierbaren Zucker sowie anderer Komponenten zu charakterisieren. Die Charakterisierung der Orangenschalen übernehmen die spanischen Projektpartner, da jeder Partner die bei ihm lokal zur Verfügung stehenden Ressourcen charakterisiert. Die Bestimmung mittels zweistufiger, analytischer Säurehydrolyse erfolgte nach Sluiter et al. 2006 (Sluiter et al. 2006). Des Weiteren wurde ebenfalls nach Sluiter [2006, 2008] der Lignin-, Asche- und Wasseranteil bestimmt (Sluiter et al. 2008, Sluiter et al. 2008). Der Stickstoffanteil wurde als Kjeldahl-Stickstoff bestimmt (Hames et al. 2008). In Tabelle 4 ist die Zusammensetzung von Weizenkaff der Jahre 2012 – 2015 aufgezeigt. Zu erkennen ist, dass die Zusammensetzung trotz verschiedener Sorten, Erntejahre und Orte nicht signifikant variiert. Somit haben die Weizensorte und die Standortunterschiede keine großen Einflüsse auf die untersuchten Anteile. Der zu verzuckernde Anteil von Weizenkaff liegt bei ~ 0,6 g/g Biomasse, der Ligninanteil variiert zwischen 0,19 – 0,22 g/g Biomasse und der Ascheanteil liegt zwischen 0,08 – 0,1 g/g Biomasse.

Weizenkaff stellt eine in großen Mengen verfügbare Ressource dar, die mit 60 % einen hohen verwertbaren Zuckeranteil aufweist.

Tabelle 4 Weizenkaff-Charakterisierung [g/g Biomasse]

Erntejahr	Herkunft/ Sorte	Zuckermonomere				Lignin	Stickstoff	Asche	Wasser
		Arabinose	Galactose	Glucose	Xylose				
2012	Sickte Elixer	0,1	0,02	0,22	0,23	0,21	0,01	0,08	0,12
2013	Bernburg Cubus	0,04	0,08	0,28	0,16	0,21	0,01	0,1	0,11
2014	Adenstedt Elixer	0,04	0,02	0,28	0,26	0,22	0,01	0,09	0,08
2015	Adenstedt Elixer	0,05	0,01	0,31	0,25	0,19	0,01	0,08	0,09

Optimierung der Vorbehandlung ligninarmer, agrarischer Reststoffe (TI)

Um die Zucker aus dem Kaff möglichst vollständig für Fermentationen bereitstellen zu können, müssen die Rohstoffe vorbehandelt werden. Die Vorbehandlung umfasst mechanische und thermochemische Verfahren. Bei der zunächst durchgeführten mechanischen Vorbehandlung wird das Probenmaterial zerkleinert. Hierdurch wird die Oberfläche erhöht und die Zugänglichkeit für die folgende thermochemische Vorbehandlung verbessert. Für die mechanische Vorbehandlung von Weizenkaff wurde der Einfluss verschiedener Mühlentypen und Siebgrößen auf die resultierende Partikelgröße untersucht. Die verwendeten Mühlen unterscheiden sich in ihrer Zerkleinerungsart (Schneiden, Druck, Reibung, Prall- und Scherkraft). Dazu wurde das Kaff mit unterschiedlichen Mühlentypen auf Partikelgrößen von ~ 1 mm (Maschenweite) und anschließend mit dem von ASA Spezialenzymen zur Verfügung gestellten Enzym (Biogazyme 2x) enzymatische hydrolysiert. Um einen möglichen Einfluss der verschieden Mühlntypen zu ekennen und Einflüsse des Enzymes auf die Biomasse auszublenden, wurden zunächst 100 FPU Enzym pro g Biomasse eingesetzt. Diese vergleichsweise hohe Enzymmenge wurde abschließend optimiert (siehe S.15) In Abbildung 2 sind die erhaltenen Zuckerkonzentrationen in Abhängigkeit vom Mühlentyp dargestellt.

Zu erkennen ist, dass alle Hydrolysen knapp 0,2 g Zucker/g Biomasse generieren. Ein signifikanter Unterschied ist nicht zu erkennen. Die Hammermühle generiert jedoch mit minimalen Unterschieden die höchsten Zuckerkonzentrationen. Da Hammermühlen industriell weit verbreitet sind und vergleichsweise kostengünstig zu betreiben sind, können die bestehen Mühlen genutzt werden. Sie erzeugen die besten Ergebnisse bei der Hydrolyse. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Vermahlung als einzige Vorbehandlung nicht ausreicht, da nur 33,3 % des der in der Biomasse enthaltenen monomeren Zucker (siehe Task 1.1) freigesetzt werden können.

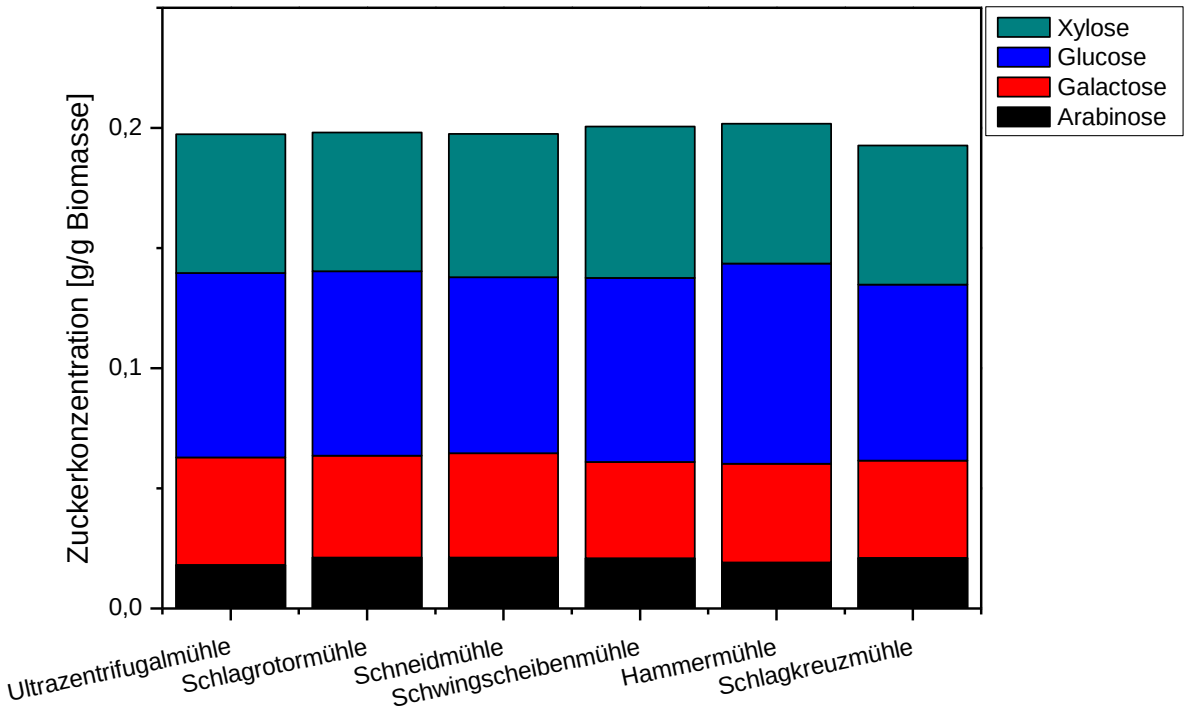


Abbildung 2 Zuckerkonzentration von Weizenkaff nach enzymatischer Hydrolyse und mechanischer Vorbehandlung mittels verschiedener Mühlentypen (Hydrolysebedingungen: 100 FPU/g Kaff, 5 % Feststoffgehalt, 0,05 M Natriumacetatpuffer, pH 4,5, 50 °C, 5 Tage, 600 rpm im Thermoschüttler (Auslenkung 1,3 mm))

Als weitere Variable der mechanischen Vorbehandlung wurde die Partikelgröße untersucht. Dazu wurde der analytische Säureaufschlüss nach Sluiter mit Partikelgrößen zwischen > 2 mm und < 0,25 mm durchgeführt. Für diese Untersuchung wurde das Kaff mit einer Messermühle vorzerkleinert und anschließend mittels 2 mm Sieb gesiebt und anschließend in der Ultrazentrifugalmühle mit Sieben der Größen 2, 1, 0,75 sowie 0,25 mm zerkleinert. Die so erhaltenen Fraktionen wurden anschließend mittels zweistufigem analytischen Säureaufschluss charakterisiert. In

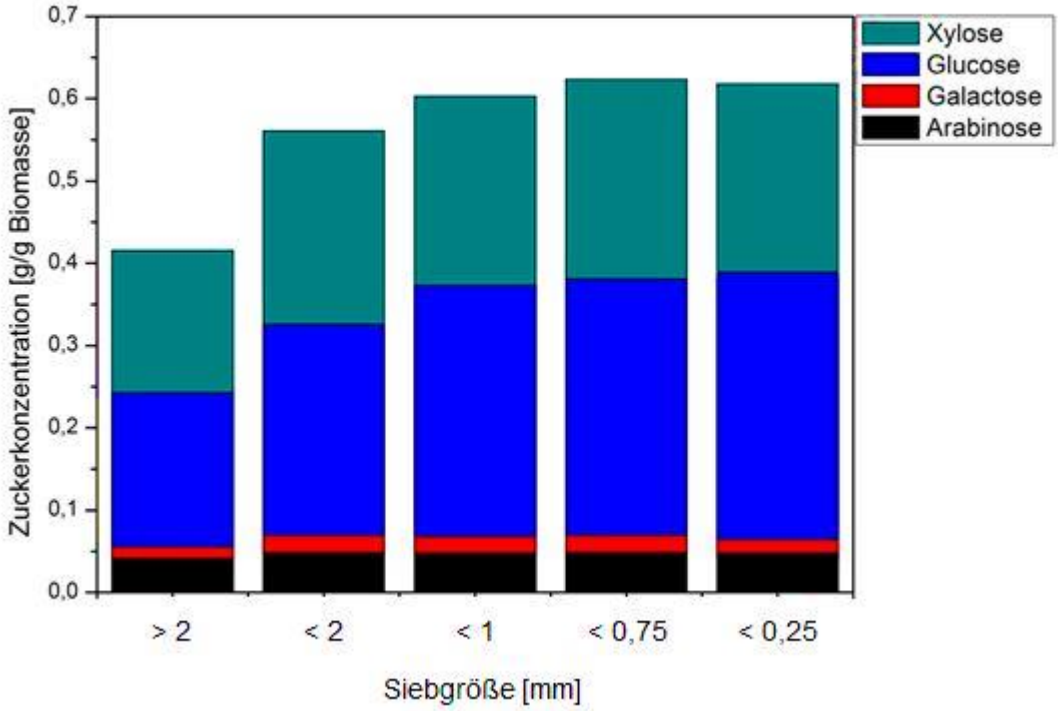


Abbildung 3 ist die gebildete Zuckerkonzentration in Abhängigkeit der Siebgröße und der damit resultierenden Partikelgröße aufgezeigt. Durch diese Untersuchung kann eine maximal erreichbare Zuckerkonzentration von 0,6 g/g Biomasse ab einer Siebgröße von < 0,75 mm festgestellt werden. Feinere Vermahlungen erzielen keine höheren Zuckerkonzentrationen. Durch die steigenden Energiekosten bei Erhöhung des Mahlgrades, wird das Kaff bei allen weiteren Optimierungen mittels Ultrazentrifugalmühle mit einer Siebgröße von 0,75 mm vermahlen.

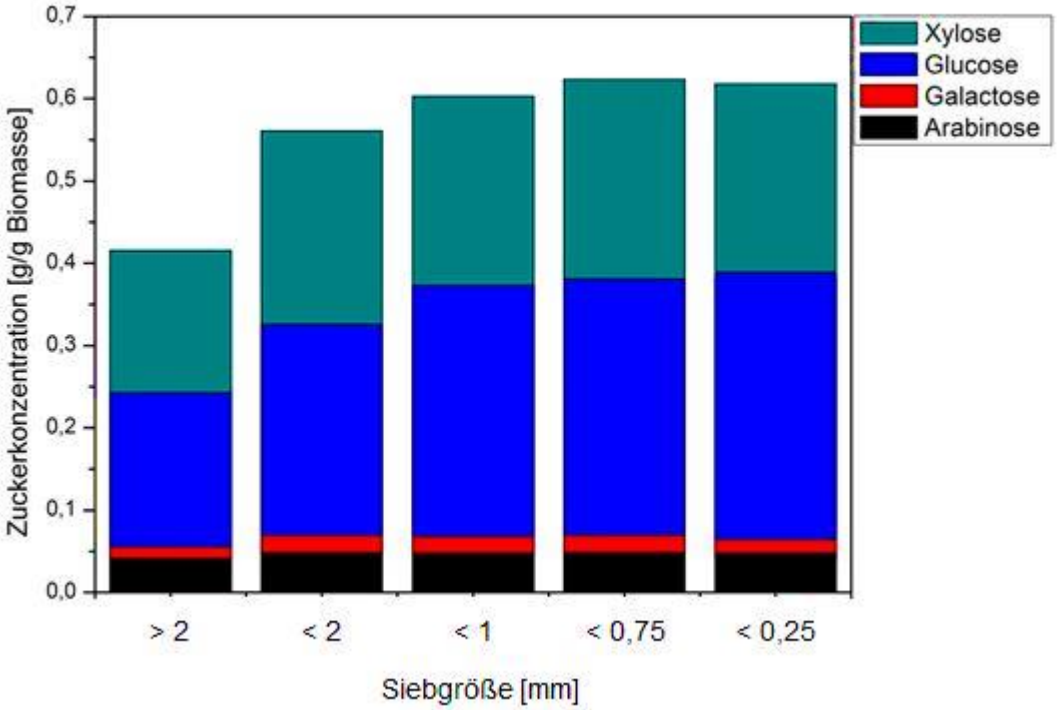


Abbildung 3 Einfluss des Mahlgrades auf die Zuckerkonzentration nach zweistufigem, analytischem Säureaufschluss (nach Sluiter (Sluiter, Hames et al. 2006)).

Die thermochemische Vorbehandlung kann in drei Kategorien eingeteilt werden. In saure, pH-neutrale und basische Vorbehandlungen. Aus jedem Bereich wurden für agrarische Reststoffe lt. Literatur (Wyman 1994, Wyman 1996, Lloyd and Wyman 2005, Mosier et al. 2005, Wyman et al. 2005, Wyman 2007, Yang and Wyman 2008, Kumar et al. 2009, Kumar and Wyman 2009, Ramirez et al. 2013, Sannigrahi and Ragauskas 2013, Trajano and Wyman 2013) für Lignocelulose gängige Vorbehandlungsmethoden identifiziert und für speziell für Kaff optimiert. Dieser Schritt ist erforderlich, da durch die Heterogenität jeder Probenmatrix jede Vorbehandlung unterschiedlich effizient auf die Rohstoffe wirken. Daher müssen die Vorbehandlungen auf jede Biomasse neu angepasst bzw. optimiert werden. Bei diesen Optimierungen muss besonders darauf geachtet werden, dass die Degradationsprodukte wie Aldehyde und organische Säuren, die durch den Abbau von Hemicellulose und Cellulose entstehen, vermieden werden. Als für die thermochemische Vorbehandlung von Weizenkaff geeignete Verfahren mit verdünnter Schwefelsäure im Konzentrationsbereich 0,01 M bis 0,1 M, Liquid Hot Water (LHW), Ammoniak (NH_3) (0,7 M) und Natriumhydroxid (NaOH) im Konzentrationsbereich 0,01 M bis 1,25 M identifiziert und optimiert. Der getestete Temperaturbereich lag zwischen 21 und 200 °C, die untersuchten Reaktionszeiten lagen zwischen 5 min und 24 h (bei 21 °C) und 5 bis 60 min im Temperaturberiech von 125 bis 150 °C sowie 5 – 30 min im Temperaturbereich von 175 bis 200 °C. Die jeweilige optimierte Vorbehandlung der unterschiedlichen Methoden mit anschließender enzymatischer Hydrolyse ist in Tabelle 5 aufgezeigt.

Tabelle 5 Optimierte Kaff-Vorbehandlungen mit anschließender enzymatischen Hydrolyse (100 FPU Biogazyme 2x/g Biomasse, mit 5 % Feststoffgehalt, bei 50°C, pH 4.8, 600 rpm)

Methode	Konzentration [mol/L]	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Verzuckerungs-grad [%]	Gebildete Degradations- Produkte [g/L]
verdünnte H_2SO_4	0,1	125	30	93,6	HMF 0,8 Furfural 0,2 Formiat 0,2 Acetat 3,8
LHW	55,4	200	10	93,9	Furfural 0,05 Lävulinsäure 0,2 Formiat 0,3 Acetat 3,6
NH_3	0,7	125	30	92,7	Dihydroxyacetone 0,7 Acetat 3,7
NaOH	1,25	21	600	99,1	Acetat 4,0

Unter den definierten Zielen (maximaler Verzuckerungsgrad bei minimalen Degradationsprodukten) ist die Vorbehandlung mit 1,25 M Natronlauge (entspricht 2 wt.%) für 600 min (10 h) bei Raumtemperatur die Beste. Alle weiterführenden Experimente wurden daher mit Natronlauge vorbehandeltem Kaff durchgeführt.

Vergleich der chemischen und enzymatischen Hydrolyse ligninarmer Reststoffe (TI, ASA)

Die chemische Hydrolyse ist in der Literatur seit langem bekannt. (McCarthy and Islam 2000) Der Vorteil der säurekatalysierten Hydrolyse liegt in der hohen Zuckerendkonzentration der erhaltenen Hydrolysate und in den im Vergleich zur enzymatischen Hydrolyse schnelleren Reaktionszeit (Stunden statt Tagen). Ein wichtiger Nachteil der säurekatalysierten Hydrolyse ist jedoch die Bildung von Degradationsprodukten (Aldehyde, org. Säuren). Fan (1987) sowie Anders (2014) zeigen, dass die Nebenproduktkonzentration stark ansteigt, wenn die Hydrolyse mit Säure durchgeführt wird. Eigene Untersuchungen mit Schwefelsäure weisen ebenfalls die Bildung von Degradationsprodukten auf. Diese Abbauprodukte müssen vermieden werden, da sie aus dem Hydrolysat entfernt werden müssen um Folgeprozesse wie Fermentationen nicht zu beeinträchtigen (Task 2.9). Um diese Abbauprodukte grundsätzlich zu vermeiden wurden die Hydrolysen enzymatisch durchgeführt. Dazu wurde das von ASA Spezialenzyme bereitgestellte Enzym Biogazyme 2x verwendet. Ein Vergleich dieses Enzyms mit anderen, verbreitet eingesetzten kommerziellen Enzymmischungen (Cellic C'Tec 2 (Novozymes) und Celluclast/Novo188 (Novozymes) zeigt, dass bei gleichem Verhältnis (FPU/g Biomasse) es keine Unterschiede hinsichtlich der Zuckerendkonzentration zu erkennen sind. Alle erzielen unter denselben Reaktionsbedingungen einen Verzuckerungsgrad von 99 % (5 % Feststoffgehalt, 100 FPU/g Biomasse). Im Rahmen des Projektes wurden von ASA Spezialenzyme speziell für Weizenkaff entwickelte Enzymmischungen ebenfalls eingesetzt, erzielten im Vergleich zum bereits verwendeten Biogazyme 2x (ASA) ähnliche bzw. geringere Verzuckerungsgrade, weshalb die im Rahmen der Optimierungen durchgeführten Experimente ausschließlich mit Biogazyme 2x durchgeführt wurden.

Die Aufgabe von ASA beinhaltete die Produktion und Bereitstellung bereits vorhandener und neu entwickelter Enzympräparate für alle Projektpartner.

Folgende Enzyme wurden für die Partner TI, BP, H2B und UCM hergestellt:

- Cellulasen
- Xylanase
- Pektinase
- ß-Galaktosidase
- ß-Glucosidase
- ß-Glucanase
- Verschiedene Enzymmischungen produziert auf Orangenschalen
- Verschiedene Enzymmischungen produziert auf Kaff

Optimierung der Hydrolyse ligninarmer Reststoffe (TI)

Die Optimierung der enzymatischen Hydrolyse wurde mit Biogazyme 2x (ASA) durchgeführt. Dabei wurden zunächst die optimalen Hydrolysebedingungen (pH-Wert: 4,5/ Temperatur: 50 °C) des Enzyms bestimmt. Danach wurde der Hydrolyseverlauf von NaOH-vorbehandeltem Kaff und die damit verbundene Hydrolysezeit bestimmt (siehe Abbildung 4). Wie zu erkennen ist, erreicht die enzymatische Hydrolyse nach 4 Tagen den maximalen Verzuckerungsgrad und verbleibt nach dieser Zeit auf diesem Plateau. Das bedeutet, dass die Hydrolyse bei 100 FPU/g Biomasse und einem Feststoffanteil von 5 % nach 4 Tagen

abgeschlossen ist. Im Vergleich dazu benötigen Enzymmischen wie Celluclast und Novo 188 mit NaOH-vorbehandeltem Kaff dieselbe Zeit, um vergleichbare Verzuckerungsgrade zu generieren. Für andere Kombinationen aus Enzymmenge und Festoffgehalt, müssen die jeweiligen Hydrolysezeiten im Einzelnen überprüft werden.

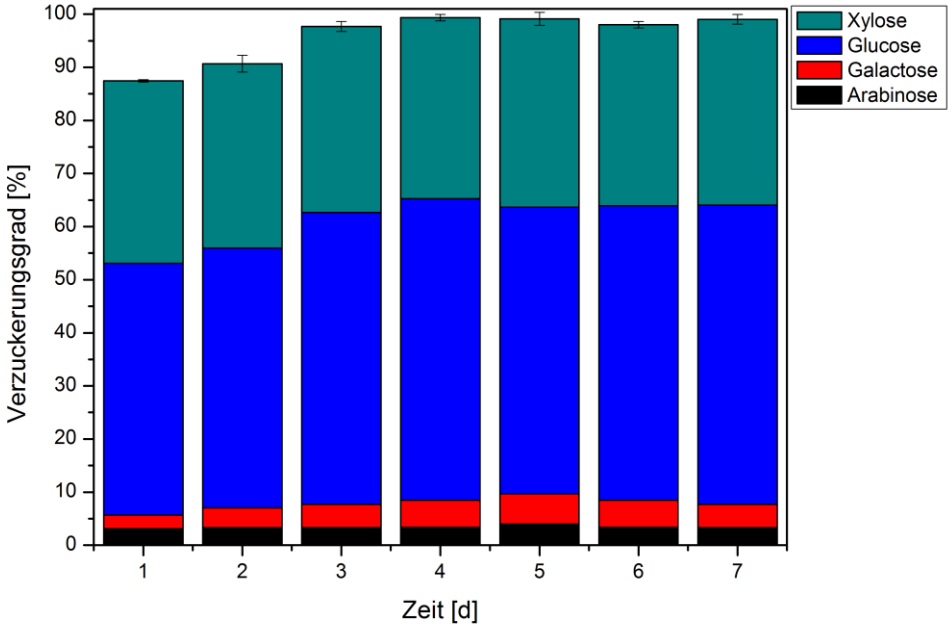


Abbildung 4 Zeitverlauf der enzymatischen Hydrolyse von NaOH vorbehandeltem Kaff (Hydrolysebedingungen: 100 FPU Biogazyme 2x/g Kaff, 5 % Feststoffgehalt, pH 4,5, 50 °C, 5 Tage, 600 rpm im Thermoschüttler (Auslenkung 1,3 mm))

Im Anschluss wurden Versuche mit 5 – 30 % Feststoffgehalt durchgeführt. In Abbildung 5 ist der Verzuckerungsgrad in Abhängigkeit der Feststoffkonzentration abgebildet. Die Hydrolyse fand dabei in einem geschüttelten Reaktorsystem statt. Je größer der Feststoffgehalt wird, desto geringer wird der Verzuckerungsgrad. Dies kann durch eine schlechte Vermischung während der Hydrolyse hervorgerufen werden, da das trockene Kaff während der Zugabe der Reaktionslösung für die Hydrolyse Wasser aufnimmt und aufquillt. Das im Kaff gebundene Wasser steht der Reaktion nicht mehr zur Verfügung, wodurch sich die Viskosität des Systems erhöht und damit die Beweglichkeit der Enzyme reduziert. Um dies zu überprüfen, wurden Hydrolysen mit ansteigenden Feststoffgehalten unter ansonsten identischen Bedingungen in einem gerührten System mit Wendelrührer durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigen, dass bei geringen und mittleren Feststoffkonzentrationen (5-10 %) keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Systemen zu erkennen sind. Bei höheren Festoffanteilen (15-20 %) erzielt die gerührte Hydrolyse bei 20 % Feststoffanteil bereits einen um 15 % höheren Verzuckerungsgrad. Somit ist es bei höheren Feststoffkonzentrationen zwingend erforderlich ein gerührtes System zu nutzen, um eine ausreichende Durchmischung zu gewährleisten.

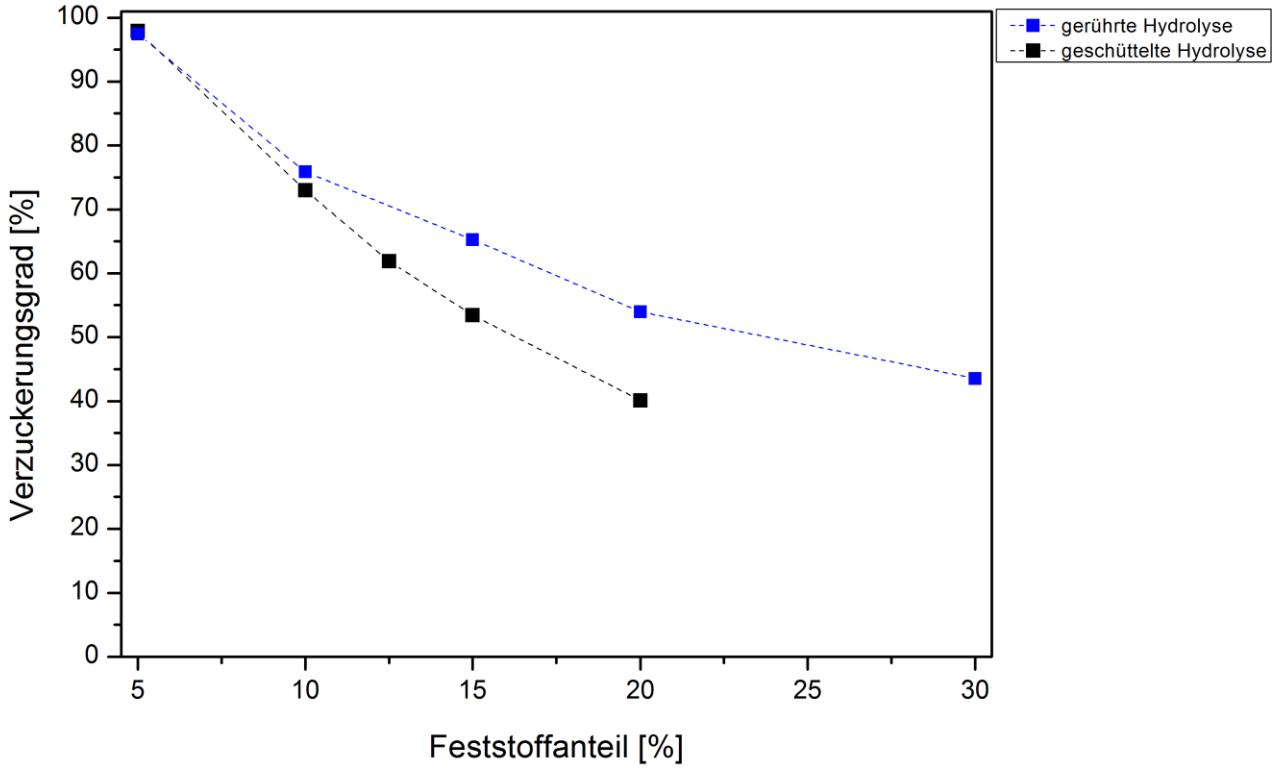


Abbildung 5 Enzymatische Hydrolyse von Kaff mit Feststoffkonzentration zwischen 5 - 30 % in einem geschüttelten System (Hydrolysebedingungen: 100 FPU Biogazyme 2x/g Kaff, pH 4,5, 50 °C, 5 Tage, 600 rpm im Thermoschüttler (Auslenkung 1,3 mm) und 15 rpm im gerührten System)

Um den Enzymbedarf und damit die Gesamtkosten für Vorbehandlung und Hydrolyse möglichst gering zu halten, ist die eingesetzte Enzymmenge zu optimieren. Die eingesetzte Enzymmenge hat jedoch auch einen großen Einfluss auf den Verzuckerungsgrad und die erhaltenen Zuckerendkonzentrationen. Daher wurden Enzymmengen zwischen 5 und 100 FPU/g Biomasse variiert (siehe Abbildung 6). Nach diesen Ergebnissen wird deutlich, dass ein großer Enzymsatz eine höhere Verzuckerung generiert.

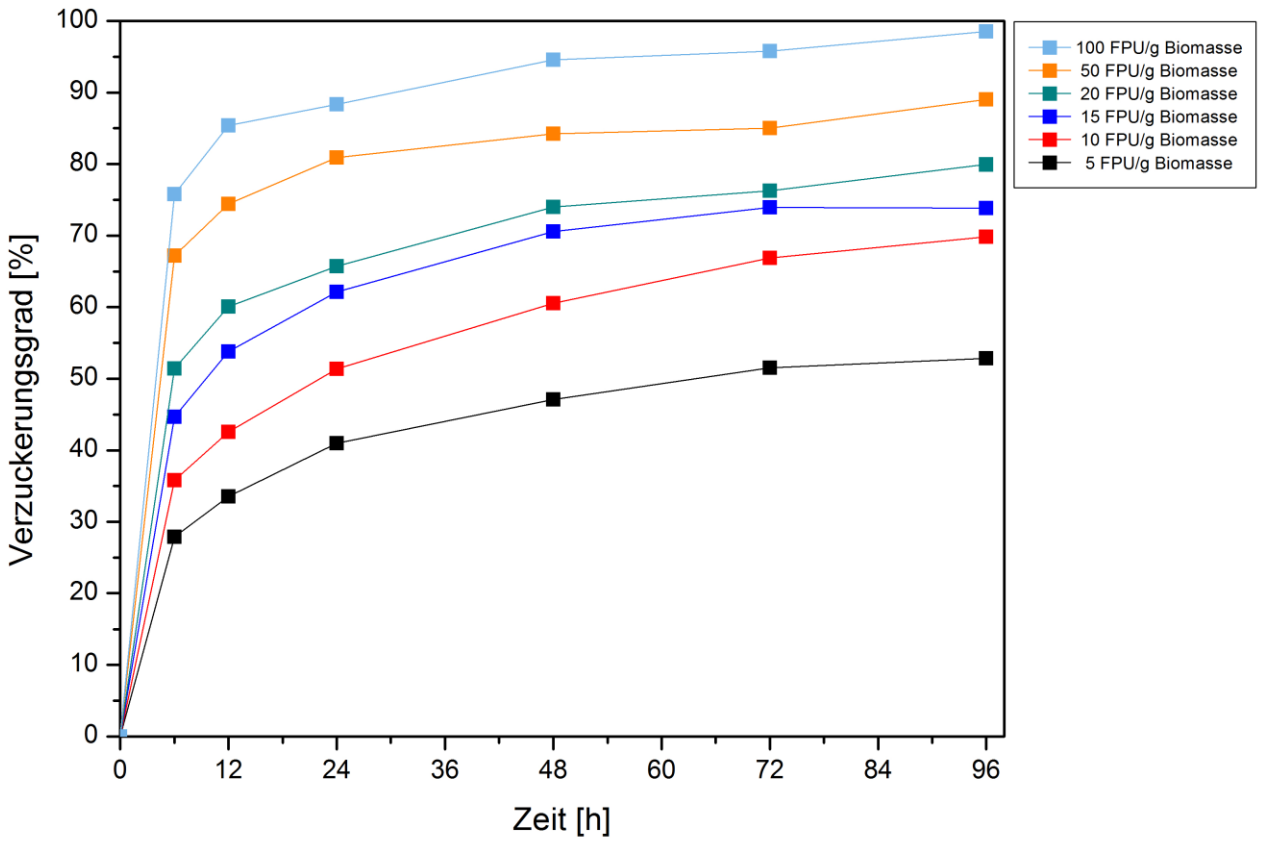


Abbildung 6 Verzuckerungsgrad nach enzymatischer Hydrolyse mit variierendem Enzymeinsatz (Biogazyme 2x) zwischen 5 und 100 FPU/g Biomasse und einer Feststoffkonzentration von 5 % (weitere Hydrolysebedingungen: pH 4,5, 50 °C, 5 Tage, 600 rpm im Thermoschüttler (Auslenkung 1,3 mm))

In allen Hydrolyseverläufen ist zu erkennen, dass die Verzuckerung schnell ansteigt und die Steigung der Kurve nach 24 h stark abnimmt. Einige Arbeitsgruppen haben die Gründe für diese häufig beobachteten Abnahmen untersucht. Es kommen Enzym-Substrat- oder Enzym-Produkt Wechselwirkungen in Betracht. Nach (Pan 2008) können Enzyme an der heterogen Matrix des Lignins fest adsorbieren, und somit nicht mehr für die weitere Hydrolyse zur Verfügung stehen. Andere Arbeitsgruppen sehen die Gründe vor allem in der Produktinhibierung bei höheren Zuckerendkonzentrationen (Kristensen et al. 2009). Beide Effekte spielen im Bereich der innerhalb des Projektes untersuchten Enzymkonzentrationen eine eher untergeordnete Rolle, da in den ersten 12 Stunden ein steiler Anstieg des Verzuckerungsgrades beobachtet wird, der in den folgenden Tagen nur noch langsam steigt.

Die ausgeprägte Abnahme der Geschwindigkeit des Umsatzes lässt sich durch die Abnahme der Aktivität des eingesetzten Enzyms durch Alterung erklären. Um die Stabilität der Enzymaktivität zu überprüfen, wurde das Enzym in einer Pufferlösung bei Hydrolysebedingungen ohne Substrat über eine Zeitspanne von 11 Tagen untersucht. Als Untersuchungsmethode dient dabei die Enzymcharakterisierung nach Ghose(Ghose 1987). Bei dieser Untersuchung zeigte sich, dass die Enzymaktivität bereits nach 24 h um knapp 20 % fällt und dass das Enzym bereits nach 48 h nur noch 60 % der initialen Cellulaseaktivität aufweist. Mit diesen Erkenntnissen wurde eine Hydrolyse mit initialen 10 FPU Biogazyme 2x/g Biomasse durchgeführt, bei der nach 24 und 48 h je 5 FPU Biogazmye 2x nachdosiert wurden. Zum Vergleich ist eine Hydrolyse mit initialen 20 FPU Biogazyme 2x/g Biomasse ohne Nachdosierung durgeführt worden. Den Hydrolyseverlauf zeigt Abbildung 7.

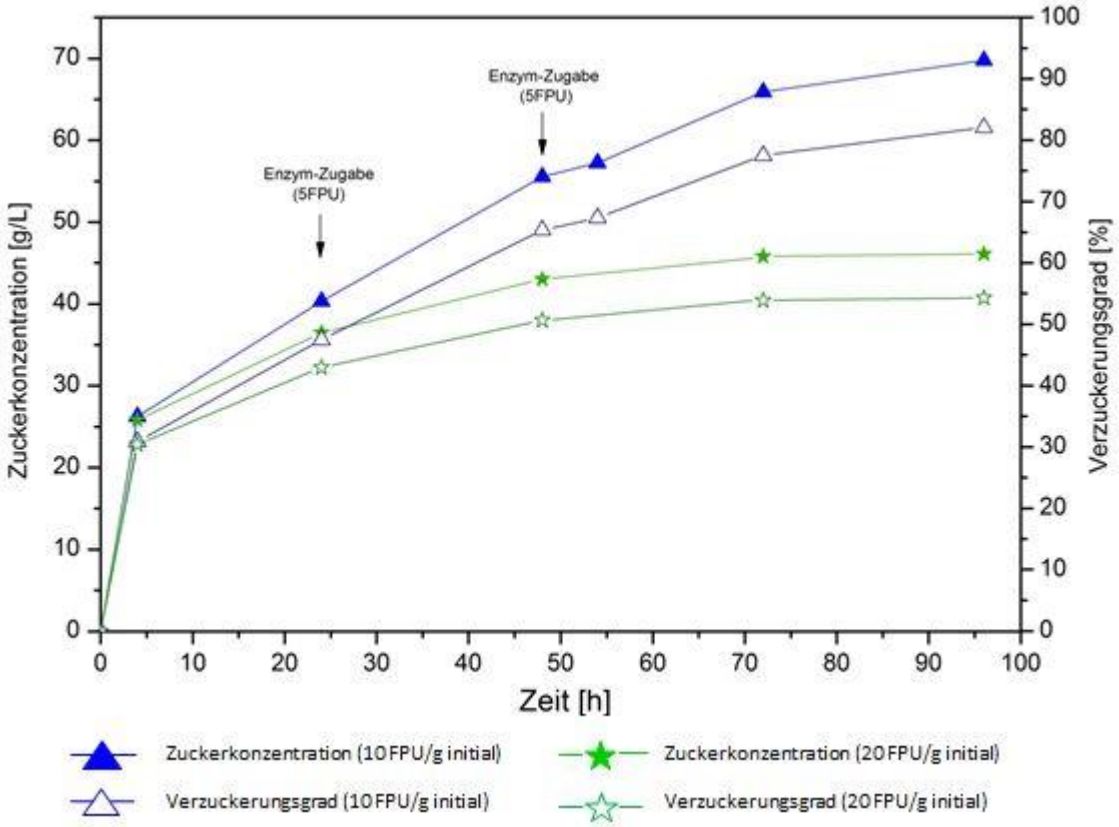


Abbildung 7 Vergleich der Enzymatischen Hydrolyse von NaOH-vorbehandeltem Kaff im gerührten System mit 15 % Feststoffgehalt mit und ohne Enzym-Feed (weitere Hydrolysebedingungen: pH 4,5, 50 °C, 4 Tage, final je 20 FPU Biogazyme 2x/g Kaff)

Eine Enzymzugabe nach 24 sowie 48 h erhöht signifikant die Zuckerkonzentrationen von 45 auf 69 g/L und erhöht ebenfalls signifikant den Verzuckerungsgrad von 55 auf 82 %. Durch diese Ergebnisse wird die Aktivitätsabnahme des Enzymes bestätigt und für eine effektive Hydrolyse muss die Enzymzugabe in Schritten erfolgen.

WP 2. Screening für Enzyme und Mikroorganismen (TI, ASA)

Entwicklung neuer Enzyme für die Hydrolyse von ligninarmen Reststoffen (ASA)

Ziel war hier die Entwicklung neuer Enzyme für die Hydrolyse von ligninarmen Reststoffen (LAR), um die Freisetzung von Saccharide aus OSR und Kaff zu maximieren.

Dabei sollten verschiedene Hydrolasen auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, Cellulose, Hemicellulosen und Pektin abzubauen, um die Freisetzung von C-5 und C-6 Zuckern bzw. Zuckersäuren zu verbessern. Im Rahmen des POAP Projektes übernimmt ASA die Versorgung alle Projektpartner mit den benötigten Enzymen.

Screening nach neuen Hydrolasen für die Freisetzung von Monosacchariden und Zuckersäuren (ASA)

Für Fermentationen ist es vorteilhaft möglichst einheitliche Zuckerfraktionen, die ausschließlich entweder Hexosen, Pentosen oder Zuckersäuren enthalten, einzusetzen. ASA entwickelt daher Hydrolasen, die nur Cellulase- oder Xylanase- / Arabinase- oder Pektinaseaktivität aufweisen.

Ziel der Arbeiten war es, neue Enzyme für die Hydrolyse von LAR zu entwickeln, die die Freisetzung von Saccharide aus Schalen von Zitrusfrüchten und Kaff zu maximieren. Darüber hinaus sollen verschiedene Hydrolasen auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, Cellulose, Hemicellulosen und Pektin abzubauen, um die Freisetzung von C-5 und C-6 Zuckern bzw. Zuckersäuren zu verbessern.

Der Projektverlauf sowie die Daten der Projektpartner zeigten, dass die Enzyme, die die Hydrolyse der LAR verbesserten auch zur höchsten Freisetzung von Zuckern und Zuckersäuren führten. Daher werden die Vorgehensweise sowie Ergebnisse für diese beiden Teilarbeitspakete gemeinsam dargestellt.

Die neuen identifizierte Cellulasen und Hemicellulasen wurden charakterisiert und mit den anderen im Projekt entwickelten Enzymen sowie mit kommerziell erhältlichen Enzymen verglichen.

Zunächst wurde die Enzymbildung der ASA-eigenen Produktionsstämme *Penicillium funiculosum* und *Aurantiporus fissitis* auf Kaff und Zitronenschalen (citrus peel waste, CPW) getestet. Basierend auf den ersten Ergebnissen wurde dann die Enzymbildung von *Penicillium funiculosum*, *Aurantiporus fissitis* und *Aspergillus aculeatus* auf Kaff und CPW optimiert.

Untersuchung der Enzymbildung ausgewählter Hochleistungsstämme auf Kaff und CPW

Durchführung

Medien:
Hauptkulturmedium:

Kaff	=	10,0 g/L	(Weizenkaff, TI, Sickte, 2013, gemahlen)
oder			
Zitronenschalen	=	30,0 g/L	(CPW, Rojas, BIOPOLIS, 14.04.14, gefroren)
Maisquellwasser	=	40,0 g/l	
$CaCl_2$ x 2 H_2O	=	1,0 g/l	
$(NH_4)_2SO_4$	=	1,0 g/l	
Antischaum	=	0,1 g/l	
(Agar	=	20 g/L) nur für Agarplatten	

Bedingungen:

Temperatur	=	30°C
pH	=	5,0 (*P. funiculosum, A. aculeatus)*
		6,0 (*A. fissites)*

Feed:

Kaff	=	70,0 g/L (falls Konzentration nicht zu hoch)
oder		
CPW	=	200 g/L
$NaNO_3$	=	12 g/L

Kultivierung und Enzymbildung

Mit Hauptkulturmedium angesetzte Agarplatten wurden mit beiden Pilzen beimpft und 7 Tage bei 30°C inkubiert. Aus den mit Pilzmyzel überwachsenen Agarplatten wurden mit einem Korkbohrer jeweils Teile (d> 0,5 cm) des Myzels herausgeschnitten und damit 500 ml-Schüttelkolben angeimpft, die mit 100 ml Hauptkulturmedium befüllt waren. Nach 3, 6 und 9 Tagen wurde jeweils 20 ml Feed pro Schüttelkolben hinzugegeben. Der pH-Wert wurde bei pH 5,0 bzw. 6,0 gehalten. Dann wurde im Brutschrank max. 14 Tage bei 30°C, 120 rpm inkubiert und im Kulturüberstand die Enzymaktivitäten gemäß Tabelle 6 und Tabelle 7 gemessen. Nach Versuchsende wurden die Überstände lyophilisiert.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der ersten 6 Wachstumstage zeigten bei beiden Stämmen eine deutlich erhöhte Enzymbildung mit CPW als Substrat im Vergleich zu Kaff, wobei die exo- und endo-Cellulase-Bildung überraschenderweise besonders bei *A. fissites* deutlich erhöht ist.

Tabelle 6: Bildung von Hydrolasen auf Kaff

	Enzymaktivität [U/ml] nach Tagen			
	0	**2**	**3**	**6**
exo-Cellulase				
P. funiculosum	0	0,076	0,05	0,24
A. fissitis	0	0	0,12	0,10
endo-Cellulase				
P. funiculosum	0	0	4,2	19,4
A. fissitis	0	0	3,4	3,7
Xylanase				
P. funiculosum	0,09	0,23	0,5	5,78
A. fissitis	0,02	0,04	0,39	4,13
ß-Glucosidase				
P. funiculosum	0	0	0,06	0,02
A. fissitis	0	0	0	0,01

Tabelle 7: Bildung von Hydrolasen auf CPW

	Enzymaktivität [U/ml] nach Tagen			
	0	**2**	**3**	**6**
exo-Cellulase				
P. funiculosum	0	0,052	0	1,05
A. fissitis	0	0,032	0,035	1,30
Endo-Cellulase				
P. funiculosum	0	0	0	56,1
A. fissitis	0	0	0	129,4
Xylanase				
P. funiculosum	0,09	0,18	0,21	24,0
A. fissitis	0,02	0,04	0,10	30,3
ß-Glucosidase				
P. funiculosum	0	0	0,04	0,05
A. fissitis	0,005	0	0,03	0,04

Optimierung der Enzymbildung

Basierend auf den diesen Ergebnissen wurde dann die Enzymbildung von *Penicillium funiculosum*, *Aurantiporus fissitis* und *Aspergillus aculeatus* auf Kaff und CPW optimiert. Hierzu wurde zunächst eine Medienoptimierung durchgeführt. Danach erfolgte die Variation der physikalisch-technischen Parameter wie Sauerstoffbedarf, Rührerdrehzahl etc.

Die Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt. Die höchsten Werte für die exo-Cellulase wurden mit P. funiculosum und A. fissiles auf dem Substrat CPW erreicht. Die maximale Enzymsekretion erfolgte nach ca. 4 Tagen Inkubationszeit (Abbildung 8). Die höchsten Werte für die endo-Cellulase wurden ebenfalls mit *P. funiculosum* und *A. fissiles* auf dem Substrat CPW erzielt. Die maximale Enzymsekretion erfolgte nach ca. 5 Tagen Inkubationszeit. Die endo-Cellulase-Bildzung auf Kaff war etwas geringer und erfolgte erst nach 10 – 12 Tagen (Abbildung 9).

Die Xylanase-Bildung lag für *P. funiculosum* und *A. fissiles* für beide Substrate auf einem ähnlichen Niveau. Wieder erfolgte die maximale Enzymsekretion auf CPW nach ca. 5 Tagen, auf Kaff nach 10 – 12 Tagen Inkubationszeit. (Abbildung 10).

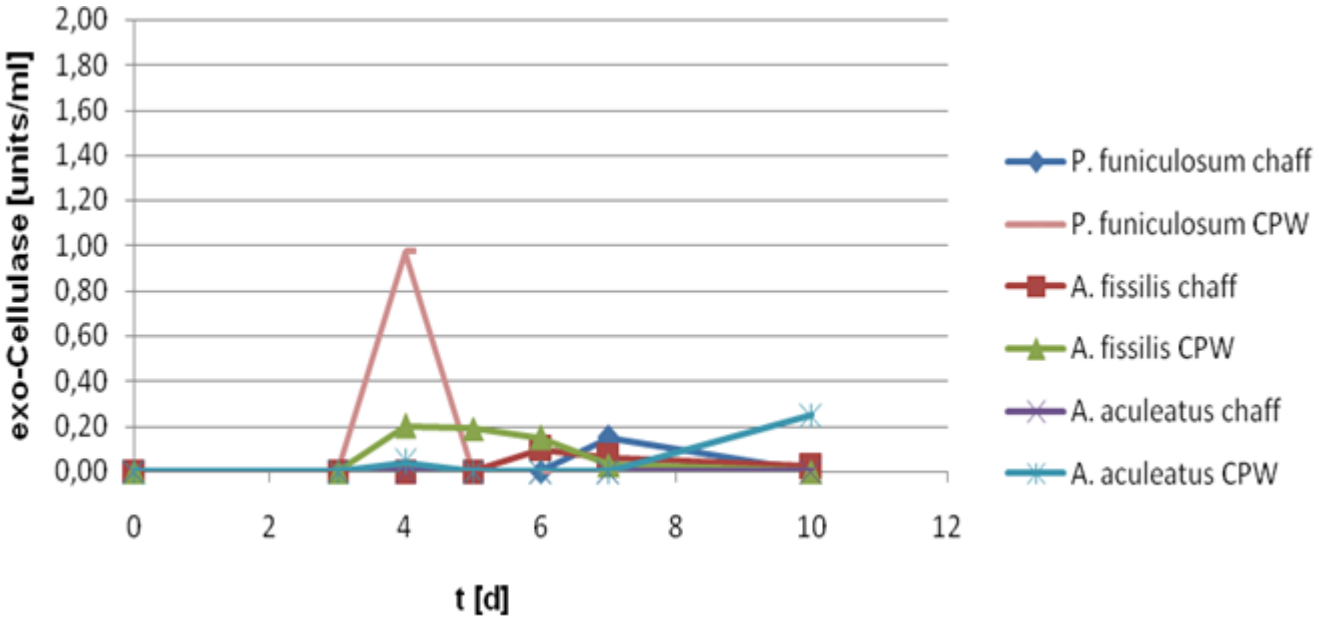


Abbildung 8: Bildung von exo-Cellulase in Abhängigkeut von der Wachstumszeit

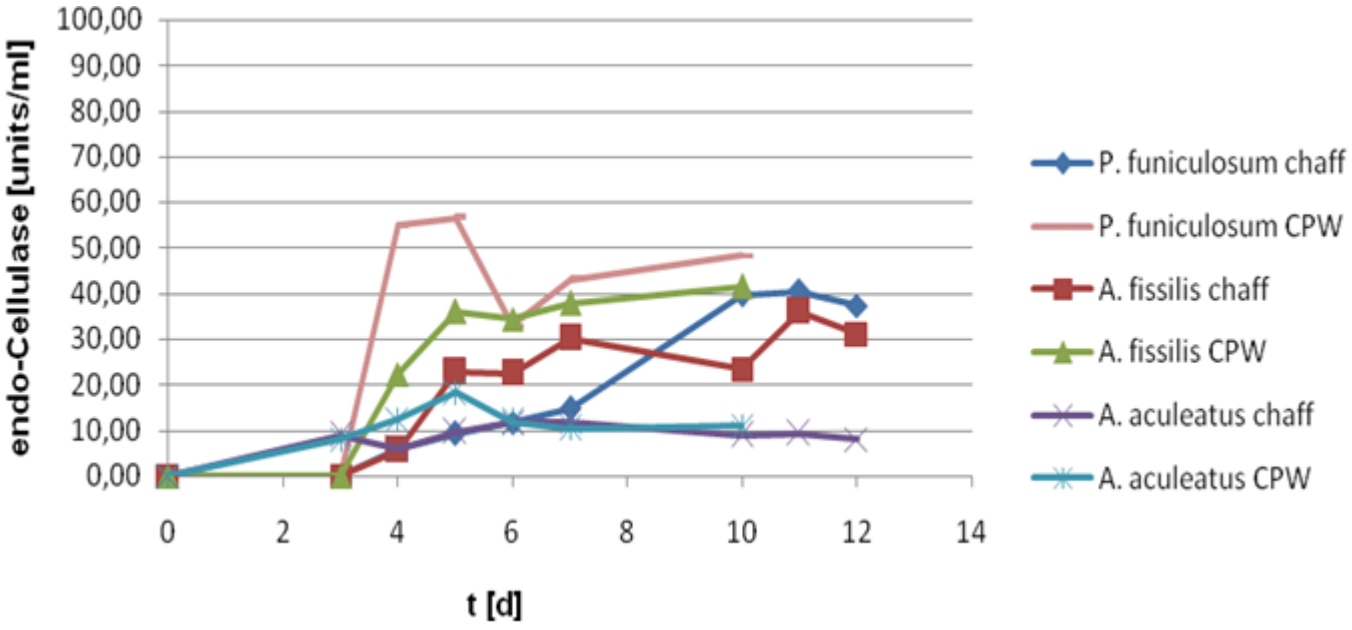


Abbildung 9: Bildung von endo-Cellulase in Abhängigkeut von der Wachstumszeit

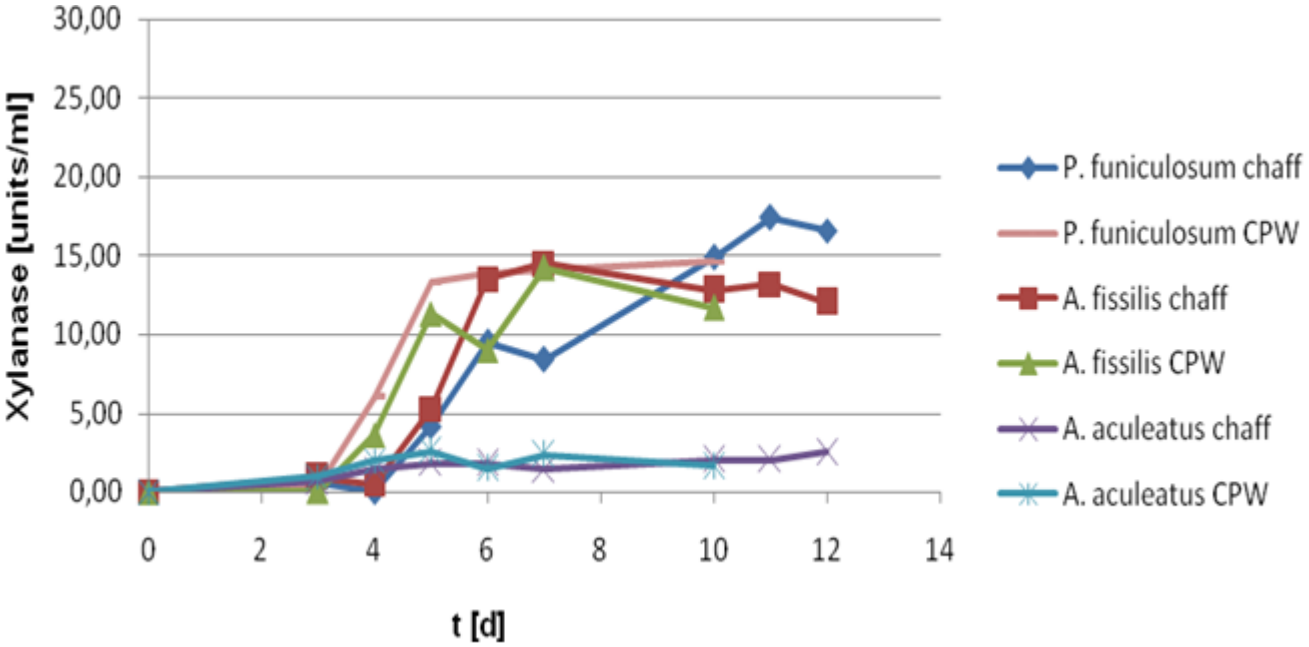


Abbildung 10: Bildung von Xylanase in Abhängigkeut von der Wachstumszeit

Die enzymhaltigen Kulturüberstände mit den höchsten Enzymaktivitäten wurden aufgearbeitet und gefriergetrocknet.

In den resultierenden Lyophilisaten wurden dann die für den Cellulose-, Hemicellulose- und Pektinabbau relevanten Enzymaktivitäten gemessen und mit den Daten der kommerziellen Präparate

- Celluclast 1,5 L (Cellulase, Fa. Novozymes)
- Biogazyme 2x (Cellulase+Hemicellulase, ASA)
- Novozym 188 (Hemicellulase, Fa. Novozymes)

verglichen (Tabelle 8).

Man sieht, dass die auf CPW erzielten Aktivitäten für endo-Cellulase und Xylanase zwar noch geringer im Vergleich zu Celluclast 1,5 L und Biogazyme 2x sind, aber bereits höher als die von Novozym 188 liegen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Enzymbildung auf dem Substrat CPW deutlich schneller als auf Kaff erfolgt. Die gemessenen Cellulase-Werte sind auf CPW etwas höher.

Die isolierten Enzympräparate wurden den Projektpartnern zur Verfügung gestellt.

Tabelle 8: Vergleich der Enzymspektren der neu entwickelten Enzympräparate mit denen von kommerziellen Enzymprodukten

Lyophilisat / Produkt	Enzymaktivität [U/g bzw. ml]				
	exo-Cellulase	endo-Cellulase	ß-Glucosidase	Xylanase	endo-Pektinase
P. funiculosum Kaff	5,73	1.125	4,7	718	28,1
*A. fissilis K*aff	3,13	1.200	9,6	275	9,7
*A. aculeatus K*aff	1,23	275	6,0	51	21,3
P. funiculosum CPW	8,16	1.880	8,3	560	437
A. fissilis CPW	5,39	1.730	1,1	583	0
A. aculeatus CPW	0,51	680	18,1	115	14,4
Cellulclast 1,5 L	310	40.300	75	6.900	0
Biogazyme 2x	1.050	117.000	290	150.000	0
Novozym 188	12	202	189	527	0

Entwicklung und Scale-up des Produktionsverfahrens für die besten Enzympräparate

Basierend auf den bisherigen Daten sowie den Ergebnissen der Charakterisierung (AP 2.5 Charakterisierung neuer Cellulasen und Hemicellulasen) sowie nach Vorliegen der Ergebnisse der Projektpartner wurde entschieden, für die Enzympräparate von *P. funiculosum* mit Kaff und CPW als Substrate ein Fermentations- und Aufarbeitungsverfahren zu entwickeln. Die Ergebnisse der Fermentationsverfahren sind in Abbildung 11und Abbildung 12 dargestellt.

Bei der Entwicklung des Aufreinigungsverfahrens wurde folgende Prozessschritte entwickelt und optimiert:

- Abtrennung des Biomasse
- Zentrifugation des Kulturüberstandes
- Ammoniumsulfatfällung
- Resuspension des Präzipitats
- Stabilisierung des Enzympräparates.

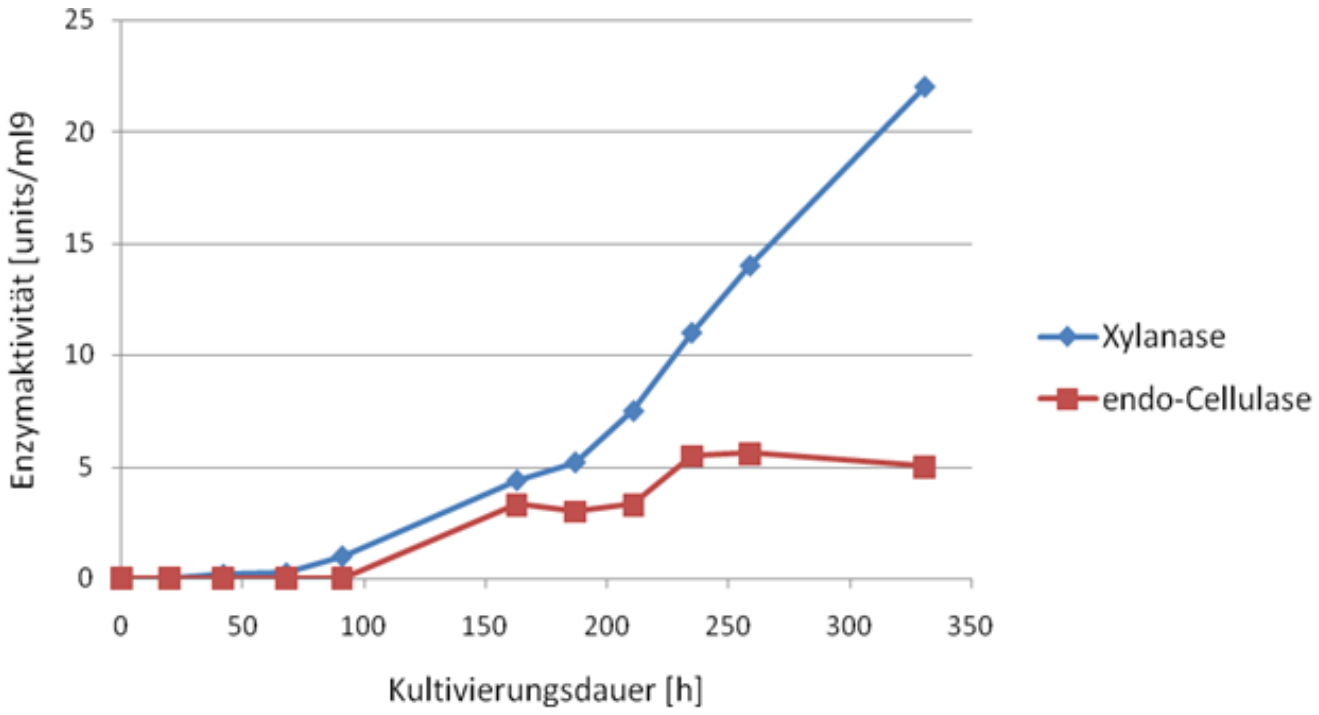


Abbildung 11: Enzymbildung von *P. funiculosum* im Fermenter mit Kaff als Substrat

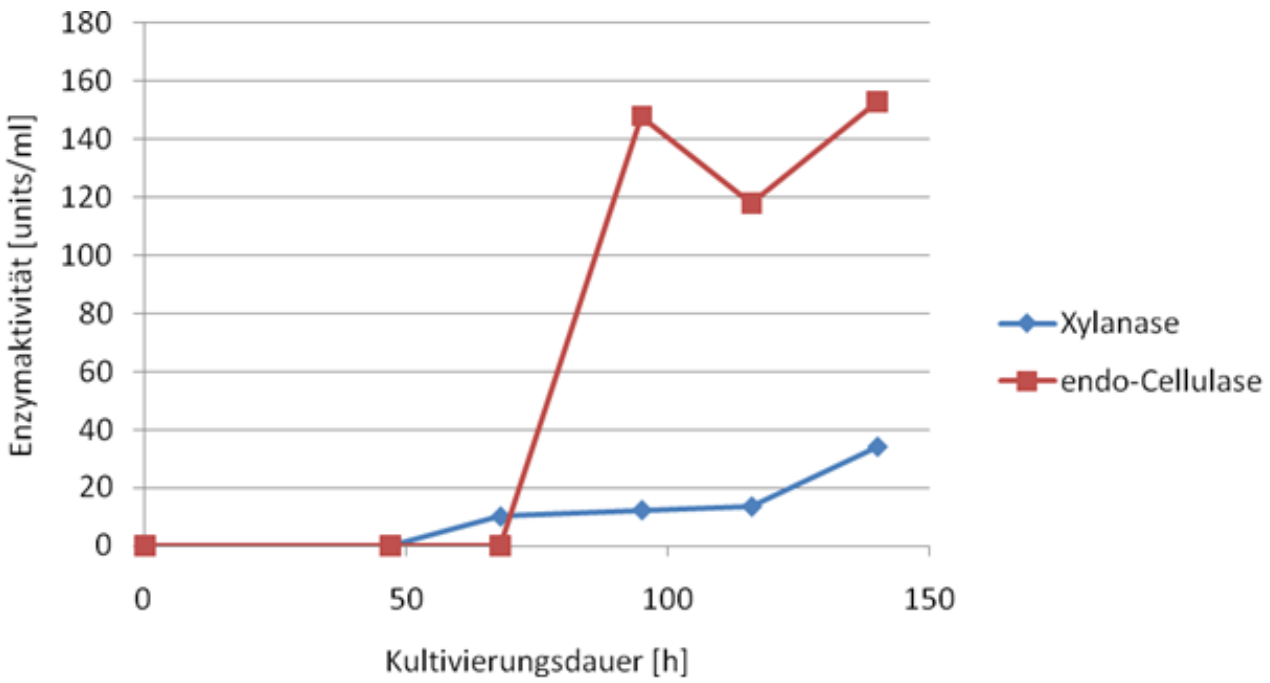


Abbildung 12: Enzymbildung von *P. funiculosum* im Fermenter mit CPW als Substrat

Die Ergebnisse der Aufreinigungsarbeiten sind in den Tabelle 9 und Tabelle 10 dargestellt. Sie zeigen, dass die Ausbeuten mit ca. 80 % befriedigend sind und dass die Höhe der Enzymaktivitäten der Endprodukte nun durchaus im Bereich von kommerziellen Präparaten liegen.

Tabelle 9: Downstream Processing der Enzymmischung von *P. funiculosum* mit Kaff als Substrat

Prozessschritt	Vol. [ml]	Xylanase [U/ml]	$E_{a,total}$ [kU]	$c_{Protein}$ [mg/ml]	$E_{a,spez.}$ [U/mg]	Ausbeute [%]
Fermentationsüberstand	4.500	22,0	99,0	0,297	74	100
2. Separation	4.000	22,0	88,0	0,297	74	88
$(NH_4)_2SO_4$ -Fällung	6,9 % , Pellet-Resuspension in 50 % Glycerin					
Pelletsuspension	55	1.410	77,6	10,40	136	78

Tabelle 10: Downstream Processing der Enzymmischung von *P. funiculosum* mit CPW als Substrat

Processschritt	Vol. [ml]	endo-Cellulase [U/ml]	$E_{a,total}$ [kU]	$c_{Protein}$ [mg/ml]	$E_{a,spez.}$ [U/mg]	Yield [%]
Fermentationsüberstand	6.400	152	931	0,24	633	100
2. Separation	6.100	152	927	0,24	633	95
$(NH_4)_2SO_4$ -Fällung	17 % , Pellet-Resuspension in 50 % Glycerin					
Pelletsuspension	55	12.290	676	8,5	1.450	73

Abschließend wurde das zu analysierende Enzymspektrum erweitert und ein Vergleich zwischen den Ergebnissen aus den Fermentationen und den Schüttelkolbenversuchen angestellt. Tab. 6 zeigt, dass durch die Fermentation auf CPW deutlich höhere Aktivitäten für die Enzyme endo-Cellulase, Xylanase sowie ß-Glucanase im Vergleich zum Schüttelkolben erreicht werden konnten.

Eine detaillierte Charakterisierung der neuen Enzympräparate wurde unter AP 2.5 vorgenommen.

Tabelle 11: Enzymspektren verschiedener Enzympräparationen von *P. funiculosum*

Enzymaktivität	Chaff		CPW	
	Fermentation	Schüttelkolben	Fermentation	Schüttelkolben
exo-Cellulase	8,3	18,7	42,3	36,3
endo-Cellulase	553	799	12.290	3.820
ß-Glucosidase	8,2	9,1	32,8	8,8
Xylanase	1.410	1.950	2.710	1.310
endo-Pektinase	14,5	34	123	466
ß-1,3(4)-Glucanase	215	497	2.940	950
ß-1,3-Glucanase	802	153	1.850	61,6

Verbesserung ausgewählter Enzyme durch Mutagenese (ASA)

Kommerzielle Enzymprodukte zur Hydrolyse von Lignocellulose haben zurzeit folgende Nachteile:

(i) starke Hemmung der Hydrolyse durch Endprodukte, wie Mono-und Disaccharide,
(ii) keine ausreichende Prozessstabilität,
(iii) ungünstige pH-Optima.

Aufgabe dieses Arbeitspaketes war daher, neue Enzyme mit verbesserten Eigenschaften zu isolieren, zu entwickeln oder entsprechende Enzymen durch Mutagenese zu verbessern.

Hierzu wurden bekannte Gensequenzen von celluloseabbauenden Bakterien im Vergleich zu Pilzen analysiert. Basierend darauf wurden die Gene für drei endo-Cellulasen aus drei Bakterienarten ausgewählt und die notwendigen Primer konstruiert.

Die weitere Vorgehensweise war wie folgt:

- Isolierung der RNA für die Enzyme

  Transkription der isolierten RNA in cDNA mit Reverser Transcriptase

- Expression der Cellulase in *Pichia pastoris*
- Charakterisierung der neuen Cellulase
- Entwicklung eines Fermentations- und Aufreinigungsverfahrens

Die besten Ergebnisse und interessantesten Eigenschaften wurden für die Cellulase aus dem Bakterienstamm *MO B3* erzielt. Daher ist die nachfolgende Darstellung der Ergebnisse auf dieses Enzym fokussiert. Da die Arbeiten zur Entwicklung einer Knockout-Mutante von *P. funiculosum*, die keine exo-Cellulase mehr – also nur eine endo-Cellulase - enthalten sollte, keine positiven Ergebnisse erbrachten, hatte dieser Weg für die Erreichung der Projektziele eine deutlich erhöhte Bedeutung.

Isolierung der RNA aus *MO B3*

Kultivierung auf verschiedenen Substraten

Um die Produktion der Cellulase-RNA zu erhöhen, wurde der Bakterienstamm zunächst auf verschiedenen Cellulose-haltigen Substraten kultiviert und die Aktivität der endo-Cellulase bestimmt (Tabelle 12).

Bei den Ansätzen mit der höchsten Enzymaktivität wurde versucht, die RNA aus der Bakterienfeuchtmasse zu isolieren. Die gelb markierten Felder zeigen die Proben mit den höchsten RNA-Ausbeuten.

Tabelle 12: Sekretion von endo-Cellulase Gen3 auf verschiedenen Substraten

Substrate	endo-Cellulase [U/ml] nach Tagen				
	3	4	5	6	7
Carboxymethylcellulose	5,1	5,8	6,0	5,9	6,9
Carboxymethylcellulose	4,7	5,4	6,7	6,6	7,5
Cellulosepulver	3,5	32,2	71,9	77,0	170
Cellulosepulver	4,2	78,6	98,6	101	234
Kaff	6,4	8,1	7,5	8,1	9,7
Kaff	6,7	9,0	8,4	8,6	11,7
CPW	6,7	31,4	31,6	50,4	58,1
CPW	6,6	11,7	28,1	34,6	51,1

Isolierung der RNA

Jeweils 200 mg Bakterienfeuchtmasse wurden bei –70 °C gelagert und mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) die RNA isoliert (Abbildung 13). Die einzelnen Schritte waren

- Aufschluss der Biomasse
- Reinigung über eine RNA-Säule
- Waschen mit Äthanol
- RNA-Elution mit Wasser.

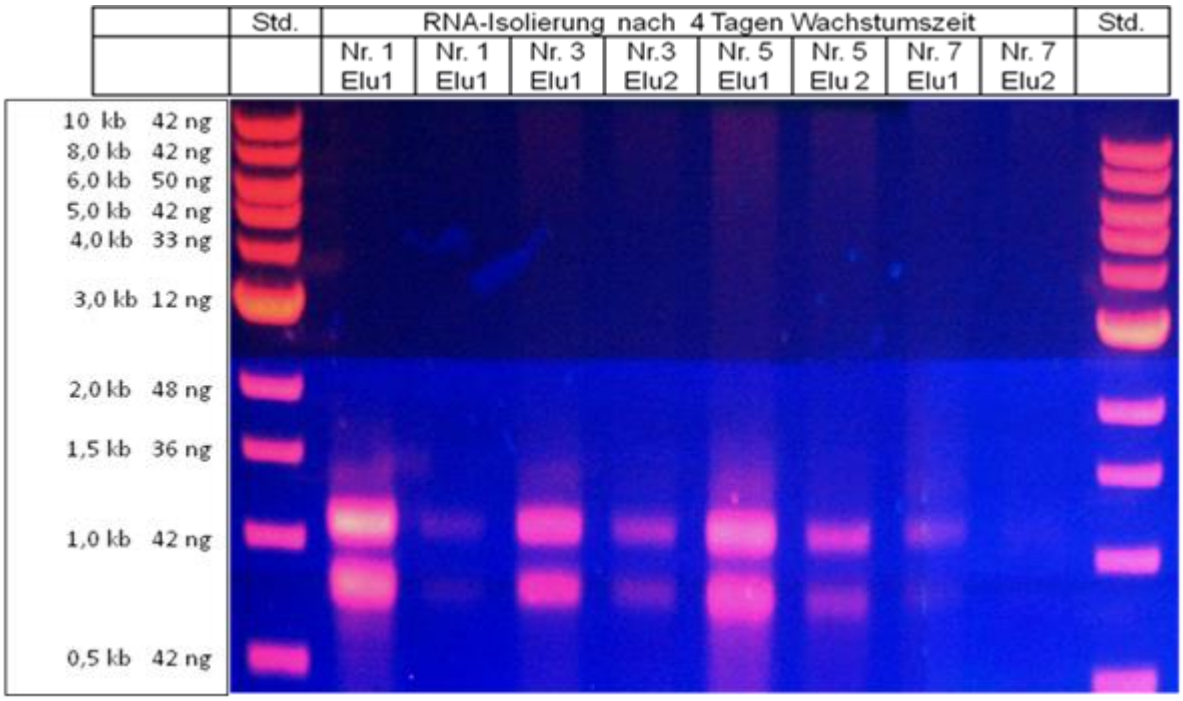


Abbildung 13: Agarosegel mit RNA-Banden aus den Kultivierungsansätzen nach 4 Tagen Wachstum

Translation der isolierten RNA in cDNA mit Reverser Transcriptase

Der nächste Schritt war die Umschreibung der isolierten RNA in cDNA. Dabei war die Vorgehensweise:

- Transkription mit der Reversen Transkriptase in Gegennwart verschiedener Primer-Mischungen
- Synthese größerer Mengen cDNA mittels PCR.

Bei den allen Proben mit erhöhter RNA-Isolierung zeigte sich auf dem Agarosegel eine Bande etwas oberhalb 2 kb (Abbildung 14). Dieser Wert stimmt mit den Daten für die endo-Cellulase aus *MO B3* relativ gut überein.

Daher wurde dieses Gen für die Expressionsversuche ausgewählt.

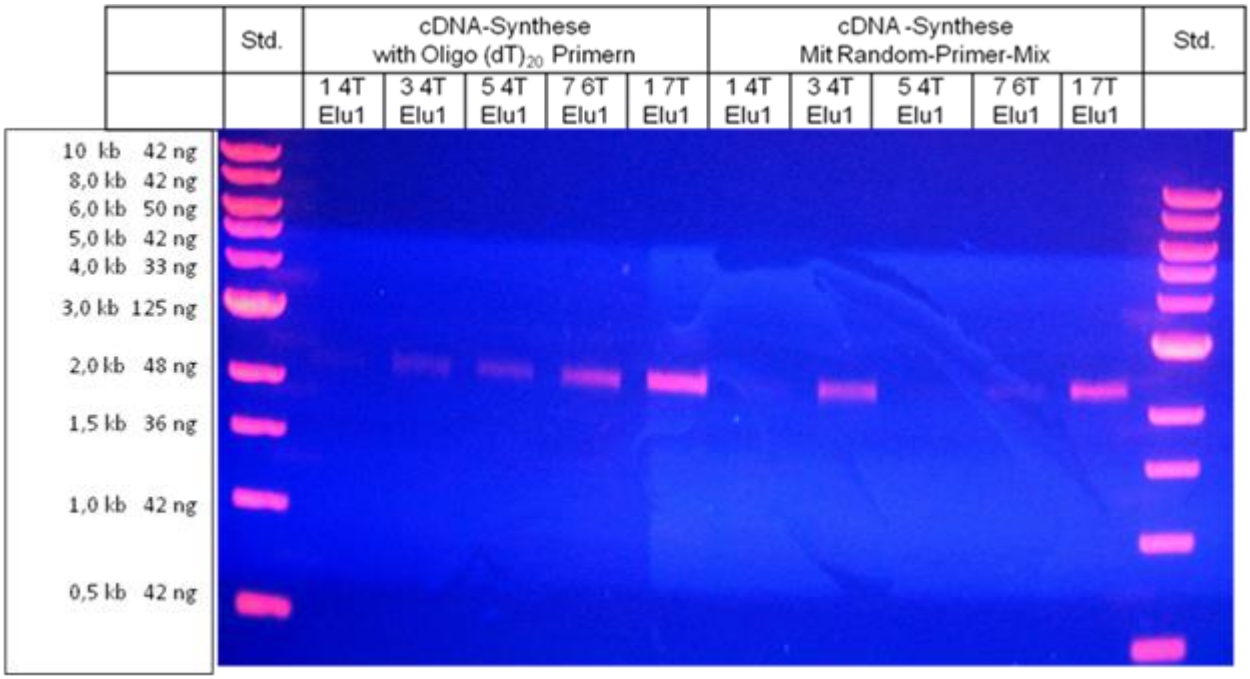


Abbildung 14: Agarosegel mit cDNA-Banden aus den Kultivierungsansätzen (Tabelle 12)

- Nr. 1, 3, 5 nach 4 Tagen
- Nr. 7 nach 6 Tagen
- Nr. 1 nach 7 Tagen

Expression der endo-Cellulase in *Pichia pastoris*

Die synthetisierte cDNA der endo-Cellulase aus *MO B3* (Gen3) wurde in den Expressionsvektor pKEXTEX integriert und in *Pichia pastoris* kloniert. Dabei konnten für Gen 3 aus *MO B3* vier Klone mit erhöhter endo-Cellulaseaktivität isoliert werden.

Charakterisierung der neuen Cellulase

Die ersten Untersuchungen der endo-Cellulase aus *MO B3* ergaben überraschende Unterschiede zu kommerziellen Enzymprodukten.

So zeigte das neue Enzym eine deutliche Verschiebung der pH-Abhängigkeit in den Neutralbereich im Vergleich zu dem Enzym aus *Trichoderma* (Abbildung 15). Darüber hinaus zeigt die endo-Cellulase aus *MO B3 b*ei pH 8,0 noch ca. 90 % und bei pH 9,0 noch ca. 60 % der maximalen Aktivität. Damit scheint dieses Enzym optimal für den Einsatz in Prozessen im neutralen bis leicht basischen pH-Bereich (Textil- und Papierindustrie, Biogasprozess) optimal geeignet. Ein derartiges Produkt ist bisher auf dem Markt nicht verfügbar.

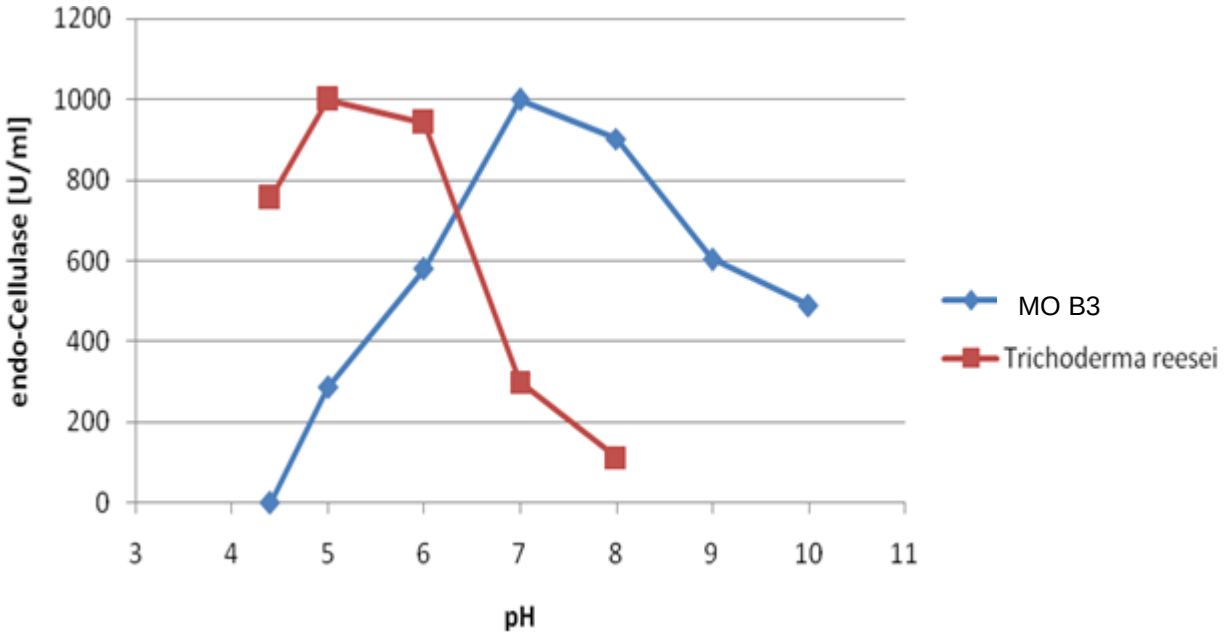


Abbildung 15: pH-Abhängigkeit der endo-Cellulase aus MO B3 exprimiert in *P. pastoris (im Vergleich zu Trichoderma reesei)*

Die Untersuchung der Temperaturabhängkeit zeigte eine Verschiebung zu kälteren Temperaturen. So wies das Enzym noch ca. 40 % der maximalen Aktivität bei 10°C auf (Abbildung 16).

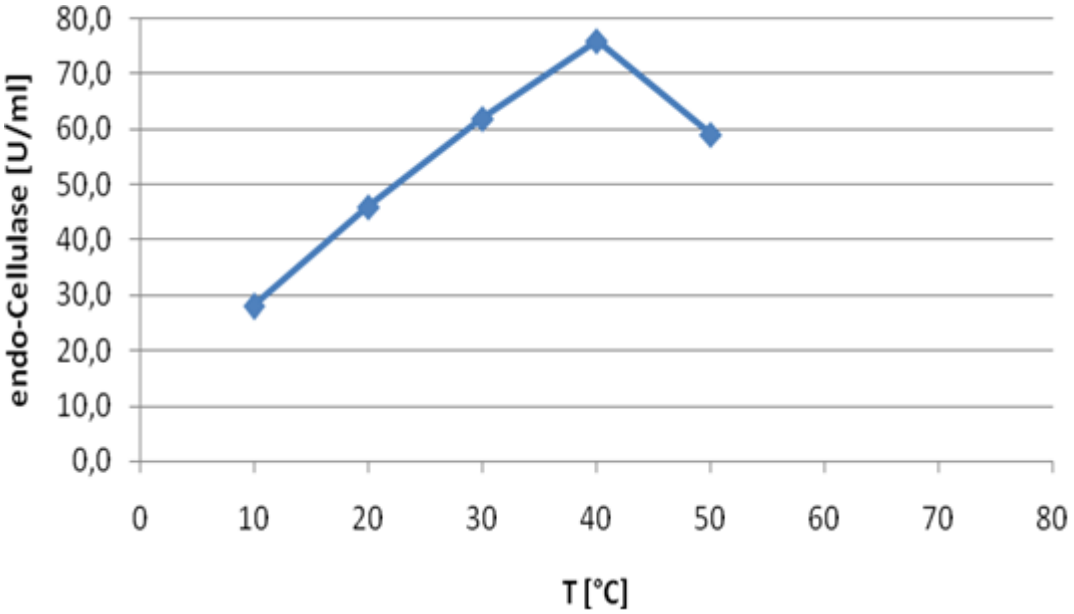


Abbildung 16: Temperatur-Abhängigkeit der endo-Cellulase aus MO B3 exprimiert in *P. pastoris*

Bei der Bestimmung der Endprodukthemmung durch Glucose zeigte sich ebenfalls ein positives Ergebnis: bis zu einer Konzentration von 50 g Glucose pro Liter war kein Verlust der Aktivität nachweisbar (Abb. 10).

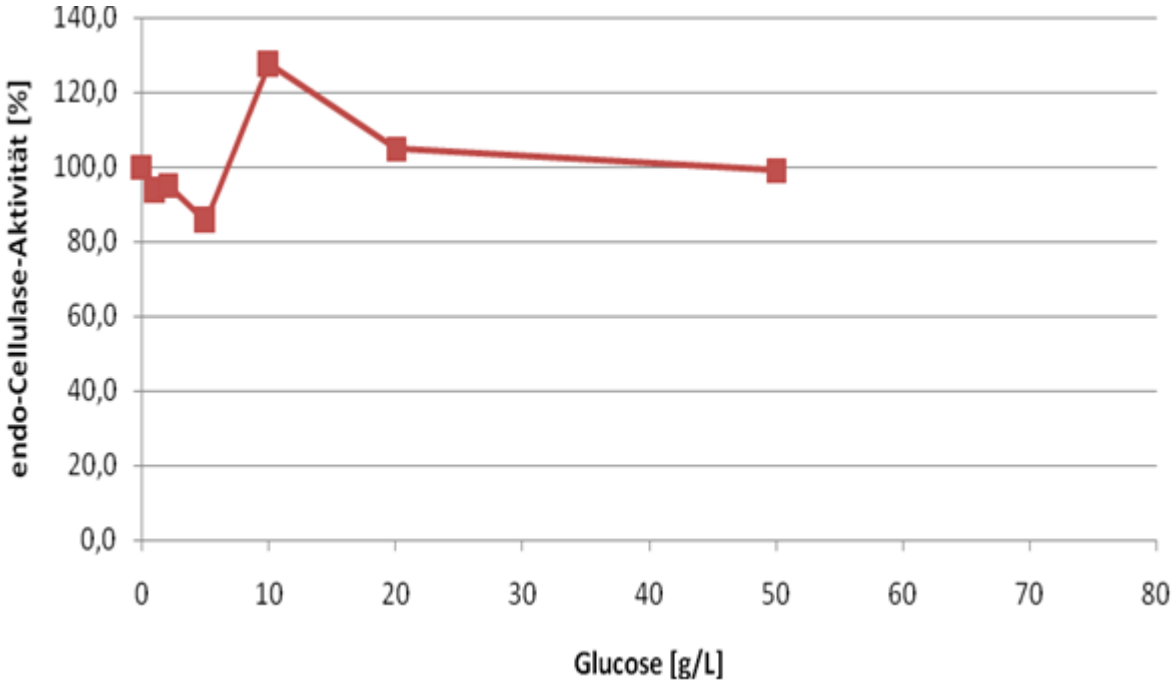


Abbildung 17: Abhängigkeit der endo-Cellulase von der Glucose-Konzentration

Entwicklung eines Fermentations- und Aufreinigungsverfahrens

Für den besten Klon, den Stamm *P. pastoris* G3mut1 wurde ein Fedbatch-Fermentationsverfahren entwickelt, mit dem eine endo-Cellulaseaktivität von ca. 270 U/ml Fermentationsbrühe erreicht wurde. Mit diesem Verfahren wurden größere Enzymmengen für die weiteren Laborversuche produziert.

Abbildung 18 zeigt den Verlauf einer typischen Fedbatch-Fermentation. Dabei ist noch zu berücksichtigen, dass die Enzymaktivitäten bei pH 4,4 gemessen wurden. Die Charakterisierungsmessungen zeigten jedoch, dass das Optimum bei pH 7,0 und die Aktivität dort um den Faktor 4 – 8 höher liegt.

Abschließend wurde für die endo-Cellulase aus *P. pastoris* G3mut1 ein Aufreinigungsverfahren entwickelt. Es besteht aus den Schritten:

- Abtrennung der Biomasse durch Zentrifugation
- Aufkonzentrierung des enzymhaltigen Fermentationsüberstandes mittels Ultrafiltration (cut-off 10.000 Da)
- Zugabe von Stabilisatoren.

So konnte ein Enzympräparat mit einer Aktivität von 3.040 U/ml hergestellt werden.

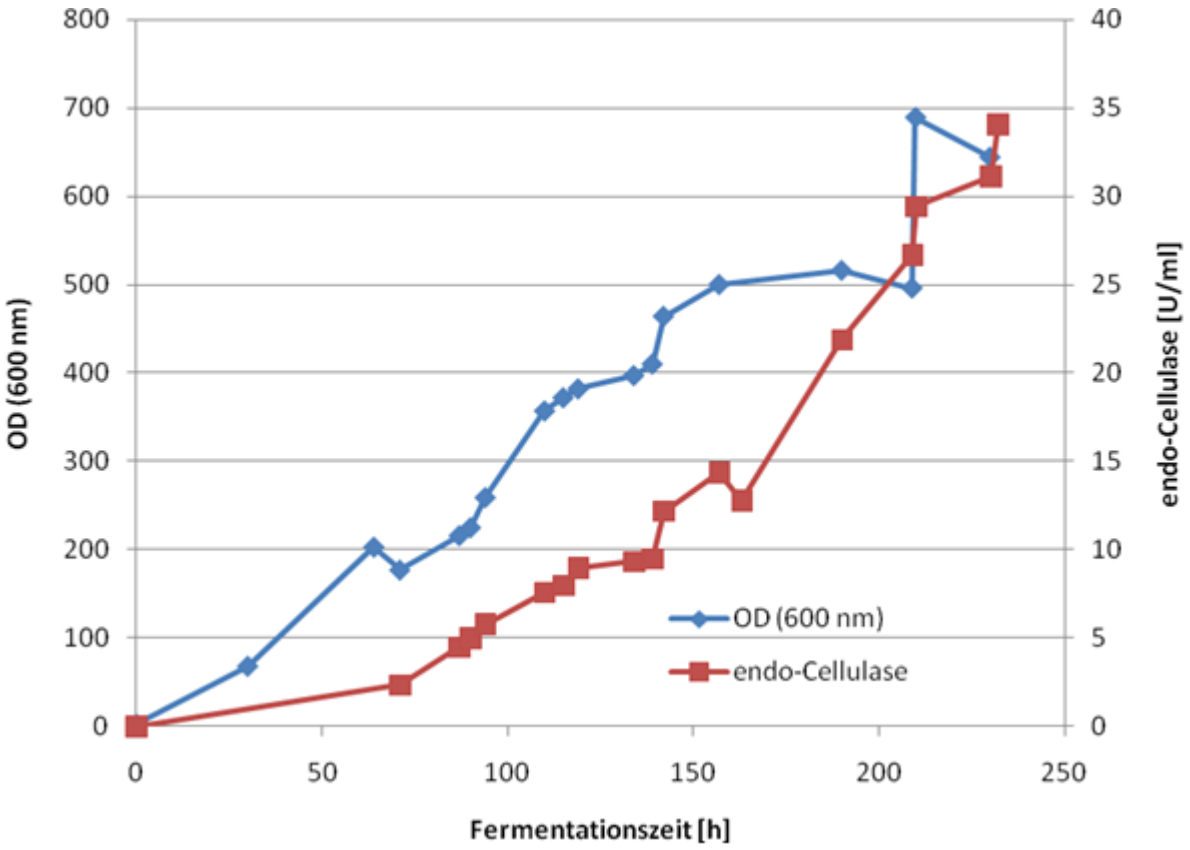


Abbildung 18: Fedbatch-Fermentation zur Produktion der endo-Cellulase mit *P. pastoris* G3mut1

Entwicklung spezieller Enzyme durch Gen-Knockout (ASA)

Zur Entwicklung von Produktionsstämmen mit definierten Enzymspektren wird der Pilz *Penicillium funiculosum*, ein leistungsfähiger Produzent von Cellulasen, Xylanasen, Mannanasen, Pektinasen und anderen Enzymen, durch spezifischen Gen-Knockout modifiziert. Dadurch sollen Stämme erhalten werden, die ausschließlich endo-Cellulase-, exo-Cellulase-, Pektinase- oder Xylanaseativitäten entwickeln.

Strategie

Penicillium funiculosum kann 3 Endoglucanases/Endocellulasen, 2 Cellobiohydrolasen und eine ß-Glucosodase produzieren, deren Sequenzen bekannt sind. Zunächst wurde versucht, das Gen für die Cellobiohydrolase 1 (Chb1, exo-Cellulase) auszuschalten. Hierzu sollte das Chb1-Gen von *P. funiculosum* mittels homologer Rekombination gegen eine modifizierte Sequenz, die kein Enzym mehr kodiert, ausgetauscht werden (Abbildung 19).

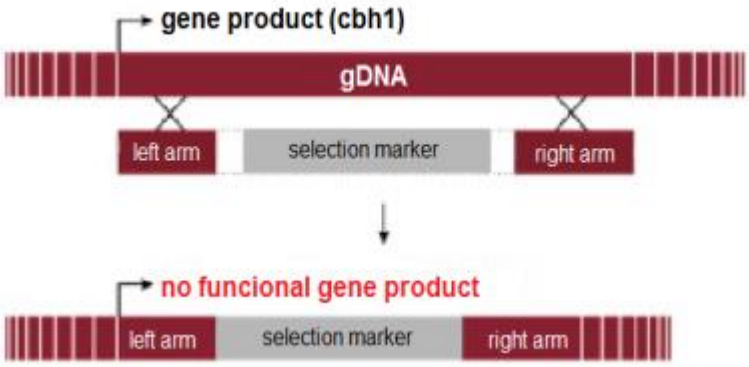


Abbildung 19: Homologe Rekombination

Dabei wurden „left arm“ und „right arm“ so konstruiert, dass diese möglichst große homologe Bereiche (500 – 1.000 bp) zum Chb1-Gen aufweisen. Zwischen diesen beiden Regionen wurde ein Resistenzgen (gegen Hygromycin, s.u.) eingebaut, dass zum Einen die die ursprüngliche Genfunktion zerstört und zum Anderen als Sektionsmarker genutzt werden kann.

Die Vorgehensweise war in folgende Schritte unterteilt:

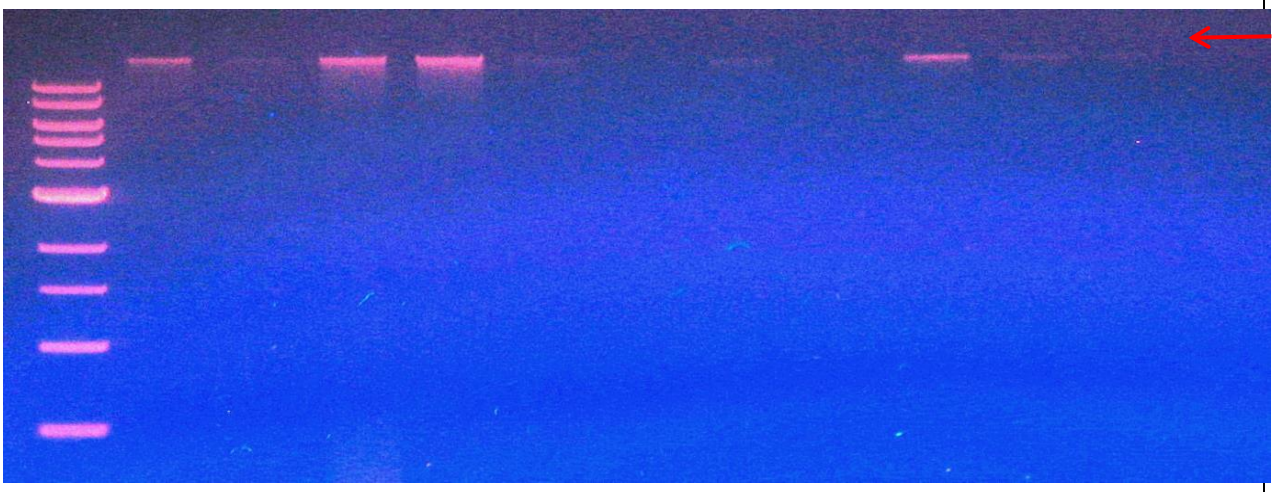
- Isolierung der genomischen DNA aus *P. funiculosum*
- Amplifizierung und Klonierung der „left arm (LA)“ (Promotor)-Region
- Amplifizierung und Klonierung der „right arm (LA)“ (Terminator)-Region
- Vermehrung des Plasmids pCNSN44
- Zusammenbau des „Knockout“--Vektors

Isolierung der genomischen DNA aus *P. funiculosum*

Die ersten Schritte, um die „left arm (LA)“ (Promotor)- Region und die „right arm (RA)“ (Terminator)- Region zu gewinnen, ist die gDNA-Isolierung sowie die nachfolgenden Amplifizierung der DNA. Die amplifizierte LA-Region“ wird in den Klonierungsvektor (pGEM-T) eingefügt, in *E.coli* kloniert und vermehrt.

Die gDNA-Isolierung wurde mit Hilfe der „DNasy Plant mini Kit“ von QIAGEN nach Herstellerangaben durchgeführt. Die gereinigte DNA aus verschiedenen Präparationen wurden auf Agarose-Gel aufgetragen. Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse: die obere Bande repräsentiert die isolierte gDNA aus *P. funiculosum.*

Std.	gDNA 24.01.14				gDNA 27.01.14							
	9Elu1	9Elu2	10Elu1	10Elu2	11Elu1	11Elu2	12Elu1	12Elu2	13Elu1	13Elu2	14Elu1	14Elu2
1µl	20µl	20µl	15µl	15µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl



Konz.	~1,5ng/µl	~3,0ng/µl	~3,0ng/µl	~1,5ng/µl

Abbildung 20: Agarosegel [0,8 %] mit gDNA aus *P.funiculosum*

Um zu prüfen, ob die Isolierte gDNA in Ordnung das Cbh1-Gen enthält, wurde eine PCR mit geeigneten Primern (Chb1-T1/Chb1-T2) durchgeführt und die resultierende gereinigte DANN auf ein Agarose-Gel aufgetragen (Abbildung 21). Die dort sichtbare Bande bei ca. 700 bp hat die erwartete Größe und zeigt somit den „linken Arm“ des Chb1-Gens.

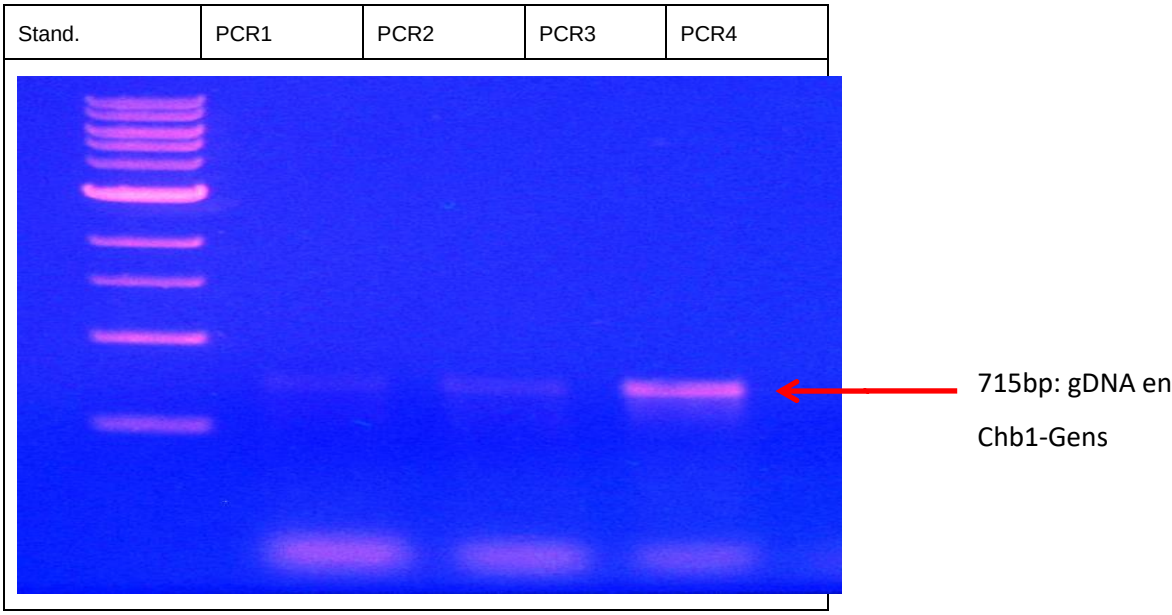


Abbildung 21: Agarosegel [0,8 %] mit DNA aus der PCR

Amplifizierung und Klonierung der „left arm (LA)“ (Promotor)-Region

Die PCR-Amplifizierung wurde mit speziell entwickelten Primern (Cbh1Fw-A1/ Cbh1Rv-A2) durchgeführt. Die amplifizierte und gereinigte LA-Region wurde in den Klonierungsvektor (pGEM-T) eingefügt. Das resultierende neue Plasmid (pGEM-T-LA) wurde in mittels Elektroparation *E.coli* kloniert und vermehrt.

Es wurden 4 verschiedene Transformationen duchgeführt. Nach die Transformation wurden die transformierten Zellen auf LB/Ampicillin/IPTG/XGal-Platten ausplattiert. Die weißen Kolonien sollten das Plasmid (pGEM-T-RA) enthalten (Abbildung 22).

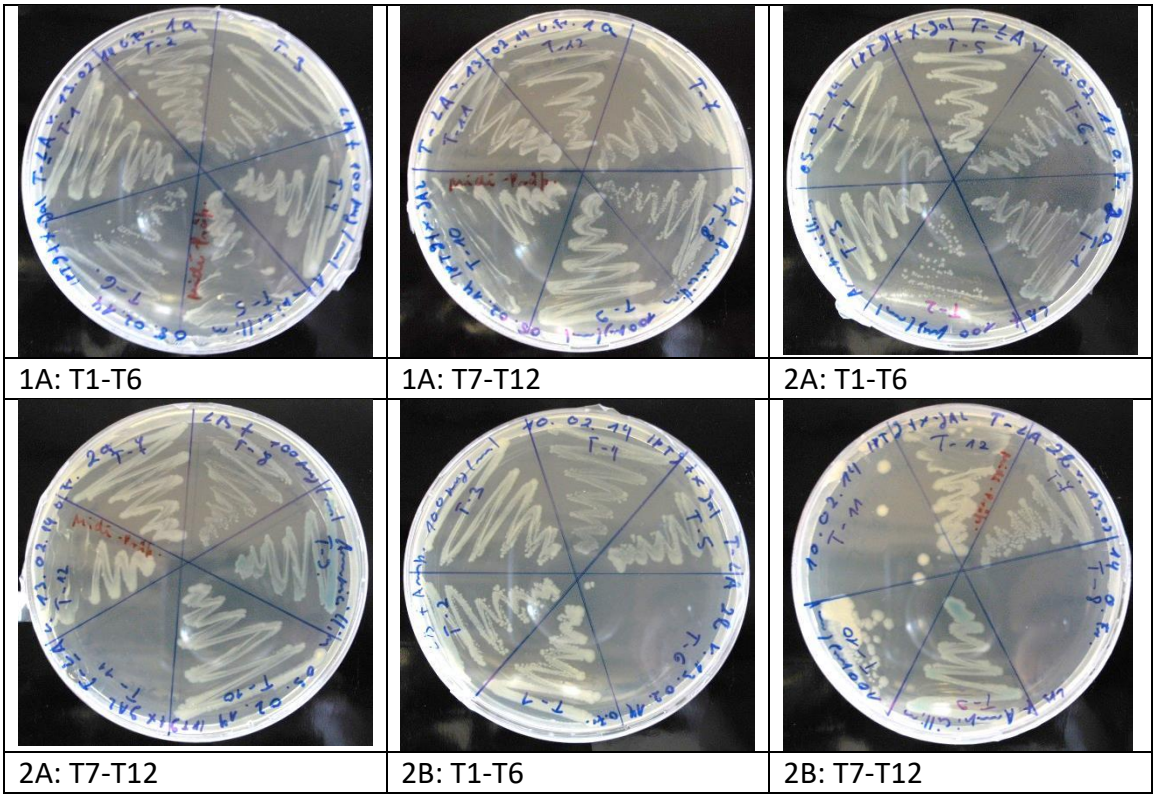
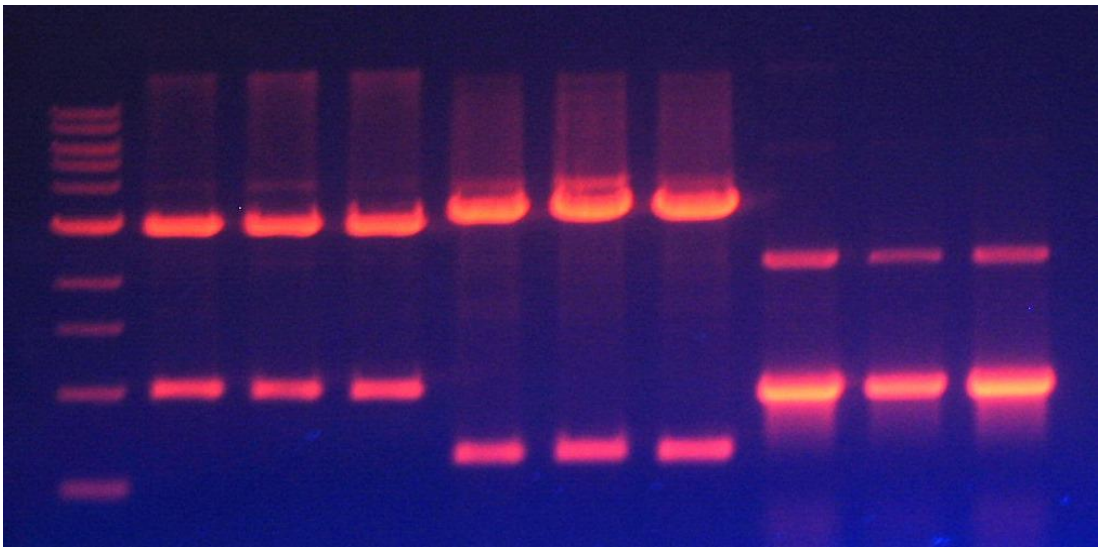


Abbildung 22: Transformation von pGEM-T-LA in *E. coli*

Die Plasmid-Isolierung aus *E. coli* wurde mit Präparations-Kits der Firma Genomed laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Prüfung von pGEM-T-LA wurde durch Restriktionsspaltung und PCR durchgeführt. Das Agarose-Gel in Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse.

	Std.	**Restriktion mit EcoRI**			**Restriktion mit KpnI/PstI**			**PCR**		
		1AT5	1AT10	2AT12	1AT5	1AT10	2AT12	1AT5	1AT10	2AT12
Probe	1µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	15 µl	15 µl	15 µl
Loud. B	1 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	3 µl	3 µl	3 µl
Wasser	4 µl									



Bande Kbp	1,0 LA / 3,0 Vektor	0,6 LA /3,4 Vektor	1,0 LA

Abbildung 23: Agarosegel [0,8 %] zur pGEM-T-LA Prüfung

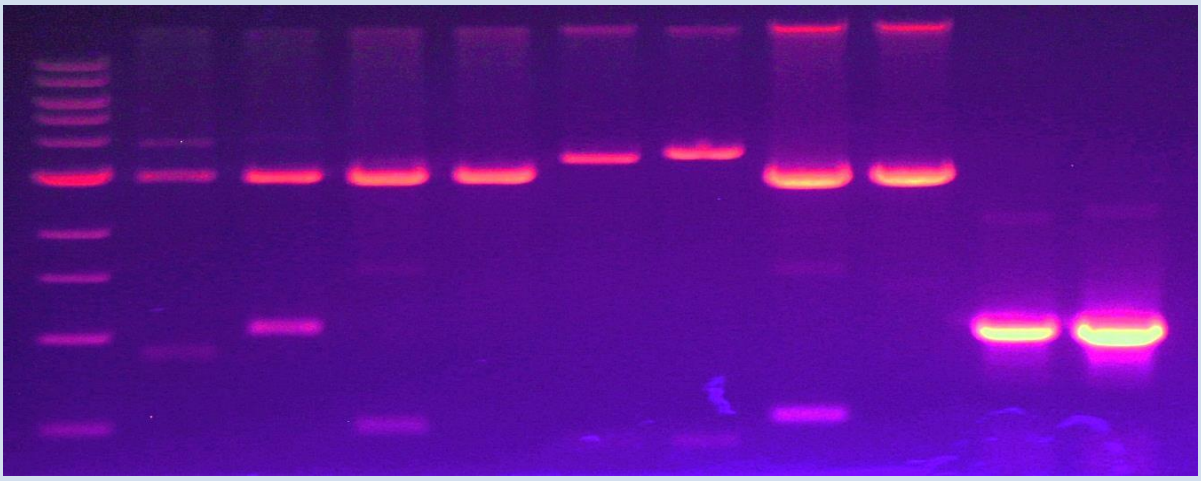
Restriktionsspaltung mit EcoRI: Die 3 ersten Spuren zeigen zwei Banden, eine bei 3,0Kbp (Vektor) und die andere bei 1,9 Kbp (LA). Das bedeutet, dass die LA-DNA richtig integriert ist.

Restriktionsspaltung mit KpnI/PstI: Spuren 4 bis 6 zeigen zwei Banden, eine bei ca. 3,4 Kbp (Vektor) und die andere bei ca. 0,6 Kbp (LA). Das Bedeutet, dass die LA-DNA in 5´→3´Richtung integriert wurde.

Amplifizierung und Klonierung der „right arm (RA)“ (Terminator)-Region

Die Arbeiten wurden analog 2.4.1.3 durchgeführt. Der resultierende Vektor wurde pGEM-T-RA wurde nach Transformation in *E. coli* isoliert und wieder mittels Restriktionsspaltung geprüft:

	Std.	Restriktionsspaltung mit EcoRI				Restriktionsspaltung mit SacI				PCR	
		RA1	RA1	Pos1	Bac1	RA1	RA1	Pos1	Bac1	RA1	RA2
Probe	1µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	25 µl	25 µl



Bande Kbp	1,0/3,0	1,0/3,0	0,5/3,0	3,0	0,65/3,4	0,65/3,4	3,5	3,0	1,0	1,0

Abbildung 24: Agarosegel [0,8 %] zur pGEM-T-RA Prüfung

Restriktionsspaltung mit EcoRI: RA2: richtig integriert. Pos1: richtig integriert, Bac1: blaue Transformanten diese Bande repräsentiert die 3,0 Kbp des geöffneten Vektors.

Restriktionsspaltung mit SacI: RA1 und RA2: Bande bei ca. 3,6 Kbp (Vektor) und diffuse Bande bei ca. 0,4 Kbp →Das RA-Insert wurde in 3´→5´Richtung integriert! Bac1: Diese Bande repräsentiert die 3,0 Kbp des geöffneten Vektors.

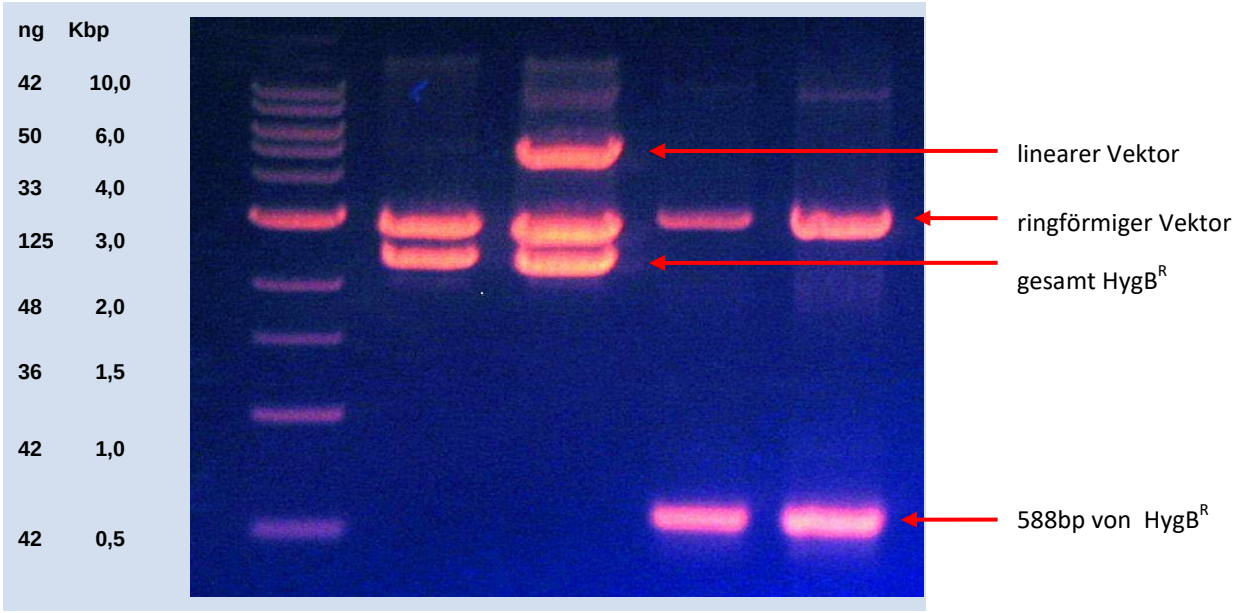
Vermehrung des Plasmids pCNSN44

Das pCNSN44 Plasmid mit 5.3Kbp enthält die Resistenzgene für Hygromicin und Ampicillin. Das Hygromicin-Resistenzgen ist ein Marker, der für die Selektion in Pflanzen (Pilzen) benutzt werden kann. Das Ampicillin-Gen ist für die Selektion in E.coli notwendig.

Das pCNSN44 Plasmid wurde von die Firma „Fungal Genetics Stock Center, FGSC“ aus DNA-Form in Filterpapier geliefert.

Die Transformation des Plasmids in *E. coli* sowie die Reinigung und Überprüfung erfolgte analog der Arbeiten mit der LA- bzw. RA-Region.

Probe	Std.	Spaltung SalI		PCR	
		Klon1	Klon2	Klon1	Klon2
	1µl	20 µl	25 µl	20µl	20µl



Bande Kbp	2,9 Vektor/2,4 HygB	0,6 HygB

Abbildung 25: Agarosegel [0,8 %] zur p-CNSN44-Prüfung

Spaltung mit SalI: Klon1: 2 Banden: bei ca.2,9Kbp (Vektor); bei ca. 2,4Kbp HygB; Klon2: 3 Banden: bei ca. 5,0Kbp lineare Vektor (nur in einer Seite geschnitten); bei ca.2,9Kbp (Vektor); bei ca. 2,4Kbp HygB

PCR: beide Klone enthalten die HygB-Marker. Die obere Bande bei ca. 3,0Kbp repräsentiert die ringförmige pCSN44

Ligation des Knockout-Vektors

Für die Synthese des Knockout-Vektors die drei hergestellten DNA-Sequenzen LA (Promotor Region), RA (Terminator Region) und HygB (Markergen) in den pGEM-T-Easy Vektor eingebaut. Abbildung 26 zeigt die Reihenfolge des Einbaus:

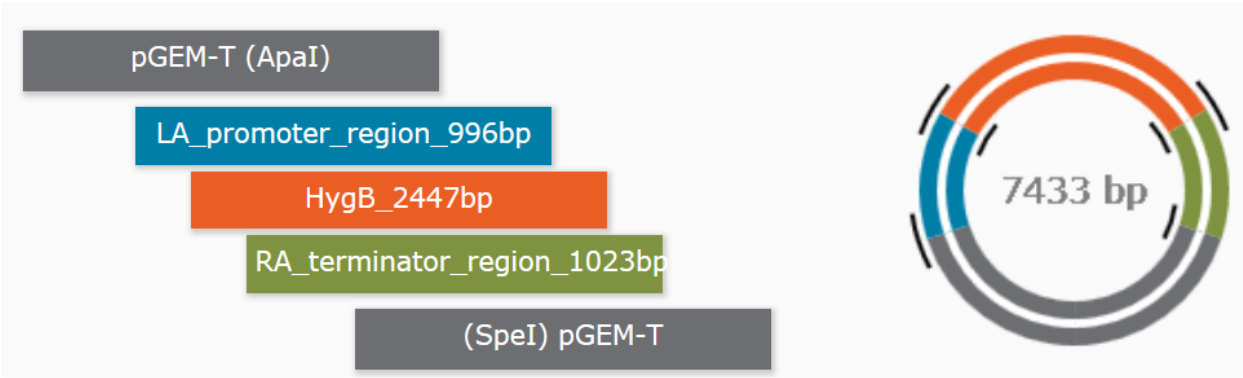


Abbildung 26: Aufbau des Knockout-Vektors

Für den Zusammenbau der einzelnen DNA-Sequenzen mussten 6 neue Primer entwickelt werden.

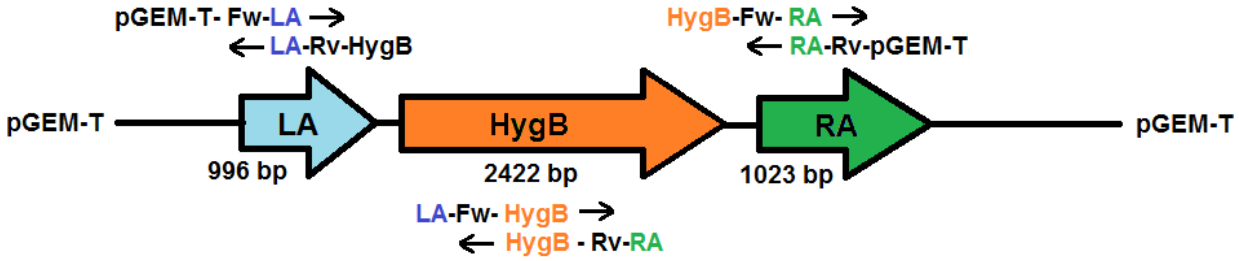


Abbildung 27: Darstellung der Knockout-Vektor-Konstruktion

Vor dem Zusammenbau des Vektors mussten die vier Einzelteile LA, HygB, RA und pGEM-T nochmals analog der vorherigen Kapitel mit PCR amplifiziert und gereinigt werden.

Danach erfolgten die Versuche zur Ligation der Einzelteile zum funktionsfähigen Vektor.

Ergebnisse

Abbildung 28 zeigt exemplarisch das Agarosegel, auf das die aufgereinigten Vektoren von vier verschiedene Ligationsansätze in zirculärer (ohne Spaltung) und linearrisierter (nach Restriktionsverdau) Form aufgetragen wurden. Man sieht, dass die Vektoren KO-09-03, KO-09-04 und KO-07-02 die richtige Größe haben.

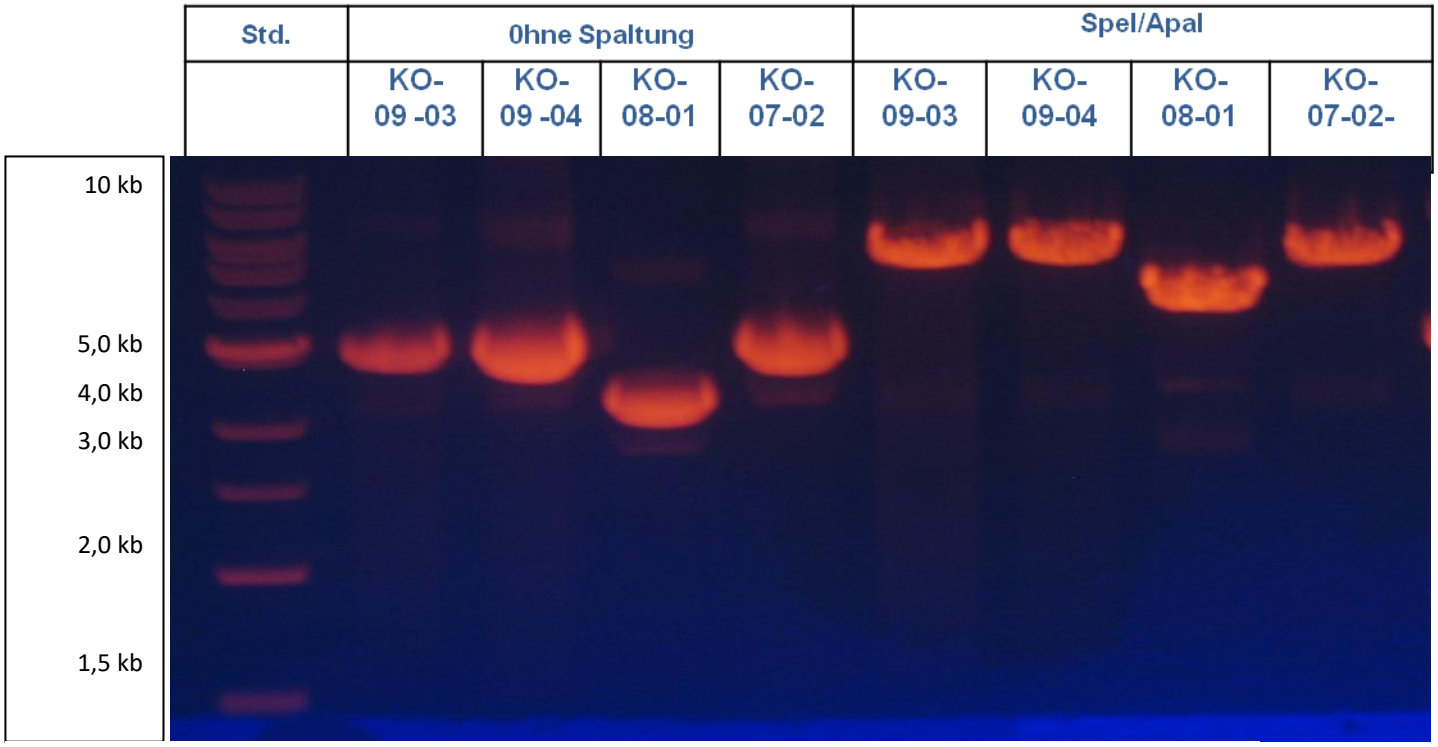


Abbildung 28: Agarosegel verschiedener Ligationsansätze

Transformation von *P.* funiiculosum mit dem KO-Vektor

Vorbereitung des KO-Vektors

Für die Transformation wurden die zirkulären sowie die gespaltenen KO-Vektoren ingesetzt. Ausgewählter Vektor für den ersten Versuch: KO-09-03 = 2.205,1 µg/ml $OD_{260/280}$= 1,75

Tabelle 13: Ansatz für die Spaltung des KO-Vektors

Komponenten	Probe
10xCutSmart	2 µl
KO-09-03 [11 µg)]	5 µl
NotI-HF (20 kU/ml)	1 µl
Dest. Wasser (auf 20 µl)	12 µl

Inkubation: 2 h bei 37 °C

Inaktivierung: 20 min bei 65 °C

PEG-Transformation

Die Klonierung erfolgte in konzentrierter PEG 4.000-Lösung. Hiezu mussten Protoplasten-Suspensionen mit Zellzahlen von $5{,}0 \times 10^7$ -2×10^8 Protoplasten/ml hergestellt werden.

Durchführung

- 100µl Protoplasten-Suspension (Protoplasten-Suspension Nr. 3 vom 12.06.2014 mit $2{,}5 \times 10^7$ Protoplasten/ml).
- + 5-10 µg KO-Vektor KO-09-03 (zirkulär und linear)
- PEG-Lösung zuggeben und 30 min auf Eis inkubieren
- PEG-Lösung zugeben und weitere 30 min bei 20 °C inkubieren
- Abtrennen der Protoplasten durch Zentrifugation
- Suspendierung der Protoplasten in Regulatorlösung

Regeneration und Selektion

Regeneration

- 400 µl der Transformationen PT01 – PT-04 werden mit 16 ml Regenerations-Medium (RM) in einem 50 ml-Tube gemischt. Dann wird über Nacht bei 30 °C, 150 rpm inkubiert.

Selektion

- Agar-Platten mit 10 ml RM-Medium + 2 % Agar gießen und bei 37 °C temperieren.
- zu 40 ml RM-soft Agar (bei 45-50 °C) wird jeweils 16 ml der Regenerations-Suspension zugesetzt.
- nach Mischung wird die Probe auf 4 RM-Agarplatten geteilt (ca. 14 ml pro Platte) und bei 30 °C inkubiert.

- 29.04.2015
- nach 24 h Inkubationszeit: Platte 1 und 2 werden 2,4 ml RM-Soft Agar + 1,0 mg/ml HygB [50 mg/ml] zugesetzt.
- 30.04.2015
- nach 48 h Inkubationszeit: Platte 3 und 4 werden 2,4 ml RM-Soft Agar + 1,0 mg/ml HygB zugesetzt
- Die Platten werden inkubiert bis die Transformanten gewachsen sind (5-6 Tagen).

Ergebnisse

Die Transformanden konnten selektiert und isoliert werden. Sie wurden auf Enzymbildung von endo- und exo-Cellulase untersucht. Es konnten jedoch keine Transformanden isoliert werden, deren exo-Cellulase zerstört wurde. Auch alle weiteren Transformationsexperimente ergaben ausschließlich Transformanden mit exo-Cellulase-Aktivität.

Da die Arbeiten zu AP 2.1, 2.2 und 2.3 inzwischen vielversprechende Ergebnisse zeigten, und speziell in AP 2.3 die Klonierung einer endo-Cellulase gelang, wurde entschieden, die Arbeiten zur Entwicklung einer Knockout-Mutante abzuschließen und stattdessen mehr auf die anderen Arbeitspakete zu fokussieren und so die Projektziele zu erreichen.

Charakterisierung neuer Cellulasen und Hemicellulasen (ASA)

Enzymspektren der Enzymmischungen

Zunächst wurden die Lyophilisate, die durch Fermentation auf CPW und Kaff hergestellt wurden, auf ihr Enzymspektrum untersucht (Tabelle 14). Dabei zeigte sich, dass

- mit CPW im Vergleich zu Kaff generell höhere Enzymaktivitäten erzielt wurden (um ca. 50 %)
- *P. funiculosum* und *A. fissiles* die besten Enzymproduzenten waren
- die endo-Cellulase-Aktivitäten der Präparate von *P. funiculosum* und *A. fissiles* fast schon im Bereich von kommerziellen Enzympräparaten liegen.

Tabelle 14: Enzymspektren der mit CPW und Kaff produzierten Lyophilisate

Lyophilisat	Enzymaktivität [U/g]				
	exo-Cellulase	endo-Cellulase	ß-Gluco-sidase	Xylanase	endo-Pektinase
P. funiculosum chaff	5,73	1.125	4,7	718	28,1
A. fissilis chaff	3,13	1.200	9,6	275	9,7
A. aculeatus chaff	1,23	275	6,0	51	21,3
P. funiculosum CPW	8,16	1.880	8,3	560	437
A. fissilis CPW	5,39	1.730	1,1	583	0
A. aculeatus CPW	0,51	680	18,1	115	14,4

Untersuchung der pH-Profile

Für den Einsatz von cellulytischen Enzymen in einigen Anwendungsbereichen (wie z.B. Biogas) ist eine hohe Aktivität im neutralen pH-Bereich wünschenswert. Daher wurden die Enzympräparate auf ihre pH-Abhängigkeit untersucht.

Dabei zeigten die mit *A. fissilis* auf CPW und Kaff produzierten Präparate eine sehr hohe exo-Cellulase und –Xylanase-Aktivität bei pH 7, während bei den Präparaten von *P. funiculosum* und *A. aculeatus* der für Pilze typische starke Aktivitätsabfall im Neutralbereich messbar war (Tabelle 14, Tabelle 15, Abbildung 29, Abbildung 30).

Die pH-Profile der exo-Cellulase and Xylanase of *A. fissilis* waren etwas in den Neutralbereich verschoben.

Weiterhin bestätigten diese Ergebnisse nochmals, dass mit dem Substrat CPW deutlich höhere exo-Cellulase-Aktivitäten im Vergleich zu Kaff erreichbar sind (Tabelle 15).

Tabelle 15: exo-Cellulase-Aktivität der mit CPW und Kaff produzierten Lyophilisate in Abhängigkeit vom pH-Wert

Lyophilisat	exo-Cellulase [units/g]			
	4,0	**5,0**	**6,0**	**7,0**
P. funiculosum chaff	11,8	3,2	1,7	1,9
A. fissilis chaff	7,0	10,0	6,6	6,4
P. funiculosum CPW	14,4	8,3	6,8	5,9
A. fissilis CPW	13,5	16,3	12,3	8,2
A. aculeatus CPW	1,8	2,0	2,0	0,6

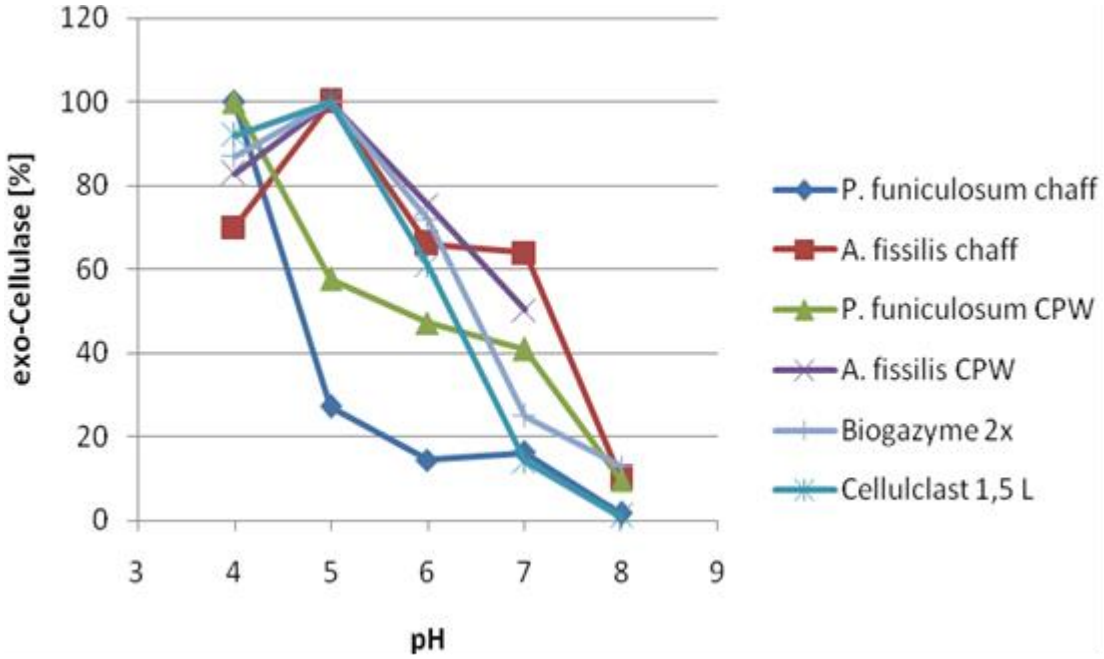


Abbildung 29: exo-Cellulase-Aktivität der mit CPW und Kaff produzierten Lyophilisate in Abhängigkeit vom pH-Wert

Tabelle 16: endo-Cellulase-Aktivität der mit CPW und Kaff produzierten Lyophilisate in Abhängigkeit vom pH-Wert

Lyophilisat	endo-Cellulase [units/g]	
	5,0	**7,0**
P. funiculosum chaff	1.806	434
A. fissilis chaff	1.439	487
P. funiculosum CPW	1.933	472
A. fissilis CPW	1.458	367
A. aculeatus CPW	564	150

Tabelle 17: exo-Xylanase-Aktivität der mit CPW und Kaff produzierten Lyophilisate in Abhängigkeit vom pH-Wert

Lyophilisat	exo-Xylanase [units/g]			
	4,0	**5,0**	**6,0**	**7,0**
P. funiculosum chaff	1.013	591	125	50
A. fissilis chaff	601	592	524	556
P. funiculosum CPW	782	454	170	79
A. fissilis CPW	507	268	424	482
A. aculeatus CPW	126	109	73	61

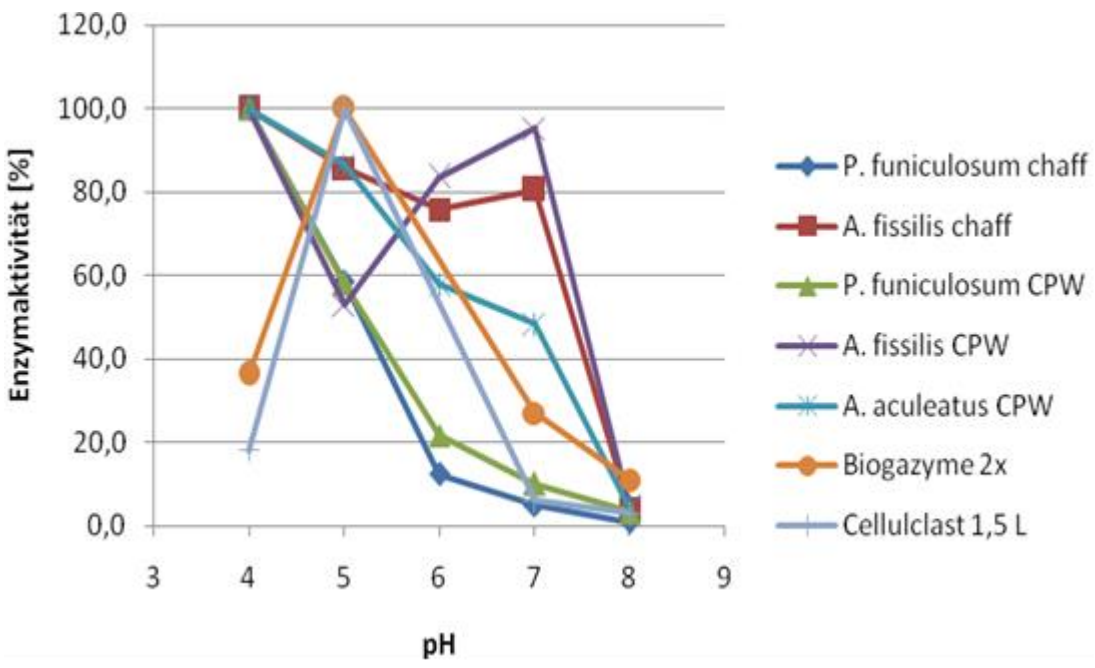


Abbildung 30: exo-Xylanase-Aktivität der mit CPW und Kaff produzierten Lyophilisate in Abhängigkeit vom pH-Wert

Untersuchung der Temperatur-Profile

Die Untersuchungen ergaben, dass die exo-Cellulase und –Xylanase von *P. funiculosum* eine erhöhte Thermostabilität im Vergleich zu *A. fissilis* haben zu haben scheinen (Abbildung 31, Abbildung 33).

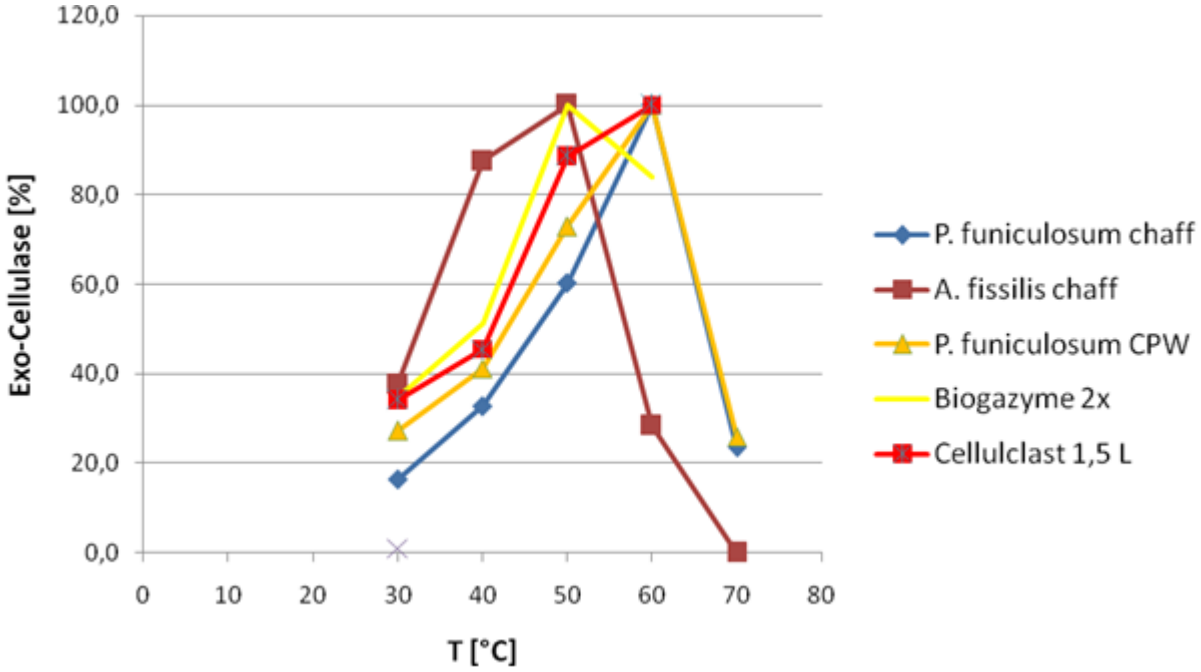


Abbildung 31: exo-Cellulase-Aktivität der mit CPW und Kaff produzierten Lyophilisate in Abhängigkeit von der Temperatur

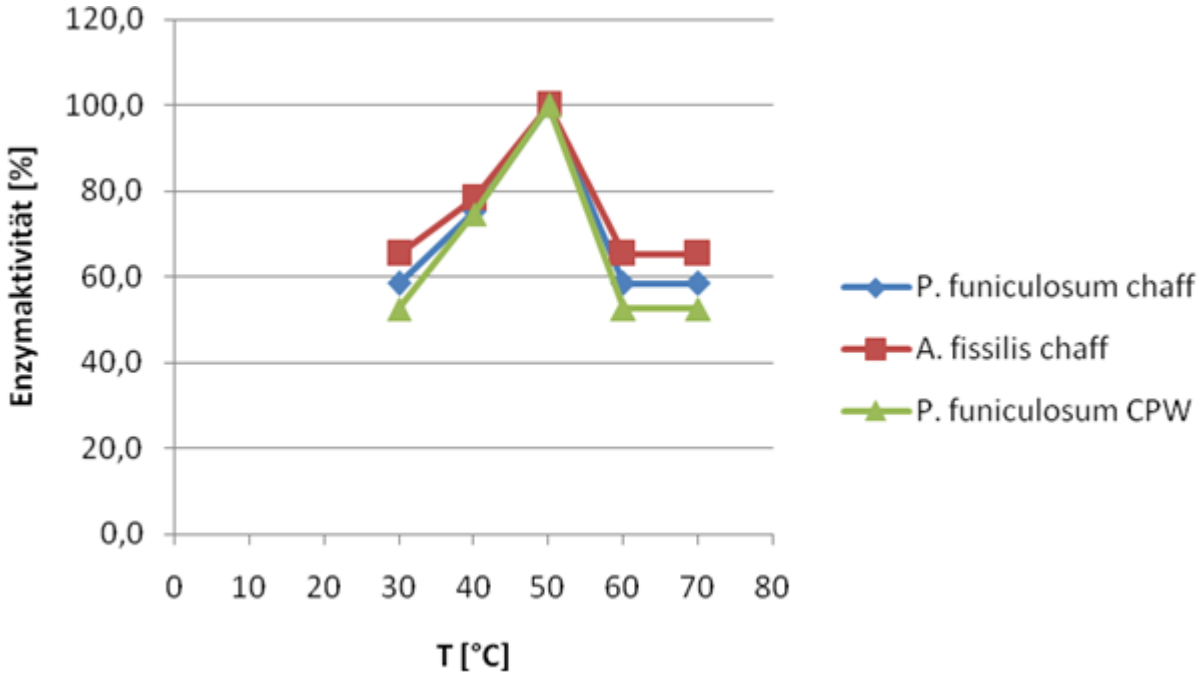


Abbildung 32: endo-Cellulase-Aktivität der mit CPW und Kaff produzierten Lyophilisate in Abhängigkeit von der Temperatur

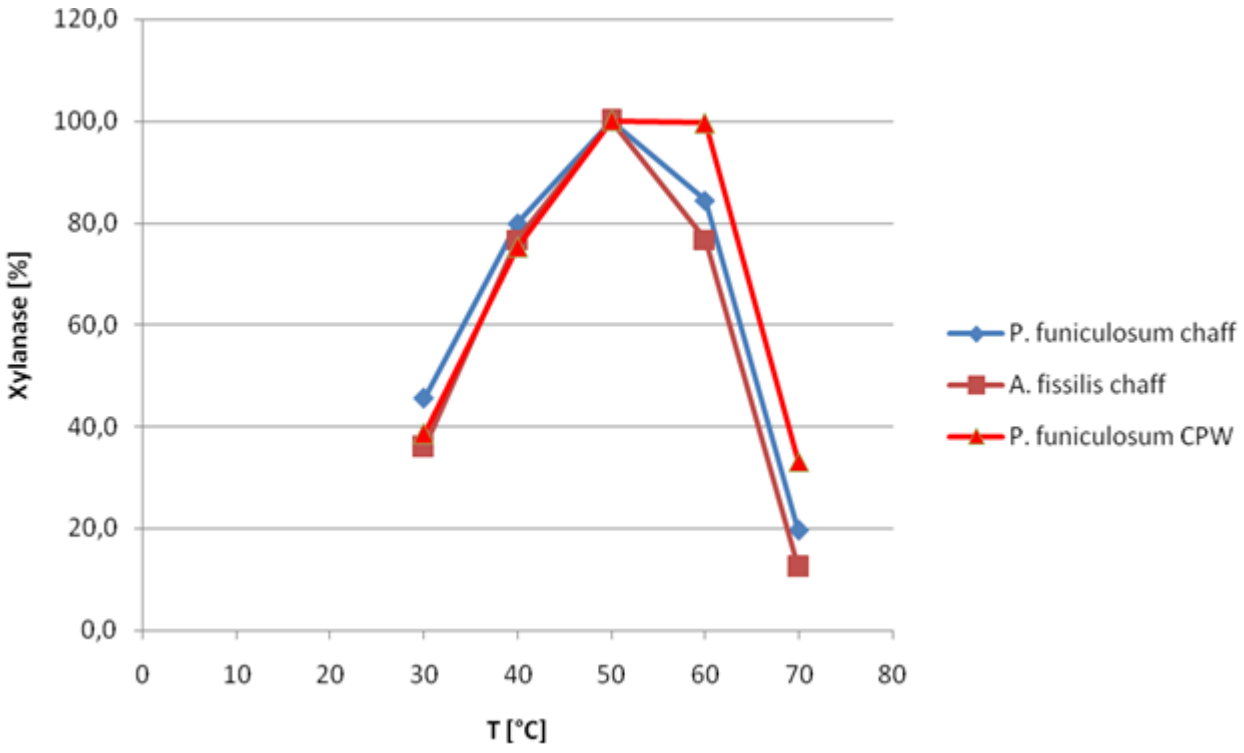


Abbildung 33: exo-Xylanase-Aktivität der mit CPW und Kaff produzierten Lyophilisate in Abhängigkeit von der Temperatur

Untersuchung der Proteinzusammensetzung mittels SDS-Gel

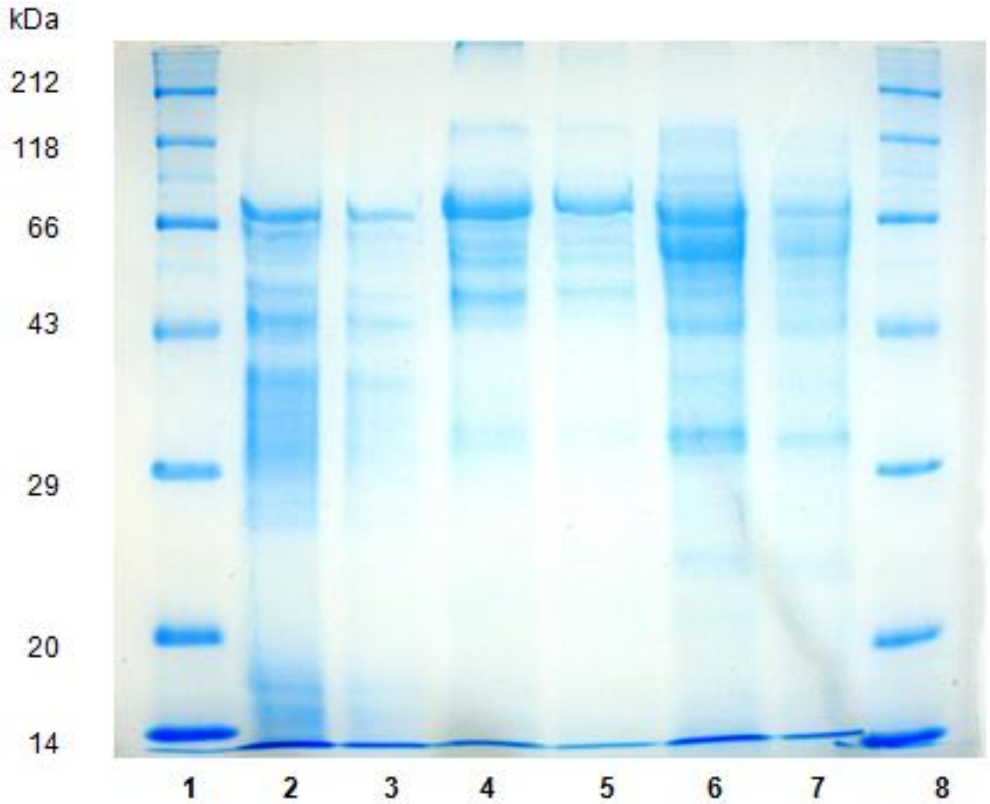
Die effektivsten neu entwickelten Enzympräparate wurden mittels SDS-Gel hinsichtlich der enthaltenen Enzym- bzw. Proteinbanden untersucht.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt.

Man sieht, dass die Enzymmischungen PF Kaff und PF CPW eine völlig unterschiedliche Enzymzusammensetzung haben (Nr. 4 und 6 des SDS-Gels). Dies beweist, dass die Enzymbildung von *P. funiculosum* wirklich speziell auf diese beiden Substrate zugeschnitten wurde. Daher ist zu erwarten, dass die Versuche der Projektpartner mit diesen Enzympräparaten besser aufgeschlossene und verzuckerte Rohstoffe liefern werden. Die Versuche der Projektpartner sind derzeit noch nicht abgeschlossen.

Für die neue endo-Cellulase gen3 zeigt das Gel eine deutliche Bande auf der Höhe von

70 kDa. In diesem Bereich liegen gewöhnlich auch die Banden von Cellulasen aus anderen Mikroorganismen.



Nr.	Probe	Protein	Vol.
1	Marker	1,4 mg/ml	10 µl
2	endo-Cellulase gen3 in 50% Glycerin v. 23.07.09, 1:4 verd.	4,9 mg/ml	20 µl
3	endo-Cellulase gen3 in 50% Glycerin v. 23.07.09, 1:8 verd.	4,9 mg/ml	20 µl
4	Enzymmischung PF Kaff in 50 % Glycerin, Jan. 16, 1:10	11,9 mg/ml	10 µl
5	Enzymmischung PF Kaff in 50 % Glycerin, Jan. 16, 1:20	11,9 mg/ml	20 µl
6	Enzymmischung PF CPW in 50 % Glycerin, Jan. 16, 1:20	25,1 mg/ml	20 µl
7	Enzymmischung PF CPW in 50 % Glycerin, Jan. 16, 1:40	25,1 mg/ml	20 µl
8	Marker	1,4 mg/ml	10 µl

Abbildung 34: Proteinbanden der im Projekt neu entwickelten Enzyme im SDS-Gel

Charakterisierung der neuen genrekombinanten endo-Cellulase

Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind in 2.3.4 **Charakterisierung der neuen Cellulase** S.8 dargestellt.

Bereitstellung von Enzymen

Produktion verschiedener neuer Hydrolasen

Während des gesamten Projektes wurden für die Projektpartner H2B, BP, UCM und TI folgende Enzyme hergestellt:

- Cellulasen
- Xylanase
- Pektinase
- ß-Galaktosidase
- ß-Glucosidase
- ß-Glucanase
- drei verschiedene Enzymmischungen produziert auf Orangenschalen
- drei verschiedene Enzymmischungen produziert auf Kaff.

Wiederholt wurden von den Projektpartnern folgende Enzympräparate angefordert:

- Biogazyme 2x (hochaktive Cellulase- und Hemicellulase-Mischung)
- Pektinase L40
- Enzymmischung *P. funiculosum* Kaff
- Enzymmischung *P. funiculosum* CPW
- Enzymmischung *A. fissitis* Kaff
- Enzymmischung *A. fissitis CPW*

In größeren Mengen fermentiert wurde von ASA:

- Enzymmischung *P. funiculosum* Kaff
- Enzymmischung *P. funiculosum* CPW

Fermentation des Enzympräparates Pf CPW und Charakterisierung

Da das Enzympräparat aus *P. funiculosum* fermentiert auf CPW die höchsten Enzymaktivitäten und darüber hinaus interessanteste biochemische Eigenschaften aufwies, wurde dieses nochmals fermentiert und das Lyophilisat biochemisch untersucht.

Die hier gemessenen Daten bestätigen nochmals die Ergebnisse aus AP 2.5 Charakterisierung neuer Cellulasen und Hemicellulasen:

- die exo-Cellulase von *P. funiculosum* hat eine leicht erhöhte Aktivität bei pH 7,0 (Abbildung 35).
- die exo-Cellulase und –Xylanase von *P. funiculosum* haben eine erhöhte Thermostabilität im Vergleich zu entsprechenden Enzymen aus anderen Pilzarten (Abbildung 36)
- das Lyophilisat weist recht hohe Enzymaktivitäten (endo-Cellulase, Xylanase, ß-Glucanase) auf, die im Bereich von kommerziellen Produkten liegen (
- Tabelle 18).

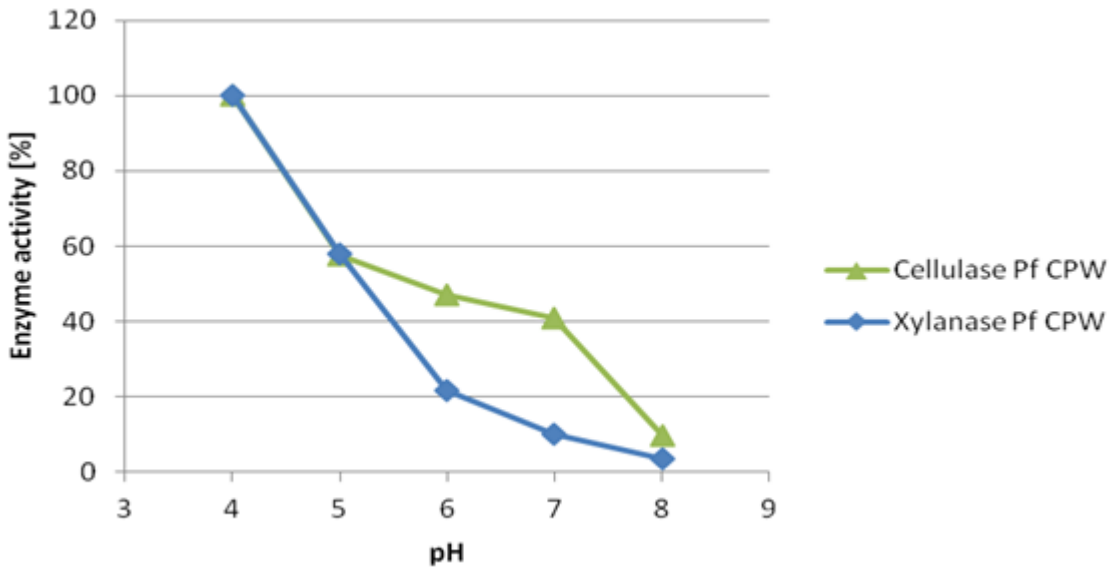


Abbildung 35: Enzymaktivitäten von *P. funiculosum* fermentiert auf CPW in Abhängigkeit vom pH-Wert

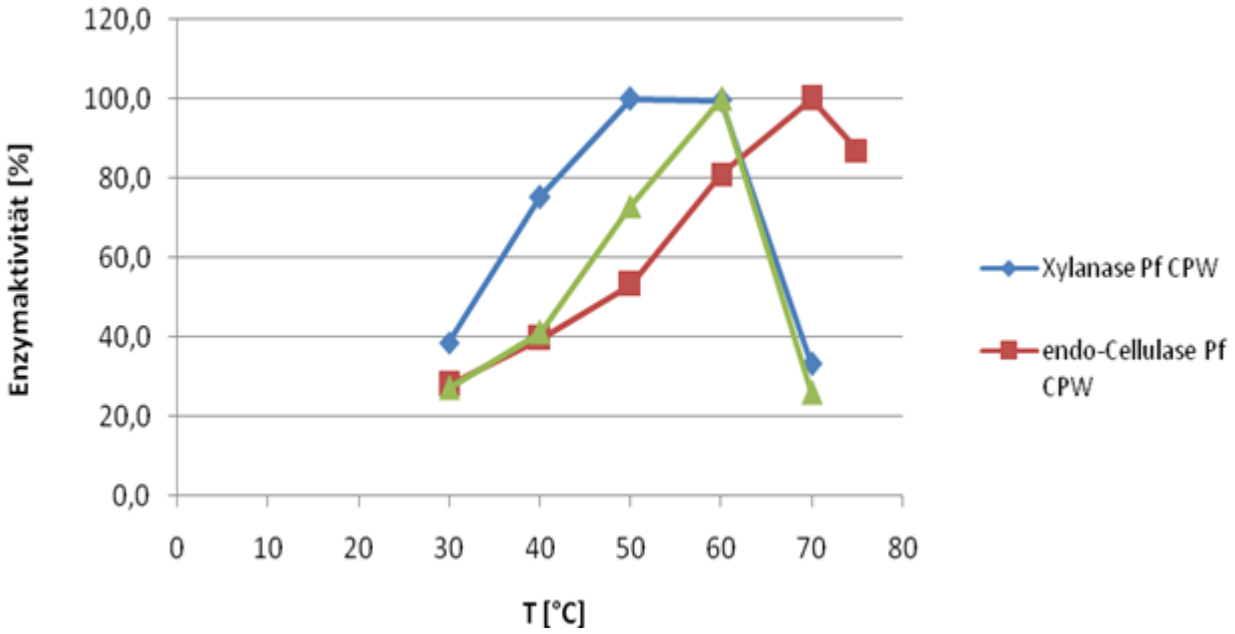


Abbildung 36: Enzymaktivitäten von *P. funiculosum* fermentiert auf CPW in Abhängigkeit von der Temperatur

Tabelle 18: Enzymspektrum von *P. funiculosum* fermentiert auf CPW

Enzymaktivität	[U/ml]
exo-Cellulase	42,3
endo-Cellulase	12.290
ß-Glucosidase	32,8
Xylanase	2.710
endo-Pektinase	123
ß-1,3(4)-Glucanase	2.940
ß-1,3-Glucanase	1.850
Ferulasäureesterase	0

MO Screening für die IA Produktion mit Glycerin als Substrat (TI)

Entwicklung einer Screeningmethode mit Schnelltest auf Itaconsäureproduktion

Für ein vereinfachtes Screening nach Itaconsäurebildnern aus Umweltproben auf Glucose wurde eine Screeningmethode mit einem hohen Probendurchsatz und einem Schnelltest auf Itaconsäure entwickelt. Zur Kultivierung der Mikroorganismen wurde das Duetzsystem (Adolf Kühner AG, Schweiz) verwendet. Mit dieser Vorrichtung können vier 96er Deepwell-Platten parallel kultiviert werden (Duetz et al. 2000). Die gesammelten Umweltproben (Bodenproben, Pflanzenmaterial, Obst- und Gemüseproben) wurden in einer 0,9 % NaCl–Lösung gelöst, auf Standard Nähragar 1, sowie Kartoffel-Dextrose-Agar Platten ausgestrichen und bei 30 °C für drei Tage inkubiert. Die morphologisch unterschiedlichen Einzelkolonien auf den Nährböden wurden in die Deepwell-Platten überführt und in 500 µL T1, T2 oder T3-Medium (Tabelle 19) mit Glucose als Kohlenstoffquelle bei 30 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator für drei Tage kultiviert. Die Deepwell-Platten wurden zentrifugiert und der Überstand für den Schnelltest verwendet.

Tabelle 19: Zusammensetzung der im Screening verwendeten Nährmedien

	T1*	T2	T3
Glucose [g/L]	100	100	100
NH_4Cl [g/L]	1,6	20	2,5
KH_2PO_4 [g/L]	0,5	2	0,1
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ [g/L]	0,2	1	0,5
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ [mg/L]	10	3,5	4
Hefeextrakt [g/L]	1	0,1	2,5
$CaCO_3$ [g/L]	30	30	30

* Tabuchi Medium (Guevarra and Tabuchi 1990)

Für die Detektion der Itaconsäure wurde ein Schnelltest entwickelt, der auf der Entfärbung einer Kaliumpermanganat-Lösung basiert (Dickman 1952). Hierzu wurde 125 µL Probe mit 125 µL Wasser verdünnt, mit 30 µL Meta-Phosphorsäure versetzt und auf Eis abgekühlt. 100 µL einer 10 mM Kaliumpermangant-Lösung wurden hinzugefügt. Aufgrund der Oxidation der Doppelbildung durch das Permanganat entfärbten sich nur Proben, die Itacon- bzw. Fumarsäure enthielten. Bereits geringe Konzentrationen von 0,6 g/L IS zeigten eine Entfärbung. Weitere organische Säuren wie Citronensäure, Äpfelsäure, Milchsäure oder Bernsteinsäure veränderten die Färbung nicht (Abbildung 37) Kulturüberstände, die sich entfärbten, wurden anschließend per HPLC vermessen, um eine Itaconsäureproduktion zu bestätigen. Mit der entwickelten Methode konnten unterschiedlichste Mikroorganismen aus Umweltproben mit bekannten Itaconsäurebildnern (positiv Kontrolle *U. maydis,*

Tabelle 20) parallel auf die Itaconsäureproduktion getestet werden. Der Schnelltest mit Kaliumpermanganat zeigte mit geringem Zeit- und Arbeitsaufwand, welcher Organismus in der Lage ist ungesättigte Verbindungen wie z.B. die Itaconsäure zu produzieren, und reduzierte so die anschließende Probenanzahl, die mittels HPLC genauer analysiert werden musste.

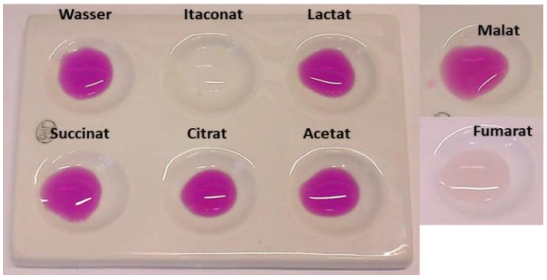
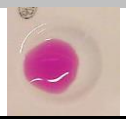
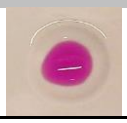
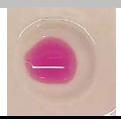
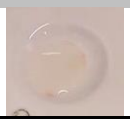


Abbildung 37 Schnelltest mit Kaliumpermanganat für verschiedene organische Säuren

Tabelle 20 Schnelltest mit Kaliumpermanganat angewendet auf eine Kultivierung mit *U. maydis*

Zeit [h]	0	7,5	24	32
c(IA) [g/L]	0	0	0,2	1,8
Schnelltest				

Screening von Umweltproben

Im Screening wurden 30 Umweltproben, sowie drei bekannte IA-Bildner (positiv Kontrolle, *P. antarctica*, *U. maydis* und *A. terreus*) und ein bekannter Nichtproduzent (negativ Kontrolle – *C. bentonensis*) auf Tabuchi-Medium (Tabelle 19) mit unterschiedlichen Zusammensetzungen getestet. Trotz unterschiedlich starkem Wachstum der verschiedenen Umweltproben auf den drei Medien, konnte mittels Schnelltest keine ungesättigte Verbindung in den verschiedenen Kultivierungen nachgewiesen werden (Tabelle 21). Jedoch zeigten zwei der drei positiven Kontrollen eine Entfärbung und eine geringe Itaconsäureproduktion nach 3 Tagen. Da das Screening von Umweltproben nicht erfolgreich war, wurden mittels phylogenetischen Stammbaums Stämme ausgewählt, die mit dem bereits bekannten Itaconsäureproduzent *Ustilago maydis* einen nahen Verwandtschaftsgrad aufwiesen.

Tabelle 21 Probenübersicht des Screnings mit bekannten positiv Kontrollen (*P. antartica, U. maydis, A. terreus*), negativ Kontrolle (*C. bentonensis*) und Umweltproben; ++ gutes Wachstum; + Wachstum erkennbar; - kein Wachstum; + IA-Produktion, - keine IA-Produktion

Probe	Wachstum			IA	Probe	Wachstum			IA
	T1	T2	T3			T1	T2	T3	
P. antarctica	+	-	++	-	Paprika	+	-	-	-
C. bentonensis	-	-	-	-	Apfel I	+	-	-	-
U. maydis	+	-	+	+	Apfel II	+	-	-	-
A. terreus	++	+	++	+	Apfel III	++	-	+	-
Holz I	+	+	+	-	Apfel IV	++	-	++	-
Holz II	++	+	+	-	Steinobst I	+	-	-	-
Erdprobe I	-	+	+	-	Steinobst II	+	-	+	-
Erdprobe II	+	++	+	-	Steinobst III	+	-	+	-
Maiskolben	-	-	-	-	Tomate I	+	-	++	-
Ast	+	-	++	-	Tomate II	+	-	-	-
Baumrinde I	++	-	+	-	Tomate III	+	-	-	-
Baumrinde II	+	-	-	-	Traube	+	-	+	-
Baumrinde III	++	-	+	-	Quitte I	+	++	++	-
Baumrinde IV	-	-	+	-	Quitte II	+	-	++	-
Kirschpflaume	++	++	++	-	Mandarine	+	-	+	-
Zuckerrübe	-	+	+	-	Milchorangenfrucht I	+	-	+	-
Zierapfel	+	-	++	-	Milchorgangenfrucht II	+	-	+	-

Screening von Mikroorganismen der Abteilung Basidomycota

Es wurden insgesamt 42 Stämme der Gattung *Candida, Pseudozyma, Sporisorium, Tilletiopsis und Ustilago* für das Screening auf Glucose zur Itaconsäureproduktion ausgewählt. Die Stämme wurden über die DSMZ (Braunschweig, Deutschland), NBRC (Tokyo, Japan), NCL (Maharashtra, Indien) und NRRL (Peoria, USA) bezogen. Zusätzlich wurden Stämme vom Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik (Braunschweig, Deutschland), zur Verfügung gestellt. Dazu wurden die Hefestämme in 100 mL Vorkulturmedium (YEPS) in einem 250 mL Schüttelkolben mit Schikanen für einen Tag bei 30 °C und 120 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Das Screening wurde anschließend in Reagenzgläsern in Tabuchi-Medium durchgeführt (4 Tage, 30 °C, 120 rpm, Neigungswinkel 30°, 2 mL Füllvolumen). Dieses System zeigte einen deutlich erhöhten Sauerstoffeintrag im Gegensatz zu den Deep-Well-Platten des Duetzssytems. Von den 42 getesteten Hefen waren unter den gewählten Bedingungen nur sechs Stämme in der Lage Itaconsäure zu produzieren (Abbildung 38). Ein Abgleich mit der Literatur zeigte, dass alle sechs Stämme als Itaconsäurebildner schon beschrieben sind (Guevarra and Tabuchi 1990). Einhergehend mit der Itaconsäureproduktion bildeten alle Stämme weiteren organischen Säuren wie Malat, Succinat oder Fumarat. Zusätzlich konnte bei den meisten Organismen eine intrazelluläre Lipidproduktion festgestellt werde. Im Vergleich zu den anderen Stämmen traten bei der Kultivierung des Stammes *U. rabenhorstiana* NBRC 8995 nur sehr geringe Konzentrationen weiterer organischer Säuren von etwa 3 % auf. Die höchste

Itaconsäurekonzentration mit 30 g/L zeigte *U. maydis* DSM 17144, dessen Itaconsäureproduktion auf Glucose schon ausführlich in der Literatur beschrieben ist (Klement et al. 2012, Maassen et al. 2014). Aus diesen Gründen wurde entschieden, mit diesen beiden Hefen *U. rabenhorstiana* NBRC 8995 und *U. maydis* DSM 17144 weitere Versuche zusätzlich zum bekannten IA-Produzenten *A. terreus* DSM 23081 durchzuführen.

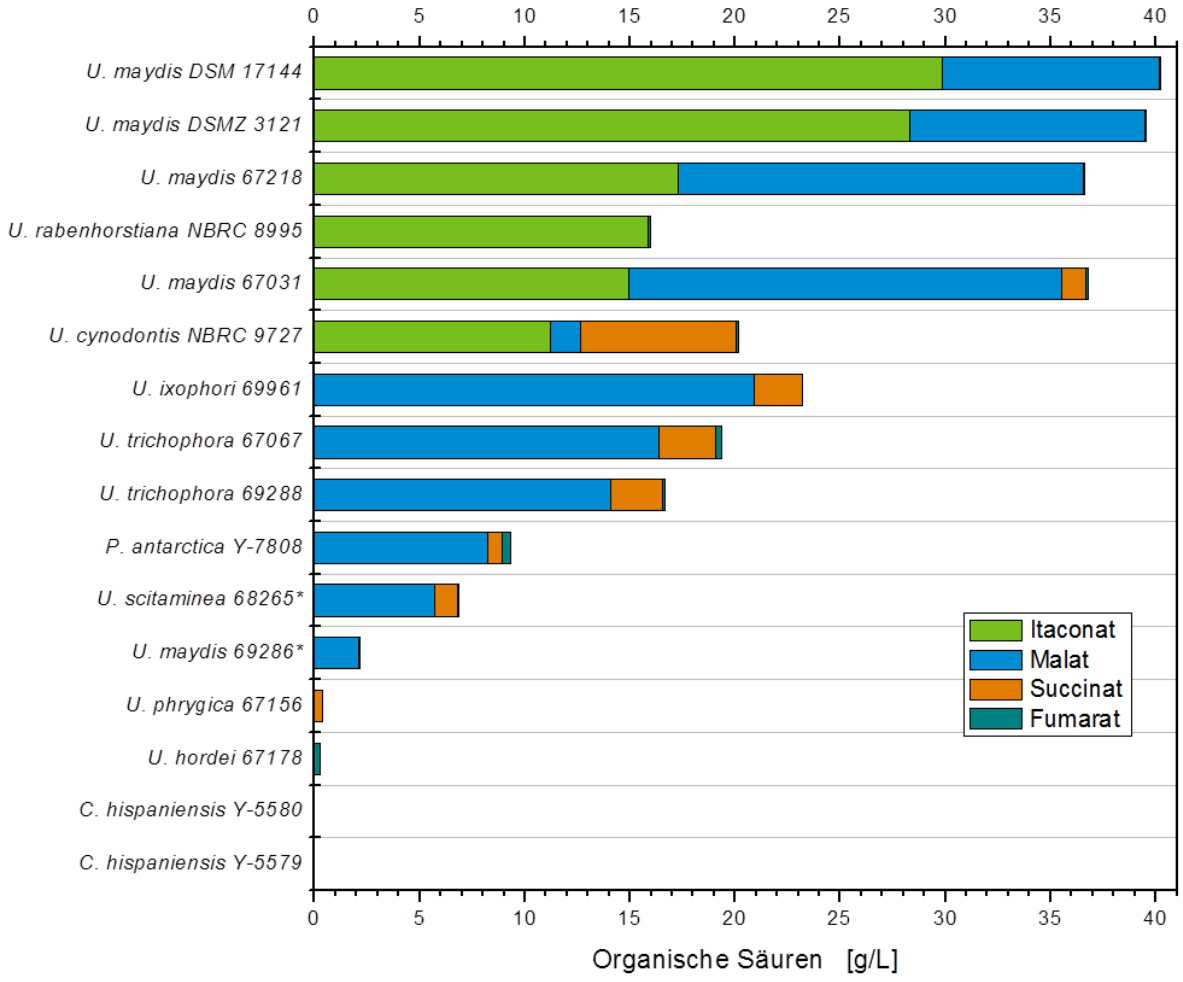


Abbildung 38 IA-Produktion und weitere organische Säuren mit *Basidomycota* in Reagenzgläsern bei 30 °C, 120 rpm nach 4 Tagen

MO Screening für die IA Produktion mit Glycerin als Substrat

Die ausgewählten Hefestämme wurden in 50 mL YEPS-Medium in einem 250 mL Schüttelkolben mit Schikanen für einen Tag bei 30 °C und 120 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Anschließend wurde das Produktionsmedium (Tabuchi-Medium mit 100 g/L Pharmaglycerin) mit 1 % der Vorkulturbrühe angeimpft. Die Kultivierung im Produktionsmedium wurde in Reagenzgläsern durchgeführt (vier Tage, 30 °C, 120 rpm, Neigungswinkel 30°, 2 mL Füllvolumen). Für die Tests mit dem filamentösen Pilz *A. terreus* wurde 250 mL Schüttelkolben genutzt (Medium Kuenz et al (2012) mit 100 g/L Pharmaglycerin, 4 Tage, 33 °C, 120 rpm, 100 mL Füllvolumen).

Die verwendeten Stämme wuchsen und produzierten Itaconsäure im Referenzmedium mit Glucose und Pharmaglycerin. Das beste Ergebnis zeigte *A. terreus* mit einer Ausbeute von 0,53 g IA/g Glycerin nach 4 Tagen, die Hefen produzierten nur sehr mäßig IA auf Pharmaglycerin. Die Ausbeuten aller getesteten Hefestämme lagen bei ≤ 0,03 g IA/g Glycerin (Tabelle 22). Somit sind alle getesteten Stämme alle in der

Lage, Glycerin als Substrat zur Itaconsäureproduktion zu nutzen. Insgesamt zeigte *A. terreus* mit 14,7 g/L IA mit Abstand das höchste Potenzial. Um jedoch Rohglycerine als Kohlenstoffquelle mit diesem Organismus nutzen zu können, müssten diese vermutlich zuvor aufgereinigt werden. Eventuell enthaltene Verunreinigungen können das Wachstums- und Produktionsverhalten von *A. terreus* stark beeinflussen (Kuenz 2008).

Tabelle 22 Vergleich der Itaconsäureproduktion von *Ustilago* sp. (Reagenzgläser bei 30 °C und 120 rpm) und *A. terreus* (Schüttelkolben bei 30 °C und 120 rpm) nach 4 Tagen, Medium nach Guevarra and Tabuchi (1990) und Kuenz, Gallenmuller et al. (2012) mit 100 g/L Glycerin

Organismus	Ausbeute [Mol%]	Ausbeute [g IA/g Substrat]	c(IA) [g/L]
***A. terreus* DSM 23081**	38	0,53	14,7
***Ustilago maydis* DSM 17144**	1,7	0,02	1,1
***Ustilago rabenhorstiana* NBRC 8995**	2	0,03	1,7

MO Screening für die IA Produktion mit Hydrolysaten ligninarmer Reststoffe als Substrat (TI)

Zusätzlich zu dem bekannten IA-Produzenten *A. terreus* DSM 23081 wurden die weiteren Untersuchungen zur IA Produktion mit Hydrolysaten ligninarmer Reststoffe mit zwei Hefen, *U. rabenhorstiana* NBRC 8995 und *U. maydis* DSM 17144, durchgeführt. Um die potenzielle Produktion von IA der drei gewählten Stämme auf Hydrolysaten ligninarmen Reststoffen vergleichen zu können, wurden vorab die Verwertbarkeit unterschiedlicher Monosaccharide, sowie der Einfluss von Zuckerabbauprodukte aus der Vorbehandlung getestet.

Verwertbarkeit unterschiedlicher Monosaccharide aus ligninarmen Reststoffen

Für die Auswahl des am besten geeigneten Mikroorganismus für die IA-Produktion auf Hydrolysaten ligninarmer Reststoffe, wurde die Verwertbarkeit typischer Monosaccharide aus Reststoffen mit dem filamentösen Pilz und den zwei Hefen getestet. Dabei wurden im Vergleich zu Glucose, Mannose, Fructose, Xylose, Arabinose, Galactose und Rhamnose als Kohlenstoffquelle mit einer Konzentration von jeweils 100 g/L eingesetzt. Die Kultivierung von *A. terreus* erfolgte bei 33 °C und 950 rpm in 96-well Mikrotiterplatten mit 100 µL Medium (Kuenz, Gallenmuller et al. 2012). In Reagenzgläsern mit 2 mL Medium (Guevarra and Tabuchi 1990) wurden die Kultivierungen der beiden Hefen bei 30 °C und 120 rpm bei einem Neigungswinkel von 30° durchgeführt. Die Kultivierungen wurden nach 4 Tagen beendet.

A. terreus und *U. rabenhorstiana* waren im Vergleich zu *U. maydis* in der Lage, alle Zucker außer Galactose und Rhamnose zur IA-Bildung zu nutzen (Tabelle 23). *U. maydis* zeigte auf den beiden Zuckern Xylose und Arabinose nur Wachstum und konnte diese zur Itaconsäurebildung nicht nutzen. *A. terreus* zeigte nach 4 Tagen Kultivierung eine starke Abhängigkeit der IA-Produktion von der jeweiligen Kohlenstoffquelle. Glucose und Mannose konnten ähnlich gut zur IA-Bildung genutzt werden, darauf folgte Fructose. Geringere IA-Konzentrationen wurden auf Xylose und Arabinose gebildet. Ein ähnliches Verhalten, wie *A. terreus* wies *U. rabenhorstiana* in der Verwertbarkeit der Monosaccharide auf. Jedoch zeigten sich für diese beiden Mikroorganismen deutliche Unterschiede in der erzielten IA-Konzentration, beispielsweise auf Glucose. Mit

A. terreus konnte nach 4 Tagen 40 g/L IA, mit *U. rabenhorstiana* etwa nur die Hälfte der Konzentration, mit 19 g/L IA, gebildet werden.

Tabelle 23 Vergleich der Itaconsäurebildung mit unterschiedlichen Zuckern (4 Tage, *Ustilago sp.* Reagenzgläser, Medium nach Guevarra and Tabuchi (1990) mit 100 g/L Zucker, 30 °C und 120 rpm) und *A. terreus* (Mikrotiterplatte, Medium nach Kuenz, Gallenmuller et al. (2012) mit 100 g/L Zucker, 33 °C und 950 rpm)

Zucker	*A. terreus*	*U. maydis*	*U. rabenhorstiana*
Glucose	+++	++	++
Mannose	+++	+	+
Fructose	+++	+	++
Xylose	++	o	+
Arabinose	++	o	+
Galactose	o	o	o
Rhamnose	o	o	o

o - keine IA-Bildung
+ - <10 g/L IA
++ - 10-30 g/L IA
+++ - > 30 g/L IA

Einflüsse unterschiedlicher Zuckerabbauprodukten aus Hydrolysaten ligninarmer Reststoffe

Neben Monosacchariden können in Hydrolysaten auch Zuckerabbauprodukte enthalten sein, die während der Vorbehandlung des Reststoffes entstehen können. Diese Zuckerabbauprodukte sind als Hemmstoffe und Inhibitoren in der Literatur bekannt (Jonsson et al. 2013, van der Pol et al. 2014). Da IA-bildende Mikroorganismen wie *A .terreus* als sehr sensitiv auf unterschiedlichste Bestandteile im Medium beschrieben werden, wurde der Einfluss von typischen Hemmstoffen und Konzentrationen (Jurchescu 2014) auf die IA-Produktion alle drei IA-bildenden Mikroorganismen untersucht. Dazu wurden die schwachen Säuren Ameisensäure und Essigsäure sowie die Furanderivate HMF und Furfural in Konzentrationsbereich von 0 g/L bis 2 g/L einzeln dem Produktionsmedium hinzugefügt. Die Versuche mit *A. terreus* wurden in Mikrotiterplatten mit 100 µL Medium (Kuenz, Gallenmuller et al. 2012) mit 100 g/L Glucose, bei 33 °C und 950 rpm durchgeführt. Beide *Ustilago* Stämme wurden in Reagenzgläsern mit 2 mL Tabuchi-Medium (Guevarra and Tabuchi 1990) bei 30 °C, 120 rpm und einem Neigungswinkel von 30° kultiviert. Die Kultivierung wurde nach 4 Tagen beendet.

Der Einfluss der einzelnen Hemmstoffe ist in Abbildung 39 für die Säuren und in Abbildung 40 für die Furanderivate dargestellt. Bereits ein Zusatz von 0,5 g/L Ameisensäure oder 1 g/L Essigsäure inhibierte das Auskeimen von *A. terreus*. Im Gegensatz dazu konnte bei der höchsten Konzentration von 2 g/L Ameisensäure mit *U. maydis*, im Vergleich zum Medium ohne Hemmstoff, noch etwa die Hälfte der IA-Konzentrationen erzielt werden. Die IA-Bildung von *U. rabenhorstiana*, wurde durch die Ameisensäure sogar nur um etwa 20 % gehemmt. Für den Einfluss von Essigsäure zeigte sich ein ähnliches Bild. *U. rabenhorstiana* reagierte unempfindlicher auf den Einfluss der Säure als *U. maydis*. Die IA-Konzentrationen waren bei dem höchsten Zusatz von 2 g/L Ameisensäure um 20 % mit *U. rabenhorstiana* und um 40 % mit *U. maydis* gemindert. Die Furanderivate HMF und Furfural beeinflussten die Fermentation beider Hefen deutlich stärker. *U. rabenhorstiana* wuchs bei einer Konzentration von 0,1 g/L HMF oder 0,5 g/L Furfural

nicht mehr, ebenso *U. maydis*. Auch bei *A. terreus* wurde, im Vergleich zur Referenz ohne Zusätze von Hemmstoffen, durch den Zusatz von 0,1 g/L HMF die IA-Produktion bereits um 70 % reduziert. Insgesamt betrachtet, hatten somit die schwachen Säuren den größten Einfluss auf die IA-Produktion mit *A. terreus* und die Furanderivate auf die Kultivierung der beiden Hefen. Daher muss beim Einsatz von Hydrolysaten berücksichtigt werden, dass unabhängig vom Mikroorganismus möglichst Hydrolysate mit sehr geringen Hemmstoffkonzentrationen verwendet werden.

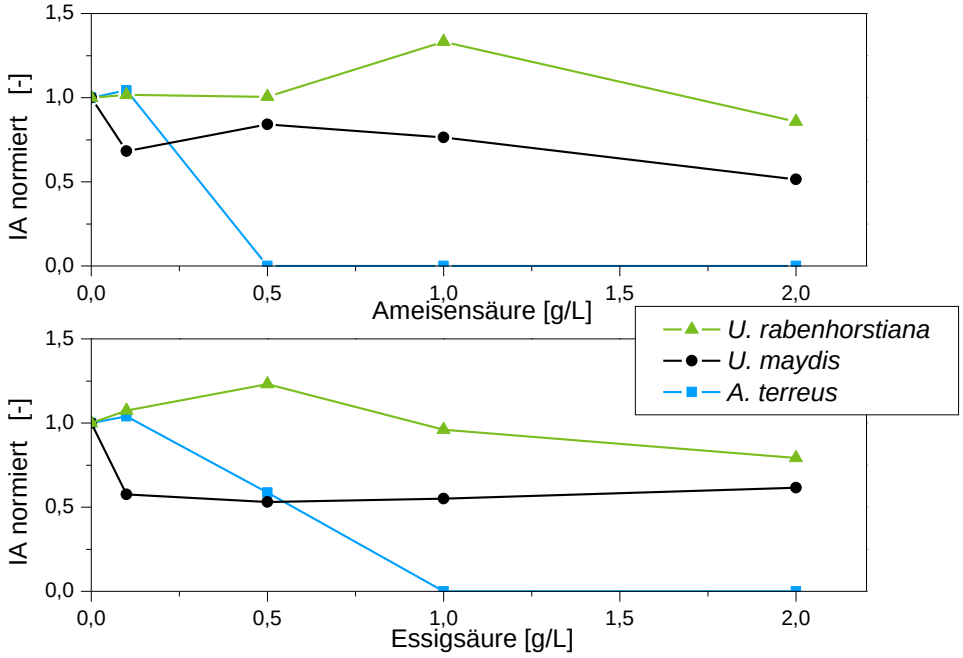


Abbildung 39 Einflüsse von schwachen Säuren aus Hydrolysaten auf die IA-Produktion mit *A. terreus* (4 Tage, Mikrotiterplatte, 33 °C, 950 rpm, 100 µL Medium) sowie *U. rabenhorstiana* und *U. maydis* (4 Tage, Reagenzgläser, 30 °C, 120 rpm, 30° Neigungswinkel, 2 mL Medium)

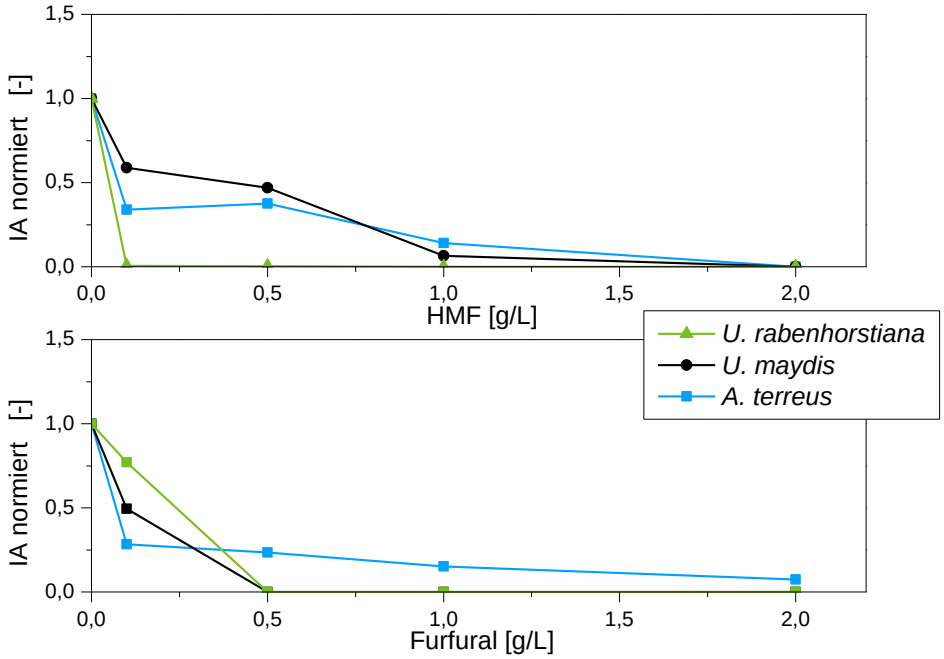


Abbildung 40 Einflüsse von Furanderivaten aus Hydrolysaten auf die IA-Produktion mit *A. terreus* (4 Tage, Mikrotiterplatte, 33 °C, 950 rpm, 100 µL Medium) sowie *U. rabenhorstiana* und *U. maydis* (4 Tage, Reagenzgläser, 30 °C, 120 rpm, 30° Neigungswinkel, 2 mL Medium)

Synthetische Hydrolysate

Um Aussagen über theoretische Werte der IA-Produktion auf Hydrolysaten von Organgenschalen und Kaff mit den einzelnen Mikroorganismen treffen zu können, wurden synthetische Hydrolysate als Kohlenstoffquelle eingesetzt. Dazu wurden die in den Reststoffen enthaltenen Monosaccharide in den Verhältnissen miteinander gemischt, die mittels NREL-Aufschluss ermittelt wurden. Die Kultivierung von *A. terreus* wurde in 250 mL Schüttelkolben mit Schikanen und 100 mL Medium (Kuenz, Gallenmuller et al. 2012) bei 120 rpm und 33 °C durchgeführt. Die Kultivierung der beiden Hefen erfolgte ebenfalls in 250 mL Kolben mit Schikanen und 50 mL Tabuchi-Medium bei 30 °C und 120 rpm. Das Medium enthielt jeweils 100 g/L Gesamtzucker. Das synthetische Orangenschalenhydrolysat enthielt 36 % Glucose, 29 % Arabinose, 22 % Galactose, 7 % Xylose und 6 % Mannose. Das synthetische Kaffhydrolysat setzte sich zusammen aus 40 % Glucose, 32 % Xylose, 21 % Arabinose, 5 % Galactose und 2 % Rhamnose. Die Kultivierungen mit synthetischem Kaff- und Orangenhydrolysat wurden mit einer Kultivierung auf Glucose (100 g/L) verglichen. Zudem sind zusammenfassend erzielte Endtiter, Produktivität und Ausbeuten aller drei Itaconsäurebildner in Tabelle 24 vergleichend dargestellt. Die höchsten IA-Konzentrationen, Produktivitäten und Ausbeuten wurden auf allen drei Kohlenstoffquellen mit *A. terreus* erzielt. Der Nebenproduktanteil lag bei etwa 5 %, wobei Ketoglutarsäure sowie Äpfelsäure die größten Anteile ausmachten.

Tabelle 24 Vergleich von Endtiter, Produktivität und Ausbeute der drei gewählten IA-Produzenten auf Glucose, synth. Orangenschalenhydrolysat und synth. Kaffhydrolysat

Endtiter [g/L]	***A. terreus***	***U. maydis***	***U. rabenhorstiana***
Glucose	58,9	23,5	19,5
Synth. Orangenschalenhydrolysat	32,4	7,7	23,8
Synth. Kaffhydrolysat	51,2	6,7	18,2

Produktivität [g/L/h]	***A. terreus***	***U. maydis***	***U. rabenhorstiana***
Glucose	0,28	0,12	0,08
Synth. Orangenschalenhydrolysat	0,13	0,05	0,1
Synth. Kaffhydrolysat	0,24	0,04	0,08

Ausbeute [g/g]	***A. terreus***	***U. maydis***	***U. rabenhorstiana***
Glucose	0,59	0,25	0,17
Synth. Orangenschalenhydrolysat	0,33	0,08	0,23
Synth. Kaffhydrolysat	0,55	0,07	0,18

Im Vergleich dazu zeigten beide Hefen deutlich niedrigere Endtiter und Ausbeuten. Dies ist zurückzuführen auf die Einlagerung von intrazellulären Lipiden. Darüber hinaus produzierte *U. maydis* in größeren Mengen

weiter organischer Säuren wie Äpfelsäure, Ketoglutarsäure, Bernsteinsäure und Spuren von Fumarsäure. Dabei lag die Nebenproduktbildung organischer Säuren auf Glucose bei etwa 35 %. Auf den alternativen Substraten wurde deutlich mehr Äpfelsäure als Itaconsäure gebildet und somit lag der Anteil der organischen Säuren als Nebenprodukte bei etwa 65 %. Dagegen bildete *U. rabenhorstiana* deutlich weniger organische Säuren als Nebenprodukt. Auf Glucose lag der Nebenproduktanteil bei etwa 4 %. Auf den alternativen Substraten war dieser leicht erhöht mit 6,3 % für synthetisches Kaffhydrolysat und 10 % auf synthetischem Orangenschalenhydrolysat.

Des Weiteren stellte sich heraus, dass Kaffhydrolysat verglichen mit OPW-Hydrolysat deutlich besser von *A. terreus* genutzt werden konnte und eine potentiell Alternative zu reinen Zuckern für die Kultivierung darstellen könnte. Insgesamt wurde eine Endkonzentration erreicht, die 87 % der Konzentration auf Glucose entsprach. Im Vergleich der beiden Hefen zeigte sich, dass *U. rabenhorstiana* potenziell eher geeignet ist Reststoffe als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Die erzielte Itaconsäurekonzentration mit beiden synthetischen Hydrolysaten lag im Bereich der Referenzkultivierung mit Glucose.

Da *A. terreus* im Vergleich zu den Hefen nicht deutlich unempfindlicher auf Zuckerabbauprodukte reagierte und zudem die besten Ergebnisse mit synthetischem Orangenschalen- und Kaffhydrolysat erzielte, sind die Kultivierungen mit den synthetischen Hydrolysen im Folgenden ausführlicher dargestellt.

***A. terreus* - Synthetisches Organgenschalenhydrolysat**

Bereits am ersten Kultivierungstag war eine unterschiedliche Morphologie des Pilzes sichtbar. So bildeten sich im Referenzmedium mit Glucose dichte feste Pellets, im synthetischem OPW-Hydrolysat weit verzweigte Hyphen. Der Inhalt des Kolbens war zudem rötlich gefärbt, die Referenz zeigte eine typische gelbliche Färbung. *A. terreus* nutzte anfänglich Glucose, danach Xylose und Mannose zur Produktion von IA und verhielt sich ähnlich der Referenz auf reiner Glucose (Abbildung 41). Ab Tag 4 verlangsamte sich die Produktivität von IA, Galactose und Arabinose wurde abgebaut, jedoch wurde nur noch ein sehr geringer Anteil von 6 g/L IA mit diesen Zuckern gebildet. Insgesamt konnten 32 g/L Itaconsäure mit einer Ausbeute von 0,33 g IA/g Zucker gebildet werden, dies entsprach 54 % der IA Konzentration auf Glucose.

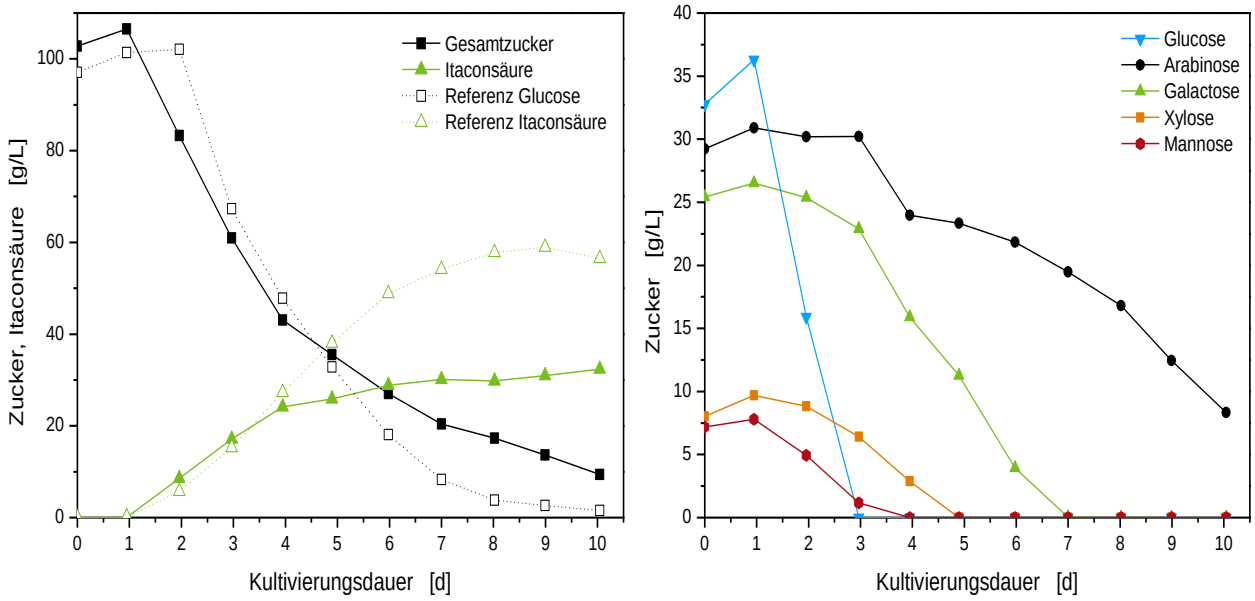


Abbildung 41 Kultivierung von *A. terreus* auf 100 g/L synthetischem OPW-Hydrolysat und Glucose in 250 mL Schüttelkolben mit Schikanen bei 120 rpm und 33°C (links); Verlauf der einzelnen Zuckerkonzentrationen im synthetischem OPW-Hydrolysat (rechts)

A. terreus - Synthetisches Kaffhydrolysat

Im Vergleich zum Orangenschalen-Hydrolysat gab es keine Unterschiede in der Morphologie. *A. terreus* zeigte feste regelmäßige Pellets, wie in der Referenz mit Glucose. Glucose und Xylose wurden am schnellsten zu IA vom Mikroorganismus verstoffwechselt (Abbildung 42), so wie beim synthetischen Orangenschalen- Hydrolysat. Verglichen mit der Referenz stieg die maximale Produktivität sogar von 0,58 g/L/h auf 0,67 g/L/h IA an. Galactose und Arabinose wurden nur mäßig zur IA-Bildung genutzt, Rhamnose wurde gar nicht aufgenommen. Insgesamt wurden 51 g/L Itaconsäure gebildet mit einer Ausbeute von 0,55 g IA/g Zucker. Verglichen mit der IA-Endkonzentration auf Glucose von 59 g/L, konnten auf synthetischem Kaffhydrolysat 86 % der IA-Endkonzentration erreicht werden. Deutlich wird, dass *A. terreus* in der Lage ist, die unterschiedlichen Zucker zur IA-Produktion zu nutzen.

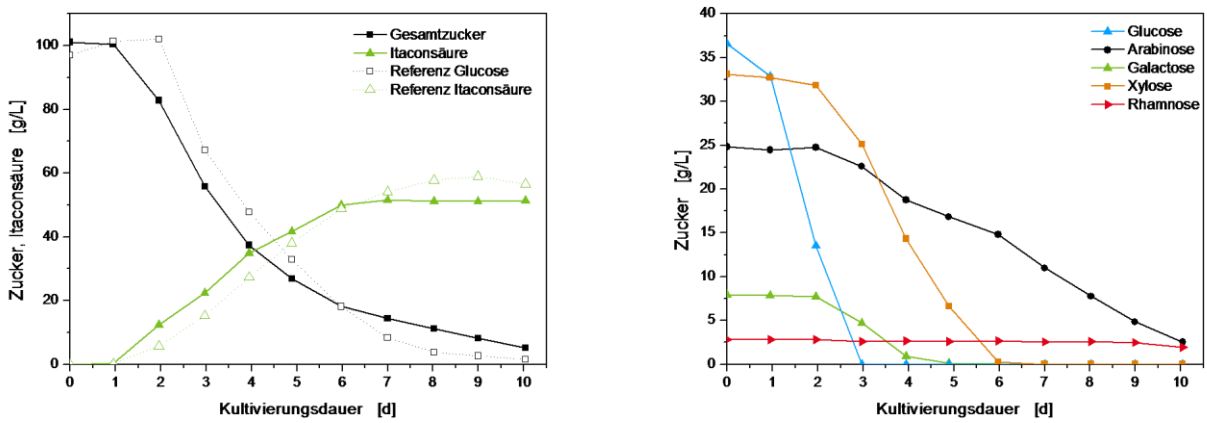


Abbildung 42 Kultivierung von *A. terreus* auf 100 g/L synthetischem Kaff-Hydrolysat und Glucose in 250 mL Schüttelkolben mit Schikanen bei 120 rpm und 33°C (links); Verlauf der einzelnen Zuckerkonzentrationen im synthetischem Kaffhydrolysat (rechts)

WP 3. Fermentation für IA Produktion (TI)

Auswahl und Verbesserung von Biokatalysatoren für die IA Produktion

Die beiden Hefen *U. maydis* und *U. rabenhorstiana* wurden für die Durchführung einer Zufallsmutagenese durch UV-Licht-Bestrahlung ausgewählt. Ziel war es Mutanten zu finden, die trotz sehr hohen Hemmstoffkonzentrationen im Medium wachsen und IA produzieren können. Hierzu wurde ein mobiler UV-Strahler (230 V, 50 Hz, 254 nm, 30 W) genutzt, wobei die Vorbrenndauer 10 Minuten betrug. 2 mL einer Zellsuspension aus einer 2 d alten Vorkultur, gelöst in einer 0,9 % NaCl-Lösung, wurden in einer Petrischale von 5 cm Durchmesser mit einem Abstand von 15,4 cm für 3 min bestrahlt. Dabei wurden die Petrischalen mit der Zellsuspension bei 125 rpm geschüttelt. Die bestrahlte Zellsuspension wurde anschließend auf PDA-Platten ausgestrichen und drei Tage bei 30 °C inkubiert. Die Kolonien wurden gepickt und auf eine PDA-Platte übertragen. Mittels Stempel wurden diese Kolonien auf PDA-Platten mit Hemmstoffkonzentrationen von 0-200 % übertragen und ebenfalls 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Bei den Hemmstoffkonzentrationen wurde

sich an Jurchescu (2014) orientiert: 0,44 g/L Ameisensäure, 1,5 g/L Essigsäure, 0,07 g/L Furfural, 0,09 g/L HMF, 0,17 g/L 4-Hydrozybenzoesäure, 0,02 g/L Syringaldehyd und 0,01 g/L Vanillin wurden als 100 % Hemmstoff eingesetzt.

In Abbildung 43 ist das Ergebnis der durchgeführten Versuche dargestellt. Keine der vermutlich mutierten Kolonien zeigte ein Wachstum auf den Platten mit einer Konzentration von 200 % Hemmstoffen. Jedoch war deutlich, dass die Größe der Kolonien mit zunehmender Hemmstoffkonzentration abnahm. Somit war es nicht möglich durch UV-Mutagenese deutlich robustere Stämme gegenüber typischen Hemmstoffen aus Hydrolysaten zu erzeugen, da auch beide Wildtypstämme Wachstum auf Platten mit einer Hemmstoffkonzentration von 100 % zeigten.

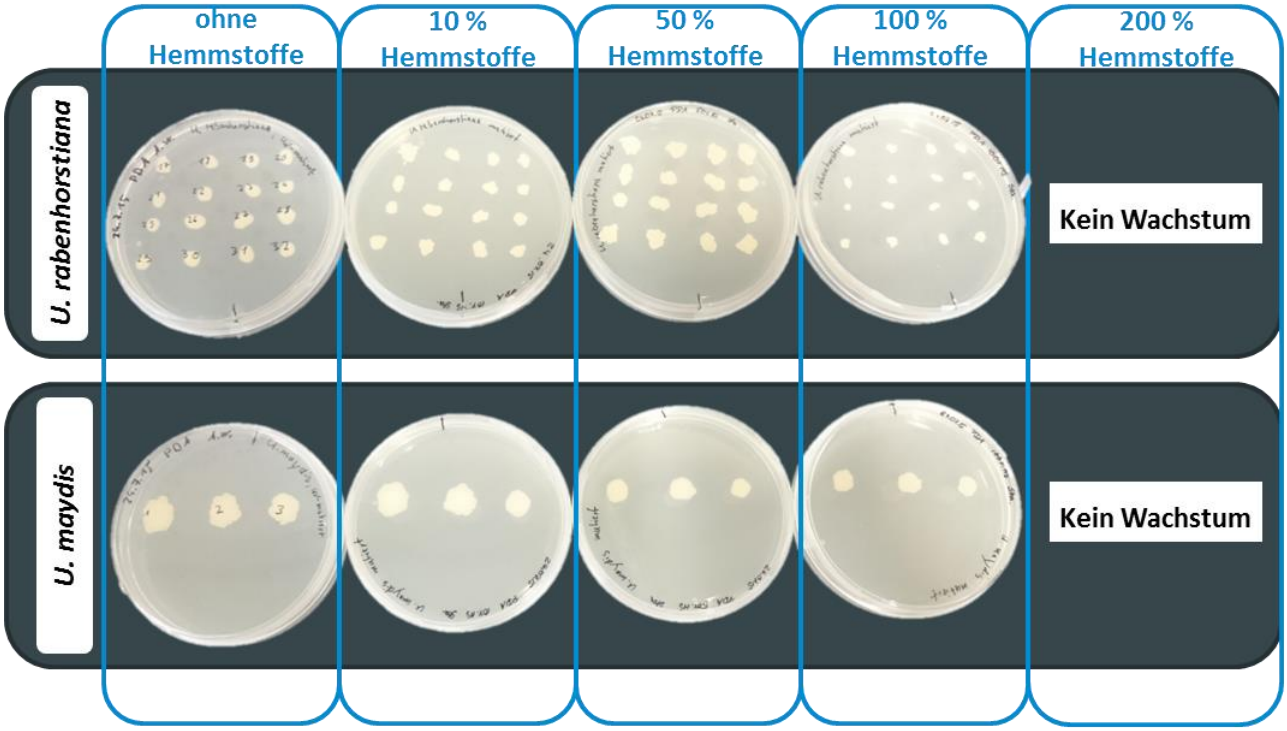


Abbildung 43 Kolonien von *U. rabenhorstiana* und *U. maydis* nach UV-Mutagenese auf PDA-Platten mit zugesetzten Hemmstoffen

Zur Überprüfung der Itaconsäurebildung der mutierten Stämme wurde beispielhaft eine Standardkultivierung mit *U. maydis* auf Tabuchi-Medium im Schüttelkolben bei 30 °C und 120 rpm durchgeführt. Abbildung 44 zeigt den zeitlichen Verlauf der Glucose und Itaconsäurekonzentration des Wildtyps (wt) und vier Mutanten (UV1-1, UV1-2, UV1-3 und UV2-6). Der Glucoseabbau und die Itaconsäurebildung des Wildtyps stimmten mit den von drei potenziellen Mutanten überein. Eine Ausnahme stellt UV2-6 da, nach 4 Tagen stagniert die Aufnahme der Glucose und die Bildung von Itaconsäure stoppte. In der Morphologie gab es deutliche Unterschiede. Die Mutante UV2-6 zeigte ein hyphenartiges Wachstum im Vergleich zum Wildtyp, der als Einzelzellen wuchs.

Insgesamt betrachtet konnte durch die UV-Mutagenese weder Organismen mit einer höheren Toleranz gegenüber Hemmstoffen aus der Vorbehandlung der Biomasse erzeugt werden, noch die Itaconsäurebildung gesteigert werden.

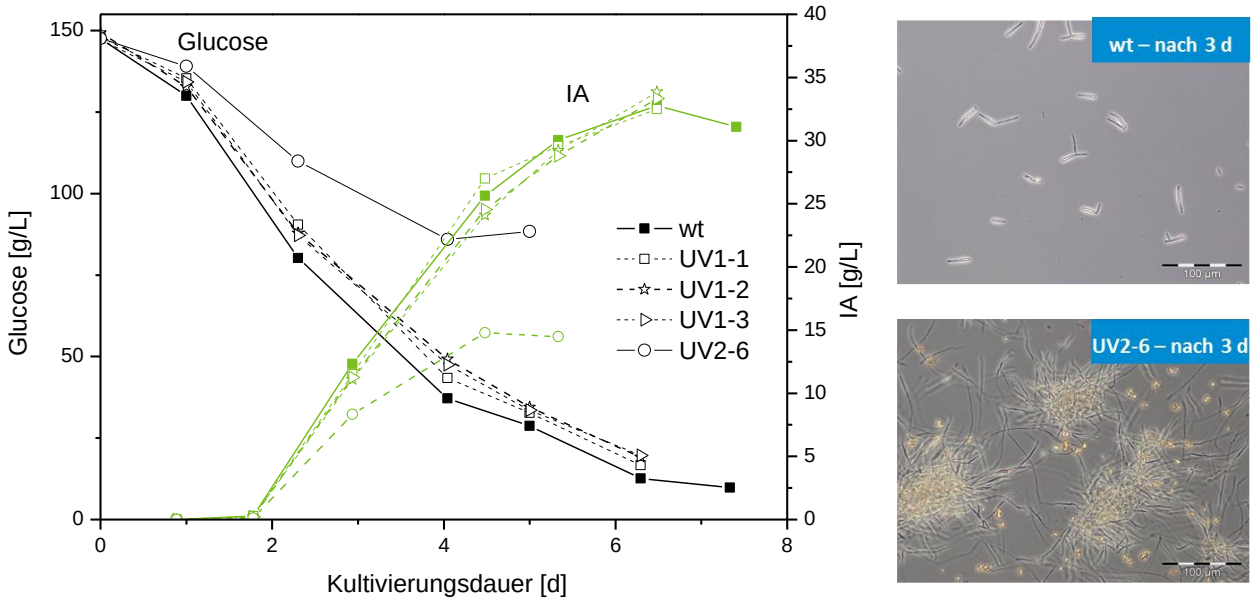


Abbildung 44 links - Kultivierung des Wildtyps (wt) *U. maydis* und potenziellen Mutationen in 250 mL Schüttelkolben mit Schikanen bei 30°C und 120 rpm mit 50 mL Tabuchi-Medium; rechts – Mikroskopaufnahmen bei 40-facher Vergrößerung des Wildtyps und der Mutanten UV2-6 nach drei Tagen Kultivierung

Produktion von IA mit freien und immobilisierten Zellen

Durch eine Immobilisierung sollte die Stabilität der Mikroorganismen und eine erhöhte Produktivität erzielt werden. Jedoch ist eine Immobilisierung von *A. terreus* aufgrund von kurzzeitigen Sauerstofflimitationen nicht vorteilhaft, da hier daraus eine vollständige Beendigung der IA-Bildung resultieren kann (Park et al. 1993, Gyamerah 1995). Aus diesem Grund sollte für die Immobilisierung die beiden Hefenstämme genutzt werden. Jedoch lag die Produktivität und die erreichten Endkonzentrationen von IA mit freien Zellen deutlich unter den Werten von *A. terreus*. Mit dem filamentösen Pilz konnten eine dreimal höhere Endkonzentration und eine vierfach gesteigerte Produktivität mit Vergleichskultivierungen auf Glucose und synthetischen Hydrolysaten erzielt werden. Aus diesen Gründen würde eine Immobilisierung keine deutliche Steigerung der Produktivität der Hefen im Vergleich zu *A. terreus* erzielen und eine Immobilisierung der Hefen wurde nicht durchgeführt.

Simultane Verzuckerung und Fermentation für die IA Produktion

Eine Simultane Verzuckerung und Fermentation (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) wurde mit *A. terreus* und beispielhaft mit der Hefe *U. maydis* unter Verwendung des Enzyms Biogazyme2x (ASA-Spezialenzyme, Wolfenbüttel, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurde Weizenkaff mittels Ultrazentrifugalmühle zerkleinert und in einer 0,25 M NaOH-Lösung 3 d bei Raumtemperatur vorbehandelt. Das anschließend gewaschene und getrocknete Weizenkaff wurde mit 10 % Feststoffanteil als Kohlenstoffquelle dem Medium (Kuenz, Gallenmuller et al. 2012) hinzugefügt und mit 10 FPU Biogazyme 2x versetzt. Diese Versuchsansätze wurden in 250 mL Schüttelkolben mit drei Schikanen bei 120 rpm durchgeführt. *A. terreus* wurde bei 33 °C, einem Start pH-Wert von pH 3,1 und 100 mL Medium kultiviert. Mit 50 mL Füllvolumen, einer Temperatur von 30 °C und einem Start-pH von pH 6 wurde der SSF mit *U. maydis* durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte mit 1 %(v/v) Inoculum im Fall von *U. maydis* und einer Sporensuspension ($1 \cdot 10^6$ Sporen/mL) für *A. terreus*.

U. maydis wuchs bei der Durchführung des SSFs nicht, dagegen konnten mit *A. terreus* nach 4 Tagen 2,3 g/L Itaconsäure produziert werden. Speziell für die Kultivierung mit *A. terreus* zeigte sich, dass bei den anfänglichen Kultivierungsbedingungen eine um 78 % reduzierte Cellulaseaktivität des eingesetzten Enzyms vorlag. Eine weitere Verschlechterung der Bedingung für die Hydrolyse wurde durch ein Absinken des pH-Wertes während der Kultivierung auf unter pH 2 deutlich.

In Abbildung 45 sind die Arbeitsbereiche und die jeweiligen optimalen Bedingungen für die beiden Mikroorganismen *U. maydis* und *A. terreus* und dem Enzym Biogazym2x in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Temperatur dargestellt. Es gab keine Überschneidungen, die einen Kompromiss von Hydrolyse- und Fermentationsbedingungen zuließen, womit die sehr schlechten Ergebnisse bei diesem SSF erklärt werden konnten. Somit erwies sich die gewählten Kombinationen aus Enzym und Mikroorganismus für eine Simultane Verzuckerung und Fermentation zur Bildung von Itaconsäure als nicht zielführend. Der Einsatz eines Enzyms mit einem niedrigeren pH-Optimum der Cellulasen könnte bei einem SSF mit *A. terreus* zu höheren IA-Konzentrationen führen. Auch zeigten getestete kommerziell erwerblichen Enzymmischungen (Cellic CTec 2 (Sigma-Aldrich)) ein pH-Optimum zwischen pH 5-6 und einen deutlichen Aktivitätsverlust bei einem pH-Wert von pH 3,1.

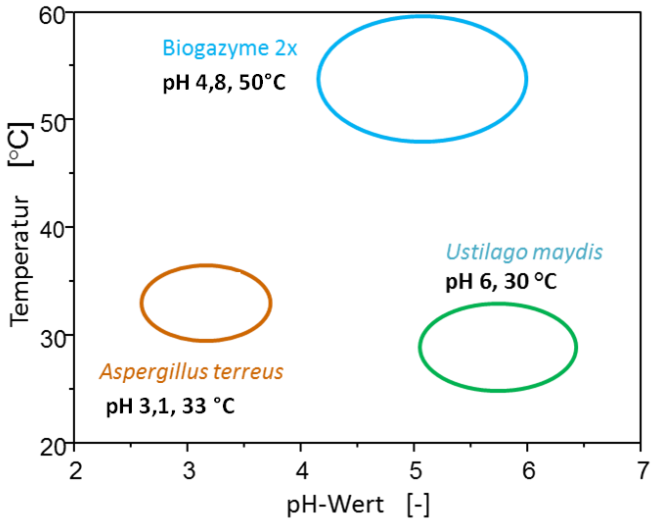


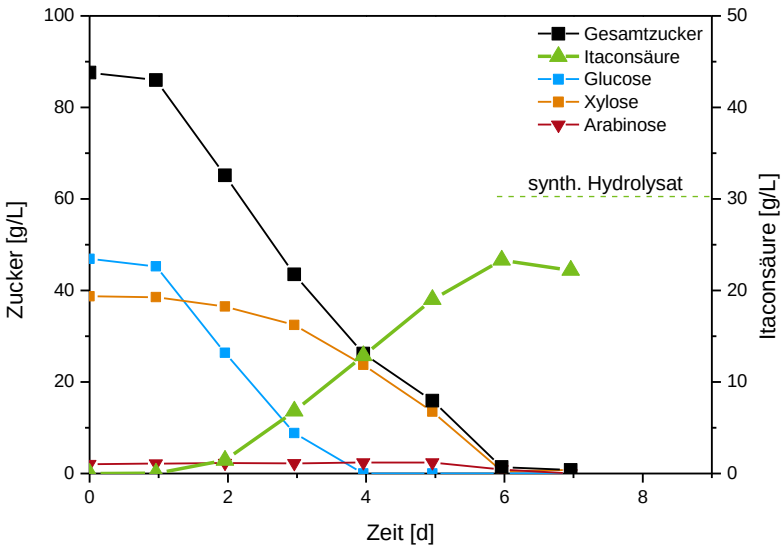
Abbildung 45 Potentieller Arbeitsbereich der Kultivierungs- und Hydrolysebedingungen in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur von *A. terreus* und *U. maydis* und des Enzyms Biogazyme2x mit Angabe zum Optimum.

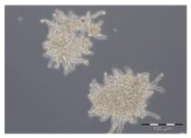
WP 4. Prozessentwicklung und Scale-up (TI)

Auswahl der am besten geeigneten Rohstoff / Stamm / Fermentation Kombination

Die Durchführung eines SSF war nicht erfolgsversprechend aufgrund der fehlenden Übereinstimmung der Hydrolyse- und Fermentationsbedingungen. Aus diesem Grund wurden Hydrolyse und Fermentation getrennt voneinander, unter jeweils optimalen Bedingungen, durchgeführt - eine Separate Verzuckerung und Fermentation (SHF). Hierzu wurde Weizenkaff mittels Ultrazentrifugalmühle zerkleinert und in einer 0,25 M NaOH-Lösung 3 d bei Raumtemperatur vorbehandelt, anschließend gewaschen und getrocknet. Die Waschschritte waren notwendig um entstandenes Acetat aus Vorbehandlung aus dem Weizenkaff zu entfernen. Das vorbehandelte Weizenkaff wurde mit einer Feststoffkonzentration von 10 % mit 10 FPU Biogazyme2x versetzt und unter optimalen Bedingungen bei pH 4,8 und einer Temperatur von 50 °C 5 Tage in Schüttelkolben mit 120 rpm hydrolisiert. Durchgeführte Versuchsreihen zeigten, dass eine Abtrennung des restlichen Kaffs notwendig war. Das so erhaltene Hydrolysat wurde über Verdampfung des Wassers aufkonzentriert und ein, ausfallender gallertartiger, brauner Feststoff abgetrennt. Dieser Feststoff enthielt unteranderem die denaturierten Enzyme, zudem ist es vorstellbar, dass weitere Proteine oder Bestandteile des Lignins abgetrennt wurden.

Das aufkonzentrierte Hydrolysat enthielt 48 g/L Glucose und 39 g/L Xylose, sowie 2 g/L Arabinose. Die jeweiligen Medienbestanteile für die Kultivierung mit *U. maydis*, *U. rabenhorstiana* und *A. terreus* wurden dem Hydrolysat hinzugefügt und der pH-Wert auf pH 6 und pH 3,1 eingestellt. Die Fermentation wurde im Fall von *A. terreus* mit 100 mL des Hydrolysates in 250 mL-Schüttelkolben mit Schikanen bei 120 rpm bei 33 °C durchgeführt. Die Kultivierung von *U. maydis* wurde mit 50 mL Füllvolumen bei 30 °C und mit 1 % (v/v) Inoculum durchgeführt. In Abbildung 46 ist der Kultivierungsverlauf von *A. terreus* dargestellt, dieser zeigte das beste Ergebnis auf Kaffhydrolysat. Aus 85 g/L Zucker konnten nach 6 Tagen 23,3 g/L IA gebildet werden, dies entsprach einer Ausbeute von 0,27 g IA/g Gesamtzucker, wobei alle Zucker verbraucht wurden. Mit *U. maydis* konnten 13,6 g/L IS mit einer deutlich geringeren Produktivität und Ausbeute verglichen mit *A. terreus* erreicht werden. Auf Grund dieses Ergebnisses wurde für die weiteren Arbeiten eine Separate Hydrolyse und Fermentation für die Verwendung von Kaff ausgewählt. Zudem zeigte sich deutlich, dass *A. terreus* gegenüber *U. maydis* deutlich höhere Endtiter, Ausbeuten und Produktivität aufwies. Deswegen wurde für die weiteren Arbeiten auf Kaffhydrolysat und der Optimierung *A. terreus* ausgewählt.




Tag 4 synth. Kaffhydrolysat

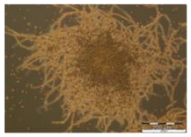

Tag 4 Kaffhydrolysat

Abbildung 46 links - Kultivierung von *A. terreus* mit konzentriertem Kaffhydrolysat bei 33 °C, 120 rpm und einem Start pH-Wert 3,1 im Schüttelkolben mit Schikanen; rechts - Mikroskopaufnahmen von *A.terreus* auf synthetischem Kaffhydrolysat bei 40–facher Vergrößerung und realem Kaffhydrolysat bei 20-facher Vergrößerung

Kinetische Analyse und Prozessmodellierung

Aufgrund der der deutlich besseren Ergebnisse zur IA Produktion, wurde *A. terreus* ausgewählt. Eine Wachstumskinetik des Pilzes kann nicht, wie bei Bakterien oder Hefen, aus der Verdopplung der Zellen mit einer bestimmten Teilungsrate berechnet werden. Zudem sind das Wachstum, die Morphologie und somit auch die Itaconsäureproduktion sehr stark von der Zusammensetzung des Substrates abhängig. Da es aufgrund der schwankenden Zusammensetzungen der verwendeten agrarischen Reststoffe, zu unterschiedlichen Substratzusammensetzungen kommen kann, wurde keine Optimierung gestützt auf einer kinetische Analyse und Prozessmodellierung durchgeführt.

Optimierung der Fermentationsprozesse

Bei der Durchführung der Separaten Hydrolyse und Fermentation mit *A. terreus* zeigte der Pilz eine deutlich verstärkte Biomassebildung. Auch die Form der Pellets wich von der auf Reinsubstrat ab (Abbildung 46). Die Pellets zeigten lange Hyphenanhänge und es kam zur Sporulation. Diese veränderte Morphologie und die Sporenbildung deuteten auf weitere Störstoffe im Hydrolysat hin. Somit bietet die Aufreinigung des Hydrolysats eine Möglichkeit, den Endtiter und Umsatz von IA weiter zu steigern.

Optimierung der Aufreinigung

Für die Aufreinigung des Hydrolysates wurden drei unterschiedliche Aufreinungsweisen getestet und mit dem Ergebnis auf synthetischem Kaffhydrolysat verglichen. Das aufkonzentrierte Hydrolysat (S.30) wurde über eine Säule mit Aktivkohle oder Kationentauscher gereinigt, auch die Kombination aus Aktivkohle und Kationentauscher wurde getestet. Anschließend wurde die Medienbestandteile (Kuenz, Gallenmuller et al. 2012) hinzugefügt und in einer 96-well Mikrotiterplatte bei 33°C und 950 rpm für 3,1 Tage kultiviert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25 Vergleich der Kultivierungen von *A. terreus* mit nicht aufgereinigten und aufgereinigten Hydrolysaten mit einer Kultivierung auf synth. Kaffhydrolysat; *96-well Mikrotiterplatte, 33°C, 950 rpm, Kultivierungsdauer 3,1 Tage*

	Ausbeute [g/g]	Produktivität [g/L/h]	Konzentration [g/L]
Synth. Kaffhydrolysat	0,48	0,37	27,2
Kaffhydrolysat	0,01	0,01	0,3
Kaffhydrolysat Aktivkohle	0,01	0,01	0,3
Kaffhydrolysat Kationentauscher	0,51	0,44	32,9
Kaffhydrolysat Aktivkohle + Kationentauscher	0,49	0,43	31,9

In Versuchen mit nicht gereinigtem sowie mit Aktivkohle behandeltem Hydrolysat konnte bei den Kultivierungen in den Mikrotiterplatten nur Spuren von Itaconsäure nachgewiesen werden, da statt typischen Pellets sich ein dichtes Myzel und Randwachstum ausbildete. Durch den Einsatz des Kationentauschers konnten mit und ohne vorherige Reinigung über eine Aktivkohle 32,9 und 31,9 g/L IA gebildet werden. Im gleichen Titerbereich lag auch die Produktion von IA auf synthetischem Hydrolysat mit 27,2 g/L IA. Somit ist eine Aufreinigung des Hydrolysates mit einem Kationentauscher ausreichend, um ähnliche IA-Konzentrationen wie im Referenzsystem mit reinen Zuckern (synth. Kaffhydrolysat) zu erzielen.

Aufgrund der zuvor erzielten Ergebnisse in der 96-well Mikrotiterplatte, wurden für die Aufreinigung des Hydrolysates ein Kationentauscher (Dowex 50 W-X8, 100/200-mesh) verwendet. Die anschließende Kultivierung wurde in 250 mL Schüttelkolben bei 33 °C und 120 rpm durchgeführt (Abbildung 47). Als Referenzsystem diente ein synthetisches Hydrolysat, das von der Zuckerzusammensetzung dem realen Hydrolysat entsprach. Insgesamt waren 85 g/L Zucker enthalten, die sich aus 50 g/L Glucose, 33 g/L Xylose und 2 g/L Arabinose zusammensetzen. Es zeigten sich gleichmäßige, jedoch größere Pellets mit ausgefranstem Myzel, die dem Referenzsystem sehr ähnlich waren. Auch die hellgelbe Farbe der Fermentationsbrühe entsprach der des Referenzsystems. Zuerst wurde Glucose genutzt, und in geringen Teilen Xylose. Nach 5 Tagen war die gesamte Glucose verbraucht, die maximale Itaconsäurekonzentration wurde nach 6 Tagen erreicht mit 27,1 g/L. Obwohl die Xylose weiter abgebaut wurde, konnte keine weitere Steigerung der Itaconsäure erzielt werden, auch die enthaltene Arabinose wurde nicht genutzt. Dagegen kam es zu einem Abbau der gebildeten Itaconsäure. Insgesamt wurden so nur 70 g/L Zucker für die Bildung von IA verwendet. Die Ausbeute betrug 0,41 $g/g_{Gesamtzucker}$ bei einer Produktivität von 0,19 g/L/h. Im Vergleich zum synthetischen Hydrolysat konnten 89 % des Endtiters erzielt werden. Insgesamt konnte durch die Aufreinigung die finale IA-Konzentration von 23,3 g/L IA (Abbildung 46) auf 27,1 g/L (Abbildung 47) um 15 % gesteigert werden.

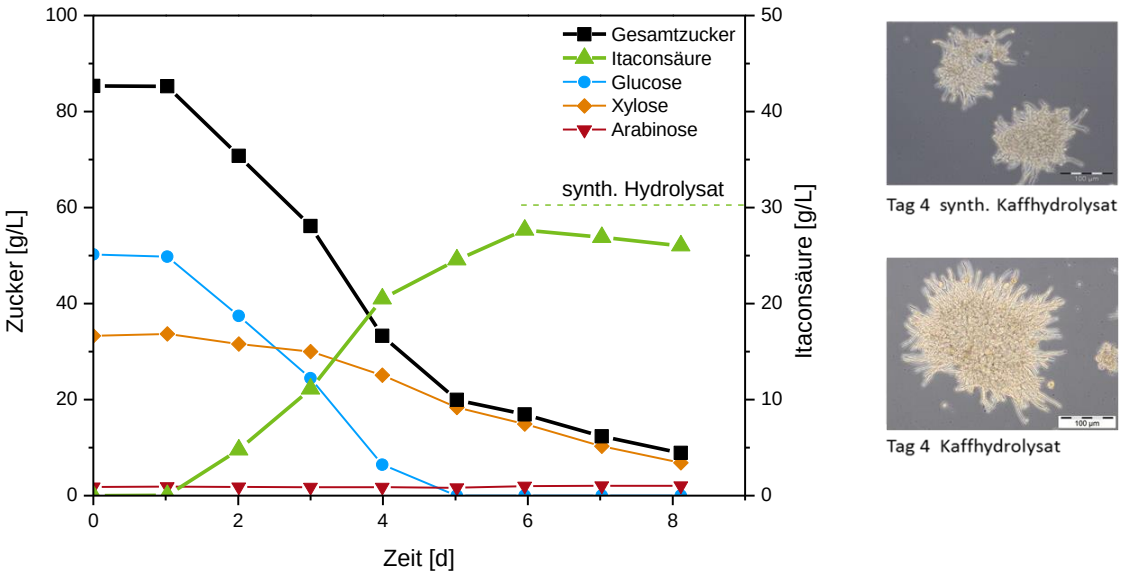


Abbildung 47 rechts - Kultivierung von *A. terreus* mit konzentriertem und gereinigtem Kaffhydrolysat über Ionentauscher bei 33 °C, 120 rpm und einem Start pH-Wert 3,1 im Schüttelkolben mit Schikanen; links – Mikrosopaufnahmen von *A.terreus* auf synthetischem Kaffhydrolysat und realem Kaffhydrolysat bei 40–facher Vergrößerung

Scale up der Fermentationen unter optimierten Bedingungen

Ein Scale-up wurde in 400 mL-Rührreaktoren (DASGIP, Deutschland) durchgeführt. Für die Itaconsäurebildung mit *A. terreus* ist eine ausreichende Sauerstoffversorgung notwendig, somit mussten hohen Begasungsraten mit einer feinen Blasenverteilung gewählt werden. Bereits geringe Begasungsraten im Kaffhydrolysat führten zu einer sehr starken Schaumbildung, die zum Austrag der Biomasse führte (Abbildung 48). Die Zugabe von üblichen Mengen Antischaum bewirkte keine Änderung in der Schaumbildung. Durch die weitere Zugabe des Antischaums wurde das Wachstum des Pilzes inhibiert. Eine mechanische Schaumzerstörung konnte aufgrund der Größe des Reaktors nicht angewendet werden. Vermutlich können enthaltene Proteine aus dem Kaff selbst für die extreme Schaumbildung verantwortlich sein.

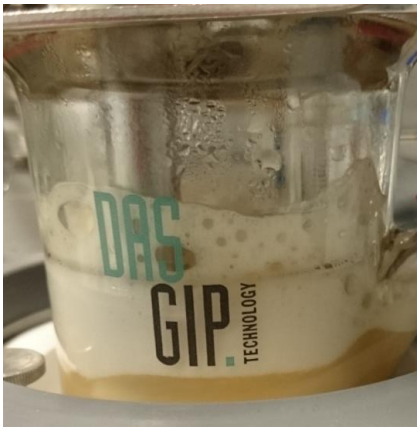


Abbildung 48 Schaumbildung des Kaffhydrolysates im 400 mL Rührreaktor mit *A. terreus*

WP 5: Produkt-Isolierung, Reinigung und Veredelung (TI)

Entwicklung von Produktisolierung und Aufreinigungstechniken

Itaconsäure liegt nach der Fermentation in einer wässrigen Mischung aus Pilzmycel, Nebenprodukten und nicht umgesetzten Substrat vor. Die Gewinnung von Itaconsäure aus Fermentationsbrühen wurde bereits vielfach untersucht. Methoden wie Reaktivextraktion (Wasewar et al. 2011), und Elektrodialyse (Kuenz 2008) wurden dabei untersucht. Nachteile wie z.B. hohe Prozesskosten bei der Reaktivextraktion, Ablagerungen an den Membranen und die nicht selektive Trennung von Itaconsäure während der Elektrodialyse stellen diese Methoden für eine Isolierung von Itaconsäure nur als bedingt geeignet dar. Die Kristallisation von Itaconsäure wurde bisher nur für Fermentationsbrühen mit einer Itaconsäureendkonzentration von ca. 80 g/L und anschließender Einengung untersucht (Dwiarti et al. 2007, Okabe et al. 2009). Itaconsäure kann bei hohen vorliegenden Produktkonzentrationen, wie Sie am Thünen-Institut erreicht wurden (Hevekerl et al. 2014), ohne vorherige Einengung aus einer Fermentationslösung durch Kristallisation isoliert werden. Die Löslichkeit von Itaconsäure wird dabei überwiegend durch den pH-Wert und die Temperatur bestimmt. Die Löslichkeit von Itaconsäure in Wasser wurde bereits von Apelblat et al. (Apelblat and Manzurola 1997) untersucht. Sie konnten zeigen, dass die Löslichkeit mit der Temperatur abnimmt und bei einer Temperatur von 5 °C eine Löslichkeit von 40,9 g/L vorliegt (Abbildung 49).

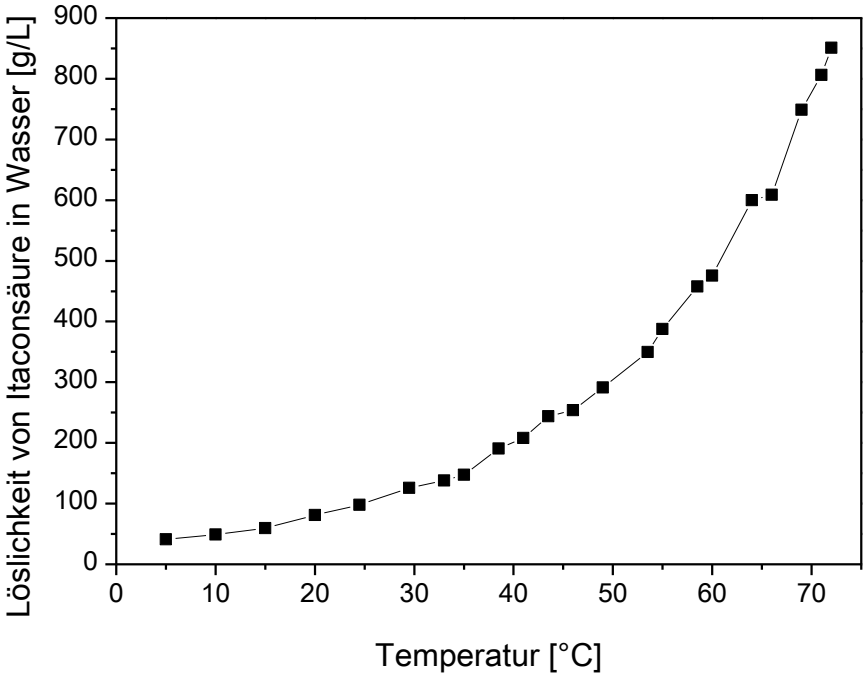


Abbildung 49: Löslichkeit von reiner Itaconsäure in Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur, (Apelblat und Manzurola 1997)

Der pH-Wert als Parameter für die Löslichkeit von Itaconsäure in Wasser kann durch die vorliegenden Ionenformen der Itaconsäure verdeutlicht werden (Abbildung 50). Es wird deutlich, dass mit steigendem pH-Wert zunächst Itaconsäure [H_2A], dann das Monoanion [HA^-] und schließlich das Dianion [A^{2-}] hauptsächlich vorliegen.

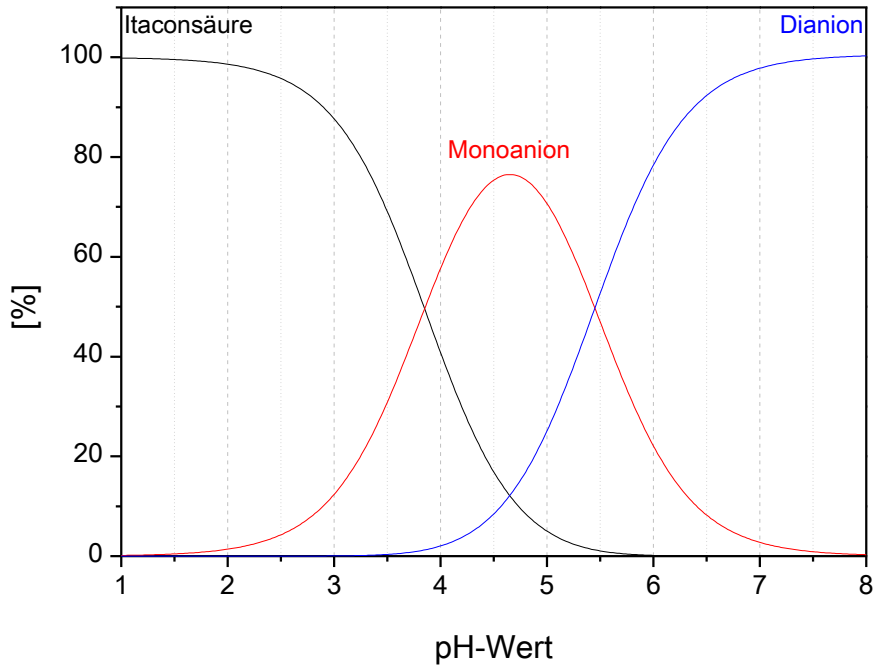


Abbildung 50: Ionenformen der Itaconsäure in Abhängigkeit vom pH-Wert bei 25 °C, nach (Rychtera and Wase 1981)

Die Löslichkeit von Itaconsäure wird durch die vorliegende Ionenform der Itaconsäure beeinflusst und steigt mit steigendem pH-Wert (Hevekerl, Kuenz et al. 2014). Um höchstmögliche Produktmengen auszukristallisieren ist es nötig, die Temperatur und den pH-Wert zu senken.

Für die Kristallisation von Itaconsäure aus einer Fermentationsbrühe wurde ein pH-Wert von pH 1,8 mit konzentrierter Schwefelsäure und eine Temperatur von 5 °C eingestellt. Es wurde eine Fermentationsbrühe mit einer Produktkonzentration von 132,7 g/L verwendet. Nach einer Kristallisationszeit von 24 Stunden bei einer Temperatur von 5 °C wurden die in Tabelle 26 angegebenen Mengen Itaconsäure nachgewiesen. Die angegeben Werte wurden für die Berechnung gerundet.

Tabelle 26: Ergebnisse der Kristallisation von Itaconsäure aus Fermentationsbrühe bei pH 1,8 und 5 °C

	Fermentationsbrühe vor der Kristallisation	Kristalle nach der Kristallisation	Fermentationsbrühe nach der Kristallisation
Itaconsäure	132,7 g (100 %)	91,9 g (69 %)	40,7 g (31 %)

Die Löslichkeit von Itaconsäure in der Fermentationsbrühe entspricht der Löslichkeit von Itaconsäure in Wasser, die von Apelblat bestimmt wurde. Durch die Kristallisation konnten gelbliche bis weiße Kristalle gewonnen werden (Abbildung 51).

Abbildung 51: Itaconsäurekristalle aus Fermentationsbrühe

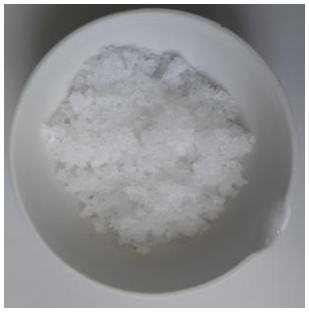
Die Reinheit der auskristallisierten Itaconsäure lag bei 98 %. Dabei konnte Ketoglutarsäure, cis-Aconitsäure, trans-Aconitsäure, Äpfelsäure und Bernsteinsäure in den Kristallen als Verunreinigung nachgewiesen werden. Diese Nebenprodukte treten bei der Herstellung von Itaconsäure mit *Aspergillus terreus* auf. Die Untersuchung der Kationen in der Fermentationsbrühe und in den Kristallen mittels Ionenchromatographie zeigte, dass die Kationen von Calcium und Magnesium in den Kristallen nachgewiesen werden können. Die Kationen Natrium und Kalium sind in den Kristallen unter der Nachweisgrenze (u.N.).

Tabelle 27: Vorliegende Kationen in der Fermentationsbrühe und in den Itaconsäurekristallen nach 24 h bei 5 °C

Kationen[mg/L]	Natrium(Na^+)	Kalium(K^+)	Calcium(Ca^{2+})	Magnesium(Mg^{2+})
Fermentationsbrühe	16	80	1447	178
Kristall	u.N.	u.N.	449	9

Die Untersuchungen zur Kristallisation von Itaconsäure zeigen, dass insbesondere die Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} auch in den Kristallen nachzuweisen sind. Eine Aufreinigung mit Aktivkohle und erneute Kristallisation wurden durchgeführt, um die Reinheit der ausgefällten Itaconsäure zu erhöhen. Hierzu wurde die Itaconsäure in Wasser gelöst, mit 10 wt.-% Aktivkohle (Norit SX1G) versetzt und bei 80°C über eine Stunde erhitzt. Anschließend wurde die Aktivkohle abfiltriert und die Lösung zur Kristallisation eingesetzt (Abbildung 52).

unaufgereinigte ausgefällte Kristalle aus Fermentationsbrühe



aufgereinigte Itaconsäurekristalle aus Fermentationsbrühe

Abbildung 52: Itaconsäurekristalle nach den jeweiligen Aufreinigungsschritten

In den aufgereinigten Itaconsäurekristallen konnten keine Nebenprodukte nachgewiesen werden. Dabei wurde eine Reinheit von >99 % erreicht.

Die direkte Isolierung von Itaconsäure aus Fermentationsbrühe mittels Kristallisation liefert ein Rohprodukt mit einer Reinheit von 98 %. Für weitere Umsetzungen (vgl. Abschnitt: Katalytische Veredelung von Itaconsäure durch Derivatisierung und Herstellung von Polymeren) wird eine größere Reinheit benötigt. Eine höhere Reinheit von >99 % wurde durch Umkristallisation und Behandlung mit Aktivkohle erreicht.

Katalytische Veredelung von Itaconsäure durch Derivatisierung und Herstellung von Polymeren

Ungesättigte Polyesterharze(UP-Harze) werden größtenteils aus fossilen Rohstoffen hergestellt und gehören zu den wichtigsten Klassen der Duromere. Itaconsäure ist für die Herstellung von UP-Harzen aus nachwachsenden Rohstoffen ein geeignetes Monomer (Farmer et al. 2015). Die funktionellen Gruppen von Itaconsäure können für eine Derivatisierung zu komplexen organischen Verbindungen, für eine Polykondensation mit Diolen zu Polyestern oder für eine radikalische Polymerisation genutzt werden. Die Doppelbindung erlaubt weiterhin die Quervernetzung der hergestellten Polyester zu Duromeren. UP-Harze finden in vielen Bereichen des alltäglichen Lebens z.B. als faserverstärkte Formteile, Halbzeuge oder Formmassen und als Beschichtungen Verwendung. Die Derivatisierung von Itaconsäure würde es ermöglichen, die Eigenschaften der Polyesterharze zu verändern und die Einsatzgebiete zu erweitern. Zu diesem Zweck wurden die Epoxidierung, Decarboxylierung und Hydrierung von Itaconsäure untersucht.

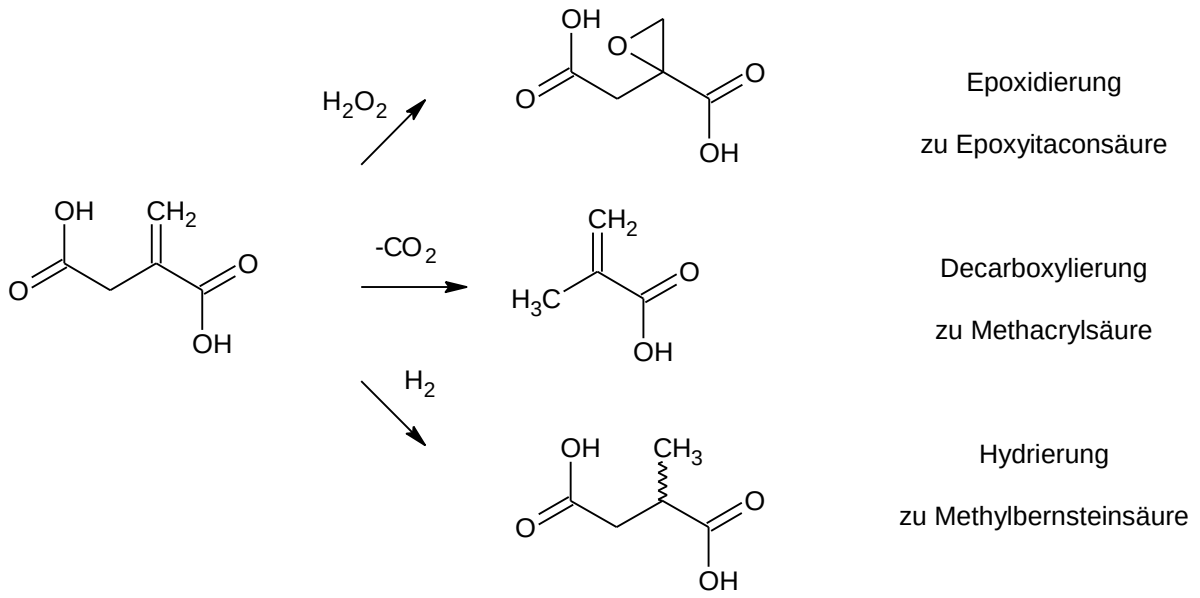


Abbildung 53: Schema zur Derivatisierung von Itaconsäure Epoxidierung von Itaconsäure

Epoxidierung von Itaconsäure zu Epoxyitaconsäure

Die Epoxidierung von Itaconsäure führt zu Epoxyitaconsäure. Durch die Umsetzung von Epoxyitaconsäure mit Diolen könnten Polyether-Polyole hergestellt werden. Polyether-Polyole werden als Vorprodukte in der Polyurethanherstellung eingesetzt.

In der Literatur wurde die Epoxidierung von α,β-ungesättigten Säuren mit diversen Katalysatoren untersucht (Payne and Williams 1959), (Kirshenbaum and Sharpless 1985), (Oguchi et al. 1989), (Oludipe 1997). Hierbei wurden u.a. homogene Katalysatoren wie Natriumwolframat ($NaWO_4$) und Wolframatophosphorsäure ($H_3PW_{12}O_{40}$) (HPW) sowie Salze der Wolframatophosphorsäure beschrieben.

Die Epoxidierung wurde zunächst mit dem Modellsubstrat Maleinsäure in einem wässrigen System untersucht. Hierzu wurden homogene Katalysatoren wie Natriumwolframat ($NaWO_4$) und Wolframatophosphorsäure ($H_3PW_{12}O_{40}$) (HPW), sowie heterogene Katalysatoren, ein Cäsiumsalz der Wolframatophosphorsäure ($Cs_{2,5}H_{0,5}PW_{12}O_{40}$) (CsPW) und Tris(Cetylpyridinium)wolframatophosphat

(π-$C_5H_5N^+(CH_2)_{15}CH_3)_3(PW_{12}O_{40})^{3-}$ (CPW), und die auf SiO_2 aufgebrachten Varianten dieser Salze untersucht. Dazu wurde 400 mL einer 5 % Lösung der Säure mit 1g des jeweiligen Katalysators bei 65 °C gerührt. Der pH-Wert wurde mit Natronlauge (NaOH) auf pH 5 eingestellt und mit einem Autotitrator konstant gehalten. Mit Zugabe von einem 10 mol% Überschuss 30 % H_2O_2 wurde die Reaktion gestartet. Die Analytik wurde mittels HPLC (Phenomenex Synergi Hydro RP, 2%MeOH, pH2 (H_3PO_4), 0,8mL/min, 30°C, UV 210 nm) durchgeführt. Die Epoxidierung von Maleinsäure läuft nach Schritt 1 in Abbildung 54 ab. Da in wässriger Lösung gearbeitet wird, ist eine Hydratisierung zu Weinsäure nach Schritt 2 in Abbildung 54 nicht auszuschließen.

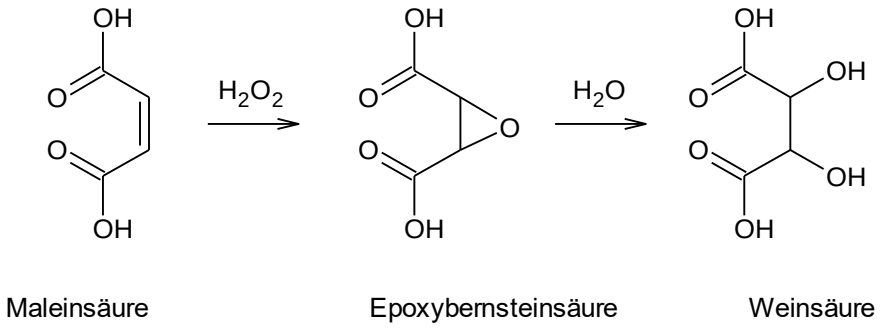


Abbildung 54: Reaktionsschema der Epoxidierung von Maleinsäure

Es konnten vollständige Ausbeuten bei Einsatz von $NaWO_4$ und CPW innerhalb von 2 h ($NaWO_4$) und 4 h (CPW) erreicht werden. Die unerwünschte Reaktion zu Weinsäure wurde nicht beobachtet. Daher wurden die untersuchten Katalysatorsysteme auf die Epoxidierung von Itaconsäure angewendet. Die Epoxidierung von Itaconsäure findet an der Doppelbindung nach Abbildung 55 (Schritt 1) statt. Da die Reaktion in einem wässrigen Medium durchgeführt wird ist nicht auszuschließen, dass die Hydratisierung von Epoxyitaconsäure zu Itaweinsäure nach Schritt 2 in Abbildung 55 stattfindet. Eine Besonderheit ist die Möglichkeit der Itaweinsäure, durch Wasserabspaltung zu Hydroxyparaconsäure zu reagieren. Itaweinsäure und Hydroxyparaconsäure sind kommerziell nicht erhältlich. Itaweinsäure und Hydroxyparaconsäure werden in der Literatur bei der Oxidation von Itaconsäure mit Kaliumpermanganat(Köhl 1899) und bei der Umsetzung von Glucose mit *Ustilago maydis*(Guevarra and Tabuchi 1990) als Produkte genannt.

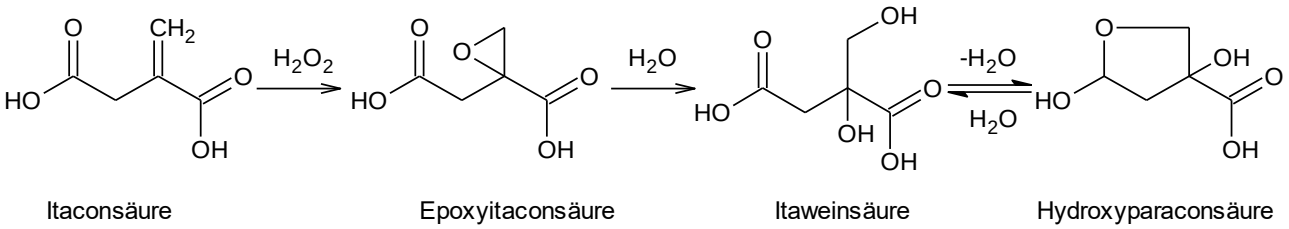


Abbildung 55: Reaktionsschema der Epoxidierung von Itaconsäure

Zur Durchführung der Reaktion wurde eine 5 wt.-% Itaconsäurelösung mit 1 g des jeweiligen Katalysators bei 65 °C gerührt. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 5 eingestellt und mit einem Autotitrator konstant gehalten. Mit Zugabe von einem 10 mol% Überschuss 30 % H_2O_2 wurde die Reaktion gestartet. Die Epoxidierung von Itaconsäure konnte mit keinem der verwendeten Katalysatoren mit vollständigen Umsätzen durchgeführt werden. In der Reaktion wurden in Abhängigkeit vom Katalysator Itaconsäureumsätze zwischen 40 % und 89 % erzielt. In der anschließenden Analytik mittels HPLC (5mmol H_2SO_4, 15°C, 0,35mL/min, HPX-87H) wurden zwei Produktpeaks und der Itaconsäurepeak beobachtet (Größenverhältnis(Peak (1): Peak (2): Peak(Itaconsäure)): 8:81:9). Da für die in der Reaktion

auftretenden Produkte kommerziell keine Standards verfügbar sind, wurde eine Isolierung und Charakterisierung der Produkte durchgeführt. Die Trennung der Substanzen mittels präparativer HPLC und anschließende Gefriertrocknung der getrennten Substanzen ermöglichte eine NMR-Messung der entstandenen Produkte. Die Substanzen wurden in deuteriertem Dimethylsulfoxid gelöst und eine NMR-Untersuchung durchgeführt. Es zeigte sich, dass in den gesammelten Fraktionen des größten Produktpeaks (Peak 2) zwei Produkte in der NMR-Untersuchung nachzuweisen sind. Die Produkte konnten als Epoxyitaconsäure und Hydroxyparaconsäure identifiziert werden. Die Identifizierung des kleineren Peaks (Peak 1) konnte nicht eindeutig in der NMR-Untersuchung erfolgen. Um zu überprüfen ob es sich bei dieser unbekannten Substanz womöglich um Itaweinsäure handeln könnte, wurde eine Oxidation von Itaconsäure mit Kaliumpermanganat und eine Fermentation von Glucose mit *Ustilago maydis* durchgeführt, da in der Literatur (Köhl 1899, Guevarra and Tabuchi 1990) Itaweinsäure und Hydroxyparaconsäure als Produkte dieser Reaktionen / Umsetzungen genannt werden. Im HPLC-Chromatogramm eluierten die Produktpeaks dieser beiden Reaktionen zur gleichen Retentionszeit wie der Produktpeak aus der oben durchgeführten Epoxidierung. Daher wurde der kleinere Produktpeak aus der Epoxidierungsreaktion in der HPLC Itaweinsäure zugeordnet.

Unvollständige Ausbeuten von Epoxyitaconsäure und die Weiterreaktion von Epoxyitaconsäure zu Produktgemischen (Abbildung 55) führen zu einem erhöhten Reinigungsaufwand der Epoxyitaconsäure. Diese Faktoren lassen die Epoxydierung von Itaconsäure als wenig aussichtsreiche Derivatisierungsoption erscheinen, so dass diese Derivatisierungsreaktion nicht weiter untersucht wurde.

Decarboxylierung von Itaconsäure zu Methacrylsäure

Die Decarboxylierung von Itaconsäure zu Methacrylsäure birgt ein großes Potential. Eine Herstellung von biobasiertem Methylmethacrylat, welches als Ausgangsstoff für Polymethylmethacrylat und andere Polymere verwendet wird, würde dadurch ermöglicht. Zurzeit wird Methacrylsäure aus fossilen Rohstoffen unter anderem nach dem Cyanhydrin-Verfahren oder Oxidation von Isobuten oder tert-Butanol hergestellt.

Die Decarboxylierung von Itaconsäure wurde bereits in der Literatur beschrieben (Carlsson et al. 1994) und (Cody et al. 2001). Extreme Reaktionsbedingungen wie z.B. hohe Drücke (200-345 bar) und Temperaturen (250-400 °C) wurden dabei verwendet. Um die Decarboxylierung bei geringeren Temperaturen durchzuführen zu können, wurde untersucht, inwieweit heterogene Katalysatoren die Decarboxylierung von Itaconsäure beeinflussen können. Zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeiten waren heterogen katalytische Arbeiten zur Decarboxylierung von Itaconsäure nicht bekannt. Aber in der Literatur wurde die Decarboxylierung von Fettsäuren mit Übergangsmetallkatalysatoren beschrieben (Maki-Arvela et al. 2007) und (Roh et al. 2011). Die Anwendung von Übergangsmetallkatalysatoren in der Decarboxylierung von Fettsäuren führt in der Regel zu besseren Selektivitäten und milderen Reaktionsbedingungen. Daher sollte u.a. eine Anwendung von Übergangsmetallkatalysatoren für die Decarboxylierung von Itaconsäure untersucht werden.

Die Decarboxylierung wurde in einem wässrigen System bei Temperaturen von 200°C bis 375°C in einem absatzweise betriebenem Rührkesselreaktor und zwei kontinuierlich betriebenen Reaktorsystemen untersucht (Abbildung 56). Der absatzweise betriebene Rührkesselreaktor wurde für Versuche mit und ohne Katalysator im Temperaturbereich von 200-300 °C verwendet. Der Rohreaktor wurde für Temperaturen im Bereich 250-375 °C ohne Katalysator verwendet. Der Festbettreaktor wurde für Versuche mit Katalysatorfüllung im Temperaturbereich von 250-375 °C verwendet.

Abbildung 56: Reaktoren für die Decarboxylierung von Itaconsäure: links: Absatzweise betriebener Rührkesselreaktor; Mitte: Kontinuierlich betriebener Rohrreaktor; rechts: Kontinuierlich betriebener Festbettreaktor

Als Standardreaktionsansatz wurde 5% Itaconsäurelösung verwendet. Zunächst wurde das Optimum des pH-Wertes für die Decarboxylierung ermittelt. Hierzu wurde der pH-Wert bei Raumtemperatur vor der Reaktion mit NaOH eingestellt und die Reaktion durchgeführt(Tabelle 28). Die Änderung des pH-Wertes mit der Temperatur wurde hierbei nicht berücksichtigt.

Tabelle 28: Decarboxylierung von Itaconsäure bei verschiedenen pH-Werten; 200 °C, 5 % Itaconsäurelösung; Rührkesselreaktor ohne Katalysator

pH-Wert [25 °C]	Selektivität zu Methacrylsäure nach 240 Min. [%]
pH 1,8	8,5
pH 3	7,2
pH 4	14
pH 5	1,6
pH 6	0

Aus den Ergebnissen in Tabelle 28 ist zu erkennen, dass die größte Selektivität zu Methacrylsäure bei einem zuvor eingestellten pH-Wert von pH 4 erreicht wird. Daher wurden alle folgenden Versuche bei einem pH-Wert von pH 4 durchgeführt.

Anschließend wurde der Einfluss der Temperatur auf die Decarboxylierung untersucht. Versuchsreihen in beiden Reaktorsystemen haben in Übereinstimmung mit der Literatur einen Anstieg der Selektivität zu Methacrylsäure mit der Temperatur gezeigt (Abbildung 57).

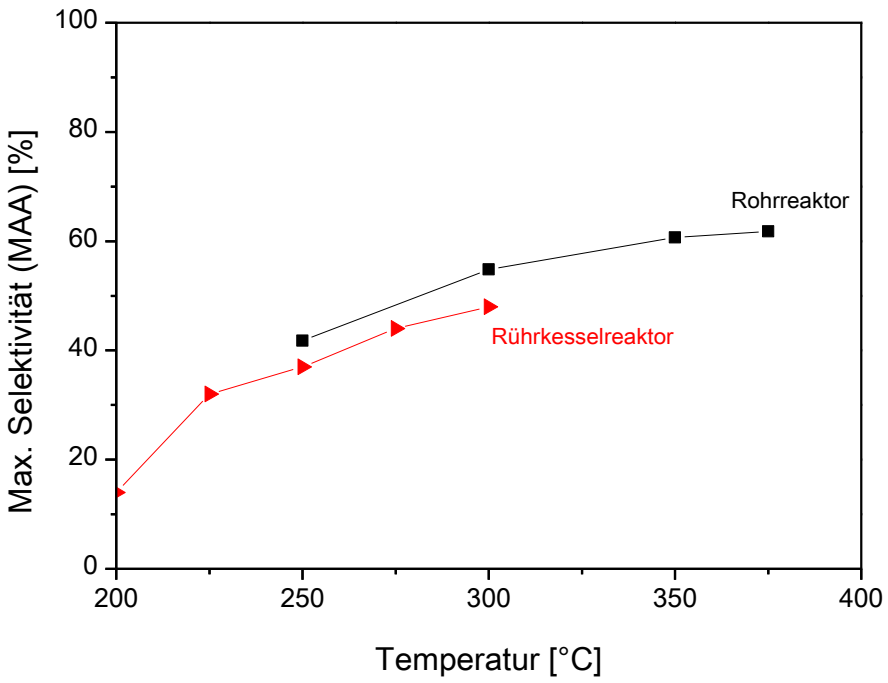


Abbildung 57: Einfluss der Temperatur bei Decarboxylierung von 5 % Itaconsäurelösung bei pH 4 ohne Katalysator

Da bei den untersuchten Reaktionsbedingungen kein Katalysator verwendet wurde, ist die oben beschriebene Reaktion eine rein thermische Reaktion.

Hohe Temperaturen führen bei vielen Reaktionen zu unerwünschten Nebenprodukten. Daher wurde die Stabilität von Methacrylsäure unter Reaktionsbedingungen untersucht. Die Reaktionsbedingungen wurden auf eine 5 % Methacrylsäurelösung übertragen. Bei der Untersuchung der Stabilität von Methacrylsäure unter Reaktionsbedingungen wurde ein Abbau von 54 % der ursprünglich eingesetzten Methacrylsäure nach 4 Stunden Reaktionszeit festgestellt (Abbildung 58). Ein Teil der Methacrylsäure reagiert zu Hydroxyisobutyrsäure. Weitere Nebenprodukte konnten in der HPLC nicht nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass ein zusätzlicher Abbau der Methacrylsäure durch eine Polymerisation verursacht wird.

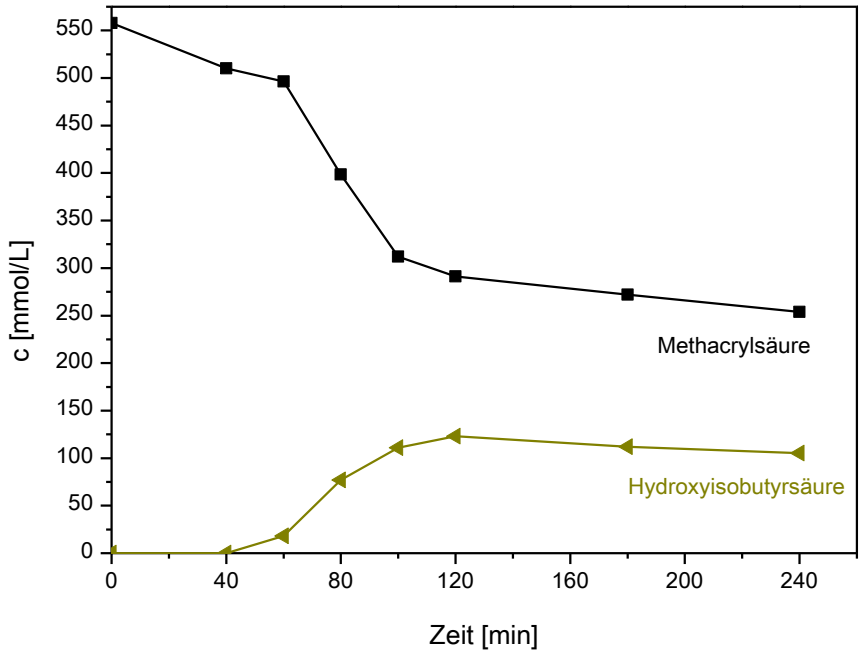


Abbildung 58: Abbau der Methacrylsäure; Rührkesselreaktor, 250 °C, pH 4, 5 % Methacrylsäurelösung, 200 mL Reaktionsvolumen

Um den Einfluss von Katalysatoren auf diese Reaktion zu untersuchen, wurde die Decarboxylierung von Itaconsäure mit Übergangsmetallkatalysatoren und diversen Katalysatorträgern bei einer Temperatur von 250 °C und einem pH-Wert von pH 4 untersucht. Dabei wurden eine Reihe Katalysatoren mit diversen basischen oder sauren Eigenschaften und verschiedene (Edel)-Metallkatalysatoren für diese Reaktion verwendet.

Abbildung 59 zeigt einen typischen Verlauf einer Reaktion im absatzweise betriebenen Rührkesselreaktor mit 0,5 g eines Pd-Pt/Al_2O_3-Katalysators und ohne Katalysator. Es wird deutlich, dass keine Verbesserung der Selektivität zu Methacrylsäure mit diesem Katalysator erreicht wird.

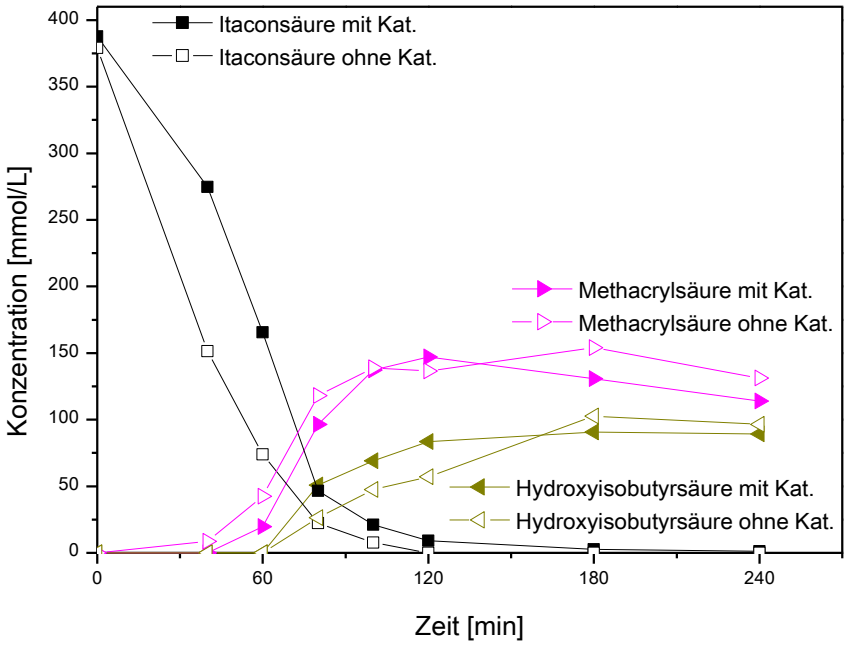


Abbildung 59: Verlauf der Decarboxylierung mit Katalysator (0,5 g Pd-Pt/Al_2O_3) und ohne Katalysator im Vergleich; 250 °C, pH 4, 5 % Itaconsäurelösung, 200 mL Reaktionsvolumen, Rührkesselreaktor

In Tabelle 29 sind die untersuchten Katalysatoren mit ihrem Einfluss auf die Decarboxylierung von Itaconsäure zusammengestellt. Als negative Einflüsse treten sowohl stärkerer Abbau der Methacrylsäure, als auch geringere Konzentrationen von Methacrylsäure sowie eine verstärkte Bildung von Nebenprodukten wie z.B. Essigsäure auf. Dabei fällt auf, dass basische Katalysatoren einen negativen Einfluss auf die Reaktion ausüben, während neutrale, amphotere oder saure Katalysatoren keinen Einfluss auf die Reaktion haben.

Tabelle 29: Einfluss von Katalysatorträgern und Edelmetallkatalysatoren auf die Decarboxylierung

Kein Einfluss	Negativer Einfluss
SiO_2	Verschiedene Aktivkohlen
Na-Y-Zeolithe	5 % Ru/Al_2O_3
Al_2O_3	5 % $RuPW_{12}O_{40}$/Al_2O_3
5 % Pd–Pt/Al_2O_3	Y_2O_3 / La_2O_3 / CeO_2 / MgO / ZrO_2
10 % Ni/Al_2O_3	Hydroxyapatit
5 % Pd/Al_2O_3	Verschiedene Hydrotalcite mit und ohne
5 % Pt/Al_2O_3	Edelmetallbeladung

Unter den untersuchten Katalysatoren konnte kein Katalysator eine positive Auswirkung auf die Decarboxylierung von Itaconsäure ausüben.

Die Decarboxylierung einer 5 % Itaconsäurelösung zu Methacrlysäure konnte mit einer Ausbeute von 62 % bei 375 °C im kontinuierlichen Betrieb durchgeführt werden. Die Isolierung der Methacrylsäure aus der Reaktionslösung könnte durch Destillation oder Reaktivdestillation mit gleichzeitiger Veresterung zu Methylmethacrylat durchgeführt werden, wurde aber nicht weiter untersucht, da dies Stand der Technik ist. Im Vergleich zu den in der Literatur dargestellten verbesserten Selektivitäten bei der Decarboxylierung von

Fettsäuren, konnte kein positiver Einfluss durch den Einsatz von Katalysatoren in der Decarboxylierung von Itaconsäure zu Methacrylsäure erreicht werden. Während der Projektlaufzeit wurde die Decarboxylierung von Itaconsäure und Citronensäure mit Übergangsmetallen von Le Notre et al. untersucht (Le Notre et al. 2014). Die Verwendung eines 2,5 % Pt/Al_2O_3-Katalysators in wässriger Lösung bei 250 °C führte nach einer Stunde Reaktionszeit zu erhöhten Selektivitäten zu Methacrylsäure gegenüber einer hydrothermalen Decarboxylierung von Itaconsäure. Es wurde eine Selektivität zu Methacrylsäure von 84 % bei Umsätzen von 80 % beschrieben. Überaschenderweise wird dieses Ergebnis in einem späteren Review zur Deoxygenierung von biobasierten Molekülen mit homogenen und heterogenen Katalysatoren von der gleichen Arbeitsgruppe nicht mehr erwähnt (Dawes et al. 2015). Die Ergebnisse von Le Notre et al. konnten in eigenen Versuchen trotz vergleichbarer Bedingungen nicht bestätigt werden.

Hydrierung von Itaconsäure

Die Hydrierung von Itaconsäure mit dem Ziel der Herstellung von Methyl-γ-Butyrolactonen und 2-Methyl-1,4-Butandiol wurde in der Literatur bereits berichtet. Die verwendeten Katalysatoren beschränken sich dabei auf wenige homogene Katalysatoren (Geilen et al. 2010) und heterogene Katalysatoren (Primo et al. 2011). Die Hydrierung von Itaconsäure zu Methylbernsteinsäure ist ein Zwischenschritt bei der Herstellung von Methyl-γ-Butyrolactonen. Mit diesem Zwischenschritt wird sich in der berichtenden Literatur nur wenig befasst.

Durch die Hydrierung von Itaconsäure zu Methylbernsteinsäure bleibt das Grundgerüst der Dicarbonsäure erhalten (Abbildung 60).

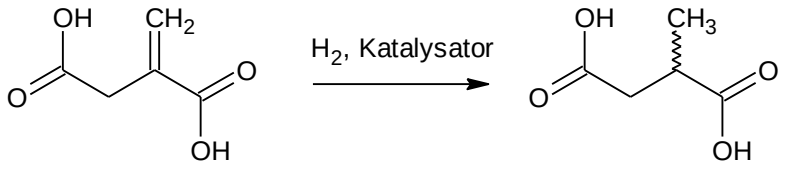


Abbildung 60: Reaktionsschema der Hydrierung von Itaconsäure zu Methylbernsteinsäure

Somit kann eine Polykondensation von Methylbernsteinsäure mit Diolen weiterhin durchgeführt werden und führt zu veränderten Eigenschaften der Polyesterharze gegenüber Polyesterharzen mit dem Baustein Itaconsäure. Ziel dieser Untersuchungen sollte die Entwicklung eines effektiven Prozesses zur Hydrierung von Itaconsäure und die Entwicklung eines selektiven, aktiven und stabilen Katalysatorsystems sein. Die Selektivität, Aktivität und Stabilität eines Katalysators entscheidet in großem Maße über die Wirtschaftlichkeit eines Prozesses.

Die Hydrierung von Itaconsäure zu Methylbernsteinsäure mit Wasserstoff wurde zunächst in einem Glasreaktor bei Atmosphärendruck und anschließend im Druckreaktor bei Wasserstoffdrücken von 2-10 bar untersucht (Abbildung 61).

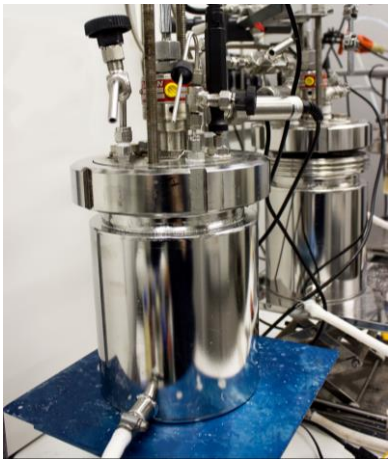


Abbildung 61: links: Glasreaktor für die Hydrierung; rechts: Druckreaktor für die Hydrierung

Zunächst wurde ein Katalysatorscreening durchgeführt. Zu Beginn wurde Al_2O_3 als Trägermaterial für die Hydrierung ausgewählt, und ein Screening nach geeigneten Edelmetallspezies durchgeführt. Die Untersuchung der Metallspezies für die Hydrierung wurde auf Platin und Palladium, sowie ein Bimetallkatalysator dieser beiden begrenzt. Der Einsatz eines Pt-Pd-Bimetallkatalysators zeigte dabei die größten Aktivitäten dieser drei untersuchten Systeme. Die Metallbeladung wurde variiert, wobei Metallbeladungen von 1 wt.-% und 5 wt.-% untersucht wurden. Unter Einsatz von 1 g Katalysator wurden akzeptable Reaktionsgeschwindigkeiten erst ab einer Metallbeladung von 5 wt.-% erreicht. Die Hydrierung von 50 g Itaconsäure bei 40 °C unter Atmosphärendruck zeigte mit 1 g des 5 % Pd-Pt/Al_2O_3-Bimetallkatalysators nach 4 Stunden vollständige Ausbeuten zu Methylbernsteinsäure. Eine ICP-Analyse der Reaktionslösungen zeigte jedoch eine Auflösung des Katalysatorträgers bei den Reaktionsbedingungen. Itaconsäure liegt in kristalliner Form als Säure vor. Eine 5 wt.-% Itaconsäurelösung hat einen pH-Wert von pH 1,8. Daher muss für diese Reaktion ein säurestabiler Katalysatorträger gewählt werden. Weiterhin wurde die Präparationsmethode untersucht. Als Präparationsmethoden wurden die Incipient wetness-Methode und die Nassimprägnierung untersucht. In Abbildung 62 sind die beiden Methoden am Beispiel Al_2O_3, SiO_2 und einem Edelmetallsalz gegenübergestellt. Bei der Nassimprägnierung wird eine Metallsalzlösung mit einer Konzentration von 5 g/L Metall in einem Überschuss Wasser mit dem Träger verrührt und in situ reduziert. Bei der Incipient wetness-Methode wird die Menge der Metallsalzlösung dem Porenvolumen des Trägers angepasst und auf den Träger aufgebracht. Hierzu wird die Metallsalzlösung mit konz. Salzsäure hergestellt. Die Reduktion wird nach Trocknung in einem Röhrenofen im Formiergasstrom (5 % Wasserstoff, 95 % Stickstoff) durchgeführt.

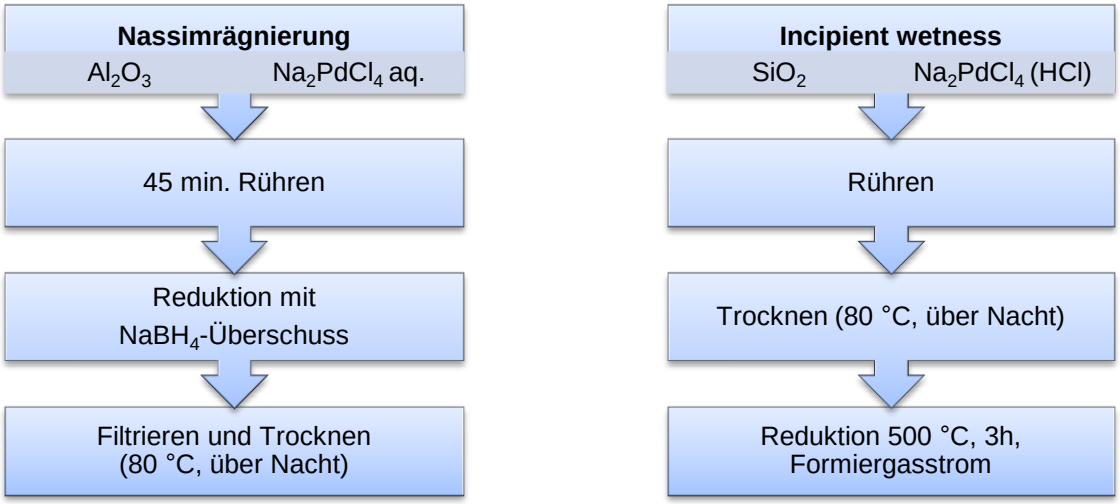


Abbildung 62: Übersichtsschema zu den Herstellungsmethoden für die verwendeten Hydrierkatalysatoren

Das Trägermaterial stellt eine wichtige Komponente bei der Herstellung der Katalysatoren dar. Es wurden Al_2O_3, CeO_2 und SiO_2 verschiedener Hersteller untersucht (Tabelle 30).

Tabelle 30: Verwendete Trägermaterialien bei der Hydrierung

Material	**Al_2O_3**	**CeO_2**	**SiO_2**	**SiO_2**	**SiO_2**
Bezeichnung	Puralox KR-90	n. a.	XWP 250 A	Norpro 300 µm	Sipernat 22
Hersteller	Sasol	ChemPur	Grace	Saint-Gobain	Evonik

In Untersuchungen zur Stabilität der Katalysatorträger konnte nachgewiesen werden, dass der Aluminiumoxidträger und Ceroxid im sauren Reaktionsmedium instabil sind. SiO_2 wird von Säuren nicht angegriffen und ist im Reaktionsmedium stabil. Die Einstellung des pH-Wertes zu einem neutralen pH-Wert wurde aufgrund der dadurch entstehenden Problematik der Isolierung der reinen Säure nicht untersucht. Da nur geringe Aktivitäten (132-351 $g_{Itaconsäure}/(h \cdot g_{Metall})$) mit der Nassimprägnierung bei SiO_2 als Träger erreicht wurden, musste die Präparationsmethode an den Katalysatorträger angepasst werden. Dabei wurde der pH-Wert der Imprägnierlösung durch Auflösung der Metallsalze mit konz. Salzsäure stark herabgesetzt. Durch Senkung des pH-Wertes unterhalb des Ladungsnullpunktes des Trägermaterials werden mehr Hydroxylgruppen vom Trägermaterial protoniert, so dass eine bessere Anhaftung des negativ geladenen Edelmetallanions(z.B. $[PtCl_6]^{2-}$) stattfinden kann. Eine Steigerung der Aktivität mit dieser an den Träger angepassten Incipient wetness Methode konnte bei den Trägern XWP 250 A und Sipernat 22 erreicht werden. Die höchste Aktivität wurde für den Träger Sipernat 22 mit 2800 $g_{Itaconsäure}/(h \cdot g_{Metall})$ bei einem Wasserstoffdruck von 5 bar und einer Eduktkonzentration von 50 g/L Itaconsäure und einem Reaktionsvolumen von 1 L erreicht.

Zur weiteren Charakterisierung des Katalysators wurden mehrere Versuchsreihen, wie z.B. die Abhängigkeit der maximalen spezifischen Aktivität vom Wasserstoffdruck oder von der Itaconsäurekonzentration und die Langzeitstabilität des Katalysators untersucht. Dabei zeigten die Katalysatoren innerhalb einer Charge reproduzierbare Aktivitäten. Zwischen den Katalysatorchargen konnten jedoch Aktivitätsunterschiede festgestellt werden.

Mit dem entwickelten 5 % Pd-Pt/SiO_2-Katalysator konnten bei einem Wasserstoffdruck von 5 bar 100 g Itaconsäure innerhalb von 40 Minuten zu Methylbernsteinsäure mit vollständiger Ausbeute umgesetzt werden (Abbildung 63).

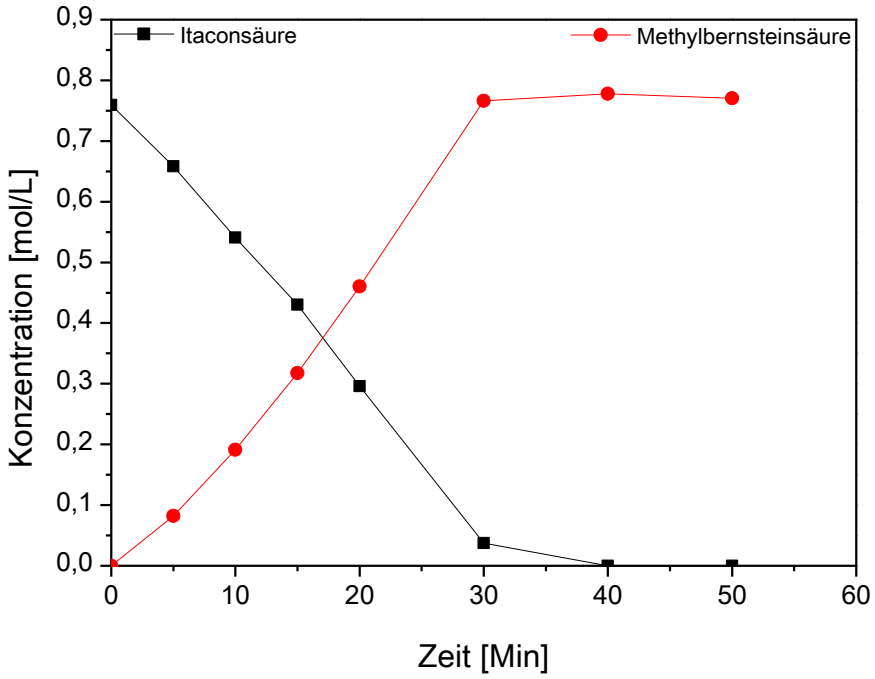


Abbildung 63: Verlauf der Konzentrationen bei der Hydrierung von 100 g/L Itaconsäure, 1 g 5 % Pd-Pt/SiO_2 (Sipernat 22) Katalysator, 40 °C, 5 bar Wasserstoffdruck, 1 L Reaktionsvolumen

Zur Untersuchung einer möglichen Stofftransportlimitierung wurden die Konzentrationen der Reaktanden variiert. Mit steigender Itaconsäurekonzentration wurde eine Abnahme der max. spez. Aktivität beobachtet (Abbildung 64).

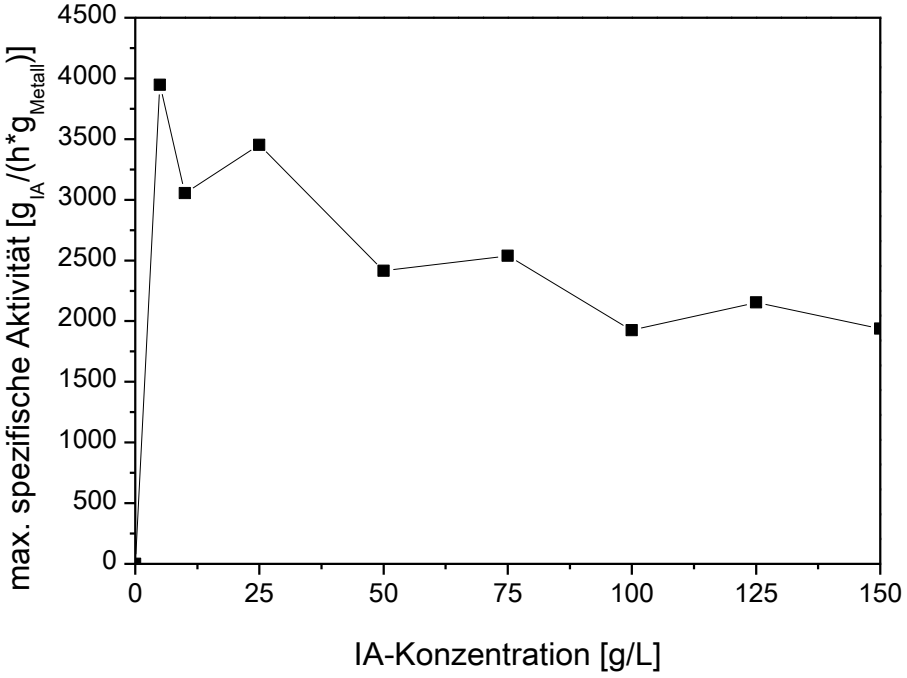


Abbildung 64: Abhängigkeit der maximalen spezifischen Aktivität von der Ausgangsitaconsäurekonzentration bei der Hydrierung: 0,5 g Katalysator, 5 % Pd-Pt/SiO_2 (Sipernat 22), 5 bar H_2-Druck, 40 °C, 1 L Reaktionsvolumen

Es ist zu erkennen, dass mit steigender Itaconsäurekonzentration eine Abnahme der maximalen spezifischen Aktivität bewirkt wird. Dies könnte mit einer einhergehenden Stofftransportlimitierung zu erklären sein. Die Menge der Itaconsäure liegt im Vergleich zum Wasserstoff dabei in einem großen Überschuss vor. Die Wasserstofflöslichkeit und somit der Transport des Wasserstoffs in die Lösung wird dadurch behindert und verlangsamt die Reaktion bei steigendem Itaconsäuregehalt.

Mit steigendem Wasserstoffdruck wurden größere maximale spezifische Aktivitäten der Katalysatoren erreicht (Abbildung 65).

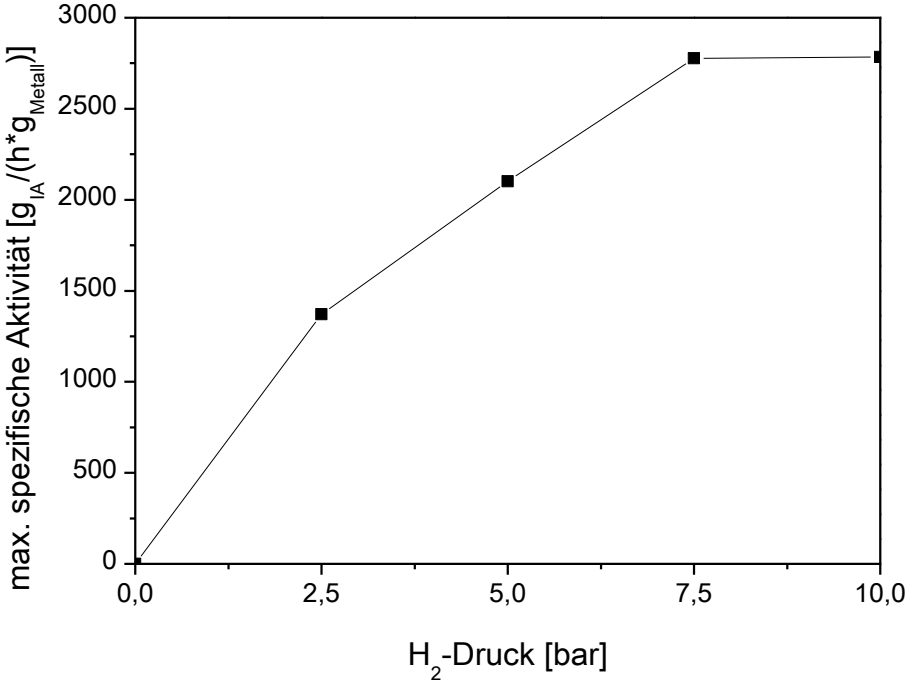


Abbildung 65: Abhängigkeit der maximalen spezifischen Aktivität vom Wasserstoffdruck bei der Hydrierung; 0,5 g 5 % Pd-Pt/SiO_2 (Sipernat 22) Katalysator, 40°C, 100 g/L IA, 1 L Reaktionsvolumen

Die max. spezifische Aktivität des Katalysators steigt mit steigendem Wasserstoffdruck bis zu ca. 2800 [g_{IA} /(h· g_{Metall})] an. Eine weitere Erhöhung des Drucks war in dem verwendeten Reaktorsystem aufgrund von begrenzten Stabilitäten bis 10 bar nicht möglich.

Ein sehr wichtiges Kriterium für den Einsatz eines Katalysators ist die Langzeitstabilität. Um Aussagen über die Langzeitstabilität eines Katalysators treffen zu können, wird der verwendete Katalysator nach der Reaktion zurückgewonnen und in der nächsten Reaktion eingesetzt. Der Einsatz des Katalysators über 5 Versuche zeigte zunächst eine Abnahme der Aktivität nach dem ersten Einsatz und anschließend eine annähernd stabile Aktivität (Abbildung 66).

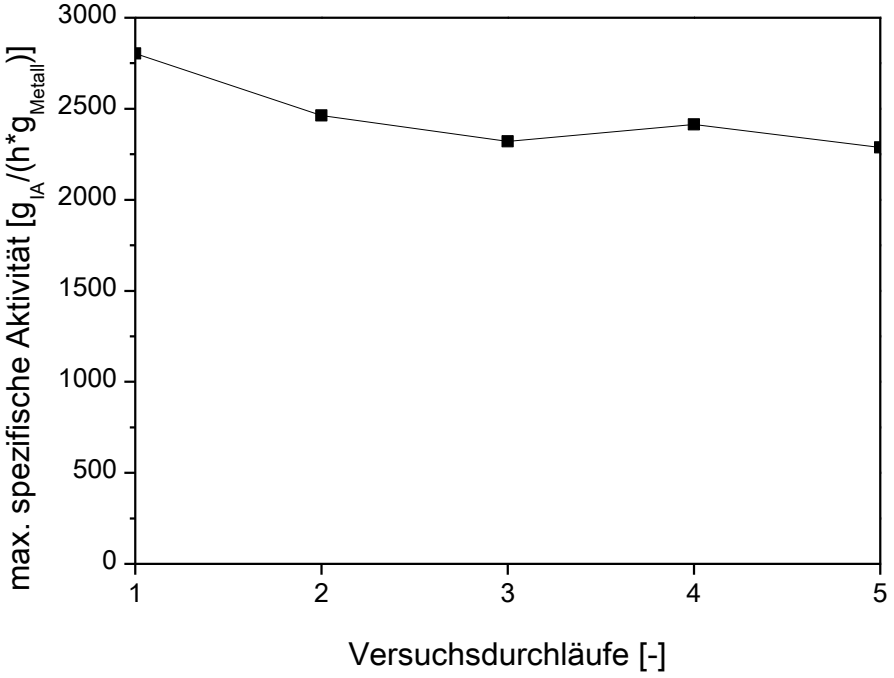


Abbildung 66: Darstellung der Langzeitstabilität durch Auftragung der max. spezifischen Aktivität gegenüber den Versuchsdurchläufen, 1 g 5 %Pd-Pt/SiO_2 (Sipernat 22) Katalysator, 5 bar H_2-Druck, 40°C, 50 g/L IA, 1 L Reaktionsvolumen)

Ein Grund für eine Abnahme der Aktivität eines Katalysators kann Metall-Leaching sein. Um dies zu untersuchen, wurden die Metallgehalte des Katalysators durch ICP-Messungen untersucht. Hierzu wurde ein Königswasseraufschluss des Katalysators durchgeführt und die Metallgehalte der Lösungen nach dem ersten Versuch und nach dem fünften Versuch verglichen. Der Metallgehalt der Katalysatoren nahm dabei um ca. 20 % von der Beladung nach dem ersten Einsatz bis nach dem fünften Versuchsdurchlauf ab und korreliert mit der Abnahme der max. spezifischen Aktivität des Katalysators nach diesen Versuchsdurchläufen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Abnahme des Metallgehaltes während des ersten Versuchsdurchlaufs aufgetreten ist, da die Aktivität nach dem ersten Versuchsdurchlauf nahezu konstant geblieben ist.

Um den Einfluss der zuvor beschriebenen Aufreinigung der Itaconsäurekristalle auf die Hydrierung zu untersuchen, wurde eine Versuchsreihe mit unaufgereinigten Itaconsäurekristallen und mit aufgereinigten Itaconsäurekristallen (Abbildung 52) durchgeführt und die maximalen spezifischen Aktivitäten gegenübergestellt. Zur Versuchsdurchführung wurde jeweils eine 5 % Itaconsäurelösung hergestellt und mit einem frisch angesetzten Katalysator unter den unten angegebenen Reaktionsbedingungen hydriert (Abbildung 67).

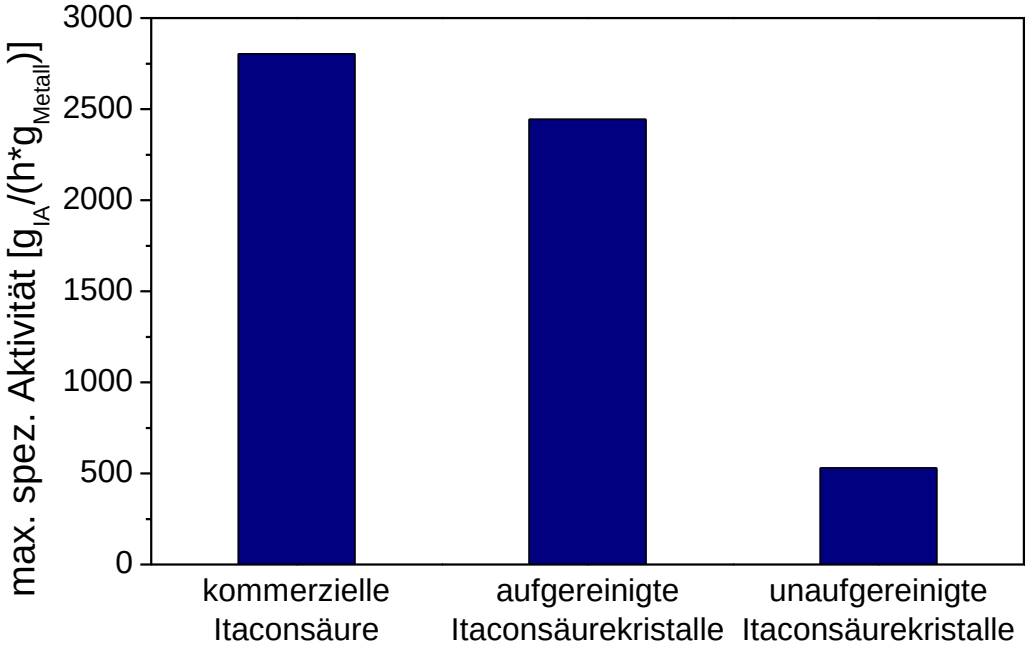


Abbildung 67: Darstellung der max. spezifischen Aktivität gegenüber den eingesetzten Reinheitsgrad der Itaconsäure, 1 g 5 % Pd-Pt/SiO_2 (Sipernat 22) Katalysator, 5 bar H_2-Druck, 40°C, 50 g/L IA, 1 L Reaktionsvolumen)

Es ist zu erkennen, dass der Katalysator bei der Hydrierung mit den aufgereinigten Itaconsäurekristallen eine ähnlich große Aktivität aufweist wie mit einer kommerziell erhältlichen Itaconsäure. Geringe Unterschiede sind dabei auf Fehler während der Katalysatorpräparation zurückzuführen. Bei der Hydrierung der Lösung der unaufgereinigten Itaconsäurekristalle weist der Katalysator eine deutlich geringere Aktivität auf.

Ein Vergleich der Aktivitäten zeigt, dass eine Aufreinigung der Itaconsäurekristalle für eine hohe Aktivität des Katalysators notwendig ist. Gründe für die geringere Aktivität des Katalysators können eine Belegung der aktiven Zentren oder Vergiftung der Katalysatoroberfläche durch Verunreinigungen aus der Fermentationsbrühe sein.

Die hergestellte Methylbernsteinsäure konnte, nachdem der Katalysator von der Reaktionslösung abgetrennt wurde, durch Kristallisation bei 5 °C mit einer Reinheit von >99 % gewonnen werden. Die somit hergestellte Methylbernsteinsäure wurde ohne weitere Aufreinigung in der Polykondensation von Itaconsäure verwendet.

Polykondensation von Itaconsäure und Methylbernsteinsäure mit 1,3- Propandiol

Wichtige Anwendungen für UP-Harze sind faserverstärkte Formteile, Halbzeuge oder Formmassen und Beschichtungen. Die Herstellung erfolgt in zwei Phasen. Die Umsetzung von Dicarbonsäuren mit Diolen mit Übergangsmetallkatalysatoren führt zu UP-Harzen. Handelsüblichen Polyesterharzen wird in der anschließenden Formulierung meistens eine bestimmte Menge Reaktivverdünner zugesetzt, um die Viskosität für eine bessere Verarbeitung und die Eigenschaften der Polyester einzustellen. Meistens wird dabei Styrol verwendet, welches gesundheitlich bedenklich ist. Nach der Formulierung wird mithilfe eines Beschleunigers und Einsatz eines Härters über die CC-Doppelbindung zu einem Duromer polymerisiert.

Die Anwendung von Itaconsäure in der Herstellung von UP-Harzen wurde bereits von (Farmer, Castle et al. 2015, Laurenzano 2016) untersucht. Durch Variation der UP-Harz-Zusammensetzung konnten Sie die Eigenschaften der Polyesterharze beeinflussen. Eine Anwendung von Itaconsäurepolyestern im Topcoatbereich könnte ebenfalls möglich sein. Ein Kriterium für den Einsatz von UP-Harzen als Topcoat ist die Flexibilität.

Ziel der durchgeführten Untersuchungen ist die Entwicklung von Itaconsäsäurederivaten und Verwendung dieser bei der Herstellung von UP-Harzen zur Erweiterung der Einsatzmöglichkeiten. Die Substition von Itaconsäure durch Methylbernsteinsäure führt zur Verringerung der Quervernetzungsdichte und ermöglicht somit eine größere Flexibilität des entstehenden Duromers. Erhöhte Flexibilität ist bei Anwendungen im Topcoatbereich notwendig.

Ein weiteres Ziel ist die Substitution des Styrols durch biobasierte Reaktivverdünner. In der Literatur wurde Dimethylitaconat bereits als Reaktivverdünner berichtet (Goerz and Ritter 2013, Laurenzano 2016). Daher sollten Dialkylitaconate aus Itaconsäure und Ethanol und Isopropanol hergestellt und ein kommerzielles Dibutylitaconat als Reaktivverdünner untersucht werden.

Die Schmelzpolykondensation von Itaconsäure, Methylbernsteinsäure und 1,3-Propandiol wurde durchgeführt (Abbildung 68). Hierzu wurde eine Standardprozedur angewendet, bei der die Säuren und das Diol im Verhältnis 1:1,1 (Säure:Diol (w/w)) bei 120 °C geschmolzen wurden. Anschließend wurde die Temperatur auf 180 °C erhöht und über die gesamte Reaktionsdauer gehalten. Der Druck wurde innerhalb von 180 Minuten auf 400 mbar gesenkt und das entstehende Wasser aus der Reaktionslösung abgezogen. Das überschüssige Wasser wurde durch Herabsenken auf ein Vakuum von <1 mbar über 60 Minuten entfernt. Es wurden 0,1 mol% Tetrabutyl-ortho-titanat-Katalysator zugegeben und der Druck über 90 Minuten auf 0,2 mbar reduziert und 60 Minuten gehalten.

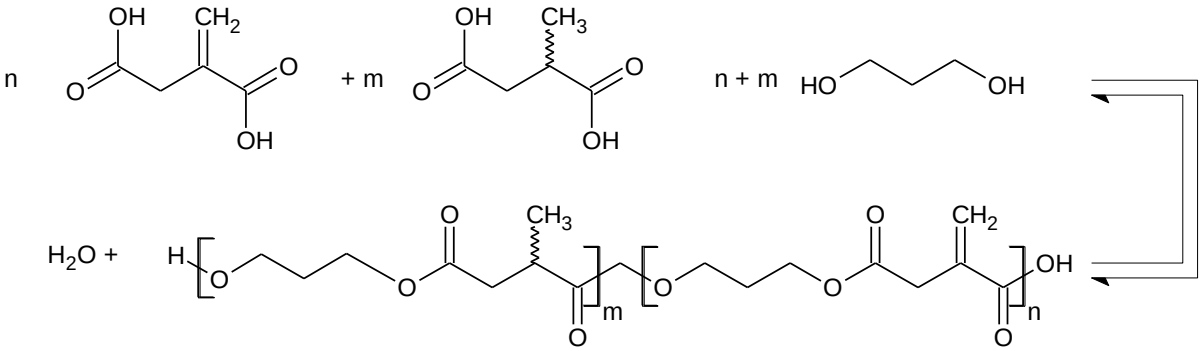


Abbildung 68: Reaktionsschema der Polykondensation von Itaconsäure, Methylbernsteinsäure und 1,3-Propandiol

Nach dieser Standardprozedur wurden die in Tabelle 31 dargestellten Polyesterharze hergestellt.

Tabelle 31: Anteile von Itaconsäure und Methylbernsteinsäure in den hergestellten Polyesterharzen mit 1,3-Propandiol

Säure	Anteil [%]				
Itaconsäure	100	75	50	25	0
Methylbernsteinsäure	0	25	50	75	100

Den hergestellten Polyesterharzen wurde 40 wt.-% Reaktivverdünner zugesetzt und so die Viskosität der Harze für eine bessere Verarbeitung eingestellt. Die Viskosität konnte für alle Polyesterharze auf eine Viskosität von ca. 1 Pa·s (25 °C) eingestellt werden und somit eine Viskosität eingestellt werden, die eine Topcoatanwendung ermöglicht. Zur Untersuchung der Materialeigenschaften wurde zu den Polyesterharzen mit dem Reaktivverdünner, 1 wt.-% einer 1 % Co-Oktoat-Lösung (Beschleuniger) zugegeben und mit 2 wt.-% Methylethylketonperoxid (MEKP(Härter)) über 24 Stunden bei 40 °C in einer Prüfkörperform (3,5·10·80 mm für Biegeprüfungen), (3,5·12,5·60 mm für Rheometerversuche) und (3,5·10·170 mm für Zugversuche) gehärtet. Die Nachhärtung erfolgte bei 100 °C über 48 Stunden. Die Härtung erfolgt radikalisch über die Doppelbindungen der Itaconsäuremoleküle im Polyesterharz (Abbildung 69). Dabei wird der Reaktivverdünner sukzessive in das entstehende Duromer eingebaut.

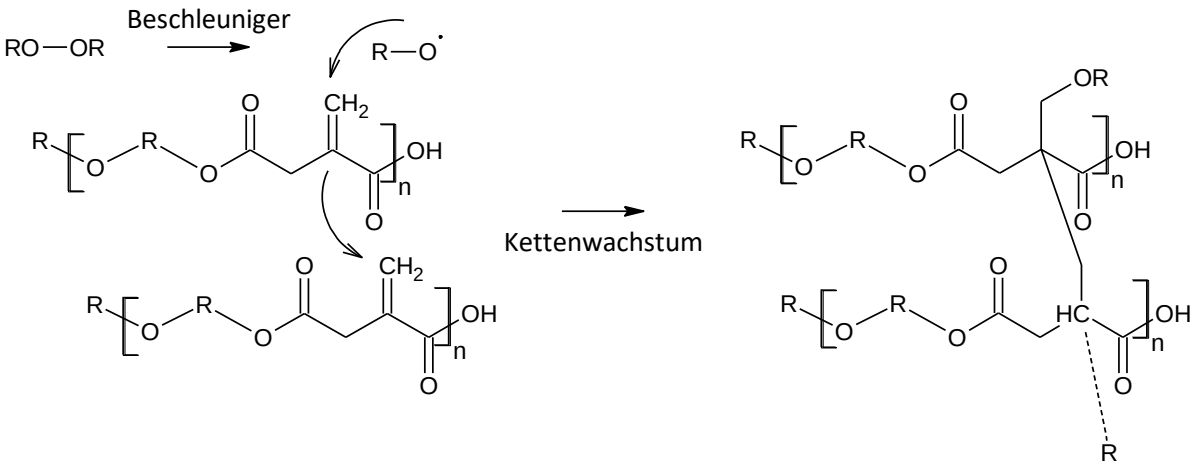


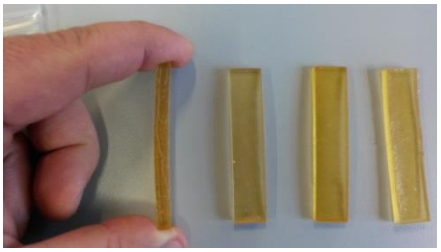
Abbildung 69: Reaktionsschema der Härtung der Polyesterharze

Durch Variation des Verhältnisses von Itacon- und Methylbernsteinsäure können die Eigenschaften der ausgehärteten Polyesterharze in weiten Bereichen eingestellt werden. Die Glasübergangstemperatur korreliert dabei mit der Quervernetzungsdichte. Durch Veränderung der Zusammensetzung des Polyesterharzes durch Verringerung des Itaconsäureanteils sinkt die Quervernetzungsdichte und somit die Glasübergangstemperatur der ausgehärteten Polyesterharze (Tabelle 32).

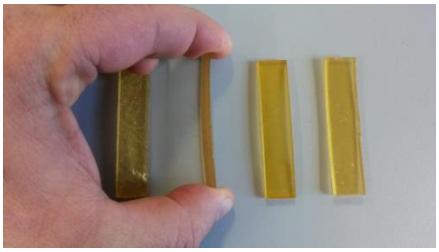
Tabelle 32: Glasübergangstemperaturen der gehärteten Polyesterharze

IA [%]	MSA [%]	T_g [°C] Dibutylitaconat	T_g [°C] Diethylitaconat	T_g [°C] Diisopropylitaconat
100	0	90 bis 92	103 bis 105	105 bis 106
75	25	82 bis 83	98 bis 100	107 bis 109
50	50	-6 bis -2	-8 bis -7	-7 bis -6
25	75	-25 bis -23	-13 bis -12	-17 bis -16

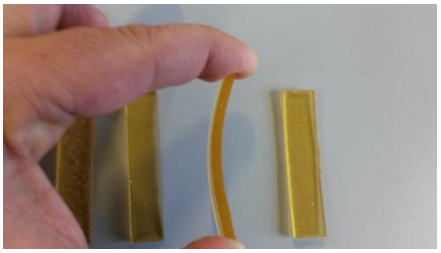
Dabei ist zu erkennen, dass nicht nur der Itaconsäuregehalt eine Veränderung in den Polymeren hervorruft, sondern auch der verwendete Reaktivverdünner einen Einfluss auf die Glasübergangstemperatur ausübt. In der Reihe der gehärteten Polyesterharze mit hohen Itaconsäureanteil ist ein Trend zu erkennen. Bei geringeren Itaconsäureanteilen und somit einer geringeren Quervernetzungsdichte ist kein klarer Trend zu erkennen. Die Verringerung des Itaconsäureanteils hat weiterhin Auswirkungen auf die Flexibilität der gehärteten Polyesterharze (Abbildung 70).



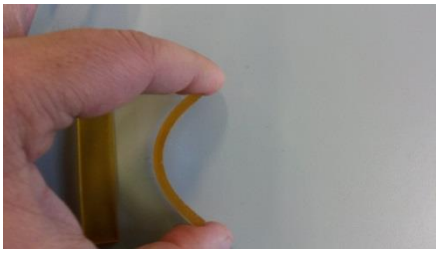
100 % IA-PD



75 % IA- 25 % MSA-PD



50 % IA- 50 % MSA-PD



25 % IA- 75 % MSA-PD

Abbildung 70: Flexibilität der gehärteten Polyesterharze

Die Eigenschaften der gehärteten Polyesterharze wurden im 3-Punkt-Biegeversuch nach DIN EN ISO 178 und im Zugversuch nach DIN EN ISO 527-1 bestimmt. Dabei konnte eine Abnahme der Biegemodule, Biegefestigkeit, Zugmodule und Zugfestigkeit sowie eine Zunahme der Bruchdehnung mit sinkendem Itaconsäureanteil beobachtet werden (Tabelle 33). Die Polyesterharze mit Dibutylitaconat weisen die geringsten Werte für die Module und Festigkeiten auf. Zum Vergleich sind Biegemodule und Biegefestigkeiten der Polyesterharze mit Diisopropylitaconat in Tabelle 34 und mit Diethylitaconat in Tabelle 35 aufgeführt.

Tabelle 33: Mechanische Eigenschaften der gehärteten Polyesterharze mit Dibutylitaconat

[MPa]	100 % IA	75 % IA 25 % MSA	50 % IA 50 % MSA	25 % IA 75 % MSA
Biegemodul [MPa]	7700	7200	400	27
Biegefestigkeit [MPa]	68	54	11	2
Zugmodul[MPa]	297	150	10,4	1,1
Zugfestigkeit [MPa]	3,5	3,1	2	0,2
Bruchdehnung [%]	0,8	2	13	22

Tabelle 34: Mechanische Eigenschaften der gehärteten Polyesterharze mit Diisopropylitaconat

	100 % IA	75 % IA 25 % MSA	50 % IA 50 % MSA	25 % IA 75 % MSA
Biegemodul [MPa]	9410	9230	2200	22
Biegefestigkeit [MPa]	73	66	34	Kein Bruch

Tabelle 35: Mechanische Eigenschaften der gehärteten Polyesterharze mit Diethylitaconat

	100 % IA	75 % IA 25 % MSA	50 % IA 50 % MSA	25 % IA 75 % MSA
Biegemodul [MPa]	11900	13400	979	25
Biegefestigkeit [MPa]	118	148	18	Kein Bruch

Es ist zu erkennen, dass durch eine kürzere Seitenkette im Reaktivverdünner bessere mechanische Eigenschaften in den gehärteten Polyesterharzen bewirkt werden können. Für die Prüfkörper mit den geringsten Itaconsäureanteilen kann keine Biegefestigkeit angegeben werden, da die Prüfung im zulässigen Bereich des Prüfgeräts zu keinem Bruch führte. Ein Vergleich der hergestellten Harze mit kommerziellen UP-Harzen zeigt, dass die Eigenschaften mit höheren Itaconsäureanteilen vergleichbare Werte für die Biegemoduli und Biegefestigkeiten aufzeigen. Lediglich im Zugversuch weisen die selbst hergestellten Polyesterharze geringere Werte auf. Die Polyesterharze mit geringeren Itaconsäureanteilen zeigen Werte für Moduli, Bruchdehnung und Festigkeiten im Bereich von Polyester-Topcoats(Tabelle 36).

Tabelle 36: mechanische Eigenschaften von kommerziellen Polyesterharzen

	konv. UP-Harz [1]	konv. Topcoat [2]
Biegemodul [MPa]	3500	900
Biegefestigkeit [MPa]	90	13
Zugmodul [MPa]	n.a.	n.a.
Zugfestigkeit [MPa]	55	12
Bruchdehnung [%]	2,5	30

[1] Viapal UP 223 BS/65 35 % Styrolgehalt ; [2] Disitron 420 C 25 % Styrolgehalt

Durch Variation der Itaconsäuregehalte in den Polyesterharzen und Veränderung des Reaktivverdünners konnte gezeigt werden, dass die Eigenschaften der gehärteten Polyesterharze durch den Methylbernsteinsäuregehalt und die Wahl des Reaktivverdünners beeinflusst werden können. Dies

ermöglicht Verwendungen als Laminierharz für faserverstärkte Formteile oder als Polyesterharz für Topcoatanwendungen. Durch einen unkomplizierten Prozess der Hydrierung von Itaconsäure sowie die einfache Polykondensation von Itaconsäure-Methylbernsteinsäure-Gemischen mit 1,3-Propandiol konnten mit einfachen Methoden Polyesterharze auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen hergestellt werden.

WP 7. Projektmanagement

Meilensteine

Dieses Projekt umfasste 8 Meilensteine, wobei 6 Meilensteine vom Thünen-Institut bearbeitet wurden. Meilenstein M1 befasste sich mit der Optimierung der Vorbehandlungsverfahren für ligninarme Reststoffe, Meilenstein M2 mit der Optimierung der Hydrolyseverfahren für Cellulose und Hemicellulose, anschließend wurde mit Meilenstein M4 das beste Enzym für einen SSF gewählt. Meilenstein M6 beschäftigte sich mit der Wahl des besten IA-Produzenten. Meilenstein M7 war das Mid-term assessment und Meilenstein M8 ist der Abschlussbericht.

- M1: Optimiertes Vorbehandlungsverfahren für ligninarme Reststoffe

Eine optimale Partikelgröße wurde durch Untersuchungen des Mahlgrades mit 0,75 mm festgestellt. Die Vorbehandlung von Weizenkaff mit 2 %iger Natronlauge für 24 h bei Raumtemperatur ist für die Fermentation zu Itaconsäure am besten geeignet, da bei dieser Methode keine Abbauprodukte entstehen und das Kaff nahezu vollständig hydrolysiert werden kann.

- M2: Optimiertes Hydrolyseverfahren für Cellulose, Hemicellulose (und Pektin)

Die Optimierung der enzymatischen Hydrolyse wurde mit Biogazyme 2x (ASA) durchgeführt. Eine maximale Zuckerkonzentration von 35 g/L bei einem Feststoffgehalt von 5 % wurde bestimmt. Eine Steigerung der Zuckerendkonzentration kann mit einer dosierten Zugabe von Enzym erfolgen. Durch die Enzymzugabe nach 24 bzw. 48 h können Zuckerkonzentrationen von 69 g/L und einem Verzuckerungsgrad (DOS) von 82 % bei einem Feststoffgehalt von 15 % erreicht werden. Während die initiale Zugabe von 20 FPU/g Biomasse 46 g/L und einem DOS von 54 % erreichen.

- M3: Wahl des besten Enzyms für die Hydrolyse von Orangenschalenresten

Ein speziell angepasstes Enzympräparat aus *P. funiculosum* zum Aufschluss und zur Verzuckerung von CPW wurde entwickelt.

- M4: Wahl des besten Enzyms für die simultane Verzuckerung und Fermentation (SSF)

Kommerziell erhältliche Enzymmischungen wurden für einen SSF untersucht. Dabei wurde die Aktivität der Cellulasen unter den Bedingungen für die Fermentation mit *A. terreus* und *U. maydis* bestimmt. Es zeigte sich, dass der sehr geringen pH-Werte von pH 3,1 bei der Kultivierung von *A. terreus* und für die niedrige geringe Temperatur von 30 °C bei *U. maydis* und *A. terreus* deutlich von optimalen Bedingungen für die Cellulasen abweichen. Die höchste Aktivität der kommerziellen Enzymmischungen zeigte Biogazyme2x von ASA Spezialenzyme. Aus diesem Grund wurde dieses für die IA-Bildung mittels SSF ausgewählt.

- M6: Wahl des besten IA-Produzenten

In einem Screening von Umweltisolaten auf Glucose wurde nach IA-Produzenten gesucht, jedoch traten keine IA-produzierenden Stämme hervor. Aus diesem Grund wurden Stämme der Abteilung Basidomycota aus weltweiten Stammsammlungen für ein weiteres Screening verwendet. Es zeigten sich

sechs IA-bildende *Ustilago*-Stämme, wobei alle schon in der Literatur als IA-Bildner beschrieben sind. Interessante Ustilago-Stämme waren *Ustilago maydis* DSM 17144 und *Ustilago rabenhorstiana NBRC 8995*. *U. maydis* zeigte den höchsten Endtiter und *U. rabenh*orstiana die niedrigste Rate an weiteren organischen Säuren als Nebenprodukt. Diese beiden Hefen wurden mit dem Eigenisolat *Aspergillus terreus* DSM 23081 verglichen, indem unterschiedliche Monosaccharide für die Kultivierung getestet, die hemmende Wirkung von Zuckerabbauprodukte aus der Rohstoffvorbehandlung untersucht und abschließend Kultivierungen auf synthetischen Hydrolysaten durchgeführt wurden. Dabei zeigte sich, dass *U. rabenho*rstiana und *A. terreus* deutlich mehr Monosaccharide als *U. maydis* für die IA-Produktion nutzen konnten. Insgesamt reagierten alle Mikroorganismen sehr empfindlich auf Zuckerabbauprodukte im Produktionsmedium. Aufgrund der deutlich höheren Ausbeute, Produktivität und somit auch finalen IA-Konzentration auf den synthetischen Hydrolysaten, wurde *A. terreus* als bester IA-Produzent ausgewählt.

- M7: Mid-term assessment

Das ERA-IB mid-term assessment wurde erfolgreich am 29.09.2014 in Brüssel durchgeführt.

- M8: Abschlussbericht

Ein gemeinsamer Abschlussbericht wurde für ERA-IB in Zusammenarbeit mit allen Partnern angefertigt. Der deutsche Abschlussbericht des Thünen-Institut ist dieses Dokument.

Verwertung

ASA:

Die wichtigsten verwertbaren Projektergebnisse sind die neu entwickelten Enzympräparate:

- ein speziell angepasstes Enzympräparat aus *P. funiculosum* zum Aufschluss und zur Verzuckerung von Kaff
- ein speziell angepasstes Enzympräparat aus *P. funiculosum* zum Aufschluss und zur Verzuckerung von CPW

Diese neuen Enzymprodukte können bei der Verwertung von Kaff und CPW zum Einsatz kommen und entsprechend vermarktet werden.

- eine neu entwickelte genrekombinante endo-Cellulase ohne Endprodukthemmung bei hohen Glukosekonzentrationen und hoher Aktivität bei pH von 7 und größer

Dieses Enzym kann in den Bereichen Biogas, Papierindustrie, Textilindustrie vermarktet werden. Es gibt derzeit kein Enzympräparat auf dem Markt mit diesen hervorragenden Eigenschaften im neutralen pH-Bereich.

Nach einer gentechnischen Optimierung des Produktionsstammes wird dieses Enzym potenziellen Anwendern für Testzwecke zur Verfügung gestellt.

TI:

Gegenüber der Ausgangssituation vor Beginn des Projektes konnten bedeutende Fortschritte erzielt werden:

- Die Natronlaugevorbehandlung konnte als besonders effektive Vorbehandlungsmethode herausgestellt werden. Insbesondere die erreichbaren Zuckerausbeuten auf Weizenkaff sowie die Vermeidung von Zucker-Abbauprodukten, welche die anschließende Fermentation inhibieren würden, stellen dieses Verfahren als besonders effektiv gegenüber anderen herkömmlichen Vorbehandlungsmethoden wie z.B. verdünnte Säure, Liquid Hot Water, Steam Explosion dar. Diese Methode könnte eine Standard-Vorbehandlungsmethode für anschließende Fermentationen werden. Durch Anwendung der Natronlaugevorbehandlung auf Weizenkaff und anschließende Fermentation mit dem besonders empfindlichen Pilz *Aspergillus terreus* konnte Itaconsäure ohne weitere Aufreinigung des Hydrolysats hergestellt werden. Hierzu wurden selbst hergestellte Hydrolysate, sowie reine Zuckerlösungen gleicher Zusammensetzung untersucht und verglichen. Jedoch erzielt *A. terreus* auf reinen Zuckern eine deutlich höhere Produktivität sowie Itaconsäureendkonzentration. Durch Aufreinigung der Hydrolysate mit Ionentauschern konnten ähnliche Produktivitäten und Produktkonzentrationen erreicht werden. Um die Kosten beim Einsatz von agrarischen Reststoffen, die im Gegensatz zu den reinen Zuckern nicht in Konkurrenz mit ihrer Anwendung in der Lebensmittel- oder Futtermittelindustrie stehen, für die Itaconsäurebildung weiter zu senken, ist es wichtig Produktivität und Titer weiter zu steigern.
- Die Hydrierung von Itaconsäure zu Methylbernsteinsäure konnte in einem einfachen und effektiven Prozess durchgeführt werden. Ferner wurde gezeigt, dass durch Polykondensation von Itaconsäure-Methylbernsteinsäure-Gemischen mit Diolen die Eigenschaften der Polyesterharze eingestellt werden können. Die gleichen Ausgangsstoffe erlauben dabei durch Variation der Säureverhältnisse eine Anwendung der Polyesterharze im Bereich der Laminierharze als auch im Topcoatbereich. Die Bandbreite der Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten von Polyestern aus nachwachsenden Rohstoffen konnte somit beträchtlich erweitert werden.
- Der Gesamtprozess bietet somit die Möglichkeit auf kostengünstigen in Deutschland zur Verfügung stehenden Rohstoffen biotechnisch Itaconsäure und Folgeprodukte zu produzieren.

Erkenntnisse von Dritten

Während dieser Projektlaufzeit wurden folgende relevante Reviews veröffentlicht, die aber auf die Durchführung unseres Vorhabens keinen Einfluss haben:

Alonso S, Rendueles M, Diaz M (2015) Microbial production of specialty organic acids from renewable and waste materials. Critical Reviews in Biotechnology 35(4):497-513 doi:10.3109/07388551.2014.904269

Anjum S., Tripathi S, ., Singh N, and, Gupta, K S (2016) Reactive extraction a boom for itaconic acid: A review. International Journal of Recent Scientific Research 7(5):11372-11376

Cordes T, Michelucci A, Hiller K (2015) Itaconic Acid: The Surprising Role of an Industrial Compound as a Mammalian Antimicrobial Metabolite. Annu Rev Nutr 35:451-473 doi:10.1146/annurev-nutr-071714-034243

Dawes GJS, Scott EL, Le Notre J, Sanders JPM, Bitter JH (2015) Deoxygenation of biobased molecules by decarboxylation and decarbonylation - a review on the role of heterogeneous, homogeneous and bio-catalysis. Green Chem 17(6):3231-3250 doi:10.1039/c5gc00023h

Delidovich I, Hausoul PJ, Deng L, Pfutzenreuter R, Rose M, Palkovits R (2016) Alternative Monomers Based on Lignocellulose and Their Use for Polymer Production. Chem Rev 116(3):1540-99 doi:10.1021/acs.chemrev.5b00354

Demain AL, Martens E (2016) Production of valuable compounds by molds and yeasts. J Antibiot doi:10.1038/ja.2016.121

Ferreira JA, Mahboubi A, Lennartsson PR, Taherzadeh MJ (2016) Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. Bioresource Technol 215:334-345 doi:10.1016/j.biortech.2016.03.018

Gupta A, Verma JP (2015) Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. Renew Sust Energ Rev 41:550-67

Jonsson LJ, Martin C (2016) Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. Bioresource Technol 199:103-1

Klement T, Büchs J (2013) Itaconic acid - A biotechnological process in change. Bioresource Technol 135:422-431 doi:10.1016/j.biortech.2012.11.141

Krull R (2015) Filaments in Bioprocess Book-1, vol 149. Springer, Hannover, Germany

Loow YL, Wu TY, Jahim JM, Mohammad AW, Teoh WH (2016) Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment. Cellulose 23(3):1491-520

Lopez-Garzon, C. S. and A. J. J. Straathof (2014). Recovery of carboxylic acids produced by fermentation. Biotechnology Advances **32**(5): 873-904.

Meyer V, Fiedler M, Nitsche B, King R (2015) The Cell Factory Aspergillus Enters the Big Data Era: Opportunities and Challenges for Optimising Product Formation. Filaments in Bioprocesses 149:91-132 doi:10.1007/10_2014_297

Mondala AH (2015) Direct fungal fermentation of lignocellulosic biomass into itaconic, fumaric, and malic acids: current and future prospects. J Ind Microbiol Biot 42(4):487-506 doi:10.1007/s10295-014-1575-4

Ramos JL, Udaondo Z, Fernandez B, Molina C, Daddaoua A, Segura A, Duque E (2016) First- and second-generation biochemicals from sugars: biosynthesis of itaconic acid. Microb Biotechnol 9(1):8-10 doi:10.1111/1751-7915.12333

Robert T, Friebel S (2016) Itaconic acid - a versatile building block for renewable polyesters with enhanced functionality. Green Chem doi:10.1039/C6GC00605A

Sheldon, R. A. (2016). Green chemistry, catalysis and valorization of waste biomass. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical 422: 3-12.

Steiger MG, Blumhoff ML, Mattanovich D, Sauer M (2013) Biochemistry of microbial itaconic acid production. Frontiers in microbiology 4:23

Straathof AJJ (2014) Transformation of Biomass into Commodity Chemicals Using Enzymes or Cells. Chemical Reviews 114(3):1871-1908 doi:10.1021/Cr400309c

Sun SN, Sun SL, Cao XF, Sun RC (2016) The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. Bioresource Technol 199:49-58

Zhang Q, Zhang PF, Pei ZJ, Wang DH (2013) Relationships between cellulosic biomass particle size and enzymatic hydrolysis sugar yield: Analysis of inconsistent reports in the literature. Renew Energ 60:127-36

Während dieser Projektlaufzeit wurden folgende relevante Paper veröffentlicht, die aber für die Durchführung dieses Vorhabens keinen Einfluss haben:

Bellasio M, Mattanovich D, Sauer M, Marx H (2015) Organic acids from lignocellulose: *Candida lignohabitans* as a new microbial cell factory. J Ind Microbiol Biot 42(5):681-691 doi:10.1007/s10295-015-1590-0

BioConSept (2016) BIOCONSEPT Integration of Bio-Conversion and Separation Technology for the production and application of platform chemicals from 2nd generation biomass. Grant Agreement number: 289194, FP7-CP-TP. www.bioconsept.eu

Brezaniova Z, Fiserova M, Stankovska M, Gigac J, Opalena E, Pugkelova J. (2016) Effect of Prehydrolysis on Enzymatic Hydrolysis of Two-Stage Pretreated Wheat Straw. Wood Res-Slovakia 61(5):697-708

Carstensen F, Klement T, Büchs J, Melin T, Wessling M (2013) Continuous production and recovery of itaconic acid in a membrane bioreactor. Bioresource Technol 137:179-87

Coimbra MC, Duque A, Saez F, Manzanares P, Garcia-Cruz CH, Ballesteros M. (2016) Sugar production from wheat straw biomass by alkaline extrusion and enzymatic hydrolysis. Renew Energ. 86:1060-8

Chen M, Huang X, Zhong C, Li J, Lu X (2016) Identification of an itaconic acid degrading pathway in itaconic acid producing *Aspergillus terreus*. Appl Microbiol Biotechnol doi:10.1007/s00253-016-7554-0

El-Imam MA, Kazeem MO, Odebisi M B, Oke MA, Abidoye OA (2013) Production of Itaconic Acid from Jatropha curcas Seed Cake by *Aspergillus terreus*. Notulae Scientia Biologicae 5(1):57-61

Folakemi Opa, A.E. (2014) The Production of Itaconic Acid from Sweet Potato Peel Using *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. Agricultural University of Tirana 13(4):72-77

Gao Q, Liu J, Liu LM (2014) Relationship Between Morphology and Itaconic Acid Production by *Aspergillus terreus*. J Microbiol Biotechn 24(2):168-176 doi:10.4014/jmb.1303.03093

Geiser E, Przybilla SK, Friedrich A, Buckel W, Wierckx N, Blank LM, Bolker M (2016) *Ustilago maydis* produces itaconic acid via the unusual intermediate trans-aconitate. Microb Biotechnol 9(1):116-126 doi:10.1111/1751-7915.12329

Geiser E, Wierckx N, Zimmermann M, Blank LM (2013) Identification of an endo-1,4-beta-xylanase of *Ustilago maydis*. Bmc Biotechnol 13 doi:Artn 59 10.1186/1472-6750-13-59

Ji WC, Shen ZM, Wen YJ. (2015) Hydrolysis of wheat straw by dilute sulfuric acid in a continuous mode. Chem Eng J. 260:20-7

Jimenez-Quero A, Pollet E, Zhao M, Marchioni E, Averous L, Phalip V (2016) Itaconic and Fumaric Acid Production from Biomass Hydrolysates by *Aspergillus* Strains. J Microbiol Biotechnol 26(9):1557-65 doi:10.4014/jmb.1603.03073

Karaffa L, Diaz R, Papp B, Fekete E, Sandor E, Kubicek CP (2015) A deficiency of manganese ions in the presence of high sugar concentrations is the critical parameter for achieving high yields of itaconic acid by *Aspergillus terreus*. Appl Microbiol Biot 99(19):7937-7944 doi:10.1007/s00253-015-6735-6

Li, S., et al. (2015). Aqueous-phase hydrogenation of biomass-derived itaconic acid to methyl-gamma-butyrolactone over Pd/C catalysts: Effect of pretreatments of active carbon. Catalysis Communications **61**: 92-96.

Liu, X., et al. (2016). A sustainable process for the production of 2-methyl-1,4-butanediol by hydrogenation of biomass-derived itaconic acid. Catalysis Today **274**: 88-93.

Le Notre, J., et al. (2014). Synthesis of Bio-Based Methacrylic Acid by Decarboxylation of Itaconic Acid and Citric Acid Catalyzed by Solid Transition-Metal Catalysts. Chemsuschem **7**(9): 2712-2720.

Maassen N, Panakova M, Wierckx N, Geiser E, Zimmermann M, Bölker M, Klinner U, Blank LM (2013) Influence of carbon and nitrogen concentration on itaconic acid production by the smut fungus *Ustilago maydis*. Engineering in Life Sciences:n/a-n/a doi:10.1002/elsc.201300043

Maassen N, Panakova M, Wierckx N, Geiser E, Zimmermann M, Bölker M, Klinner U, Blank LM (2014) Influence of carbon and nitrogen concentration on itaconic acid production by the smut fungus *Ustilago maydis*. Engineering in Life Sciences:n/a-n/a doi:10.1002/elsc.201300043

Magalhaes, A. I., et al. (2016). Separation of Itaconic Acid from Aqueous Solution onto Ion-Exchange Resins. Journal of Chemical and Engineering Data 61(1): 430-437

Qi BK, Chen XR, Yi S, Wan YH (2014) Inhibition of Cellulase, b-Glucosidase, and Xylanase Activities and Enzymatic Hydrolysis of Dilute Acid Pretreated Wheat Straw by Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation Products. Environ Prog Sustain.33(2):497-503

Rajan K, Carrier DJ. (2014) Effect of dilute acid pretreatment conditions and washing on the production of inhibitors and on recovery of sugars during wheat straw enzymatic hydrolysis. Biomass Bioenerg 62:222-7

Songserm P, Thitiprasert S, Tolieng V, Piluk J, Tanasupawat S, Assabumrungrat S, Yang ST, Karnchanatat A, Thongchul N (2015) Regulating Pyruvate Carboxylase in the Living Culture of *Aspergillus Terreus* Nrrl 1960 by l-Aspartate for Enhanced Itaconic Acid Production. Appl Biochem Biotech 177(3):595-609 doi:10.1007/s12010-015-1763-3

Sun T, Li XJ (2015) Study on production of itaconic acid with *Aspergillus terreus* utilizing glucose. Res J Biotechnol 10(5):108-116

Tippkotter N, Duwe AM, Wiesen S, Sieker T, Ulber R (2014) Enzymatic hydrolysis of beech wood lignocellulose at high solid contents and its utilization as substrate for the production of biobutanol and dicarboxylic acids. Bioresource Technol 167:447-455 doi:10.1016/j.biortech.2014.06.052

Toquero C, Bolado S. (2014) Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. Bioresource Technol 157:68-76

Xin Li KZ, Chenhuan Lai, Jia Ouyang, Qiang Yong (2016) Improved Itaconic Acid Production from Undetoxified Enzymatic Hydrolysate of Steam-Exploded Corn Stover using an *Aspergillus terreus* Mutant Generated by Atmospheric and Room Temperature Plasma. Bioresources 11(4): 9047-9058

Uslu, H. and D. Datta (2015). Experimental and Theoretical Investigations on the Reactive Extraction of Itaconic (2-Methylidenebutanedioic) Acid Using Trioctylamine (N,N-Dioctyloctan-1-amine). Journal of Chemical and Engineering Data **60**(5): 1426-1433.

Veröffentlichungen

Teile der Forschungsergebnisse wurden auf Tagungen/Konferenzen präsentiert:

- S. Krull, A. Brockmann, A. Hevekerl , A. Kuenz, U. Prüße, K-D.Vorlop (2015) “Biotechnological itaconic acid production from hydrolysates”, 3rd European Congress of Applied Biotechnology, Poster, Nizza, Frankreich
- S. Krull, L. Eidt, A. Hevekerl, A. Kuenz, J. Oetken, H. Storz; U. Prüße (2016) “Biotechnological itaconic acid production from wheat chaff hydrolysate”, 12th Renewable Resources & Biorefineries Conference, Poster, Gent, Belgien
- J. Oetken, H. Storz, U. Prüße (2016), “Optimization of common chemical pretreatments to enhance the enzymatic hydrolysis of wheat chaff” 12th Renewable Resources & Biorefineries Conference, Poster, Gent, Belgien
- J. Oetken (2016) Spreustrohforum
- M. Ciaston, U. Prüße, H. Storz (2016), „Prozess zur Synthese von Polyesterharzen mit einstellbarer Härte auf Basis von Itaconsäure", ProcessNet - Jahrestagung und 32. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, Vortrag, Aachen, Deutschland
- S. Krull, L. Eidt, A. Kuenz, J. Oetken, H. Storz, U. Prüße (2016), "Biotechnologisch erzeugte Itaconsäure aus agrarischen Reststoffen", ProcessNet - Jahrestagung und 32. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, Vortrag, Aachen, Deutschland
- J.Oetken, H.Storz, U.Prüße (2016), „Optimierung von bekannten Vorbehandlungen für die Weizenkaff-Hydrolyse“ ProcessNet - Jahrestagung und 32. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, Poster, Aachen, Deutschland

Die Forschungsergebnisse wurden in Fachjournalen veröffentlicht:

- Ciaston, M., Prüße, U. and Storz, H. (2016), Prozess zur Synthese von Polyesterharzen mit einstellbarer Härte auf Basis von Itaconsäure. Chemie Ingenieur Technik, 88: 1230. doi:10.1002/cite.201650120
- Krull, S., Eidt, L., Kuenz, A., Oetken, J., Storz, H. and Prüße, U. (2016), Biotechnologisch erzeugte Itaconsäure aus agrarischen Reststoffen. Chemie Ingenieur Technik, 88: 1232. doi:10.1002/cite.201650140
- Oetken, J., Storz, H. and Prüße, U. (2016), Optimierung von bekannten Vorbehandlungen für die Weizenkaff-Hydrolyse. Chemie Ingenieur Technik, 88: 1238. doi:10.1002/cite.201650121

Geplante Veröffentlichungen in Fachjournalen (in Bearbeitung):

- Martin Ciaston, Henning Storz, Ulf Prüße: Vorläufiger Titel: Synthesis of unsaturated Polyester resins with flexible properties based on itaconic acid
- S. Krull, L. Eidt, A. Hevekerl, A. Kuenz, J. Oetken, H. Storz; U. Prüße, Vorläufiger Titel: “Biotechnological itaconic acid production from wheat chaff hydrolysate” (geplante Veröffentlichung in: Process Biochemistry)
- J.Oetken, H.Storz, U.Prüße „Biomass pretreatment – the key to enhance the enzymatic hydrolysis of wheat chaff: Comparison and optimization of common chemical pretreatments” (geplante Veröffentlichung in: Biomass & Bioenergy)
- Gemeinsame Publikationen mit den Projektpartnern sind geplant.
- Eine Patentanmeldung für die isolierte endo-Cellulase wird derzeit geprüft (ASA).

Literaturverzeichnis

Apelblat, A. and E. Manzurola (1997). "Solubilities of L-aspartic, DL-aspartic, DL-glutamic, p-hydroxybenzoic, o-anistic, p-anisic, and itaconic acids in water from T = 278 K to T = 345 K." Journal of Chemical Thermodynamics **29**(12): 1527-1533.

Bledzki, A. K., et al. (2010). "Physical, chemical and surface properties of wheat husk, rye husk and soft wood and their polypropylene composites." Composites Part a-Applied Science and Manufacturing **41**(4): 480-488.

Carlsson, M., et al. (1994). "Study of the sequential conversion of citric to itaconic to methacrylic acid in near-critical and supercritical water." Industrial & Engineering Chemistry Research **33**(8): 1989-1996.

Cody, G. D., et al. (2001). "Geochemical roots of autotrophic carbon fixation: hydrothermal experiments in the system citric acid, H2O-(±FeS)−(±NiS)." Geochimica et Cosmochimica Acta **65**(20): 3557-3576.

Dawes, G. J. S., et al. (2015). "Deoxygenation of biobased molecules by decarboxylation and decarbonylation - a review on the role of heterogeneous, homogeneous and bio-catalysis." Green Chemistry **17**(6): 3231-3250.

Dickman, S. R. (1952). "Photometric Determination of Aconitic Acid with Potassium Permanganate." Analytical Chemistry **24**(6): 1064-1066.

Duetz, W. A., et al. (2000). "Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates." Applied and Environmental Microbiology **66**(6): 2641-2646.

Dwiarti, L., et al. (2007). "Itaconic acid production using sago starch hydrolysate by Aspergillus terreus TN484-M1." Bioresource Technology **98**(17): 3329-3337.

Farmer, T., et al. (2015). "Synthesis of Unsaturated Polyester Resins from Various Bio-Derived Platform Molecules." International Journal of Molecular Sciences **16**(7): 14912.

Geilen, F. M. A., et al. (2010). "Selective and Flexible Transformation of Biomass-Derived Platform Chemicals by a Multifunctional Catalytic System." Angewandte Chemie International Edition **49**(32): 5510-5514.

Ghose, T. K. (1987). "Measurement of Cellulase Activities." Pure and Applied Chemistry **59**(2): 257-268.

Goerz, O. and H. Ritter (2013). "Polymers with shape memory effect from renewable resources: crosslinking of polyesters based on isosorbide, itaconic acid and succinic acid." Polymer International **62**(5): 709-712.

Guevarra, E. D. and T. Tabuchi (1990). "Accumulation of Itaconic, 2-Hydroxyparaconic, Itatartaric, and Malic-Acids by Strains of the Genus Ustilago." Agricultural and Biological Chemistry **54**(9): 2353-2358.

Gyamerah, M. H. (1995). "Oxygen requirement and energy relations of itaconic acid fermentation by Aspergillus terreus NRRL 1960." Applied Microbiology and Biotechnology **44**(1-2): 20-26.

Hames, B., et al. (2008). "Determination of Protein Content in Biomass." Laboratory Analytical Procedure (LAP), National Renewable Energy Laboratory.

Hevekerl, A., et al. (2014). "Influence of the pH on the itaconic acid production with Aspergillus terreus." Applied Microbiology and Biotechnology **98**(24): 10005-10012.

Ikada, Y., et al. (1987). "Stereocomplex Formation between Enantiomeric Poly(Lactides)." Macromolecules **20**(4): 904-906.

Jonsson, L. J., et al. (2013). "Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification." Biotechnology for Biofuels **6**.

Jurchescu, I. M. (2014). 2,3-Butanediol Production with GRAS Microorganisms – Screening, Cultivation, Optimization and Scale - Up –. Fakultät für Lebenswissenschaften, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Kirshenbaum, K. S. and K. B. Sharpless (1985). "Improved procedure for the tungstate-catalyzed epoxidation of .alpha.,.beta.-unsaturated acids." The Journal of Organic Chemistry **50**(11): 1979-1982.

Klement, T., et al. (2012). "Biomass pretreatment affects Ustilago maydis in producing itaconic acid." Microbial Cell Factories **11**.

Köhl, W. (1899). "Ueber Umlagerungen bei den ungesättigten Säuren. XIV. Oxydation zweibasischer ungesättigter Säuren." Justus Liebigs Annalen der Chemie **305**(1): 41-52.

Kristensen, J. B., et al. (2009). "Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose." Biotechnology for biofuels **2**(1): 1-10.

Kuenz, A. (2008). Itaconsäureherstellung aus nachwachsenden Rohstoffen als Ersatz für petrochemisch hergestellte Acrylsäure, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig**:** 162.

Kuenz, A., et al. (2012). "Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations." Applied Microbiology and Biotechnology **96**(5): 1209-1216.

Kumar, R., et al. (2009). "Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies." Bioresource Technology **100**(17): 3948-3962.

Kumar, R. and C. E. Wyman (2009). "Does change in accessibility with conversion depend on both the substrate and pretreatment technology?" Bioresource Technology **100**(18): 4193-4202.

Laurenzano, G. (2016). Entwicklung ungesättigter Polyesterharze aus nachwachsenden Rohstoffen.

Le Notre, J., et al. (2014). "Synthesis of Bio-Based Methacrylic Acid by Decarboxylation of Itaconic Acid and Citric Acid Catalyzed by Solid Transition-Metal Catalysts." Chemsuschem **7**(9): 2712-2720.

Lloyd, T. A. and C. E. Wyman (2005). "Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids." Bioresource Technology **96**(18): 1967-1977.

Lohrasbi, M., et al. (2010). "Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products." Bioresource Technology **101**(19): 7382-7388.

Maassen, N., et al. (2014). "Influence of carbon and nitrogen concentration on itaconic acid production by the smut fungus Ustilago maydis." Engineering in Life Sciences **14**(2): 129-134.

Maki-Arvela, P., et al. (2007). "Catalytic deoxygenation of fatty acids and their derivatives." Energy & Fuels **21**(1): 30-41.

McCarthy, J. L. and A. Islam (2000). Lignin chemistry, technology, and utilization: a brief history. ACS Symposium Series, Washington, DC; American Chemical Society; 1999.

Mosier, N., et al. (2005). "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass." Bioresource Technology **96**(6): 673-686.

Oguchi, T., et al. (1989). "Epoxidation of α,β-Unsaturated Carboxylic Acids with Hydrogen Peroxide by Heteropoly Acids." Chemistry Letters **18**(11): 2053-2056.

Okabe, M., et al. (2009). "Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in Aspergillus terreus." Applied Microbiology and Biotechnology **84**(4): 597-606.

Oludipe, J. O. (1997). "Analysis of products distribution and selectivity in maleic acid epoxidation by hydrogen peroxide in catalytic systems." Journal of Chemical Technology & Biotechnology **70**(3): 261-266.

Pan, X. J. (2008). "Role of functional groups in lignin inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose to glucose." Journal of Biobased Materials and Bioenergy **2**(1): 25-32.

Park, Y. S., et al. (1993). "Effect of dissolved-oxygen concentration and impeller tip speed on itaconic acid production by Aspergillus terreus." Biotechnology Letters **15**(6): 583-586.

Payne, G. B. and P. H. Williams (1959). "Reactions of Hydrogen Peroxide. IV. Sodium Tungstate Catalyzed Epoxidation of α,β-Unsaturated Acids." The Journal of Organic Chemistry **24**(1): 54-55.

Primo, A., et al. (2011). "Synergy between the metal nanoparticles and the support for the hydrogenation of functionalized carboxylic acids to diols on Ru/TiO2." Chemical Communications **47**(12): 3613-3615.

Ramirez, R. S., et al. (2013). Fundamentals of biomass pretreatment at high pH. Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals. C. E. Wyman, John Wiley & Sons, Ltd.**:** 145-167.

Roh, H. S., et al. (2011). "The effect of calcination temperature on the performance of Ni/MgO-Al2O3 catalysts for decarboxylation of oleic acid." Catalysis Today **164**(1): 457-460.

Rychtera, M. and D. A. J. Wase (1981). "The growth of Aspergillus terreus and the production of itaconic acid in batch and continuous cultures. The influence of pH." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **31**(1): 509-521.

Sannigrahi, P. and A. J. Ragauskas (2013). Fundamentals of biomass pretreatment by fractionation. Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals. C. E. Wyman, John Wiley & Sons, Ltd.**:** 201-222.

Sluiter, A., et al. (2008). "Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples." Laboratory Analytical Procedure (LAP), National Renewable Energy Laboratory.

Sluiter, A., et al. (2006). "Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples." National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.

Sluiter, A., et al. (2008). "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass; National Renewable Energy Laboratory (NREL): Golden, CO, 2008." There is no corresponding record for this reference.

Trajano, H. L. and C. E. Wyman (2013). Fundamentals of Biomass Pretreatment at Low pH. Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals. C. E. Wyman, John Wiley & Sons, Ltd**:** 103-128.

van der Pol, E. C., et al. (2014). "By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio)chemicals and fuels." Applied Microbiology and Biotechnology **98**(23): 9579-9593.

Wang, L. M., et al. (2011). "Highly efficient production of D-lactate by Sporolactobacillus sp. CASD with simultaneous enzymatic hydrolysis of peanut meal." Applied Microbiology and Biotechnology **89**(4): 1009-1017.

Wasewar, K. L., et al. (2011). "Reactive Extraction of Itaconic Acid Using Quaternary Amine Aliquat 336 in Ethyl Acetate, Toluene, Hexane, and Kerosene." Industrial & Engineering Chemistry Research **50**(2): 1003-1011.

Wyman, C. (1996). Handbook on bioethanol: production and utilization, CRC press.

Wyman, C. E. (1994). "Alternative fuels from biomass and their impact on carbon dioxide accumulation." Applied Biochemistry and Biotechnology **45**(1): 897-915.

Wyman, C. E. (2007). "What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol." Trends in Biotechnology **25**(4): 153-157.

Wyman, C. E., et al. (2005). "Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover." Bioresource Technology **96**(18): 2026-2032.

Yang, B. and C. E. Wyman (2008). "Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol." Biofuels, Bioproducts and Biorefining **2**(1): 26-40.

ANHANG (NUR bei gemeinsamem Schlussbericht von Verbundvorhaben erforderlich)[1]

Erzielte Ergebnisse der nicht deutschen Projektpartner

Biopolis

Biopolis war an WP1, WP2, WP3, WP4 und WP6 beteiligt und war der Projektkoordinator (WP7). Die Hauptergebnisse werden hier zusammengefasst:

WP 1. Rohstoffe

Biopolis übernahm die regelmäßige Versorgung der Projektpartner mit Orangenschalenresten (OPW) von spanischen Erzeugern. NREL und weitere gravimetrische Analysen wurden verwendet, um das Substrat (Wasserinhalt, Asche, Lipide, Cellulose, Hemicellulose, Pektin, Lignin,) zu charakterisieren. Verschiedene Chargen wurden analysiert und es zeigten sich nur sehr geringe Unterschiede in der Zusammensetzung.

WP 2. Screening für Enzyme und Mikroorganismen

Die Auswahl an Mikroorganismen für die Fermentation mit Glycerin wurde beendet. Stämme von *Paenibacillus pabuli* und *Sporobacillus terrae* wurden als die besten Erzeuger für D-MS ausgewählt. Mehrere genauere Untersuchungen wurden mit diesen Stämmen durchgeführt, um die Neuheit und Einfallsreichtum zu demonstrieren und die Stämme für die Produktion von D-MS zu patentieren. Das Patent wird redigiert und wird vor Ende des Jahres präsentiert.

Das Screening und die Auswahl an verbesserten Produzenten durch zufällige Mutagenese brachten keine verbesserten Biokatalysatoren hervor. Aus diesem Grund wurden die Prozessentwicklung und –optimierung mit den Wildtyp-Stämmen weiter bearbeitet.

Bezüglich der D-MS Produktion aus Zuckern wurden Untersuchungen mit Stamm 286 auf synthetischem OPW-Hydrolysat durchgeführt. Dieser Stamm wurde an UCM für die Optimierung der Fermentation übergeben und wurde von Biopolis für die Prozessentwicklung genutzt.

WP 3 Fermentation für D-MS und IA-Produktion

Die ersten Fermentationen wurden mit Stamm 286 in einem synthetischen OPW-Medium durchgeführt, welches die Zucker enthielt, die im OPW-Hydrolysat gefunden wurden. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, indem der pH-Wert während der gesamten Fermentation konstant auf pH 5.8 gehalten wurde. Der Stamm wuchs und produzierte D-MS sogar bei hohen Temperaturen, z.B. bei 45 ºC. Aus diesem Grund wurde der Stamm für eine simultane Verzuckerung und Fermentation (SSF) ausgewählt. Der SSF wurde mit einer Separaten Hydrolyse und Fermentation (SHF) mit OPW verglichen. Die besten Ergebnisse wurden mit der SHF-Konfiguration erzielt, so dass der SHF als Verfahrensweise ausgewählt wurde.

WP 4 Prozessentwicklung und Scale-up

Die Optimierung der Fermentation und der Scale-up für die D-MS wurden anfänglich mit synthetischem OPW-Hydrolysat und anschließend mit realen OPW Hydrolysat als Substrat durchgeführt. Die Fermentation mit dem synthetischen Hydrolysat wurde in einem 1.5-L Bioreaktor im Fed-Batch-Modus durchgeführt. Bis zu 25 g/L Milchsäure, wurden mit einer Reinheit von 100 % e.e. D-MS erhalten. Es wurden weitere Fermentationen mit dem OPW-Hydrolysat im 1.5-L Bioreaktor durchgeführt, in dem das Hydrolysat nach Protokollen von UCM hergestellt wurde. Auch diese Fermentation wurde im Fed-Batch-Modus durchgeführt.

Bis zu 30 g/L MS mit einer Reinheit von 100 % D-MS e.e. wurden erhalten. Jedoch konnten noch Inhibierungseffekte nachgewiesen werden und somit wurden mehrere Optimierungen in Zusammenarbeit mit UCM durchgeführt. Die Inocculum-Präparation und die Vorbehandlung der OPW waren kritisch und mehrere Änderungen wurden im Prozess umgesetzt.

Maisquellwasser wurde im finalen Prozess als Ersatz für teurere Stickstoffquellen verwendet. Mit dieser optimierten Fermentation konnten bis zu 102 g/L von MS mit einer Reinheit von 100 % e.e. D-MS erzielt werden. Diese Reaktion wurde in einen 20 L Bioreaktor übertragen und die Ausbeute sowie der Titer wurden bestätigt. Alle Daten wurden gesammelt und EKO für die LCA und LCC zur Verfügung gestellt.

UCM

Die Complutense Universität hat an mehreren Arbeitspaketen gearbeitet: Substratcharakterisierung, Verzuckerung der Proben und Optimierung (WP1), Fermentation für D-MS und IA Produktion (WP3), Optimierung der Fermentationsproszesse (WP4) und Produktisolierung, Aufreinigung und Veredelung (WP5).

Bezüglich der Substratvorbehandlungen hat sich UCM in WP1 mit der nassen Vorbehandlung des Weizenkaffs in der Kollaboration mit dem TI Braunschweig beschäftigt. Dabei wurde eine Nassvermahlung und das Verfahren der Steam-explosion (SE) ausgewählt, und die Temperatur sowie die Anzahl von Zyklen variiert. Auf der anderen Seite beschäftigte sich UCM mit der Verwendung von OPW. Diese wurden durch klassische Vorbehandlungen (Mahlen, SE, liquid hot water oder Mikrowellenaufschluss) und Pyrolyseverfahren (Torrefizierung, teilweiser Trocknung) behandelt. Für das Weizenkaff wurde eine SE bei 6 atm und 175 ºC durchgeführt. Für zwei Zyklen zeigte sich die höchste Ausbeute an Glucose, während das beste Ergebnis für OPW mit einer Zerkleinerung durch eine Messermühle und eine anschließende Trocknung auf 60-70 % Wassergehalt erreicht wurde. Mehrere HPLC Techniken wurden durchgeführt, um alle Proben zu analysieren.

In demselben Arbeitspaket wurde die Optimierung der enzymatischen Verzuckerung betrachtet, da diese von äußerster Bedeutung für die Wirtschaftlichkeit aller Prozesse ist. Somit wurde ein großes Augenmerk auf WP1 gelegt. Diverse Betriebsparameter wurden untersucht: Rühren, pH-Wert und dessen Kontrolle, Temperatur, Feststoffanteil, batch- vs. fed-batch- Betrieb und Enzymmischungsoptimierung (sowohl mit den Enzymen von Novozymes als auch von ASA Spezialenzyme). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass das mechanische Rühren von Bedeutung ist, wenn hohe Erträge an Monosacchariden erzielt werden sollen, während mittlere Konzentrationen an Pectinasen, und ein niedriges bis mittleres Cellulasen Niveau, erforderlich sind. Temperatur und pH-Wert hatten eine geringere Auswirkung, wenn die Werte innerhalb einer bestimmter Größenordnung lagen (45-55ºC, pH 4,5-5,5). Sirupe, die auf diesem Wege in produziert wurden, konnten effektiv für die D-MS Produktion in 1L-Bioreaktoren eingesetzt werden.

Bezüglich der Produktion von D-MS (WP 3 und 4), wurde sich nach einem Screening für den Stamm *Lactobacillus delbruekii delbruekii* entschieden. Die Untersuchungen wurden mit einem synthetischen OPW-Hydrolysat durchgeführt. Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Medienzusammensetzung und

Fermentationsbedingungen wurden durchgeführt, um die optimalen Bedingungen für die Fermentation festzulegen (40 ºC und ein kontrollierter pH-Wert von pH 5,8 mit Ammoniumhydroxid als Base). Auch die Präparation des Inoculums wurde untersucht und es zeigte sich, dass dies ein Schlüsselschritt für eine geringe Nebenproduktbildung ist.

Die Ergebnisse auf synthetischem Hydrolysat müssen noch mit den Ergebnissen auf realem Hydrolysat verglichen werden. Zum aktuellen Zeitpunkt sind noch viele Punkte zu klären. Aus diesem Grund hat UCM beim spanischen Ministerium (MINECO) um eine Verlängerung des Projektes gebeten. Für WP 5 wurde die Aufreinigung und die Aufarbeitung für D-MS in zwei parallelen Ansätzen untersucht: Einerseits wurde zellfreiem Medium mit D-MS Methanol und Schwefelsäure hinzugefügt, um Ammoniumsulfat und Methyllactat auszufällen. Diese Strategie resultierte in reiner D-MS, wie bereits in der Literatur beschrieben, wobei aber große Mengen an Methanol dafür erforderlich sind. Andererseits wurde nach der Zellabtrennung Calciumchlorid hinzugefügt. So entstand bei niedrigen Temperaturen Calciumlactat als Feststoff und eine Calciumchloridlösung. Die nachfolgende Behandlung des Feststoffes mit verdünnter H_2SO_4 in Gegenwart von n-Butanol führte zu einem $CaSO_4$ Niederschlag und Butyllactat, dessen Hydrolyseertrag reines D-MS war. Die so erhaltene Säure wurde für die Oligomerisation in einem thermisch katalytischen Prozess verwendet, um Vorpolymer und Dimere für die D-MS Endpolymerisation zu erhalten.

H2B

Im Rahmen des POAP-Projektes beschäftigte H2Biyotek sich mit der Entwicklung von Vorbehandlungsmethoden, enzymatischer Hydrolyse von Orangenschalenabfall (OPW) und der Herstellung und Trennung von D-Milchsäure aus der Fermentation von OPW-Hydrolysat.

Vorbehandlungsmethoden und enzymatische Hydrolyse

Zu Beginn des Projekts wurden Vorbehandlungsmethoden und enzymatische Hydrolyse mit mehreren Substraten mit unterschiedlichem Ligningehalt (Maiskolben, Sonnenblumenkernschalen und Sägemehl) als Referenz untersucht Die alkalische Vorbehandlung wurde als eine geeignete Methode herausgefunden. Anhand der Glucoseausbeuten des Verfahrens wurden Maiskolben als das beste Referenzsubstrat unter den oben erwähnten mit 25% Umsatz von Glucose ausgewählt.

In den letzten zwei Jahren des Projektes wurde Orangenschalenabfall (OPW) für die Vorbehandlung und das enzymatische Hydrolyseverfahren mit ASA Biogazyme 2x und ASA Pektinase L-40 untersucht.

Vor der enzymatischen Hydrolyse wurden mehrere Vorbehandlungsverfahren angewendet, um Limonen zu entfernen:

- Nur Entfernen des Flavedo-Teils des Orangenschalenabfalls,
- Extrahieren mit organischen Lösemitteln (mit Hexan),
- Extrahieren mit siedendem Wasser (liquid hot water (LHW)),
- Dampfbehandlung,
- Auswaschen mit Ethanol.

Auswaschen mit Methanol erwies sich als die am besten geeignete Methode, Die Glukosekonzentrationen des mit Dampf behandelten variierten zwischen 12 g/L und 15 g/L und die enzymatische Hydrolyse von mit Ethanol behandelten OPW führte zu etwa 30 g/L Glucose. Beide Hydrolyseverfahren wurden mit einem 25 %-igen Enzym-Trockengewichtsverhältnis durchgeführt.

Anschließend wurden für die enzymatische Hydrolyse von OPW Optimierungsstudien durchgeführt. Zuerst wurde das Enzym-Trockengewichtsverhältnis in bestimmten Intervallen von 25% auf 2,5% gesenkt, und die optimale Menge wurde als 5 %-iges Enzym-Trockengewichtsverhältnis bestimmt. Konzentrationen an Glucose und insgesamt fermentierbarem Zucker (Glucose, Xylose, Galactose, Arabinose) von etwa 20 g/l bzw. 31 g/l wurden unter Verwendung dieser Enzymmenge erreicht.

Weiterhin wurde, um die Zuckerkonzentration und den Titer der Milchsäure entsprechend zu erhöhen, das Recycling von enzymatischem Hydrolysat untersucht. Ein 3-stufiges Recycling (24-Stunden-Hydrolyse für jede Stufe mit der Verwendung von 5 % Enzymbeladung / Biomasse) erfolgte durch Zugabe von frischen OPW und frischem Enzym (etwa 60 g/l Glucose und 89 g/l gesamte fermentierbare Zuckerausbeute) und nur durch Zugabe von frischen OPW (50 g/l Glucose und 62 g/l Gesamtmenge an fermentierbarem Zucker).

Im letzten Projektjahr erhielt H2B neue Lactobacillus-Stämme. Es wurde beobachtet, dass es nicht notwendig war, ein Limonen-Entfernungsverfahren anzuwenden, um Milchsäure durch diese Stämme zu erzeugen.

Fermentation zur Milchsäureerzeugung

Zu Beginn des Projektes erfolgte die Milchsäurefermentation unter Verwendung des aus der enzymatischen Hydrolyse von LHW erhaltenen Hydrolysats als Referenzstudie. Am Ende der Fermentation wurde fast 90% Umsatz erreicht. Unterdessen wurde, um die Kosten des Fermentationsverfahrens zu reduzieren, Hefeextrakt, der eine wichtige Proteinquelle für Milchsäurebakterien ist, aus dem Abfall von Brauerhefe während der Milchsäureherstellung hergestellt.

Anschließend wurden Fermentationsexperimente unter Verwendung von vorbehandeltem OPW-Hydrolysat, MRS- und TGY-Medien durchgeführt. Basierend auf der Menge der Stickstoffquelle und dem Lactobacillus-Stamm dauerte die Fermentation 1 bis 7 Tage. In den Fermentationen mit vorbehandeltem (LHW) OPW-Hydrolysat wurde maximal 7,4 % Milchsäure aus 10 % Glucose erreicht.

Durch die Anwendung verschiedener Vorbehandlungsverfahren wurden unterschiedliche Fermentationsausbeuten erhalten. Das effizienteste dieser Verfahren war die Auswaschung mit Ethanol. Bei dieser Methode betrug die höchste Ausbeute an Milchsäure 74 %. Bei den Fermentationsexperimenten, die mit diesen neuen Stämmen durchgeführt wurden, wurde beobachtet, daß es nicht notwendig ist, das Limonen vorher zu entfernen. Fermentationsexperimente mit dem Hydrolysat, das mit Ethanol vorbehandelt wurde, und mit dem Hydrolysat, das ohne Anwendung einer Limonen-Entfernungsmethode hergestellt worden war, wurden durchgeführt. Die Ausbeuten waren höher als 90 %, wenn die Stämme von *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* und *Lactobacillus plantarium* verwendet wurden.

Trennung und Aufreinigung

In den ersten beiden Projektjahren wurde zur Reinigung der Milchsäure ein Kristallisationsverfahren untersucht (Milchsäure in Form von Ca-D-Lactat). Dabei wurde mit Fermentationslösungen aus der Umsetzung von reiner Glucose und den erhaltenen Fermentationslösungen der Hydrolysate von LHW gearbeitet. In diesem Verfahren störten andere in dem Fermentationsmedium verbleibende ungenutzte Kohlenhydrate vermutlich die Kristallisation von Calcium-D-lactat, und es wurde keine Kristallisation nach 24 h bei 4 °C beobachtet.

Im letzten Jahr des Projekts wurde die Reaktivextraktion zur Reinigung von Milchsäure untersucht, wodurch eine höhere Extraktionseffizienz im Vergleich zu anderen herkömmlichen Trennverfahren erzielt wurde. Bei

diesem Verfahren wurden hauptsächlich tertiäre Amine und Natriumsalze verwendet. Das Verfahren wurde im Erlenmeyerkolben bei 25 °C, 150 U/min in Schüttelinkubatoren bei pH-Werten von pH 1 und pH 2 durchgeführt. Milchsäure bzw. Na-Lactat wurden mit einer 25 % igen Ausbeute erhalten.

EKO

Haupttätigkeiten von Ekodenge waren wie folgt:

WP4 und WP6:

- Datenerfassung: Vervollständigung des Datenbestands der einzelnen Partner für 1-Kg-Produkt
- Analysen und Diskussionen von aktualisierten Input- und Output-Strömen durch die Systemgrenzen für D-MS und IA
- Datenentwicklung mit der Datenbank Ecoinvent für den Vergleich mit Refernzprozessen
- Literaturrecherche von Fermentation und Produktion von D-MS und IA und deren Polymerisation im Industriemaßstab
- LCA Datensätze wurden gesammelt
- Identifizierung der LCC Methodik im Detail und Schaffung eines Berechnungsmoduls
- Die Einflussbewertungen wurden abgeschlossen

LCA:

Die Daten zur LCA-Bewertung für erdölbasierte Polymere wurden evaluiert, um einen Benchmark für die PIA und PMS zu erhalten und diese Prozesse bewerten zu können.

LCC:

- Entwicklung der Methodik für LCC gestützt auf aktuellen Bewertungstechniken
- Darstellung der funktionellen Formulierungen im Prozess mit passenden Annahmen für Input- und Output-Ströme
- Ermittlung von Einflusskategorien auf die Einheitskosten und Prozesskosten pro Einheit

EPESUS Software für LCA und LCC-Analysen:

- Integration der letzten Datenbank von Ecoinvent und Einflussbewertungsmethoden in die neue Plattform
- Schaffung und Spezialisierung des LCC Moduls, das auf Rohstoff, Produktion, Investition, Wartung und Nutzungsphase und Entsorgung gestützt ist
- Integration des LCC Moduls in EPESUS
- Entwicklung von erneuerten Ansichtsdesigns und Schnittstellen, sowie erforderlichen Revisionen.
- Arbeiten zu REST-(Representational State Transfer)Architektur, um die Leistung zu vergrößern und das Modulmanagement zu verbessern
- Entwicklung der Datenveranschaulichung, um das Entscheidungssystem zu unterstützen
- Verwendung der Ergebnisse für eine umfassende Benchmarkanalyse von PIA und PMS Produktion für LCA und LCC

Fazit des Gesamtvorhabens

Ziel des Projektes war die Entwicklung von effizienten und wirtschaftlichen Prozessen zur fermentativen Herstellung von Itaconsäure und D-Milchsäure aus ligninarmen agrarischen Reststoffen. Dabei wurde in zwei Fallbeispielen untersucht, wie sich Itaconsäure aus Weizenkaff und D-Milchsäure aus Orangenschalenresten herstellen lassen.

Die Fermentationen mit Orangenschalenresten-Hydrolysat zeigten, trotz der Zugabe von komplexen N-Quellen, Inhibierungsprobleme, was weitere Vorbehandlungsoptimierungen erforderlich machte. Unter optimierten Bedingungen konnten bis zu 102 g/L Milchsäure mit einer Reinheit von 100 % e.e. D-Milchsäure erzielt werden. Zur Aufreinigung der D-Milchsäure wurden Kristallisationsverfahren sowie Reaktivextraktion untersucht, wobei mit letzterer eine höhere Extraktionseffizienz im Vergleich zu anderen herkömmlichen Trennverfahren erzielt werden konnte.

Die chemische Vorbehandlungsmethoden sowie die enzymatischen Hydrolyse wurde für den Reststoff Weizenkaff ebenfalls optimiert. Mit diesem aufgereinigten Weizenkaff-Hydrolysat konnten 27,7 g/L Itaconsäure fermentativ hergestellt werden. Zur Aufreinigung der Itaconsäure wurden Kristallisationsverfahren untersucht.

Beim Vergleich der LCA/LCC Daten ergaben sich für den Prozess Itaconsäure aus Weizenkaff höhere Werte für das GWP sowie für den Wasser- und Primärenergiebedarf. Die geringeren Werte für Orangenschalen spiegeln in erster Linie die hohen Anteile freier, leicht fermentierbarer Zucker in diesem Substrat wider, die nicht durch Hydrolyse aus der enthaltenen Kohlenhydrate (Cellulose und Hemicellulose) gewonnen werden müssen. Es gelang die Entwicklung von speziell adaptierten Enzympräparaten für die Verbesserung der Hydrolyse sowohl Weizenkaff als auch von Orangenschalenresten. Da die Steigerung der Effizienz der Enzyme im Vergleich zu konventionellen bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht im erforderlichen Umfang möglich war, erfordert die Gewinnung von Itaconsäure aus Weizenkaff mehr Ressourcen. Signifikant bessere Werte wurden bei Einsatz von Glucose als Substrat erreicht. Bis entsprechend effizientere Enzyme zur Verfügung stehen, stellt dieses Substrat eine Alternative zu reinen Lignocellulosesubstraten dar.

Die katalytische Veredelung von Itaconsäure zeigte, dass bei der Decarboxylierung und Epoxidierung, aufgrund von schwer zu kontrollierenden Nebenreaktionen, die Selektivitäten und Ausbeuten noch kein wirtschaftlich verwertbares Niveau erreichten. Anders stellt es sich bei der Hydrierung dar. Die so erhaltene Methylbernsteinsäure lässt sich mit für Polymeranwendungen ausreichende Reinheit und Ausbeute herstellen und zu Copolyestern mit neuen thermischen und mechanischen Eigenschaften verarbeiten, die den Einsatzbereich von Itaconsäure im Bereich der biobasierten Polymere deutlich erweitert. In aktuellen Forschungsarbeiten und Projekten werden zurzeit neue Anwendungen für Methylbernsteinsäure erforscht.

Während der Projektlaufzeit wurde die Zusammenarbeit innerhalb des Konsortiums intensiviert und es fand ein reger Austausch von Methoden und Ergebnissen statt, die auch Gegenstand von gegenwärtig erstellten Publikationen zur Vorbehandlung und enzymatischen Hydrolyse von Reststoffen sind (TI und UCM). Bei den Projektpartner TI und UCM haben mehrere Studierende ihre Doktorarbeit durchgeführt. ASA hat seine Palette an marktfähigen Enzymen erweitert, die nun auf andere Bereiche wie Biogas-, Papier- und Textilindustrie angewendet werden können. Bei BP implizieren die Maßstabsvergrößerung und das Patent, das vorbereitet wird, eine engere Position zum Markt in Bezug auf die Polymerindustrie. Die Teilnahme am Projekt ermöglichte EKO die Weiterentwicklung der EPESUS-Software für die ökologische und ökonomische

Bewertung von Bioprozessen. Mit Hilfe der in der LCA/ LCC entwickelten Methodik wurden frühzeitig Engpässe, bzw. verfahrenstechnische Probleme aufgezeigt, die für das Verständnis dieser und ähnlich gelagerter Prozesse von großem Interesse sind. Die über die gesamte Prozesskette hinweg generierten Daten sind für die Projektpartner äußerst wertvoll, da sie bereits in frühen Projektphasen fundierte Entscheidungen zur Wahl effizienterer Verfahrensvarianten möglich machen.