



Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften

Studiengang Lebensmittel- und Bioprodukttechnologie

SS 2013

Masterthesis

**Untersuchungen zum SSF – Prozess der simultanen Verzuckerung und Vergärung von
Cellulose zu Ethanol auf Basis von Weizenkleie als Substrat mit einem ausgewählten
Hefestamm**

Urn:nbn:de:gbv:519-thesis2013-0121-4

Verfasser: Manuel Meißner

Betreuer: Prof. Dr. Klaus Zimmer

Dr. Gerhard Kerns

Leipzig,

17.08.2013

Abstract

Producing lignocellulosic ethanol is one of the recent subjects in biotechnology research. Therefore, a SSF – process for wheat bran as the substrate was designed with dry yeast and cellulases from *Penecillium verruculosum*. The aim was, to reach a maximum of ethanolproduction at a time of 72 hours and installing a feed – rhythm. It turns out, that the enzymes were stable all over the fermentation time, and the yeasts only needs 24 hours to produce the bulk of the possible ethanol – concentration. A yield of nearly 27 % was reached by adding amylase in a prehydrolysis and glucosidase in a 42 l – scale without using feeds. As a plus, no salt was needed to be add to the fermentation medium, because the mains water contains enough of the needed substances. There is some potential of optimization, because a third of the used wheat bran consists of hemicellulose. But to use this potential a genetic engineered microorganisms is necessary.

Inhalt

Abstract	1
Verzeichnis der verwendeten Formelzeichen, Symbole und Abkürzungen	4
Formelzeichen und Symbole	4
Abkürzungen	4
1 Einleitung	6
2 Stand der Wissenschaft und Technik	7
2.1 Weizenkleie	7
2.2 Enzyme	8
2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
2.4 <i>Penecillium verruculosum</i>	9
2.5 SSF – Prozess	10
2.6 Analytik	11
2.6.1 Zellzahlbestimmung	11
2.6.2 Gaschromatographie	12
2.6.3 Enzymaktivität (FPA - Filterpapieranalyse)	13
2.6.4 Reduzierende Zucker	14
3 Material und Methoden	15
3.1 Material.....	15
3.1.1 Geräte.....	15
3.1.2 Chemikalien und Mikroorganismen	16
3.2 Methoden	17
3.2.1 Schüttelkolbenversuche	17
3.2.2 Fermentation im 5 l – Bioreaktor.....	20
3.2.3 Fermentation im 42 l – Bioreaktor.....	22
3.2.4 Zellzahlbestimmung.....	28
3.2.5 Gaschromatographie	28
3.2.6 Enzymaktivität (FPA)	29
3.2.7 Reduzierende Zucker	29
4 Ergebnisse	30
4.1 Schüttelkolbenversuche	30
4.2 Fermentationen im 5 l – Braunreaktor.....	37
4.3 Fermentationen im 42 l - Bioreaktor	41
5 Zusammenfassung und Ausblick	49

6 Mögliche industrielle Umsetzung des Verfahrens	51
7 Literaturverzeichnis.....	54
8 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	57
Verzeichnis der Abbildungen	57
Verzeichnis der Tabellen	58
9 Verzeichnis der Anlagen	59
9.1 Rohdaten der Schüttelkolbenversuche.....	60
9.2 Rohdaten der Versuche im 5 l – Bioreaktor	61
9.2.1 batch 01	61
9.2.2 batch 02	63
9.2.3 batch 03	64
9.3 Rohdaten und Diagramme der Versuche im 42 l – Bioreaktor	65
9.3.1 V 1	65
9.3.2 V 2	68
9.3.3 V 3	71
9.3.4 V 4	74
9.3.5 V 5	76
9.3.6 V 6	79
9.3.7 V 7	82
Selbstständigkeitserklärung.....	85

Verzeichnis der verwendeten Formelzeichen, Symbole und Abkürzungen

Formelzeichen und Symbole

c_{Produkt}	Konzentration des Produktes
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
M	Molarität
U	Units, Einheit für Enzymaktivität
v/v	Volume/Volume, Konzentrationsangabe Volumen je Volumen
V_R	Reaktionsvolumen
w/v	Weight/Volume, Konzentrationsangabe Masse je Volumen
X	Ausbeute in %

Abkürzungen

AUC	Area Under Curve (Peakfläche)
batch	Fermentationsversuch
DCU	Digital Control Unit
Dest. Wasser	Destilliertes Wasser
DNS	3,5-Dinitrosalicylsäure
EtOH	Ethanol
FID	Flammenionisationsdetektor
FPA	Filterpapieranalyse

GC	Gaschromatographie
H155	Interne Bezeichnung für den Haushefestamm von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , kultiviert auf Schrägagarröhrchen
Hrsg.	Herausgeber
LW	Leitungswasser
MKC	mikrokristalline Cellulose
<i>P. v.</i>	<i>Penicillium verruculosum</i>
PV10	Interne Bezeichnung für das Cellulasekonzentrat von <i>P. v.</i>
RS	Reduzierende Zucker
SK	Schüttelkolben
SK_V	Schüttelkolben – Versuch
SSF	Simultaneous Saccharification and Fermentation
TG	Trockengewicht
TH	Trockenhefe
<i>T. r.</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
TS	Trockensubstanz
UK41	Ultrakonzentrat 41, interne Bezeichnung für das Cellulasekonzentrat von <i>T. r.</i>
V	Versuch
Vgl.	Zum Vergleich
WK	Weizenkleie
ZfT	Zuckerforschung Tulln

1 Einleitung

Um die Lebensmittelpreise nicht weiter zu erhöhen und die Konkurrenz um Anbaufläche zu entschärfen, soll Ethanol in Zukunft verstärkt aus lignocellulosehaltigen Pflanzenresten, wie z. B. Stroh, gewonnen werden. Der hauptsächliche verwertbare Anteil dieser Pflanzenreste besteht nicht aus Stärke, sondern aus Cellulose. Cellulose, ein Polysaccharid, ist der auf der Erde am häufigsten vorkommende biologische, nachwachsende Stoff. An Verfahren zum Aufschluss und dem Nutzen dieser Biomasse wird seit den 70er Jahren geforscht. Die Bedingungen sind allerdings schwierig, da die Substrate meist komplex vorliegen und der verwertbare Anteil schwer zugänglich ist. [2] In dieser Arbeit werden für ein solches Verfahren Untersuchungen durchgeführt. Aus dem Substrat Weizenkleie, welches bei einem Kooperationspartner des SIAB (Sächsisches Institut für Biotechnologie e. V., 1997 in Leipzig gegründet [14]) in Mengen von 55000 Tonnen pro Jahr anfällt, soll Ethanol der zweiten Generation gewonnen werden. [9] Weizenkleie ist ein Nebenprodukt, welches beim Mahlen des Getreidekorns frei wird. Neben 10,3 % verwertbarer Cellulose enthält es einen noch unbekannten Anteil an Stärke. [8] Es ist ein SSF – Prozess vorgesehen, der die Verzuckerung des Celluloseanteils durch technische Enzyme, und die Verstoffwechselung der freien Zuckermoleküle durch die Hefen in einem Bioreaktor zusammenführt. Als technische Enzyme werden Cellulasekomplexe eingesetzt, welche von *Penecillium verruculosum* stammen.

Das Ziel der Arbeit ist es, Erkenntnisse zum Prozess, zur Abbaubarkeit des Substrates und der Ethanolausbeute zu gewinnen. Dabei sollen erreichbare Alkoholausbeuten in Bezug auf die eingesetzte Weizenkleie angegeben, und Prozessparameter entwickelt werden.

2 Stand der Wissenschaft und Technik

2.1 Weizenkleie

Als Weizenkleie (Abbildung 1) werden die Rückstände bezeichnet, die nach dem Mahlen von Weizenkorn zurückbleiben. Das sind vor allem die Samenschalen. [1] Sie bestehen aus Polymeren wie Lignin, Cellulose und Stärke. Aufgrund dieser Ballaststoffe wird Kleie auch als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt. [7] Die für diese Untersuchungen verwendete Weizenkleie enthält die in Tabelle 1 dargestellten Inhaltsstoffe. Nachgewiesen wurden u. a. Lignin, Cellulose und Hemicellulose. Letztere addiert ergeben den Holocelluloseanteil. Die nicht analysierten 29,1 % bestehen u. a. aus Stärke und Protein.

Tabelle 1: Bestandteile Weizenkleie in % [8]

	Weizenkleie
TG_{nicht extrahiert}	89,0
Extraktanteil	9,2
Ligninanteil	6,2
Celluloseanteil	10,3
Holocelluloseanteil	43,5
Hemicelluloseanteil	33,2
Gesamtprozentanteil	58,9



Abbildung 1: Weizenkleie

Damit Weizenkleie als Substrat eingesetzt werden kann, ist es nötig, die enthaltene Cellulose freizulegen und zu hydrolysieren. Dies sollen im vorliegenden Prozess Enzymkomplexe des Pilzes *Penicillium verruculosum* übernehmen. Diese Enzyme spalten die β -glykosidischen Bindungen der Glucosemoleküle (Vgl. Strukturformel Cellulose, Abbildung 2), sodass den Hefen frei verfügbarer Zucker zugeführt werden kann. Dabei ist zu beachten, dass Lignin, als der sogenannte Holzstoff der Pflanzen, bei zu hoher Konzentration die Fermentation behindern kann. Lignin wird mit Cellulose in die Zellwand eingelagert und sorgt dort für die Festigkeit der pflanzlichen Zellen. Als Nebenprodukt bei Fermentationen von lignocellulosehaltiger Biomasse kann es als Brennstoff oder zur Herstellung anderer Biopolymere genutzt werden. [11]

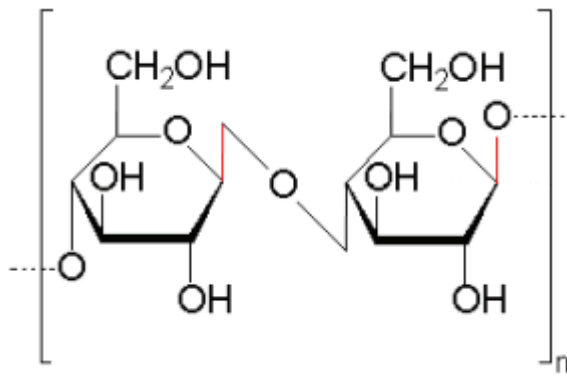


Abbildung 2: Strukturformel Cellulose [46]

Um den verwertbaren Teil des Rohstoffs zu erreichen, werden Aufschlussverfahren eingesetzt. Diese dienen dem Ziel, die Ligninstrukturen des eingesetzten lignocellulosehaltigen Substrats so weit aufzubrechen, dass Enzyme wie Cellulasen oder Chemikalien die Hydrolyse der Cellulose durchführen können. Weiterhin sollen Lignin und Hemicellulose abgespalten werden, da vor allem der Holzstoff die Fermentation inhibiert. [5] Nach Stroeve, 2009, ist eine Vorbehandlung des Substrates, also ein Aufschlussverfahren, sehr wichtig, da dadurch Kosten und Effizienz des Gesamtprozesses gesenkt werden können. [17] Es gibt verschiedene Verfahren, wie man die Ligninstrukturen aufbrechen kann. Zu den physikalischen Methoden zählen u.a. Zermahlen oder Erhitzen, zu den Physikochemischen vor allem die sogenannte Steam Explosion. Dieses Verfahren wird mit sehr heißem Wasserdampf unter erhöhtem Druck durchgeführt, und ist die derzeit am weitesten verbreitete Vorbehandlungsmethode für lignocellulosehaltige Biomasse. Chemische Methoden wie Säure- oder Laugenverfahren, sowie der Einsatz von heißem Wasser runden das Spektrum der Verfahren ab. [17]

2.2 Enzyme

Um lignocellulosehaltige Stoffe einer Vergärung zuführen zu können, müssen die cellulosehaltigen Anteile der Biomasse verzuckert werden. Das geschieht in der Mikrobiologie vor allem mit Enzymen (Abbildung 3). Zu nennen sind dabei Endoglucanasen, Cellobiohydrolasen und β-Glucosidasen. Stärke wird dagegen durch Amylasen und α-Glucosidasen in Monomere zerlegt. In der Natur kommen sogenannte Enzymkomplexe, z.B. aus den Pilzen *Penicillium verruculosum* oder *Trichoderma reesei*, vor, welche aus einem Komplex von verschiedenen großen Anteilen der genannten Enzyme bestehen.

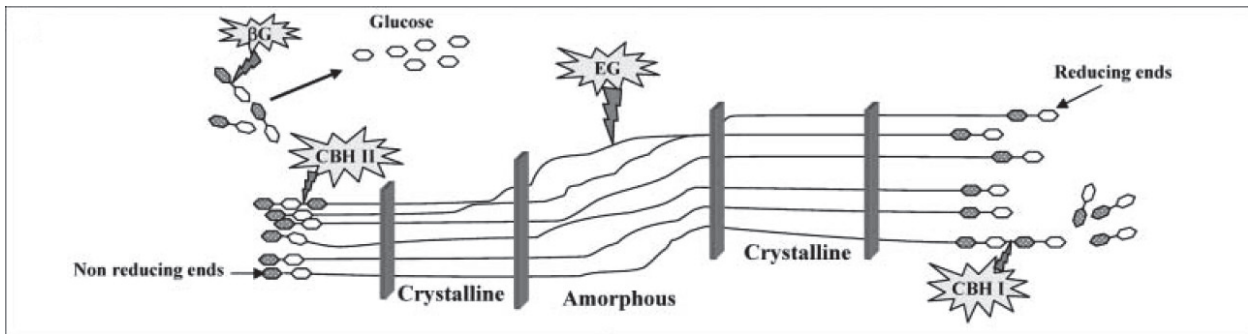


Abbildung 3: Enzymatische Hydrolyse von Cellulose. β G – β -Glucosidase, CBH I/II – Cellobiohydrolase, EG - Endoglucanase [12]

2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae ist die bekannte Bäckerhefe. Sie gehört zu den Modellorganismen und wird den Eukaryoten zugeordnet. Die Hefen können sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen leben. Sie wird, wie allgemein bekannt, beim Backen verwendet, damit der Teig durch Kohlenstoffdioxidbildung „aufgeht“, als auch zum Bier brauen, wo sie den Alkohol produziert. Hefe kann man auf Agarplatten oder als Schrägagarkolonie anzüchten und lagern, oder in Form von Trockenhefe einsetzen. Die Vorteile dieses Produktionsorganismus‘ sind seine hohe spezifische Ethanolbildungsrate von bis zu 1,3 g/g Zellmasse und Stunde, sowie seine Toleranz gegenüber Inhibitoren und hohen Alkoholmengen (einige Stämme überleben Konzentrationen von über 100 g/l). [11] Nachteilig ist, dass genetisch unveränderte Hefen lediglich Glucose zu Ethanol vergären können. Daher wird an Fermentationsstämmen gearbeitet, die in der Lage sind, auch Pentosen zu verstoffwechseln. [11] Ein solcher Stamm ist für die Verwendung der Kohlenhydrate als Substrat aus Lignocellulose deutlich effizienter, allerdings ist der Einsatz solcher gentechnisch veränderten Mikroorganismen in dieser Arbeit nicht vorgesehen.

2.4 *Penicillium verruculosum*

Penicillium verruculosum ist ein filamentös wachsender Pilz, welcher den Deuteromyceten zugeordnet wird. Bei Vorlage cellulosehaltigen Substrates produziert er Exocellulasen, die im sogenannten „down – stream proessing“ mittels Separation und Cross – Flow – Filtration abgetrennt und aufkonzentriert werden können. Diese Enzymkomplexe haben eine erhöhte β -Glucosidaseaktivität, was die Cellobiosekonzentration gering hält. [50] Aufgrund einer noch

vorhandenen partiellen C – Katabolitrepression ist es derzeit noch nicht wirtschaftlich, diesen Cellulaseproduzenten industriell zu produzieren.

2.5 SSF – Prozess

Der SSF – Prozess (Simultaneous Saccharification and Fermentation, Abbildung 4) ist ein Verfahren, welches eine zweistufige Herstellungsverfahren in einem Schritt vereint, nämlich die Hydrolyse von Biomasse und die anschließende Verstoffwechselung der Hydrolyseprodukte zum gewünschten Endprodukt. [11]

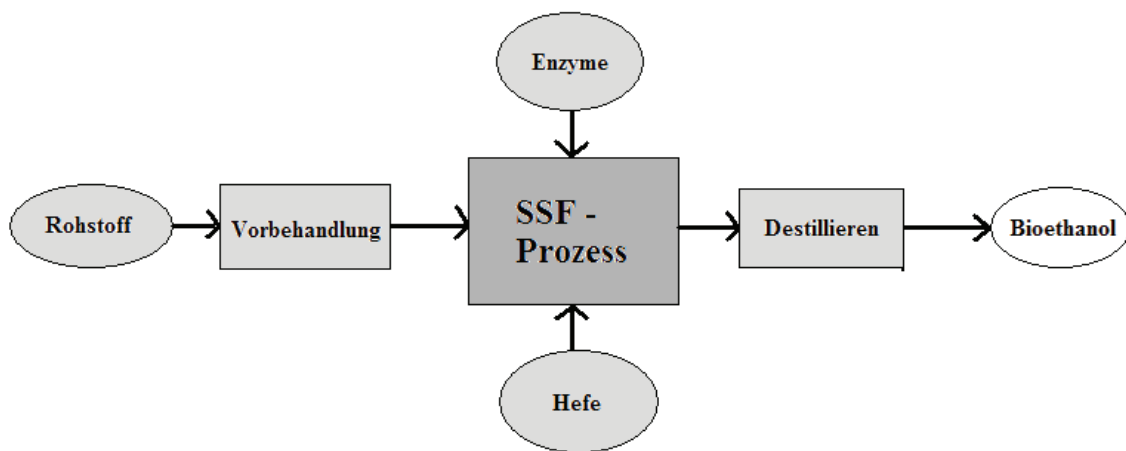


Abbildung 4: Schema eines SSF – Prozesses

Die wirtschaftlichen Vorteile liegen auf der Hand: statt zwei separater Verfahren wird nur noch eines benötigt, daher können Kosten vor allem in den Bereichen Energieverbrauch, Anschaffung und Personal gespart werden. Allerdings gibt es auch Nachteile; besonders bei der Reaktionsgeschwindigkeit. Die Cellulasekomplexe arbeiten bei einer Temperatur am effizientesten, bei der die Hefezellen schon inhibiert werden. Wenn Enzyme und Mikroorganismen in einem Chemostat gleichzeitig funktionieren sollen, ist es also wichtig, Reaktionsparameter (Temperatur, pH – Wert etc.) zu finden, bei denen beide ausreichend gut funktionieren. In der Literatur finden sich für den in dieser Arbeit angestrebten Prozess eine Temperatur von 35 °C und ein pH – Wert von 5. [6][13][22][23][24] Die Rührerdrehzahl ist so einzustellen, dass die Scherkräfte für die Hefen verträglich sind, aber dennoch eine ausreichende Durchmischung stattfindet. Daher wird in dieser Arbeit eine Spanne von 150 bis 300 rpm genutzt. Drei gleichmäßig auf der Rotorwelle verteilte Radialrührer bewirken, dass eine

ausreichende Strömung im gesamten Reaktionsvolumen herrscht, weshalb die Rührerdrehzahl nicht höher eingestellt werden muss.

2.6 Analytik

2.6.1 Zellzahlbestimmung

Auf einer etwa 5 mm dicken Glasplatte (Abbildung 5) mit der Größe eines Objektträgers befinden sich drei Stege (zwei Seiten- und ein Mittelsteg, welcher um 100 µm abgesenkt ist), die durch Fräsungen voneinander abgetrennt sind. Eine Querfräsung teilt den Mittelsteg in zwei Hälften mit je einem Quadratnetz. Mit Hilfe eines plangeschliffenen Deckplättchens, welches fest auf den Seitenstegen angebracht wird, entsteht über dem abgesenkten Mittelsteg ein genau definiertes Volumen. Ein Quadratnetz (A-Quadrat) besteht aus 16 B-Quadraten, welche wiederum in 16 C-Quadrate (0,0025 mm² x 0,1 mm) unterteilt sind. Über das mikroskopische Auszählen der C –, bzw. B – Quadrate lässt sich die Zellkonzentration einer injizierten Zellsuspension sehr genau bestimmen. [16] [20] Dazu wurde folgende Formel verwendet (Gleichung 1)

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Volumen}} = \frac{\text{Durchschnitt gezählter Zellen je Quadrat}}{\text{Fläche} \times \text{Tiefe} \times \text{Verdünnung}} \quad (1)$$



Abbildung 5: Thoma - Kammer

Diese Methode wird angewendet, wenn photometrische Messungen nicht möglich sind. Das ist u. a. der Fall, wenn Partikel im Fermentationsmedium sind, die die Messung verfälschen. Dazu zählt z. B. auch das Substrat Weizenkleie. Die Lignin- und Cellulosereste im Medium beeinträchtigen eine korrekte Messung.

Allerdings werden durch diese Messmethode auch Fehler eingetragen. Es können lebende nicht von toten Zellen unterschieden werden, auch eine statistische Unsicherheit durch Probenahme

und Verdünnung beeinträchtigen das Ergebnis. Unter den entsprechenden Umständen ist es trotzdem die einzig anwendbare Analyse für die Zellzahl, und ausreichend, um die gewünschten Ergebnisse zu erhalten.

2.6.2 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (Abbildung 6) dient dazu, die in einer flüssigen oder gasförmigen Probe enthaltene flüchtige Stoffe qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Dabei werden die Analyten innerhalb einer Säule unter hohen Temperaturen zwischen zwei Phasen (dem zu untersuchenden Gasmisch, einschließlich des Trägergases, und der Innenseite der Säule) verteilt. Das Gas wird als mobile Phase bezeichnet, da es die Stoffe transportiert; die Säuleninnenseite wird als stationäre Phase betitelt. [10] Die hier verwendete 30 m lange und 0,25 mm starke (Innendurchmesser) Säule gehört zu den Kapillarsäulen und ist mit einer 0,25 μm dünnen Polyethylen – Glycol – Schicht beschichtet. Das Trägergas ist Stickstoff. Die Stoffe werden durch Adsorbieren an der Säulenschicht zurückgehalten und so aufgetrennt. Ein FID (Flammenionisationsdetektor), der aufgrund seiner guten Eigenschaften zu den meist genutzten Detektoren gehört, verbrennt den Analyten unter Beimischung von Luft und Wasserstoff. Aufgrund eines Stromflusses, der durch positive Ionen an der Flammendüse und eingefangenen Elektronen an der über der Flamme angebrachten Sammeldüse entsteht, kann auf die Stoffmenge rückgeschlossen werden. [10] Vorher angefertigte Standards erlauben eine quantitative und qualitative Aussage über die Inhaltsstoffe einer Probe.

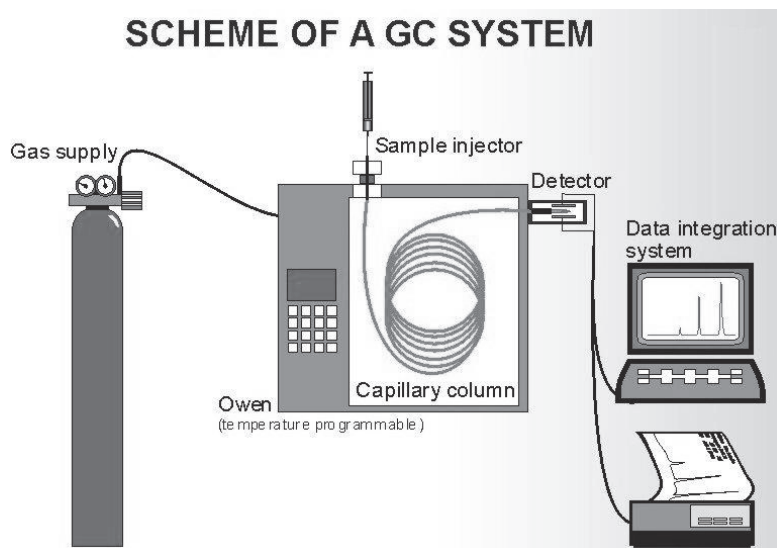


Abbildung 6: Schema einer Gaschromatografieranlage [19]

Die Stromflüsse erscheinen als Peaks in den sogenannten Chromatogrammen (Abbildung 7). Für einen Standard werden diese Peaks am PC mathematisch integriert und die so erhaltene Fläche

wird ins Verhältnis zur eingefüllten Stoffkonzentration gesetzt. Wird eine Probe aus einem Versuch vermessen, kann der Stoff anhand der Retentionszeit erkannt und seine Peakfläche über den Standard in die Stoffkonzentration übersetzt werden.

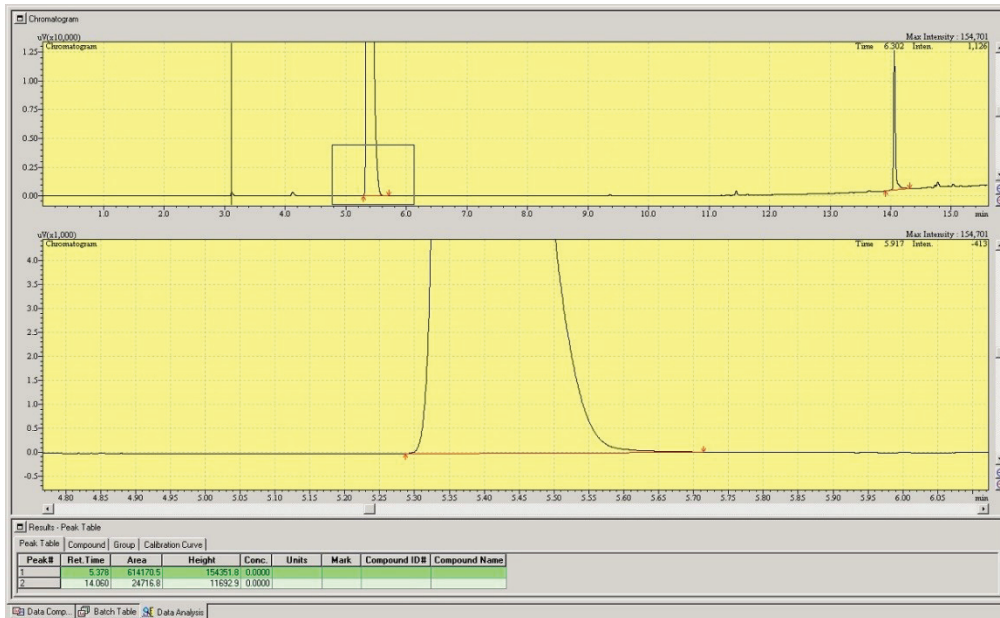


Abbildung 7: Beispiel eines Chromatogramms (Probe aus einer Ethanolgärung: Peak 1 = Ethanol, Peak 2 = Essigsäure)

2.6.3 Enzymaktivität (FPA - Filterpapieranalyse)

Die FPA dient dazu, die Enzymaktivität von Cellulasen nachzuweisen, bzw. quantitativ zu bestimmen. Dazu wird neben aus Cellulose bestehendem Filterpapier auch DNS (3,5-Dinitrosalicylsäure) benötigt. Die in der zu untersuchenden Probe enthaltenen Enzyme spalten die Cellulose des Filterpapiers in einer temperierten Umgebung für eine gewisse Zeit auf, sodass reduzierende Zucker freigesetzt werden. Die Zugabe der Säure stoppt den Prozess, und ist gleichzeitig der Indikator für die Menge an freigesetzten Zuckern. [15] In der Lösung vorhandene reduzierende Zucker reduzieren die Nitrogruppe am dritten Kohlenstoffatom des aromatischen Ringes der Säure zu einer Aminogruppe. Somit wird DNS zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure, welche Licht bei einer Wellenlänge von 540 nm stark absorbiert. Dieser Effekt kann photometrisch quantifiziert werden. [15]

Mittels eines vorher erarbeiteten Standards kann eine Gleichung erstellt werden, anhand derer die gemessene Extinktion mit der Konzentration an reduzierenden Zuckern in der beprobten

Lösung in Verbindung gebracht wird. Dies lässt Rückschlüsse auf die Aktivität der Enzyme im Verlauf eines Prozesses zu.

2.6.4 Reduzierende Zucker

Diese Messmethode basiert auf dem gleichen Prinzip wie die FPA, allerdings ohne die Inkubation im Wasserbad. Der Begriff „Reduzierende Zucker“ (Abkürzung: RS) beschreibt dabei die Menge aller in der Lösung vorhandenen Zucker, die reduzierend wirken können. Das sind beispielsweise Glucose, Cellobiose und Pentosen. [15]

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Bezeichnung

Autoklav
 Bioreaktor, 5 Liter

 Bioreaktor, 42 Liter
 Duranflaschen
 Eppendorfggefäße 1 ml – 2 ml
 Erlenmeyerkolben, 0,5 l – 1 l
 Feinwaage
 Gaschromatograph
 Heizplatte
 Messzylinder 0,1 – 0,5 l
 Metallring
 Mikroskop
 Mullbinde
 pH – Messgerät
 pH – Elektrode
 Pipetten, 0,01 ml – 10 ml
 Pipettenspitzen, 0,01 ml – 10 ml
 pO₂ – Elektrode
 Probenahmeröhrchen
 Reagenzgläser
 Schüttelinkubator
 Spatel
 Spektralphotometer
 Sterilbank
 Thoma-Kammer
 Umluft - Trockenschrank
 Waage

Hersteller/Lieferant

Varioklav, Typ 400
 Biostat® MD, B.Braun Biotech International
 + DCU B.Braun Biotech International
 Infors HT
 Schott
 Brand
 VWR
 Mettler – Toledo, AB204
 Shimadzu GC 2010 Plus
 Rommelsbacher
 Schott
 SIAB
 Jenaval, Carl Zeiss Jena
 Geschäft des allgemeinen Bedarfs
 Knick Portamess
 Mettler – Toledo
 Eppendorf
 VWR
 Mettler – Toledo
 VWR
 VWR
 Infors HT
 VWR
 Shimadzu UV – 160 A
 Heraeus, Hera Safe
 Fein Optik Bad Blankenburg
 Heraeus Instruments, Typ UT 6120
 Sartorius, BP3100S

Wasserbad, temperierbar	Lauda, Ecoline 019 Typ E 100
Vials	VWR
Zentrifugen	Sigma 2K15
	Sigma 8K10
	Eppendorf miniSpin plus
Zentrifugenfilter 3 kDa – 0,5 ml	VWR

3.1.2 Chemikalien und Mikroorganismen

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
3,5 – Dinitrosalicylsäure		
α – Amylase	ZfT	
α – Glucosidase	ZfT	
Ammoniumchlorid	Riedel – de Haën®	31107
Ammoniaklösung	Carl Roth GmbH + Co. KG	6774.2
Brauhefe	SIAB	H155
D(+) – Glucose	Merck KG	1.08337.0250
Eisessig	Carl Roth GmbH + Co. KG	3738.1
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG	9065.1
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG	P018.2
Magnesiumsulfat– heptahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG	T888.2
MKC	Serva	14204
<i>P. v.</i>	SIAB	PV10
Peptone	Duchefa Biochemie bv	P1328.1000
pH Buffer Solution	Carl Roth GmbH + Co. KG	9602.1, 9604.1
Schwefelsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG	0967.1
<i>T. r.</i>	SIAB	UK41
Trockenhefe	ZfT	
WK	ZfT	
Yeast Extract	Duchefa Biochemie bv	Y1333.1000

3.2 Methoden

3.2.1 Schüttelkolbenversuche

Bei den Schüttelkolbenversuchen handelt es sich um die erste Stufe des Upscalings. Hierfür wurden Zweikolbensysteme verwendet, die einen anaeroben Prozess garantieren (Abbildung 8). Dieses besteht aus einem Fermentationskolben mit 150 ml Reaktionsvolumen, und einem Abluftkolben, der mit destilliertem Wasser gefüllt ist. Beide Kolben sind mit einem Schlauch verbunden, dessen eines Ende im Fermentationskolben ohne Kontakt zum Medium fixiert ist, aber im Abluftkolben mit dem anderen Ende unter Wasser liegt. Dadurch kann ein Druckausgleich erfolgen, ohne dass Sauerstoff in den Fermentationskolben gelangt. Ein steriler Luftfilter am Abluftschlauch des Abluftkolbens verhindert zusätzlich ein Eindringen von Organismen ins System.



Abbildung 8: Zweikolbensystem

Die Zusammensetzung der Medien der SK – Versuche orientierten sich an der Literatur. [3] Lediglich Ammoniumchlorid wurde gegen Ammoniumsulfat getauscht, da es häufiger Anwendung findet. [4][6][13][22][23][24]

Nachdem unter Berücksichtigung der noch zuzugebenden Mengen an Vorkultur und Enzymlösung die Kolben mit Medium befüllt und vorbereitet waren, wurde der pH – Wert mit verdünnter Schwefelsäure, bzw. verdünnter Ammoniumhydroxyd – Lösung auf 5 ($\pm 0,1$) eingestellt. Als Substrat diente Weizenkleie. Anschließend wurden sie bei 121 °C für 25 Minuten autoklaviert. Die Enzymlösung wurde unter der Cleanbench sterilfiltriert und zupipettiert. Die anfänglich verwendete Hefevorkultur wurde ebenfalls unter der Sterilbank zupipettiert (15 ml; 10 % des Reaktionsvolumens); später wurde Trockenhefe an gleicher Position in einem sterilen Becherglas abgewogen und in die Schüttelkolben gefüllt.

Nach dem Zusammenbau der Zweikolbensysteme wurden die Minireaktoren bei 35 °C und 120 rpm im Schüttler für 72, respektive 24 Stunden inkubiert.

In Tabelle 2 und 3 sind die Einwaagen der jeweiligen Versuche dargestellt. Die Konzentrationen für das Substrat beziehen sich immer auf die Trockensubstanz.

Tabelle 2: Einwaage Substanzen für SK - Versuche

Versuchsnummer	c(Substrat)	Hefeart, c(Hefe)	Enzymkomplex, Enzymloading [IU/g TS Substrat]	Medium (siehe Tabelle 3)	Fermentationsdauer
	[g/l]				[h]
1	20	H155, 10 %	<i>T. r.</i> , 50	A1	72
2	30	H155, 10 %	<i>T. r.</i> , 50	A2	72
3	60	TH,5 g/l	<i>P. v.</i> , 50	B	72
4	80	TH,5 g/l	<i>P. v.</i> , 50	B	72
5	80	TH, 5 g/l	<i>P. v.</i> , 50	B	72
6	80	TH, 5 g/l	<i>P. v.</i> , 50	LW	72
7	80	TH, 5 g/l	<i>P. v.</i> , 50	LW	24
8	80	TH, 20 g/l	<i>P. v.</i> , 50	LW	24

Tabelle 3: Fermentationsmedienbestandteile (Angaben in g/l)

Bezeichnung	c(NH ₄ Cl)	c((NH ₄) ₂ SO ₄)	c(MgSO ₄ ×7 H ₂ O)	c(KH ₂ PO ₄)
A1	6	-	0,9	3
A2	-	6	0,9	3
B	-	4	0,6	2
LW	-	-	-	-

3.2.2 Fermentation im 5 l – Bioreaktor

3.2.2.1 Vorbereitung

Die anaeroben Fermentationen liefen im 5 l – Bioreaktor von Braun ab (Abbildung 9). Dafür wurden auf ein Reaktionsvolumen von 3 Litern die in Tabelle 4 dargestellten Substanzen eingewogen und Parameter eingestellt.



Legende:

- 1 Fermenterkessel mit Doppelglaswand
- 2 Rührermotor
- 3 Zuluftschlauch mit Luftfilter
- 4 Probenahmeschlauch
- 5 Abluftwasserauffangbehälter
- 6 Animpf-/Feedschlauch
- 7 Abluftkühler
- 8 Antischaumsonde
- 9 pO₂-Sonde
- 10 Temperaturfühler
- 11 pH-Sonde (befindet sich hinter dem Rührermotor)
- 12 Schläuche für die Vorlagenzufuhr

Abbildung 9: 5 l – Bioreaktor

Tabelle 4: Einwaage Substanzen für Batch – Fermentation

	Batch 01	Batch 02	Batch 03
Substrat	MKC	WK	WK
c(Substrat) [g/l]	30	30	30
c(Trockenhefe) [g/l]	5	5	5
Medium	A	A	A
Enzymbeladung <i>P. v.</i> [IU/g TS]	50	50	50
T [°C]	35	35	35
pH – Wert	5	5	5
Rührergeschwindigkeit [rpm]	150	200	200

MKC, mikrokristalline Cellulose, diente neben WK als Vergleichssubstrat, da sie kein Lignin enthält. Nachdem alle Stoffe abgewogen und in den Fermenter gefüllt worden waren, wurde das Volumen mit Leitungswasser auf 2 Liter aufgefüllt. Durch Rühren wurden die Salze gelöst. Anschließend wurde der Deckel geschlossen und alle Sonden, Schläuche etc. an – und eingebaut. Danach wurde der Bioreaktor bei 121 °C für 35 Minuten ohne Vorlagen autoklaviert. Die Vorlagen (Tabelle 5) wurden separat für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Autoklaviervorgang und erfolgtem Abkühlen wurde der Fermenter an die DCU, das Kühlsystem und die Vorlagen angeschlossen. Die Einstellung der Parameter erfolgte analog zu Tabelle 4.

Tabelle 5: Vorlagen für Fermentationen im Braun – Reaktor

Vorlage	Konzentration [%]
Ammoniumhydroxid	15
Schwefelsäure	15
Antischaummittel auf Silikonbasis	20

3.2.2.2 Animpfen und Durchführung

Der autoklavierte und eingestellte Fermenter wurde mit 5 g/l Trockenhefe beimpft. Zusätzlich zur Hefe wurden die Enzyme (*P. verruculosum*, 50 IU/g) und eine entsprechende Menge sterilisiertes Leitungswasser zugegeben, sodass das Reaktionsvolumen von 3 Litern erreicht wurde. Die Zuführung gelang über eine sterile Nachführungsflasche, die über einem Feuerring an den sterilisierten Nachführungsschlauch angeschlossen wurde. Die Online - Datenaufzeichnung erfolgte mittels des Computerprogramms MFCS.

3.2.2.3 Beenden der Fermentation

Eine Fermentation dauerte 72 Stunden. Nach der Entnahme der letzten Probe wurde die Online - Datenaufzeichnung gestoppt. Anschließend wurde der Rührer ausgestellt, die Sonden ausgebaut und gereinigt, und alle Vorlagenpumpen abgeschaltet. Zum Reinigen des Fermenters und der Schläuche wurde Leitungswasser verwendet.

3.2.2.4 Probenahme

Die Probenahme erfolgte täglich mehrmals, mindestens jedoch alle 24 Stunden. Dazu wurde mittels Stickstoffzufuhr ein Überdruck erzeugt, der die Fermenterflüssigkeit durch den Probenahmeschlauch nach außen drückte (Abbildung 9). Dort wurde die Probe in einem sauberen Becherglas aufgefangen. Anschließend wurden zwei Zentrifugenröhrchen zu je 25 ml gefüllt und in der Sigma 2K15 – Zentrifuge bei 12000 rpm 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein verschließbares Proberöhrchen gegeben und für weitere Untersuchungen im Gefrierschrank bei ca. -18 °C gelagert.

3.2.3 Fermentation im 42 l – Bioreaktor

3.2.3.1 Vorbereitung

Alle Zubehöerteile des gereinigten 42l – Bioreaktors wurden eingebaut. Dazu zählen insbesondere das Belüftungsrohr, die Radialrührer, die Strömungsbrecher, sowie pH- und pO₂-Sonde, Temperaturfühler, Probenahmeventil und Zuluftfilter. Alle O-Ringe wurden mit Silikonfett eingefettet, um die Abdichtung zu gewährleisten. Anschließend wurden ca. 5 Liter Leitungswasser eingefüllt, um die Gleitringdichtung der Rührerwelle und die Sonden abzudecken. Danach wurden die eingewogenen Salze und Substrate (Vgl. Tabelle 6) zugegeben und nach Zugabe weiterer 5 Liter Leitungswasser alles mit 300 rpm verrührt. Anschließend wurde der Rührer ausgestellt und ca. 5 ml Antischaummittel zugegeben, um die starke Schaumbildung während der Sterilisation zu verhindern. Danach wurde der Reaktor mit Leitungswasser auf das Vorlagevolumen aufgefüllt. Das Vorlagevolumen berechnet sich aus dem gewünschten Startreaktionsvolumen abzüglich des Volumens des Enzymkonzentrates, welches beim Animpfen nachträglich zugeführt wird.



Legende:

- | | |
|----|---|
| 1 | DCU |
| 2 | Fermenterkessel mit Doppelwand |
| 3 | Probenahmeventil |
| 4 | Abluftkühler |
| 5 | Sichtfenster |
| 6 | Drucksensor |
| 7 | Überdruckventil |
| 8 | Blindstopfen, Platz für
Zuführungseinrichtungen von
Nachführungen, Vorlagen, etc. |
| 9 | Temperaturfühler |
| 10 | pH-Sonde |
| 11 | pO ₂ -Sonde |

Abbildung 10: 421 – Bioreaktor

Der befüllte Bioreaktor wurde mit dem Deckel verschlossen. Dieser wurde mit Blindstopfen, Septen und Zugangsstopfen für die Nachführungskanülen sowie der Abluftfilteranlage und dem Drucksensor bestückt.

Der fertig zusammengebaute, befüllte und abgedichtete Reaktor wurde nun für 25 Minuten bei 121 °C und 150 rpm sterilisiert. Die Steuerung übernahm dabei die Software. Anschließend kühlte er automatisch auf die gewünschte Fermentationstemperatur herunter und stellte die Rührerdrehzahl nach Vorgabe ein. Die Vorlagenkanülen (Säure, Base, Antischaummittel) wurden eingebaut, indem die entsprechenden Zugangsstopfen herausgedreht, der Raum über dem Septum mit Ethanol gefüllt und entflammt wurde. In dieser Flamme wurden die Kanülen durch das Septum gestochen und eingedreht. Anschließend wurden pH – Wert, alle Mess- und Regeleinrichtungen aktiviert und eingestellt. Stickstoff wurde zum Ausgasen dem Medium zugeführt, sodass ein anaerober Prozess garantiert werden konnte.

Nachdem alle Parameter (Vgl. Tabelle 7) und alle Anschlüsse (Säure, Base, Antischaum, Regel- und Messtechnik) überprüft wurden, konnte angeimpft werden.

3.2.3.2 Animpfen und Durchführung

Das zu verwendende Enzymkonzentrat wurde unter der Cleanbench mit Sterilfiltern (0,45 µm Porengröße) filtriert, anschließend entsprechend der Vorgaben abgemessen, in eine sterile Duranflasche gefüllt und diese verschlossen. Anschließend wurde auf einer desinfizierten und mit Ethanol gereinigten Waage Trockenhefe mit einem abgeflammt Metallspatel in eine ebenfalls sterilisierte Duranflasche abgewogen und die Flasche verschlossen.

Ein mit Mullbinde umwickelter Metallring mit einem Durchmesser von 25 cm wurde mit Ethanol getränkt und entflammt. Dieser Feuerring wurde über einen der Blindstopfen gelegt. Ein Edelstahltrichter wurde gleichermaßen mit Ethanol benetzt und abgeflammt. Dieser wurde dann in das Deckelloch gesteckt, welches bisher vom Blindstopfen verschlossen wurde. Anschließend wurden über dem Trichter in der Flamme des Feuerrings die Duranflaschen nacheinander geöffnet (erst die Trockenhefe, dann das Enzymkonzentrat) und in den Fermenter gekippt. Danach wurde die Öffnung wieder mit dem kurz abgeflammt Blindstopfen verschlossen. In gleicher Weise wurde u. a. Substrat nachgeführt (Vgl. Tabelle 8).

3.2.3.3 Beenden der Fermentation

Nach der letzten Probenahme wurde die Fermentation am PC gestoppt. Anschließend wurden alle Messsonden deaktiviert, und alle Pumpen und Regelungseinrichtungen ausgeschaltet. Danach wurde die gesamte Fermenterbrühe abgelassen und alle Reaktorteile ausgebaut. Gereinigt wurden alle Teile und der Reaktorinnenraum mit Leitungswasser, die Sonden wurden ausgebaut, mit destilliertem Wasser gereinigt und in die Lagerflüssigkeiten getaucht.

3.2.3.4 Probenahme

Die Probe wurde über das Probenahmeventil entnommen. Dabei wurden vorher einige Mililiter in einen Eimer abgelassen, damit keine abgestandene Flüssigkeit, die im Ventil war, die Probe verfälschte. Die Probe selbst wurde in einem Becherglas aufgefangen und weiterverarbeitet. Anschließend wurde das geschlossene Ventil 8 min mit Wasserdampf sterilisiert. Die abgenommene Probe wurde analog der Proben unter 3.2.2.4 abzentrifugiert und gelagert.

3.2.3.5 Vorhydrolyse

Die Vorhydrolyse diente dazu, die Stärkemoleküle der Weizenkleie zu spalten. Dafür wurde α -Amylase eingesetzt. Das Enzymkonzentrat wurde unter der Sterilbank in eine sterile Duranflasche pipettiert und anschließend dem Fermenter analog zur Animpfmethode zugeführt. Dabei wurde das Medium im Bioreaktor auf 75 °C vortemperiert und mit Stickstoff ausgegast.

Die Vorhydrolyse dauerte 6 h; es wurde bei gleicher Temperatur mit 300 rpm gerührt. Nach Ablauf der angegebenen Zeit wurde auf Fermentationstemperatur heruntergekühlt. Vor dem Animpfen wurde nochmal ausgegast.

Versuch 6 wurde dabei mit 15 U/g TS α -Amylase und in der anschließenden Fermentation mit 0,25 U/g TS α -Glucosidase beladen. Versuch 7 erhielt eine Beladung von 100 U/g TS α -Amylase und 5 U/g TS α -Glucosidase.

Tabelle 6: Versuchsplan der Versuche im 42 l - Bioreaktor

Versuchsnummer	c(WK) [g/l]	c(Trockenhefe) [g/l]	Enzymloading [IU/g TS Substrat]	Medium (siehe Tabelle 3)	Fermentationsdauer [h]	Vorhydrolyse
1	45	5	25	B	163	nein
2	45	5	20	B	89	nein
3	45	5	20	B	88	nein
4	80	5	20	B	25	nein
5	100	5	10	LW	72	nein
6	100	5	10	LW	28	ja
7	60	5	15	LW	24	ja

Tabelle 7: Parameter für die Versuche im 42 l – Bioreaktor

Versuchsnummer	Temperatur [°C]	pH – Wert	Rührergeschwindigkeit [rpm]	Feeds (siehe Tabelle 9)
1	35	5	150	ja
2	35	5	150	ja
3	35	5	250	ja
4	35	5	250	nein
5	35	5	250	ja
6	35	5	250	nein
7	35	5	300	nein

Tabelle 8: Übersicht über Feeds für die Versuche im 42 l – Bioreaktor

Versuchsnummer	Feednummer	Suspension: V [l], c(WK) [g/l]	Trocken: m(WK) [g]	Besonderheiten
1	1	1, 80	-	Volumen gleichmäßig auf 2 Erlenmeyerkolben (V=1 l) verteilt
	2	2, 45	-	
2	1, 2, 3	3, 45	-	Volumen gleichmäßig auf 2 Erlenmeyerkolben (V=1 l) verteilt
3	1	-	56	1 Erlenmeyerkolben (V=1 l), 1 l LW nachgeführt
	2	-	200	TS verteilt auf 3 Erlenmeyerkolben (V=0,5 l), 1 l LW nachgeführt
	3, 4, 5, 6, 7	-	133,5	TS verteilt auf 2 Erlenmeyerkolben (V=0,5 l), 0,5 l LW nachgeführt
5	1, 2, 3	-	133,5	TS verteilt auf 2 Erlenmeyerkolben (V=0,5 l)

3.2.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mittels Thoma – Kammer und dem entsprechenden Auszählungsverfahren unter dem Mikroskop ermittelt. Dabei wurden nur B – Quadrate ausgezählt. Die Formel zum Berechnen der Zellzahl je μl ist nachfolgend dargestellt (Gleichung 2).

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{gezählte Zellen je B-Quadrat} \times 250}{0,0025\text{mm}^2 \times 0,1\text{mm} \times 16 \times \text{Verdünnung}} \quad (2)$$

Für die Variable „Verdünnung“ wird ein Faktor entsprechend des Wertes des Quotienten eingesetzt, der das genutzte Verdünnungsverhältnis beschreibt. Eine Verdünnung von 1:100, umgangssprachlich eine 100er – Verdünnung, wird durch den Faktor 0,01 dargestellt. Der Faktor 250 wird eingesetzt, um die Zellzahl von den ausgezählten 0,004 μl auf 1 μl Zellsuspension umzurechnen.

3.2.5 Gaschromatographie

3.2.5.1 Probenvorbereitung

1 ml jeder Probe wurde filtriert (3 kDa) und in sogenannte Vials gefüllt.

3.2.5.2 GC – Programm

Die Methode zur Ethanolbestimmung wurde mit einer Zebron Wax – Säule durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 0,2 μl . Die Spritze wurde vor dem Kontakt mit der zu vermessenden Probe drei Mal mit ultrapurem Wasser gespült, nach der Probeninjektion fünf Mal. Die Temperatur des Splitinjektors betrug 140 °C, der Total Flow des Carrier Gases (Stickstoff) betrug 51,7 ml/min bei 83,8 kPa. Bei der Säule wurden zu Beginn der Messung 35 °C angelegt und 5 min gehalten. Danach erfolgte eine Temperaturerhöhung in Schritten von 10 Kelvin bis auf 85 °C. Die weitere Temperaturanstiegsrate betrug 25 K bis 200 °C erreicht wurden. Diese Temperatur wurde 1 min gehalten. Der FID wurde auf 200 °C vorgeheizt und mit 40 ml/min Stickstoff, 30 ml/min Wasserstoff und 400 ml/min Luft versorgt. Eine Messung hatte eine Analysenzeit von 15,6 min. Jede Probe wurde doppelt vermessen.

3.2.5.3 Auswertung

Die Peaks des ermittelten Gaschromatogramms wurden mit der Funktion „manuelle Peakintegration“ des Programms neu integriert, da das Programm selten die Peaks korrekt erkannte. Die dadurch berechnete Peakfläche wurde mit den entsprechend angefertigten Standards verglichen und so die Produktkonzentrationen ermittelt.

3.2.6 Enzymaktivität (FPA)

Die zu untersuchende Probe wurde mit 0,05 M Citratpuffer in einem Reagenzglas verdünnt. In je ein neues Reagenzglas wurden 0,8 ml und 0,4 ml der verdünnten Probe gefüllt und mit 1,2, respektive 1,6 ml Citratpuffer versetzt, sodass ein Volumen von je 2 ml entstand. Aus jedem dieser Reagenzgläser wurden dreimal je 0,5 ml entnommen und in je ein weiteres Reagenzglas gefüllt und mit 1 ml Citratpuffer versetzt. Nun wurden diese 9 Reagenzgläser, mit insgesamt 3 Verdünnungsstufen, in ein auf 50 °C vortemperiertes Wasserbad gestellt. Zu je zwei Reagenzgläsern jeder Verdünnungsstufe wurde ein standardisierter Filterpapierstreifen (1 x 6 cm) aus Cellulose gegeben. Zusätzlich mit dem Nullwert (1,5 ml Citratpuffer) wurde dies für eine Stunde bei 50 °C inkubiert. Danach wurden 3 ml DNS in jedes Reagenzglas gegeben und 5 Minuten gekocht. Anschließend wurden 10 ml destilliertes Wasser in jedes Reagenzglas gegeben und jede Lösung bei 540 nm vermessen. Alle Werte wurden in ein Berechnungsschema eingetragen und gegen einen Standard gerechnet. Dadurch konnte auf die FPA in IU/ml rückgeschlossen werden. [15]

3.2.7 Reduzierende Zucker

Die zu bemessende Probe wurde mit destilliertem Wasser verdünnt. 0,5 ml jeder Verdünnungsstufe wurde mit 1,5 ml DNS versetzt und anschließend 5 Minuten im kochenden Wasser inkubiert. Danach wurden 5 ml destilliertes Wasser zugegeben und anschließend bei 540 nm gegen einen Nullwert photometrisch bemessen. Der Nullwert setzte sich aus 0,5 ml destilliertem Wasser und 1,5 ml DNS zusammen. Alle Bestimmungen wurden doppelt durchgeführt, um anschließend den Mittelwert zu errechnen. Mit der ermittelten Extinktion und Berechnung mit einem vorher angefertigten Standard wurde auf die Konzentration an reduzierenden Zuckern in g/l rückgeschlossen. [15]

4 Ergebnisse

4.1 Schüttelkolbenversuche

Die Schüttelkolbenversuche sollten grundlegende Erkenntnisse zur Etablierung des SSF-Prozesses liefern. Eine davon war, welche Ethanolausbeuten im Schüttelkolbenmaßstab möglich sind. Wurde nur der Celluloseanteil verzuckert, indem ausschließlich Cellulasekomplexe (ohne α -Amylase oder α -Glucosidase) beigelegt wurden, waren zunächst Ausbeuten von ca. 14 % möglich (30 g/l WK, H155, UK41, 72 h; Abbildung 11). Mit höherer Kleiekonzentration sank die Ausbeute, da ungleich mehr Ethanol produziert wurde (sichtbar an den ersten 4 Versuchen). Die hohe Substratbeladung bewirkte im Schüttelkolbenmaßstab Probleme einer homogenen Durchmischung des Mediums und damit möglicherweise eine Verringerung der Stoffumsätze. Es waren später im gerührten Fermenter keine deutlichen Ausbeuteunterschiede zwischen hoher und niedriger Beladung festzustellen. Allerdings ist auch ein Fehlereintrag durch die Hefe H155 mit dem Vorkulturmedium sehr wahrscheinlich, da durch den Crabtree – Effekt bereits Ethanol gebildet, ins Fermentationsmedium mit eingetragen wurde und anschließend erhöhend auf die letztendliche Alkoholkonzentration wirkte.

Die Werte der Ausbeute wurden nicht auf den Celluloseanteil bezogen, sondern auf die insgesamt eingesetzte WK, um Angaben über 100 % zu vermeiden und somit die Ergebnisse wirtschaftlich zu veranschaulichen. Rechnerisch kann eine solch hohe Ausbeute zustande kommen, wenn durch die Autoklavierung, also Zuführung von Hitze und Druck, Zuckermoleküle aus dem Hemicellulose- und Stärkerüst der WK im Vorhinein herausgelöst und mit verstoffwechselt werden. Zur Vereinfachung der Rechnung wurde die Masse der Weizenkleie-TS einem Celluloseanteil von 100 % gleichgesetzt. Um die Berechnung zu demonstrieren, wurde die gemessene Ethankonzentration des ersten SK des Versuchs „80 g/l WK, 5 g/l TH, α A, nur LW, 24h“ gewählt:

$$\text{Ausbeute [\%]} = \frac{17,101 \frac{\text{g}}{\text{l}} \times 0,15 \text{ l}}{\frac{13,485 \text{ g}}{162,145} \times 92,134} \times 100 = 33,48 \quad (3)$$

Ein weiterer Fehlereintrag durch Vorkulturmedium ist sichtbar bei den RS – Konzentrationen. Die restliche Glucose aus dem Vorkulturmedium erhöhte die RS – Menge im Fermentationsmedium, während die reduzierenden Zucker aus den Fermentationen mit Trockenhefe ausschließlich aus der Verzuckerung der Weizenkleie stammten. Werden die Versuche mit H155 getrennt von den Versuchen mit TH betrachtet, ist sichtbar, dass eine höhere

WK – Konzentrationen in höhere RS – Konzentrationen am Ende der Fermentation resultierte, da mehr nicht verwertbare reduzierende Zucker freigesetzt wurden. Es gilt also:

$$c_{Start}(WK) \sim c_{Ende}(RS)$$

80 g/l WK – Konzentration wurden als maximal im Schüttelkolben umwälzbare Beladung ermittelt und deshalb für die weiteren Versuche als Standard festgesetzt, um auch die Nähe zu den Fermenterversuchen zu halten.

Die Trockenhefe wurde für alle weiteren Versuche als Standardorganismus festgelegt, da sie deutliche Handling – Vorteile hat. Es kann Zeit und Material gespart werden, da sie nicht in einer Vorkultur angezogen werden muss. Weiterhin können genau definierte Konzentrationen eingewogen werden.

Mit dem Ziel die Ausbeute zu erhöhen, wurde der Einsatz stärke-spaltender Enzyme untersucht. Dies bewirkte einen sprunghaften Anstieg der Ausbeute auf 24,7 % (80 g/l WK, 5 g/l TH, α A, 72 h) und hat sich damit im Vergleich zum Versuch zuvor (gleiches Setup, allerdings ohne α -Amylase und α -Glucosidase: 8,74 %) fast verdreifacht. Die Ethanolkonzentration stieg bei diesen beiden Versuchen von ca. 4 g/l auf 12,6 g/l an.

Eine weitere Steigerung der Ethanolkonzentration, und damit der Ausbeute, lies sich erreichen, indem die Salze des Fermentationsmediums weggelassen wurden. Anlass für diese Maßnahme bot das Ergebnis einer Recherche beim örtlichen Wasserlieferanten (Tabelle 9). Bis auf Phosphat, welches allerdings durch die toten Anteile der Trockenhefe eingetragen wird, sind alle Stoffe enthalten, wenn auch nur in Spuren. Doch die Ergebnisse zeigen, dass diese Spuren ausreichen (80 g/l WK, 5 g/l TH, α A, nur LW, 72 h). Es wurde in diesem Versuch ca. 38 % Ausbeute bei einer Ethanolkonzentration nach 72 h von 19,4 g/l erreicht.

Abbildung 11: Ergebnisse Schüttelkolbenversuche

Tabelle 9: Konzentrationen von Leitungswasserkomponenten

Komponente	Messwert	Grenzwert nach TVO	Einheit
<u>Ammonium</u>	<u>< 0,03</u>	0,50	[mg/l]
Basenkapazität Kb 8.2	< 0,1	< 0,1	[mmol/l]
Blei	< 0,001	0,025	[mg/l]
Cadmium	0,0011	0,005	[mg/l]
Calcitlösekapazität	2,7	5	[mg/l]
Calcium	46,6	-	[mg/l]
Chlorid	38,9	250	[mg/l]
Chrom	< 0,001	0,050	[mg/l]
Coliforme Keime	0		[/100ml]
E.-Coli	0		[/100ml]
Eisen	< 0,015	0,200	[mg/l]
Enterokokken	0		[/100ml]
Fluorid	0,69	1,50	[mg/l]
Gesamthärte (WMRG)	1,6	-	[mmol/l]
<u>Kalium</u>	<u>1,5</u>	-	[mg/l]
Koloniezahl bei 20°C	0	20	[/ml]
Koloniezahl bei 36°C	0	100	[/ml]
Leitfähigkeit	449	2790	[µS/cm]
<u>Magnesium</u>	<u>11,1</u>	-	[mg/l]
Mangan	0,002	0,050	[mg/l]
Natrium	29,4	200	[mg/l]
Nickel	0,0056	0,020	[mg/l]
Nitrat	15,1	50	[mg/l]
Nitrit	< 0,01	0,10	[mg/l]
pH-Wert	7,77	6,5 - 9,5	
Säurekapazität Ks 4.3	1,22	-	[mmol/l]
<u>Sulfat</u>	<u>97</u>	250	[mg/l]
Uran	<0,0005	0,010	[mg/l]

Wie die parallel laufenden Fermenterversuche (siehe 4.3) zeigten, wird die Ethanolproduktion nach wenigen Stunden eingestellt. Um das auch im kleinen Maßstab zu untersuchen, wurde der

Versuch mit der höchsten erreichten Ausbeute (SK_V6) wiederholt, und bereits nach 24 h beendet (SK_V7). Dabei zeigte sich, dass mit 33,4 % (17,05 g/l Ethanol) Ausbeute lediglich ca. 5 % bis zum Höchstwert des 72 h – Versuchs (SK_V6) fehlten. In den restlichen 48 h wurden als nur noch lediglich ca. 2 g/l Ethanol gebildet. Trotzdem sank die RS – Konzentration deutlich ab. Im 24 h – Versuch lagen 18,4 g/l RS vor, nach 72 h nur noch 11,35 g/l. Der Zucker wurde also nur geringfügig in Ethanol umgesetzt.

Die These, dass stattdessen nach 24 h verstärkt Essigsäure gebildet wurde, unterstützt Abbildung 12. Dort sind die pH – Wertdifferenzen zwischen dem Einstellen des Fermentationsmediums und dem Abbruch der Fermentation dargestellt. Ein großer Balken bedeutet ein großes Absinken des pH – Wertes im Verlauf der Fermentation. Ganz deutlich zu sehen ist, dass die pH - Wertänderung im Zeitraum von 24 h sehr viel geringer ist als nach 72 h Versuchslaufzeit. Dies ist ein klarer Beleg dafür, dass Säure gebildet wurde. Mit der GC wurde lediglich Essigsäure detektiert, weshalb die Ergebnisse als Beleg für eine verstärkte Essigsäureproduktion nach 24 h gewertet wurden.

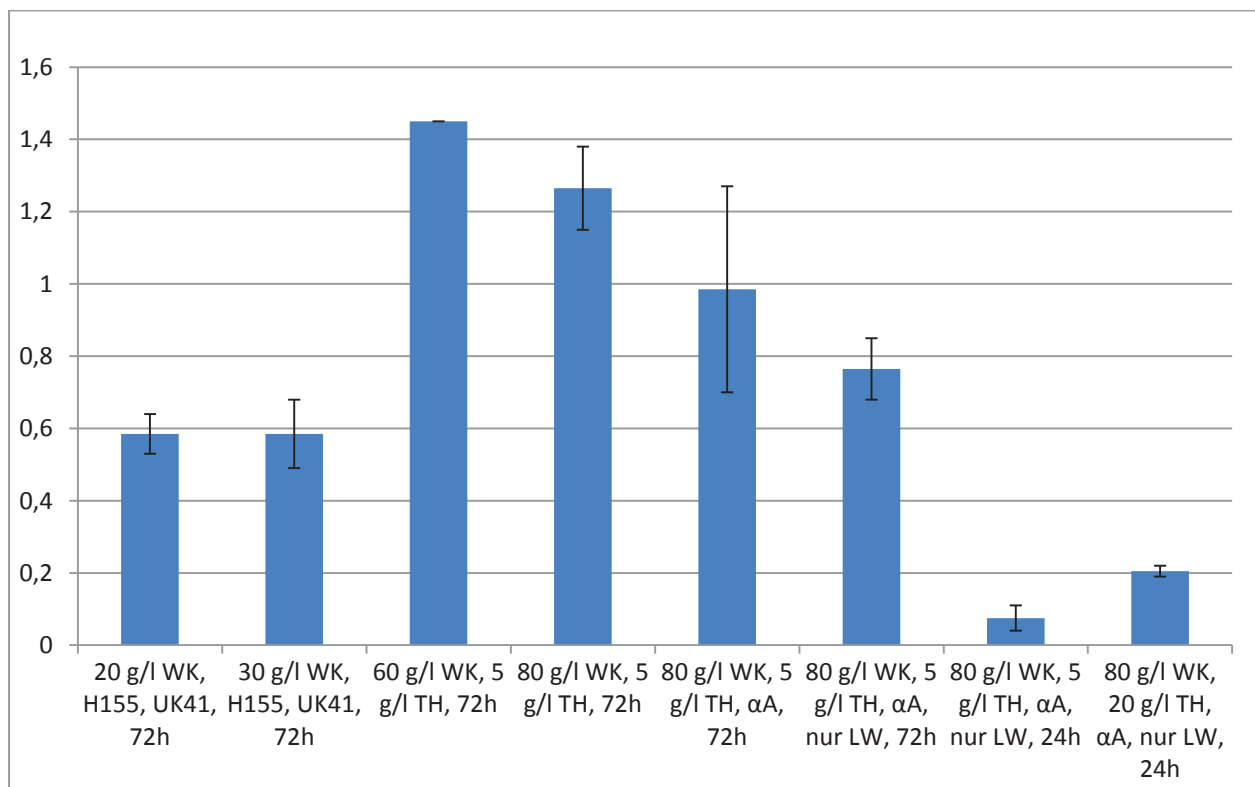


Abbildung 12: pH - Wertänderung der Schüttelkolbenversuche (Differenz zwischen pH_{Start} und pH_{Ende})

Aufgrund der erlangten Erkenntnisse wurde im größeren Maßstab ein 24stündiges Verfahren einer längeren Fermentation vorgezogen.

Anschließend wurde untersucht, ob eine höhere Hefekonzentration zu Beginn der Fermentation in einer höheren Ethanolkonzentration resultiert. Hintergrund dieser Überlegung war, dass die enzymatische Hydrolyse in den ersten Fermentationsstunden mehr lösliche Zucker liefert, als die Hefe umsetzt. Sollte die Ethanolproduktion aufgrund der Eigenschaften der verwendeten Hefe nur maximal 24 h andauern, würde man so mehr Organismen den Zucker zuführen, und mehr Organismen könnten gleichzeitig Ethanol bilden. Bei einer hochentwickelten Produktionshefe wäre das durchaus wünschenswert, um einen hohen Durchsatz zu erreichen, Diese Annahme wurde jedoch durch klar geringere Ausbeuten und Ethanolkonzentrationen widerlegt. Die Ausbeute beim Versuch „80 g/l WK, 20 g/l TH, α A, nur LW, 24 h“ ist 8 % geringer (25,1%), die Alkoholkonzentration sank auf 12,9 g/l. Grund dafür war wahrscheinlich, dass mehr Zellen auch mehr Energie für den Erhaltungs- und Fortpflanzungsstoffwechsel benötigten, welcher dann dem Produktionstoffwechsel fehlte.

Eine numerische Zusammenfassung der Ergebnisse der Schüttelkolbenversuche liefert Tabelle 10.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Schüttelkolbenversuche

Versuchsnummer	Bezeichnung	c(EtOH) [g/l]	Ausbeute (bezogen auf WK) [%]	c(RS) [g/l]	pH – Wertdifferenz
SK_V 1	20 g/l WK, H155, UK41, 72h	1,47	12,9	2,58	0,59
SK_V 2	30 g/l WK, H155, UK41, 72h	2,41	14,11	3,46	0,59
SK_V 3	60 g/l WK, 5 g/l TH, 72h	3,35	9,84	1,78	1,45
SK_V 4	80 g/l WK, 5 g/l TH, 72h	3,97	8,74	2,87	1,27
SK_V 5	80 g/l WK, 5 g/l TH, αA, 72h	12,62	24,7	7,33	0,99
SK_V 6	80 g/l WK, 5 g/l TH, αA, nur LW, 72h	19,38	37,94	11,35	0,77
SK_V 7	80 g/l WK, 5 g/l TH, αA, nur LW, 24h	17,05	33,38	18,38	0,08
SK_V 8	80 g/l WK, 20 g/l TH, αA, nur LW, 24h	12,94	25,12	18,79	0,21

4.2 Fermentationen im 5 l – Braunreaktor

Die Versuche im 5 l – Bioreaktor stellten die erste Stufe des Upscalings nach den Schüttelkolbenversuchen dar.

Im ersten Versuch sollte untersucht werden, wie der Prozess verläuft, wenn ein ligninfreies Substrat, MKC, eingesetzt wird (Abbildung 13). Dabei konnte festgestellt werden, dass die Ethanolproduktion auch in diesem Versuch keine 24 h andauerte. Nach einem Tag betrug die Ausbeute 47,1 % bei 8,03 g/l Ethanol, wobei das gemessene Maximum von 8,92 g/l nach 72 h (Ausbeute: 52,3 %) nur unwesentlich höher lag. Die Essigsäureproduktion setzte messbar erst nach ca. 30 h ein. Der Abbau der reduzierenden Zucker stagnierte schon sehr früh, was allerdings kein Zeichen für fehlende Stoffwechselaktivität sein muss, da von einer gewissen Dynamik ausgegangen werden kann: Möglicherweise wurden verwertbare Zucker durch die Enzyme freigesetzt, die in gleichem Maße durch die Hefen utilized wurden.

Als wichtiges Ergebnis ist zu vermerken, dass auch eine ligninfreie Umgebung zur frühen Inhibierung der Alkoholbildung führte. Ein negativer Einfluss des Substrates (z. B. durch Lignin) kann daher zumindest als minimiert, aber nicht als Ursache, betrachtet werden.

Die Schwankungen der Zellzahl können dank der eingefügten Trendlinie relativiert werden; es handelt sich hauptsächlich um die unter Punkt 2.6.1 diskutierten Fehler. Als Beispiel zur Berechnung wurde die Probe nach 24 h ausgewählt. Die gezählten Zellen je B – Quadrat (analog zu 3.2.4) betrugen durchschnittlich 18,25. Daraus ergibt sich folgende Rechnung:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\mu\text{l}} = \frac{18,25 \text{ Zellen je B-Quadrat} \times 250}{0,0025 \times 0,1 \times 16 \times 0,01} = 114062500 \quad (4)$$

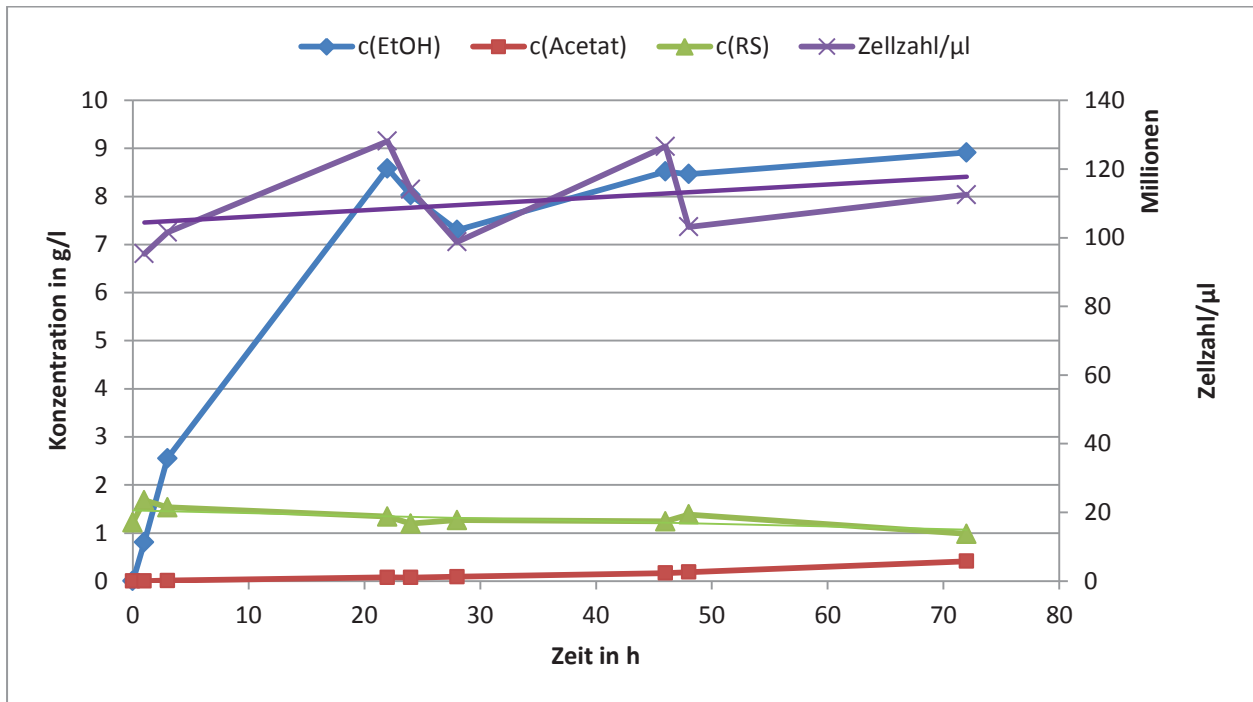


Abbildung 13: Fermentationsdiagramm batch 01

Die Versuche batch 02 und batch 03 liefen mit Weizenkleie als Substrat ab. Allerdings kam es zu technischen Schwierigkeiten; die Probenahmeeinrichtung wurde durch Kleie verstopft, und auch die Nachführung misslang aufgrund der geringen Schlauchdurchmesser und der Engpässe am Vorlagenausgang und Fermenterdeckeileingang. Daher musste diese Stufe des Upscalings (5 l Reaktor) frühzeitig abgebrochen, und im größeren Maßstab fortgesetzt werden.

Dennoch konnte als Ergebnis der beiden Versuche vermerkt werden, dass das bekannte Problem der frühen Inhibierung der Ethanolproduktion vorliegt (Abbildungen 14 und 15). Die Essigsäureproduktion verlief deutlicher als mit MKC als Substrat, allerdings sind die Konzentrationen für die reduzierenden Zucker auch ein Vielfaches höher, sodass nach Ende der Ethanolbildung genug Substrat für das Nebenprodukt vorhanden war. In beiden Versuchen ist deutlich zu sehen, dass der steilste negative Anstieg der $c(RS)$ – Kurve mit dem steilsten Anstieg der $c(Acetat)$ – Kurve übereinstimmte. Dies wurde als Beleg gewertet, dass der Verbrauch der vorhandenen Zucker hauptsächlich in der Bildung von Essigsäure resultierte.

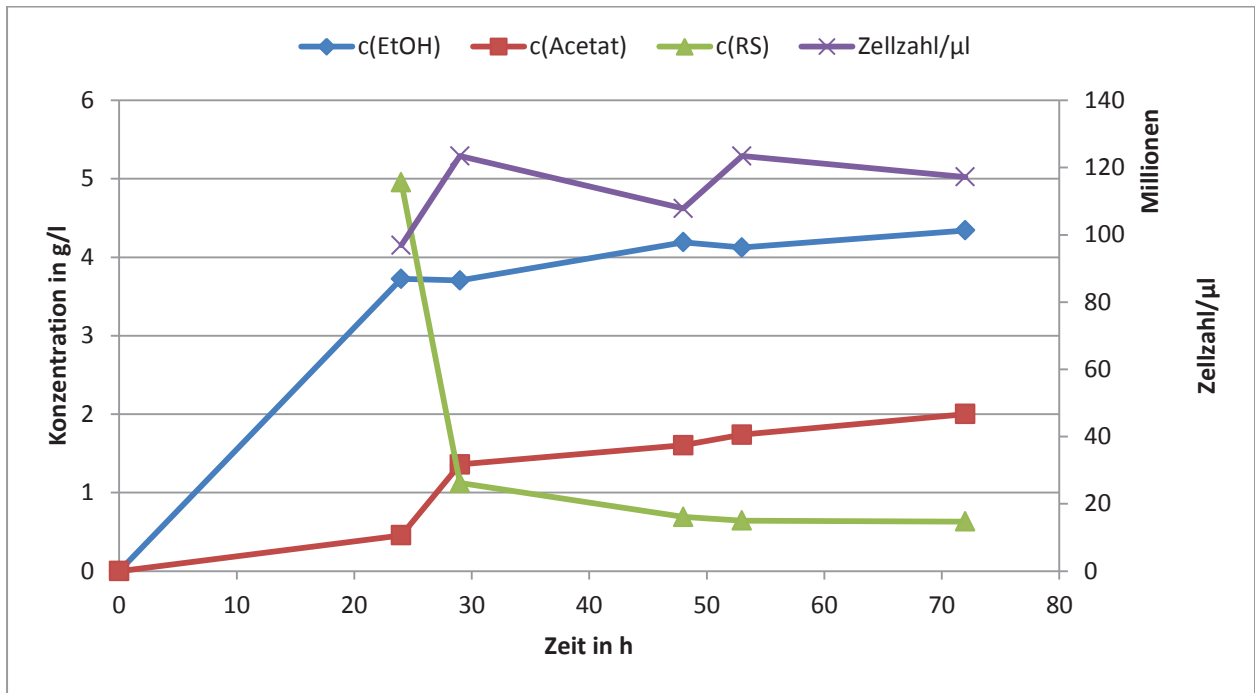


Abbildung 14: Fermentationsdiagramm batch 02

Die Ausbeute des Versuchs batch 02 betrug nach 24 h 21,9 % bei einer Ethanolkonzentration von 3,7 g/l, welche nach 72 h noch um 0,6 g/l anstieg.

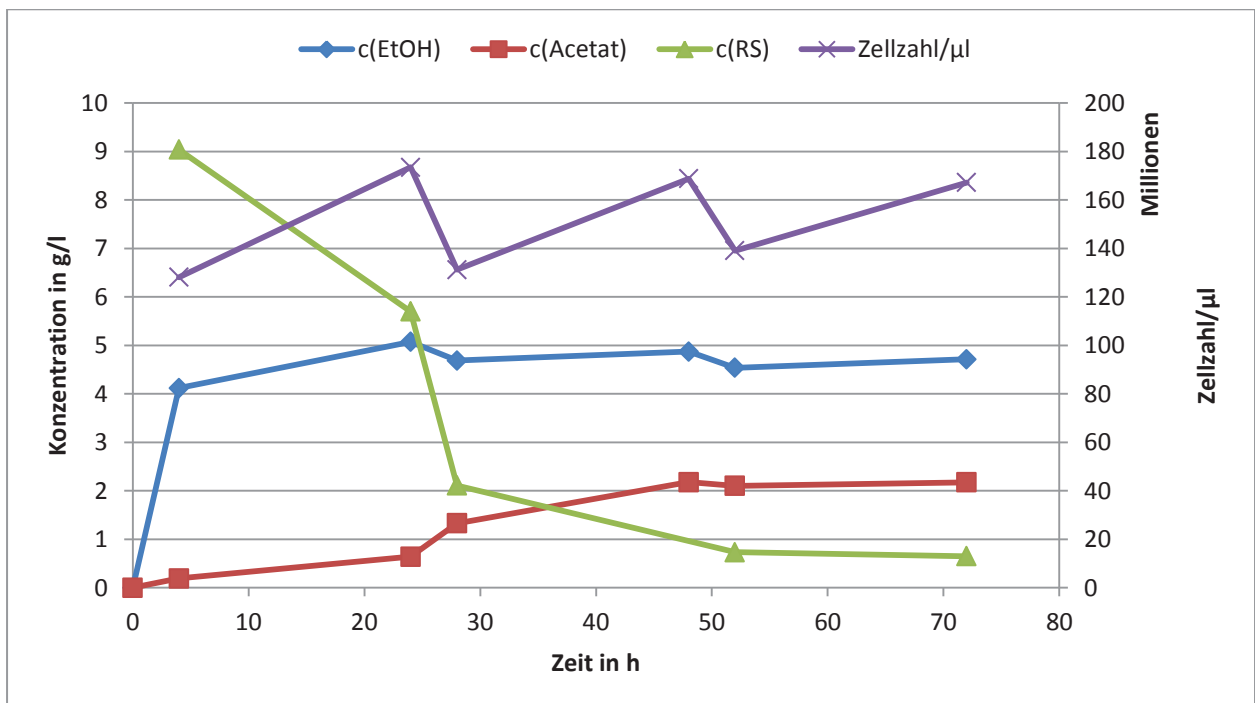


Abbildung 15: Fermentationsdiagramm batch 03

Mit batch 03 sollte erstmals eine Nachführung getestet werden. Allerdings traten die oben genannten Umstände ein, weshalb der Versuch ohne Feed lief. Es wurde nach 24 h eine

Ausbeute von 29,8 % erreicht (5,07 g/l), die sich aufgrund sinkender Ethanolwerte nach 72 h auf 27,6 % (4,71 g/l) reduzierte.

Abbildung 16 stellt nochmal die erreichten Ausbeuten im Überblick dar, Tabelle 11 liefert eine Übersicht über die Details.

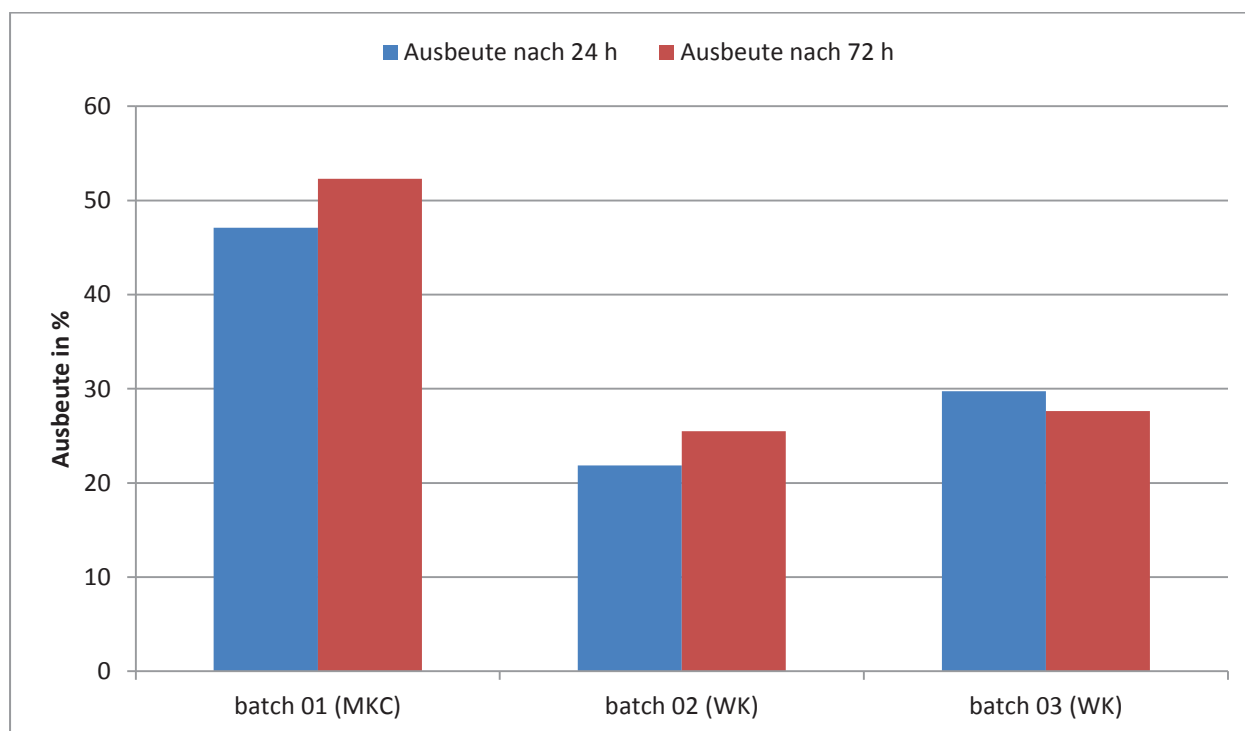


Abbildung 16: Zusammenfassung der Ausbeuten der Versuche im 5 l – Bioreaktor

Tabelle 11: Zusammenfassung der Ergebnisse der Versuche im 5 l – Bioreaktor

Versuchsnummer	Substrat, c(Substrat) [g/l]	Medium (siehe Tabelle 3)	Ausbeute nach 24 h – 72 h	[%] nach 24 h – 72 h	c(EtOH) [g/l]
batch 01	MKC, 30	A	47,11 – 52,3	8,03 – 8,92	
batch 02	WK, 30	A	21,85 – 25,47	3,72 – 4,34	
batch 03	WK, 30	A	29,75 – 27,64	5,07 – 4,71	

4.3 Fermentationen im 42 l - Bioreaktor

Diese Versuche wurden als Step – by – Step – Optimierung durchgeführt. Das bedeutet, nach jeder Fermentation wurden die Ergebnisse analysiert. Parameteränderungen für die nächste Fermentation, basierend auf den erlangten Erkenntnissen aus Bioreaktor- und den neuesten, parallel laufenden Schüttelkolbenversuchen, festgelegt.

Die ersten zwei Versuche dienten der Ermittlung der geeignetsten Substratnachführungsmethode, und sind daher, vor allem in Hinblick auf die erreichte Ausbeute, wenig aussagekräftig. Allerdings zeigen sie deutlich, dass die verwendeten Cellulasekomplexe von *Penecillium verruculosum* über die gesamte Fermentationsdauer stabil blieben. Dies wird deutlich in Abbildung 17. Die Trendlinien zeigen streng genommen zwar einen sehr leichten Abfall, betrachtet man jedoch die Einzelwerte, sind ebenso leichte Schwankungen in beide Richtungen wahrnehmbar. Ein starker Abfall der Werte über die Zeit würde auf eine Denaturierung oder den Abbau der Enzyme durch die Hefen hindeuten. Steigende Werte sind, wissenschaftlich betrachtet, nicht möglich, da keine weiteren Enzyme, die die FPA erhöhen würden, hinzugefügt wurden. Daher sind erhöhte Werte durch Messfehler und Ungenauigkeiten der Messmethode zu begründen. Die Stabilität der Enzymkomplexe ermöglicht eine Enzymrückgewinnung im späteren Verfahren, und damit eine Kosteneinsparung.

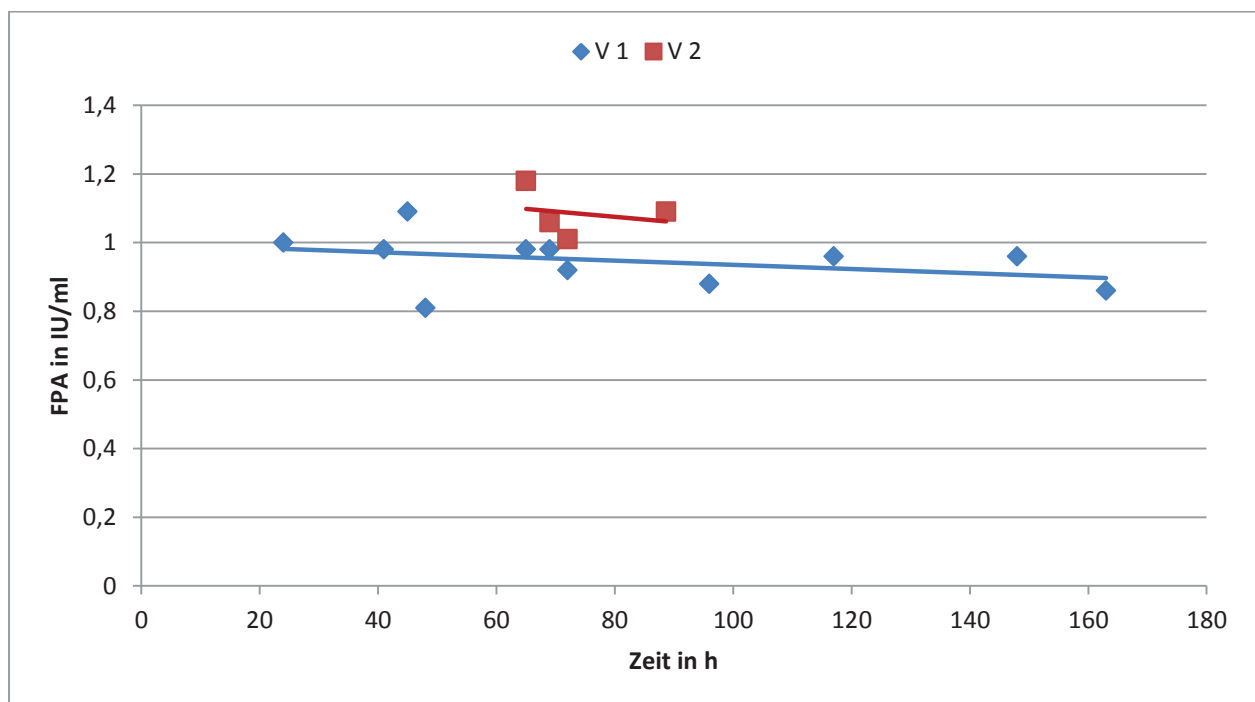


Abbildung 17: Verlauf der Cellulaseaktivität über die Fermentationsdauer im 42 l – Bioreaktor

Um eine solche Fermentation bewerten zu können, ist ein Vergleich der erreichten Ausbeuten notwendig. Dem kommt die Abbildung 18 nach. Dargestellt sind die erreichten Ausbeuten nach 24 h und, für die früheren Fermentationen, auch nach 72 h.

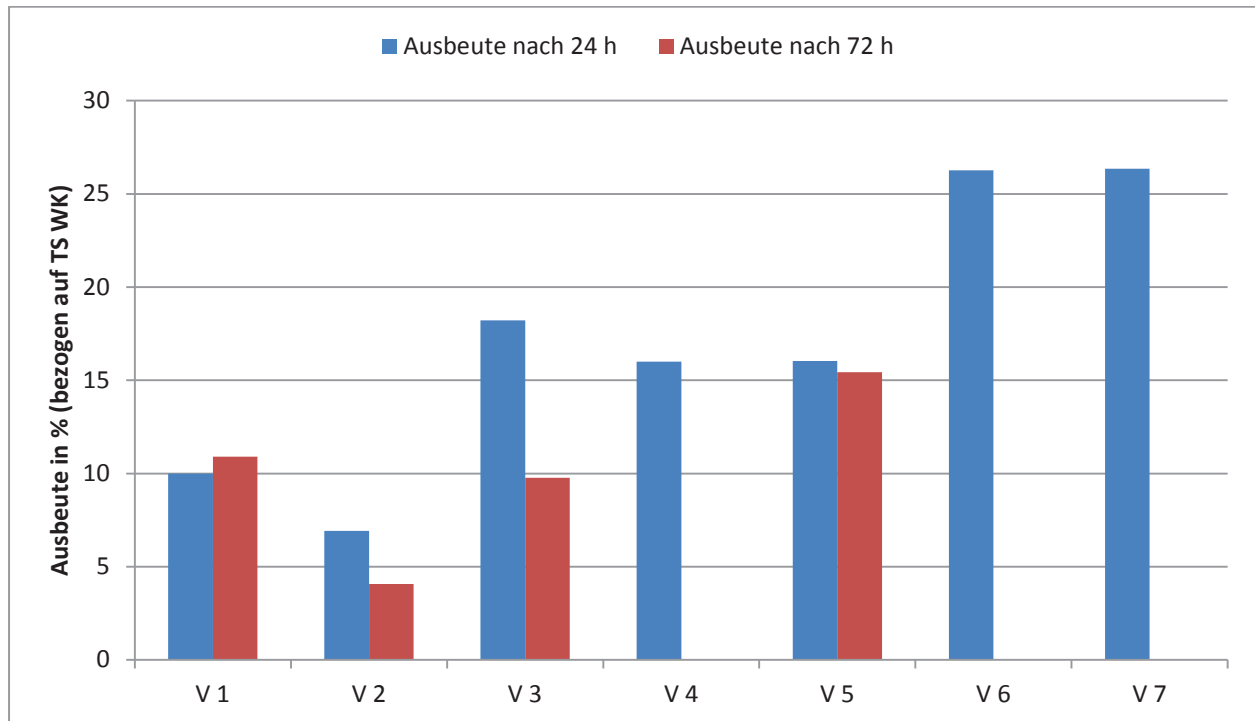


Abbildung 18: erreichte Ausbeuten der 42 l - Versuche, bezogen auf die TS der insgesamt eingesetzten WK

Wie oben bereits erwähnt, sind die Werte von V 1 und V 2 nur bedingt verwendbar, da es sich um Testversuche handelte. V 3 wurde als Fed – Batch mit standardisierter Nachführungsmethode durchgeführt. Die hier erreichte Ausbeute betrug nach 24 h 18,2 %; es wurde bis dahin einmalig nachgefüttert. Nach 72 h und 6 weiteren Feeds betrug die Ausbeute nur noch 9,8 %. Auch in V 5 sank die Ausbeute von 24 h bis 72 h ab (von 16 % auf 15,4 %). Das liegt daran, dass trotz Substratnachführung kein Alkohol mehr gebildet wurde. Es ist zu berücksichtigen, dass mit jeder Zugabeeinheit das Arbeitsvolumen erhöht und das Produkt verdünnt wird, und die Ausbeute sinkt. Wie auch die Schüttelkolbenversuche zeigten, wurde nach 24 h kein Ethanol mehr gebildet. Dies lässt sich auch noch genauer anhand des Fermentationsdiagramms zeigen (Abbildung 19). Mit V 4 wurde auch ohne Weizenkleienachführung eine Ausbeute von 16 % erreicht, was dem Wert aus V 5 nach 24 h entsprach. Allerdings wurden auch hier bereits Erkenntnisse aus den Schüttelkolbenversuchen umgesetzt, denn V 5 wurde ohne Zusatz von Nährsalzen, sondern ausschließlich mit Leitungswasser als flüssiger Phase des Fermentationsmedium gefahren. Hier bestätigte sich, dass damit keine Performanceverluste

verbunden sind. V 6 und V 7, beide durchgeführt mit Vorhydrolyse (Einsatz von α -Amylase und α -Glucosidase), erreichten Ausbeuten von 26,3 % und 26,3 %, also auf gleichem Niveau (26,3 %).

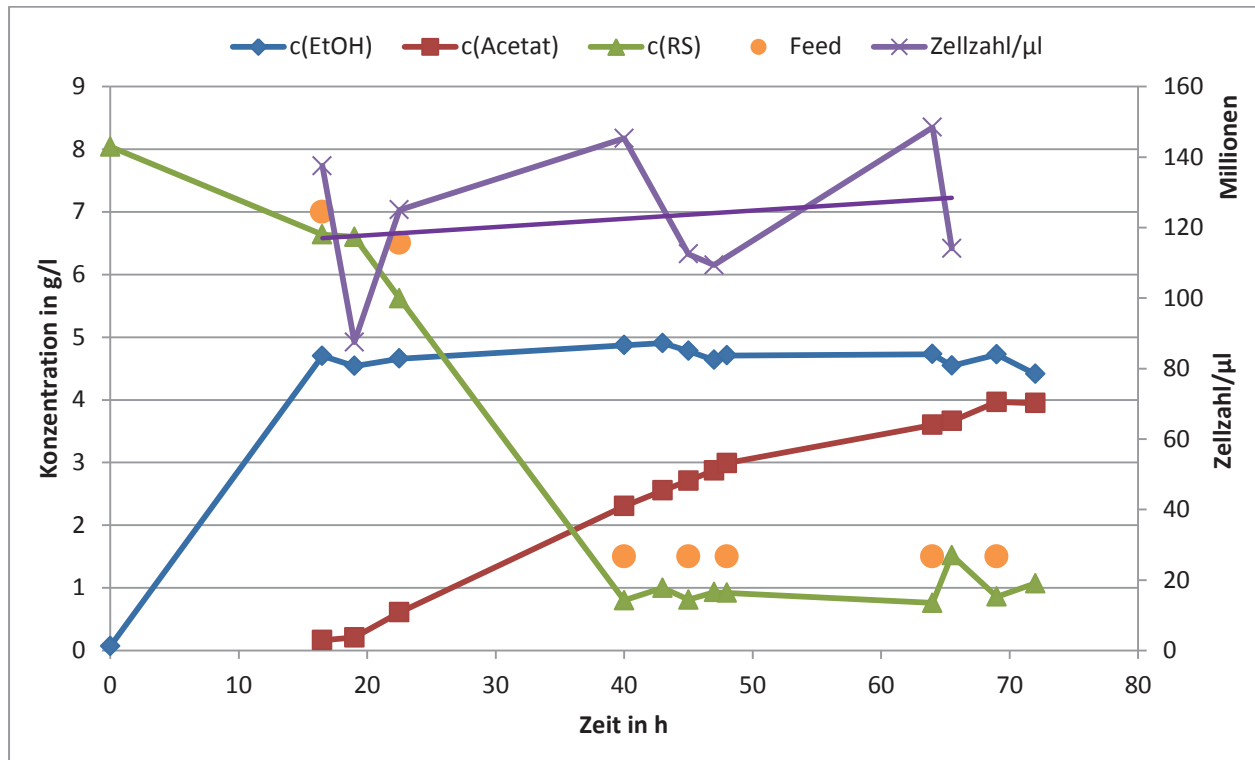


Abbildung 19: Fermentationsdiagramm V 3

Dieses Diagramm zeigt, dass die Ethanolbildung de facto nach 16 h, trotz nachfolgender WK-Zugaben, abgeschlossen war (die orange-farbenen Punkte kennzeichnen die Zeitpunkte der Nachführung entlang des Verlaufs der RS-Konzentration). Zur gleichen Zeit begann eine starke Essigsäureproduktion, und die von den Enzymen freigesetzten reduzierenden Zucker wurden verbraucht. Da mit den genutzten Analysemethoden keine weiteren Nebenprodukte außer Acetat entdeckt wurden, ist davon auszugehen, dass die Hefen die bereitgestellten Zucker hauptsächlich dafür verwendeten. Die Hefezahl zeigt eine stabilen Trendlinie, die nicht auf eine Reduktion der Zellzahl mit fortschreitender Fermentationsdauer schließen lässt.

Die Feeds ließen die RS – Kurve kurzzeitig ansteigen, blieben allerdings ohne Einwirkung auf die Ethanolkonzentration. Dass die Zucker zur Essigsäureproduktion verwendet wurden, lässt sich auch durch den Prozessverlauf des Versuchs V 3 belegen (Abbildung 20).

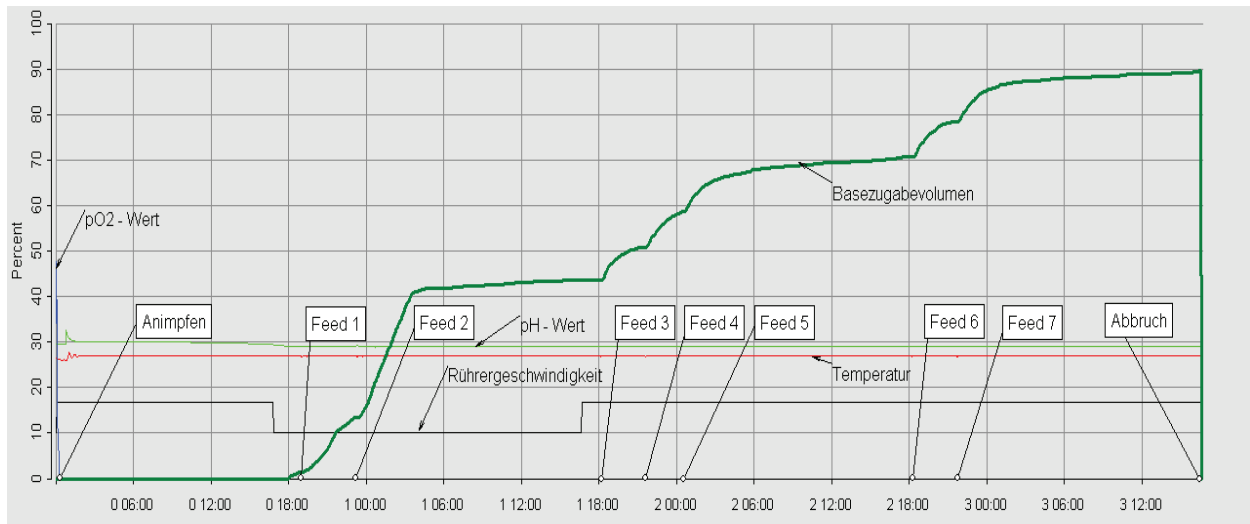


Abbildung 20: Verlaufsdigramm V 3

Unmittelbar nach jedem Feed stieg die Basezugabekurve (dunkelgrün) an. Dies ist besonders deutlich ab Feed 3 zu sehen. Da Base nur zugegeben wird, wenn der pH – Wert sinkt, ist davon auszugehen, dass Säure produziert wurde. Die Diagramme der anderen Fermentationen V 1, V 2 und V 5 (siehe Anhang) bestätigen diese Erkenntnisse. Daher kann die Basezugabekurve als Indikator für die Essigsäureproduktion betrachtet werden. Formal kann folgender Zusammenhang aufgestellt werden, der jedoch mittels besser geeigneter Analysemethoden für die Nebenprodukte im Kulturmedium nachgewiesen werden muss.

$$c(\text{Acetat}) \sim V_{\text{Zugabe}}(\text{Base})$$

Mit der Änderung der Rührerdrehzahl während der Fermentation von 250 rpm auf 150 rpm wurde getestet, ob die Verringerung des Leistungseintrags eine Verlängerung der Ethanolproduktion zu Folge hat, da durch die niedrigere Rührergeschwindigkeit die Hefen „geschont“ werden sollten. Wie zu sehen ist, hatte dies allerdings keinen Effekt.

V 4 lieferte genauere Erkenntnisse zum Fermentationsverlauf innerhalb der ersten 24 h (Abbildung 21). Die Daten lassen vermuten, dass sogar nur in den ersten ca. 5 bis 6 Fermentationsstunden Ethanol produziert wurde. Bis zu diesen Zeitpunkten sank die RS-Konzentration signifikant ab, Zucker wurde also verbraucht, während die Kurve danach stagnierte. Analog dem simultanen Abfall der RS-Konzentration entwickelte sich der Anstieg der Ethanolkonzentration rückläufig. Es kann von einer intakten Zellkultur über den betrachteten Versuchszeitraum ausgegangen werden, da die Zellzahlen je μl über 24 h stabil blieben. Daher kann ein Zellkulturtod als Grund für die stagnierende Alkoholproduktion ausgeschlossen werden. Eine Limitation verfügbarer löslicher Zucker scheidet bei einer ständig verfügbaren

Konzentration von mindestens 10 g/l ebenfalls als Ursache aus. Essigsäure blieb die gesamte Fermentationsdauer über maximal in Spuren nachweisbar, und wirkte somit auch nicht inhibierend.

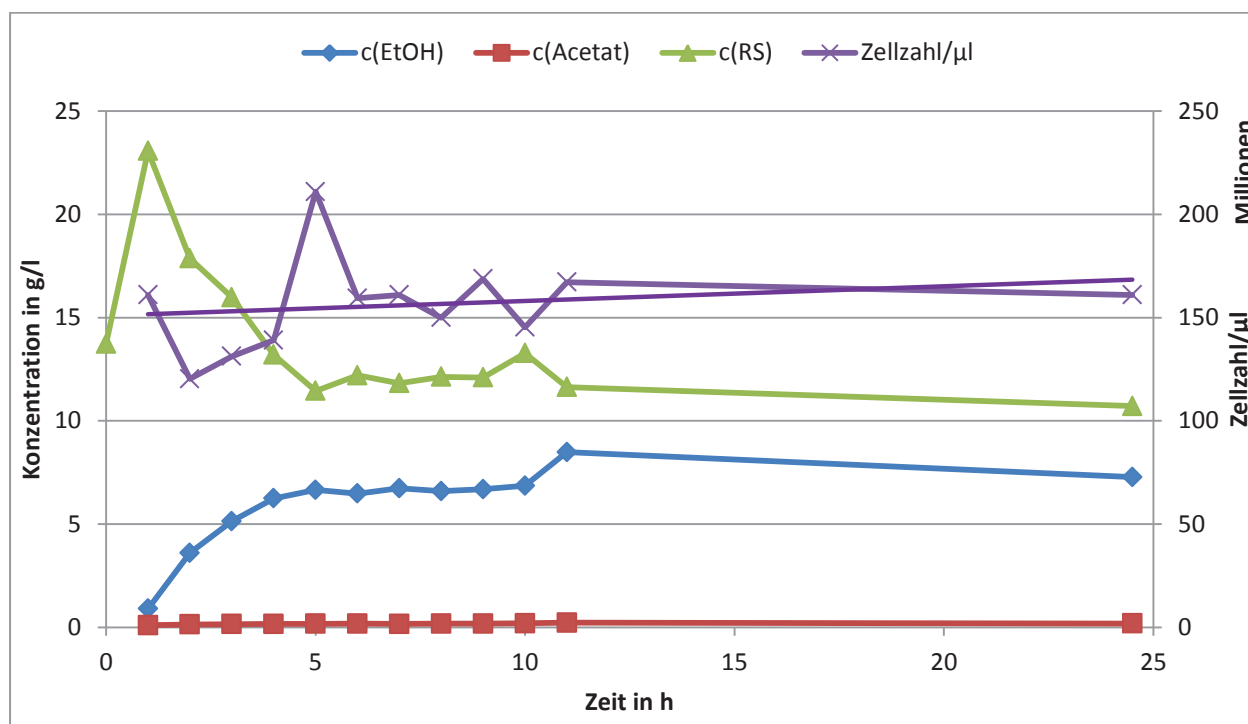


Abbildung 21: Fermentationsdiagramm V 4

Aufgrund der bisher erlangten Erkenntnisse ist eine Fermentationsdauer von 24 h ausreichend; weitere Stunden erbrachten kaum Ethanolzuwachs und verbrauchten daher nur unverhältnismäßig viel Energie. Nachführungen waren insofern unnützlich, da zum Zeitpunkt des Endes der Ethanolproduktion noch ausreichend hohe RS-Konzentrationen, und damit eine ausreichende Kohlenstoffquelle, für die Hefen, vorhanden waren. Auch Nachführungen, die innerhalb der ersten 24 h erfolgten, zeigten keinen positiven Einfluss. Eine inhibierende Wirkung von Lignin oder anderen Stoffen kann ebenso ausgeschlossen werden, da die Versuche im 5 l – Bioreaktor mit ligninfreier MKC als Substrat auf die gleichen Sachverhalte rückschließen ließen.

Mit den Versuchen V 6 und V 7 sollten die Erkenntnisse aus den Schüttelkolbenversuchen im kleintechnischen Maßstab überprüft werden. Beide wurden aufgrund der bisherigen Ergebnisse nur 24 h und ohne WK-Nachdosierung durchgeführt. Die Unterschiede von V 6 zu V 7 bestanden in der verringerten vorgelegten WK-Konzentration, dem leicht erhöhten Leistungseintrag, und erhöhten Enzymbeladungen. Wie Abbildung 18 veranschaulicht, wurde trotz allem die Ausbeute nicht erhöht. Das bedeutet zunächst: mit geringerem Einsatz von

Energie und teuren Enzymen konnten ähnliche Ausbeuten analog dem hohem Einsatz erzielt werden.

Die Abbildungen 22 und 23 zeigen deutlich, dass bereits nach wenigen Stunden die Ethanolproduktion nahezu beendet ist. Die Probe zum Zeitpunkt 0 wurde im Zuge mit der Überführung der Trockenhefe, α -Glucosidase und Cellulasekomplexe entnommen. Erkennbar ist der darauffolgende starke Anstieg der RS – Konzentrationen. Dieser liegt begründet in der Freisetzung von Mono- und Disacchariden bzw. Oligomeren aus Polysaccharidverbänden. Bei beiden Fermentationen wurden die finalen Ethanolkonzentration (V 6 = 14,93 g/l und V 7 = 8,98 g/l) bereits nach 4 Stunden mit einem geringfügig reduzierten Wert von 1 g/l erreicht. Weiterhin ist wieder zu sehen, dass vor allem bei V 7 zum gleichen Zeitpunkt der Zuckerverbrauch stagnierte, bis die Acetatproduktion einsetzte und dafür Zucker verbraucht wurde. Allerdings sind nach 24 h noch hohe RS – Konzentrationen vorhanden (V 6: 14,54 g/l; V 7: 9,29 g/l).

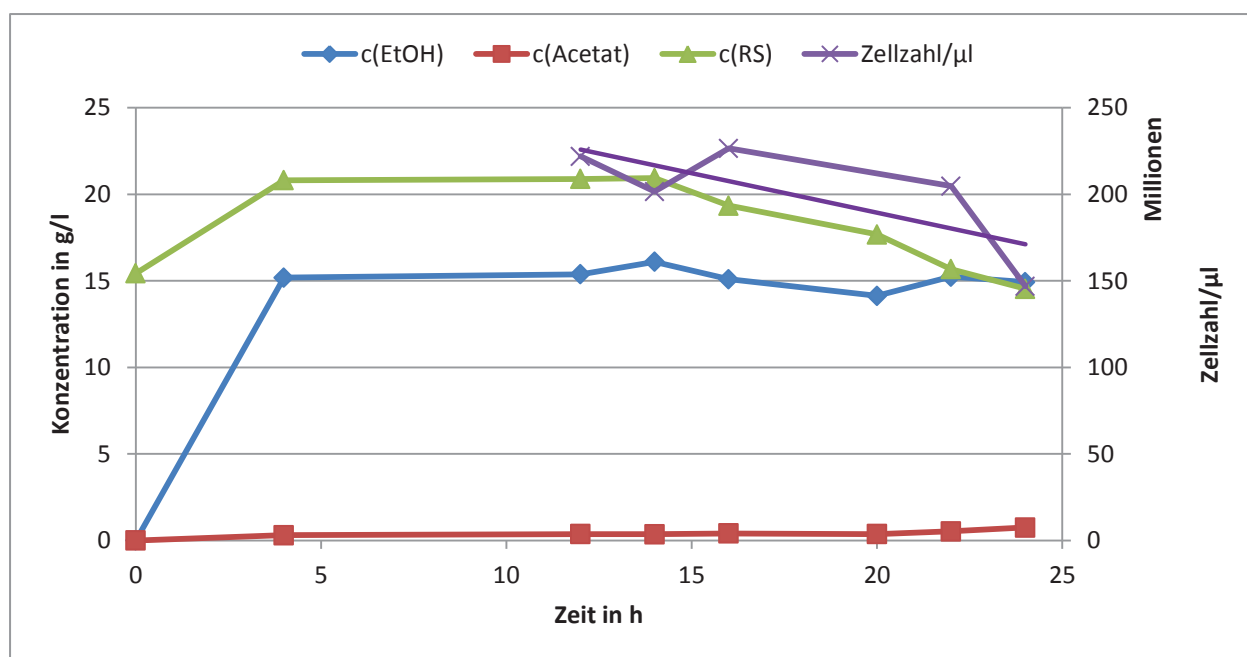


Abbildung 22: Fermentationsdiagramm V 6

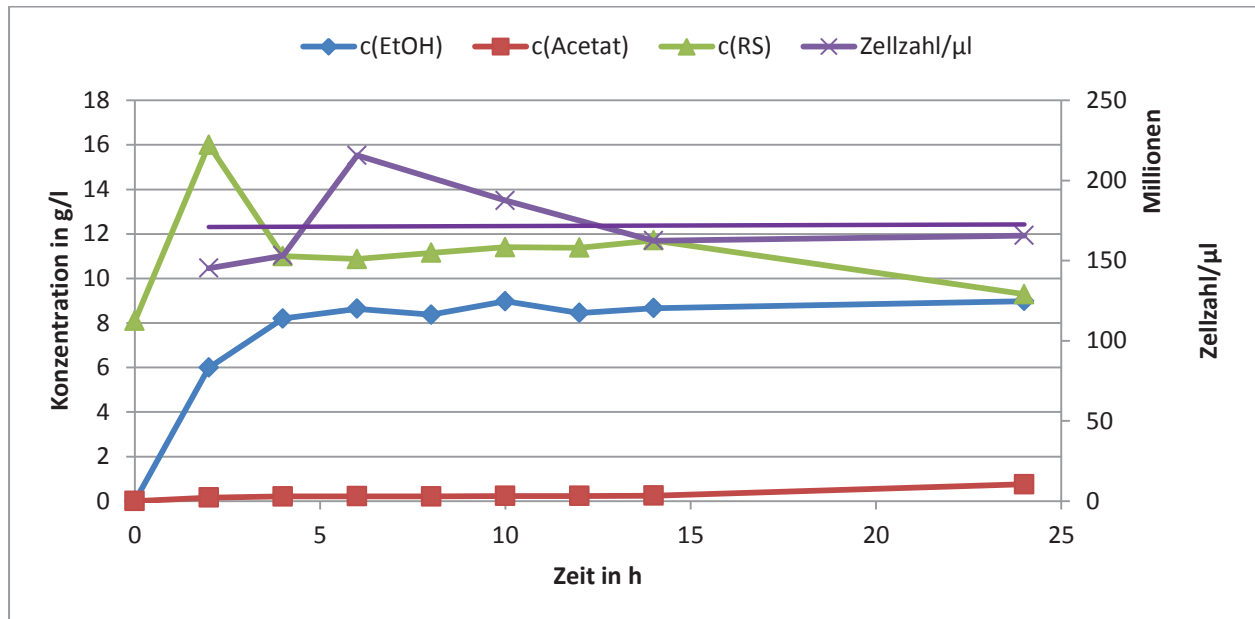


Abbildung 23: Fermentationsdiagramm V 7

Tabelle 12: Zusammenfassung Ergebnisse der Versuche im 42 l – Bioreaktor

Versuchsnummer	c(WK) [g/l]	Medium (siehe Tabelle 3)	Vorhydrolyse	c(EtOH) [g/l] nach 24 h – 72 h	Ausbeute [%] nach 24 h – 72 h
1	45	B	nein	2,56 – 2,79	10 – 10,9
2	45	B	nein	2,72 – 3,19	6,93 – 4,07
3	45	B	nein	4,66 – 4,41	18,21 – 9,76
4	80	B	nein	7,28	16,01
5	100	LW	nein	9,11 – 10,72	16,03 – 15,43
6	100	LW	ja	14,93	26,27
7	60	LW	ja	8,98	26,34

5 Zusammenfassung und Ausblick

Mit dieser Arbeit wurden Erkenntnisse zur Produktion von Bioethanol in einem SSF – Prozess auf Basis von Weizenkleie als Substrat erlangt.

Die Untersuchungen des Prozesses im Schüttelkolbenmaßstab ergaben, dass ein 24stündiger Prozess ausreicht, um nahezu die Ausbeute eines 72stündigen Verfahrens zu erreichen. Der geringe in den letzten 48 h produzierte Alkohol wiegt den zusätzlichen Aufwand und den Energieverbrauch des 72stündigen Prozesses nicht auf. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass mittels einer Vorhydrolyse, die den Stärkeanteil der Weizenkleie den Hefen zugänglich macht, eine Ausbeute von ca. 38 % nach 72 h (33,4 % nach 24 h) erreicht werden kann. Ein weiteres kostensenkendes Ergebnis ist, dass die dem Medium zugegebenen Salze nicht benötigt werden, die Spurenelemente im Leitungswasser völlig ausreichen, und sogar die Ausbeute steigern.

Die Versuche im 5 l – Bioreaktor brachten die Erkenntnis, dass für feste Substrate wie Weizenkleie besondere technische Voraussetzungen erforderlich sind, damit der Prozess funktioniert.

Im größten Maßstab, den 42 l – Bioreaktorversuchen, konnten letztlich die Erkenntnisse aus den Schüttelkolbenversuchen bestätigt und das Verfahren optimiert werden. Als Ergebnis konnten in einem 24stündigen Prozess bis zu 26,3 % der Weizenkleie umgesetzt werden. Aufgrund visueller Erfahrungen wird eine maximale WK – Konzentration von 80 g/l empfohlen. Eine Optimierung des Sterilisationsvorgangs kann diese Zahl nach oben korrigieren.

Weitere Ansätze, z. B. die Erhöhung der Hefezahl, brachten keine Verbesserung der Ausbeute. Da Temperatur und pH – Wert festgesetzt wurden, können folgende Prozessparameter (Tabelle 13) als die erfolgreichsten der Untersuchungen angesehen werden.

Tabelle 13: erfolgreichste Parameter der Fermentationsversuche

Vorhydrolyse		
Parameter	Wert	Anmerkung
Temperatur	75 °C	Je nach technischen Möglichkeiten höher, bis zur vorgegebenen Grenze des Enzymherstellers
pH – Wert	ca. 7	
Rührergeschwindigkeit	300 rpm	Optimierbar
Dauer	6 h	Optimierbar
α – Amylase (Beladung)	100 U/g TS	Optimierbar
Prozess		
Parameter	Wert	Anmerkung
Temperatur	35 °C	
pH – Wert	5	
pO₂ – Wert	0 %	
Rührergeschwindigkeit	300 rpm	Optimierbar
Medium	Leitungswasser	
Substratkonzentration	60 – 80 g/l	Optimierbar
Hefekonzentration	5 g/l	Trockenhefe
Cellulasebeladung	15 IU/g TS	Optimierbar
α – Glucosidase (Beladung)	5 U/g TS	Optimierbar

Wie zu sehen ist, gibt es noch Optimierungspotential. So kann eine höhere Rührergeschwindigkeit durchaus positiv auf die Affinität der Enzyme zum Substrat wirken, und ist in jedem Falle preiswerter als eine Erhöhung der Enzymbeladungen, die den gleichen Effekt hervorrufen würden. Weiterhin kann untersucht werden, ob eine geringere Hefekonzentration die Ethanolproduktion verlängert und höhere Ausbeuten bewirkt.

Das größte Potential für eine Ausbeutensteigerung wird aber in der Verwertung der Hemicellulose gesehen. Mit einem Anteil von 33,2 % stellt sie einen nicht zu unterschätzenden Anteil in der Weizenkleie. Dafür nötig sind allerdings nicht nur weitere teure Enzyme, die die entsprechenden Strukturen spalten und Pentosen freigeben können. Es werden auch

Produktionshefen benötigt, die im großtechnischen Maßstab Fünffachzucker verwerten können. Gentechnische Arbeiten zum Erreichen dieses Ziels werden derzeit durchgeführt. So wurde z. B. ein Gen für einen Arabinose – Transporter aus *Pichia stipitis* in *S. cerevisiae* transplantiert (Europäische Patentschrift EP 2 102 348 B1). Für einen belast- und bezahlbaren Industriestamm gibt es aber noch keine Ergebnisse.

6 Mögliche industrielle Umsetzung des Verfahrens

In der Industrie ist es wichtig, Kosten zu sparen. Daher muss ein Verfahren so aufgebaut werden, dass viele Schritte automatisch, beziehungsweise möglichst „per Knopfdruck“ geschehen. Einen einführenden Vorschlag für ein solches Verfahren wird in Abbildung 18 dargestellt.

Das Substrat, Weizenkleie, wird im WK – Lagertank gespeichert. Dieser ist in Richtung der unteren Öffnung konisch gestaltet, sodass das Substrat bei Öffnung des angeschlossenen Ventils aufgrund der Schwerkraft durchfließt. Nebenbei wird so auch das Prinzip „first in – first out“ erfüllt. Die nächste Station der Weizenkleie ist der Wirbelschichtreaktor. Dieser wird maximal zu 60 % gefüllt, damit genügend Raum zur Luftverwirbelung bleibt, bei der über 121 °C heiße Luft eingeblasen und so die Keimzahl im Substrat reduziert wird.

Nach einer Zeit t , die in einem Optimierungsversuch festzulegen ist, wird die Weizenkleie über eine Feststoffpumpe in den SSF – Bioreaktor gefördert. Über verschiedene Anschlüsse werden Wasser, Enzyme und Trockenhefe zugeführt; die zur pH – Wertreglung erforderlichen Korrekturmittel (Base und Säure) werden in Vorlagentanks gelagert und bei Bedarf zugeführt, ebenso das Antischaummittel.

Die Fermentation läuft über eine computergesteuerte programmierte Prozessabfolge (Vorhydrolyse, dann Zugabe weiterer Enzyme und Trockenhefe, etc.) automatisiert ab. Alle nötigen Anschlüsse für Messelektroden, Durchflussmesser, Thermometer etc. sind nicht in der Abbildung eingetragen.

Mit der Beendigung der Charge wird das Kulturmedium, und die darin enthaltenen Hefen, thermisch inaktiviert, abgelassen und restliche Feststoffe, vor allem das Lignin, abfiltriert. Das Filterprogramm entsteht dabei in einer eigenen Untersuchung. Im Ligninbehälter wird es

aufgefangen und kann für weitere Verwendungen, z. B. der Herstellung von Biopolymeren, abgeholt werden.

Das Permeat wird über eine Säule geführt, die über Antikörperbindung die verwendeten Enzyme rückgewinnen kann. Allerdings ist dies kein notwendiger Schritt, denn auch nach der Vakuumsdestillation bleiben die Enzyme intakt. Das Ziel der Destillation ist die Abtrennung des gewünschten Ethanol. Ohne Vakuum siedet es bei 70 °C, bei Unterdruck sind niedrigere Temperaturen (abhängig vom Druck) ausreichend, wodurch die Enzyme erhalten werden.

Das Ethanol wird anschließend in einem Lagertank zwischengespeichert und kann zur Weiterverarbeitung abtransportiert werden.

Um weitere Kosten zu sparen, kann der Destillationsrest (Schlempe), in dem sich nun Nebenprodukte der Fermentation (z. B. Essigsäure) sowie Rückstände (z. B. Bestandteile lysierter Hefezellen, reduzierende Zucker) befinden, wiederverwendet werden. Dazu wird die Schlempe in einem Neutralisationsreaktor durch Zugabe der gleichen Base, die bereits im SSF – Prozess zum Einsatz kam, auf den für den Prozess benötigten pH-Wert 5 eingestellt. So ist eine Erhöhung der Salzfracht durch Eintrag einer salzhaltigen Base wie Natriumhydroxyd ausgeschlossen, außerdem können Kosten durch weitere Tanks eingespart werden. Die Schlempe kann nun für den nächsten Prozess bereitgestellt werden.

Aussagen zu Kosten können leider nicht getroffen werden, da zu Personalkosten, Anlagenpreisen etc. keine Zahlen vorliegen. Dieses Verfahren soll lediglich als Idee dienen, wie ein industrieller Ablauf zur Bioethanolgewinnung aus Weizenkleie in einem SSF – Prozess gestaltet werden könnte.

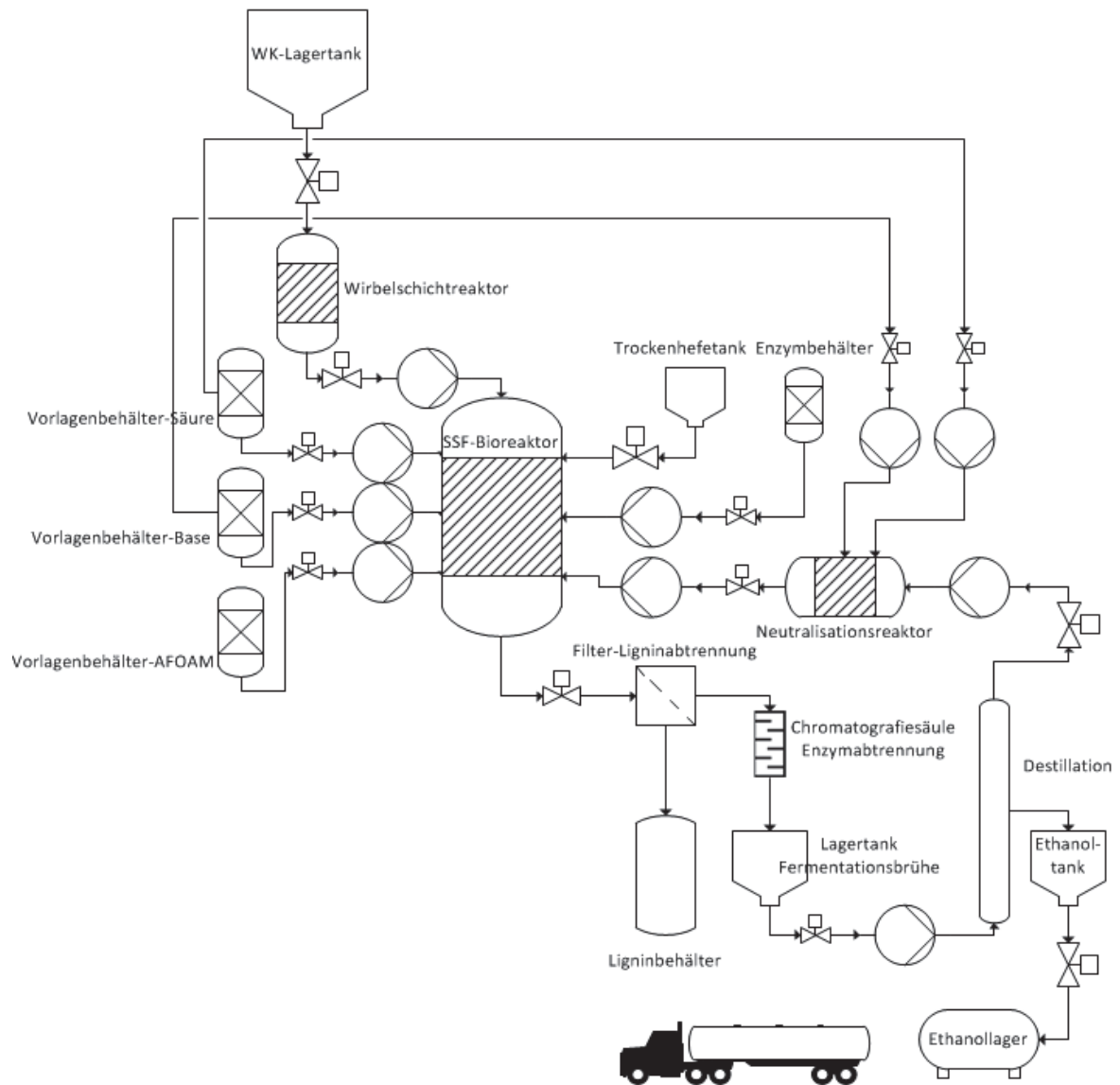


Abbildung 24: Verfahrensschema

7 Literaturverzeichnis

- [1] Andreae-Noris Zahn AG (Hrsg.): Weizenkleie. [http:// www.gesundheit.de/lexika/medizin-lexikon/weizenkleie](http://www.gesundheit.de/lexika/medizin-lexikon/weizenkleie). 13.09.2012; 13.09.2012.
- [2] Antranikian, G. (Hrsg.) et al.: Angewandte Mikrobiologie. 1. Aufl. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2006).
- [3] Arndt, S.: Untersuchungen zum SSF-Prozess der simultanen Verzuckerung und Fermentation von Cellulose mit einem *Penicillium verruculosum* Enzymkomplex. Diplomarbeit, Hochschule Fresenius (2012).
- [4] Fakruddin, Md. et al.: Analysis of Key Factors Affecting Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* IFST-072011. Biotechnology 11 (2012), S. 248-252.
- [5] Gorwa-Grauslund, M. F. et al.: Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 82 (2007), S. 340-349.
- [6] Gouveia, E.R. et al.: Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 in simultaneous saccharification and fermentation of delignified sugarcane bagasse. Industrial Crops and Products 36 (2012), S. 584–588.
- [7] Gräber, R.: Weizenkleie – Wirkung, Anwendung und Nutzen. <http://www.gesundheifasten.de/nahrungsergaenzung/weizenkleie.html>. 02.08.2012; 13.09.2012.
- [8] Institut für Pflanzen- und Holzchemie, Tharandt: Untersuchungsbericht Weizenkleie und NP-Zellstoff. Tharandt (2012)
- [9] Kerns, G.: Entwurf zum Arbeitsthema für das Praxissemester von Manuel Meißner, HS Neubrandenburg. SIAB Leipzig (2012).
- [10] Kolb, B.: Gaschromatographie in Bildern. 2. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003
- [11] Lidén, G. et al.: A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. Biotechnology for Biofuels (2008), 1:7.

- [12] Pérez, J. et al.: Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* 5 (2002), S. 53-63.
- [13] Sassner, P. et al.: Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content. *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2006), S. 756-762.
- [14] SIAB e.V.: Unternehmen. <http://www.siab-biotechnologie.de/unternehmen/>. 20.01.2013; 20.01.2013
- [15] Spindler, D.: Analytikvorschriften. SIAB (2012).
- [16] Steinbüchel, A. et al.: *Mikrobiologisches Praktikum*. 1. Auflage. Berlin: Springer-Verlag, 2003
- [17] Stroeve, P. et al.: Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 48 (2009), S. 3713-3729.
- [18] Verfasser unbekannt. http://www.chemgapedia.de/vsengine/media/vsc/de/ch/4/cm/kohlenhydrate/bilder/vk_cellulose2.gif. 16.11.2012; 16.11.2012.
- [19] Verfasser unbekannt. 09.01.2006. http://chem.uft.uni-bremen.de/Chromatography/ch_gc_system_1.jpg. 04.07.2013; 05.07.2013.
- [20] Verfasser unbekannt.: Verteilung von Hefezellen in einer Thoma-Kammer. URL: <http://euler.iam.uni-bonn.de/bio/pdf/Aufgabenzettel2.pdf>. 07.04.2009; 07.04.2009
- [21] Xu, F. et al.: Partition of enzymes between the solvent and insoluble substrate during the hydrolysis of lignocellulose by cellulases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 51 (2008), S. 42-48.
- [22] Zacchi, G. et al.: Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content. *Biomass and Bioenergy* 30 (2006), S. 863-869.
- [23] Zacchi, G. et al.: Influence of strain and cultivation procedure on the performance of simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme and Microbial Technology* 38 (2006), S. 279-286.

- [24] Zacchi, G. et al.: Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated willow. *Enzyme and Microbial Technology* 17 (1995), S. 255-259.

8 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Weizenkleie.....	7
Abbildung 2: Strukturformel Cellulose [46]	8
Abbildung 3: Enzymatische Hydrolyse von Cellulose. β G – β -Glucosidase, CBH I/II – Cellobiohydrolase, EG - Endoglucanase [12]	9
Abbildung 4: Schema eines SSF – Prozesses.....	10
Abbildung 5: Thoma - Kammer	11
Abbildung 6: Schema einer Gaschromatografieanlage [19]	12
Abbildung 7: Beispiel eines Chromatogramms (Probe aus einer Ethanolgärung: Peak 1 = Ethanol, Peak 2 = Essigsäure)	13
Abbildung 8: Zweikolbensystem	17
Abbildung 9: 5 l – Bioreaktorreaktor	20
Abbildung 10: 42l – Bioreaktor	23
Abbildung 11: Ergebnisse Schüttelkolbenversuche	32
Abbildung 12: pH - Wertänderung der Schüttelkolbenversuche (Differenz zwischen pH_{Start} und pH_{Ende})	34
Abbildung 13: Fermentationsdiagramm batch 01	38
Abbildung 14: Fermentationsdiagramm batch 02	39
Abbildung 15: Fermentationsdiagramm batch 03	39
Abbildung 16: Zusammenfassung der Ausbeuten der Versuche im 5 l – Bioreaktor	40
Abbildung 17: Verlauf der Cellulaseaktivität über die Fermentationsdauer im 42 l – Bioreaktor	41
Abbildung 18: erreichte Ausbeuten der 42 l - Versuche, bezogen auf die TS der insgesamt eingesetzten WK	42
Abbildung 19: Fermentationsdiagramm V 3	43
Abbildung 20: Verlaufsdiagramm V 3	44
Abbildung 21: Fermentationsdiagramm V 4.....	45
Abbildung 22: Fermentationsdiagramm V 6.....	46
Abbildung 23: Fermentationsdiagramm V 7.....	47
Abbildung 24: Verfahrensschema	53

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Bestandteile Weizenkleie [8]	7
Tabelle 2: Einwaage Substanzen für SK - Versuche.....	19
Tabelle 3: Fermentationsmedienbestandteile (Angaben in g/l).....	19
Tabelle 4: Einwaage Substanzen für Batch – Fermentation	21
Tabelle 5: Vorlagen für Fermentationen im Braun – Reaktor	21
Tabelle 6: Versuchsplan der Versuche im 42 l - Bioreaktor	26
Tabelle 7: Parameter für die Versuche im 42 l – Bioreaktor	26
Tabelle 8: Übersicht über Feeds für die Versuche im 42 l – Bioreaktor.....	27
Tabelle 9: Konzentrationen von Leitungswasserkomponenten	33
Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Schüttelkolbenversuche.....	36
Tabelle 11: Zusammenfassung der Ergebnisse der Versuche im 5 l – Bioreaktor	40
Tabelle 12: Zusammenfassung Ergebnisse der Versuche im 42 l – Bioreaktor.....	48
Tabelle 13: erfolgreichste Parameter der Fermentationsversuche	50

9 Verzeichnis der Anlagen

9.1 Rohdaten der Schüttelkolbenversuche.....	60
9.2 Rohdaten und Diagramme der Versuche im 5 l – Bioreaktor.....	61
9.2.1 batch 01.....	61
9.2.2 batch 02.....	63
9.2.3 batch 03.....	64
9.3 Rohdaten und Diagramme der Versuche im 42 l – Bioreaktor.....	65
9.3.1 V 1.....	65
9.3.2 V 2.....	68
9.3.3 V 3.....	71
9.3.4 V 4.....	74
9.3.5 V 5.....	76
9.3.6 V 6.....	79
9.3.7 V 7.....	82

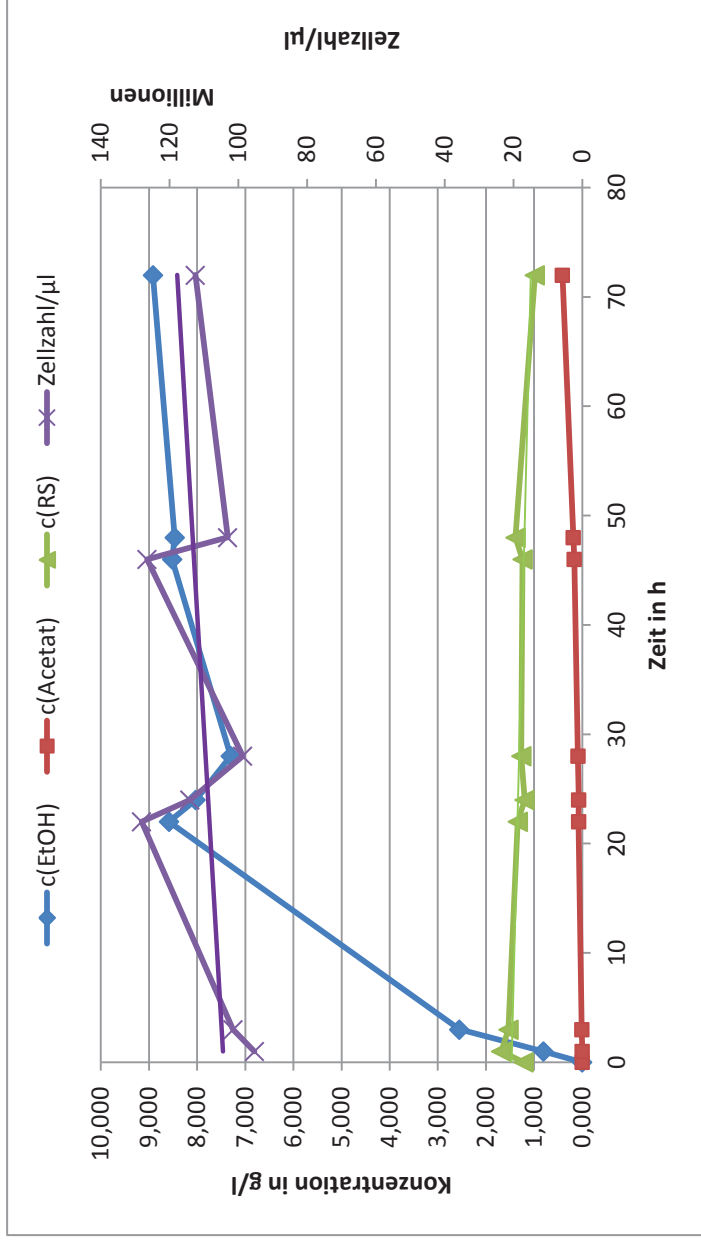
9.1 Rohdaten der Schüttelkolbenversuche

Versuch (Werte für je 2 SK)	pH _{Start}	pH _{Ende}	c(EtOH)	c(RS)	Ausbeute
20 g/l WK, H155, UK41, 72h	4,96	4,32	1,222	2,513	10,749
	5,13	4,6	1,709	2,637	15,031
30 g/l WK, H155, UK41, 72h	4,93	4,44	2,83	3,455	16,602
	5,38	4,7	1,981	3,47	11,62
60 g/l WK, 5 g/l TH, 72h	5,09	3,64	3,848	2,215	11,285
	5,09	3,64	2,86	1,344	8,389
80 g/l WK, 5 g/l TH, 72h	5,09	3,71	3,277	2,03	7,208
	4,94	3,79	4,671	3,707	10,275
80 g/l WK, 5 g/l TH, αA, 72h	5,47	4,2	12,727	8,144	24,913
	4,87	4,17	12,512	6,513	24,49
80 g/l WK, 5 g/l TH, αA, nur LW, 72h	4,89	4,21	16,933	10,284	33,147
	5,3	4,45	21,834	12,424	42,741
80 g/l WK, 5 g/l TH, αA, nur LW, 24h	5,1	4,99	17,101	18,16	33,476
	4,9	4,86	17,001	18,595	33,28
80 g/l WK, 20 g/l TH, αA, nur LW, 24h	5,05	4,86	12,885	18,7	25,01
	5,06	4,84	13,001	18,87	25,237

9.2 Rohdaten der Versuche im 5 l – Bioreaktor

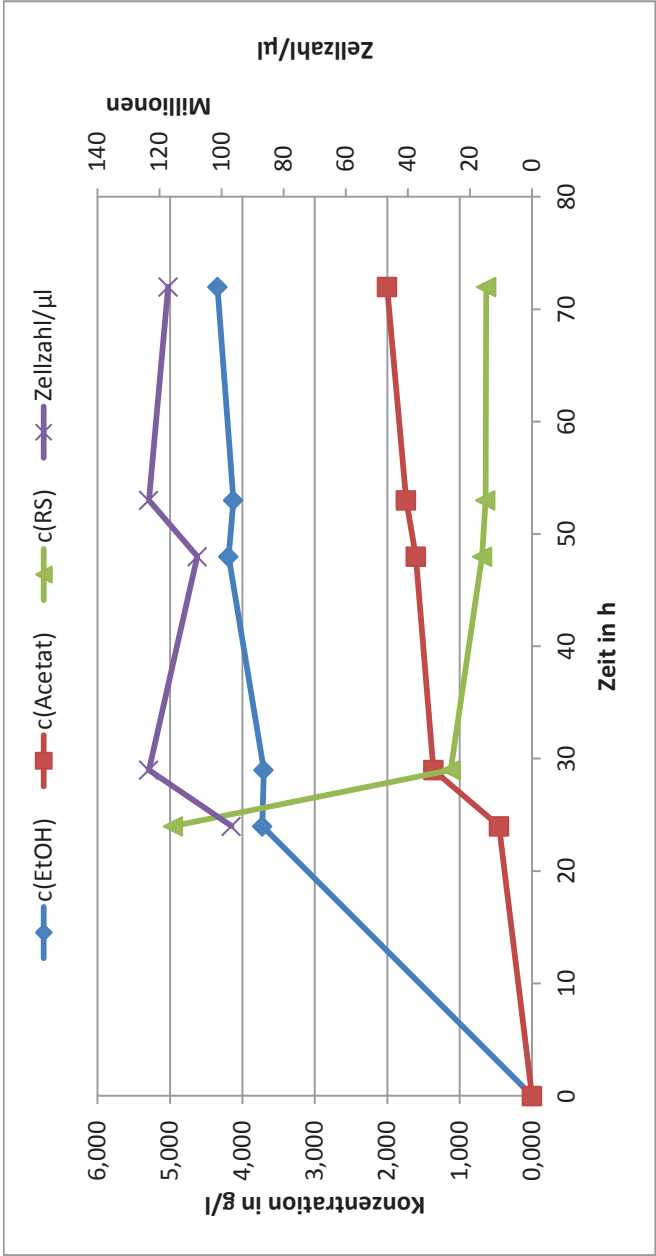
9.2.1 batch 01

Probe	Zeit [h]	c(EtOH) [g/l]	c(Acetate) [g/l]	c(RS) [g/l]	FPA [IU/ml]	Zellzahl/ μ l	Ausbeute [%]
0	0	0,000	0,000	1,219	0,930		
1	1	0,809	0,000	1,682	0,890	95312500	
2	3	2,554	0,011	1,534	0,960	101562500	
3	22	8,583	0,076	1,341		128125000	
4	24	8,030	0,074	1,196	1,150	114062500	47,108
5	28	7,302	0,090	1,268		98750000	
6	46	8,519	0,166	1,240		126562500	
7	48	8,466	0,186	1,386	1,170	103125000	
8	72	8,915	0,411	0,983	1,070	112500000	52,3



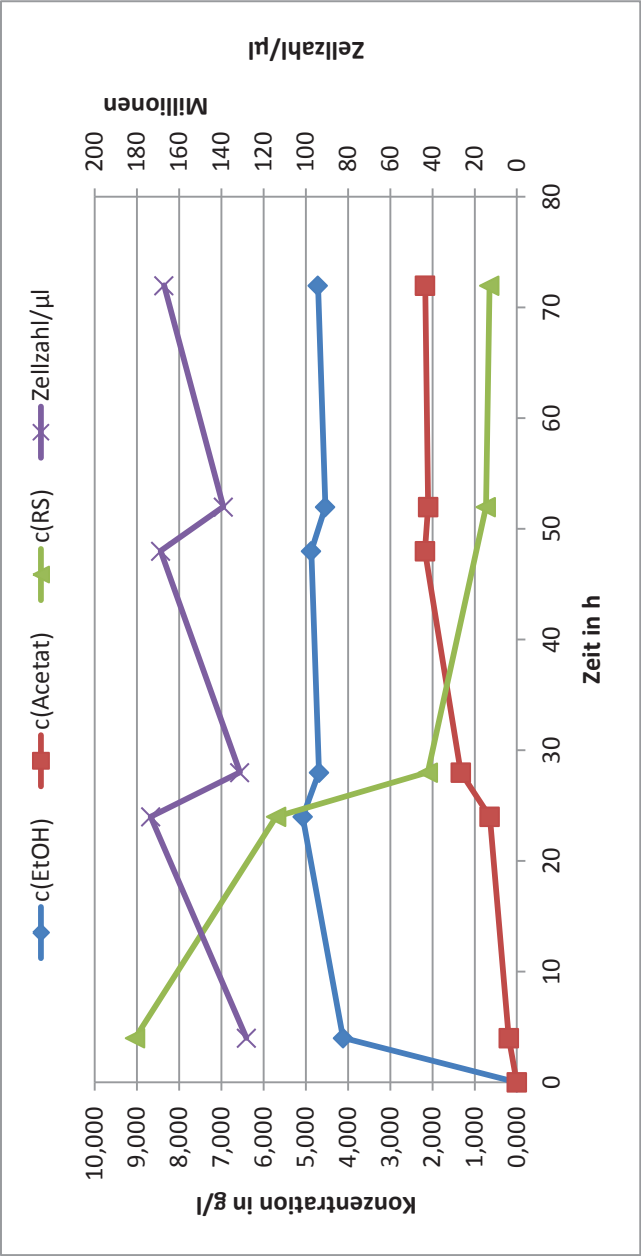
9.2.2 batch 02

Probe	Zeit [h]	c(EtOH) [g/l]	c(Acetat) [g/l]	c(RS) [g/l]	FPA [IU/ml]	Zellzahl/ μ l	Ausbeute [%]
0	0	0,000	0,000	-	-	89062500	
1	24	3,724	0,456	4,954	1,310	96875000	21,846
2	29	3,704	1,360	1,123		123437500	
3	48	4,192	1,604	0,690	1,680	107812500	
4	53	4,124	1,739	0,643		123437500	
5	72	4,342	2,002	0,632	1,770	117187500	25,474



9.2.3 batch 03

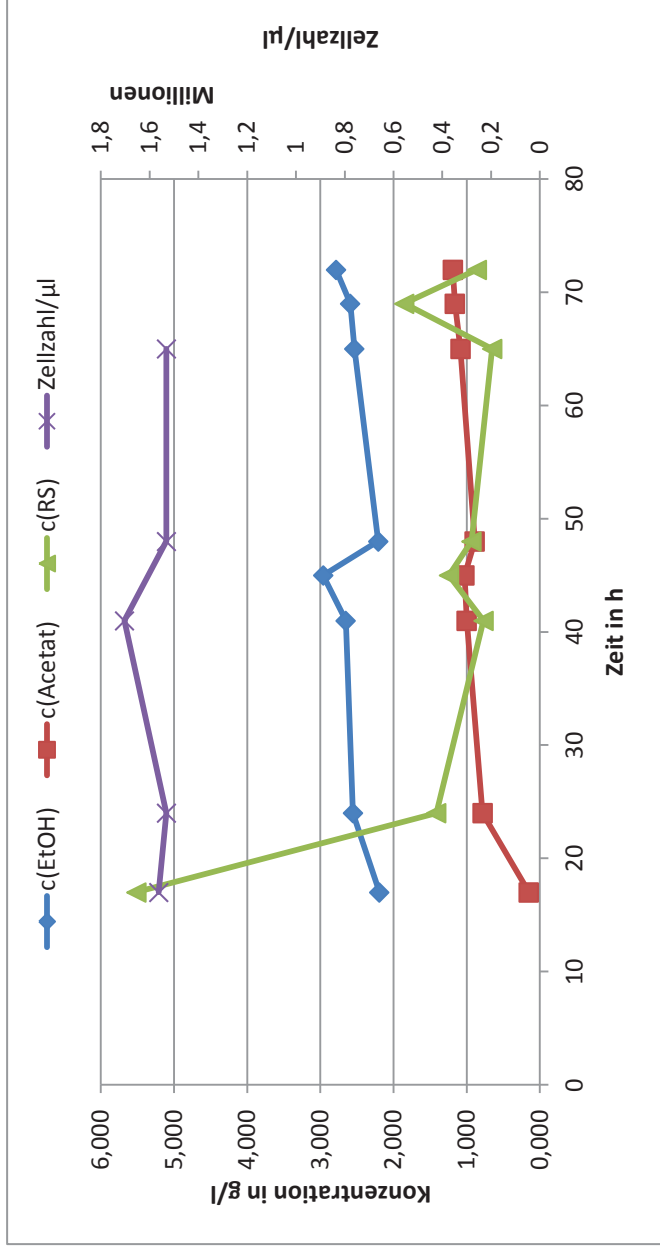
Probe	Zeit [h]	c(EtOH) [g/l]	c(Acetat) [g/l]	c(RS) [g/l]	FPA [IU/ml]	Zellzahl/ μ l	Ausbeute [%]
0	0	0,000	0,000				
1	4	4,118	0,191	9,039	1,150	128125000	
2	24	5,072	0,641	5,701	1,280	173437500	29,751
3	28	4,687	1,330	2,108	1,360	131250000	
4	48	4,872	2,178			168750000	
5	52	4,538	2,103	0,733	1,140	139062500	
6	72	4,712	2,174	0,651	1,460	167187500	27,642

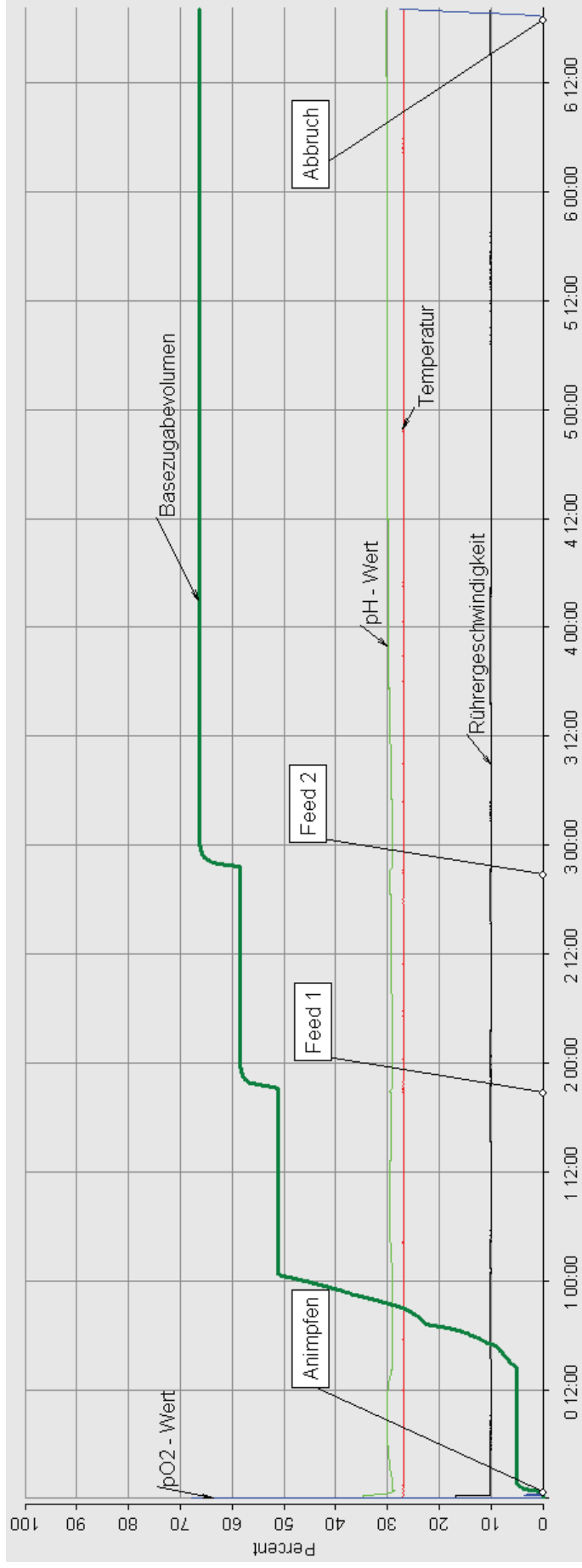


9.3 Rohdaten und Diagramme der Versuche im 42 l – Bioreaktor

9.3.1 V 1

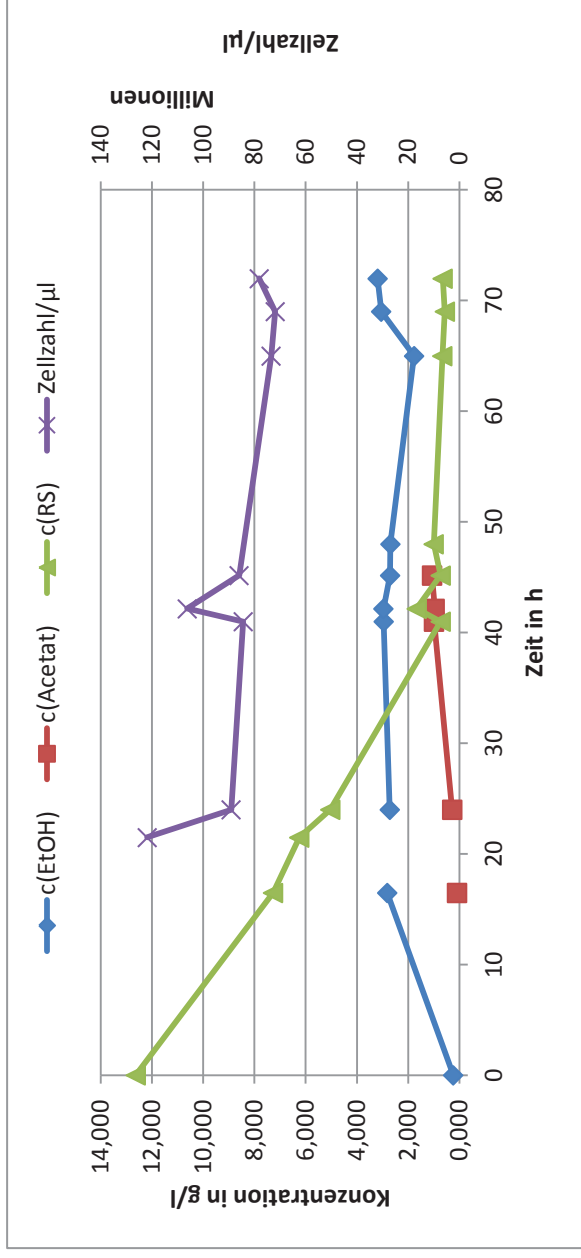
Probe	Zeit [h]	c(EtOH) [g/l]	c(Acetate) [g/l]	c(RS) [g/l]	FPA [IU/ml]	Zellzahl/ μ l	Ausbeute [%]
0	0						
1	17	2,194	0,152	5,516		1562500	
2	24	2,555	0,782	1,415	1	1531250	9,992
3	41	2,652	0,999	0,770	0,98	1703125	
4	45	2,961	1,030	1,242	1,09		
5	48	2,208	0,891	0,934	0,81	1531250	
6	65	2,535	1,084	0,652	0,98	1531250	
7	69	2,591	1,163	1,853	0,98		
8	72	2,787	1,189	0,860	0,92		10,9

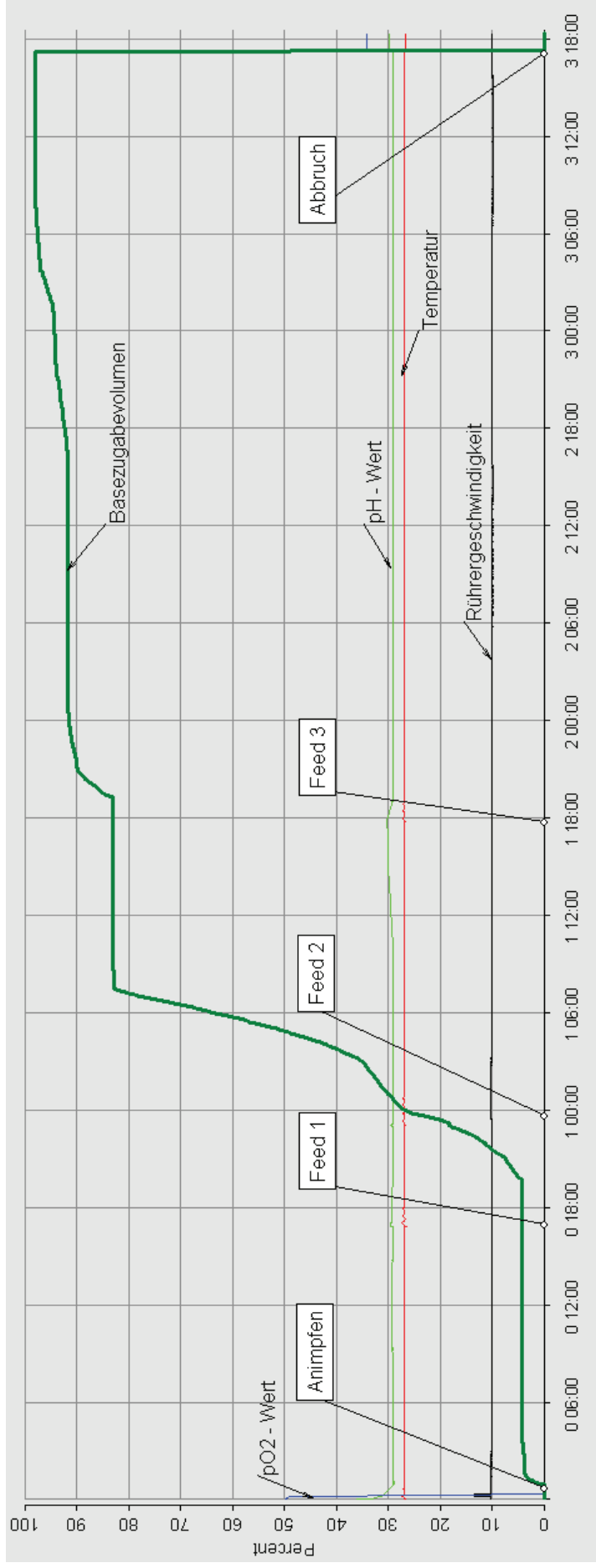




9.3.2 V 2

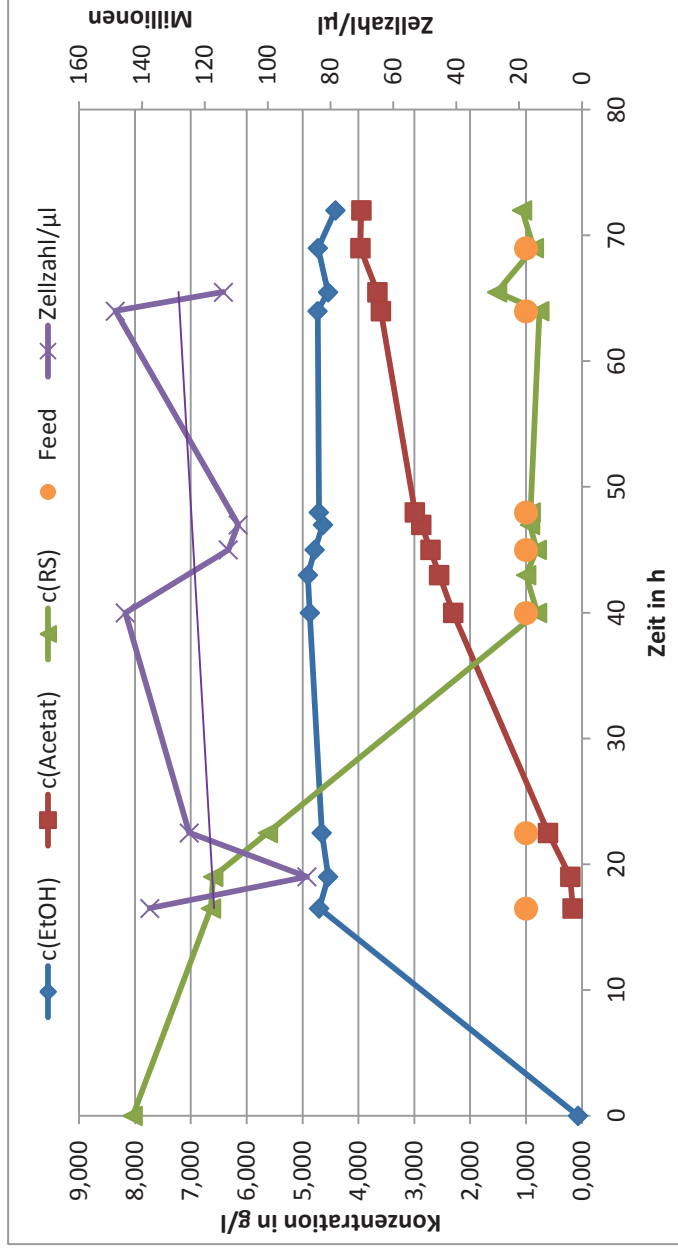
Probe	Zeit [h]	c(EtOH) [g/l]	c(Acetate) [g/l]	c(RS) [g/l]	FPA [IU/ml]	Zellzahl/ μ l	Ausbeute [%]
0	0	0,237		12,64			
1	16,5	2,816	0,094	7,27			
2	21,5			6,245		121875000	
3	24	2,716	0,282	5,04		89062500	6,928
4	41	2,955	0,987	0,73	0,77	84375000	
5	42,17	2,961	0,963	1,67		106250000	
6	45,17	2,707	1,068	0,73		85937500	
7	48	2,690		1			
8	65	1,767		0,66	1,18	73437500	
9	69	3,047		0,57	1,06	71875000	
10	72	3,189		0,65	1,01	78125000	4,071

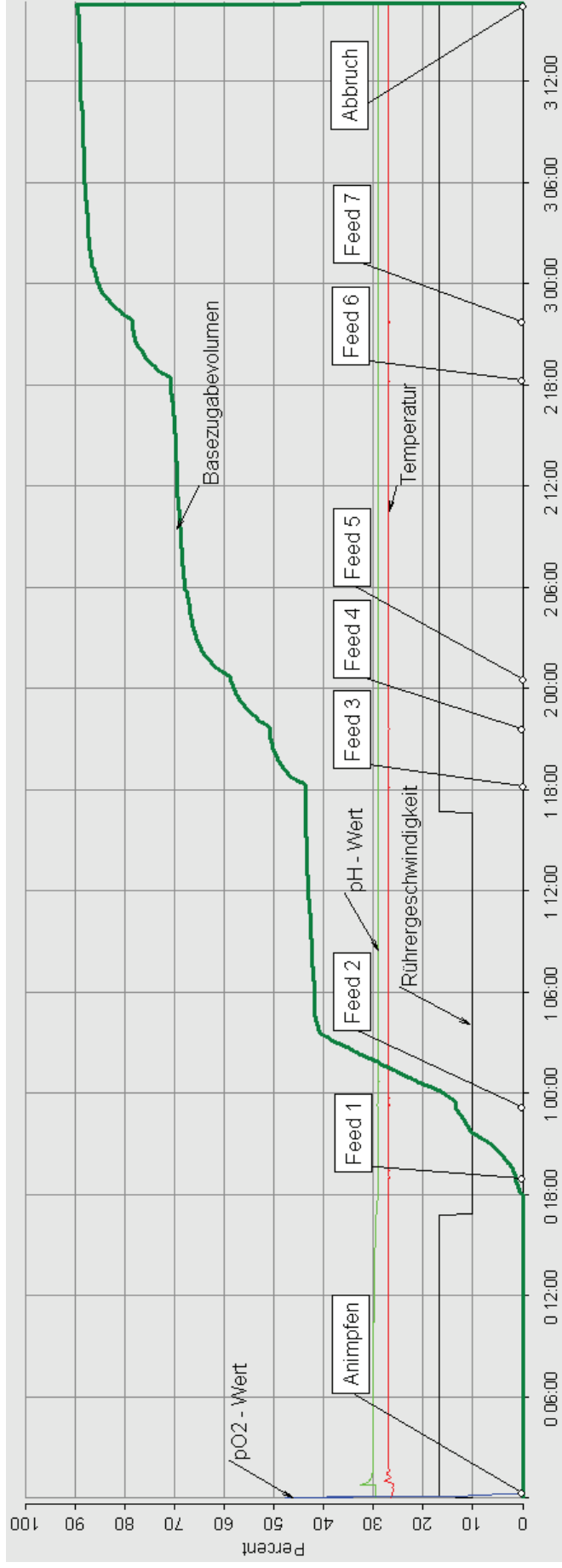




9.3.3 V 3

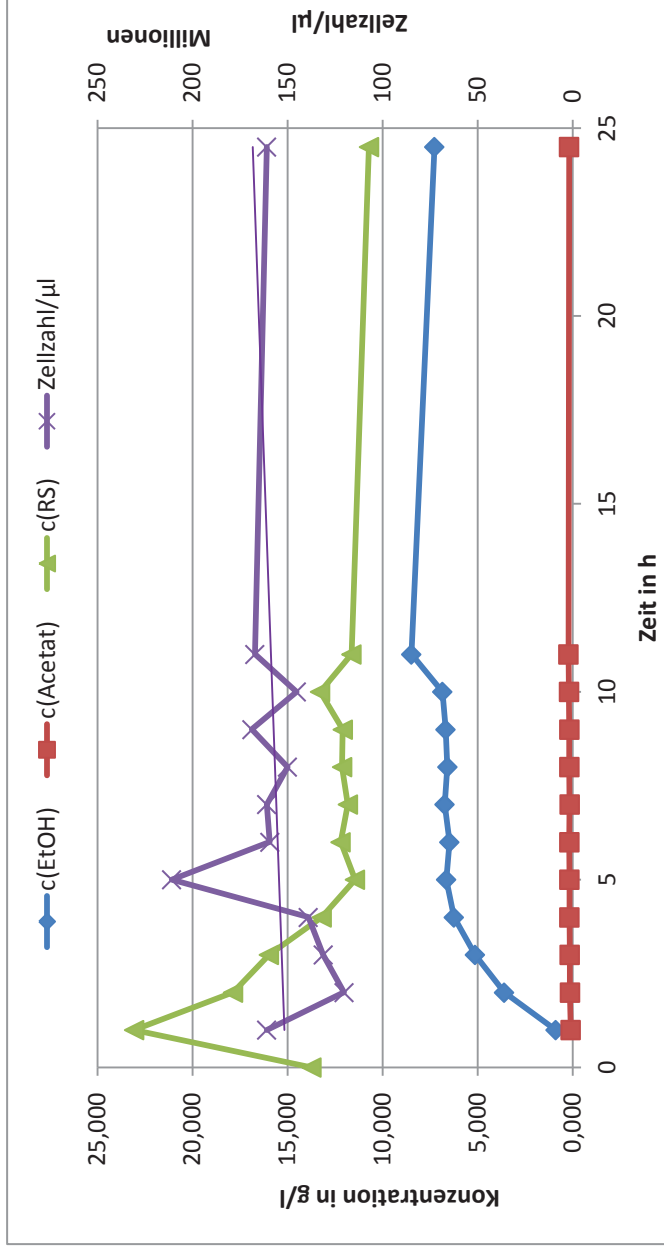
Probe	Zeit [h]	c(EtOH) [g/l]	c(Acetate) [g/l]	c(RS) [g/l]	FPA [IU/ml]	Zellzahl/ μ l	Ausbeute [%]
0	0	0,068		8,04			
1	16,5	4,701	0,164	6,64		137500000	
2	19	4,542	0,209	6,6		87500000	
3	22,5	4,657	0,608	5,62		125000000	18,214
4	40	4,871	2,305	0,8	0,76	145312500	
5	43	4,906	2,555	1			
6	45	4,781	2,710	0,81		112500000	
7	47	4,637	2,874	0,93		109375000	
8	48	4,708	2,990	0,92			
9	64	4,729	3,600	0,76		148437500	
10	65,5	4,545	3,664	1,52		114062500	
11	69	4,724	3,966	0,86			
12	72	4,413	3,949	1,07			9,765





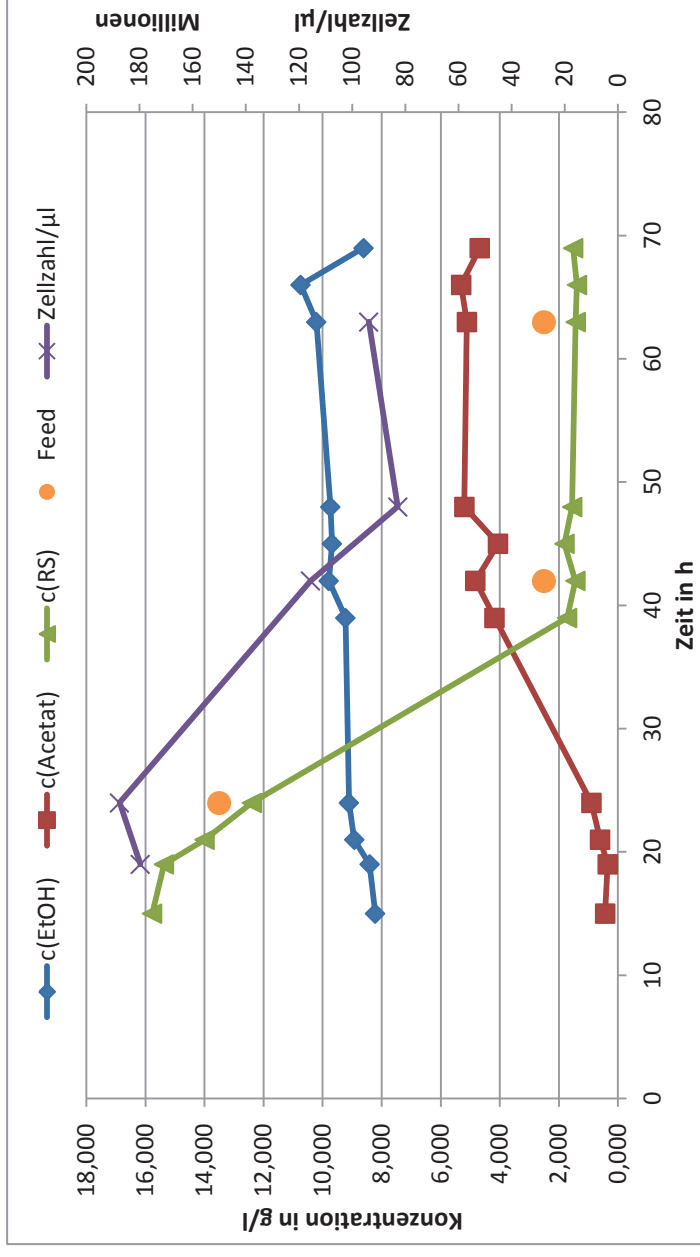
9.3.4 V 4

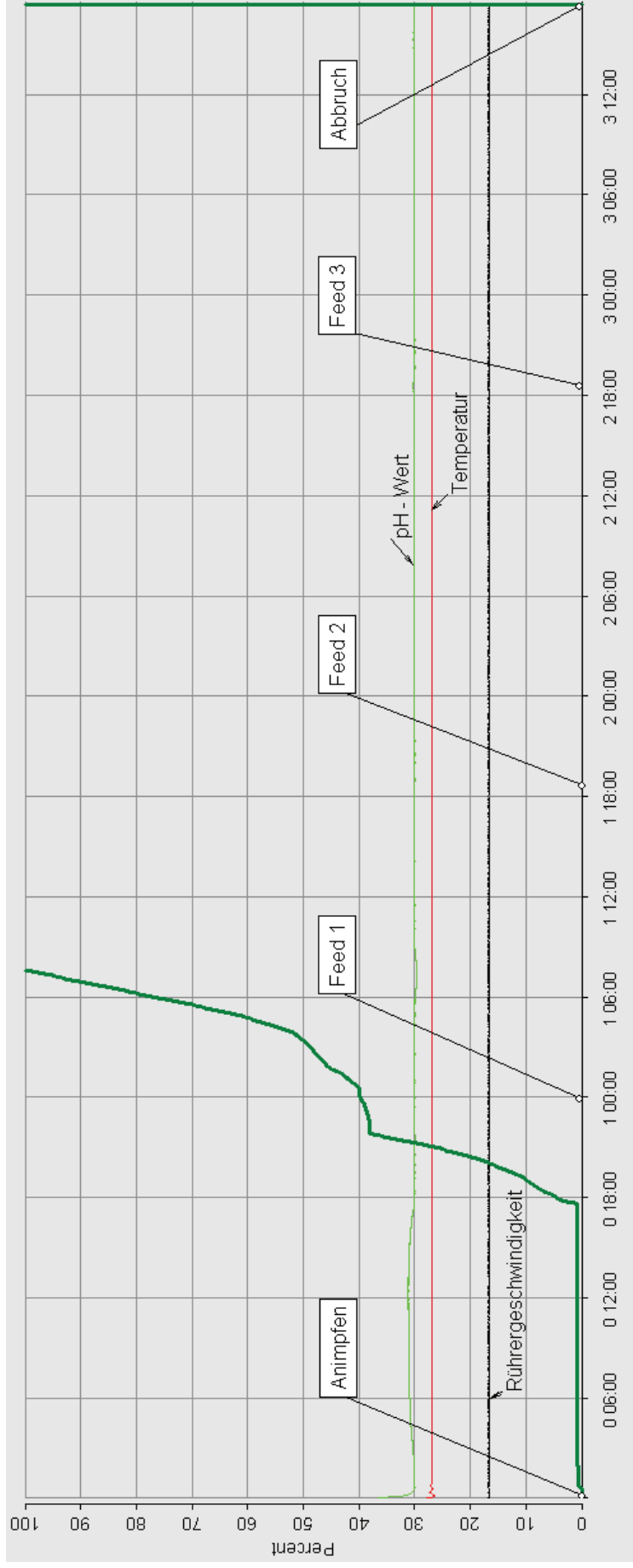
Probe	Zeit [h]	c(EtOH) [g/l]	c(Acetate) [g/l]	c(RS) [g/l]	FPA [IU/ml]	Zellzahl/ μ l	Ausbeute [%]
0	0			13,735			
1	1	0,899	0,104	23,07		160937500	
2	2	3,607	0,143	17,865		120312500	
3	3	5,139	0,157	15,98		131250000	
4	4	6,249	0,169	13,2		139062500	
5	5	6,654	0,175	11,45		210937500	
6	6	6,480	0,182	12,205		159375000	
7	7	6,737	0,167	11,825		160937500	
8	8	6,591	0,184	12,13		150000000	
9	9	6,685	0,177	12,1		168750000	
10	10	6,855	0,195	13,28		145312500	
11	11	8,486	0,227	11,635		167187500	
12	24,5	7,276	0,191	10,715		160937500	16,008



9.3.5 V 5

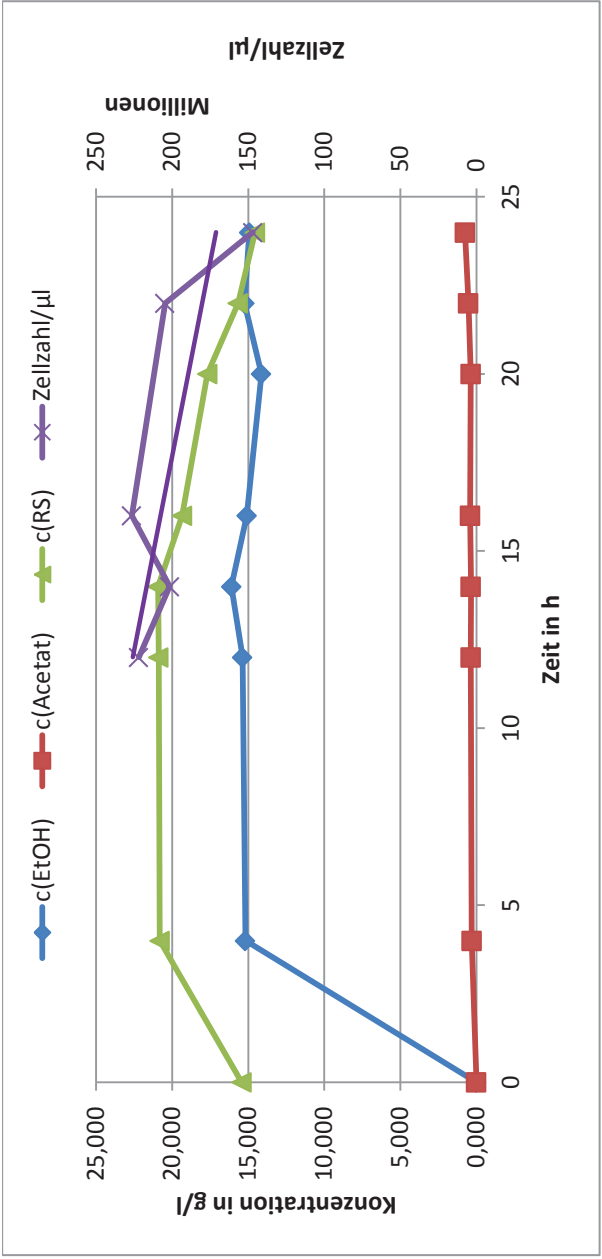
Probe	Zeit [h]	c(EtOH) [g/l]	c(Acetate) [g/l]	c(RS) [g/l]	FPA [IU/ml]	Zellzahl/ μ l	Ausbeute [%]
0	0						
1	15	8,220	0,436	15,77			
2	19	8,409	0,347	15,37		179687500	
3	21	8,928	0,602	13,995			
4	24	9,109	0,900	12,39	0,52	187500000	16,031
5	39	9,227	4,175	1,72			
6	42	9,789	4,827	1,44		115625000	
7	45	9,679	4,056	1,81			
8	48	9,736	5,201	1,55	0,56	82812500	
9	63	10,213	5,112	1,43		93750000	
10	66	10,743	5,310	1,39			
11	69	8,615	4,678	1,52			
12	72	10,716	5,932	1,57			15,427

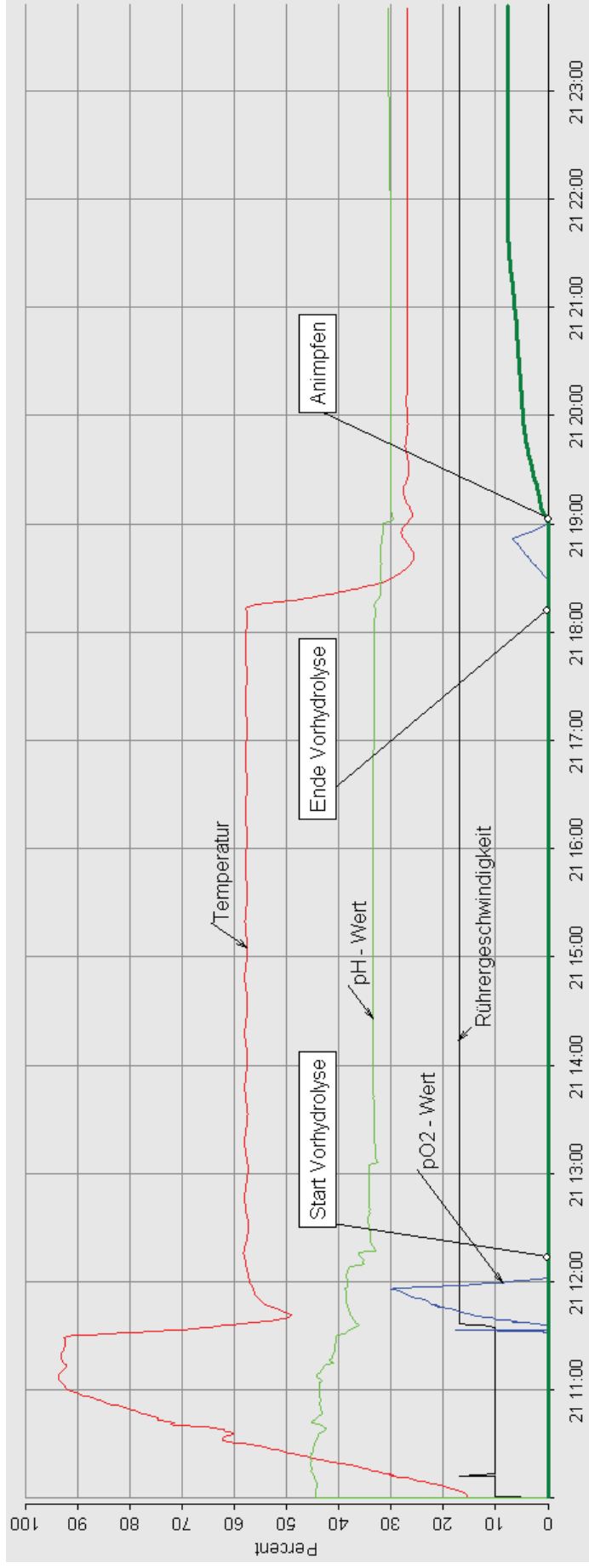




9.3.6 V 6

Probe	Zeit [h]	c(EtOH) [g/l]	c(Acetate) [g/l]	c(RS) [g/l]	FPA [IU/ml]	Zellzahl/ μ l	Ausbeute [%]
0	0	0,000	0,000	15,43			
1	4	15,189	0,303	20,81			
2	12	15,377	0,367	20,89		221875000	
3	14	16,099	0,360	20,93		201562500	
4	16	15,093	0,408	19,34		226562500	
5	20	14,133	0,368	17,68			
6	22	15,236	0,525	15,67		204687500	
7	24	14,927	0,747	14,54		146875000	26,27

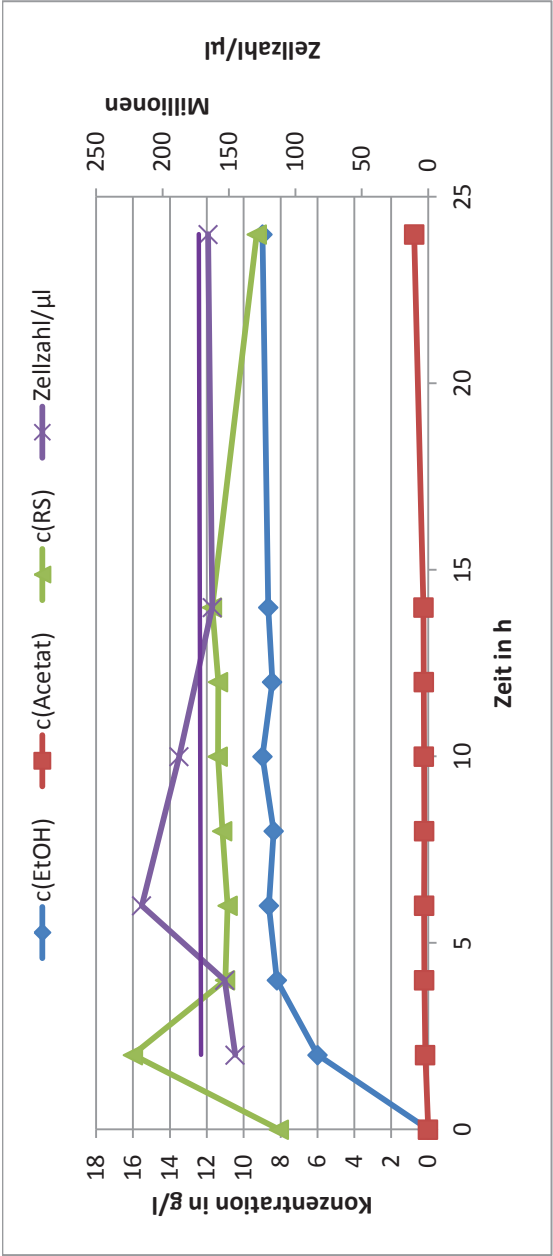




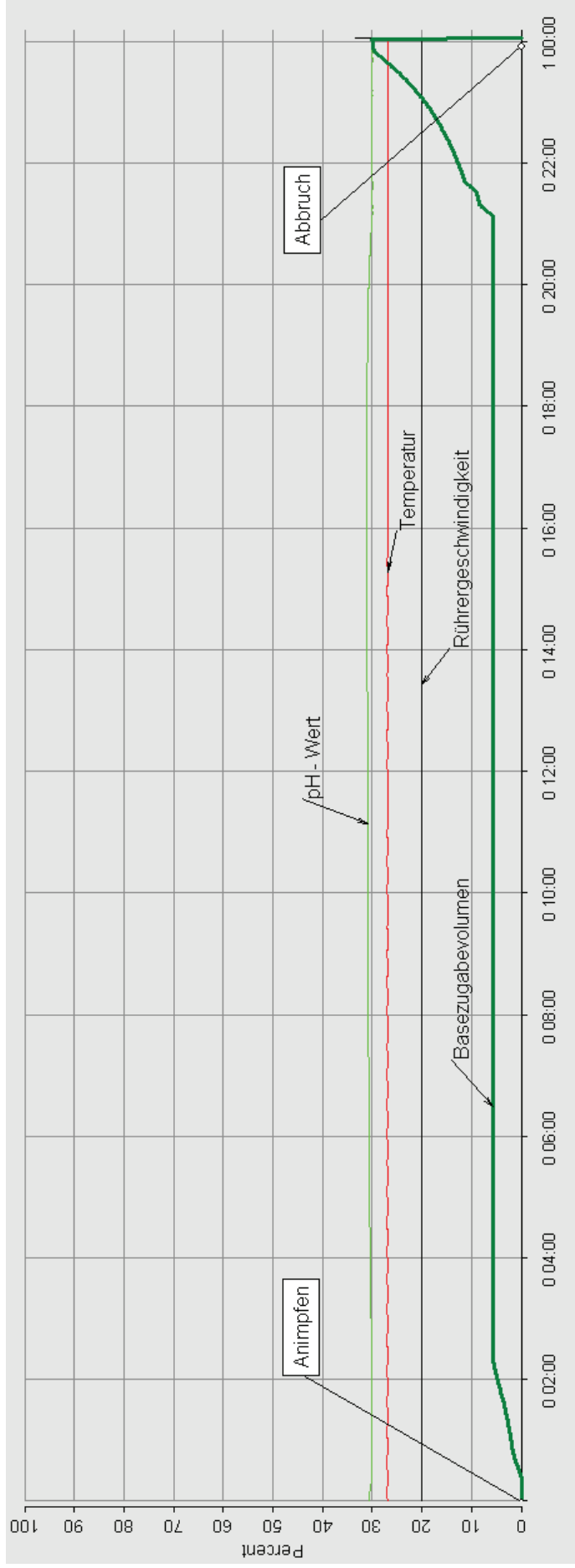


9.3.7 V 7

Probe	Zeit [h]	c(EtOH) [g/l]	c(Acetat) [g/l]	c(RS) [g/l]	FPA [IU/ml]	Zellzahl/ μ l	Ausbeute [%]
0	0	0,000	0,000	8,09			
1	2	5,991	0,157	16		145312500	
2	4	8,201	0,207	11		153125000	
3	6	8,635	0,218	10,87		215625000	
4	8	8,371	0,211	11,155			
5	10	8,975	0,228	11,4		187500000	
6	12	8,450	0,233	11,38			
7	14	8,669	0,248	11,71		162500000	
8	24	8,980	0,756	9,29		165625000	26,34







Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Unterschrift