# Schlussbericht

## zum Vorhaben

Thema: **ERA-IB: Herstellung und Veredelung von 2,3-Butandiol aus Biomasse (PUBB); Teilvorhaben A - E**

Zuwendungsempfänger:


**Johann Heinrich von Thünen-Institut, Institut für Agrartechnologie, Braunschweig (vTIBS) (FKZ 22009608A)**

**Evonik Degussa GmbH, Marl (ED) (FKZ 22009608B)**

**Südzucker AG-ZAFES, Obrigheim/Pfalz (SZ) (FKZ 22009608C)**

**Technische Universität Braunschweig, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Braunschweig (TUBS) (FKZ 22009608D)**

**Johann Heinrich von Thünen-Institut, Institut für Holztechnologie und Holzbiologie, Hamburg (vTIHH) (FKZ 22009608E)**



Förderkennzeichen:

**08NR096A-E** bzw. **22009608A-E**

Laufzeit:

**01.03.2009** bis **31.08.2012**

Datum der Veröffentlichung:

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

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

**I. ZIELE 1**

**1. AUFGABENSTELLUNG 1**
**2. WISSENSCHAFTLICHE-TECHNISCHE AUSGANGSSITUATION 2**
**3. ZUSAMMENARBEIT MIT ANDEREN STELLEN 4**

**I. WISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHE ERGEBNISSE DER DEUTSCHEN PROJEKTPARTNER 5**

**1. ERZIELTE ERGEBNISSE 5**
WP 1: ROHSTOFFE (VTIHH) 5
WP 2: SCREENING NACH MIKROORGANISMEN UND GENTECHNIK (TUBS) 25
WP 3: OPTIMIERUNG DER FERMENTATIONSPARAMETER (TUBS) 28
WP 4: IMMOBILISIERUNG, PROZESSENTWICKLUNG UND MAßSTABSVERGRÖßERUNG (TUBS, VTIBS, SZ) 37
WP 5: PRODUKTISOLIERUNG, -REINIGUNG UND -VEREDELUNG (ED, VTIBS) 47
WP 6: PROZESSÖKONOMIE UND NACHHALTIGKEIT (ED, SZ, VTIBS) 69
WP 7: PROJEKTMANAGEMENT (ALLE PARTNER) 86
BERICHTE DER NICHT DEUTSCHEN PROJEKT-PARTNER 86
BIOPOLIS S. L. (BPOL) 86
POZNAN UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES (PULS) 87
TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ (TUL) 91
COMPLUTENSE UNIVERSITY (UCM) 93
SOLVAY SA – CHEMICALS SECTOR BUSINESS DEPLOYMENT (SV) 95
**2. VERWERTBARKEIT DER ERGEBNISSE 96**
**3. RELEVANTE ERGEBNISSE DRITTER 97**

**4. ERFOLGTE/GEPLANTE VERÖFFENTLICHUNGEN 97**

**5. LITERATURVERZEICHNISS 99**

# I. Ziele

## 1. Aufgabenstellung

Ziel des Projektes ist die Entwicklung eines effizienten und wirtschaftlichen biotechnischen Prozesses zur fermentativen Herstellung von 2,3-Butandiol (2,3-BD) aus verschiedenen agrarischen und forstlichen Roh- und Reststoffen sowie dessen Veredelung.

2,3-Butandiol ist eine wertvolle Chemikalie, die als Frostschutzmittel und als Ausgangsverbindung zur Herstellung von Pflanzenschutzmitteln, Pharmazeutika, Geruchsstoffen, Feuchthaltemitteln oder Weichmachern Verwendung findet. Ferner kann 2,3-BD als Ausgangsverbindung zur Herstellung des Lösungsmittels/ Kraftstoffadditivs Methylethylketon und der bulk-Chemikalie 1,3-Butadien (1,3-BD) genutzt werden. 1,3-BD wird derzeit ausschließlich aus fossilen Rohstoffen im Umfang von etwa 8 Mio. Jato hergestellt. Es stellt eine wichtige Vorstufe für künstlichen Kautschuk, verschiedene Polyamide und andere Kunststoffe dar.

Aufgrund der breiten Verwendungsmöglichkeiten kann 2,3-BD als neue biobasierte Plattformchemikalie angesehen werden, die biotechnisch aus nachwachsenden Rohstoffen zugänglich ist. Damit trägt das angestrebte Projekt unmittelbar dazu bei, fossile Rohstoffe zu schonen und substantielle Beiträge zum Klimaschutz zu leisten.

### *Voraussetzung / Planung und Ablauf des Vorhabens*

Das Projekt deckt die gesamte Wertschöpfungskette ausgehend von verschiedenen nachwachsenden Rohstoffen über die Biokonversion zu dem Primärprodukt 2,3-Butandiol, dessen Isolierung und Aufarbeitung bis hin zu dessen Veredelung zu den bulk-Chemikalien Methylethylketon und 1,3-Butadien ab. Das Projektschema in Abbildung 1 zeigt die Abfolge der einzelnen Arbeitspakete entlang der Wertschöpfungskette und die Partner, die die Bearbeitung der verschiedenen Aufgabenbereiche durchführen. Die Betrachtung zur Prozessökonomie und zur Nachhaltigkeit (WP 6) umfasst naturgemäß die gesamte Wertschöpfungskette, während das Projektmanagement (WP 7) das gesamte Projekt zusammenführt.

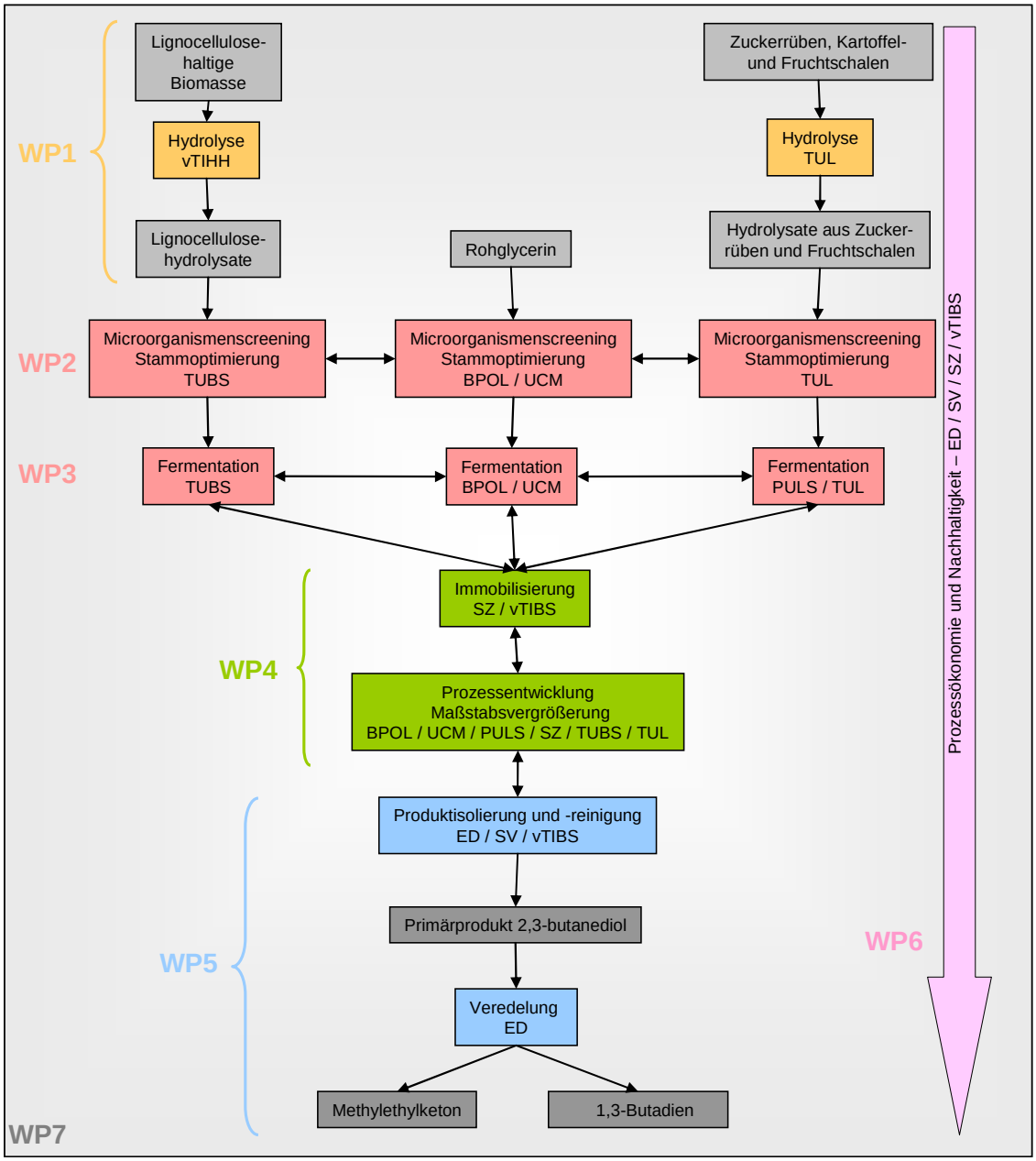



**Abbildung 1: Projektschema**

# 2. Wissenschaftliche-technische Ausgangssituation

Die fermentative Herstellung von 2,3-BD ist bereits lange bekannt, wurde aber mit Ausnahme einer kurzen Periode während des zweiten Weltkrieges aufgrund der geringen Wirtschaftlichkeit bislang technisch nicht durchgeführt. Als wesentlichen Faktoren hierfür sind die Notwendigkeit der Verwendung von MOs der Risikoklasse 2, die geringe Produktivität im Gesamtprozess sowie die problematische Abtrennung von 2,3-BD aus den Fermentationsbrühen zu nennen.

2,3-BD kann aus verschiedenen Pentosen, Hexosen, Disacchariden und Glycerin mit verschiedenen Bakterien unter mikroanaeroben Bedingungen hergestellt werden. Die entsprechenden

Stoffwechselwege gelten als aufgeklärt. Zu den 2,3-BD-Bildnern zählen Bakterien wie *Klebsiella oxytoca, Bacillus polymyxa* (*Paenibacillus polymyxa*), *Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, Aeromonas hydrophila, Serratia marcescens, Bacillus amyloloquefaciens, Enterobacter cloacae* und *Enterobacter aerognes*. Die besten Ergebnisse wurden bislang mit *Klebsiella oxytoca* erzielt. Attraktiv ist hierbei nicht nur das breite Spektrum von Substraten, die zu 2,3-BD vergoren werden können, z.B. verschiedene Pentosen, Hexosen und Disaccharide, sondern ebenso die hohen erzielbaren Produktkonzentrationen von über 100 g/L. Problematisch ist jedoch, dass es sich bei *Klebsiella oxytoca* um einen Organismus der Risikoklasse 2 handelt, der nur unter großen Sicherheitsauflagen und somit Kosten industriell einsetzbar wäre, womit sich in der heutigen Zeit ein kostengünstiger Prozess nicht realisieren lassen würde. Als 2,3-BD-Bildner sind aber auch einige Bakterien der für einen industriellen Einsatz attraktiven Risikoklasse 1, beispielsweise *Lactobacillus helveticus* oder *Paenibacillus polymyxa*, beschrieben. Leider stehen diese bezüglich der erzielbaren Produktivitäten und Produktkonzentrationen bislang deutlich hinter den Leistungsdaten von *Klebsiella oxytoca* zurück. Daher gilt auch dem Auffinden leistungsfähiger 2,3-BD-Bildner der Risikoklasse 1 sowie deren weiterer Verbesserung durch Mutagenese und gentechnische Methoden das Hauptaugenmerk der Biokatalysatorentwicklung in dem beantragten Projekt. Hierzu sind in der Literatur keine systematischen Arbeiten beschrieben.

Die in der Literatur beschriebenen Ansatzpunkte zur Steigerung der geringen Produktivität sollen auch in dem vorliegenden Projekt verfolgt werden. Dazu zählen optimierte Fermentationsbedingungen (z.B. pH, Temperatur, Sauerstoffversorgung, Substrattyp, Substratkonzentration) und die Verwendung immobilisierter Biokatalysatoren. Die hier durchzuführende ganzheitliche Betrachtung und das angestrebte fine-tuning von verwendetem Substrat, eingesetztem optimierten Stamm, angepassten Fermentationsbedingungen sowie optimierten Immobilisierungsmethoden verspricht signifikante Produktivitätsverbesserungen gegenüber dem Stand des Wissens.

Aufgrund des hohen Siedepunktes von 2,3-BD und dessen großer Wasserlöslichkeit gestaltet sich die Abtrennung von 2,3-BD bislang als schwierig. Die besten Erfolge sind mit Membranverfahren erzielt worden, jedoch sind bislang keine systematischen Untersuchungen hinsichtlich des Membrantyps, der Membranarchitektur und deren Standzeit und Regenerationsmöglichkeiten durchgeführt worden. Deren Optimierung, die im vorliegenden Projekt angestrebt wird, sollte ebenfalls zu einer deutlich verbesserten Abtrennbarkeit führen.

Der breit gefasste und systematische Ansatz in dem vorliegenden Projekt, der von verschiedenen kostengünstigen nachwachsenden Rohstoffen ausgeht, und nicht nur die Optimierung der 2,3-BD produzierenden Stämme an sich sondern ebenso auf angepasste und optimale Fermentationsparameter abzielt, sollte zu einem gegenüber dem Stand des Wissens deutlich

verbesserten Produktionsprozess von 2,3-BD führen. Mit der angestrebten verbesserten Produktisolierung und den nachfolgenden Konversionswegen steht dann ein Weg offen, mit MEK und 1,3-BD zukünftig aus nachwachsenden Rohstoffen herzustellen.

# 3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das gesamte Projektkonsortium besteht aus 10 Projektpartnern (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Übersicht der Projektpartner**

| # | Partner | Akronym |
|---|---|---|
| 1 | Johann Heinrich von Thünen-Institut (vTI)<br>Institut für Agrartechnologie und Biosystemtechnik<br>Braunschweig, Deutschland | vTIBS |
| 2 | Poznan University of Life Sciences<br>Department of Biotechnology and Food Microbiology<br>Poznan, Polen | PULS |
| 3 | Biopolis S. L.<br>Valencia, Spanien | BPOL |
| 4 | Complutense University<br>Faculty Chemical Science – Department of Chemical Engineering<br>Madrid, Spanien | UCM |
| 5 | Evonik Degussa GmbH<br>Marl, Deutschland | ED |
| 6 | Solvay SA – Chemicals Sector Business Deployment<br>Brüssel, Belgien | SV |
| 7 | Südzucker AG – ZAFES<br>Obrigheim/Pfalz, Deutschland | SZ |
| 8 | Technische Universität Braunschweig<br>Institut für Biochemie und Biotechnologie<br>Braunschweig, Deutschland | TUBS |
| 9 | Technical University of Lodz<br>Institute of Technical Biochemistry & Institute of Bioprocess Engineering<br>Lodz, Polen | TUL |
| 10 | Johann Heinrich von Thünen-Institut (vTI)<br>Institut für Holztechnologie und Holzbiologie<br>Hamburg, Deutschland | vTIHH |

Damit besteht das Konsortium aus sechs akademischen und vier Industriepartnern. Die Hälfte dieser Partner, drei akademische (vTIBS, TUBS und vTIHH) und zwei Industriepartner (ED und SZ), kommen aus Deutschland. Dazu kommen zwei akademische Partner aus Polen (PULS und TUL), ein akademischer (UCM) und ein Industriepartner (BPOL) aus Spanien sowie ein weiterer Industriepartner aus Belgien (SV).

# I. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse der deutschen Projektpartner

Das Gesamtprojekt ist in 7 Arbeitspakete (Work Package = WP, Abbildung 1) unterteilt, in denen wiederum verschiedene Aufgaben (Task) bearbeitet werden, die im Folgenden aufgelistet sind. Dabei ist durch das jeweilige Akronym angegeben, welche Partner an welchen Arbeitspaketen beteiligt sind.

Die deutschen Projektpartner arbeiten in den nachfolgend aufgelisteten Arbeitspaketen (WP) und Aufgaben (Task) entsprechend der Nummerierung des PUBB proposals.

## 1. Erzielte Ergebnisse

## WP 1: Rohstoffe (vTIHH)

Im deutschen Teilprojekt soll Lignocellulose-stämmige Biomasse auf ihre Eignung als Substrat für die anschließende fermentative Herstellung von 2,3-Butandiol untersucht werden. Die Schwerpunkte liegen auf der Optimierung des Dampfdruckaufschlusses und der enzymatischen Hydrolyse von Pappelholz zur Bereitstellung von monomeren Kohlenhydraten.

### *Task 1.1: Charakterisierung des Rohmaterials*

Für die Dampfdruckaufschlüsse wurde hauptsächlich Pappelholz (Populus balsamifera) aus einer Kurzumtriebsplantage von einer Versuchsfläche in Methau, Sachsen verwendet (Schütt et al. 2011). Zusätzlich wurde Weidenholz (Salix viminalis) aus einer Kurzumtriebsplantage in Reinbek, Schleswig-Holstein eingesetzt. Der Aufschluss erfolgte jeweils mit Holz mit Rinde, da eine Entrindung für die geringen Durchmesser wirtschaftlich nicht sinnvoll durchgeführt werden kann. Weiterhin wird durch Nutzung dieser Sortimente die Konkurrenz zur Zellstoff- und Papier- sowie zur Holzwerkstoffindustrie minimiert. Die Extraktstoff- und Kohlenhydratanalyse von Pappel- und Weidenholz ergaben sehr ähnliche Ergebnisse (Abbildung 2).

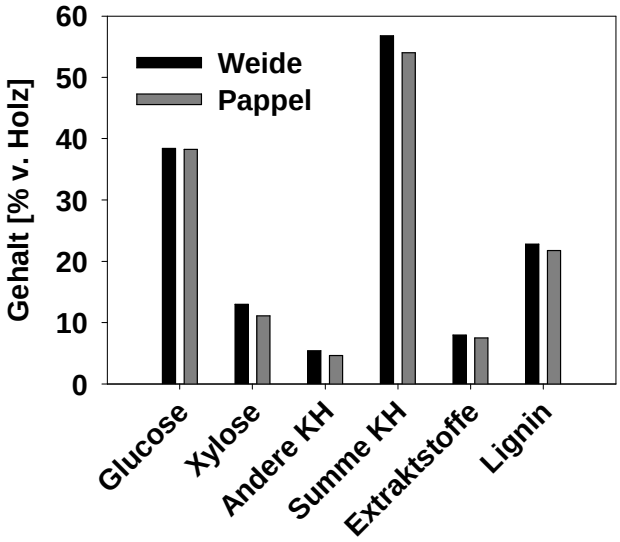



**Abbildung 2: Rohstoffanalyse des eingesetzten Pappel und Weidenholzes, KH-Kohlenhydrate**

## *Task 1.2: Optimierung des Dampfdruck-Aufschlusses von Lignocellulosen aus Kurzumtriebsplantagen*

Die Optimierung des Dampfdruckaufschlusses wurde mit statistischen Versuchsplänen in einer Versuchsreihe ohne Chemikalienzusatz und einer zweiten Reihe mit Einsatz von $SO_2$ durchgeführt. Eine ausführliche Beschreibung der Vorgehensweise, aller Einzelergebnisse sowie der ermittelten Modellgleichungen wurde von Schütt et al. (2011; 2012a) publiziert. In diesem Bericht wird daher auf die Erläuterung der Statistik verzichtet. Es werden nur wesentliche Ergebnisse der Versuchspläne dargestellt, die ermittelten Optima vorgestellt und die Massenbilanzen des Prozesses mit und ohne $SO_2$ Einsatz verglichen.

## Entwicklung des Optimums ohne $SO_2$

Basierend auf Literaturwerten und Vorversuchen wurden die Aufschlüsse ohne $SO_2$-Einsatz im Temperaturbereich von 170 bis 220°C für eine Reaktionszeit von 5 bis 30 min durchgeführt. In Abbildung 3 zeigt die Wirkungsflächendiagramme für die Faserstoff- und Extraktausbeuten in Abhängigkeit von Temperatur und Dauer des Dampfdruckaufschlusses.

Es wird ersichtlich, dass die Faserstoffausbeute mit zunehmender Dauer und Temperatur des Aufschlusses stetig abnimmt, wobei der Einfluss der Temperatur deutlich größer ist als der Einfluss der Zeit. Die Abnahme der Faserstoffausbeute mit zunehmendem Schärfegrad ist hauptsächlich auf den Abbau der Hemicellulosen zu wasserlöslichen Oligo- und Monomeren zurückzuführen. Dementsprechend nimmt die Extraktausbeute zunächst mit steigendem Schärfegrad zu. Es wird jedoch bereits bei moderaten Aufschlussbedingungen ein Optimum erreicht, jenseits dessen die Extraktausbeute wieder stark abnimmt. Dies liegt am Abbau der im Extrakt gelösten Xylose zu

Furfural. Einerseits ergibt sich aus der Reaktion von Xylose zu Furfural ein Masseverlust, da die Reaktion unter Abspaltung von drei Wassermolekülen abläuft. Weiterhin ist das Furfural in Verbindung mit Wasserdampf sehr flüchtig, so dass ein großer Teil bei der Entspannung des Reaktors in der Gasphase verloren geht und erst bei der Bilanzierung der Gasphasen berücksichtigt wird.

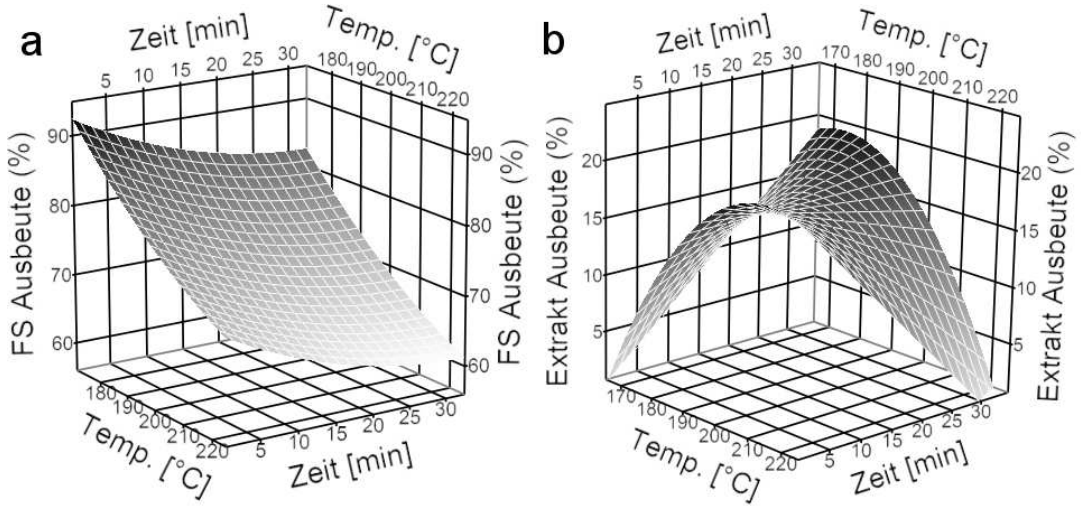



**Abbildung 3: Wirkungsflächendiagramme der Ausbeuten der Dampfdruckaufschlüsse in Abhängigkeit der Temperatur und der Reaktionszeit. a) Faserstoff (FS) Ausbeute; b) Extraktausbeute.**

Es zeigt sich somit, dass ein Optimum für die Xyloseausbeute bereits bei sehr milden Bedingungen im Dampfdruckaufschluss erreicht wurde. Für eine gute enzymatische Abbaubarkeit der Cellulose waren jedoch deutlich schärfere Aufschlussbedingungen notwendig. Um diesem Zielkonflikt zwischen hoher Xylose- und hoher Glucoseausbeute gerecht zu werden, wurde die Optimierung des statistischen Modells anhand der Summe beider Kohlenhydrate nach enzymatischer Hydrolyse des Faserstoffes und saurer Hydrolyse des Extrakts durchgeführt. Nach Anpassung der Modellgleichung wurde die optimale Kohlenhydratausbeute für Dampfdruckaufschlüsse bei 210°C und 15 min berechnet (Abbildung 4).

Um die Qualität des Modells zu prüfen, wurden drei Kontrollversuche unter den berechneten optimalen Bedingungen durchgeführt (Tabelle 2). Die Faserstoffausbeute wurde sehr gut durch das Modell vorhergesagt. Die Ausbeuten des Extrakts und der Kohlenhydrate nach Hydrolyse zeigen leichte Abweichungen gegenüber den vorhergesagten Werten. In Hinblick auf das Reaktordesign sowie die Vielzahl der Schritte zur Bestimmung der Ausbeuten kann die Berechenbarkeit anhand des Modells als gut betrachtet werden.

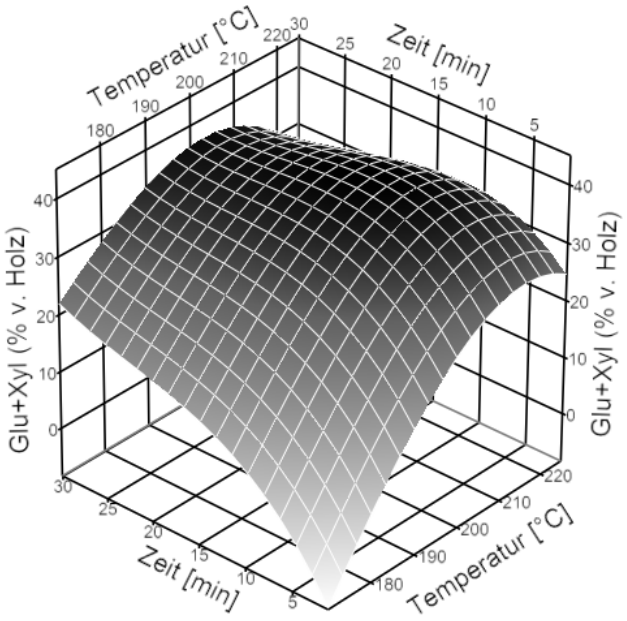



**Abbildung 4: Wirkungsflächendiagram für die Summe von Glucose und Xylose nach Dampfdruckaufschluss und Hydrolyse von Faserstoff und Extrakt.**

Zwei weitere Kontrollversuche wurden mit Holz ohne Rinde durchgeführt, um den Einfluss der Rinde auf die enzymatische Hydrolyse zu untersuchen. Die absoluten Ausbeuten sind geringfügig höher als die Ergebnisse aus den Aufschlüssen mit Rinde. Da der Extraktstoffgehalt in der Rinde deutlich höher und die Kohlenhydratgehalte geringer sind, war dieses Ergebnis zu erwarten. Die letzte Spalte von Tabelle 2 zeigt die Kohlenhydratausbeuten nach enzymatischer Hydrolyse bezogen auf die theoretisch verfügbaren Kohlenhydrate. Die Ausbeute der Aufschlüsse mit Rinde betrug 61,9% während sich nach Aussortieren der Rinde 63,6% Ausbeute erzielen ließen. Dieser Unterschied ist sehr gering, so dass vermerkt werden kann, dass die Rinde keinen erheblichen Einfluss auf die enzymatische Hydrolyse hat.

**Tabelle 2: Vergleich der Modellvorhersage und der Kontrollversuche (KV1.1-1.3) im Optimum anhand der Faserstoff-, Extrakt- und Kohlenhydratausbeuten.**

| Versuch | Faserstoff Ausbeute [%] | Extrakt Ausbeute [%] | Kohlenhydrate nach Hydrolyse[a] [%] | [%][b] |
|---|---|---|---|---|
| Modell | 68,4±1,0 | 14,4±1,8 | 36,4±0,8 | |
| KV1.1 | 67,9 | 13,0 | 34,5 | 61,8 |
| KV1.2 | 68,3 | 12,4 | 35,2 | 63,1 |
| KV1.3 | 67,7 | 13,2 | 34,0 | 60,9 |
| Mittelwert | 68,0 | 12,9 | 34,6 | 61,9 |
| σ | 0,31 | 0,42 | 0,62 | 1,1 |
| KV ohne Rinde | 71,1 | 12,7 | 36,9 | 63,6 |

[a] Summe von Glucose und Xylose aus Faserstoff und Extrakt
[b] % bezogen auf die theoretische Kohlenhydrat-Ausbeute

## Entwicklung des Optimums mit $SO_2$ Imprägnierung

Das Basismodell mit 18 Experimenten wurde um 12 Experimente mit Einsatz von $SO_2$ erweitert. Die Durchführung dieser Versuchsreihe wurde bei Schütt et al. (2012a) beschrieben. Die Temperatur- und Zeitstufen in dieser Erweiterung entsprachen den Stufen im Basismodel. Der $SO_2$-Einsatz wurde in vier Stufen zwischen 0,7 und 2,5% variiert.

Abbildung 5 zeigt die Wirkungsflächendiagramme für die Faserstoff- und Extraktausbeuten in Abhängigkeit der Einsatzmenge an $SO_2$ und der Temperatur des Aufschlusses. Die Reaktionszeit wies den geringsten Einfluss auf die Ausbeuten auf und wird daher hier nicht vertiefend wiedergegeben. In der Abbildung werden die Wirkungsflächendiagramme bei einer Reaktionszeit von 15 min dargestellt, da dies der Aufschlussdauer im berechneten Optimum entspricht.

Sowohl eine Erhöhung der Temperatur, als auch des $SO_2$-Einsatzes resultieren in einer Abnahme der Faserstoffausbeute (Abbildung 5a). Der Einfluss der Temperatur auf die Faserstoffausbeute ist jedoch deutlich stärker. Einen größeren Einfluss hat der $SO_2$-Einsatz auf die Extraktausbeute (Abbildung 5b). Mit zunehmender Einsatzmenge lässt sich die Menge des Extrakts und entsprechend auch die Xyloseausbeute im Extrakt steigern. Das $SO_2$ bewirkt eine Hydrolyse der Xylane bei geringeren Temperaturen. Die Abbaureaktionen der Xylose zu Furfural treten daher in deutlich geringerem Umfang auf, was zu der Erhöhung der Extraktausbeute führt. Der Verlauf der Wirkungsfläche zeigt, dass die Extraktausbeuten, ebenso wie bei der Versuchsreihe ohne $SO_2$ Einsatz, bei einer weiteren Erhöhung der Temperatur wieder stark abfallen.

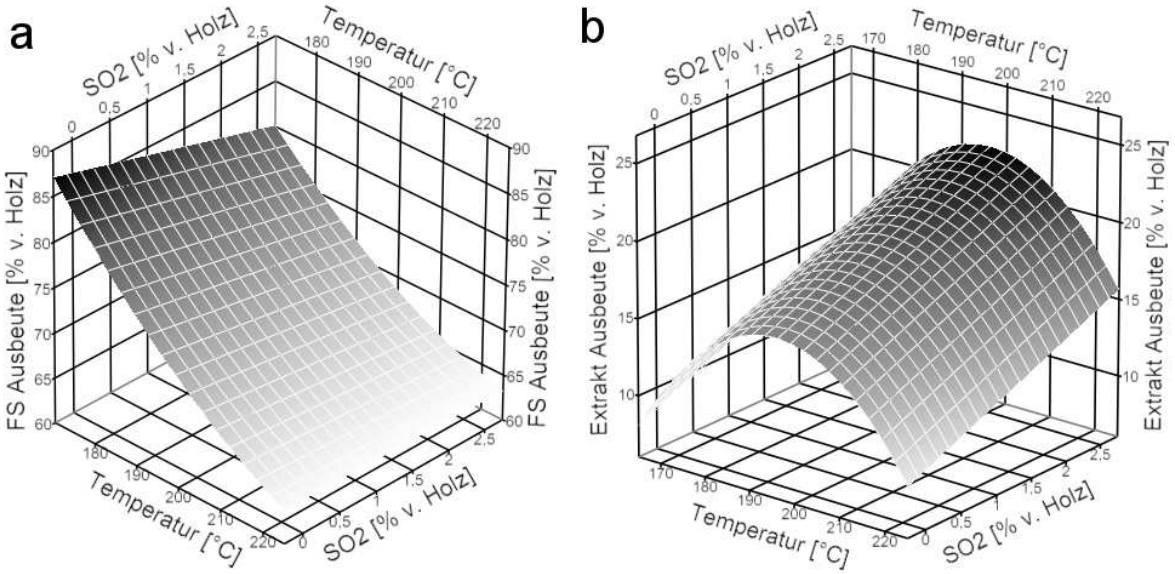



**Abbildung 5: Wirkungsflächendiagramme der Ausbeuten der Dampfdruckaufschlüsse in Abhängigkeit der Temperatur und der eingesetzten Menge an SO2 bei einer Reaktionszeit von 15 min. a) Faserstoffausbeute; b) Extraktausbeute**

Auch die Zugänglichkeit des Faserstoffes für die enzymatische Hydrolyse wurde durch den $SO_2$-Einsatz erhöht, so dass die Kohlenhydratausbeuten insgesamt deutlich stiegen. Die Optimierung des Modells in Bezug auf die Summe der Glucose- und Xyloseausbeuten nach der Hydrolyse ergab entsprechend ein berechnetes Optimum bei 200°C, 15 min und 2,5% $SO_2$ (Abbildung 6). Ebenso wie für die Extraktausbeuten ergeben sich auch für die Glucose- und Xyloseausbeuten Ausbeuteverluste durch die weitere Erhöhung der Temperatur im Dampfdruckaufschluss.

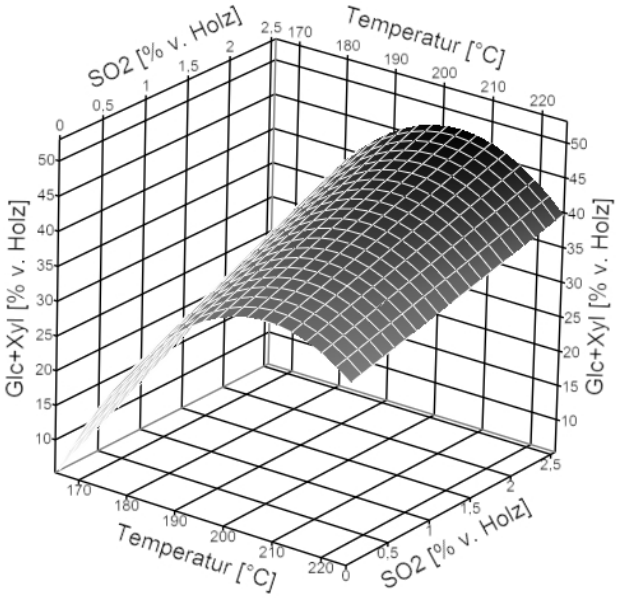



**Abbildung 6: Glucose- und Xyloseausbeuten nach enzymatischer Hydrolyse des Faserstoffes und saurer Hydrolyse des Extrakts in Abhängigkeit des SO2-Einsatzes und der Temperatur des Aufschlusses.**

**Tabelle 3: Vergleich der Modellvorhersage und der Kontrollversuche (KV2.1-2.3) im Optimum mit SO2 anhand der Faserstoff-, Extrakt- und Kohlenhydratausbeuten.**

| Versuch | Faserstoff Ausbeute [%] | Extrakt Ausbeute [%] | Kohlenhydrate nach Hydrolyse[a] [%] |
|---|---|---|---|
| Model | 68,9±1,6 | 22,0±2,3 | 47,3±2,0 |
| KV2.1 | 67,9 | 18,6 | 43,1 |
| KV2.2 | 65,9 | 18,8 | 42,0 |
| KV2.3 | 66,1 | 19,1 | 43,7 |
| Mittelwert | 66,7 | 18,8 | 42,9 |
| σ | 1,1 | 0,3 | 0,9 |

[a] Summe von Glucose und Xylose aus Faserstoff und Extrakt

Für das Optimum des erweiterten Modells wurden ebenfalls drei Kontrollversuche durchgeführt (Tabelle 3). Die Abweichungen sind dabei etwas größer als für das Basismodell ohne $SO_2$-Einsatz. Die Imprägnierung des Holzes mit $SO_2$ als ein zusätzlicher Schritt in der Vorbehandlung scheint die Vorhersage der Ergebnisse zu erschweren. Zudem wurden für die Erweiterung des Modells weniger Versuche durchgeführt, als für das Basismodell. Die Kohlenhydratausbeute nach enzymatischer Hydrolyse konnte jedoch um ca. 9% gegenüber dem Optimum ohne $SO_2$ gesteigert werden.

## Produktbilanz unter Optimalbedingungen mit und ohne $SO_2$

Unter den Optimalbedingungen mit und ohne $SO_2$ wurde eine umfassende Produktbilanzierung durchgeführt. Die Gesamtausbeute aller nicht flüchtigen Bestandteile nach Trocknung des Faserstoffes und des Extrakts liegt bei 80,9% nach Vorbehandlung ohne $SO_2$ und bei 85,5% mit $SO_2$ (Abbildung 7).

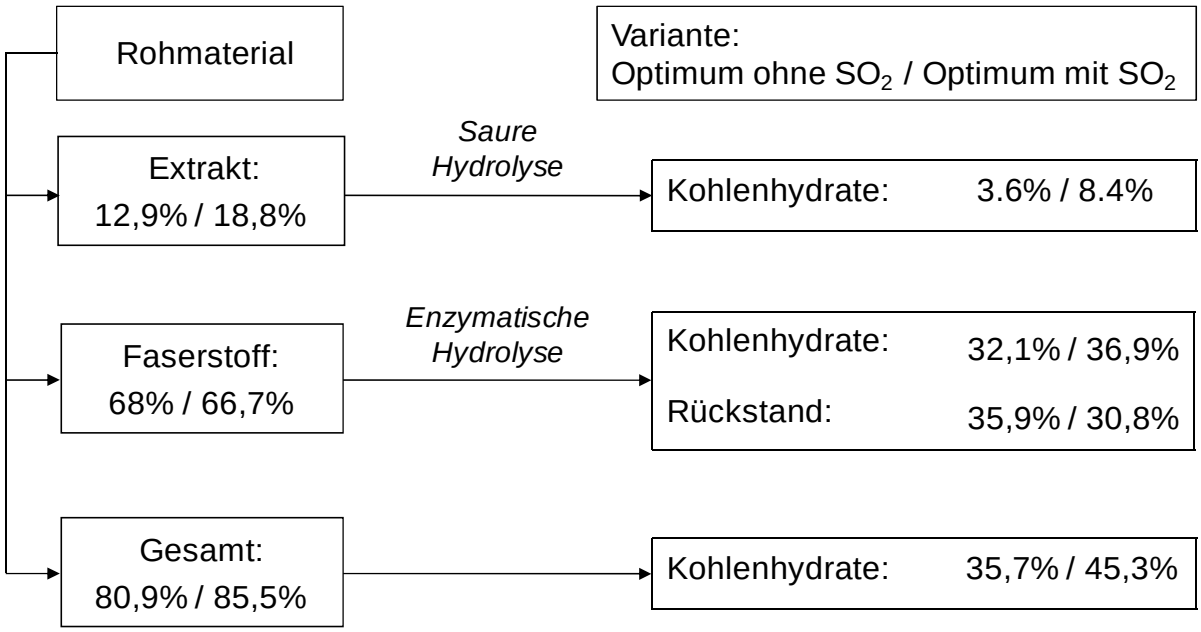



**Abbildung 7: Bilanzierung der nicht-flüchtigen Bestandteile der Dampfdruckaufschlüsse sowie der enzymatischen Hydrolyse der Faserstoffe und der sauren Hydrolyse der Extrakte unter den Bedingungen der beiden Optima (Optimum ohne SO2 / Optimum mit SO2). Alle Prozentwerte beziehen sich auf das eingesetzte trockene Rohmaterial.**

Die höhere Ausbeute im Optimum mit $SO_2$ lässt sich auf die höheren Extraktausbeuten zurückführen, während die Faserstoffausbeuten beider Optima sehr ähnlich sind. Die Zugänglichkeit des Faserstoffes für die enzymatische Hydrolyse wurde allerdings durch den $SO_2$-Einsatz im Dampfdruckaufschluss weiter verbessert. Dementsprechend tragen sowohl die Ausbeuten der sauren Hydrolyse des Extraktes, als auch die Ausbeuten der enzymatischen Hydrolyse des Faserstoffes zu der höheren Kohlenhydratausbeute im Optimum mit $SO_2$ bei. Weiterhin wurde eine Reihe von Abbauprodukten im Extrakt und in der Gasphase quantifiziert (Tabelle 4). Die mengenmäßig wichtigsten Komponenten waren Essigsäure und Furfural, welche beide aus dem Xylan stammen und in der Bilanz jeweils 3-4% bezogen auf Holz ausmachten. Während die Essigsäure hauptsächlich im Extrakt gefunden wurde, befand sich das Furfural zum größten Teil in der Gasphase. Dies zeigt die hohe Flüchtigkeit des Furfurals in Verbindung mit Wasserdampf. HMF wurde nur zu einem geringeren Anteil und ausschließlich in den Extrakten gefunden. Die größere Ausbeute an Furfural gegenüber dem HMF ist dadurch bedingt, dass die Xylane während des Aufschlusses zu

einem deutlich größeren Anteil als die Cellulose abgebaut wurden und im Rohstoff keine nennenswerten Mengen an Mannan enthalten sind.

**Tabelle 4: Abbauprodukte der Kohlenhydrate und des Lignins im Extrakt und in der kondensierten Gasphase.**

| Komponente | 210°C; 15 min | | 2.5% $SO_2$; 200°C; 15 min | |
|---|---|---|---|---|
| | Extrakt | Gasphase | Extrakt | Gasphase |
| | [% v. Holz] | | [% v. Holz] | |
| Essigsäure | 3,0 | 1,2 | 2,8 | 1,0 |
| Ameisensäure | 0,9 | 0,2 | 0,5 | 0,1 |
| Furfural | 0,4 | 2,4 | 0,6 | 2,1 |
| 5-HMF | 0,5 | - | 0,6 | - |
| 4-Hydroxy-benzoesäure | 0,7 | - | 0,9 | - |
| Syringaldehyd | 0,1 | - | 0,1 | - |
| Vanillin | 0,1 | - | 0,1 | - |

Die detektierten phenolischen Komponenten 4-Hydroxybenzoesäure, Syringaldehyd und Vanillin machten in der Summe nur ungefähr 1% bezogen auf den eingesetzten Rohstoff aus. Der Vergleich beider Optima zeigt, dass nach der Vorbehandlung mit $SO_2$ höhere Kohlenhydratausbeuten erhalten wurden. Dies lässt sich auf ein kleineres Ausmaß an Abbaureaktionen zurückführen, da geringere Aufschlusstemperaturen für die Erhöhung der Zugänglichkeit des Faserstoffes ausreichend waren. Entsprechend wurden etwas geringere Mengen an Furfural, Essig- und Ameisensäure gefunden. Die Unterschiede sind allerdings sehr gering und können die Differenz in der Xyloseausbeute nicht kompensieren. Auch nach Auffangen der Bestandteile verbleibt eine Lücke in der Produktbilanz. Diese Lücke zeigt, dass die Kondensation der Gasphase im Labormaßstab schwierig ist und ein beträchtlicher Teil der flüchtigen Bestandteile verloren gegangen ist. Für die Prozessbilanz kann abschließend festgehalten werden, dass aus Sicht der Produktbilanz der Aufschluss mit $SO_2$ zu bevorzugen ist, da hier eine höhere Produktausbeute und ein höherer Gehalt an fermentierbaren Zuckern erreicht wird und gleichzeitig eine niedrigere Reaktionstemperatur ausreicht. Dem steht der größere Aufwand für den Einsatz des $SO_2$ gegenüber. Die Entscheidung, welche Variante zu bevorzugen ist, kann nur anhand einer ökonomischen und ökologischen Bewertung der beiden Prozessvarianten vorgenommen werden.

## Vergleichsaufschlüsse mit dem Weidenholz

Die Vergleichsaufschlüsse mit Weide wurden unter den Bedingungen des ermittelten Pappeloptimums mit $SO_2$ (200 °C, 15 min, 2,5% $SO_2$) durchgeführt. Ein Vergleich der Faserstoff- und

Extraktausbeuten (Abbildung 8a) und der Kohlenhydratausbeuten nach enzymatischer Hydrolyse (Abbildung 8b) ergibt nur sehr geringe Abweichungen zwischen den Rohstoffen Pappel und Weide.

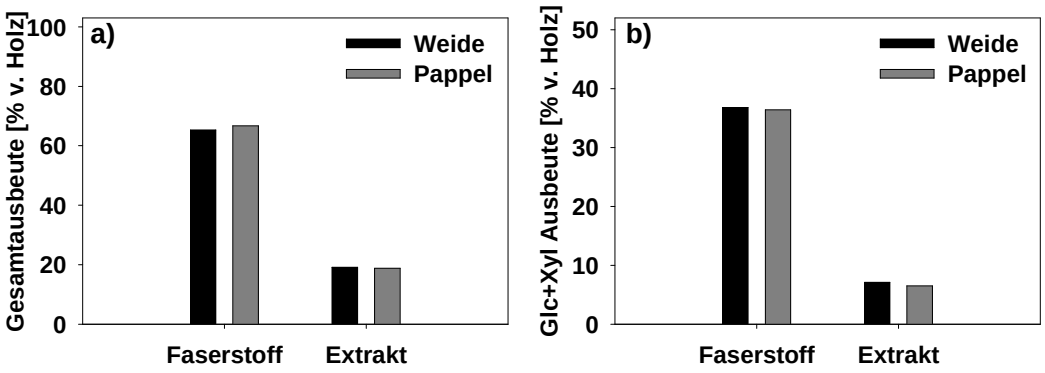



**Abbildung 8: Ausbeuten nach Dampfdruckbehandlung von Pappel- und Weidenholz (200 °C; 15 min; 2,5% SO2). a) Gesamtausbeuten und b) Kohlenhydratausbeuten (Glucose+Xylose) nach enzymatischer Hydrolyse**

Da sowohl die Rohstoffanalyse als auch die Ergebnisse nach Dampfdruckbehandlung und enzymatische Hydrolyse von Pappel- und Weidenholz sehr eng beieinander liegen, wurde keine weitere Optimierungsreihe für das Weidenholz durchgeführt.

## Mikroskopische Untersuchungen der Pappel-Faserstoffe

Die Pappel-Faserstoffe nach Aufschluss unter Optimalbedingungen mit und ohne $SO_2$ wurden topochemisch mit Hilfe der Universalmikrospektralphotometrie (UMSP) untersucht (Schütt et al. 2012a), um die Verteilung von Lignin und Extraktstoffen in den Zellwandschichten zu verfolgen. Nach Vorbehandlung unter den höheren Temperaturen ohne $SO_2$-Zusatz ist bereits aus den lichtmikroskopischen Aufnahmen ersichtlich, dass die Fasern völlig vereinzelt vorliegen, während bei dem Aufschluss mit $SO_2$ bei niedriger Temperatur die Zellwandstruktur und der Faserverband besser erhalten bleibt (Schütt et al. 2012b). Die topochemische Untersuchung der Faserstoffe durch Universalmikrospektralphotometrie zeigte eine starke Mobilisierung des Lignins nach Aufschluss bei 210°C ohne $SO_2$. Der Faserstoff wies vermehrt stark kondensierte Extraktstoff-Agglomerate sowie mit UV-absorbierenden Stoffen gefüllte Lumina auf. Diese Effekte traten nach Aufschluss bei 200°C mit $SO_2$ deutlich weniger auf. Der Unterschied wurde auf die geringeren Temperaturen zurückgeführt, welche für den Aufschluss mit $SO_2$ ausreichend waren. Da die Zugänglichkeit der Faserstoffe nach Vorbehandlung mit $SO_2$ höher war, wirkt sich die Mobilisierung und anschließende Ablagerung des Lignins auf der Faseroberfläche wahrscheinlich negativ auf die enzymatische Hydrolyse aus. Eine ausführliche Darstellung dieser Untersuchungen findet sich bei Schütt et al. (2012a).

## Vergleich des Dampfdruck-Refiner-Aufschlusses mit dem Dampfdruck-Explosions-Aufschluss

In der Literatur wird kontrovers diskutiert, ob die schlagartige Entspannung (steam explosion) am Ende der Dampfdruckbehandlung die Zugänglichkeit des Rohstoffes für eine enzymatische Hydrolyse erhöht. Diese Frage ist für die Auslegung einer Anlage und die Frage, welche Rückgewinnungssysteme für die Prozesswärme eingesetzt werden können, von erheblicher Bedeutung. Daher wurde unter den Bedingungen des Optimums ohne $SO_2$ der Dampfdruck-Refiner-Aufschluss mit einem Dampfdruck-Explosions-Aufschluss verglichen. Die Explosions-Aufschlüsse wurden auf einer Versuchsanlage an der Norwegian University of Life Sciences in Ås, Norwegen durchgeführt. Dabei wurde untersucht, ob die Explosion am Ende der Behandlung die Zugänglichkeit für die enzymatische Hydrolyse erhöht.

Für einen erfolgreichen Dampfdruck-Explosions-Aufschluss war eine Vorzerkleinerung der Hackschnitzel vor dem Aufschluss erforderlich. Ohne diese Mahlung konnte kein homogener Faserstoff aus dem Aufschluss erhalten werden. Bezüglich der Produktausbeuten nach der enzymatischen Hydrolyse der Faserstoffe wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Verfahren gefunden. Aufschlüsse ohne die Explosion, beziehungsweise ohne die Refinerbehandlung am Ende der Dampfbehandlung zeigten, dass der entscheidende Faktor für die Erhöhung der Zugänglichkeit die Zerkleinerung des Materials war. Im Dampfdruck-Refiner-Aufschluss erfolgt die Zerkleinerung der Hackschnitzel in erweichtem Zustand bei hohen Temperaturen. Im Dampfdruck-Explosions-Verfahren musste eine stärkere Zerkleinerung vor der Dampfbehandlung erfolgen. Dies ergibt möglicherweise einen energetischen Vorteil für den Dampfdruck-Refiner-Aufschluss, wie er in den eigenen Untersuchungen durchgeführt wurde. Eine ausführliche Beschreibung der Durchführung und Auswertung der Versuche wird bei Schütt et al. (2012a) gegeben.

### *Task 1.3: Enzymatische Hydrolyse der Faser- und Extraktfraktionen aus dem Dampfdruckaufschluss*

## Einfluss der Reaktionszeit und der Substratkonzentration auf die Faserstoffhydrolysen

Für die Optimierung des Dampfdruckaufschlusses wurden enzymatische Hydrolysen unter Standardbedingungen durchgeführt. Diese zielten auf einen weitgehenden Abbau der Faserstoffe ab, um die Effektivität des jeweiligen Dampfdruckaufschlusses zu bewerten. Für die Weiterverarbeitung der Hydrolysate ist jedoch eine hohe Zuckerkonzentration notwendig, um später die Aufreinigung

der Fermentationsprodukte wie Butandiol oder Ethanol wirtschaftlich durchführen zu können. Mit Erhöhung der Stoffdichte während der enzymatischen Hydrolyse verringert sich jedoch, nach vorherrschender Meinung aufgrund von Produktinhibierungen, die katalytische Aktivität der Enzyme. Weiterhin müssen Kompromisse zwischen der Kohlenhydratausbeute, dem Enzymeinsatz und der benötigten Reaktionszeit gemacht werden. Um die Beziehungen dieser Faktoren zueinander deutlich zu machen, wurden Zeitreihen von enzymatischen Hydrolysen bei Faserstoffkonzentrationen von 5-20% durchgeführt. Anschließend wurden die Glucosekonzentrationen in den Lösungen sowie die Ausbeute bezogen auf die Faserstoffe ermittelt.

Abbildung 9a zeigt, dass die Glucosekonzentration durch die Erhöhung der Stoffdichte deutlich von circa 30 g/L auf über 100 g/L gesteigert werden konnte. Es wird jedoch auch ersichtlich, dass die maximale Zuckerausbeute bei höheren Stoffdichten erst sehr viel später erreicht wird. Noch deutlicher wird dieser Effekt in Abbildung 9b. Die Glucoseausbeute ist bei 5% Stoffdichte nach 48 h und bei 10% Stoffdichte nach 72 h auf dem Maximum von circa 60% bezogen auf den Faserstoff angelangt. Diese Ausbeuten wurden bei 15% und 20% Stoffdichte selbst nach einer Dauer von 168 h nicht erreicht.

Die Zeitreihen wurden bei einem relativ hohen Enzymeinsatz von 136 µL Cellic CTec2 (Cellulase-Mix) und 40 µL Novozym 188 (ß-Glucosidase) pro Gramm Faserstoff durchgeführt. Die Menge an Cellic CTec2 entspricht einer Aktivität von 20 FPU (Filter Paper Units) pro Gramm Faserstoff, was dem mittleren bis oberen Bereich der in der Literatur zu findenden Enzymeinsätze entspricht.

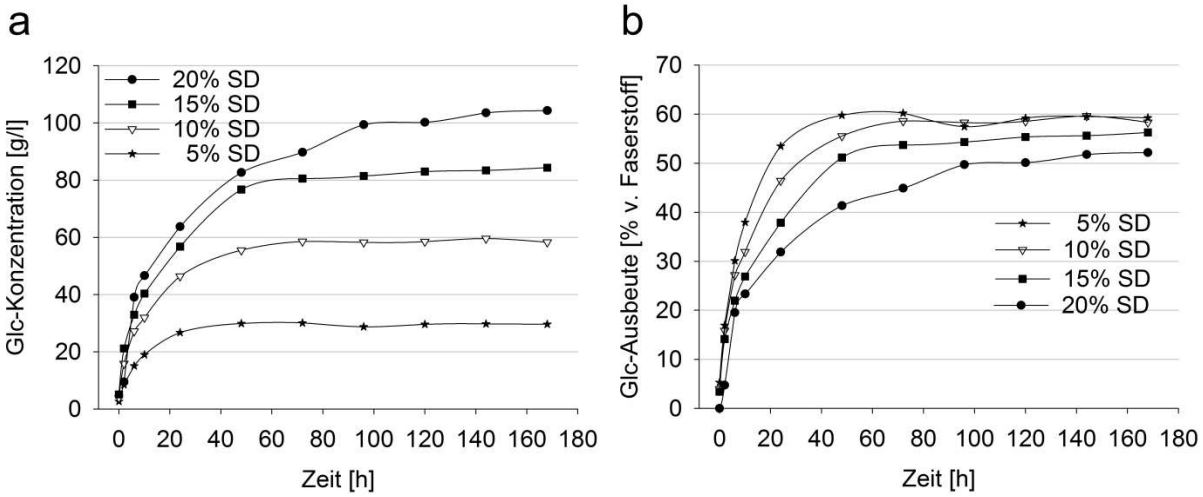



**Abbildung 9: Einfluss der Reaktionszeit und der Stoffdichte während der enzymatischen Hydrolyse auf die Glucosekonzentration im Hydrolysat (a) und die Glucoseausbeuten bezogen auf den Faserstoff (b).**

Bei einer Stoffdichte von 15% wurde daher der Enzymeinsatz auf 10 FPU und 5 FPU reduziert. Dabei wurde der Einsatz von 40 µL Novozym 188 konstant gehalten, um einen Rückgang der Aktivität durch Produktinhibierungen auszuschließen. Die Reduzierung auf 10 FPU lässt die Hydrolyserate in der

Initialphase recht deutlich zurückgehen (Abbildung 10). Nach 168 h liegen die Konzentrationen jedoch noch relativ nah bei den Ergebnissen mit Einsatz von 20 FPU. Bei der weiteren Reduzierung auf 5 FPU scheinen die Cellulasen bereits sehr früh inaktiviert zu sein, so dass kein weiterer Abbau mehr zu verzeichnen ist. Dies kann an unterschiedlichen Mechanismen liegen. Möglich ist die unproduktive Bindung von Cellulasen an den Faserstoff oder eine direkte Adsorption auf vorhandenes Lignin. Es zeigt sich somit, dass trotz Optimierung der Enzyme durch die Hersteller noch immer ein sehr hoher Enzymeinsatz und eine relativ lange Hydrolysedauer notwendig sind, um akzeptable Kohlenhydratausbeuten und -konzentrationen zu erreichen.

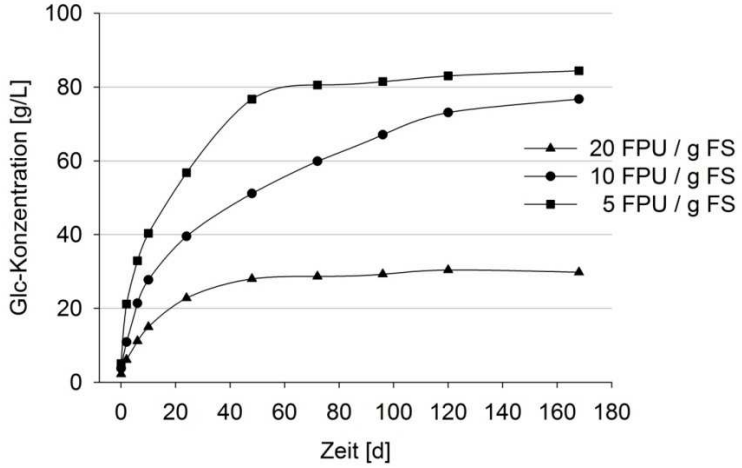



**Abbildung 10: Einfluss des Enzymeinsatzes und der Reaktionszeit auf die Glucosekonzentration bei 15% Stoffdichte.**

## Gemeinsame Hydrolyse von Faserstoff und Extrakt

Unter den Bedingungen der Optima mit und ohne $SO_2$-Einsatz fallen die Kohlenhydratausbeuten in den Extrakten relativ gering aus. Bei der Optimierung der enzymatischen Hydrolyse wurde deshalb der Fokus hauptsächlich auf die Hydrolyse des Faserstoffes gelegt. Es stellt sich jedoch die Frage, inwiefern eine gemeinsame Weiterverarbeitung von Faserstoff und Extrakt möglich ist. Dabei war vor allem von Interesse, ob die im Extrakt in höherer Konzentration enthaltenen Nebenprodukte die enzymatische Hydrolyse inhibieren. Zur Untersuchung dieser Frage wurde eine enzymatische Hydrolyse mit einem Gemisch von Faserstoff und Extrakt in dem Verhältnis durchgeführt, das der Ausbeuterelation nach dem Dampfdruckaufschluss entsprach. Als Referenz wurde nur der Faserstoff in Puffer umgesetzt. Die gemeinsame Hydrolyse von Faserstoff und Extrakt ergab einen Anstieg der inhibitorischen Komponenten um das zwei- bis sechsfache (Tabelle 5). Die Kohlenhydratausbeuten sind jedoch in beiden Hydrolysaten sehr ähnlich. Die Enzyme werden demnach durch die im Dampfdruckaufschluss gebildeten Nebenprodukte nur in geringem Maße gehemmt. Allerdings

können die inhibitorischen Substanzen sehr wohl negative Auswirkungen auf eine nachgeschaltete Fermentation ausüben.

**Tabelle 5: Einfluss der gemeinsamen enzymatischen Hydrolyse von Faserstoff und Extrakt auf die Konzentration der potentiellen Inhibitoren und der Kohlenhydrate im Hydrolysat**

| | Hydrolysat von Faserstoff [g/L] | Hydrolysat von Faserstoff + Extrakt [g/L] |
|---|---|---|
| Potentielle Inhibitoren | | |
| 5-HMF | 0,048 | 0,257 |
| Furfural | 0,038 | 0,162 |
| 4- Hydroxybenzoesäure | 0,084 | 0,329 |
| Vanillin | 0,007 | 0,015 |
| Syringaldehyd | 0,012 | 0,027 |
| Essigsäure | 0,477 | 3,073 |
| Ameisensäure | 0,154 | 0,947 |
| Kohlenhydrate nach EH | | |
| Glucose | 31,2 | 30 |
| Xylose | 1,2 | 2,3 |
| Mannose | 0,3 | 0,7 |

## *Task 1.5: Erzeugung von Hydrolysaten für Fermentationen in größerem Maßstab und Qualitätskontrolle*

6 Liter Hydrolysat mit hoher Glucosekonzentration (120 g/L) wurden für die TUBS bereitgestellt, um Versuche im Bioreaktor durchzuführen. 8 Liter Hydrolysat wurden an das vTI BS geliefert um Fermentationsversuche mit immobilisierten Microorganismen durchzuführen. Größere Mengen an Hydrolysat (30 L) konnten aufgrund des begrenzten Dampfdruckreaktors nicht geliefert werden.

## *Task 1.6: Nutzung von Nebenprodukten und Identifizierung inhibierender Verbindungen*

### Vergleich des alkalisch extrahierten Lignins und des ligninreichen Hydrolyse-rückstands

Eine Versuchsreihe zur Extraktion von Lignin aus den vorbehandelten Fasern ergab, dass eine alkalische Extraktion am aussichtsreichsten für Fasern scheint, die mit einem Schärfegrad (SG) bis zu log $R_0$ = 4 vorbehandelt wurden. Eine detaillierte Darstellung dieser Untersuchungen findet sich bei Schütt et al. (2011). Entsprechend wurden mehrere Vorbehandlungen unter konstanten Bedingungen von 190°C und 16 min (SG 4) durchgeführt um eine ausreichende Faserstoffmenge zu

erhalten. Von einem Teil dieses Faserstoffes wurde das Lignin mit verdünnter Natronlauge extrahiert. Der andere Teil des Faserstoffes wurde ohne vorherige Extraktion enzymatisch hydrolysiert. Als Rückstand der enzymatischen Hydrolyse erhält man ebenfalls eine ligninreiche Fraktion.

Die so erhaltenen Fraktionen, das NaOH-extrahierte Lignin (NaOH-L) und das enzymatische Hydrolyselignin (EHL) wurden charakterisiert und miteinander verglichen. Bei den oben genannten Versuchsbedingungen weist das Lignin eine enge Molmassenverteilung auf, die enzymatische Hydrolyse des Faserstoffs ist aber noch nicht optimal. Daher wurden weitere Lignine unter den Bedingungen der Optima mit und ohne $SO_2$ isoliert und für alle isolierten NaOH- und Hydrolyse-Lignine wurde eine umfassend Charakterisierung durchgeführt.

In der folgenden Diskussion werden die Proben mit den Abkürzungen SG4 (Schärfegrad 4 = 190°C, 16 min), OoS (Optimum ohne $SO_2$) und OmS (Optimum mit $SO_2$) benannt (Tabelle 6). Die Massenbilanz der Extraktionen bestätigt, dass die extrahierbare Ligninmenge mit dem Schärfegrad der Vorbehandlung zunimmt. Auch der Einsatz des $SO_2$ bewirkt einen deutlichen Anstieg der Ligninausbeute (Tabelle 6). Die Ausbeuten der enzymatischen Hydrolyse des Faserstoffs steigen nach Vorbehandlung bei SG4 durch die Extraktion an, während nach Vorbehandlung unter den Bedingungen der Optima, insbesondere nach dem Aufschluss mit $SO_2$, ein leichter Rückgang zu verzeichnen ist (Schütt 2012).

**Tabelle 6: Massenbilanz der Lignin-Extraktion aus den Faserstoffen nach Vorbehandlung bei Schärfegrad 4 (SG4) sowie unter den Bedingungen der Optima ohne $SO_2$ (OoS) und mit $SO_2$ (OmS).**

| Aufschlussbedingungen | 190°C; 16 min | 210°C; 15 min | 200°C; 15 min; 2,5% $SO_2$ |
|---|---|---|---|
| Bezeichnung | SG4 | OoS | OmS |
| | [% bezogen auf Faserstoff] | | |
| Faserstoff nach Extraktion | 75,7 | 70,2 | 72,2 |
| Gefälltes Lignin | 19,4 | 24,0 | 23,2 |
| Gesamt | 95,1 | 94,3 | 95,4 |

Bei dem Vergleich der extrahierten Lignine (NaOH-L) und der enzymatischen Hydrolyselignine (EH-L) in Tabelle 7 fällt zunächst der hohe Kohlenhydratanteil der EH-Lignine auf. Dieser beträgt nach der milderen Vorbehandlung (SG4) 29,8%. Im OoS sind die Kohlenhydratgehalte auf 16,4% und im OmS auf 12,6% reduziert. Dies spiegelt den besseren Abbau der Faserstoffe aus den Optimalbedingungen während der enzymatischen Hydrolyse wieder. Die NaOH-Lignine weisen einen sehr geringen Kohlenhydratanteil von maximal 1% auf. Dementsprechend ergab die Elementaranalyse für die NaOH-Lignine einen höheren Kohlenstoffgehalt als für die EH-Lignine. Dies ist auf den höheren Kohlenstoffgehalt des Lignins im Vergleich zu den Kohlenhydraten zurückzuführen. Weiterhin fällt

beim Vergleich der NaOH-Lignine untereinander auf, dass der Kohlenstoff im SG4-Lignin geringer ausfällt als im OoS- und im OmS-Lignin. Dies lässt darauf schließen, dass die Erhöhung der Temperatur (im OoS), beziehungsweise der Acidität (im OmS) im Aufschluss zu weiteren Änderungen im Lignin führen.

**Tabelle 7: Charakterisierung der NaOH-Lignine und der EH-Lignine nach Aufschluss bei Schärfegrad 4 (SG4) sowie im Optimum ohne $SO_2$ (OoS) und mit $SO_2$ (OmS) bezüglich der Kohlenhydratgehalte und der Elementarzusammensetzung.**

| | SG4 | | OoS | | OmS | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | NaOH-L | EH-L | NaOH-L | EH-L | NaOH-L | EH-L |
| | [% bezogen auf Lignin] | | | | | |
| Glucose | 0,3 | 29,8 | 0,1 | 16,4 | 0,2 | 12,6 |
| Xylose | 0,6 | 2,0 | 0,1 | 0,5 | 0,2 | 0,5 |
| Andere KH* | 0,3 | 1,3 | 0,1 | 0,8 | 0,1 | 0,7 |
| Kohlenstoff | 61,2 | 55,35 | 65,12 | 60,3 | 64,7 | 60,8 |
| Wasserstoff | 6,1 | 6,2 | 5,3 | 5,7 | 5,6 | 5,6 |
| Stickstoff | 0,3 | 0,7 | 0,4 | 0,6 | 0,4 | 0,7 |
| Schwefel | - | 0,1 | - | - | 0,2 | 0,2 |

*Andere Kohlenhydrate: Mannose, Arabinose, Galactose, Cellobiose

In den NaOH-Ligninen wurden die OH-Gruppen mittels $^{31}$P-NMR nach Argyropoulos (1994) bestimmt. Für die EH-Lignine war dies aufgrund der hohen Verunreinigung mit Kohlenhydraten nicht möglich. Die Messungen ergaben mit Erhöhung des Schärfegrades hauptsächlich eine Reduzierung der aliphatischen OH-Gruppen um ca. 50%, während der Gehalt aromatischer OH-Gruppen nahezu konstant blieb (Tabelle 8). Weiterhin konnte eine leichte Zunahme der Carboxylgruppen beobachtet werden. Die Abnahme der aliphatischen OH-Gruppen ist eine mögliche Erklärung für den erhöhten Kohlenstoffanteil im OoS- und OmS-Lignin.

**Tabelle 8: OH-Gruppen und Carboxylgruppen der NaOH-Lignine nach Aufschluss bei Schärfegrad 4 (SG4) sowie im Optimum ohne $SO_2$ (OoS) und mit $SO_2$ (OmS)**

| | SG4 | OoS | OmS |
|---|---|---|---|
| | | [mmol/g] | |
| Aliphat. OH-Gruppen | 3,05 | 1,56 | 1,48 |
| Aromat. OH-Gruppen | 2,56 | 2,45 | 2,57 |
| Carboxyl-Gruppen | 1,19 | 1,54 | 1,47 |

Abbildung 11 zeigt die Molmassenverteilung der Lignine nach Größenausschlusschromatographie mit UV-Detektion (SEC in DMSO/LiBr; Schütt et al. 2011). Sehr auffällig ist der erhöhte Anteil an niedermolekularen Bestandteilen in den EH-Ligninen. Wahrscheinlich konnten diese Bestandteile aufgrund ihrer geringen Molmasse nicht mehr aus dem NaOH-Extrakt ausgefällt werden, so dass sie im NaOH-Lignin verloren gegangen sind. Weiterhin weisen die EH-Lignine einen etwas höheren Anteil an sehr hochmolekularem Lignin auf. Höchstwahrscheinlich sind diese Bestandteile bei der Extraktion des Lignins im Faserstoff verblieben.

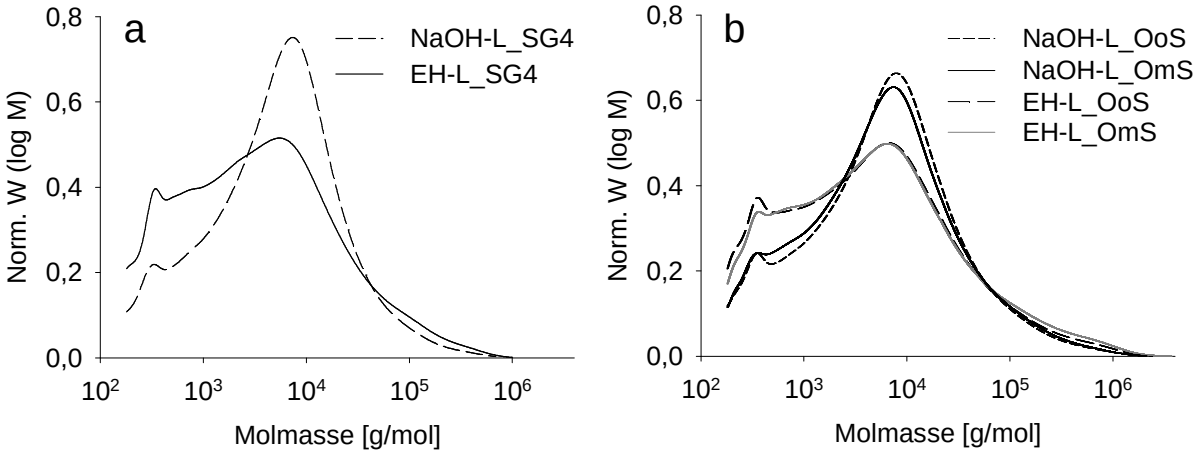



**Abbildung 11: Molmassenverteilung der im Upscaling gewonnenen NaOH-Lignine (NaOH-L) und EH-Lignine (EH-L), a) Vorbehandlung bei Schärfegrad 4 (SG4), b) Vorbehandlung unter Optimalbedingungen ohne $SO_2$ (OoS) und mit $SO_2$ (OmS).**

In Tabelle 9 sind die Zahlenmittel (Mn), Peakmaxima (Mp) und Gewichtsmittel der EH- und NaOH-Lignine aus den drei verschiedenen Vorbehandlungen aufgeführt. Die Zahlenmittel und die Peakmaxima der Lignine weisen nur einen sehr geringen Unterschied zwischen allen Proben auf. Die Gewichtsmittel der Lignine stiegen jedoch von13.000-15.000 g/mol in den SG4-Ligninen auf 22.000-33.000 g/mol nach Vorbehandlung im Optimum mit und ohne $SO_2$. Die höchsten Molmassen sind hierbei für die OmS-Lignine zu verzeichnen.

Der Vergleich der Molmassenverteilung der OoS- und OmS-Lignine (Abbildung 11b) mit den SG4-Ligninen (Abbildung 11a) macht deutlich, dass die Erhöhung der Molmassen hauptsächlich auf einen Anstieg der hochmolekularen Flanke im Bereich über $10^5$ g/mol zurückzuführen ist. Bei Berechnung der Gewichtsmittel $M_w$ werden diese hochmolekularen Bestandteile sehr stark gewichtet. Es ist somit ersichtlich, dass sowohl die Erhöhung der Temperaturen, als auch die Erhöhung der Acidität im Dampfdruckaufschluss Kondensationsreaktionen im Lignin fördert, diese jedoch nur einen sehr geringen Anteil der Gesamtfraktion betreffen.

**Tabelle 9: Molmassen der NaOH-Lignine und der EH-Lignine nach Aufschluss bei Schärfegrad 4 (SG4) sowie im Optimum ohne $SO_2$ (OoS) und mit $SO_2$ (OmS)**

| Mittelwerte | SG4 | | OoS | | OmS | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | NaOH-L | EH-L | NaOH-L | EH-L | NaOH-L | EH-L |
| | | | [g/mol] | | | |
| $M_n$ | 1790 | 1220 | 1790 | 1280 | 1700 | 1360 |
| $M_p$ | 7290 | 5410 | 7740 | 6650 | 7360 | 6490 |
| $M_w$ | 13010 | 15680 | 22300 | 25300 | 23250 | 33670 |

Für die SG4-Lignine wurden zusätzlich die Brennwerte ermittelt. Sie liegen in einem Bereich von 24 MJ/kg für das EH-Lignin bis 27 MJ/kg für das NaOH-Lignin. Die thermische Verwertung der Lignine könnte demnach auch dazu beitragen, die benötigte Energie für den Dampfdruckaufschluss bereitzustellen.

Eine Einsatzmöglichkeit für Lignin ist die Zugabe zu Phenol-Formaldehyd-Harzen, um so den Einsatz von Phenol zu verringern. Zwei Harze wurden synthetisiert, zu denen 20% NaOH-L oder EHL hinzugegeben wurde. Als Referenz wurde der Einsatz von 20% Organosolv-Lignin in einer Harzformulierung sowie ein reines Phenol-Formaldehyd-Harz untersucht (Abbildung 12) Die Klebstoffqualität der synthetisierten Harze wurde mit einem „Automated Bonding Evaluation System“ (ABES) getestet. Hierbei werden zwei Furnierstreifen unter erhöhter Temperatur und Druck miteinander verklebt. Anschließend wird die Zug- bzw. Scherfestigkeit der Klebefuge durch auseinanderziehen der Furnierstreifen ermittelt. Entgegen der Erwartungen erbrachte der Einsatz des EHL deutlich bessere Ergebnisse, welche auf einem Niveau mit dem Einsatz von Organosolv Ligninen liegen.

Der Einsatz von Dampfdruckligninen in Klebstoffen wird gegenwärtig in Hamburg im Rahmen des ERA-NET/WoodWisdom Projektes ProLignin (FNR-FKZ 22020811) weiter untersucht.

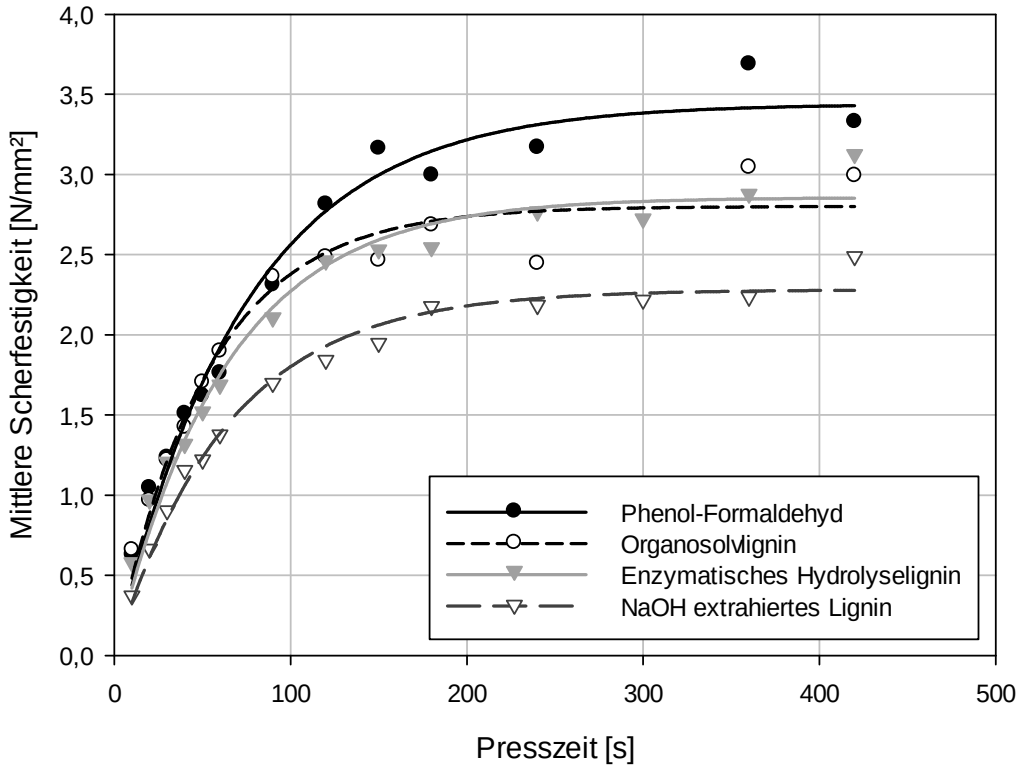



**Abbildung 12: Entwicklung der Scherfestigkeit von Phenol-Formaldehyd Harzen mit Zugabe verschiedener Lignine in Abhängigkeit von der Presszeit**

## Identifizierung von inhibierenden Verbindungen

Die Identifizierung von inhibierenden Verbindungen wurde in enger Kooperation mit dem Projektpartner TUBS durchgeführt. Generell führt eine gemeinsame Hydrolyse von Faserstoff und Extrakt zu höheren Konzentrationen an Inhibitoren. Dies wurde bereits im Zusammenhang mit der enzymatischen Hydroylse erläutert (Tabelle 5). Für die Erzeugung der konzentrierten Fermentations-Lösungen im Projekt wurde daher nur der Faserstoff eingesetzt. Tabelle 10 zeigt die Gehalte an Kohlenhydraten sowie an potentiell inhibierenden Substanzen die unter diesen Bedingungen erhalten werden. Die Inhibierungswirkung wird durch die TUBS erläutert.

**Tabelle 10: Gehalt an Kohlenhydraten und an potentiell inhibierenden Verbindungen in einem Faserstoff-Hydrolysat**

| **Kohlenhydrate** | **[g/L]** |
|---|---|
| Glucose | 112,81 |
| Xylose | 4,00 |
| Mannose | 0,82 |
| **Furane/Aromaten** | |
| 5-Hydroxymethylfurfural | 0,167 |
| Furfural | 0,121 |
| p-Hydroxybenzoesäure | 0,311 |
| Vanillin | 0,012 |
| Syringaaldehyd | 0,021 |
| **Organische Säuren** | |
| Essigsäure | 1,612 |
| Ameisensäure | 0,142 |

## Verwendung der Fraktionen im Biogasreaktor

Als Alternative zur enzymatischen Hydrolyse und anschließenden Fermentation bietet sich die direkte Umsetzung der Faserstoffe und Extrakte im Biogasreaktor an. Dazu wurden Versuche mit einem Faserstoff und dem Extrakt nach Dampfdruckbehandlung durchgeführt (Saake et al. 2010). Dabei wurden zunächst der Faserstoff und das Extrakt einzeln vergoren (Abbildung 13). Beide Fraktionen ergaben nach 21 Tagen Biogasausbeuten von mehr als 300 ml pro Gramm Trockensubstanz (TS). Aus den Ergebnissen wurde ein Modell für die Mischung von Faserstoff und Extrakt errechnet. Die anschließende Vergärung der Mischung erbrachte Ergebnisse, die dem Modell sehr nahe kamen. Entsprechend konnte der Schluss gezogen werden, dass die Inhaltsstoffe des Extrakts nicht inhibierend auf die Mikroorganismen im Biogasreaktor wirken. Die ebenfalls hohen Ausbeuten aus dem reinen Extrakt ermöglichen zudem eine getrennte Weiterverarbeitung der Fraktionen aus dem Dampfdruckaufschluss. Dabei können die Faserstoff-Hydrolysate für die Fermentation zu 2,3-Butandiol und die Extrakte zur Produktion von Biogas verwendet werden. Durch diese Vorgehensweise können die inhibierenden Substanzen aus dem Prozess zur 2,3-Butandiol-Produktion ausgeschleust und in den Biogasstrom umgeleitet werden.

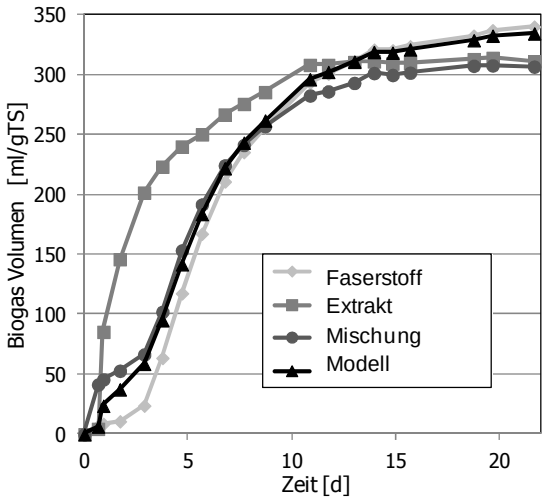



**Abbildung 13: Biogasbildung bei separater und gemeinsamer Umsetzung von Faserstoff und Extrakt. Für die Mischung wurde ein theoretisches Modell zum Vergleich benutzt.**

## Zusammenfassung

Der Dampfdruckaufschluss von Pappel und Weidenholz Aufschluss wurde für den Einsatz mit und ohne $SO_2$ optimiert und eine umfangreiche Bilanzierung aller Fraktionen inklusive der flüchtigen Bestandteile, des Lignins und der inhibierenden Substanzen durchgeführt. Nach dem Aufschluss mit $SO_2$ wurden eine höhere Ausbeute an Xylose im Extrakt, eine besser enzymatische Hydrolyse des Faserstoffes sowie etwas geringere Mengen an Abbauprodukten gegenüber dem Aufschluss ohne $SO_2$ gefunden. Der Dampfdruck-Refiner-Aufschluss wurde mit einem Dampfdruck-Explosions-Aufschluss verglichen. Bezüglich der Produktausbeuten nach der enzymatischen Hydrolyse der Faserstoffe wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Verfahren gefunden. Für die Gewinnung des Lignins wurde eine alkalische Extraktion aus dem Faserstoff vor der enzymatischen Hydrolyse erprobt. Alternativ kann das Lignin als Rückstand aus der enzymatischen Hydrolyse gewonnen werden. Dieser Weg ist einfacher, führt aber zu höheren Kohlenhydrat-Verunreinigungen im Lignin. Für beide Verfahrensweisen ist sowohl eine stoffliche als auch eine thermische Verwendung möglich. Erste Untersuchungen zeigen, dass auch die Hydrolyse-Lignine für eine stoffliche Nutzung z.B. in Phenolharzen geeignet erscheinen. Auf den Verfahrensschritt der alkalischen Extraktion kann daher im Prozess verzichtet werden.

Die Fermentation der Faserstoffhydrolysate zu 2,3-Butandiol bei dem Projektpartner TUBS ergab gute Ergebnisse. Die Zugabe des Extrakts zur Fermentation bewirkte allerdings eine deutliche Inhibierung der Mikroorganismen. Daher wurde alternativ die Verwertung der Extrakte im Biogasprozess getestet. In diesem Prozess werden die für die Fermentation zu 2,3-Butandiol inhibierenden Bestandteile toleriert. Dementsprechend ist es möglich die Produktströme getrennten zu verarbeiten. Die Faserstoffhydrolysate können zu 2,3-Butandiol fermentiert und die Extrakte zur Produktion von Biogas verwendet werden.

# WP 2: Screening nach Mikroorganismen und Gentechnik (TUBS)

Es wird ein Screening nach geeigneten Mikroorganismen (MO) der Risikoklasse 1 auf den jeweiligen Substraten durchgeführt, da nur mit MOs dieser niedrigsten Risikoklasse Aussicht auf eine spätere industrielle Umsetzung des Gesamtprozesses besteht. Weitere Zielkriterien des Screenings sind eine große Toleranz gegenüber Nebenprodukten und hohen Substrat- und Produktkonzentrationen sowie eine hohe Produktivität. Weitere Verbesserungen dieser Zielgrößen sollen durch Optimierung geeigneter MO-Stämme mittels Mutagenese und gentechnischen Methoden erreicht werden.

## *Task 2.1: Screening nach Klasse 1 - Mikroorganismen auf verschiedenen Substraten*

In diesem Projektteil sind Untersuchungen zum Screening an Mikroorganismen durchgeführt worden, die nach Literaturrecherche ein Potential zur 2,3-BD-Bildung besitzen. Als Kohlenstoffquelle sollten dabei reine Zucker (Glucose, Xylose, Saccharose) sowie Holzhydrolysate (aus Lignocellulose; vom Partner vTIHH) getestet werden. Um eine bessere Vergleichbarkeit der 2,3-BD Produktion auf unterschiedlichen Substraten zu gewährleisten, wurde durch Zusammenarbeit der am WP 2 beteiligten Projektpartner (BPOL, TUBS, TUL, PULS) ein Standard Screening Protokoll (Tabelle 11) entwickelt, welches für alle untersuchten Stämme verwendet werden sollte, um deren Potential zur 2,3-BD Bildung zu testen.

**Tabelle 11: Zusammensetzung des Screening Mediums und Kultivierungsbedingungen.**

| | |
|---|---|
| Glucose (30 g/L)/ Glycerin (30 g/L)/ Holzhydrolysat bzw. andere Hydrolysate (30 g/L Glucose) [alternativ]<br>5 g/L Hefeextrakt<br>5 g/L Trypton<br>7 g/L $K_2HPO_4$<br>5.5 g/L $KH_2PO_4$<br>1 g/L $(NH_4)_2SO_4$<br>0.25 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$<br>0.12 g/L $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$<br>0.021 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$<br>0.029 g/L $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$<br>0.039 g/L $Fe(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ | 10 mL/L Lösung:<br>0.2 g/L Nikotinsäure<br>0.0262 g/L $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$<br>0.0037 g/L $NiCl_2 \cdot 6H_2O$<br>0.5 g/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$<br>0.1 g/L $H_3BO_3$<br>0.172 g/L $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$<br>0.001 g/L $CuCl_2 \cdot 2H_2O$<br>0.554 g/L $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$<br><br>30°C<br>100 rpm<br>24-96 h |

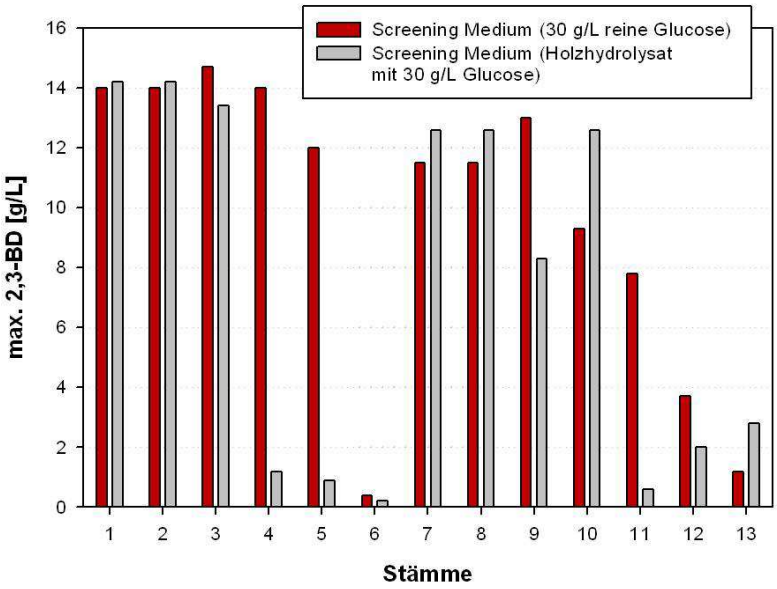
Zusätzlich wurden unter den Projektpartnern Stämme mit gutem Potential ausgetauscht und auf den jeweils anderen Substraten kultiviert. Eine Liste der bisher auf 2,3-BD Bildung untersuchten Stämme

(von Stammsammlungen und Projektpartnern) ist in Tabelle 12 dargestellt. Die Mikroorganismen wurden parallel auf Screening Medium mit reiner Glucose bzw. Holzhydrolysat (Glucosegehalt jeweils 30 g/L) kultiviert. Abbildung 14 zeigt die maximalen 2,3-BD Konzentrationen, die bei dem Vergleichsversuch erzielt wurden. Unter denen der Risikogruppe 1 zugehörigen Stämmen zeigen *Paenibacillus polymyxa* und *Bacillus licheniformis* die beste Produktion auf dem Glucose Medium, *Paenibacillus polymyxa* und *Raoultella sp.* (Stamm A) auf dem Holzhydrolysat Medium.

**Tabelle 12: Liste der auf 2,3-BD-Bildung gescreenten Stämme.**

| Stamm | Bezeichnung | Herkunft bzw. Projektpartner |
|---|---|---|
| *Paenibacillus polymyxa* | ATCC 12321 | Stammsammlungen (ATCC, DSM, NRRL)<br><br>TUBS |
| | DSM 356 | |
| | DSM 36 | |
| *Bacillus licheniformis* | DSM 8785 | |
| | ATCC 9789 | |
| *Candida utilis* | ATCC 22023 | |
| *Klebsiella oxytoca* * | ATCC 8724 | |
| | NRRL B-199 | |
| | m5a1 | Firma Biopolis (BPOL) – Valencia/Spanien |
| *Raoultella sp.* | Stamm A | |
| *Enterococcus casseliflavus* * | 18.3 (Eigenisolat) | |
| *Lysinibacillus sphaericus* | 37 (Eigenisolat) | |
| *Lysinibacillus fusiformis* | 47 (Eigenisolat) | |
| *Bacillus licheniformis* | - | Stammsammlung TU Lodz (TUL) – Lodz/Polen |
| *Bacillus subtilis* | - | |
| *Bacillus amyloliquefaciens* | - | |

* Risikoklasse 2 Stämme




| Nr. | Stamm |
|---|---|
| 1 | *P. polymyxa* ATCC12321 |
| 2 | *P. polymyxa* DSM 356 |
| 3 | *P. polymyxa* DSM 36 |
| 4 | *B. licheniformis* DSM 8785 |
| 5 | *B. licheniformis* ATCC 9879 |
| 6 | *C. utilis* ATCC 22023 |
| 7 | *K. oxytoca* ATCC 8724 |
| 8 | *K. oxytoca* NRRL B-199 |
| 9 | *K. oxytoca* m5a1 |
| 10 | *Raoultella sp.* (Stamm A) |
| 11 | *E. casseliflavus* 18.3 |
| 12 | *L. sphaericus* 37 |
| 13 | *L. fusiformis* 47 |

**Abbildung 14: Maximale 2,3-BD-Konzentration der untersuchten Stämme auf Screening Medium mit reiner Glucose bzw. Holzhydrolysat (Glucosegehalt jeweils 30 g/L).**

Des Weiteren wurden 12 Mikroorganismen aus Umweltproben stammend vom Steinhuder Meer (in Niedersachsen) isoliert und auf Selektivagarplatten ausplattiert. Als selektive Bestandteile dienten Holzhydrolysat (ca. 12 g/L Glucose), Harnstoff und das Fungizid Amphotericin B. Die Isolate wurden auf Glucose Medium kultiviert und mittels Dünnschichtchromatographie (DC) auf 2,3-BD Bildung untersucht; die 2,3-BD Bildner wurden anschließend auf Holzhydrolysat Medium kultiviert.

6 Isolate haben eine gute 2,3-BD Produktion auf Holzhydrolysat Medium gezeigt und wurden daraufhin durch partielle 16S rDNA-Sequenzierung identifiziert. 2 Isolate konnten der Risikoklasse 1 zugeordnet werden (*Rhodococcus qingshengii*). Im Vergleich zu *B. licheniformis* und *P. polymyxa,* die auf dem Screening Medium 14 g/L 2,3-BD bilden konnten, wurden mit diesem Bakterium jedoch niedrigere Mengen an 2,3-BD erzielt (9,5 g/L). Aus diesem Grund wurden alle weiteren Versuche mit *P. polymyxa* und *B. licheniformis* durchgeführt.

## *Task 2.2: Optimierung der Mikroorganismen durch Mutagenese*

Zur Verbesserung der 2,3-BD Produktion wurden die Klasse 1 – Bakterien *P. polymyxa* ATCC 12321 und *B. licheniformis* DSM 8785 mit UV-Licht bestrahlt. Es sollten Mutanten selektiert werden, die eine geringere Säurebildung (Milch-, Essigsäure) aufweisen.

Die Selektion erfolgte bei *P. polymyxa* mit Hilfe eines pH-Indikators; die von der Literatur empfohlene proton-suicide Methode wurde wegen des Gefährdungspotentials nicht angewandt. Die Kultivierung der Mutanten erfolgte in Mikrotiterplatten und als pH Indikator wurde Bromkresolgrün verwendet, welches einen Farbumschlag im Bereich von pH 6 nach pH 4 von dunkelblau nach gelb aufweist. Das Flüssigmedium zeigte eine dunkelblaue Färbung, da der Anfangs-pH-Wert bei 6,7 liegt. Es wurden 44 Mikroorganismen aus den Wells isoliert, die keinen oder einen schwachen Farbumschlag zeigten. Die Mutanten wurden einem Test auf 2,3-BD Bildung durch DC-Analyse unterzogen, anschließend auf Glucose und Holzhydrolysat Medium kultiviert. Im Vergleich zum Wildtypstamm war die 2,3-BD Produktion der Mutanten auf Glucose Medium jedoch um ca. 2-3 g/L niedriger.

Im Vergleich zu *P. polymyxa* konnten während der Kultivierung von *B. licheniformis* keine großen Veränderungen des pH-Wertes beobachtet werden. Aus diesem Grund erfolgte die Selektion der Mutanten statt durch den Einsatz eines pH-Indikators, mittels DC (qualitative 2,3-BD Bestimmung). Die Kultivierung der Mutanten wurde in Mikrotiterplatten auf Glucose Medium durchgeführt. 59 UV-Mutanten wurden ausgewählt und deren Potential zur 2,3-BD Bildung mit Hilfe der DC untersucht. Die besten 20 Mutanten wurden im Schüttelkolbenmaßstab kultiviert und die maximale 2,3-BD Produktion mit dem Wildtypstamm verglichen (Abbildung 15). Die Produktion der ausgewählten Mutanten erwies sich als vergleichbar zum Wildtyp. Des Weiteren wurden die maximalen 2,3-BD Konzentrationen beim Wildtyp bereits nach 36 h erreicht, bei den Mutanten jedoch erst 4-12 h später. Für *P. polymyxa* und *B. licheniformis* konnten keine besseren Produzenten durch

Zufallsmutagenese mittels UV-Bestrahlung erzielt werden. Für die weiteren Versuche wurde folglich auf den Einsatz der UV-Mutanten verzichtet.

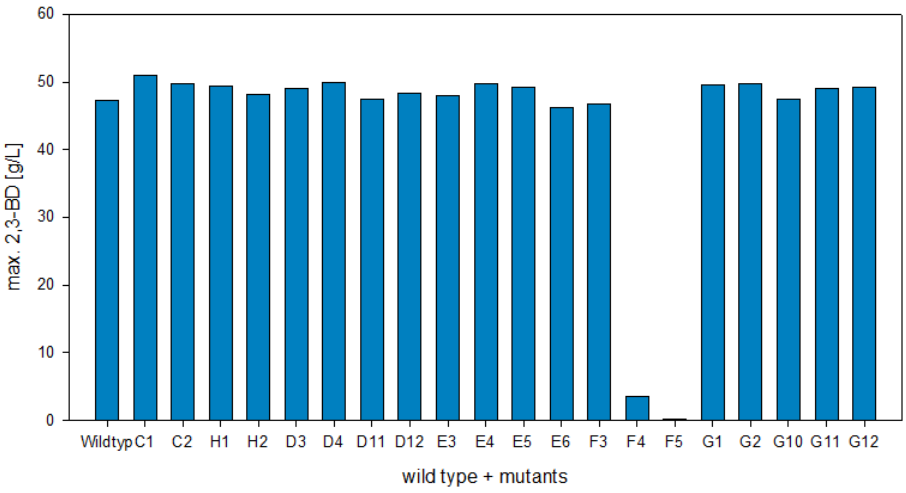



**Abbildung 15: Kultivierung des Wildtypstammes *B. licheniformis* DSM 8785 und der selektierten UV-Mutanten auf Glucose Medium; Vergleich der maximalen 2,3-BD Konzentrationen.**

# WP 3: Optimierung der Fermentationsparameter (TUBS)

## *Task 3.1: Entwicklung und Adaptation der Analytik*

In der Literatur sind unterschiedliche Methoden für den Nachweis von 2,3-BD beschrieben. Die qualitative Bestimmung kann mittels Dünnschichtchromatographie oder kolorimetrischen Tests (Voges-Proskauer; Desnuelle und Naudet) erfolgen. Für den quantitativen Nachweis werden die HPLC- und GC/FID-Analytik empfohlen. Für die quantitativen Untersuchungen wurde die HPLC-Analytik verwendet. Die Komponenten des HPLC-Systems und die Messungsparameter sind in Tabelle 13 aufgelistet. Die Kalibrierung von 2,3-BD erfolgte mit Standardlösungen der drei Stereoisomere des Diols: D-(-)-, L-(+)- und meso-2,3-BD (Abbildung 16). Es wurden jeweils unterschiedliche Konzentrationen im Bereich von 1 bis 20 g/L 2,3-BD vermessen.

**Tabelle 13: Komponente des HPLC-Systems und Messungsparameter**

| | |
|---|---|
| Säule | **Aminex® HPX-87H**; 300 × 7,8 mm (BioRad) |
| Stationäre Phase | Styrene divinylbenzene resin (8% crosslinked; ionic form) |
| Trennungsprinzip | Ionenausschluss + Reversed-Phase |
| Vorsäule | SecurityGuard Cartridge Carbo-H 4 × 3,0 mm (Phenomenex) |
| Laufmittel | 0,005 M $H_2SO_4$ |
| Flussrate | 0,5 mL/min |
| Detektor | Brechungsindexdetektor (RI) |
| Prozessführung | Isokratisch; 60°C (für Glucose) bzw. 25°C (für Saccharose) |
| Probenvolumen | 20 µL |

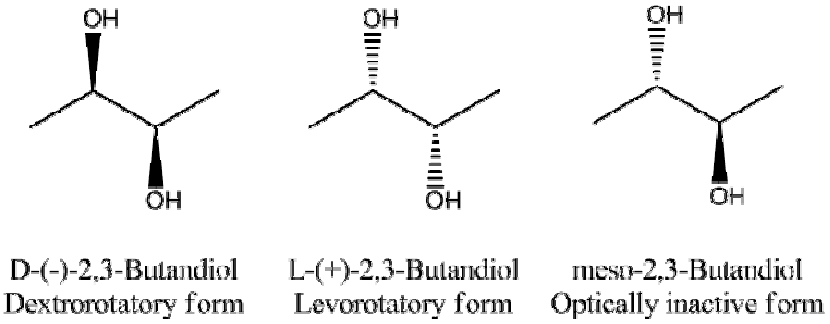



**Abbildung 16: Stereoisomere von 2,3-BD**

Die Aminex HPX-87H Säule besitzt die Fähigkeit, die meso-Form von 2,3-BD von den D- und L-Formen zu unterscheiden. D- und L-2,3-BD können jedoch nicht getrennt werden. Wenn eine Lösung bestehend aus allen 3 Stereoisomeren mittels HPLC untersucht wird, sind im Chromatogramm zwei Peaks ersichtlich: der erste Peak entspricht meso-2,3-BD, der zweite dem Gemisch aus D- und L-2,3-BD (Abbildung 17, links). Unterschiedliche Mikroorganismen produzieren unterschiedliche Stereoisomere von 2,3-BD. *P. polymyxa* bildet nur D-(-)-2,3-BD, *B. licheniformis* hingegen ein Gemisch aus meso- und D-(-)-2,3-BD.

Der Vorteil der HPLC-Methode gegenüber den anderen Nachweismethoden besteht darin, dass außer 2,3-BD auch die als Kohlenstoffquelle verwendeten Zucker (Glucose, Xylose) und die Fermentationsnebenprodukte (Acetoin, Glycerin, Ethanol usw) detektiert werden können. Somit ist eine einzige Messung genügend, um sowohl den Zuckerabbau, als auch die 2,3-BD- und Nebenproduktbildung während einer Kultivierung aufzuzeichnen. In Abbildung 17 (rechts) ist beispielsweise ein Chromatogramm von Standardlösungen von 2,3-BD und ausgewählten Fermentationsnebenprodukten dargestellt.

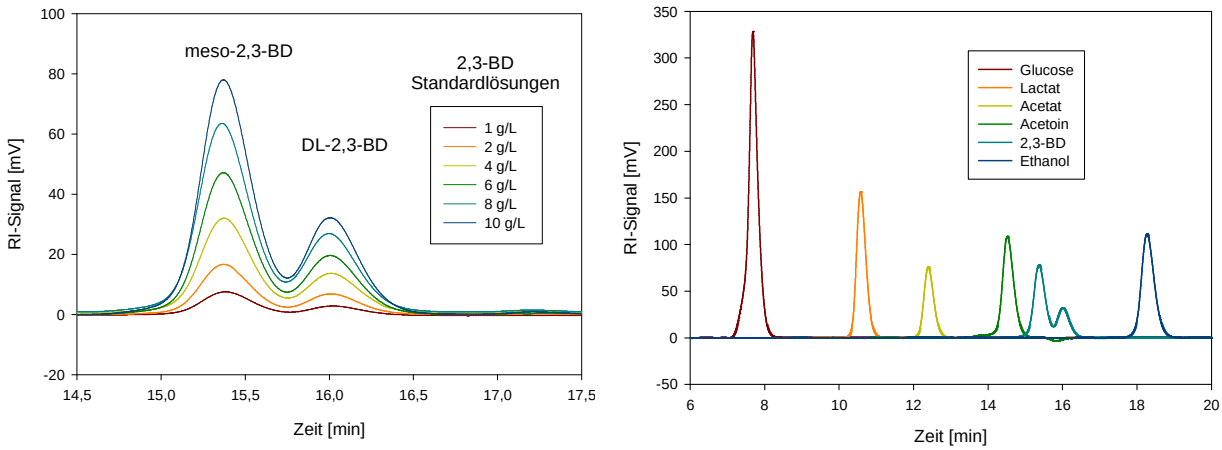



**Abbildung 17: Chromatogramm einer HPLC-Messung von 2,3-BD Standardlösungen (links) bzw. Standardlösungen von 2,3-BD und ausgewählten Fermentationsnebenprodukten (rechts).**

Für die Kultivierungen auf Saccharose musste die HPLC-Analytik erneut adaptiert werden. Unter den Standard-Messbedingungen (60°C Säulentemperatur, 0,5 mL/min Flussrate des Laufmittels) konnte wegen der schlechten Trennung der Zucker keine genaue Messung der Zuckergehalte durchgeführt werden (Abbildung 18, oben). Die Säulentemperatur musste auf 25°C und die Flussrate des Laufmittels auf 0,4 mL/min gesenkt werden, um eine gute Trennung der Zucker (Saccharose, Glucose und Fructose) zu gewährleisten. Unter diesen Bedingungen erfolgte allerdings eine Überlappung des Acetoinpeaks mit dem D-2,3-BD Peak (Abbildung 18, unten). Aus diesem Grund mussten bei den Kultivierungen auf Saccharose zwei getrennte HPLC-Messungen erfolgen: eine für die Zucker und eine für die Fermentationsprodukte.

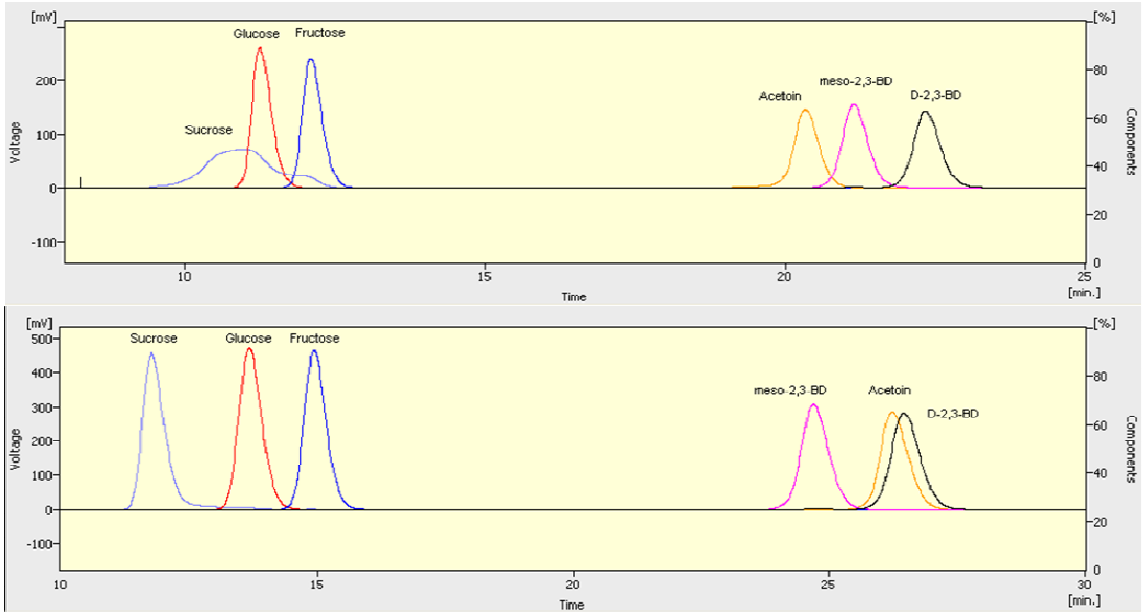



**Abbildung 18: Chromatogramm einer HPLC-Messung von Standardlösungen von Saccharose, Glucose, Fructose, Acetoin und 2,3-BD bei 60°C und 0,5 mL/min (oben) bzw. 25°C und 0,4 mL/min Flussrate des Laufmittels (unten).**

## *Task 3.2: Optimierung der Fermentationsmedien*

Zur Medienoptimierung wurden unterschiedliche reine Zucker (Glucose, Xylose, Saccharose) in verschiedenen Konzentrationen sowie Holzhydrolysat als C-Quelle eingesetzt. Die Versuche wurden in 500 mL Schüttelkolben mit 100 mL Arbeitsvolumen durchgeführt. Abbildung 19 zeigt exemplarisch die erzielten maximalen 2,3-BD Konzentrationen bei der Kultivierung von *P. polymyxa* DSM 36 auf Glucose bzw. Xylose Medium bei unterschiedlichen Schüttelgeschwindigkeiten.

Die beste 2,3-BD Produktion (17 g/L) wurde bei der Kultivierung mit 60 g/L Glucose und 150 rpm erreicht. Niedrigere Schüttelfrequenzen sowie die Verwendung von Xylose als C-Quelle führten zu geringeren 2,3-BD Konzentrationen.

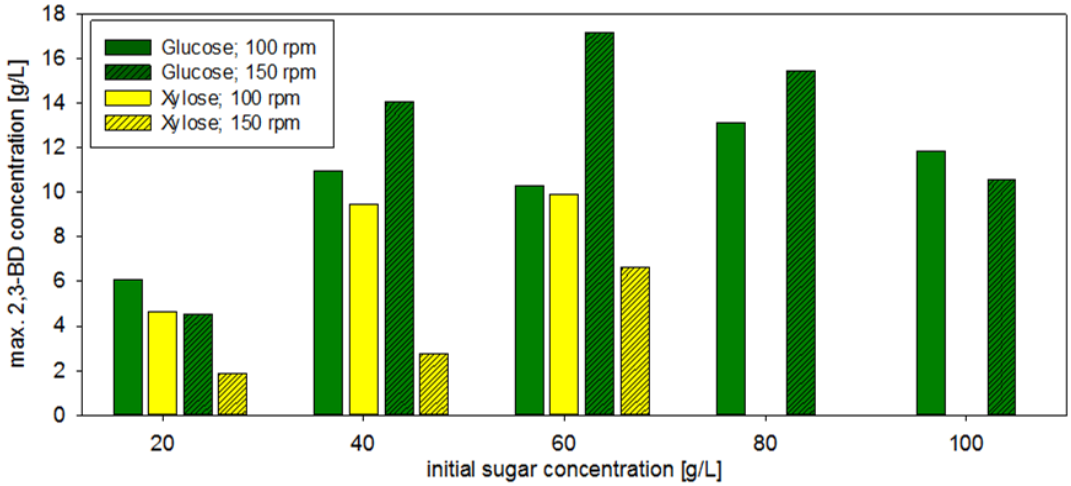



**Abbildung 19: Vergleich der 2,3-BD Produktion von *P. polymyxa* DSM 36 auf Medium mit 20-100 g/L Glucose bzw. Xylose bei 30°C und 100 bzw. 150 rpm; Inkubationszeit: 10-50 h.**

Für *B. licheniformis* DSM 8785 wurde eine Optimierung der Anfangskonzentration an Glucose bzw. Saccharose im Bereich von 20 bis 300 g/L durchgeführt. Die Ergebnisse wurden hinsichtlich maximaler 2,3-BD Produktion, Ausbeute und Produktivität untereinander verglichen. Bei der Kultivierung auf 180 g/L Glucose (Abbildung 20links) konnten 73,7 g/L 2,3-BD erzielt werden, eine Ausbeute von 0,42 g/g und eine Produktivität von 0,86 g/L. Aus 260 g/L Saccharose (Abbildung 20 rechts) wurden 77 g/L 2,3-BD gebildet, die Ausbeute betrug 0,30 g/g, und die Produktivität 0,75 g/Lh.

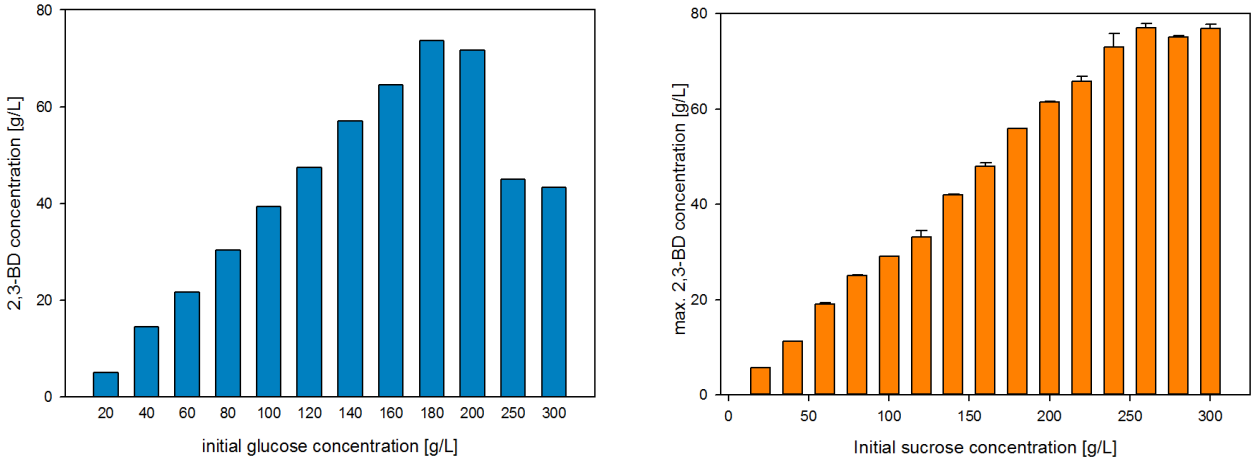



**Abbildung 20: Vergleich der maximalen 2,3-BD Produktion von *B. licheniformis* DSM 8785 auf Medium mit 20-300 g/L Glucose (links) bzw. Saccharose (rechts) bei 30°C, 100 rpm und 16,5-132,5 h.**

Im Kultivierungsmedium für *P. polymyxa* und *B. licheniformis* sind komplexe Mediumsbestandteile enthalten. Dabei handelt es sich um Hefeextrakt (HE) und Trypton (T), mit Konzentrationen von jeweils 5 g/L. Da diese Bestandteile teuer sind, würde eine Reduzierung der eingesetzten Konzentrationen zu einer deutlichen Kostenreduzierung für das Medium führen, was für einen späteren industriellen Prozess sehr wichtig ist. Experimente wurden durchgeführt, bei denen die Konzentration beider Komponenten gleichzeitig oder getrennt reduziert wurde. Die Ergebnisse

wurden hinsichtlich der 2,3-BD Bildung verglichen (Abbildung 21). Eine geringere Konzentration an HE und/oder T im Medium führte jedoch zu einer niedrigeren 2,3-BD Produktion.

Eine weitere Kostenreduzierung für das Medium könnte erreicht werden, indem die enthaltene Phosphatmenge verringert wird. Die im Medium enthaltenen Mengen an $K_2HPO_4$ und $KH_2PO_4$ wurden auf jeweils ¾, ½ und ¼ reduziert. In der 2,3-BD Produktion konnten keine signifikanten Unterschiede (> 4 g/L) erkannt werden.

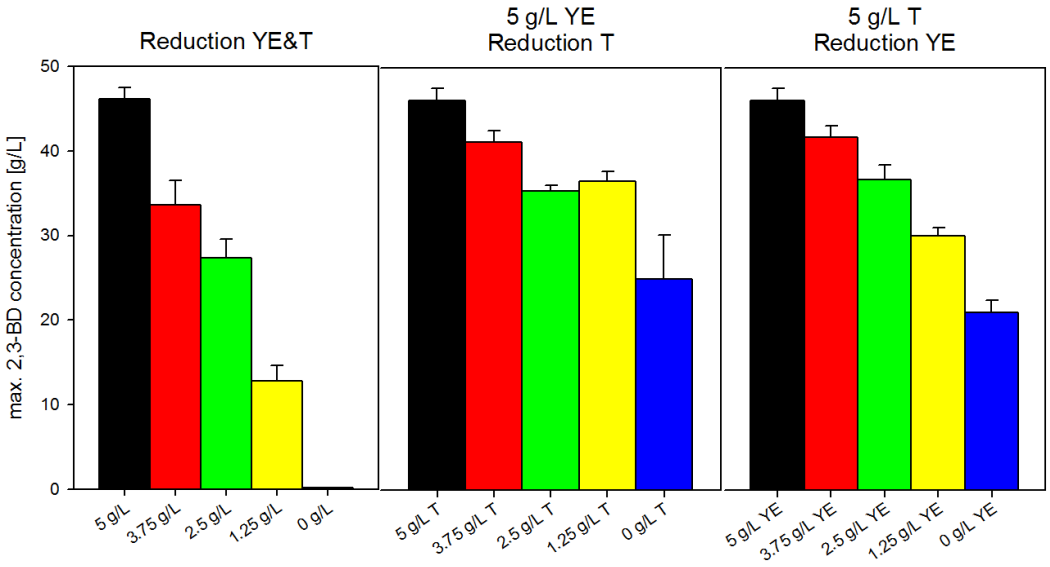



**Abbildung 21: Vergleich der 2,3-BD Produktion von *B. licheniformis* auf Medium mit 120 g/L Glucose bei 30°C und 100 rpm: (links) gleichzeitige Reduktion von HE und T; (Mitte) 5 g/L T; Reduktion von HE; (rechts) 5 g/L HE; Reduktion von T.**

## *Task 3.3: Optimierung der Fermentationsparameter für freie und immobilisierte Zellen*

a) Schüttelkolbenmaßstab

Eine klassische Optimierung der Kultivierungsparameter erfolgte durch Veränderung eines Parameters, während alle anderen konstant gehalten wurden. Dies wurde hinsichtlich optimaler Werte für Temperatur und Schüttelgeschwindigkeit für *B. licheniformis* DSM 8785 durchgeführt. Die beste 2,3-BD Produktion (73,7 g/L) in einer batch Kultivierung wurde, wie schon zuvor gezeigt, auf 180 g/L Glucose (Schüttelkolben Maßstab) mit *B. licheniformis* DSM 8785 bei 30°C und 100 rpm erreicht (Abbildung 20, links).

Mit diesen Parametern und der optimalen Anfangsglucosekonzentration von 180 g/L wurden Fed-Batch Versuche durchgeführt. Es wurde eine Kombination aus Glucose und allen anderen

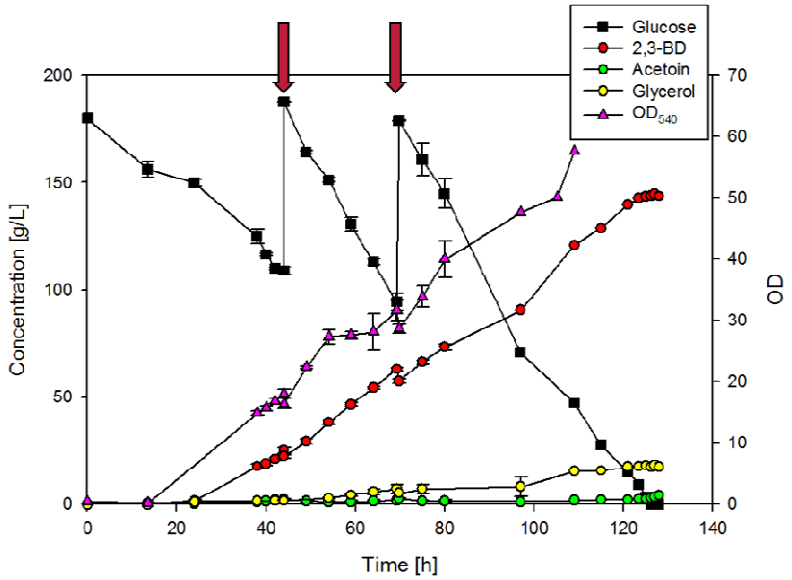
Mediumsbestandteilen in fester Form (unsteril) zugefüttert. Drei Zufütterungsstrategien wurden getestet:

(A) Zufütterung von 2x90 g/L Glucose bei 90 g/L Restglucose;

(B) Zufütterung von 2x105 g/L Glucose bei 75 g/L Restglucose;

(C) Zufütterung von 2x120 g/L Glucose bei 60 g/L Restglucose.

Abbildung 22 zeigt exemplarisch den Kultivierungsverlauf für die erfolgreichste Strategie (A), bei der eine maximale 2,3-BD Konzentration von 144,7 g/L erreicht wurde. Die Strategien (B) und (C) führten zu geringeren 2,3-BD Mengen sowie Ausbeuten und Produktivitäten.




| Parameters: |
|---|
| • Glucose: 180 + 2*90 g/L |
| • 30 °C |
| • 100 rpm |

| Results (after 127 h) | |
|---|---|
| 2,3-BD [g/L] | 144.8 |
| Acetoin [g/L] | 3.2 |
| Glycerol [g/L] | 18.2 |
| 2,3-BD Yield [g/g] | **0.40** |
| Productivity [g/Lh] | **1.14** |

**Abbildung 22: Fed-Batch Kultivierung von *B. licheniformis* DSM 8785 auf Medium mit 180 g/L Glucose; zweifache Zufütterung von jeweils 90 g/L Glucose und Mediumbestandteilen.**

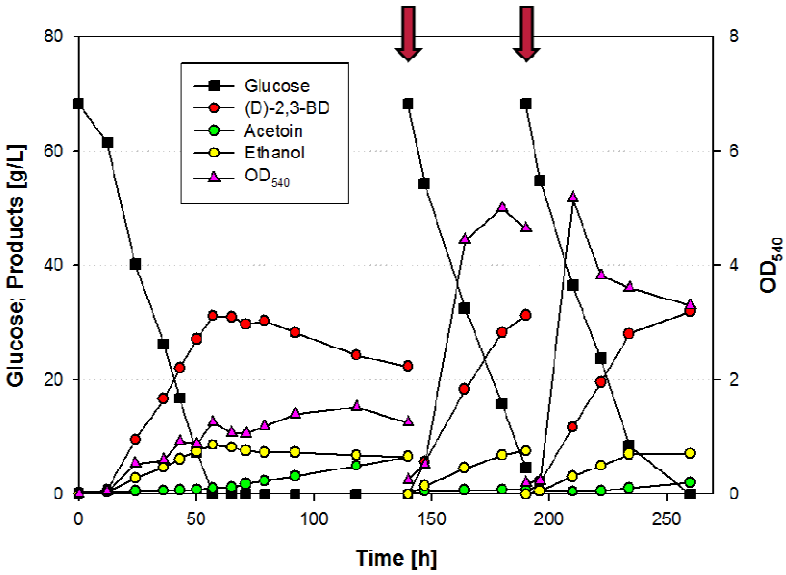
Für *P. polymyxa* ATCC 12321 erfolgte eine Parameteroptimierung mittels CCD (Central Composite Design) mit der Software Minitab® 15. Hier wurden aus einer Reihe von experimentellen Versuchen die optimalen Werte für Glucose, Temperatur und Schüttelgeschwindigkeit ausgerechnet. Die dabei berechnete 2,3-BD Konzentration wurde anschließend experimentell bestätigt (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Berechnete optimale Parameter für die Kultivierung von *P. polymyxa* ATCC 12321 (links); Vergleich zwischen berechneter und gemessener 2,3-BD Konzentration bei Kultivierung unter den angegebenen Parametern (rechts).**

| Parameter | Wert |
|---|---|
| Glucose [g/L] | 68,18 |
| Temperatur [°C] | 25 |
| Schüttelgeschwindigkeit [rpm] | 80,3 |

| Methode | 2,3-Butandiol [g/L] |
|---|---|
| Berechnet | 23,39 |
| Gemessen | 24,35 |

Zusätzlich zu den Versuchen mit freien Zellen wurden auch Experimente mit immobilisierten Zellen durchgeführt. Die LentiKats® Immobilisierungen wurden vom Projektpartner vTIBS, die Immobilisierungen in Alginat von SZ durchgeführt. Durch Immobilisierung können die Biokatalysatoren von der Kultursuspension einfacher abgetrennt, sowie nach einem Waschschritt erneut für Kultivierungen eingesetzt werden. Abbildung 23 stellt eine repeated batch Kultivierung mit immobilisiertem *P. polymyxa* ATCC 12321 (LentiKats®) dar, wobei die Immobilisate zweifach auf neuem Medium übertragen wurden und erneut zu hohen 2,3-BD Konzentrationen führten.




**Parameters:**

- 68 g/L Glucose
- 25 °C
- 80 rpm

| Results (after 50-60 h) | |
|---|---|
| 2,3-BD [g/L] | ~ 31 |
| Acetoin [g/L] | 0.8-2 |
| Ethanol [g/L] | 6-8 |
| 2,3-BD Yield [g/g] | 0.47 |
| Productivity [g/Lh] | 0.5-0.6 |

**Abbildung 23: Repeated batch Kultivierung von in LentiKats® immobilisiertem *P. polymyxa* ATCC 12321 auf Medium mit 68 g/L Glucose; zweifacher Mediumwechsel.**

b) 3,5 L Bioreaktormaßstab

Nach der Optimierung der Kultivierungsbedingungen im Schüttelkolbenmaßstab erfolgte ein Scale-Up der Experimente in den 3,5 L Bioreaktormaßstab. Dabei wurde ein künstliches Holzhydrolysat Medium hergestellt, basierend auf der Zuckerzusammensetzung der vom vTIHH produzierten Holzhydrolysate, und für die Kultivierungen verwendet. Potentiell inhibierende Verbindungen (Furane, phenolische Substanzen und organische Säuren) wurden nicht zugesetzt.

Für die Bioreaktorkultivierung stellte sich die Regulierung der Sauerstoffversorgung als besonders schwierig heraus, da die optimalen Werte für die Schüttelfrequenz aus den Schüttelkolbenversuchen nicht direkt für die Einstellung der Rührerdrehzahl übernommen werden konnten. Weiterhin ist eine genaue Einstellung des $pO_2$-Wertes für die mikrobielle Herstellung von 2,3-BD äußerst wichtig, da sowohl Vorversuche, als auch Daten aus der Literatur darauf hinweisen, dass eine bestimmte, sehr geringe Gelöst-Sauerstoff-Konzentration in der Kultur zu einer deutlichen Steigerung der 2,3-BD Ausbeute führt. Dies bestätigt auch der in Abb. 11 dargestellte Vergleich der Kultivierungsverläufe für eine aerobe und mikroaerobe Kultivierung von *P. polymyxa* DSM 36 im 3,5 L Bioreaktor. Unter aeroben Bedingungen (Abbildung 24, links) wurde der $pO_2$-Wert durch automatische Steigerung der

Rührerdrehzahl auf ca. 10% gehalten, was zu einer gesteigerten Produktion von Acetoin führte. Hingegen war unter mikroaeroben Bedingungen das Hauptprodukt 2,3-BD (Abbildung 24, rechts). Hier sank der $pO_2$-Wert direkt nach Inokulieren des Mediums auf einen Wert nahe 0, der mit den verwendeten amperometrischen Sensoren nicht gemessen werden konnte.

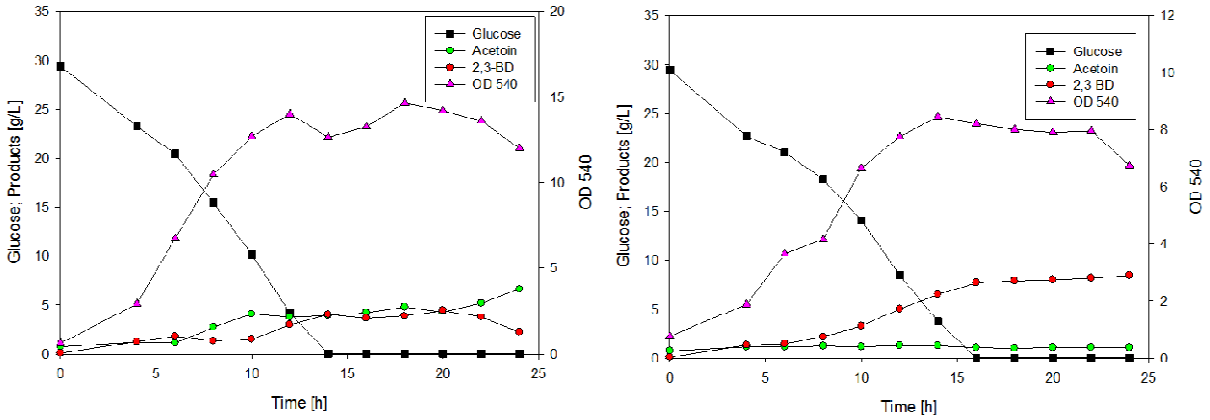



**Abbildung 24: Kultivierungsverlauf von *P. polymyxa* DSM 36 im 3,5 L Bioreaktor: 2,8 L Medium (35 g/L Glucose), 30 °C, Belüftung 1,2 L/min. (links) aerobe Bedingungen: automatische Regelung der Rührerdrehzahl, $pO_2$≥10%; (rechts) mikroaerobe Bedingungen: 250 rpm, $pO_2$ nicht geregelt.**

Um niedrige $pO_2$-Werte besser einstellen und messen zu können, wurden die amperometrischen $pO_2$-Sensoren durch optische Sensoren ersetzt, die im mikroaeroben Bereich eine erhöhte Genauigkeit aufweisen. Um den optimalen Sauerstoffpartialdruck für die 2,3-BD Bildung zu finden wurden die Belüftungsrate und die Rührerdrehzahl variiert. Eine Rührergeschwindigkeit von 400 rpm und eine Belüftungsrate von 1,2 L/(L·min) bzw. 3,6 L/min erwiesen sich für beide Stämme als optimal. In Batch Kultivierungen mit diesen Parametern konnten die Ergebnisse aus dem Schüttelkolbenmaßstab reproduziert werden. Mit *B. licheniformis* wurde eine 2,3-BD Konzentration von 47,6 g/L 2,3-BD (von 120 g/L Glucose) erreicht (

Tabelle **15**a).

Nachdem die Fermentationsparameter auf künstlichem Holzhydrolysatmedium optimiert wurden, wurde als Vergleich auch das natürliche Holzhydrolysat (vom Partner vTIHH) als Substrat für Bioreaktorkultivierungen eingesetzt. Die Ergebnisse der Batch Kultivierung mit *B. licheniformis* im 3,5 L Bioreaktormaßstab auf natürlichem Holzhydrolysat (ca. 100 g/L Glucose enthalten) sind in

Tabelle **15**(b) zusammengefasst. Eine 2,3-BD Konzentration von 36.1 g/L wurde erreicht, mit einer Ausbeute von 0,36 g/g Glucose.

Der Fed-Batch Kultivierungsmodus führte bei *B. licheniformis* zu einer Verbesserung der 2,3-BD Produktion.

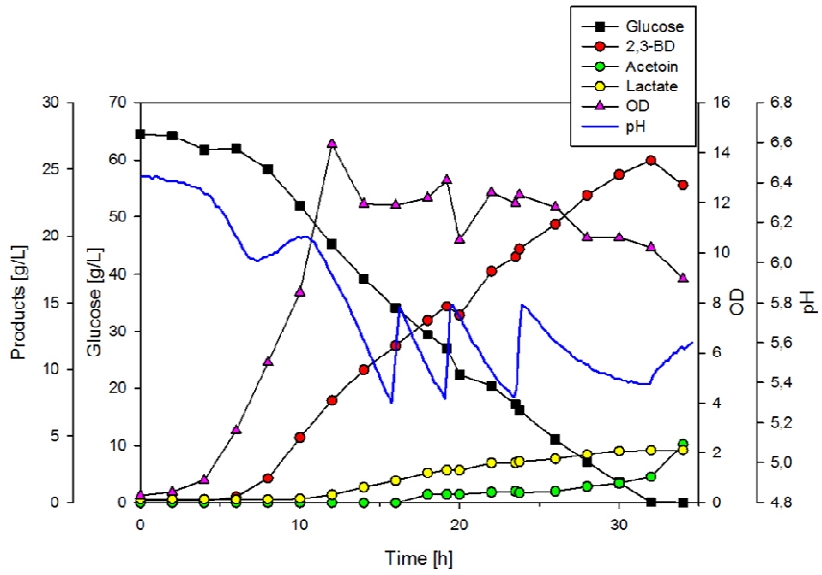
Tabelle **15**(c) zeigt die Ergebnisse der erfolgreichsten Zufütterungsstrategie. Die Kultivierung wurde mit 120 g/L Glucose begonnen und es erfolgte eine 5fache Zufütterung von jeweils 45 g/L Glucose

und allen Mediumbestandteilen, bei einer Restglucose von 75 g/L. Die somit erreichte 2,3-BD Konzentration betrug 127,4 g/L, mit einer Produktivität von 1,05 g/(L·h).

**Tabelle 15: Ergebnisse der 3,5 L Bioreaktor Kultivierungen von *B. licheniformis* DSM 8785:**
**(a) Batch Kultivierung auf künstlichem Holzhydrolysat mit 120 g/L Glucose**
**(b) Batch Kultivierung auf natürlichem Holzhydrolysat mit 100,6 g/L Glucose**
**(c) Fed-Batch Kultivierung mit bester Zufütterungsstrategie (120+5*45 g/L Glucose).**

| Ergebnisse | a) 56 h | b) 70 h | c) 113 h |
|---|---|---|---|
| 2,3-BD [g/L] | 47,6 | 36,1 | **127,4** |
| Acetoin [g/L] | 7,1 | 1,5 | 2,3 |
| Glycerin [g/L] | 4,3 | 5,3 | 30 |
| Ausbeute [g/g] | **0,40** | 0,36 | 0,37 |
| Produktivität [g/L·h] | 0,85 | 0,52 | **1,05** |

Basierend auf Daten aus der Literatur, wurden für *P. polymyxa* Batch Kultivierungen mit erzwungenen pH-Shifts ausgeführt. Nachdem der pH-Wert auf einem bestimmten Level gesunken war, wurde er durch Zugabe von NaOH um 0,5 bzw. 1 pH-Einheit erhöht. Ein erzwungener pH-Shift von 5,3 auf 5,8 erwies sich als optimal. In diesem Fall konnte die Kultivierungsdauer um ca. 6 h verkürzt und die Produktivität auf einen Wert von 0,80 g/(L·h) erhöht werden (Abbildung 25).




**Parameters:**
- 68 g/L Glucose
- 30 °C
- 400 rpm
- Aeration rate: **3.6 L/min**

| Results (after 32 h) | |
|---|---|
| 2,3-BD [g/L] | **25.7** |
| Acetoin [g/L] | 1.94 |
| Lactate [g/L] | 3.93 |
| Yield [g/g] | **0.38** |
| Productivity [g/(L·h)] | **0.80** |

**Abbildung 25: Verlauf der Kultivierung von *P. polymyxa* ATCC12321 im 3,5 L Bioreaktor: 2,8 L Medium (68 g/L Glucose), 30°C, 400 rpm, Belüftung: 1.2 L/(L·min), pH-Shift: 5,3 auf 5,8.**

Die Durchführung von Fed-Batch Versuchen ermöglichte eine Steigerung der maximalen 2,3-BD Konzentration für *P. polymyxa* von 25,3 auf 44,5 g/L. Die Anfangsglucosekonzentration betrug dabei 68 g/L und eine zweifache Zufütterung von jeweils 38 g/L Glucose und allen Mediumbestandteilen wurde vorgenommen. Die 2,3-BD Ausbeute wurde dabei von 0,37 auf 0,43 g/g Glucose erhöht.

# WP 4: Immobilisierung, Prozessentwicklung und Maßstabsvergrößerung (TUBS, vTIBS, SZ)

## *Task 4.1: Entwicklung geeigneter Immobilisierungsmaterialien und –methoden*

### Alginatkugelherstellung durch Sprühen (SZ):

Im Rahmen diese Arbeitspakets erhielt Südzucker von der Technische Universität Braunschweig einen vielversprechenden, nicht pathogenen Bakterienstamm, *Bacillus licheniformis*, der in der Lage ist, durch sog. fedbatch-Fermentation aus Glucose bis zu 100 g/L 2,3-Butandiol (2,3-BD) zu synthetisieren. Im Antrag waren als Immobilisierungsmatrices Polyvinylalkohol, Polymethacrylat, Carrageenan und Alginat genannt. Südzucker besitzt langjährige Erfahrungen auf dem Gebiet der Immobilisierung von Mikroorganismen in Alginat. Da dieses Verfahren für die Herstellung von Lebensmitteln genutzt wird, wurde beschlossen, die Immobilisierung von *Bacillus licheniformis* in Calcium-Alginat zu testen. Der Vorteil des Verfahrens liegt darin, sog. fed batch oder kontinuierliche Fermentationen ohne signifikanten Biomasseverlust durchführen zu können. Nachteilig bei der Verwendung von Calciumalginat-Kugeln ist die limitierte Diffusion von Substrat in die Kugeln hinein bzw. von Dissimilationsprodukten aus dem Inneren der Alginat-Kugeln hinaus in den löslichen Überstand. Umgangen wurde dieser Nachteil durch Wahl der richtigen Kugelgröße – groß genug um die Stabilität der Alginat-Kugeln zu gewährleisten, aber auch klein genug, die Diffusionsrate hoch genug zu halten. Der mittlere Durchmesser der Alginat-Kugeln lag bei etwa 1 mm (Abbildung 26).

Die Produktion von 2,3-Butandiol aus Kohlenhydraten mit in Alginat immobilisierter Biomasse muss unter sterilen Bedingungen erfolgen. Diese Expertise ist bei Südzucker sowohl im Labor- als auch im Produktionsmaßstab vorhanden.

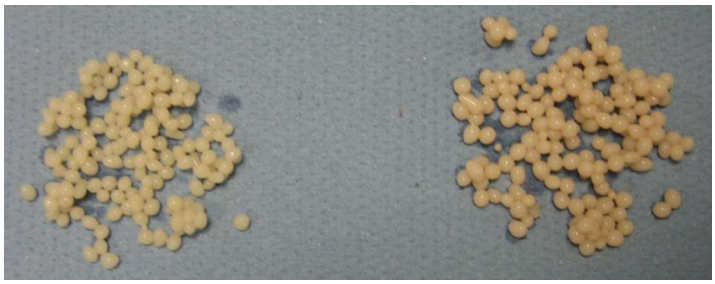


**Abbildung 26: Alginat Kugeln**

### Alginatkugelherstellung mit der Abtropfapparatur mittels Druckluft (vTIBS)

Alginat sowie ein PEG/PVA Gemisch wurde in den Abblaskopf der Abtropfapparatur eingefüllt. Mit Hilfe des seitlichen (0,15 bar) und oberen (0,2 bar) Abblasdruckes wurde das Alginat durch die Kanüle in die 2%ige $CaCl_2$-Lösung (w/w), bzw. das PVA/PEG Gemisch in ein Wasser/PEG1000-Gemisch (50%/50%) eingetropft (Abbildung 27). Größe und Form der Kugeln konnten durch die Änderung des seitlichen Abblasdruckes und der Höhe eingestellt werden.

Mit der Abtropfapparatur mittels Druckluft wurden Kugeln mit einem Durchmesser von ungefähr 1 mm produziert, wobei die Größe durch den seitlichen Abblasdruck und dem Abstand verändert werden kann.

**Abbildung 27: Kugelherstellung aus Alginat und PVA/PEG mit der Abtropfapparatur mittels Druckluft.**

## Einsatz von in Alginat immobilisiertem *Bacillus licheniformis*

Im Labormaßstab wurden 1 kg/h einer Suspension von *Bacillus licheniformis* in Natriumalginat in eine Lösung bestehend aus Calciumacetat hinein gesprüht. Nach Aushärtung der Kugeln wurden diese steril in ein Medium überführt, das neben anderen Komponenten Glucose, Hefeextrakt und Phosphat enthielt. Die erste Batchkultur mit 30 g/L Glucose in Schüttelkolben verlief ohne Probleme und 12,8 g/L 2,3-BD wurden gebildet. Aufgrund des vergleichsweise hohen Phosphatgehalts jedoch wurde das Gegenion Calcium aus dem Calciumalginat herausgelöst und die Calciumalginat-Kugeln fielen nach einigen Tagen auseinander. Daraufhin wurden Versuche angestellt, den Phosphatgehalt im Medium um 50 % zu erniedrigen und die Konzentration der $Ca^{2+}$-Ionen im Medium zu erhöhen. Dieses Vorgehen erhöhte zwar die Lebenszeit der Alginat-Kugeln, dennoch konnte das vorzeitige Auflösen der Kugeln nicht verhindert werden. Da *Bacillus licheniformis* jedoch eine Phosphatquelle für das Wachstum benötigt, ist die Immobilisierung des Bakteriums in Calciumalginat für die Synthese von 2,3-BD ungeeignet.

Zusätzlich zu den Schüttelkolbenversuchen wurden in Calciumalginat immobilisierte *B. licheniformis* Zellen in eine Säule überführt und ihnen Glucose haltiges Medium angeboten. Hier konnte zwar eine

geringe 2,3-BD-Bildung beobachtet werden, die Bedingungen waren jedoch zu anaerob. Somit ist ein solches Produktionsverfahren von 2,3-BD ebenfalls nicht geeignet.

Aufgrund dieser Ergebnisse musste im Projekt auf eine andere Immobilisierungstechnik zurückgegriffen werden, die jedoch nicht bei Südzucker sondern am vTI in Braunschweig etabliert ist (Immobilisierung der Zellen in Polyvinyl-alcohol (PVA) wie zum Beispiel LentiKats®). Ein scale up der Immobilisierung (task 4.2) war somit bei Südzucker nicht erforderlich.

## LentiKats® (vTIBS):

Es wurde eine gebrauchsfertige Lösung (LentiKat®-Liquid und – Stabilizer) der Firma geniaLab verwendet. Das geschmolzene LentiKat®-Liquid wurde mittels LentiKat®-Printer zu linsenförmigen LentiKats® verarbeitet (Abbildung 28).

**Abbildung 28: links: LentiKat®-Printer, -Liquid und –Stabilizer; rechts: frisch geprintete LentiKats® (Foto / Stereolupe).**

Die LentiKats® wurden bis zu einer Restfeuchte von 30% getrocknet. Die Restfeuchte wurde mittels Gewichtsdifferenz zwischen den frisch hergestellten Immobilisaten und den zu trocknenden Immobilisaten bestimmt. Nach Erreichen von der Restfeuchte von 28%, wurden die LentiKats® für mindestens 2 Stunden in der LentiKat®-Stabilizer Lösung gehärtet.

## *Task 4.2: Maßstabsvergrößerung der Immobilisierung (vTIBS, SZ)*

Die im Task 4.2 beschriebenen Aufgaben beinhalten die Immobilisierung eines potentiell geeigneten Mikroorganismus, der 2,3-Butandiol in größeren Konzentrationen produzieren kann. Das Immobilisat soll anschließend an den Partner zurückgesandt werden, um es dort Fermentationsversuchen zu unterziehen. Bevor diese Versuche jedoch initiiert werden, musste zunächst im Labormaßstab verifiziert werden, ob sich ein geeigneter Mikroorganismus unbeschadet immobilisieren lässt bzw. ob das Immobilisat über einen längeren Zeitraum aktiv ist.

Das vTI Braunschweig erhielt vom Projektpartner TU BS zwei Mikroorganismen, *P. polymyxa* ATCC 12321 sowie *B. licheniformis* DSM 8785, die bei Fermentationen im Schüttelkolbenmaßstab als freie

Zellen sehr gute 2,3-BD Produktionen zeigen (Tabelle 12). Die Vorkultur wurde von der TU BS zur Verfügung gestellt, sodass das vTI ausgehend von diesen Vorkulturen die Immobilisate in Form von LentiKats® herstellen konnte (Abbildung 29).

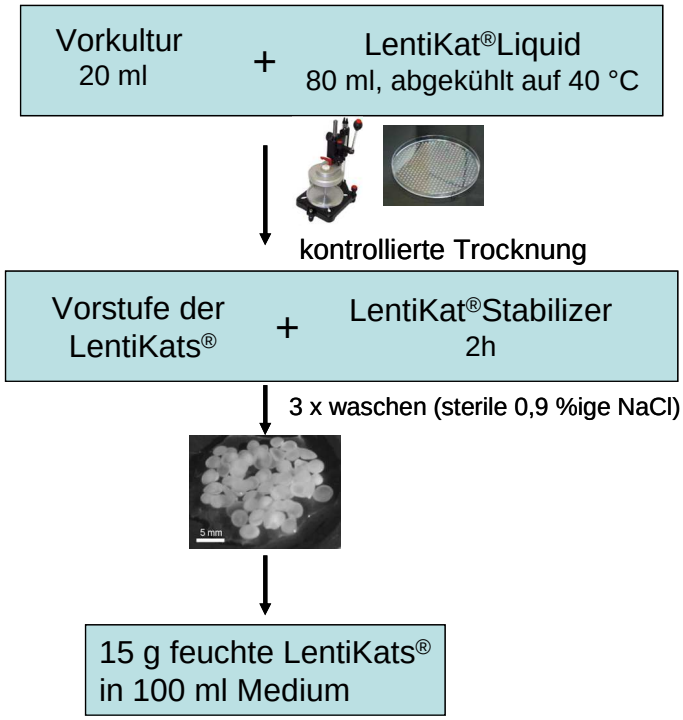



**Abbildung 29: Herstellungsschema der LentiKats**

Kultiviert wurden die immobilisierten Zellen mit dem gleichen Medium und unter vergleichbaren Bedingungen wie die freien Zellen von der TU BS. So wurden die Versuche mit den Immobilisaten in 500 ml Schüttelkolben mit 3 Schikanen, 100 mL Kultivierungsmedium, 100 Upm (50 mm Auslenkung) bei 33 °C und 100 g/L (*B. licheniformis* DSM 8785) bzw. 60 g/L (*P. polymyxa* ATCC 12321) Glucose durchgeführt.

In den folgenden Versuchen wird untersucht, in wie fern diese beiden ausgewählten Stämme nach der Immbobilisierungsprozedur (Abbildung 29) aktiv sind und auch nach mehrmaligen Medienwechsel eine gute Aktivität aufweisen.

Der Stamm *P. polymyxa* ATCC 12321 wurde mit 60 g/L Glucose gestartet, welche innerhalb von 24 h vollständig verbraucht wurden und 19 g/L 2,3-BD sowie 2 g/L Acetoin gebildet wurden (Abbildung 30). Trotz mehrfacher Lagerung bei 4 °C (während folgender Versuchszeiten: 24 - 93 h; 192 – 260 h; 360 – 428 h) und 5 fachen Medienwechsel produzierten die Immobilisate nach jedem Medienwechsel innerhalb von 24 h zwischen 15-20 g/L 2,3-BD. Es traten keine Probleme hinsichtlich Kontamination oder Aktivitätseinbußen auf. Jedoch konnte trotz vorhandener Glucose in den

Versuchsansätzen nach dem 3. Medienwechsel keine weiterführende 2,3-BD Produktion erzielt werden, es setzte lediglich eine erhöhte Acetoinproduktion ein.

Somit wurde gezeigt, dass dieser Stamm immobilisiert in Form von LentiKats® sehr gute Eigenschaften zeigt und somit für weitere Forschungen und Optimierungen dem Projektpartner TU BS zur Verfügung gestellt (Abbildung 23), wobei die Parameter der Kultivierung so gewählt wurden, dass sie den theoretisch berechneten optimalen Bedingungen entsprachen (Tabelle 14).

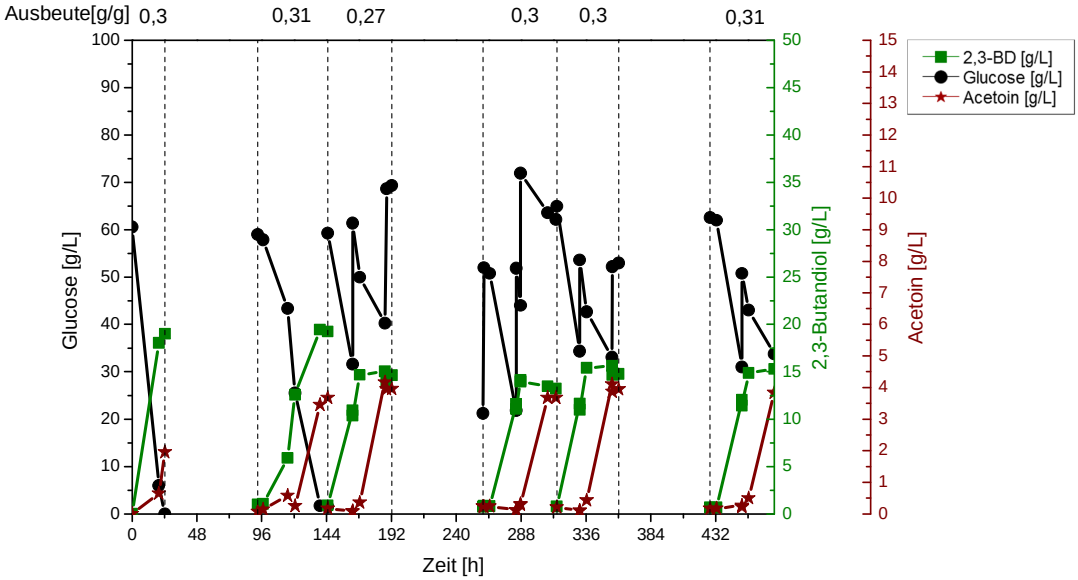



**Abbildung 30: Repeated batch Kultivierung von in LentiKats® immobilisiertem *P. polymyxa* ATCC 12321 auf Medium mit 60 g/L Glucose; 5 facher Mediumwechsel.**

Das vTI Braunschweig untersuchte weiterhin die Immobilisierung mit PVA in Form von LentiKats® mit dem Stamm *B. licheniformis* DSM 8785, da dieser Stamm bei Fermentationen im Schüttelkolbenmaßstab als freie Zellen sehr gute 2,3-BD Produktionen zeigte (Abbildung 20). Kultiviert wurden die immobilisierten Zellen mit dem gleichen Medium und unter vergleichbaren Bedingungen wie die freien Zellen von der TU BS. So wurden die Versuche mit den Immobilisaten in 500 ml Schüttelkolben mit 3 Schikanen, 100 mL Kultivierungsmedium, 100 Upm (50 mm Auslenkung) und 33 °C durchgeführt.

Die Fermentation mit dem immobilisierten *B. licheniformis* DSM 8785 wurde mit einer Glucoseanfangskonzentration von 180 g/L gestartet (Abbildung 31). Eine Glucoselimitierung muss vermieden werden, da dieser Stamm infolge einer Glucoselimitierung die 2,3-BD Produktion einstellt und auch nach einem Medienwechsel bzw. einer Glucosezugabe nicht mit einer erneuten 2,3-BD-Produktion beginnt, wodurch erhebliche Aktivitätsverluste auftreten. Aus diesem Grund wurde durch eine tägliche Substratzudosage einer Limitierung entgegen gewirkt. Trotz Lagerung bei 4 °C für 3 Tage und Medienwechsel haben die Immobilisate im dritten Ansatz nach 103 h 125 g/L 2,3-BD mit

einer Ausbeute von 0,37 g/g und einer Produktivität von 1,21 g/(Lh) erreicht was mit den Ergebnissen der TU BS mit freien Zellen sehr gut korreliert (Abbildung 22).

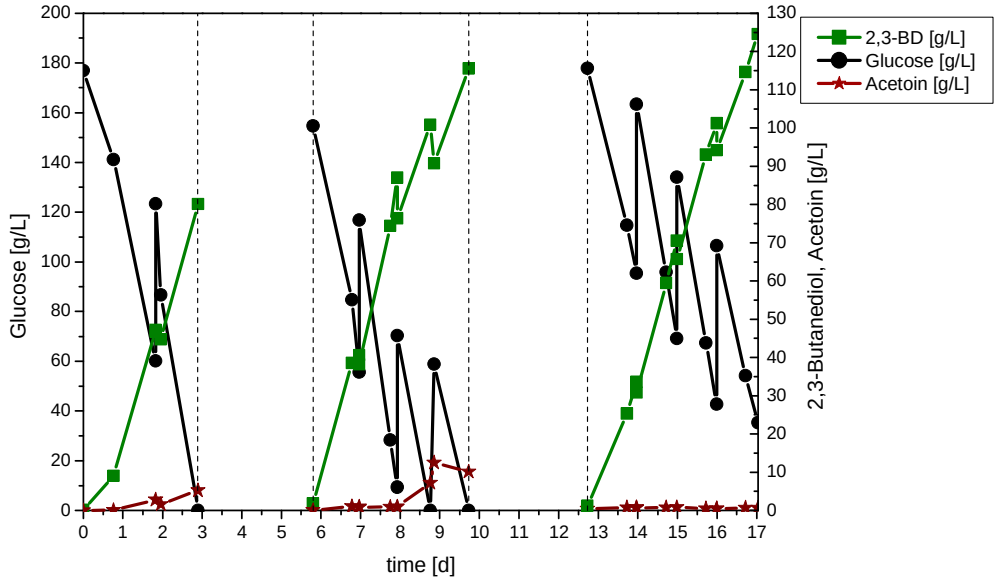
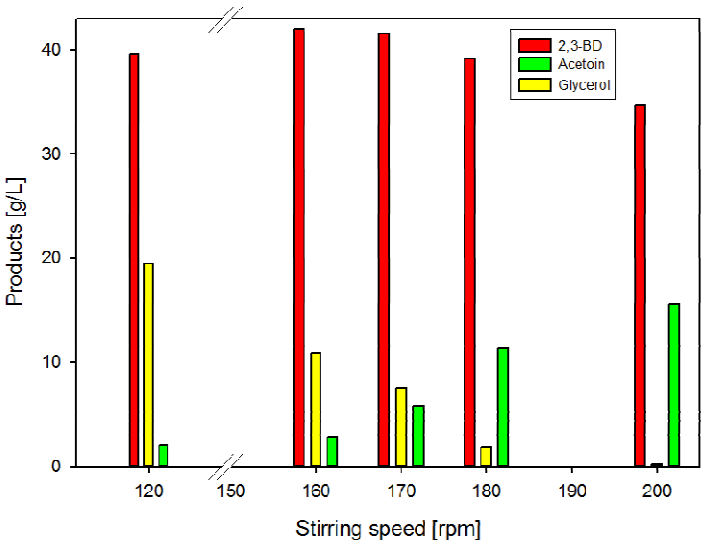



**Abbildung 31: Repeated fedbatch Kultivierung von in LentiKats® immobilisiertem *B. licheniformis* DSM 8785 auf Medium mit 180 g/L Glucose; 3 facher Mediumwechsel.**

## *Task 4.3: Fermentation in größerem Maßstab mit ausgewählten Mikro-organismen*

Nach der erfolgreichen Optimierung der Fermentationsparameter im 3,5 L Bioreaktormaßstab erfolgte ein Scale-up der Kultivierungen in den 40 L Bioreaktormaßstab. Für diesen Task wurde *B. licheniformis* DSM 8785 ausgewählt, mit dem im 3,5 L Maßstab die höchsten 2,3-BD Erträge erzielt werden konnten. Die Maßstabsvergrößerung wurde bei konstanter Gasleerrohrgeschwindigkeit durchgeführt, wobei die Rührergeschwindigkeit anhand verschiedener Scale-up Kriterien im Bereich 120-200 rpm optimiert wurde. Bei konstanter Reynoldszahl resultierte eine Rührergeschwindigkeit von 75 rpm, bei konstanter Begasungszahl 164 rpm und bei konstanter Rührerspitzengeschwindigkeit 173 rpm. Abbildung 32 zeigt ein Vergleich der Ergebnisse dieser Kultivierungen. Die besten Ergebnisse wurden bei konstanter Begasungszahl (160 rpm) bzw. konstanter Rührerspitzengeschwindigkeit (170 rpm) erzielt.




| Stirring speed [rpm] | Yield [g/g] | Productivity [g/(L·h)] |
|---|---|---|
| 120 | 0.36 | 0.62 |
| 160 | 0.39 | 0.88 |
| 170 | 0.39 | 0.92 |
| 180 | 0.36 | 0.85 |
| 200 | 0.31 | 0.76 |

Results in the 3.5 L bioreactor scale:

| | |
|---|---|
| Yield [g/g] | 0.43 |
| Productivity [g/(L·h)] | 0.85 |

**Abbildung 32: Vergleich verschiedener Rührergeschwindigkeiten bei der Kultivierung von *B. licheniformis* im 40 L Bioreaktor: 28 L Medium (120 g/L Glucose), 30°C, Belüftung: 18,3 L/min.**

Eine konstante Rührerspitzengeschwindigkeit wurde als Kriterium auch bei dem Scale-up der Kultivierung mit *B. licheniformis* bei hoher Temperatur (37°C) und mit hoher Glucosestartkonzentration (180 g/L) eingesetzt. Abbildung 33 stellt einen Vergleich der Ergebnisse im Schüttelkolben, 3,5 L und 40 L Bioreaktor dar und zeigt eine perfekte Übereinstimmung der 2,3-BD Produktion in den beiden Bioreaktormaßstäben, also ein erfolgreiches Scale-up Verfahren.

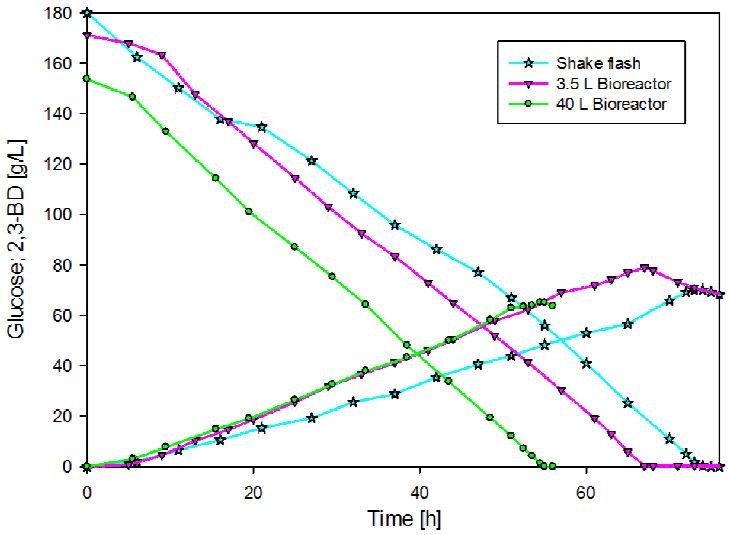



**Abbildung 33: Scale-up bei hoher Glucosekonzentration (180 g/L) und hoher Temperatur (37°C) mit *B. licheniformis*. Vergleichskultivierung im Schüttelkolben, 3,5 L und 40 L Bioreaktor.**

Im Projekt war an sich vorgesehen, als Fermentationssubstrat C5 und C6 Kohlenhydrate aus der Hydrolyse aus Lignocellulose (z.B. Zuckerrübenpressschnitzeln oder Holz) zu fermentieren. Für Fermentationen im 20–L Maßstab hätten dafür zumindest mehrere hundert Gramm des Holz- bzw. Zuckerrübenschnitzelhydrolysats zur Verfügung stehen müssen. Da die Apparatur zur

Vorbehandlung, welche dem vTI Hamburg zur Verfügung stand, nicht die entsprechende Größe hatte, standen größere Mengen an Hydrolysat nicht zur Verfügung. Fermentationen im Schüttelkolbenmaßstab mit *Bacillus licheniformis*, der ein Gemisch aus C5 und C6 Zuckern als Substrat erhielt, konnte gezeigt werden, dass der Stamm in der Lage ist, Glucose (aus Cellulose), Xylose und Arabinose (aus Hemicellulose) vollständig zu verstoffwechseln und daraus 2,3-BD zu synthetisieren.

Um Fermentationsversuche im halbtechnischen Maßstab durchführen zu können, musste ein alternatives Substrat eingesetzt werden. Daher wurde beim Projekttreffen am 24./25.11.2011 in Hamburg gemeinschaftlich beschlossen, Saccharose-haltigen Dicksaft dafür zu verwenden, der kostengünstiger als reine Saccharose ist und in anderen Fermentationsindustrien bereits als Substrat verwendet wird.

Fermentation im 20 L-Maßstab - Batchversuche

*B. licheniformis* wurde zunächst in orientierenden Versuchen mit Dicksaft als Substrat kultiviert, der 180 g/L Saccharose enthielt. Die Zellkultivierung erfolgte für 72 h bei 30 °C, einer Rührerdrehzahl von 210 rpm und einer Belüftungsrate von 0,55 Volumen Luft/Fermentervolumen und Minute (VVm). Bei dieser Belüftungsrate lag die Sauerstoffkonzentration im Fermenter bei konstant 10 %. Es wurde beobachtet, dass die angebotene Saccharose innerhalb von 50 h vollständig verstoffwechselt wurde, jedoch war die Konzentration des gebildeten 2,3-BD deutlich geringer als in Schüttelkolbenversuchen. Am Ende der Fermentation wurden lediglich 38 g/L Acetoin und 14 g/L 2,3-BD gemessen. Diese Daten zeigen, dass die Belüftungsrate eine sehr wichtige Rolle spielt. Bei zu hohem Angebot erfolgt zwar eine gute Biomassebildung, es wird jedoch vergleichsweise wenig 2,3-BD gebildet. Bei zu geringem Sauerstoffangebot hingegen geht die Zellvermehrung zurück, im Zuge der Regeneration von NADH + H+ wird jedoch mehr Acetoin zu 2,3-BD reduziert.

Fermentation im 20 L-Maßstab – Fedbatchversuche

Aufgrund des Saccharosemangels nach 50 h Fermentationszeit wurde beschlossen, in sog. Fedbatchversuchen Saccharose in Form von Dicksaft nachzufüttern. Dazu erfolgte zunächst eine Vorkultivierung von *Bacillus licheniformis* in 15 L-Batchkultur mit 180 g/L Saccharose. Nach 17,5 h wurde die Fütterung gestartet, die bis zur 42. Fermentationsstunde andauerte. In diesen 24,5 h wurden 5 L Dicksaft nachgefüttert, so dass das Gesamtvolumen am Ende der Fermentation bei 20 L lag. Die Zufütterungsrate entsprach 204 g Dicksaft/h bzw. 120 g Saccharose/h. Somit lag der Gesamtanteil an Saccharose, mit der *Bacillus licheniformis* im Fedbatchverfahren kultiviert wurde, bei 300 g/L. Aufgrund des höheren Sauerstoffbedarfs durch das höhere Substratangebot gegenüber der Batch-Fermentation wurde das Medium mit 0,67 VVm Luft versorgt.

Abbildung 34 zeigt den Verlauf einer Fedbatch-Fermentation. Daraus geht hervor, dass die Saccharose innerhalb von 17 h komplett hydrolysiert und verstoffwechselt wurde. Nach Start der Zufütterung wurde die Saccharose gespalten und vornehmlich Fructose als Substrat verwertet, während die Glucosekonzentration auf etwa 25 g/L anstieg. Am Ende der Fermentation (70 h) war kaum Acetoin nachweisbar, die Konzentration an 2,3-BD stieg auf 82 g/L an. Damit lag die Ausbeute bezogen auf die eingesetzte Saccharose bei 27 %. Dieser Wert ist vergleichbar mit der Ausbeute, die bei Partnern wie z.B. bei der TU Braunschweig erzielt wurden, die zwischen 0,29 und 0,35 g 2,3-BD/1 g Glucose bzw. Saccharose lagen.

Eine mögliche Ursache für die vergleichsweise geringe Ausbeute scheint die Synthese einer unbekannten Komponente zu sein, die möglicherweise ein Polysaccharid darstellt. Ein Hinweis darauf, dass es sich wahrscheinlich um ein Polysaccharid handelt, ergab sich daraus, dass eine Sterilfiltration des Medium zur Vorbereitung von Lösungen für die HPLC-Analytik kaum möglich war; zudem setzten sich die Filter schnell zu. Auch das Abzentrifugieren der Zellen vom löslichen Überstand war kaum möglich.

Die Fermentationsversuche zeigen, dass *Bacillus licheniformis* grundsätzlich ein geeigneter, nicht pathogener Bakterienstamm für die Synthese von 2,3-BD ist. Die Polysaccharidkomponente wurde im Schüttelkolbenmaßstab nicht gebildet, als der Stamm mit Xylose, Arabinose und Glucose entstammend einer Vorbehandlung und Hydrolyse von Lignocellulose, kultiviert wurde.

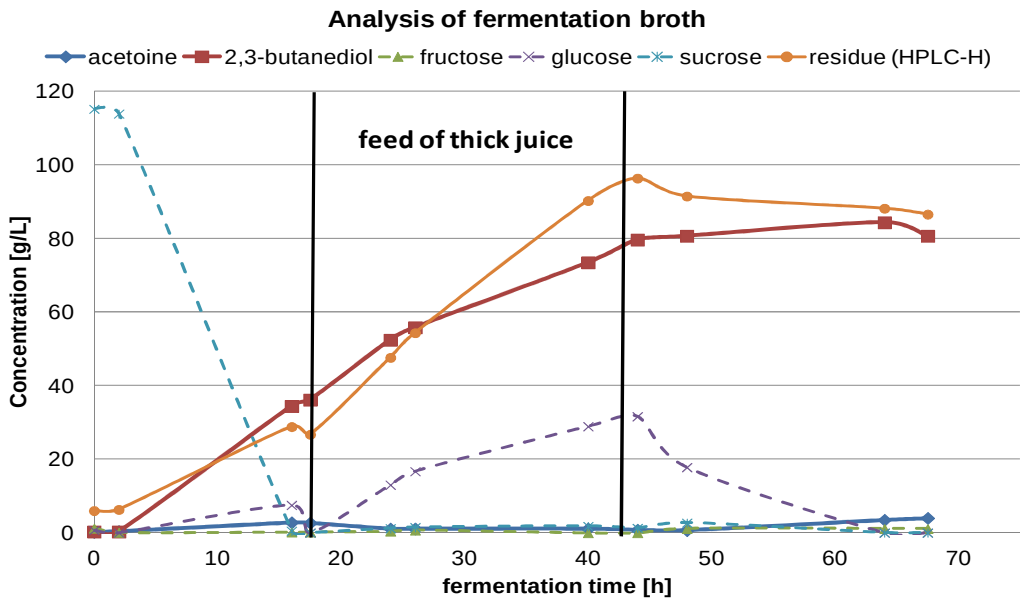



**Abbildung 34: Fedbatch Fermentation der 2,3-BD Bildung duch *B.licheniformis* bei 30 °C, einer Rührerdrehzahl von 210 rpm und einer Belüftungsrate von 0,67 VVm**

## *Task 4.4: Kinetik und Prozessmodellierung*

Bioreaktorversuche ermöglichen die Messung einer Reihe von Parametern über die gesamte Kultivierungsdauer. Mit Hilfe von entsprechenden Sensoren konnte der Verlauf von pH, Temperatur, $pO_2$, sowie $O_2$ und $CO_2$ im Abgas über den gesamten Zeitraum der Kultivierung online aufgenommen werden. Die Bestimmung der optischen Dichte, C-Substrate, 2,3-BD und Nebenprodukte erfolgt offline. Zusätzlich wurden OD-Sensoren gekauft, die es ermöglichten, das Wachstum online zu verfolgen, somit schneller auf Wachstumsprobleme zu reagieren und den Prozess zu verbessern.

## *Task 4.5: Untersuchung und Modellierung mikrobiellen Stresses*

Zusätzlich zu den reinen Zuckern sollten auch Holzhydrolysate (vom Partner vTIHH) als Substrat für die 2,3-BD Produktion eingesetzt werden. Während der Herstellung dieser Hydrolysate werden jedoch Komponenten frei, die eine toxische Wirkung auf die Bakterien haben können.

Die wichtigsten potentiellen Inhibitoren sind Furfural, 5-HMF, 4-Hydroxybenzoesäure, Vanillin, Syringaldehyd, Ameisensäure und Essigsäure. Der Einfluss dieser potentiell inhibierenden Verbindungen auf das mikrobielle Wachstum und die Produktion von 2,3-BD wurde in Schüttelkolbenexperimenten untersucht. Deren Konzentrationen reichen von 0,01 g/L (Vanillin) bis 1,5 g/L (Essigsäure) in Anwesenheit von 68 g/L Glucose. Es wurden einzelne Verbindungen sowie Kombinationen in unterschiedlichen Konzentrationsstufen (1fach, 2fach usw.) getestet. Bei *P. polymyxa* konnten Inhibierungseffekte erst ab einer 8fachen Konzentration an Inhibitoren ermittelt werden (Abbildung 35), bei *B. licheniformis* schon ab einer 1fachen Konzentration (Tabelle 16).

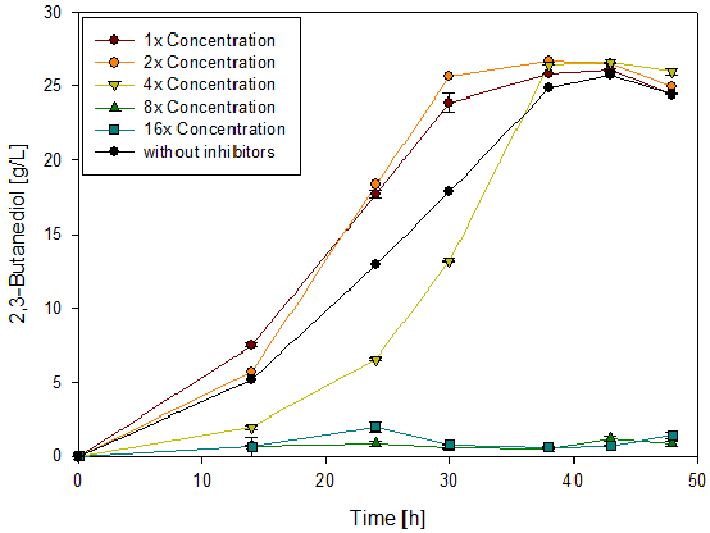



**Abbildung 35: 2,3-BD Bildung durch *P. polymyxa* auf künstlichem Holzhydrolysatmedium mit Zugabe von inhibierenden Stoffen in unterschiedlichen Konzentrationsstufen (1fach-16fach).**

**Tabelle 16: Übersicht über die Inhibierung des mikrobiellen Wachstums und der 2,3-BD Produktion von *B. licheniformis* durch Zugabe von inhibierenden Stoffen in unterschiedlichen Konzentrationsstufen: (++) starke Inhibierung, (+) Inhibierung, (-) keine Inhibierung.**

| | Inhibition at the following concentrations: | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1x | 2x | 4x | 8x | 16x | 32x | 64x |
| Furfural | - | - | - | + | ++ | ++ | ++ |
| 5-HMF | - | - | - | - | - | + | ++ |
| Formic Acid | - | + | + | + | ++ | ++ | ++ |
| Acetic Acid | - | - | - | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Vanillin | - | - | - | - | - | - | - |
| Syringaldehyde | - | - | - | - | - | + | ++ |
| 4-Hydroxy Benzoic Acid | - | - | - | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Combinations | + | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |

# WP 5: Produktisolierung, -reinigung und -veredelung (ED, vTIBS)

## *Task 5.1: Entwicklung von in-situ/ex-situ Produktisolierungs-verfahren (vTIBS)*

Membranverfahren versprechen derzeit die größte Effizienz zur Aufreinigung von 2,3-BD, so dass ein Verfahrensschema bestehend aus mehreren Modulen entwickelt wurde (Abbildung 36).

Die Mikrofiltrationsanlage (Firma MILLIPORE, Querstromfiltration) dient der Filtration der Fermentationsbrühe bis zu einer Größe von 0,1 µm (Zellabtrennung). Die Flachmembranen bestehen aus Durapore (PVDF, polyvinylidene fluoride) mit einer Membranfläche von 60 $cm^2$.

Die Ultrafiltrationsanlage (Firma Microdyn-Nadir) dient der Filtration kleiner 0,1 µm. Das vorhandene Modul ist eine Hohlfaserkartusche aus PES (polyethersulfone), mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa, sie ist 364 mm lang und besitzt eine Membranfläche von 2600 $cm^2$.

Die Elektrodialyse (Firma PCA-GmbH) wird zur Abtrennung von Ionen eingesetzt. Das Modul (PC *Cell*) besitzt eine aktive Membranfläche von 58 $cm^2$.

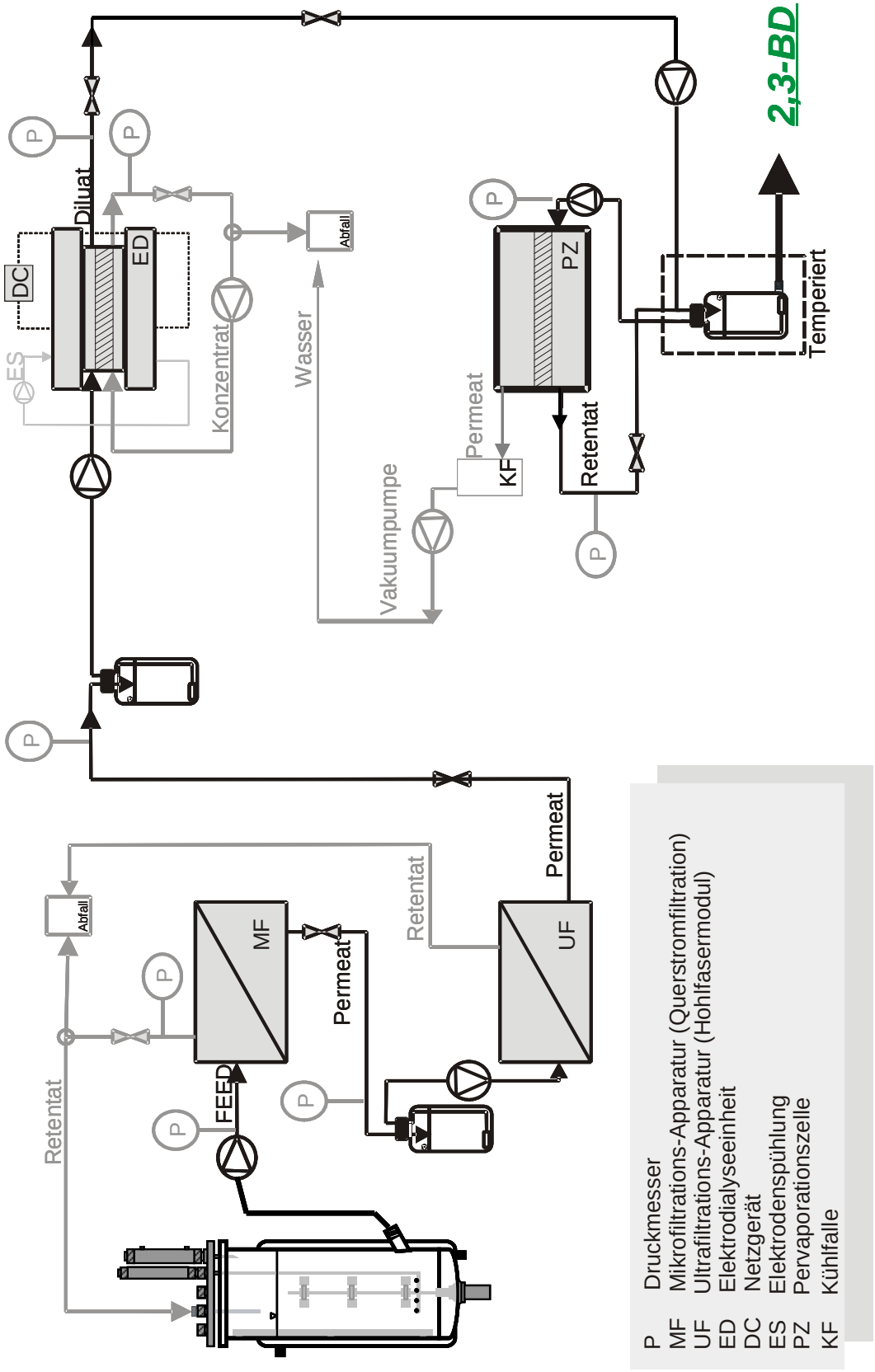



**Abbildung 36: Geplante Versuchsanlage zur Aufreinigung von 2,3-BD.**

Die Pervaporation dient zur Aufkonzentrierung des Zielproduktes 2,3-BD. Die Pervaporation, oder auch Vakuummembrandestillation genannt, ist eine Kombination aus Membrandestillation und Permeation. Auf der Permeatseite wird ein Vakuum angelegt und das Verfahren dient zur Trennung zweier perfekt gemischter Flüssigkeiten. Zur Isolierung von 2,3-BD sollen zunächst zwei verschiedene Verfahren getestet werden:

1. anorganische Membranen: Von der Firma HITK e.V. wurden zwei Zeolithmembranen im Einkanalrohr inklusiv des passenden Edelstahlgehäuses bezogen. Die Membran besteht aus Zeolith ZSM-5 und Zeolith NaA mit einer Filterfläche von je 147,75 $cm^2$.
2. organische Membranen: Als organische Membranen soll zunächst eine PTFE (polytetrafluoroethylene) Membran getestet werden. Laut Literatur konnte an einer 0,22 µm PTFE-Membran eine Modelllösung von 2,3-BD (c=40 g/L BD) aufkonzentriert werden (c=650 g/L). Auch eine reale Fermentationsbrühe mit gleicher 2,3-BD-Konzentration konnten bis auf 430 g/L aufkonzentriert werden (Qureshi, Meagher et al. 1994). Die institutseigene Werkstatt hat ein Pervaporationsmodul für Flachmembranen gebaut (Abbildung 37).

**Abbildung 37: Pervaporationsmodul links für organische Flachmembranen, rechts für anorganische Membranen im Einkanalrohr.**

Hierzu wurden in Absprache mit dem Projektpartner Solvay für die Pervaporation Flachmembranen aus dem Membransortiment von Solvay ausgewählt, welche mit dem selbst gebauten Pervaporationsanlage (Abbildung 38) zur Isolierung und Aufkonzentrierung von 2,3-BD getestet wurden. Des Weiteren wurden in Zusammenarbeit mit Solvay folgende kommerziell erhältliche Membranen der Firmen Pall und Millipore ausgewählt und getestet:

Pall:

- Supor (PES) 0.1, 0.2, 0.4 µm
- Nylaflo (Hydrophilic nylon)0.2 µm
- Tuffryn (Hydrophilic polysulfone)
- Versapor (Hydrophilic acrylic copolymer on a non-woven support) 0.2, 0.45 µm

Millipore: Millipore Express PLUS (polyethersulfon, 0.22 µm)

MEMBRANA:

- ACCUREL ® PP 2E HF (R/P): 164 µm thickness
- ACCUREL ® PP 1E (R/P): 101 µm thickness

## *Task 5.2: Reinigung von 2,3-Butandiol (vTIBS, ED)*

Mit der Pervaporationsanlage (Abbildung 38) wurden anhand von Modelllösungen die in Task 5.1 beschriebenen Membranen unter verschiedenen Bedingungen auf ihre Eignung getestet, 2,3-BD mittels Pervaporation aufzukonzentrieren.

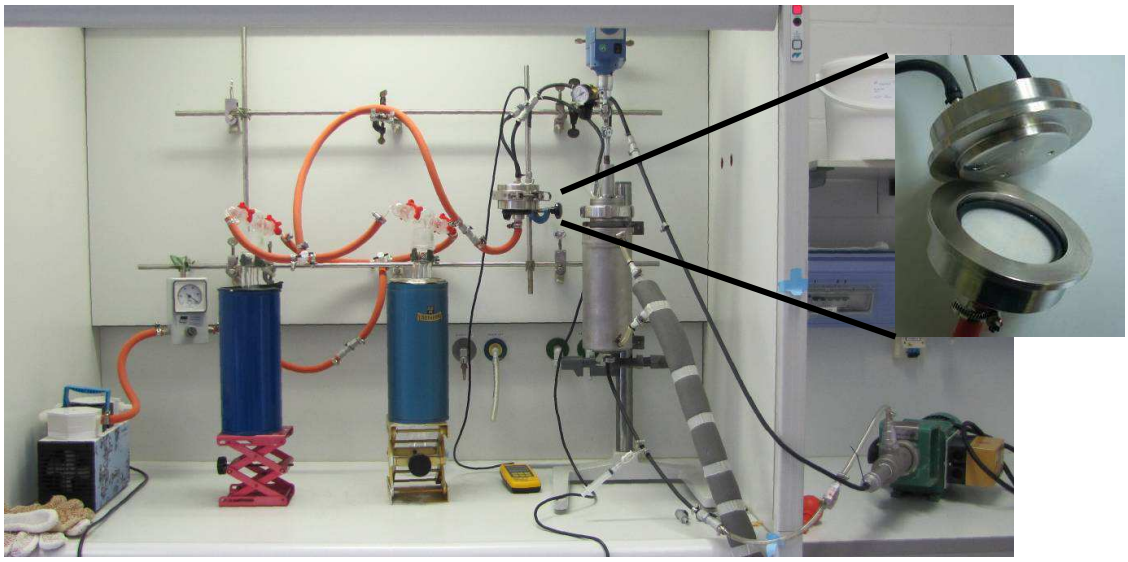


**Abbildung 38: Pervaporationsanlage für organische Flachmembranen**

### 1. Anorganische Membranen:

Die Versuche mit der Zeolith ZSM5 Membran im Einkanalrohr (Geometrie: l = 250 mm, da/dc = (10/7) mm, Träger: $Al_2O_3$, d50 = 3 µm, Membran: Zeolith ZSM5) wurden in dem Edelstahlmodul durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine anorganische hydrophobe Zeolithmembranen die zur Abtrennung von Ethanol aus wässrigen Lösungen/Fermentation angewendet wird.

Bei Untersuchungen mit Modelllösungen von 50 g/L 2,3-BD stellte sich jedoch heraus, dass unter den eingestellten Betriebsparameter (Startvakuum: 8 mbar, Temperatur: 70 °C, Flussrate: 26 L/h) keine signifikante Anreicherung des Produktes im Permeat stattfindet.

### 2. Organische Membranen:

- Versuche mit den in Task 5.1 aufgelisteten kommerziell erhältlichen Flachmembranen der Firmen Pall und Millipore zeigten, dass sie in dieser Form nicht geeignet sind, um das 2,3-BD aus der verwendeten Modelllösung (mit 50 g/L 2,3-BD) aufzukonzentrieren.
- Weiterhin zeigte sich, dass die Flachmembranen Aquivion (Solvay, in den Stärken 30, 105, 108 und 206 µm) ebenfalls in dieser Form nicht geeignet sind, um das 2,3-BD aus der verwendeten Modelllösung (mit 50 g/L 2,3-BD) aufzukonzentrieren.
- Pervaporation mittels PTFE Membran:

Die erfolgversprechendsten Ergebnisse wurden mit PTFE Membranen (Firma: Sartorius, Solvay; Porenweite 0,2 µm, Stärke 65 µm) erzielt. Bei diesem Membranmaterial soll während der

Pervaporation der Wasserdampf durch die Membran hindurch treten und als Permeat von der Ausgangsmodelllösung abgetrennt werden. Das 2,3-BD hingegen soll auf Retentatseite der Membran verbleiben und bedingt durch den Übergang des Wassers aufkonzentriert werden. Fraktioniertes Sammeln und Beprobung des Permeates sowie regelmäßige Probenahme des Retentats ermöglichen eine genaue Bilanzierung der Stoffverteilungen.

Die ersten Versuchsreihen zeigten, dass die Ergebnisse sehr stark von der 2,3-BD Konzentration, der Versuchsdauer und vor allem von einem wiederholten Einsatz der selben Membran abhängen. Daher wurden folgende Versuchsansätze durchgeführt:

a) Die Ausgangskonzentration der Modelllösung wird variiert, zwischen 11 und 538 g/L 2,3-BD.
b) Alle Versuche wurden ohne Austausch der Membran 5-mal hintereinander mit einer neuen Modelllösung unter ansonsten gleichen Bedingungen und verdoppelter Flussrate durchgeführt.
c) Variation der Temperatur
d) Temperatur- und Pumpgeschwindigkeit- Variation einer 180 µm dicken PTFE Membran
e) Variation der Ausgangskonzentration mit einer 180 µm dicken PTFE Membran

**Zu a):** Bei der Variation der Ausgangskonzentration (Abbildung 39) ist ersichtlich, dass mit steigender Ausgangskonzentration (x-Achse) an 2,3-BD, die 2,3-BD Endkonzentration im Retentat (graue Balken) gesteigert werden konnte, so werden z.B. 88,8 g/L auf 205 g/L, 209 g/L auf 299 g/L 2,3-BD am Versuchsende aufkonzentriert. Analysiert man aber die prozentualen Verteilungen (Abbildung 39, grün) des 2,3-BDs, ist ersichtlich, dass mit steigender Ausgangskonzentration ein steigendender Anteil des Produktes über die Membran hindurchtritt und folglich dem aufzukonzentrierenden Retentat verloren geht. Des Weiteren ist der Versuch mit 50 g/L 2,3-BD als Ausgangskonzentration mit zwei verschiedenen Versuchszeiten (Abbildung 39 Versuchsdauer) durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass die Verlängerung der Versuchszeit um 40 min eine geringe Steigerung der Endkonzentration erzielte, aber die Bilanz bezüglich des prozentualen Anteils des 2,3-BDs im Retentat von 95 auf 50% sank Die Membran ändert folglich abhängig von der Kontaktzeit mit 2,3-BD seine Eigenschaften.

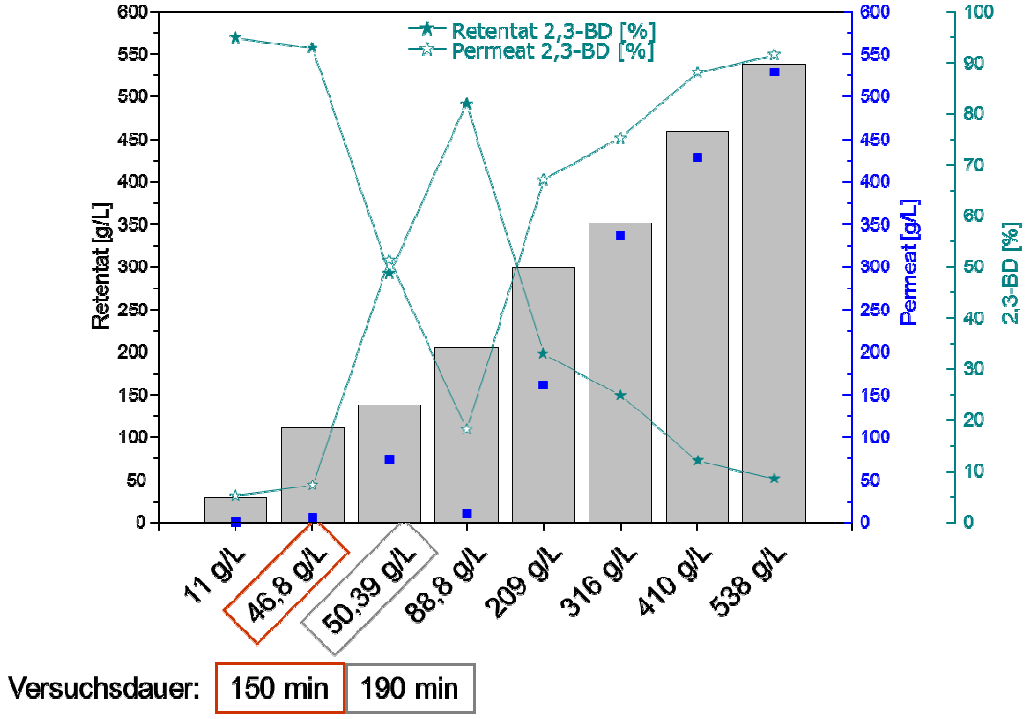



**Abbildung 39: Pervaporation von Modelllösung (0,5 L) zwischen 11 und 538 g/L 2,3-BD mit der PTFE Membran: Porenweite 0,2 µm, Dicke 65 µm, Pumpgeschwindigkeit 26 L/h, 60 °C, 150 min Versuchsdauer.**

**Zu b):** Bei diesem Versuchsansatz wurde ein PTFE Membran 5 mal hintereinander unter ansonsten gleichen Bedingungen eingesetzt, um eine Modelllösung (50 g/L 2,3-BD) aufzukonzentrieren. Beim ersten Einsatz der Membran konzentrierte man erfolgreich die Modelllösung von 50 auf 150 g/L 2,3-BD nach 180 min auf. Beim zweiten und den folgenden Einsätzen verringerte sich die erreichbare Endkonzentration auf ungefähr 100 g/L (Abbildung 40). Ausschlaggebender als die erreichte Endkonzentration des 2,3-BDs im Retentat ist aber, der prozentuale Anteil des Produktes am Ende der Aufreinigung im Konzentrat (Retentat, Abbildung 40). Lag der prozentuale Anteil des eingesetzten 2,3-BDs am Versuchsende beim 1. Einsatz der Membran bei 84 – 94%, so sank er drastisch bei den zweiten, dritten und folgenden Einsätzen auf unter 65% ab. Dies zeigt, dass durch den Kontakt mit 2,3-BD die Membraneigenschaften verändert werden und die Membran beim wiederholten Einsatz durchlässiger für das 2,3-BD wird. Um zu überprüfen, ob allein der Kontakt mit 2,3-BD die Membraneigenschaften beeinflussen, ohne dass diese Membran im Pervaporationsprozess eingesetzt wurde, wurde eine Membran vorbehandelt. Die Membran wurde 12h bei 70 °C in 5 % 2,3-BD gelagert. Anschließend wurde diese vorbehandelte Membran für die Pervaporation eingesetzt und fünfmal nacheinander zur Aufkonzentrierung von Modellösungen verwendet (Abbildung 41). Abgesehen von der sinkenden Endkonzentration und dem prozentualen Anteil an 2,3-BD am Versuchsende bei den wiederholenden Einsätzen, ist auffällig, das bereits beim ersten Einsatz der vorbehandelten Membran im Vergleich zur Referenz (nicht vorbehandelt,

1.Einsatz) die erreichbare Endkonzentration nach 180 min lediglich 100 g/L anstatt 155 g/L (Referenz) 2,3-BD beträgt.

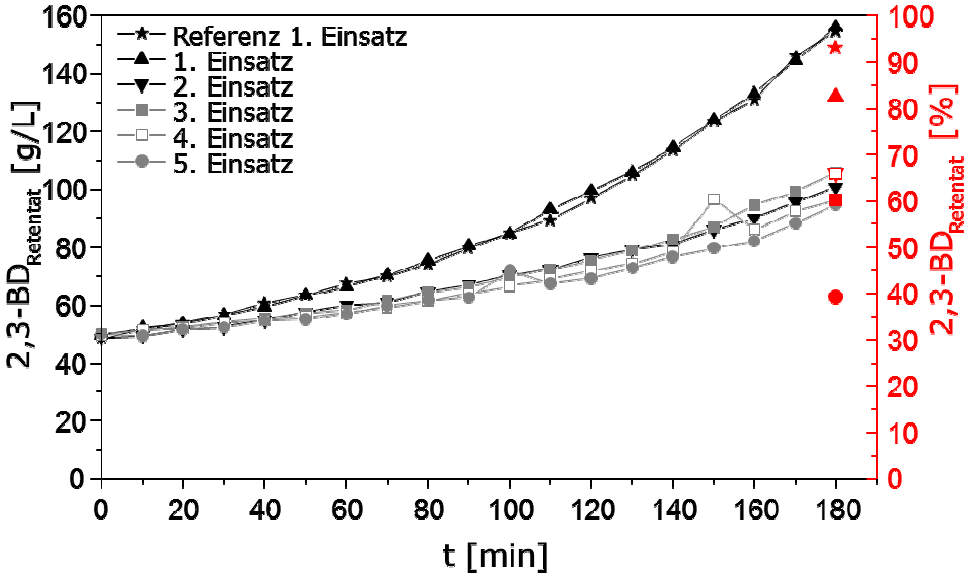



**Abbildung 40: Wiederholter Einsatz derselben PTFE Membran (Porengröße 0,2 µm, Dicke 65 µm) zur Pervaporation einer Modelllösung (0,5 L) mit 50 g/L 2,3-BD, Pumpgeschwindigkeit: 52 L/h, 60 °C**

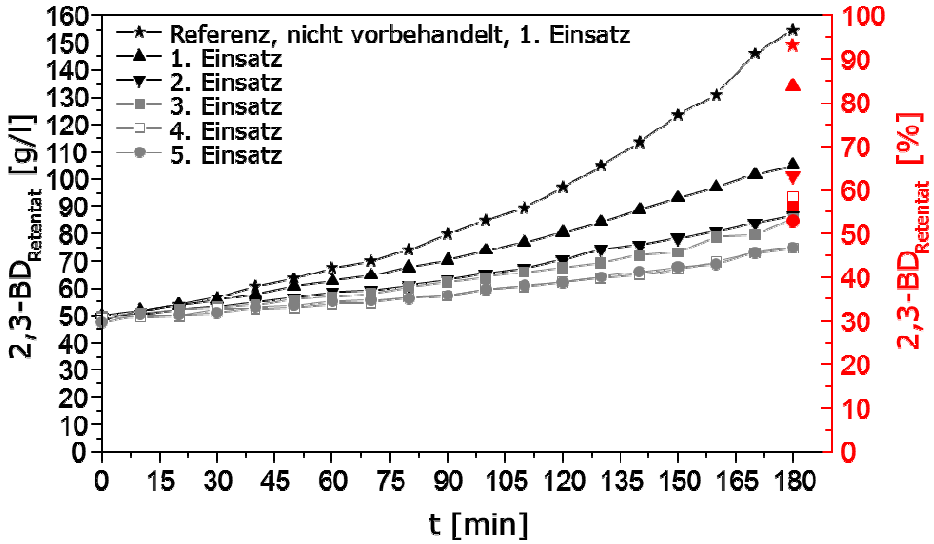



**Abbildung 41: Wiederholter Einsatz derselben vorbehandelten PTFE Membran (Porengröße 0,2 µm, Dicke 65 µm) zur Pervaporation einer Modelllösung (0,5 L) mit 50 g/L 2,3-BD, Pumpgeschwindigkeit: 52 L/h, 60 °C; Vorbehandlung: 12h bei 70 °C in 5 % 2,3-BD gelagert.**

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl der zeitliche Kontakt der Membran mit 2,3-BD, der mehrfache Einsatz und auch hohe Konzentrationen an 2,3-BD die Eigenschaften der PTFE Membran (Porengröße 0,2 µm, Stärke: 65 µm) unter den derzeitigen Prozessparametern negativ beeinflussen. Daher wurden im Folgenden verschiedene Temperaturen, eine Erhöhung der Pumpgeschwindigkeit und Veränderungen der Membran (Stärke, Porengröße, Material) im Hinblick auf die Leistung der Pervaporation verändert. Für diese Zwecke wurden Muster der PTFE Membran mit der Stärke 0,18 mm vom Projektpartner Solvay zur Verfügung gestellt sowie PP Membranen der Firma MEMBRANA erworben.

**Zu c.)** Variation der Temperatur: Ziel ist es die Versuchsdauer bzw. die Kontaktzeit des 2,3-BDs mit der Membran zu minimieren und die Performance der Membran somit über einen längeren Zeitraum stabil zu erhalten. Diese Versuche wurden Apparativ bedingt mit 1 L Modellösung durchgeführt, so dass sich unter Referenzbedingungen die Versuchszeiten von bisher 180 min auf 300 min verlängern. Bei Temperaturen von 40 und 50 °C trat nahezu keine Aufkonzentrierung des 2,3-BDs im Retentat auf (Abbildung 42). Bei 60 °C wurden die eingesetzten 50 g/L auf 155 g/L im Retentat aufkonzentriert mit einem prozentualen Anteil von 93%. Bei einer Temperatur des Retentats von 70 °C wurde die Versuchsdauer von 300 auf 240 min verkürzt, bei gleichzeitiger Steigerung der Endkonzentration von 155 auf 180 g/L 2,3-BD. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 80 °C bewirkte erneut eine Verkürzung der Versuchsdauer auf 190 min und eine Erhöhung der Endkonzentration auf 252 g/L 2,3-BD. Der transmembrane Flux wurde von 34 (bei 60 °C) auf 85 [kg/(m$^2$h)] bei 80 °C gesteigert.

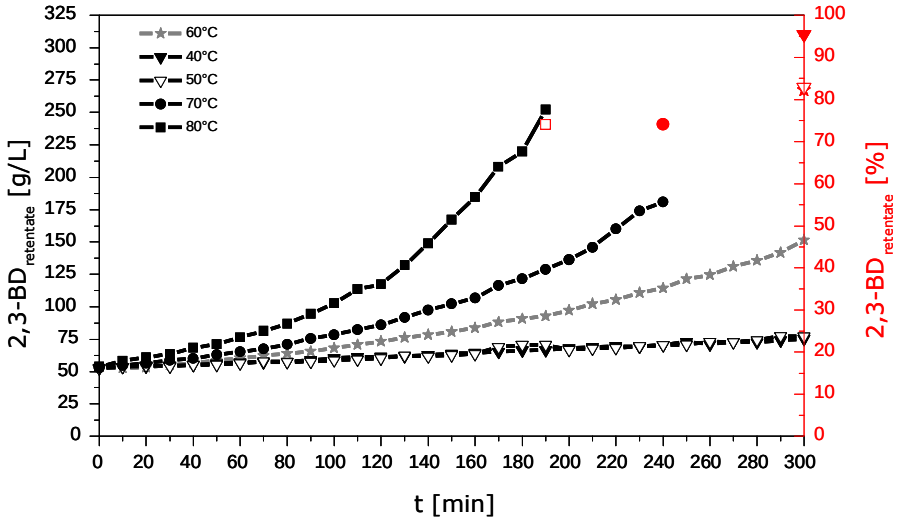



**Abbildung 42: Temperaturoptimierung der Pervaporation einer Modelllösung (1 L) mit 50 g/L 2,3-BD, Pumpgeschwindigkeit: 52 L/h, PTFE Membran (Porengröße 0,2 µm, Dicke 65 µm).**

Trotz der verkürzten Versuchsdauer und somit kürzerer Kontaktzeit zwischen Membran und 2,3-BD, zeigte ein zweiter Einsatz derselben Membran unter den gleichen Versuchsbedingungen deutlich schlechtere Ergebnisse (Abbildung 43). Nach 180 min Versuchsdauer war dieser Durchlauf beendet

(Flux: 88 [kg/(m$^2$h)]) und die eingesetzten 50 g/L 2,3-BD wurden nur auf 196 g/L anstatt 252 g/L 2,3-BD (1. Einsatz) aufkonzentriert. 50% des eingesetzten 2,3-BD sind parallel mit dem Wasser ins Permeat übergegangen was einen 50%igen Verlust darstellt.

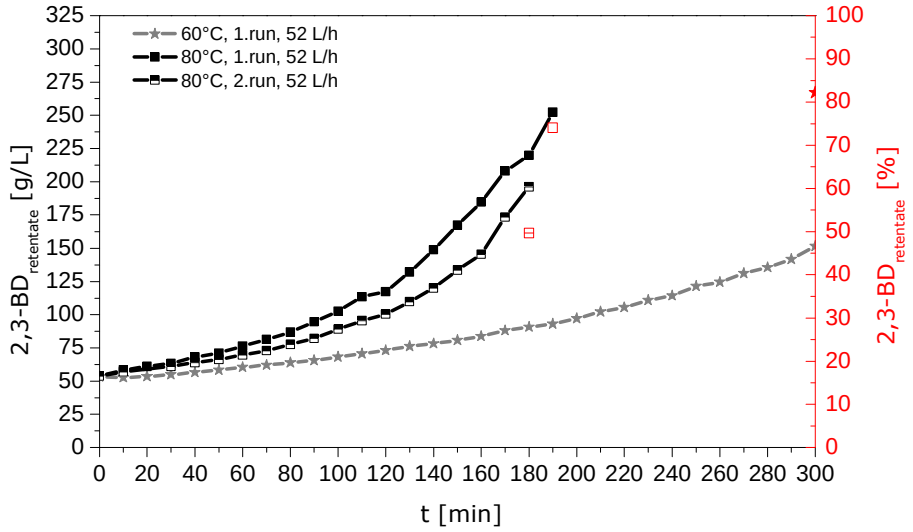



**Abbildung 43: Mehrfacheinsatz der Membran bei 80 °C, Pervaporation einer Modelllösung mit 50 g/L 2,3-BD, Pumprate: 52 L/h, PTFE Membran (Porengröße 0,2 µm, Dicke 65 µm).**

**Zu d.)** Da trotz Verkürzung der Versuchsdauer, die Membran nicht effektiv mehrfach eingesetzt werden kann, wurde eine PTFE Membran mit der Stärke von 180 µm getestet. Unter gleichen Versuchsbedingungen (60 °C, Pumpgeschwindigkeit: 52 L/h) wurde mit diesem Membranmaterial die 50 g/L 2,3-BD Lösung auf 279 g/L 2,3-BD nach 300 min aufkonzentriert mit einer prozentualen Anreicherung von 90% im Retentat (Abbildung 44). Steigert man bei gleicher Temperatur (60 °C) die Pumpgeschwindigkeit auf 69 L/h erhält man 306 g/L 2,3-BD aufkonzentriert im Retentat nach 280 min und einer Anreicherung von 89%. Erhöht man nun die Temperatur bei dieser Membran auf 80 °C ist das Ergebnis sehr stark von der gewählten Pumpgeschwindigkeit des Retentats abhängig. Der transmembrane Flux ist bei 80°C und 69 L/h mit 104 [kg/(m$^2$h)] vergleichend hoch, was die verkürzte Versuchsdauer begründet. Die effektivste Aufkonzentrierung konnte bei einer Temperatur von 80 °C, einer Pumpgeschwindigkeit von 52 L/h und der 180 µm PTFE erreicht werden.

**Zu e.)** Während der Projektlaufzeit wurde im WP3 die erreichbare Endkonzentration mit *B.licheniformis* auf über 100 g/L 2,3-BD gesteigert. Daher wurde im Folgenden eine Pervaporation mit einer Modelllösung bestehend aus 100 g/L 2,3-BD, der 180 µm dicken PTFE Membran bei 80 °C und 52 L/h Pumpgeschwindigkeit durchgeführt (Abbildung 45). Nach einer Versuchszeit von 210 min wurde das Retentat erfolgreich auf 420 g/L aufkonzentriert.

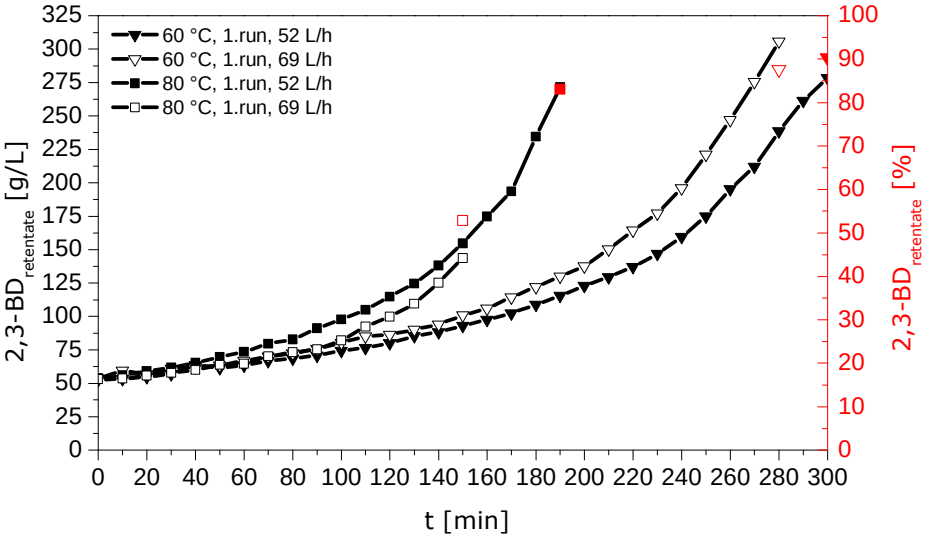



**Abbildung 44: Temperatur- und Pumpgeschwindigkeit- Variation der 180 µm dicken PTFE Membran**

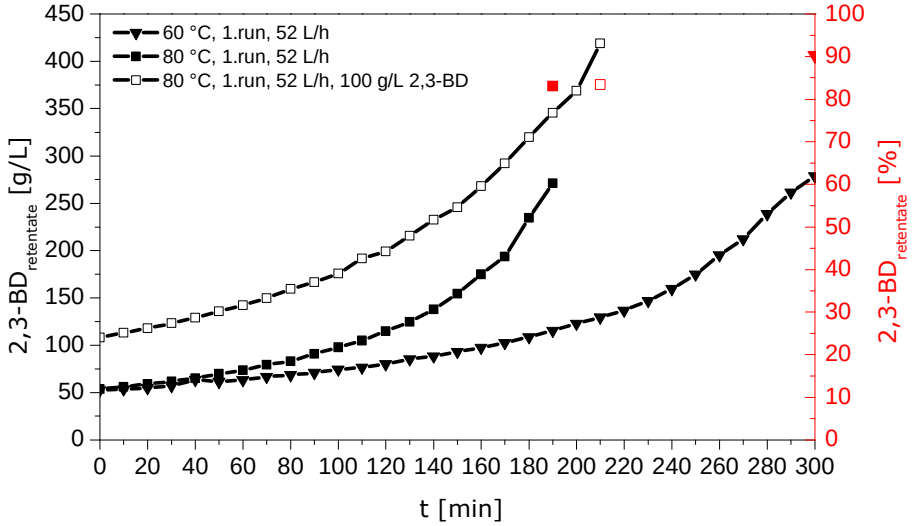



**Abbildung 45: Pervaporation, Vergleich zwischen 50 und 100 g/L 2,3-BD Modelllösung mit der 180 µm dicken PTFE Membran**

- Pervaporation mittels PP Membranen

Ein weiteres vielversprechendes Material für die Flachmembranen zur Aufkonzentrierung von 2,3-BD stellt die Membran ACCUREL ® PP 2E HF (R/P) mit einer Dicke von 164 µm da. Vergleichend zur 180 µm dicken PTFE Membran wird unabhängig von der gewählten Temperatur eine etwas geringere

Endkonzentration (250 g/L 2,3-BD anstatt 279 g/L) erreicht (Abbildung 46). Jedoch wird mit zunehmender Temperatur die Versuchsdauer verkürzt und die prozentuale Anreicherung im Retentat geringfügig verringert und somit der Verlust an 2,3-BD etwas erhöht. Eine Steigerung der Pumpgeschwindigkeit von 52 auf 68 L/h erzielte ebenso eine Endkonzentration von 250 g/L 2,3-BD und die Versuchsdauer ist um 20 min verkürzt. Ein zweiter Einsatz dieser Membran spiegelt jedoch das gleiche Ergebnis wieder, wie die der PTFE Membranen. Die Endkonzentration ist mit 180 g/L geringer als beim ersten Einsatz und die prozentuale Anreicherung beträgt lediglich 73%. Somit permeieren beim zweiten Einsatz 27% des eingesetzten 2,3-BD und gehen der Aufkonzentrierung verloren.

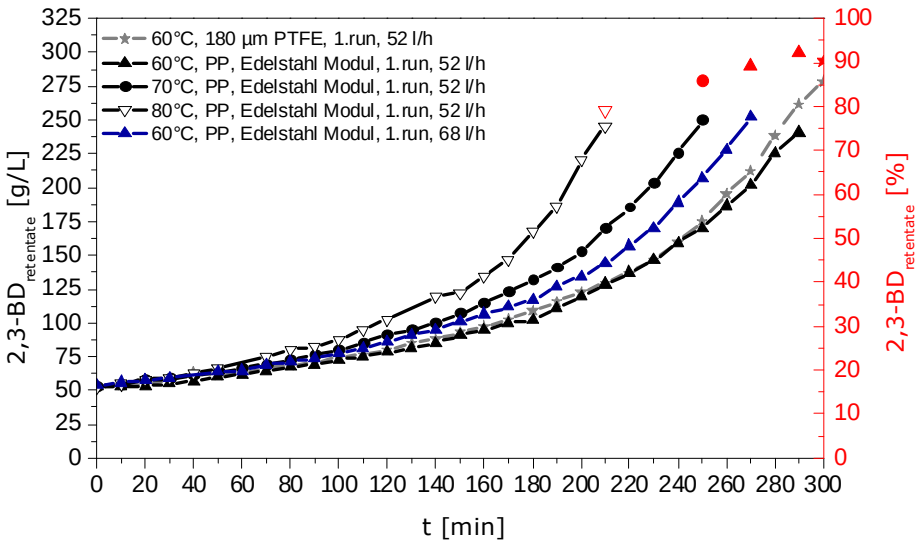



**Abbildung 46: Pervaporation, Vergleich zwischen der 180 µm dicken PTFE Membran und der PP Membran, 60-80 °C, 52 und 68 L/h Pumpgeschwindigkeit.**

## Diskussion Task 5.2

Vielversprechende Ergebnisse der Aufkonzentrierung von 2,3-BD Modelllösungen konnten mit der 180 µm dicken PTFE Membran sowie der Membran aus PP erzielt werden. Die besten Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefasst. So können 50 g/L 2,3-BD erfolgreich auf 300 g/L (180 µm dicke PTFE, 60 °C, 69 L/h nach 300 min) bzw. 100 g/L 2,3-BD auf 420 g/L 2,3-BD (180 µm dicke PTFE, 80 °C, 52 L/h nach 210 min) aufkonzentriert werden.

Unabhängig von den gewählten Parameter und Optimierungen traten jedoch Probleme bzw. deutliche Verschlechterungen der Aufkonzentrierung bei dem wiederholten Einsatz der Membranen auf. Vermutlich wird die Membran durch das 2,3-BD durchlässiger („membrane wetting“) und ist

somit für einen Mehrfacheinsatz nicht geeignet. Durch Kontaktwinkel Messungen konnte bestätigt werden, dass PTFE Membranen, die einmal benutzt wurden, bzw. vorbehandelt wurden (vor dem 1. Einsatz 12 h bei 70°C in 2,3-BD gelagert) im Vergleich zu unbenutzten PTFE Membranen deutlich hydrophiler waren.

Diese Aufarbeitungsmethode stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, ist aber mit den hier beschriebenen Membranen im Hinblick auf die Langzeitstabilität des Systems nicht für die alleinige Aufkonzentrierung des 2,3-BD aus der Fermentationsbrühe geeignet.

**Tabelle 17: Überblick der besten Ergebnisse zur Aufkonzentrierung einer 50 g/L 2,3-BD Modelllösung mittels Pervaporation.**

| Membrane | run | T [°C] | t min] | pumprate [L/h] | Flux [kg/(m²h)] | 2,3-BD [%] Permeat | 2,3-BD [%] Retentat | 2,3-BD [g/L] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **65 µm** PTFE | 1. | **60** | 180 | 51 | 33,53 | 6,88 | 93,12 | 154,5 |
| | 1. | 60 | 180 | **70** | 35,1 | 7,1 | 92,9 | 195,7 |
| | 1. | **80** | 190 | 52 | 84,67 | 26 | 74 | 252 |
| **180 µm** PTFE | 1. | **60** | 300 | 52 | 52,03 | 10,23 | 89,77 | 279 |
| | 1. | 60 | 300 | **69** | 52,9 | 13,15 | 86,85 | 306 |
| | 1. | **80** | 190 | 52 | 82,65 | 17 | 83 | 271 |
| **PP** | 1. | **60** | 290 | 52 | 55,81 | 8 | 92 | 241 |
| | 1. | **70** | 250 | 52 | 63,06 | 14 | 86 | 249 |
| | 1. | **80** | 210 | 52 | 75,24 | 21 | 79 | 246 |
| | 1. | 60 | 270 | **69** | 57,03 | 11 | 89 | 252 |

## *Task 5.3: Veredelung von 2,3-Butandiol (ED)*

Ziel der Arbeiten im Arbeitspaket 5.3 ist die Entwicklung eines nachhaltigen Verfahrens zur Umsetzung von nachwachsenden Rohstoffen über das 2,3-Butandiol bis zum Butadien und/oder MEK, das wirtschaftlich mit Naphtha-basierten Routen konkurrieren kann und ökologisch mit geringerem Energie-Bedarf und $CO_2$ Ausstoß behaftet ist. Hierzu sollen 3 Varianten, (a) die direkte Umsetzung von 2,3-Butandiol zu 1,3-Butadien, (b) die Umsetzung eines veretherten 2,3-Butandiols und (c) die Umsetzung eines veresterten 2,3-Butandiols zum 1,3-Butadien betrachtet werden.

Nach den Versuchen zur Herstellung von 1,3-Butadien aus 2,3-Butandiol in der Gasphase wurde in einem nächsten Schritt 2,3-Butandioldiacetat als Ausgangsstoff eingesetzt. Es wurde erwartet, dass aufgrund der Eigenschaft als gute Abgangsgruppe, sowie dem dirigierenden Effekt bei einer Eliminierung, die Acetatgruppen zu höheren Umsätzen und Selektivitäten bezüglich 1,3-Butadien führen würde. Im ersten Schritt wurde die Umsetzung in der Flüssigphase in einem Autoklaven untersucht. Die dominierende Selektivität bezüglich Methylethylketon (MEK) und sehr geringen Umsätzen wurden beobachtet.

Die Untersuchung der Gasphasenreaktion wurde im zweiten Schritt untersucht. Gute Umsätze und Selektivität konnte erreicht werden und eine Aspen Prozesssimulation wurde durchgeführt. Diese Ergebnisse zeigen die prinzipielle Machbarkeit eines technischen Verfahrens zur Herstellung von 1,3-Butadien aus 2,3-Butandioldiacetat.

## Ergebnisse und Diskussion

Im ersten Teil des Projekts wurde die Umsetzung von 2,3-Butandiol in 1,3-Butadien untersucht. Trotz zahlreicher Versuche war immer Methylethylketon (MEK) das Hauptprodukt und eine maximale Ausbeute von 10% für 1,3-Butadien konnte erreicht werden.

Die Herstellung von 1,3-Butadien aus 2,3-Butandioldiacetat sollte gegenüber der Reaktion aus 2,3-Butandiol vorteilhafter sein. Zum einen stellt die Acetatgruppe gegenüber der Hydroxylgruppe eine deutlich bessere Abgangsgruppe dar, zum anderen kann bei der Reaktion ein energetisch besonders vorteilhafter 6-gliedriger Übergangszustand durchlaufen werden, was einen deutlichen Effekt auf Reaktivität, sprich Umsatz, und die Selektivität haben sollte (Abbildung 47 und Abbildung 48).

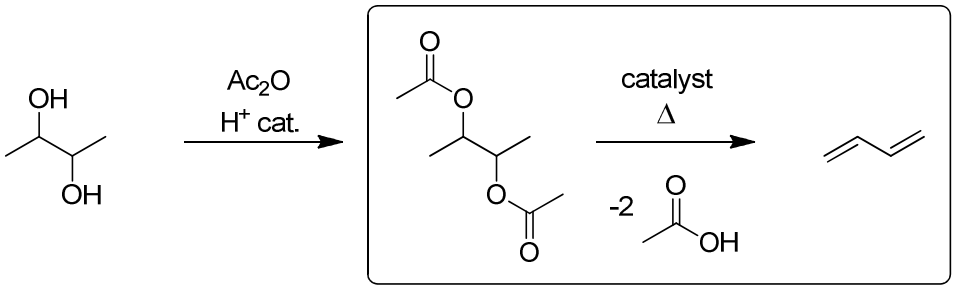



**Abbildung 47: Veresterung von 2,3-Butandiol mit anschließender Eliminierung zum 1,3-Butadien**

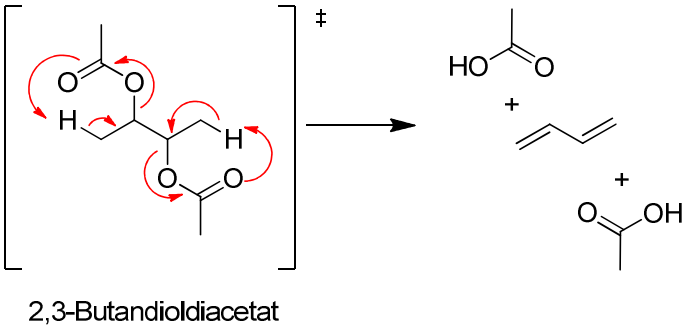



**Abbildung 48: Für die Eliminierung energetisch vorteilhafter 6-gliedriger Übergangszustand**

In einer ersten Studie sollte die Umsetzung des 2,3-Butandioldiacetats in Flüssigphase untersucht werden. Bei den Versuchen wurden 150,0 g 2,3-Butandioldiacetat und 0,4 g des jeweiligen Katalysators eingesetzt. Bei einer Versuchstemperatur von 250 °C betrug die Reaktionsdauer im Allgemeinen vier Stunden. Maximale Selektivitäten von 30% für MEK und 6% für Butadien wurde beobachtet (Abbildung 49), was für ein industrielles Verfahren nicht ausreicht.

In einer Gasphasenreaktion bei erhöhter Temperatur (575-600 °C) kann der 2,3-Butandioldiacetat zwei Moleküle Essigsäure abspalten und das gewünschte Diolefin bilden (Abbildung 47). Die Synthese kann als eine thermische, homogene Gasphasenreaktion beschrieben werden, die sich in zwei Reaktionsschritte gliedern lässt. In einem ersten Reaktionsschritt wird ein Molekül an Essigsäure abgespaltet und es bildet sich das Intermediat 2-Acetoxy-but-3-en (Monoester). Die Abspaltung des zweiten Moleküls Essigsäure, in einem zweiten Reaktionsschritt, liefert 1,3-Butadien.

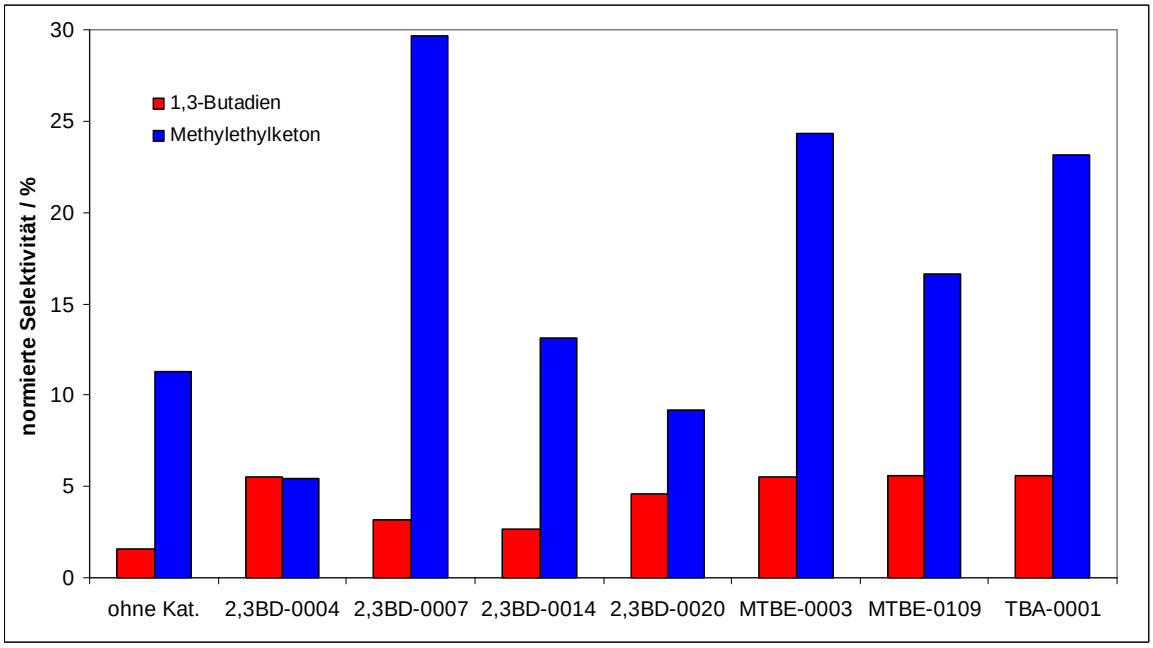



**Abbildung 49: Vergleich der normierten Selektivitäten von 1,3 Butadien und Methylethylketon**

Einige Nebenreaktionen können ebenfalls stattfinden (Abbildung 50). Bei niedrigerer Temperatur wird ein Molekül Essigsäureanhydrid abgespaltet und es entsteht Methylethylketon (MEK). Bei zu hoher Temperatur kann das Butadien weiter reagieren: mit einer Diels-Alder Reaktion bildet sich Vinylcyclohexen (VCH) und weitere Reaktionen führen zu Oligomeren bzw. Polymeren.

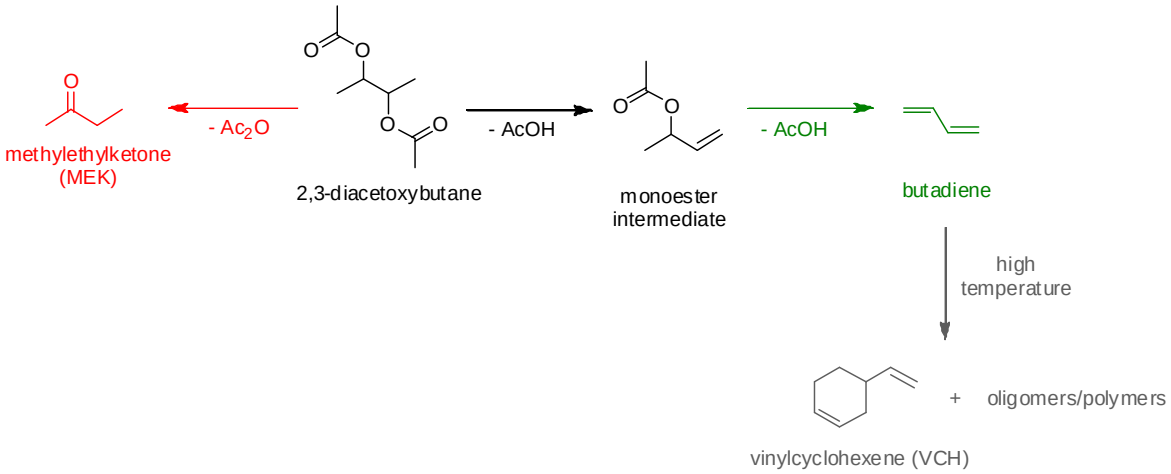



**Abbildung 50: Mögliche Reaktionen aus 2,3-Butandioldiacetat**

Dazu hat eine Aspen-Simulation gezeigt, dass die Selektivität in Richtung Butadien höher bei einer höheren Temperatur ist (Abbildung 51). Bei niedrigerer Temperatur soll MEK das Hauptprodukt sein. Es ist also besonders sinnvoll, die Reaktion bei hoher Temperatur in der Gasphase statt bei 250°C in der Flüssigphase durchzuführen.

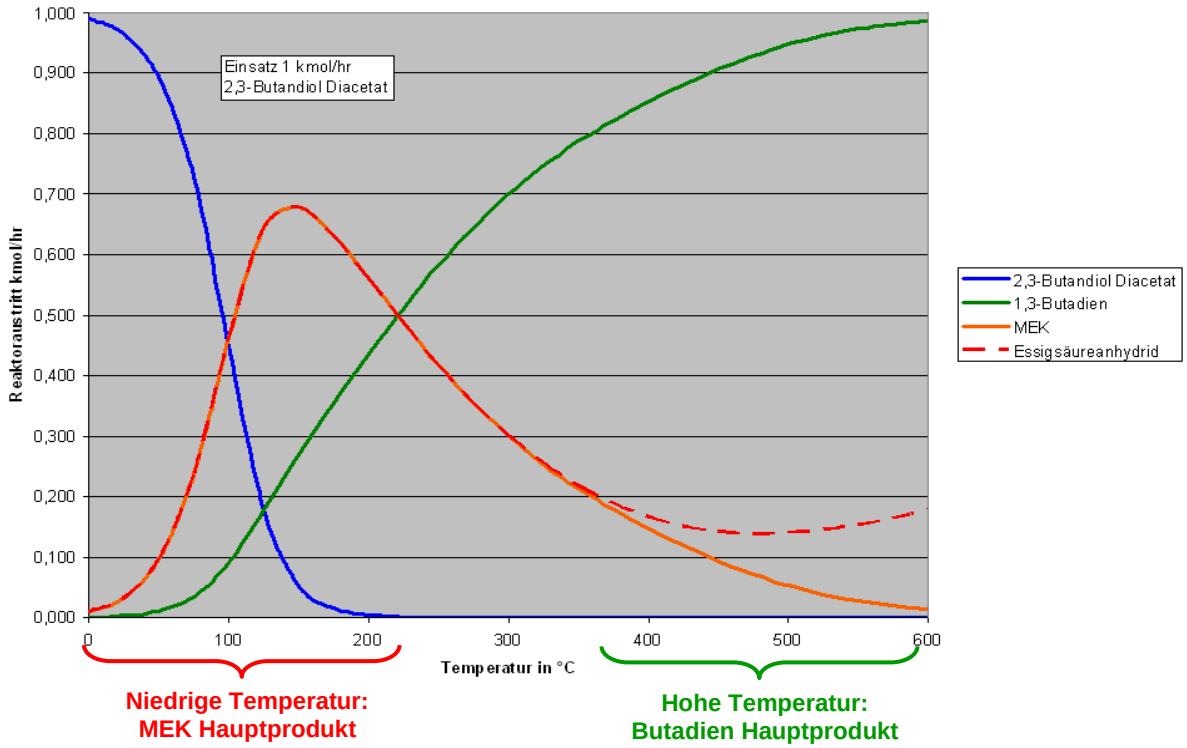



**Abbildung 51: Aspen-Simulation der Dehydratisierung von 2,3-Butandioldiacetat**

Die Apparatur zur Dehydratisierung (Abbildung 52) von 2,3-Diacetoxybutan darf nur mit einem Sicherheitskonzept betrieben werden.

Von dem Flüssiggas 1,3-Butadien, das in dieser Reaktion hergestellt werden soll, geht ein hohes Gefahrpotential aus. Aus diesem Grund ist zu gewährleisten, dass zu keinem Zeitpunkt ein Kontakt mit 1,3-Butadien besteht. Hierfür ist eine geschlossene Apparatur zu verwenden, die in einer Abzugskapelle mit hoher Luftumwälzung betrieben wird. Des Weiteren wird der Reaktor über einen längeren Zeitraum mit dem Inertgas Stickstoff gespült und während des Betriebs wird ein geringer Stickstoffstrom durch die Anlage geleitet. Entstehende Gase werden über einen direkten Anschluss an die Abluft abgeführt. Hier findet eine weitere Verdünnung der Abgase mit der zehnfachen Menge an Stickstoff statt.

Die Dehydratisierung wird drucklos betrieben. Um einen möglichen Druckaufbau zu verhindern und die innere Sicherheit des Reaktors zu gewährleisten, findet eine Absicherung über ein Sicherheitsventil (6 bar) statt, welches ebenfalls mit der Abluft direkt verbunden ist.

Die Synthese von 1,3-Butadien wird bei Temperaturen von 250 °C bis 550 °C durchgeführt. Es soll mit Hilfe einer Temperatursteuerung mit Übertemperaturschutz gewährleistet werden, dass zu keinem Zeitpunkt eine Überhitzung der Anlage entstehen kann.
In der Reaktion entstehende Hochsieder, die bei Raumtemperatur nicht gasförmig sind, sind in einem geeigneten Behälter zu kondensieren und aufzufangen.

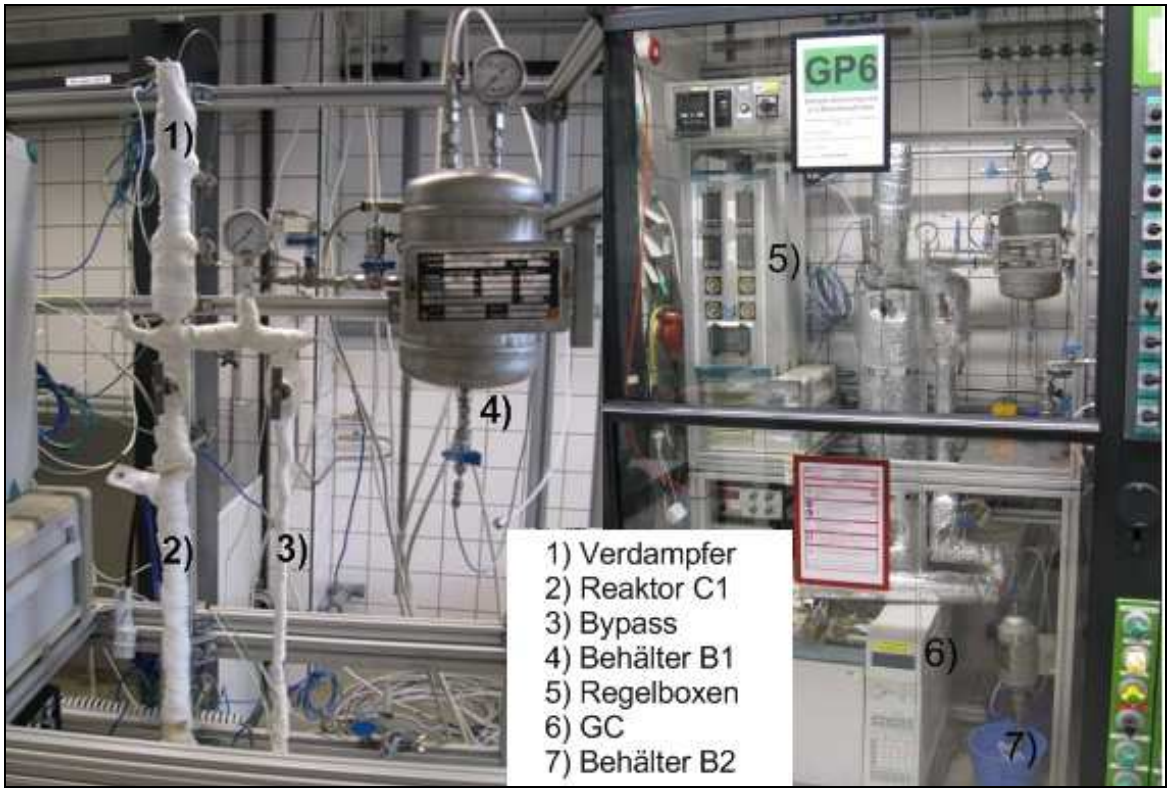



**Abbildung 52: Aufbau der Apparatur zur Dehydratisierung von 2,3-Diacetoxybutan**

Aufgrund der hohen Temperaturen die für die Dehydratisierung im Rahmen dieser Arbeit benötigt werden, muss der verwendete Edelstahl (Präzisionsrohre aus V4A-Stahl) oberhalb seiner normalen Betriebstemperatur (450 °C bei Umgebungsdruck) betrieben werden. Es wird festgelegt, dass die Rohrinnentemperatur nicht höher als 600 °C gewählt wird und nach einer Betriebszeit von maximal 40 h bzw. nach Abkühlen auf Raumtemperatur das Rohrstück nicht mehr verwendet werden darf und gegen ein fabrikneues Rohrstück ausgetauscht wird. Zuerst werden drei Katalysatoren eingesetzt und deren Einfluss auf die Reaktion untersucht. Hierfür werden die AlumoSilikate Davicat O 701, Siralox 40, sowie MOX 170 verwendet (Tabelle 18).

**Tabelle 18: Zusammensetzung der Katalysatoren**

| Katalysator | $Al_2O_3$ (%) | $SiO_2$ (%) | D (mm) |
|---|---|---|---|
| Siralox 49 | 60,9 | 39,1 | 1,0-3,0 |
| Davicat O 701 | 15,0 | 72,0 | 1,0-2,8 |
| MOX 170 | 0,9 | 99,1 | 1,0-3,0 |

Die Dehydratisierung des Diesters wurde bei 250 bis 450 °C mit einem Massenstrom von 16,19 g/h durchgeführt. Trotz sehr hoher Umsätze blieb die Ausbeute am Butadien oft gering (im besten Fall 58%). Grund dafür ist ein hoher Anteil an Methylethylketon und sehr viele Nebenprodukte. In GC Chromatogramme wurden zahlreiche Peaks beobachtet, unter Anderen sind verschiedene aromatische Verbindungen und Oligomere zu erkennen.

Während der Reaktion ist innerhalb der Anlage ein Druckaufbau bis auf 3 bar festzustellen. Analog hierzu ist zu erkennen, dass der Umsatz der Reaktion mit zunehmendem Druckanstieg rückgängig ist. In Folge dessen wurden die Versuche abgebrochen und die Anlage heruntergefahren. Dazu zeigte die Katalysatoren nach dem Betrieb eine schwarze Verfärbung (Abbildung 53).

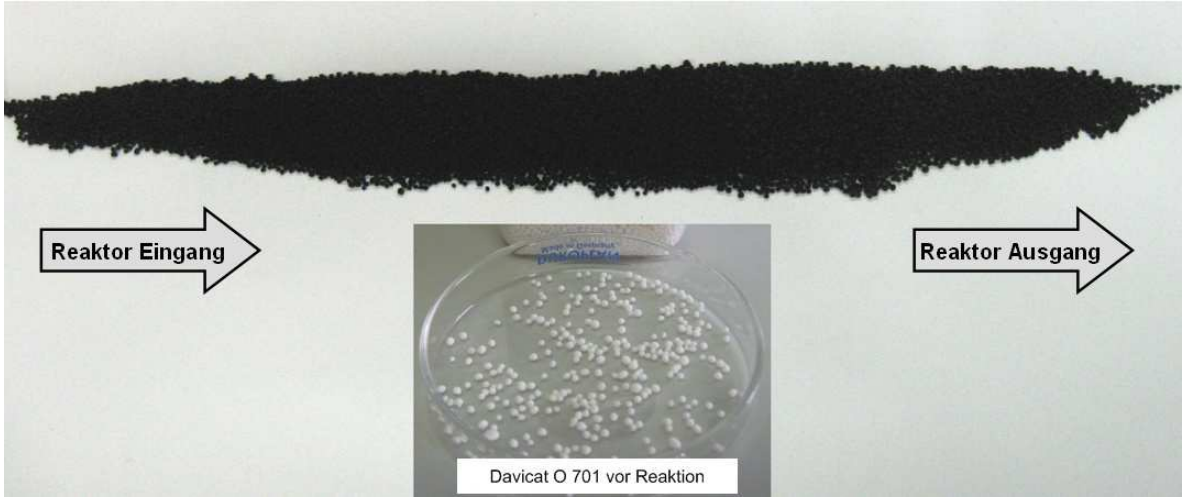



**Abbildung 53: Verfärbung von Davicat O 701 nach ca. acht Betriebsstunden**

Die Spaltung von 2,3-Diacetoxybutan in der Gasphase ist also in Gegenwart von Alumosilikaten sehr unselektiv. Aus diesem Grund wurde dann die thermische Spaltung ohne Katalysator untersucht.

Im Rahmen der thermischen Versuche wird der Rohrreaktor mit Quarzbruch (d=0,5-2 mm) befüllt. Es werden Temperaturen von 350-550°C getestet. Für jede Temperatur werden unterschiedliche Massenströme an 2,3-Diacetoxybutan untersucht, um den Einfluss der Verweilzeit auf die Reaktion zu ermitteln (Tabelle 19).

**Tabelle 19: Versuchsplanung der thermischen Versuche**

| Versuch Nr. | Temperatur (°C) | Verweilzeiten (s) |
|---|---|---|
| 1 | 350 | 164 |
| 1 | 400 | 54-164 |
| 2 | 450 | 15-164 |
| 3 | 475 | 23-164 |
| 4 | 500 | 18-54 |
| 5 | 550 | 15-164 |

Es ist zu beobachten, dass sich die Temperaturen am Reaktoreingang, wie auch am Reaktorausgang über die Zeit nicht signifikant ändern. Des Weiteren findet kein Druckaufbau innerhalb der Apparatur statt. Entstehender Druckverluste über die Rohrleitungen sind so gering, dass sie durch das eingesetzte Manometer nicht erkannte werden können.

Mehrere Versuchsbedingungen wurden untersucht (Tabelle 20). Die Reglereinstellungen sind vor Versuchsbeginn eingestellt worden. Nach einer Vorlaufzeit von ca. einer Stunde ist mit der Dokumentation der Reaktorinnentemperaturen, sowie der gaschromatographischen Untersuchung begonnen worden.

**Tabelle 20: Umsatz, Ausbeute und Selektivität der thermischen Versuche**

| Versuch | Verweilzeit (s) | Temperatur (°C) | Umsatz (%) | Ausbeute 1,3-BD (%) | Selektivität 1,3-BD (%) | Ausbeute Monoester (%) | Selektivität Monoester (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Q1 | 53,54 | 400 | 16,37 | 0,00 | 0,00 | 3,56 | 21,77 |
| Q2 | 53,54 | 450 | 48,33 | 14,96 | 30,95 | 29,93 | 61,94 |
| Q3 | 22,95 | 450 | 45,51 | 14,18 | 31,15 | 26,23 | 57,63 |
| Q4 | 17,85 | 450 | 42,42 | 12,29 | 28,96 | 25,76 | 60,72 |
| Q5 | 14,60 | 450 | 25,12 | 5,06 | 20,15 | 16,76 | 66,70 |
| Q6 | 53,54 | 475 | 81,41 | 41,94 | 51,51 | 33,12 | 40,68 |
| Q7 | 32,11 | 475 | 75,93 | 37,49 | 49,38 | 35,20 | 46,36 |
| Q8 | 22,95 | 475 | 71,68 | 33,74 | 47,07 | 34,53 | 48,17 |
| Q9 | 53,54 | 500 | 96,69 | 72,36 | 74,84 | 19,99 | 20,68 |
| Q10 | 32,11 | 500 | 94,39 | 57,59 | 61,01 | 24,34 | 25,78 |
| Q11 | 22,95 | 500 | 97,41 | 70,85 | 72,73 | 19,04 | 19,55 |
| Q12 | 17,85 | 500 | 95,51 | 66,00 | 69,11 | 23,20 | 24,29 |
| Q13 | 22,95 | 550 | 100,00 | 77,86 | 77,86 | 6,00 | 6,00 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Q14 | 17,85 | 550 | 100,00 | 75,71 | 75,71 | 6,89 | 6,89 |
| Q15 | 14,6 | 550 | 100,00 | 75,04 | 75,04 | 7,14 | 7,14 |
| Q16 | 163,96 | 350 | 3,98 | 0 | 0 | 1,19 | 29,94 |
| Q17 | 163,96 | 400 | 25,55 | 6,00 | 23,47 | 19,23 | 75,25 |
| Q18 | 163,96 | 450 | 92,82 | 63,34 | 68,24 | 22,89 | 24,66 |
| Q19 | 163,96 | 475 | 100,00 | 76,07 | 76,07 | 8,55 | 8,59 |
| Q20 | 163,96 | 550 | 100,00 | 75,71 | 75,71 | 8,74 | 8,74 |

Aus diesen Ergebnissen beobachten wir zuerst, dass eine längere Verweilzeit bzw. eine höhere Temperatur zu einem besseren Umsatz führt (Abbildung 54). Jedoch sinkt die Selektivität ab, wenn die Bedingungen zu drastisch sind: eine Temperatur von 550 °C, kombiniert mit einer langen Verweilzeit, gibt eine schlechtere Selektivität in Richtung Butadien. Nebenreaktionen wie Diels-Alder bzw. Polymerisation können diese Beobachtung erklären.

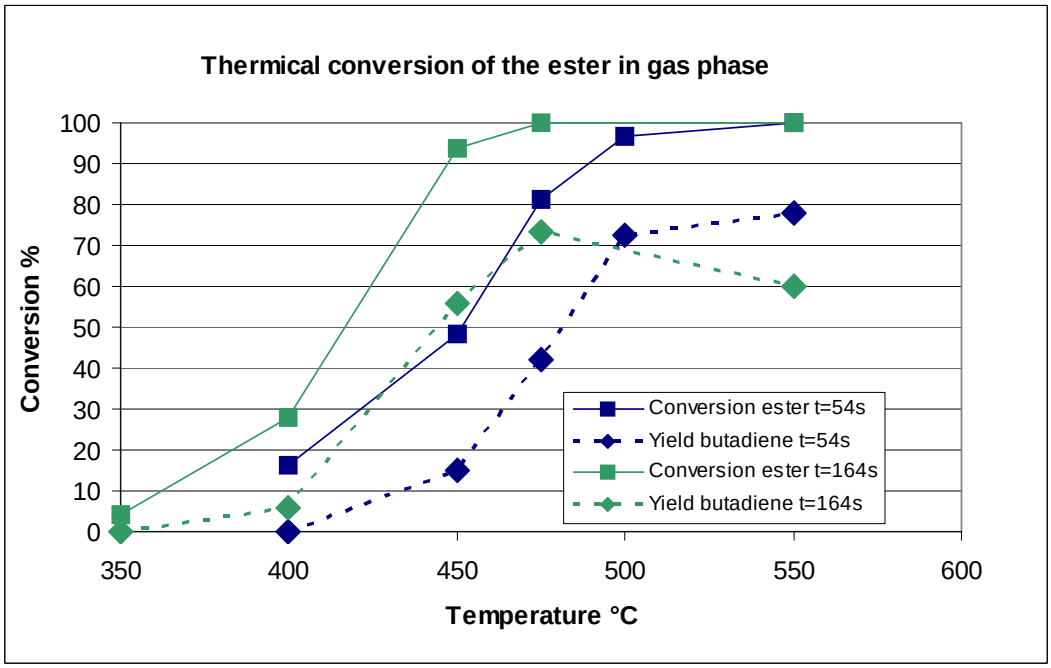



**Abbildung 54: Umsetzung von 2,3-Diacetoxybutan in der Gasphase**

Die Ausbeute des Butadiens ist proportional zu dem Umsatz an 2,3-Diacetoxybutan und eine Ausbeute von 80% konnte bei Vollumsatz erreicht werden (Abbildung 55). Außerdem ist die gesamte Ausbeute für Butadien und den Monoester Intermediat deutlich höher als Butadien allein. Das Recycling des Monoesters wäre also in einem technischen Verfahren besonders sinnvoll.

Es wurde beobachtet, dass eine längere Verweilzeit zu besseren Ausbeuten führt, jedoch mit begrenztem Effekt (Abbildung 56).

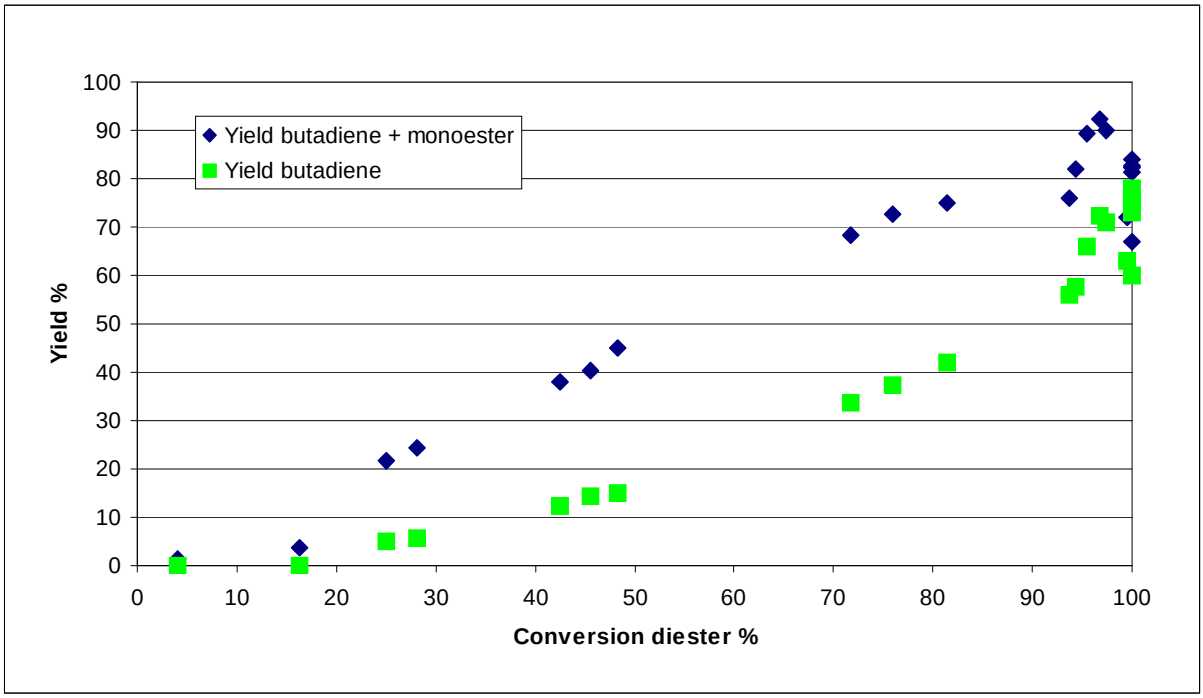



**Abbildung 55: Ausbeuten in Abhängigkeit vom Umsatz**

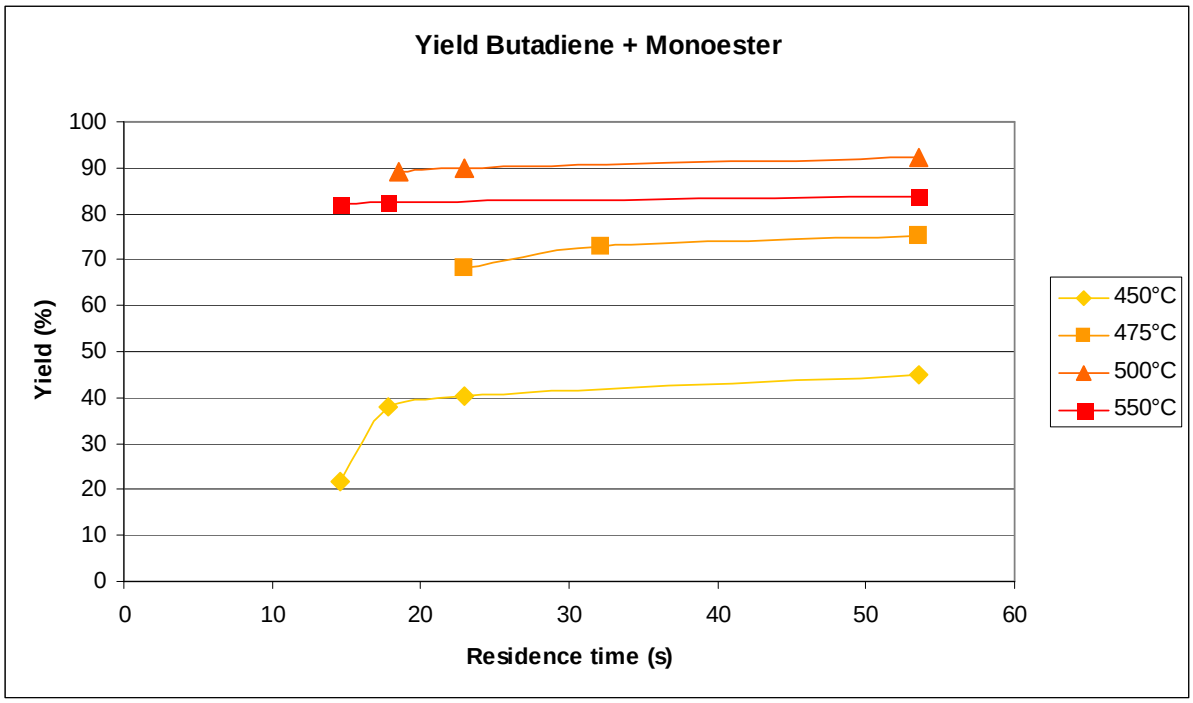



**Abbildung 56: Effekt von Temperatur und Verweilzeit**

Die Temperatur hat einen drastischen Effekt auf die Reaktion (Abbildung 57). Bei niedriger Temperatur ist der Umsatz gering und der Anteil an Methylethylketon größer als Butadien (schlechte Selektivität). Bei hoher Temperatur (T ≥550 °C) ist der Umsatz vollständig aber die Bildung von Nebenprodukten (Vinylcyclohexen und Oligomere) wird beobachtet. Die gesamte Ausbeute für Butadien und Monoester ist bei 500 °C am höchsten. Bei dieser Temperatur wird eine Selektivität von 75% in Richtung Butadien und 20% in Richtung Monoester erreicht. Es entspricht einer Selektivität von 95 % und einer gesamten Ausbeute von 92% für Butadien und Monoester.

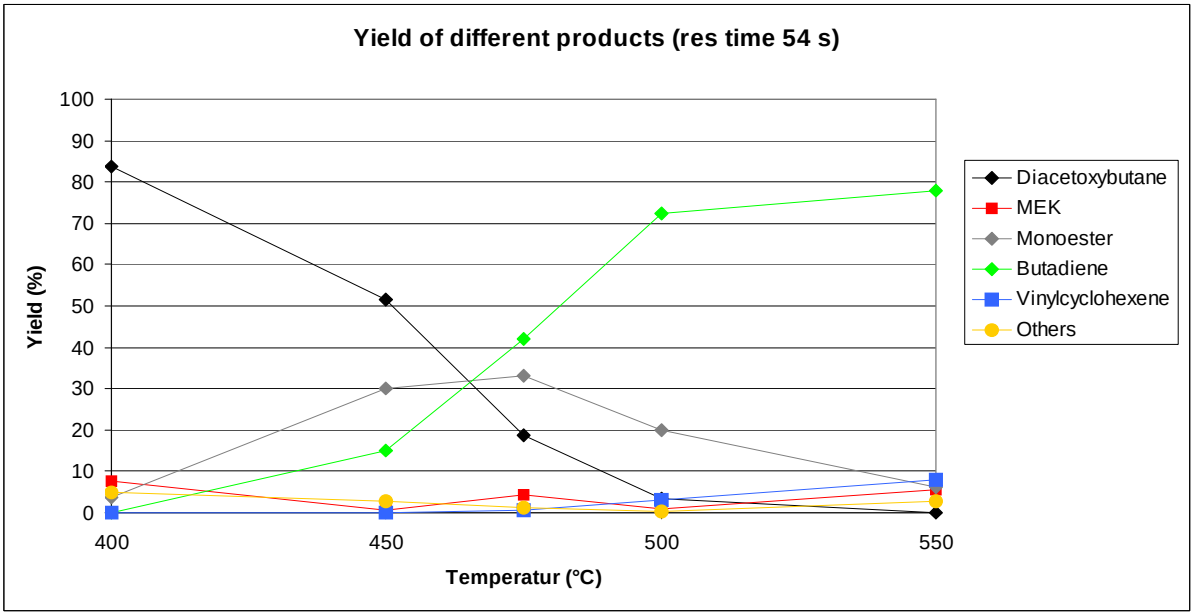



**Abbildung 57: Ausbeute der verschiedenen Produkte in Abhängigkeit von Temperatur**

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Vollumsatz des Intermediats (Monoester) vermieden werden muss, um den Anteil an Nebenprodukten möglichst niedrig zu halten. Bei einer Temperatur von 500 °C wird das 2,3-Butandioldiacetat fast vollständig umgesetzt und die gesamte Ausbeute für Butadien und Monoester ist maximal. Ein effizientes industrielles Verfahren soll also dieser unvollständigen Reaktion und dem Recycling des Monoesters entsprechen. Aus diesem Grund wurden entschieden, den Prozess bei 500 °C mit der Trennung der verschiedenen Produkte und mit den entsprechenden Recyclingströmen der unreagierten Edukte zu simulieren (Abbildung 58).

Diese Arbeit hat gezeigt, dass die industrielle Herstellung von 1,3-Butadien aus 2,3-Butandioldiacetat machbar ist. Ohne Betrachtung der Wirtschaftlichkeit ist es also technisch möglich, die Spaltung von 2,3-Butandioldiacetat in der Gasphase für die hochselektive Herstellung von 1,3-Butadien durchzuführen.

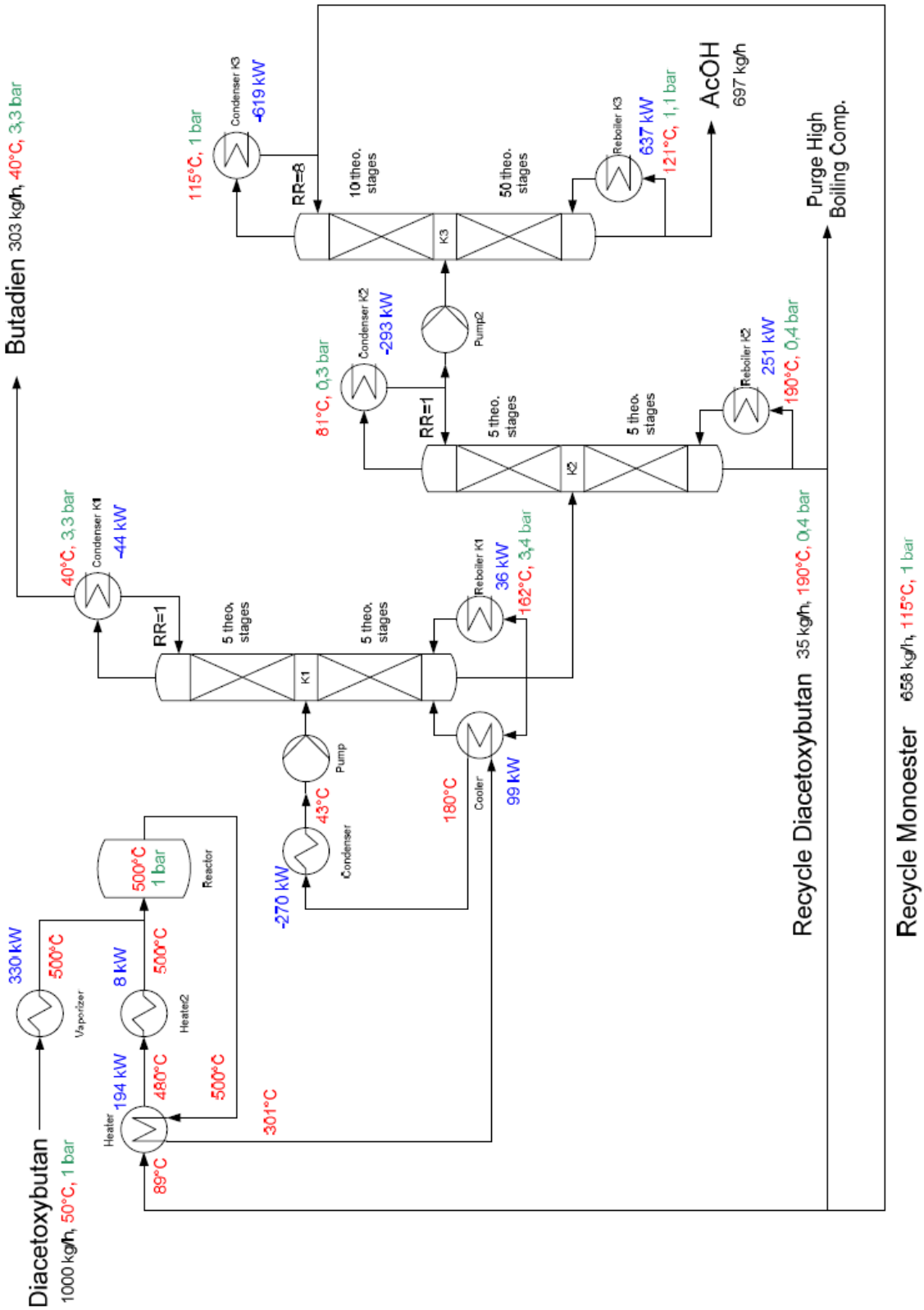



**Abbildung 58: Aspen Simulation eines möglichen industriellen Verfahrens**

# WP 6: Prozessökonomie und Nachhaltigkeit (ED, SZ, vTIBS)

Der Einsatz von Biomasse für die stoffliche Nutzung wird als die Lösung für den Ersatz abnehmender fossiler Kohlenstoff-Quellen angesehen. Ziel dieser Studie ist die vergleichende Bewertung der 2,3-Butandiol Herstellung aus fossilen Ressourcen bzw. aus nachwachsenden Rohstoffen (Glucose, Saccharose, Holz aus Kurzumtriebsplantagen) und Reststoffen (Rohglycerin und Zuckerrübenschnitzel).

## Methodik

Die Studie wurde in Anlehnung an die Normen ISO 14040/44 durchgeführt und die verschiedenen Herstellungsprozesse mit der Software Umberto® 5.6 modelliert. Als funktionelle Einheit wurde 1 t 2,3-Butandiol definiert.

Die betrachtete Systemgrenze ist das Fabriktor; es wurden alle Vorkettenemissionen sowie alle relevanten Schritte bis zur Herstellung des Endprodukts (2,3-Butandiol) berücksichtigt. Die Verteilung, Nutzung und Entsorgung von 2,3-Butandiol wurde in dieser Studie nicht untersucht, da 2,3-Butandiol sowohl als Lösungsmittel, als auch als Edukt für weitere Produkte verwendet werden kann.

Die Massenströme und der Energiebedarf der einzelnen Prozessschritte wurden von den jeweiligen Projektpartnern zur Verfügung gestellt, wobei für die endgültige Bewertung die Daten der Pilotversuche (Fermentervolumen bis zu 35 L) verwendet wurden. Die erfassten Daten wurden im Gesamtkontext einer Plausibilitätsprüfung unterworfen und durch iteratives Vorgehen mit den Projektpartnern abgestimmt. Der Energiebedarf für die destillative Abtrennung von verschiedenen 2,3-Butandiol-Konzentrationen aus den unterschiedlichen Fermentationsbrühen wurde von einem Projektpartner (SOLVAY) mit ASPEN PLUS für eine Anlagenkapazität von 50.000 Jahrestonnen berechnet und in die Ökobilanzmodelle eingefügt. Die Vorketten der Rohstoffe und Energieeinträge wurden überwiegend durch Verwendung von Ecoinvent-Datensätzen ergänzt. Als Standort für eine hypothetische Anlage wurde Deutschland gewählt und entsprechend nationale, europäische und globale Hintergrunddatensätze in abgestufter Priorität verwendet.

Es wurden einige vereinfachende Annahmen getroffen:

- Allokation wurde so weit möglich vermieden und für Nebenprodukte der Systemerweiterungsansatz verwendet. Dies entspricht den Vorgaben der ISO14040/44.
- Abschneidekriterium für Massen- und Energieströme der Einheitsprozesse betrug <1%, wobei nach Expertenkonsultation ergebnisrelevante Massenströme nicht ignoriert wurden.

Die Gesamtheit der erfassten Massen- und Energieströme (mit Ausnahme von Wasser) betrug in allen Modellen >95%.

- Die Infrastruktur wurde nicht einbezogen.
- Der Transport der Rohstoffe zur Konversionsanlage wurde nicht modelliert, da die Auswahl der Transportmittel und Entfernungen die Unsicherheit der Ergebnisse zusätzlich erhöht hätte.
- Emissionen von biogenem $CO_2$ wurden nicht berücksichtigt, da davon auszugehen ist, dass in der Wachstumsphase aufgenommenes $CO_2$ während der Produktion oder durch Nutzung innerhalb kurzer Zeit wieder in den natürlichen $CO_2$-Kreislauf zurückkehrt.
- Die Nebenprodukte der Fermentation wurden nicht berücksichtigt.

Als Wirkungsabschätzungsmethode wird CML2001 verwendet. Die in dieser Studie ausgewählten Indikatoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine bedeutende Wirkung auf das Ökosystem Erde haben, es allgemein anerkannte, wissenschaftliche Ansätze für deren Quantifizierung gibt und sie universell anwendbar sind. Indikatoren mit großer methodischer Unsicherheit, z.B. Frischwasserökotoxizität, wurden nicht berücksichtigt.

## Petrochemische Herstellung

Hintergrunddaten für die petrochemische Herstellung von 2,3-Butandiol liegen nicht vor, daher musste ein petrochemisches Referenzsystem modelliert werden. Es wurde davon ausgegangen, dass die Herstellung über die Chlorhydrin-Route aus 2-Buten erfolgt, also analog der Herstellung von 1,2-Propandiol aus Propen. Die Inventardaten aus den ecoinvent-Datensätzen für Propenoxid und Propandiol (Althaus, et al., 2007) wurden stöchiometrisch angepasst und mit Daten aus Myszkowski, et al. (1965) ergänzt, um die petrochemische Herstellung von 2,3-Butandiol zu modellieren.

## Prozessbeschreibung

Für die petrochemische Produktion von 2,3-Butandiol wurde ein $C_4$-Raffinat aus Steamcracking-Prozessen der Mineralöl-Raffination als Ausgangsstoff verwendet. Nach der Elimination von Isobuten durch protonkatalysierte Addition von Methanol (Behr, et al., 2005), werden die 1- (56 Gew.-%) und 2-Butene (44 Gew.-%), nach Weissermel et al. (1998, S. 75, High severity Steamcracking of Naphtha) mit hypochloriger Säure zu Chlorhydrinen umgesetzt. Diese werden durch Zugabe von Natriumhydroxid epoxidiert. Die dabei entstehenden Butenoxide werden anschließend zu den Butandiolen hydrolysiert. Auf diesem Wege entsteht 1,2-Butandiol aus 1-Buten und 2,3-Butandiol aus 2-Buten. Als Nebenprodukt liegt außerdem Methylethylketon (MEK) vor (Myszkowski, et al., 1965). Die Isolierung der Produkte wird durch Rektifikation erreicht (Gräfje, et al., 2005).

Die Endprodukte werden vom Eingangsverhältnis der 1- und 2-Butene bestimmt. Weitere 2 mol-% liegen als MEK vor (Myszkowski, et al., 1965). Es ergeben sich pro Kilogramm 2,3-Butandiol 1,27 kg 1,2-Butandiol und 0,037 kg MEK.

## Validierung des Systems

Zur Validierung des Modells wurde der kumulierte Energiebedarf (KEA), der eco-indicator 99 und der Treibhauseffekt (100 a) mit Hilfe von Umberto® berechnet und mit dem theoretischen Ansatz von Wernet, et al. (2009) verglichen. Zusätzlich wurden die Umweltwirkungen für die Herstellung von 1 t 1,4-Butandiol berechnet, obwohl sich die Herstellungsprozesse von 1,4- und 2,3-Butandiol erheblich unterscheiden.

Tabelle 21 zeigt, dass die modellierten Ergebnisse mit den Ergebnissen nach dem neuronalen Netzwerk Ansatz von Wernet (Wernet, et al., 2009) für den Treibhauseffekt und den kumulierten Energiebedarf gut übereinstimmen. Lediglich der eco-indicator 99 der modellierten 2,3-Butandiol-Herstellung weicht leicht ab. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Die petrochemische Herstellung von 2,3-Butandiol wird im Folgenden als Referenzsystem beim Vergleich von biobasiertem 2,3-Butandiol herangezogen.

**Tabelle 21: Berechnete Werte für die Produktion von 1 t 2,3-Butandiol (2,3-BD) für den kumulierten Energiebedarf, eco-indicator 99 und den Treibhauseffekt (GWP), verglichen mit Ergebnissen nach der Methode von Wernet, et al. (2009) und einem ecoinvent-Datensatz zur Herstellung von 1,4-Butandiol**

| | **GWP** [kg $CO_2$-eq/t 2,3-BD] | **Kumulierter Energiebedarf** [MJ-eq/t 2,3-BD] | **eco-indicator 99** [Punkte/t 2,3-BD] |
|---|---|---|---|
| Petrochemisch | 3405 | 86386 | 230 |
| Gemäß Wernet, et al., (2009) | 3190 ± 1220 | 88000 ± 28400 | 290 ± 30 |
| 1,4-Butandiol, ecoinvent | 4161 | 93496 | 277 |

## Produktion von 2,3-Butandiol aus Biomasse

Für die Herstellung von 2,3-Butandiol aus Biomasse wurden nachwachsende Rohstoffe (Glucose, Zuckerrübendicksaft, Holz), agrarische Reststoffe (Zuckerrübenschnitzel) und Reststoffe aus der Herstellung von Biodiesel (Rohglycerin) verwendet. Die jeweiligen Biomassesubstrate werden vorbehandelt und anschließend fermentativ umgesetzt. Danach wird 2,3-Butandiol aus der Fermentationsbrühe destillativ abgetrennt. Zuckerrübenschnitzel (ZRS) und Holz müssen vor der Beschickung des Fermenters hydrolytisch aufgebrochen und nachbehandelt werden, während

Dicksaft, Glucose und Rohglycerin direkt eingesetzt werden können (siehe Abbildung 59). Die Fermentationsbrühe wird gegebenenfalls vor der Destillation durch Zentrifugation oder andere geeignete Verfahren aufgereinigt.

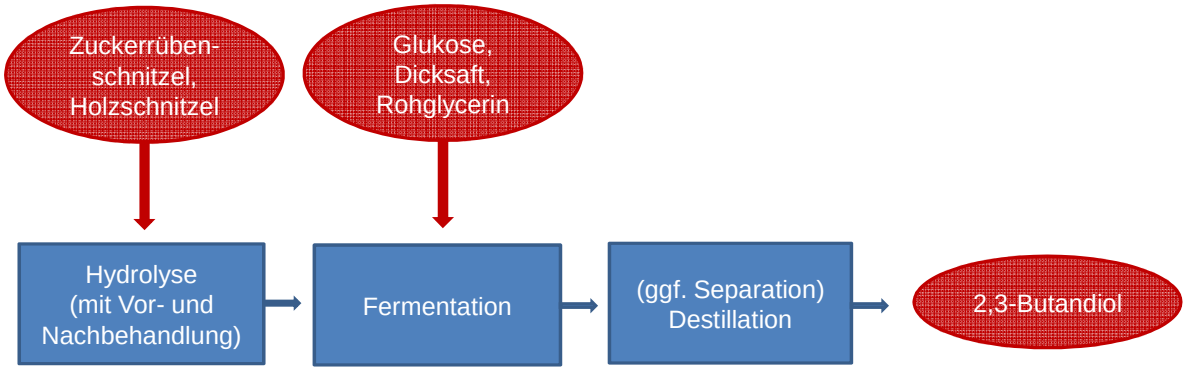



**Abbildung 59: Prozessschema der biotechnologischen Herstellung von 2,3-Butandiol aus nachwachsenden Rohstoffen (Glucose, Dicksaft oder Holz) und Reststoffen (Zuckerrübenschnitzel oder Rohglycerin)**

## Herstellung aus Glucose

Es wurde eine Glucose-Herstellung durch enzymatische Hydrolyse aus Maisstärke nach Anuradha, et al. (1999) angenommen. Die dabei benötigte Energie wurde für eine angenommene Temperaturerhöhung von 20 °C auf 55 °C berechnet.

## Herstellung aus Rohglycerin

Rohglycerin, ein Produktionsrückstand aus der Biodieselherstellung, kann ohne weitere Aufbereitung direkt in die Fermentation eingespeist werden. Daher wurde analog zur Methodik der Erneuerbaren Energien Richtlinie (Europäische Union, 2009) keine Vorkettenbelastung angerechnet.

## Herstellung aus Dicksaft

Dicksaft wird in der Zuckerproduktion aus Zuckerrüben hergestellt. Bei der Dicksaftproduktion entstehen Carbokalk und Zuckerrübenschnitzel als Nebenprodukte. Als Systemerweiterung wurde angenommen, dass der Carbokalk in der Landwirtschaft Kalkstein substituiert, überschüssige Elektrizität dem deutschen Stromnetz zugeführt wird und Zuckerrübenschnitzel als proteinreiches Viehfutter Weizen ersetzen. Die substituierte Menge an Weizen wurde nach dem Verhältnis der metabolischen Energie-Gehalte von Zuckerrübenschnitzeln und Weizen berechnet (Menke, et al., 2004) (Stalljohann, 2009). Zusätzlich wurde das ökonomische Allokationsverfahren eingesetzt, um die Auswirkungen des methodischen Ansatzes zu quantifizieren.

## Herstellung von Zuckerrübenschnitzel-Hydrolysat

Zückerrübenschnitzel (ZRS) sind ein Nebenprodukt aus der Dicksaft-Produktion zur Zuckergewinnung. Vor der Fermentation werden sie hydrothermal vorbehandelt und einer enzymatischen Hydrolyse

unterzogen. Bei der Nachbehandlung des Hydrolysats entsteht Zentrifugationsrückstand, für den eine Entsorgung in einer städtischen Müllverbrennungsanlage angenommen wurde.

## Herstellung von Holz-Hydrolysat

Zur Bereitstellung des Holzes wurde eine Kurzumtriebsplantage mit Pappeln nach Rödel (2008) mit vierjährigen Wachstumsperioden ohne Düngerzugabe und einer Produktion von 8 t absolut trockenen Holzes pro Hektar und Jahr, sowie einer Gesamtlaufzeit von 16 Jahren angenommen. Die Holzschnitzel werden einem Dampfaufschluss unterzogen. Das dabei entstehende Abwasser kann einer Biogasanlage zugeführt werden. Das aufgeschlossene Substrat wird hydrolysiert und der Rückstand abzentrifugiert. Das gereinigte Hydrolysat wird als Fermentationssubstrat verwendet, der ligninreiche Rückstand wird zur Energiegewinnung eingesetzt.

## Ökobilanzen

Die experimentell erfassten Daten wurden für die Sachbilanz verwendet und die Modelle mit relevanten Hintergrunddatensätzen aus der ecoinvent-Datenbank ergänzt. Weiterhin wurden Best-Case-Szenarien für Dicksaft und Rohglycerin bei maximaler 2,3-Butandiol-Fermentationsausbeute berechnet. Die maximale 2,3-Butandiol-Konzentration wurde mit Glucose erzielt und betrug ca. 140 g/L.

Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die Substitution eines Teils des Zuckers durch Hydrolysat auf die Ökobilanz auswirkt. Um den Einfluss des methodischen Ansatzes abzuschätzen, wurde für Dicksaft als Substrat sowohl Systemerweiterung als auch ökonomische Allokation verwendet.

## Ergebnisse Systemerweiterung

Bei der Verwendung von Dicksaft als Substrat ergeben sich niedrigere Umweltwirkungen als bei dem petrochemischen Vergleichsprozess, wenn das Verfahren der Systemerweiterung angewandt wird. Die Umweltwirkungen sind in Tabelle 22 dargestellt. Das Versauerungspotential ist um 80% geringer. Das Eutrophierungspotential beträgt -115% und das Humantoxizitätspotential -157% des petrochemischen Prozesses. Das photochemische Ozonbildungspotential und der stratosphärische Ozonabbau sind um 50% bzw. 83% niedriger als bei der petrochemischen Herstellung. Der Treibhauseffekt ist um 18% geringer.

## Ergebnisse Ökonomische Allokation

Werden Nebenprodukte anstatt mit Systemerweiterung mit ökonomischer Allokation einbezogen, ergeben sich für alle Wirkungskategorien deutlich höhere Werte (siehe Tabelle 22), so dass

Versauerungspotential (ACP), Treibhauseffekt (GWP), Eutrophierungspotential (EP) und Humantoxizitätspotential (HTP) die Werte des Referenzsystems um 5,7%, 23%, 104% und 21% übersteigen. Photochemisches Ozonbildungspotential (POCP) und stratosphärisches Ozonabbaupotential (ODP) sind zwar um 25 bzw. 22% höher als mit Systemerweiterungen, übersteigen aber nicht die Werte der petrochemischen Herstellung.
Um abzuschätzen, wie sich die Umweltwirkung dieses Prozesses bei weiterer Optimierung entwickelt, wird ein Best-Case-Szenario modelliert.

In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der Systeme mit Glucose, Rohglycerin und Dicksaft der petrochemischen Produktion gegenüber gestellt.

**Tabelle 22: Vergleich ausgewählter Wirkungskategorien für die Herstellung von 1 t 2,3-Butandiol auf petrochemischem und biotechnologischem Wege (SE = Systemerweiterung, ÖA = Ökonomische Allokation)**

| | Petrochemisch | Glucose | Roh-Glycerin | Dicksaft SE | Dicksaft ÖA |
|---|---|---|---|---|---|
| ACP | 12,4 | 16,4 | 7,6 | 2,5 | 13,1 |
| GWP | 3405 | 4335 | 4784 | 2776 | 4175 |
| EP | 7,4 | 24,6 | 16,2 | -8,5 | 15,1 |
| HTP | 332 | 473 | 533 | -522 | 403 |
| POCP | 0,56 | 0,31 | 0,37 | 0,28 | 0,35 |
| ODP | 0,00158 | 0,00035 | 0,00032 | 0,00027 | 0,00033 |

**Grün markierte Werte sind kleiner als die des petrochemischen Vergleichssystems. Versauerungspotential: EU-Durchschnitt, Treibhauseffekt: 100 a, Eutrophierungspotential: Generisch, Humantoxizitätspotential: 100 a, photochemisches Ozonbildungspotential: High $NO_x$, stratosphärisches Ozonabbaupotential: Steady State, Versauerungspotential (ACP) [kg $SO_2$-Eq/t 2,3-BD], Treibhauseffekt (GWP) [kg $CO_2$-Eq/t 2,3-BD], Eutrophierungspotential (EP) [kg $PO_4$-Eq/t 2,3-BD], Humantoxizitätspotential (HTP) [kg 1,4-DCB-Eq/t 2,3-BD], photochemisches Ozonbildungspotential(POCP) [kg Ethylen/t 2,3-BD], stratosphärisches Ozonabbaupotential (ODP) [kg CFC-11-/t 2,3-BD]**

Der Prozess mit Rohglycerin zeigt im Vergleich zum petrochemischen Prozess ein um 80% geringeres Potential zum stratosphärischen Ozonabbau. Auch Versauerungspotential und photochemisches Ozonbildungspotential machen lediglich 61% und 66% des petrochemischen Prozesses aus. Diese geringeren Umweltwirkungen resultiert daraus, dass Rohglycerin ohne Vorkettenemissionen in dem Prozess direkt verwendet werden kann. Allerdings sind der Treibhauseffekt, das Eutrophierungspotential und das Humantoxizitätspotential bei Verwendung von Rohglycerin um 40, 119 und 61% höher als bei der petrochemischen Herstellung. Abbildung 60 zeigt, dass dies vor allem

auf den hohen Energiebedarf der Fermentation und der Destillation zurückzuführen ist. Folglich ist bei dem Best-Case-Szenario eine Verringerung des Energiebedarfs und damit einhergehende kleinere Werte für Humantoxizitätspotential, Eutrophierungspotential und Treibhauseffekt zu erwarten.

Wird Glucose als Rohstoff für die Herstellung von 2,3-Butandiol verwendet, zeigt sich im Vergleich zum petrochemischen Prozess bei der Eutrophierung ein um den Faktor 3,3 höherer Wert. Versauerungspotential, Treibhauseffekt, und Humantoxizitätspotential sind um 27 – 43% höher. Abbildung 61 zeigt, dass dies vor allem durch die Bereitstellung des Substrats verursacht wird.

Glucose wird aus Maisstärke gewonnen. Der Einsatz von Dünge- und Pflanzenschutzmitteln, sowie der Anbau von Gründüngung führen zur Freisetzung eutrophierender und versauernder Substanzen, sowie klimawirksamer Gase. Dadurch sind das Eutrophierungspotential, das Versauerungspotential und der Treibhauseffekt höher als bei der petrochemischen Herstellung. Niedrigere Werte als beim Referenzsystem zeigen sich beim photochemischen Ozonbildungspotential (55%), sowie dem stratosphärischen Ozonabbau (22%). Diese liegen in einer ähnlichen Größenordnung, wie bei den Prozessen mit Rohglycerin und Dicksaft.

Die Zucker aus Holz- und ZRS-Hydrolysat können ebenfalls als Substrat bei der Fermentation eingesetzt werden, allerdings ist die Zuckerkonzentration in den Hydrolysaten geringer als die bei der Fermentation erwünschte. Um eine energieaufwendige Aufkonzentrierung der Hydrolysate zu vermeiden, können die erforderlichen Zuckerkonzentrationen durch Zugabe von Zucker oder Dicksaft eingestellt werden.

**Tabelle 23: Vergleich ausgewählter Wirkungskategorien für die Herstellung verschiedener Substrate mit 1 t Zuckergehalt (Saccharose-Äquivalente) (ÖA = Ökonomische Allokation, ZR = Zuckerrüben, ZRS = Zuckerrübenschnitzel, angenommene Wärmetauscher-Effizienz beim ZRS-Aufschluss: 60 %)**

| | **Zucker aus ZR** (Jungbluth, et al., 2007) | **Dicksaft (ÖA)** | **Glucose** | **ZRS-Hydrolysat** | **Holz-Hydrolysat** |
|---|---|---|---|---|---|
| ACP | 3,29 | 2,44 | 5,75 | 3,87 | 10,7 |
| GWP | 461 | 431 | 1085 | 1973 | 2363 |
| EP | 2,72 | 1,92 | 8,47 | 7,30 | 5,14 |
| HTP | 76,2 | 34,3 | 107,5 | 201,7 | Nicht bestimmt |
| POCP | 0,0312 | 0,0425 | 0,0660 | 0,1674 | 47,47 |
| ODP | 0,0000383 | 0,0000421 | 0,0000868 | 0,0001176 | 0,0001133 |

**Versauerungspotential: EU-Durchschnitt, Treibhauseffekt: 100 a, Eutrophierungspotential: Generisch, Humantoxizitätspotential: 100 a, photochemisches Ozonbildungspotential: High $NO_x$, stratosphärisches Ozonabbaupotential: Steady State, Versauerungspotential (ACP) [kg $SO_2$-Eq/t 2,3-BD], Treibhauseffekt (GWP)**

**[kg $CO_2$-Eq/t 2,3-BD], Eutrophierungspotential (EP) [kg $PO_4$-Eq/t 2,3-BD], Humantoxizitätspotential (HTP) [kg 1,4-DCB-Eq/t 2,3-BD], photochemisches Ozonbildungspotential(POCP) [kg Ethylen/t 2,3-BD], stratosphärisches Ozonabbaupotential (ODP) [kg CFC-11-/t 2,3-BD]**

Tabelle 23 zeigt, dass die Umweltbelastungen mit Ausnahme der Eutrophierung bei der Verwendung von Holz und ZRS deutlich größer sind als bei Verwendung von Saccharose oder Glucose. Geht man davon aus, dass 60 % der Wärme aus dem ZRS-Aufschluss zurückgewonnen werden, ergibt sich ein um 17 % geringeres Eutrophierungspotential als bei der Verwendung von Glucose. Verglichen mit Dicksaft (ökonomische Allokation) ergibt sich ein um den Faktor 3,8 höheres Eutrophierungspotential. Durch den hohen Elektrizitätsbedarf für Hydrolyse und Aufbereitung des ZRS-Hydrolysats ist das Versauerungspotential um 59 % höher als bei Zucker aus Dicksaft, während es den Wert der Glucose-Herstellung um 33 % unterschreitet. Auf Grund dieses hohen Elektrizitätsbedarfs ergeben sich außerdem vergleichsweise hohe Werte des Zuckerrüben-Hydrolysats für Treibhauseffekt (Faktor 1,8 gegenüber Glucose, Faktor 4,6 gegenüber Dicksaft), Humantoxizitätspotential (Faktor 1,9 gegenüber Glucose, Faktor 5,9 gegenüber Dicksaft), stratosphärisches Ozonabbaupotential (Faktor 1,4 gegenüber Glucose, Faktor 2,8 gegenüber Dicksaft) und photochemisches Ozonbildungspotential (Faktor 2,5 gegenüber Glucose, Faktor 3,9 gegenüber Dicksaft).

Holzhydrolysat zeigt ebenso wie das ZRS-Hydrolysat lediglich ein geringeres Eutrophierungspotential als Glucose (39 % niedriger). Verglichen mit Dicksaft ist das Eutrophierungspotential um den Faktor 2,7 höher. Aufgrund des hohen Energiebedarfs für den Aufschluss und die Hydrolyse ergeben sich für alle übrigen Umweltkategorien deutlich höhere Werte: Das Versauerungspotential ist um den Faktor 1,9 (Glucose) bzw. 4,4 (Dicksaft) höher, der Treibhauseffekt um 2,2 (Glucose) bzw. 5,5 (Dicksaft), das photochemische Ozonbildungspotential um 719 (Glucose) bzw. 1117 (Dicksaft) und das stratosphärische Ozonabbaupotential um 1,3 (Glucose) bzw. 2,7 (Dicksaft). Das hohe photochemische Ozonbildungspotential wird durch Kohlenwasserstoff-Emissionen verursacht. Wird die Freisetzung dieser Emissionen in einer industriellen Anlage durch geeignete Maßnahmen verhindert, ergibt sich ein entsprechend geringeres photochemisches Ozonbildungspotential.

Der Einsatz der Hydrolysate ist folglich hinsichtlich der Umweltwirkung nicht angeraten. Ersetzt man einen Teil der Glucose mit Zuckerrüben-Hydrolysat, sinken Versauerungs- und Eutrophierungspotential zwar um 8,5 bzw. 6,1 %, die übrigen Wirkungskategorien steigen jedoch um 15 % (Treibhauseffekt und Humantoxizitätspotential), 5,7 % (stratosphärisches Ozonabbaupotential) und 26 % (photochemisches Ozonbildungspotential) (siehe Tabelle 24).

**Tabelle 24: Vergleich ausgewählter Wirkungskategorien für die Herstellung von 1 t 2,3-Butandiol aus Glucose, aus einer Kombination von Glucose und Zuckerrübenschnitzel-Hydrolysat (ZRS, angenommene Wärmerückgewinnung beim Aufschluss: 60 %), sowie auf petrochemischem Wege**

| | Petrochemisch | Glucose | Glucose + ZRS |
|---|---|---|---|
| ACP | 12,4 | 16,4 | 15,0 |
| GWP | 3405 | 4335 | 4992 |
| EP | 7,4 | 24,6 | 23,1 |
| HTP | 332 | 473 | 542 |
| POCP | 0,56 | 0,31 | 0,39 |
| ODP | 0,00158 | 0,00035 | 0,00037 |

**Grün markierte Werte sind kleiner als die des petrochemischen Vergleichssystems. Versauerungspotential: EU-Durchschnitt, Treibhauseffekt: 100 a, Eutrophierungspotential: Generisch, Humantoxizitätspotential: 100 a, photochemisches Ozonbildungspotential: High $NO_x$, stratosphärisches Ozonabbaupotential: Steady State, Versauerungspotential (ACP) [kg $SO_2$-Eq/t 2,3-BD], Treibhauseffekt (GWP) [kg $CO_2$-Eq/t 2,3-BD], Eutrophierungspotential (EP) [kg $PO_4$-Eq/t 2,3-BD], Humantoxizitätspotential (HTP) [kg 1,4-DCB-Eq/t 2,3-BD], photochemisches Ozonbildungspotential(POCP) [kg Ethylen/t 2,3-BD], stratosphärisches Ozonabbaupotential (ODP) [kg CFC-11-/t 2,3-BD]**

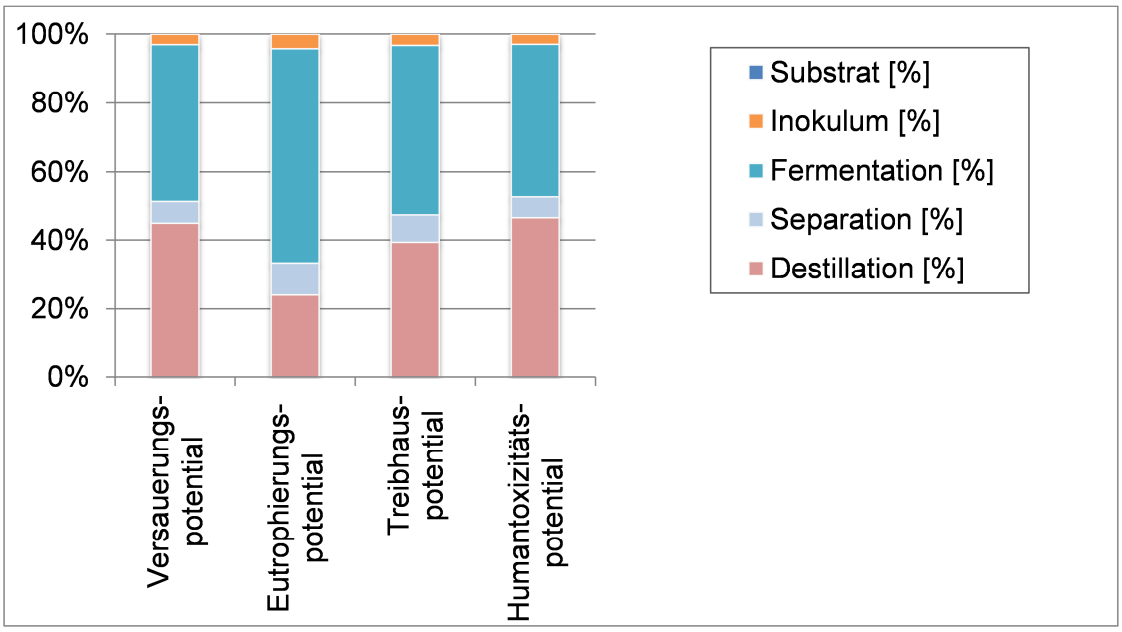



**Abbildung 60: Anteile der einzelnen Prozessschritte bei der Herstellung von 2,3-Butandiol aus Rohglycerin an dem Gesamtwert für Versauerungspotential [kg SO2-Eq/t 2,3-BD], Eutrophierungspotential [kg PO4-Eq/t 2,3-BD], Treibhauseffekt [kg CO2-Eq/t 2,3-BD] und Humantoxizitätspotential [kg 1,4-DCB-Eq/t 2,3-BD]**

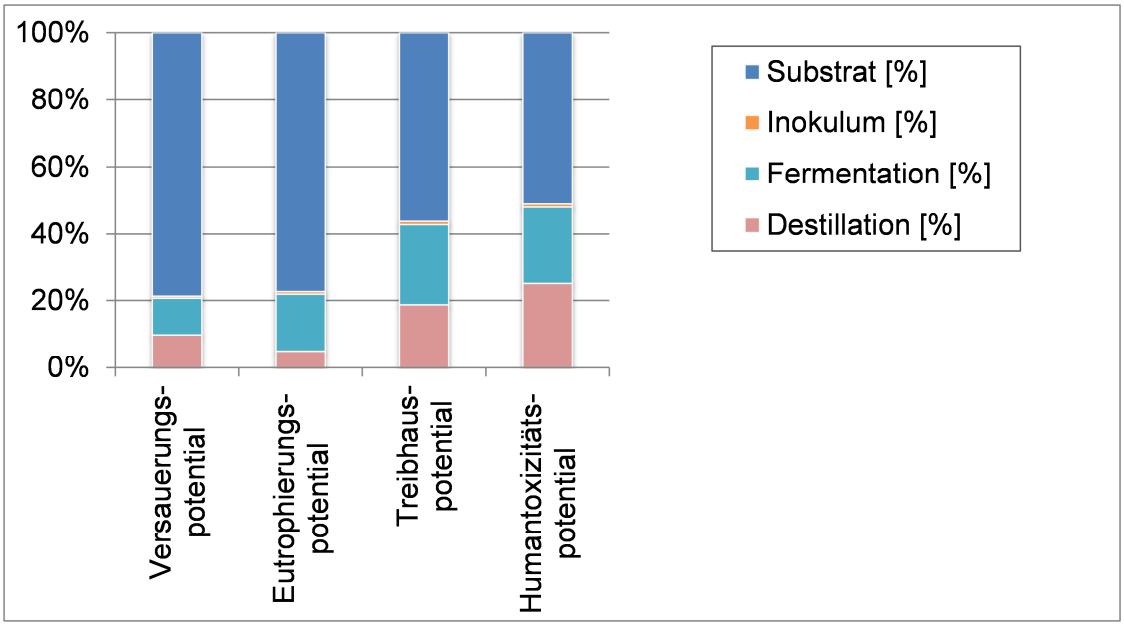



**Abbildung 61: Anteile der einzelnen Prozessschritte bei der Herstellung von 2,3-Butandiol aus Glucose an dem Gesamtwert für Versauerungspotential [kg SO2-Eq/t 2,3-BD], Eutrophierungspotential [kg PO4-Eq/t 2,3-BD], Treibhauseffekt [kg CO2-Eq/t 2,3-BD] und Humantoxizitätspotential [kg 1,4-DCB-Eq/t 2,3-BD]**

## Best-Case Szenarien

## Dicksaft

Mit Glucose als Rohstoff konnte ca. 140 g 2,3-Butandiol pro Liter Fermentationsbrühe hergestellt werden. Diese Konzentration wurde als aktuelles Best-Case-Szenario für Dicksaft und Rohglycerin angenommen.

Da die Verwendung von Dicksaft – wenn Systemerweiterung angewandt wird – bereits zuvor in allen Kategorien niedrigere Werte zeigte als die petrochemische Herstellung, setzt sich dieser Trend auch bei höheren Fermentationsausbeuten fort (siehe Tabelle 25). Wird eine 2,3-Butandiol-Konzentration von 140 g/L bei der Fermentation erreicht, sinkt das Versauerungspotential und das stratosphärische Ozonabbaupotential um 86 – 89 % im Vergleich zum petrochemischen Herstellungsprozess. Das photochemische Ozonbildungspotential ist um 68 % und der Treibhauseffekt um 51 % geringer als beim Referenzsystem.

Wird bei der Best-Case-Konzentration anstatt der Systemerweiterungen ökonomische Allokation verwendet, zeigen sich deutlich höhere Umweltwirkungen. Mit Ausnahme des Eutrophierungspotentials sind die Umweltbelastungen dennoch erheblich geringer als bei petrochemisch hergestelltem 2,3-Butandiol.

**Tabelle 25: Vergleich ausgewählter Wirkungskategorien für die Herstellung von 1 t 2,3-Butandiol aus Dicksaft und errechnete Szenarien mit höherem Produkt-Output bei gleichem Prozess-Input und Verrechnung der Nebenprodukte als Systemerweiterung (SE) bzw. mittels ökonomischer Allokation (ÖA)**

| | Petroch. | 80 g/L (erreicht, SE) | 100 g/L (SE) | 120 g/L (SE) | 140 g/L (Best Case, SE) | 140 g/L (Best Case, ÖA) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ACP | 12,4 | 2,5 | 2,2 | 1,9 | 1,7 | 7,7 |
| GWP | 3405 | 2776 | 2259 | 1922 | 1677 | 2468 |
| EP | 7,41 | -8,51 | -6,82 | -5,73 | -4,95 | 8,41 |
| HTP | 332 | -522 | -402 | -326 | -273 | 251 |
| POCP | 0,56 | 0,28 | 0,23 | 0,20 | 0,18 | 0,22 |
| ODP | 0,00158 | 0,00027 | 0,00022 | 0,00019 | 0,00017 | 0,000204 |

**Grün markierte Werte sind kleiner als die des petrochemischen Vergleichssystems. Versauerungspotential: EU-Durchschnitt, Treibhauseffekt: 100 a, Eutrophierungspotential: Generisch, Humantoxizitätspotential: 100 a, photochemisches Ozonbildungspotential: High $NO_x$, stratosphärisches Ozonabbaupotential: Steady State, Versauerungspotential (ACP) [kg $SO_2$-Eq/t 2,3-BD], Treibhauseffekt (GWP) [kg $CO_2$-Eq/t 2,3-BD], Eutrophierungspotential (EP) [kg $PO_4$-Eq/t 2,3-BD], Humantoxizitätspotential (HTP) [kg 1,4-DCB-Eq/t 2,3-BD], photochemisches Ozonbildungspotential(POCP) [kg Ethylen/t 2,3-BD], stratosphärisches Ozonabbaupotential (ODP) [kg CFC-11-/t 2,3-BD]**

## Rohglycerin

Tabelle 26 zeigt, dass der Prozess mit Roh-Glycerin als Substrat zwischen 60 und 80 g/L Produktkonzentration den Treibhauseffekt des petrochemischen Prozesses unterschreitet. Zwischen 80 und 100 g/L wird dieser Punkt auch beim Humantoxizitätspotential erreicht, während das Eutrophierungspotential noch um 5,9 % höher ist, als beim petrochemischen Prozess. Bei 120 g/L ist das Eutrophierungspotential 12 % niedriger als beim petrochemischen Prozess, so dass bei dieser Konzentration alle Umweltbelastungen geringer sind als beim Referenzsystem. Unter Best-Case Bedingungen ist das stratosphärische Ozonabbaupotential 91 % kleiner als das des Referenzsystems. Versauerungspotential und photochemischer Ozonabbau sind um ca. 75 % kleiner. Das Eutrophierungspotential erreicht einen um 30 % geringeren Wert, während der Treibhauseffekt um 47 % und das Humantoxizitätspotential um 36 % kleiner sind als beim petrochemischen Herstellungsverfahren.

**Tabelle 26: Vergleich ausgewählter Wirkungskategorien für die Herstellung von 1 t 2,3-Butandiol aus Roh-Glycerin und errechnete Szenarien mit höherem Produkt-Output bei gleichem Prozess-Input**

| | Petroch. | 50 g/L (erreicht) | 60 g/L | 80 g/L | 100 g/L | 120 g/L | 140 g/L (Best Case) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ACP | 12,4 | 7,6 | 6,5 | 5,0 | 4,1 | 3,43 | 3,0 |
| GWP | 3405 | 4784 | 4052 | 3064 | 2479 | 2079 | 1804 |
| EP | 7,41 | 16,23 | 13,44 | 9,93 | 7,85 | 6,49 | 5,22 |
| HTP | 332 | 533 | 458 | 352 | 289 | 244 | 214 |
| POCP | 0,56 | 0,37 | 0,31 | 0,24 | 0,20 | 0,17 | 0,15 |
| ODP | 0,00158 | 0,00032 | 0,00028 | 0,00022 | 0,00018 | 0,00015 | 0,00014 |

**Grün markierte Werte sind kleiner als die des petrochemischen Vergleichssystems. Versauerungspotential: EU-Durchschnitt, Treibhauseffekt: 100 a, Eutrophierungspotential: Generisch, Humantoxizitätspotential: 100 a, photochemisches Ozonbildungspotential: High $NO_x$, stratosphärisches Ozonabbaupotential: Steady State, Versauerungspotential (ACP) [kg $SO_2$-Eq/t 2,3-BD], Treibhauseffekt (GWP) [kg $CO_2$-Eq/t 2,3-BD], Eutrophierungspotential (EP) [kg $PO_4$-Eq/t 2,3-BD], Humantoxizitätspotential (HTP) [kg 1,4-DCB-Eq/t 2,3-BD], photochemisches Ozonbildungspotential(POCP) [kg Ethylen/t 2,3-BD], stratosphärisches Ozonabbaupotential (ODP) [kg CFC-11-/t 2,3-BD]**

## Ökonomische Abschätzung

Derzeit ist 2,3-Butandiol ein Nischenprodukt, dessen Preis durch Mischkalkulation an Hand des Gesamthandelsvolumens festgelegt wird. Ein einheitlicher Preis für 2,3-Butandiol konnte daher nicht ermittelt werden; nach Aussagen der Industriepartner liegt der Preis zwischen 1,5 €/kg und 25 €/kg. Wobei sich die hoch angegeben Preise mit 25 €/kg auf enantiomeren reines 2,3-Butandiol bezieht, was für die Veredelung zu MEK und 2,3-BD nicht relevant ist. Die Schwankungsbreite des Preises von petrochemisch hergestellten 2,3-Burandiol ist nicht nur bei den ökonomischen Input-Werten signifikant, dies trifft auch auf die ökologischen Input-Daten zu, daher sind die Ergebnisse mit einer entsprechenden Unsicherheit behaftet.

Expertenbefragungen zufolge liegen die jährlichen Personalkosten für eine Ethanolanlage vergleichbarer Größe bei etwa 2 Millionen € und beeinflussen demzufolge den Herstellungspreis für 2,3-Butandiol nur geringfügig. Die Investitionskosten sind von einer Reihe standortspezifischer Faktoren abhängig und lassen sich daher ohne Festlegung des Standortes ebenso wenig beziffern wie die zu erwartenden Transportkosten.

Um eine Abschätzung über Wirtschaftlichkeit und Hauptkostentreiber der entwickelten Prozesse treffen zu können, wurde aus Material- und Energiekosten ein Herstellungspreis ermittelt und mit der derzeitigen Marktpreisspanne von 2,3-Butandiol verglichen.

Auf Grund der großen Bandbreite der von den Projektpartnern angegebenen Substanzpreise wurde für die betroffenen Materialien jeweils ein Szenario mit dem günstigsten und eines mit dem höchsten angegebenen Preis berechnet. Nicht vorhandene Preise wurden durch Internetrecherche ergänzt. Als Zuckerpreis wurde 0,5 €/kg, der durchschnittliche Weltmarktpreis von Juni 2010 – November 2011, verwendet (Verband Süddeutscher Zuckerrübenanbauer e.V., 2011). Neben dem momentanen Preis, der sich zum Teil aus Großabnehmer-Preisen, zum Teil aus Kleinabnehmer-Preisen zusammensetzt, wurde eine Abschätzung eines Industriepreises durchgeführt, indem angenommen wurde, dass alle Substanzkosten, die nicht bereits Großabnehmer-Preise waren, um den Faktor 10 günstiger werden.

Die Herstellungspreise für die unterschiedlichen Substrate sind in Tabelle 27 dargestellt. Wird Glucose als Substrat verwendet, belaufen sich die Herstellungskosten auf etwa 4500 €/t 2,3-Butandiol, wobei das Fermentationsmedium mehr als zwei Drittel der Kosten verursacht.

**Tabelle 27: Vergleich des Marktpreises von 2,3-Butandiol mit dem Herstellungspreis (Industrieskala) der biotechnischen Produktion von 1 t 2,3-Butandiol auf Basis verschiedener Rohstoffe unter Verwendung der niedrigsten Substanzpreise und unter Best-Case Bedingungen**

| **Substrat** | **Preis** [€/t 2,3-Butandiol] | **Preis, Best Case** [€/t 2,3-Butandiol] |
|---|---|---|
| Markpreis | 1500 - 27000 | |
| Glucose | 4476 | 4476 |
| Rohglycerin | 1344 | 491 |
| Dicksaft | 3855 | 2272 |

Rohglycerin und Dicksaft sind nicht nur aus ökologischer Sicht die bevorzugten Substrate für die 2,3-Butandiol-Herstellung, sondern sind auch ökonomisch vorteilhafter als die anderen untersuchten Substrate. Das sagt aber noch nichts über die Verfügbarkeit der Rohstoffe aus.

Die Verfügbarkeit ist im Falle von Dicksaft gegeben, allerdings werden dazu ca. 10000 ha Agrarfläche benötigt. Rohglycerin ist nur in begrenztem Maße vorhanden. Für die angenommene Jahresproduktion von 50 kt 2,3-Butandiol werden ca. 85 kt Rohglycerin benötigt, welches einer jährlichen Biodieselproduktion von ca. 1,5 Millionen Litern bzw. mehr als 14% der in Europa produzierten Biodieselmenge im Jahr 2011 entspricht. Die Verwendung von Rohglycerin für die 2,3-Butandiol-Herstellung würde starke Auswirkungen auf den derzeitigen Glycerinmarkt haben und zu Verdrängungseffekten sowie einem Preisanstieg für Rohglycerin führen.

Abbildung 62 zeigt die verschiedenen Kostenpositionen für die unterschiedlichen Substrate. Das Fermentationsmedium und insbesondere die darin enthaltenen Suppline sind neben den Substraten die maßgeblichen Kostenfaktoren und können in Summe bis zu 90 % ausmachen. Supplinreiche

Fermentationsmedien wie z.B. bei Verwendung von Glucose können bis zu zwei Drittel der Herstellungskosten ausmachen. Die Substratkosten können wie im Falle von Dicksaft ca. 45 % der Kosten beitragen und sind nach den Mediumkosten der zweitwichtigste Kostenfaktor. Eine Ausnahme davon ist Rohglycerin, welches verglichen mit den zuckerbasierten Substraten für die Fermentation einen deutlichen Preisvorteil hat. Inwieweit dieser jedoch besteht, wenn der Glycerinbedarf signifikant ansteigt, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht vorherzusagen. Die Energiekosten sind trotz des relativ hohen Energiebedarfs als moderat einzustufen.

Durch Gewinnung der Nebenprodukte der Fermentation könnte ggf. zusätzlicher Gewinn erwirtschaftet werden. Da der zusätzliche energetische und apparative Aufwand jedoch nicht innerhalb des Projektes untersucht wurde, lässt sich dieser nicht beziffern.

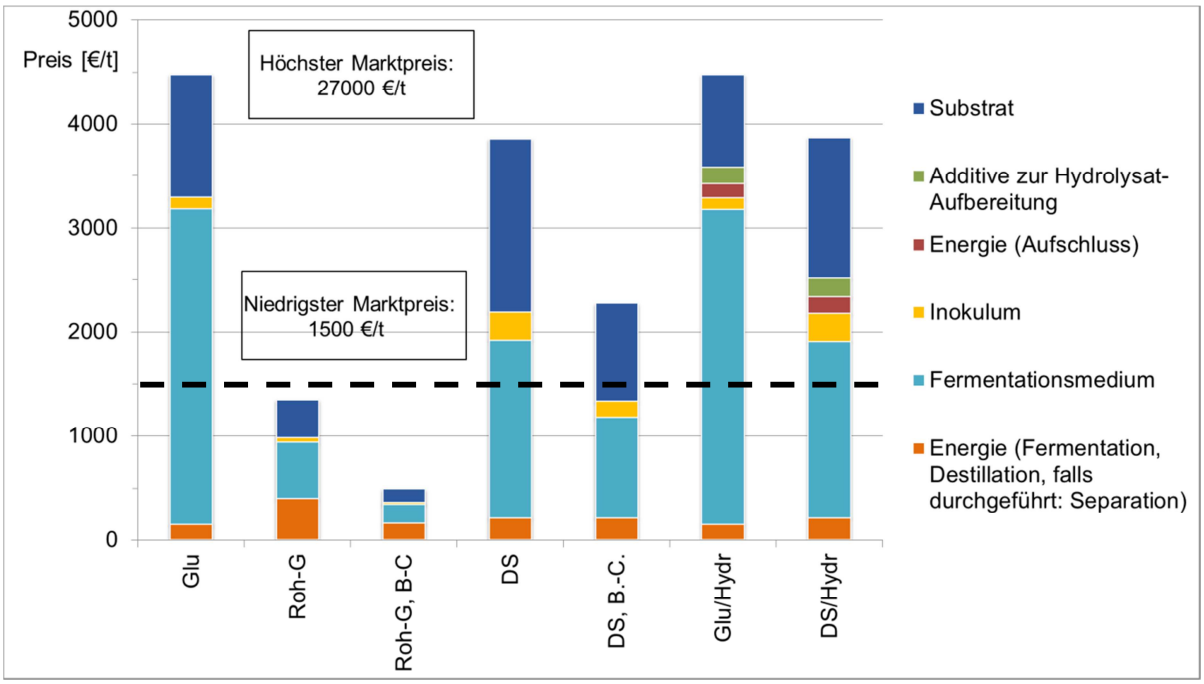



**Abbildung 62: Vergleich des Marktpreises von 1 t 2,3-Butandiol mit den Produktionspreisen (Industrieskala) der biotechnologischen Prozesse auf Basis nachwachsender Rohstoffe (Glucose (Glu), Roh-Glycerin (Roh-G), Dicksaft (DS) und in Kombination mit Zuckerrüben-Hydrolysat (Hydr), sowie Best-Case-Szenarien (B.-C) mit Dicksaft und Rohglycerin**

ZRS- und Holzhydrolysat können für die Fermentation eingesetzt werden. Allerdings ist die Zuckerkonzentration in den Hydrolysaten deutlich geringer als die für die Fermentation optimale Zuckerkonzentration. Die Hydrolysate könnten aber mit Dicksaft, Zucker oder Glucose angereicht werden. Vergleicht man die Preise der Hydrolysate auf Basis ihres Zuckergehalts mit Dicksaft bzw. Glucose stellt man fest, dass durch den Einsatz von Holz- bzw. ZRS-Hydrolysat keine nennenswerten Kosteneinsparungen zu erwarten sind.

Die anteilige Substitution von Zucker durch ZRS-Hydrolysat ist folglich weder ökologisch noch ökonomisch sinnvoll.

**Best-Case Szenarien**

Werden voraussichtliche Industriepreise zugrunde gelegt, so ergibt sich für 2,3-Butandiol aus Dicksaft ein Herstellungspreis von 2200 – 3800 €/t bzw. 500 – 1300 €/t bei Verwendung von Rohglycerin. 2,3-Butandiol aus Dicksaft ist somit etwa dreimal teurer als aus Rohglycerin hergestelltes. In diesen Kosten sind die Transport-, Investitions- und Kapitalisierungskosten jedoch noch nicht enthalten. Geht man von einem Preis von 1500 €/t 2,3-Butandiol aus, so ist lediglich biobasiertes 2,3-Butandiol aus Rohglycerin aus ökonomischer Sicht konkurrenzfähig.

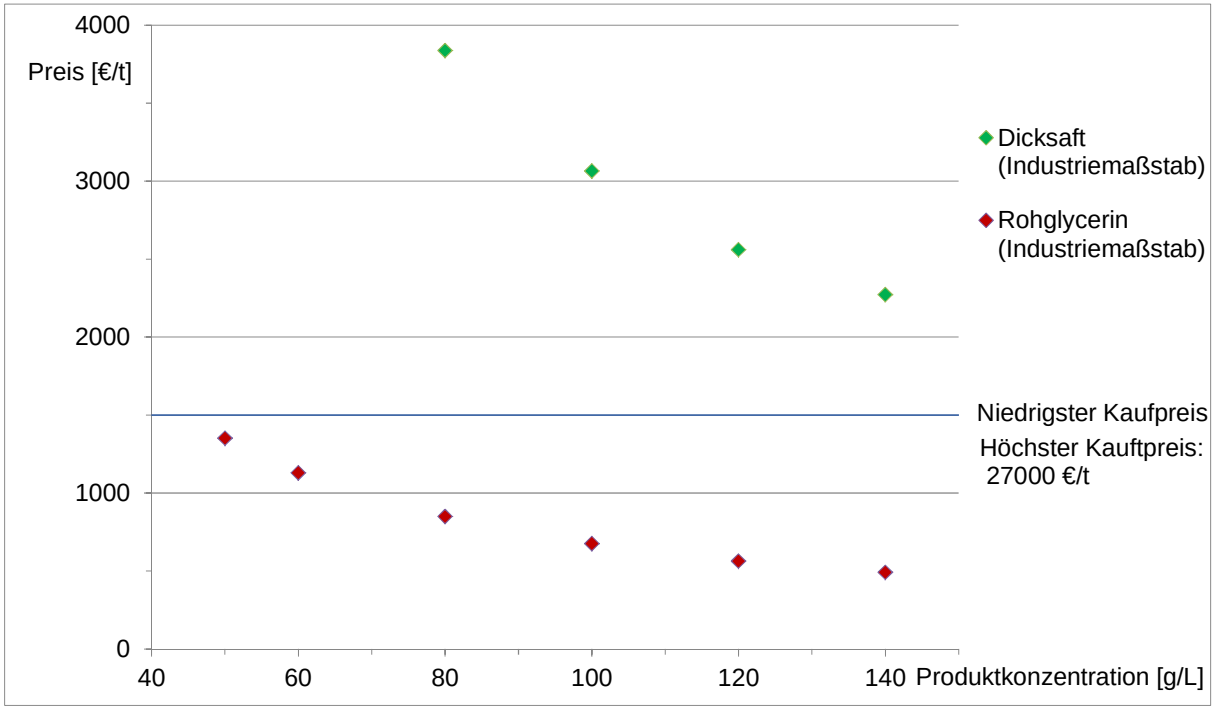



**Abbildung 63: Vergleich des Marktpreises von 1 t 2,3-Butandiol mit den Produktionskosten der biotechnologischen Prozesse auf Basis von Rohglycerin bzw. Dicksaft, ausgehend von der jeweils erreichten Produktkonzentration in der Fermentationsbrühe und hochgerechnet für höhere Produktkonzentrationen**

Im Gegensatz zu den Kosten unterscheiden sich die Treibhausgas-Emissionen bei Verwendung von Rohglycerin und Dicksaft als Substrat nur geringfügig. Aus ökologischer Sicht hat Dicksaft als Substrat - unter den in dieser Studie verwendeten Annahmen - leichte Vorteile, die im vorherigen Kapitel im Detail beschrieben wurden. Der Zusammenhang zwischen Kosten und Treibhauseffekt sind für Rohglycerin und Dicksaft in Abbildung 64 graphisch dargestellt.

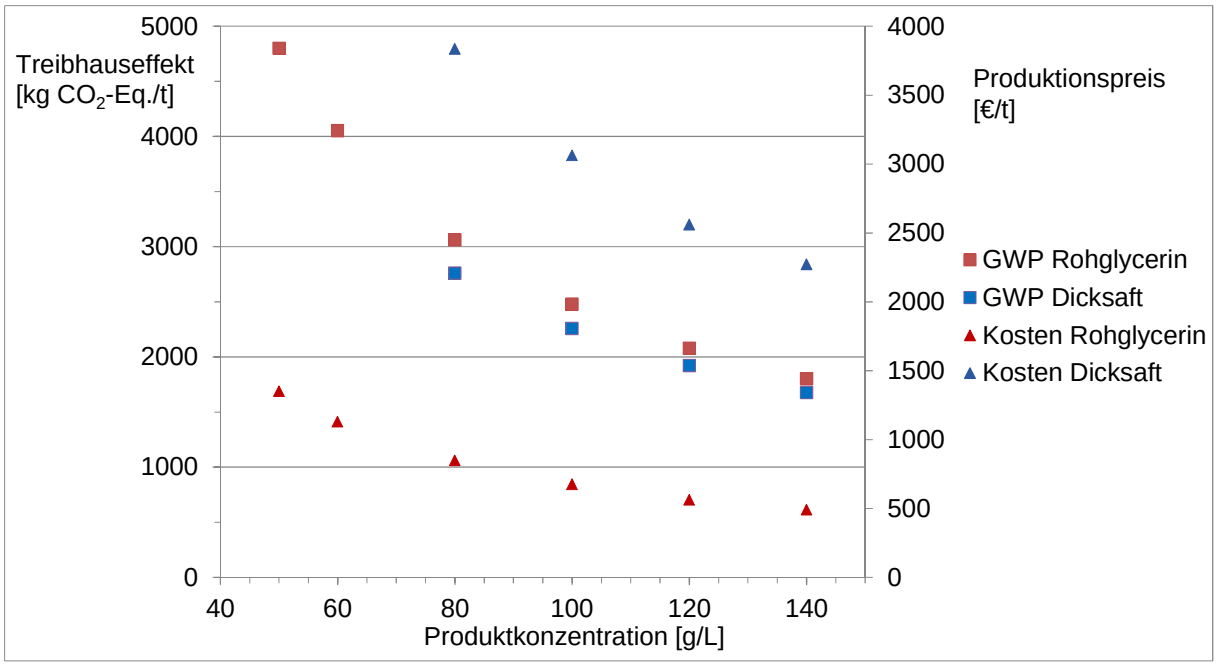



**Abbildung 64: Treibhauseffekt (GWP) und Kosten (Industriemaßstab) der Produktion von 1 t 2,3-Butandiol aus Rohglycerin, ausgehend von der erreichten Produktkonzentration in der Fermentationsbrühe und hochgerechnet für höhere Produktkonzentrationen**

**Zusammenfassung**

Durch die Verwendung von Dicksaft und Rohglycerin als Rohstoffe für die biotechnologische Herstellung von 2,3-Butandiol (BDO) lassen sich fossile Ressourcen in erheblichem Maße einsparen. Die Herstellung von 2,3-Butandiol aus Dicksaft und Rohglycerin ist ökologisch vorteilhaft gegenüber petrochemisch hergestelltem 2,3-Butandiol in Bezug auf den Treibhauseffekt, Versauerung, Ozonabbau und bodennahe Ozonbildung, wenn eine 2,3-BD-Konzentration in der Fermentationsbrühe > 100 g/L erreicht wird. Lediglich das Eutrophierungspotential ist bei der Verwendung von Dicksaft höher als bei der petrochemischen Herstellung. Die ökologische Vorteilhaftigkeit von Dicksaft wird jedoch maßgeblich von der Wahl der Allokationsmethode (Systemerweiterung oder ökonomische Allokation) beeinflusst.

Die Verwendung von Glucose aus Maisstärke führt nicht zu einer ökologischen Entlastung. Dies gilt auch für Zuckerrübenschnitzel und Holz aus Kurzumtriebsplantagen, da deren Umwandlung zu fermentierbaren Zuckern sehr energieintensiv ist; so ist z.B. der Treibhauseffekt pro Masseneinheit Zucker aus den Zuckerrübenschnitzeln bzw. Holz vier- bis fünfmal höher als Zucker aus Zuckerrüben. Zuckerrübenschnitzel werden gegenwärtig als Tierfutter eingesetzt; würde man die Schnitzel dem Tierfuttermarkt entziehen, entstünde dort ein zusätzlicher Flächenbedarf (Auslöser indirekter Landnutzungsänderung).

Im Best-Case Szenario – bei Erreichen von 140 g 2,3-BD/L in der Fermentationsbrühe – können bei Verwendung von Rohglycerin als Substrat bis zu 1,6 t $CO_2$-Äq/t 2,3-BD eingespart werden. Wird Dicksaft als Substrat verwendet, beträgt die $CO_2$-Äq-Einsparung 0,9 bzw. 1,7 t pro t 2,3-BD, abhängig von der gewählten Allokationsmethode. Der Fermentationsrohstoff muss in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen; dies ist im Falle von Dicksaft gegeben, allerdings werden dazu ca. 10000 ha Agrarfläche benötigt. Rohglycerin ist nur in begrenztem Maße vorhanden. Für die angenommene Jahresproduktion von 50 kt 2,3-BD werden ca. 125 kt Rohglycerin benötigt, welches einer jährlichen Biodieselproduktion von ca. 1,5 Millionen Litern Biodiesel bzw. mehr als 14% der in Europa produzierten Biodieselmenge im Jahr 2011 entspricht.

Derzeit ist 2,3-BD ein Nischenprodukt, dessen Preis durch Mischkalkulation an Hand des Gesamthandelsvolumens festgelegt wird. Ein einheitlicher Preis für 2,3-BD konnte daher nicht ermittelt werden; nach Aussagen der Industriepartner liegt der Preis zwischen 1,5 €/kg und 25 €/kg. Die Schwankungsbreite ist nicht nur bei den ökonomischen Input-Werten signifikant, dies trifft auch auf die ökologischen Input-Daten zu, daher sind die Ergebnisse mit einer entsprechenden Unsicherheit behaftet.

Nur die ökologisch vorteilhaften Substrate, Dicksaft und Rohglycerin, stellen eine Alternative zu petrochemisch hergestelltem 2,3-BD dar. Die 2,3-BD-Herstellungskosten betragen in Abhängigkeit von der 2,3-BD-Konzentration in der Fermentationsbrühe 0,5 – 5 €/kg, wobei Erlöse aus den Fermentationsnebenprodukten wie z.B. Ethanol, Acetoin, Bernsteinsäure, etc. eben so wenig berücksichtigt wurden, wie die Personal- und Investitionskosten. Expertenbefragungen zufolge liegen die jährlichen Personalkosten für eine Ethanolanlage vergleichbarer Größe bei etwa 2 Millionen € und beeinflussen demzufolge den Herstellungspreis für 2,3-BD nur geringfügig. Die Investitionskosten sind von einer Reihe standortspezifischer Faktoren abhängig und lassen sich daher ohne Festlegung des Standortes nicht beziffern.

Das Fermentationsmedium ist neben den Substratkosten der dominierende Kostenfaktor. Nur wenn die im Fermentationsmedium enthaltenen Suppline - zumindest teilweise – substituiert oder reduziert werden können, lassen sich die Herstellungskosten signifikant senken.

# WP 7: Projektmanagement (alle Partner)

Die Projektmeetings wurden im Abstand von ca. 6 Monaten bei den Projektpartnern durchgeführt (Abbildung 65). Die aktuellen Ergebnisse wurden vorgestellt und über die weitere Vorgehensweise diskutiert.

**Abbildung 65: Übersicht der Projektmeetings PUBB und der ERA IB Meetings**

# Berichte der nicht deutschen Projekt-partner

# Biopolis S. L. (BPOL)

Der Projektpartner Biopolis S.L. ist hauptsächlich in WP 2 (Screening nach Mikroorganismen und Gentechnik) WP 3 (Optimierung der Fermentationsparameter) und WP 4 (Immobilisierung, Prozessentwicklung und Maßstabsvergrößerung) involviert. Folgende Untersuchungen wurden durchgeführt, um eine guten Riskikoklasse 1 Stamm zu identifizieren, der Glycerin verwertet und Butandiol produziert:

Task 2.1: Screening nach Klasse 1 - Mikroorganismen die Glycerin als C-Quelle verwerten können und 2,3-BD produzieren. Kolorimetrische Tests zum Nachweis von Acetoin und 2,3-BD wurden der Literatur entnommen und angepasst. Nach einem Screening, 25 Mikroorganismen der Stammsammlung und 850 Umweltisolate aus dem Belebtschlamm aus eines Biodieselherstellers aus Spanien. Mehrere 2,3-BD Produzenten wurden identifiziert (*Lysinobacillus fusiformis, Lysinobacilllus sphaericus, Bacillus cereus, Enterococcus casseliflavus*). Die zwei besten Produzenten, die in diesem Screening gefunden wurden, gehören zu der Gattung *Raoultella*. Das Screening-Verfahren wurde in

Zusammenarbeit mit den in diesem Arbeitspaket beteiligten Partner konzipiert. Der komplette Genom eines *Raoultella* Stammes (Stamm A) wurde sequenziert und die Gene identifiziert, die im Glycerin Stoffwechsel zum Endprodukt 2,3-BD beteiligt sind.

Task 2.2: Optimierung der Mikroorganismen durch Mutagenese. Der *Raoultella* Stamm A wurde als Kandidat ausgesucht, da dieser Stamm die beste Performanz im Screening Task 2.1 mit dem Komplexmedium aufwies. Der Ablauf für die Mutagenese unter Verwendung von UV-Strahlung und EMS (Ethylmethansulfonat) wurden für den *Raoultell*a Stamm A entwickelt. Für die Selektion der Mutanten wurde an die Mutagenese die proton-suicide Methode (Bromid / Bromat Platten) gekoppelt, um Mutanten mit veränderten Muster der Säurebildung zu selektieren. 640 Mutanten wurden analysiert und 24 von diesen wurden für weitere Untersuchungen weiter verwendet. Zwei Mutanten, IIIA3 und IA1, produzierten 30% mehr 2,3-Butandiol als der Wildtyp, im Komplexmedium des Screenings.

Task 2.3 Optimierung der Mikroorganismen durch genetisch/metabolisches engineering. Verschiedene Ansätze wurden entwickelt: Klonierung und Expression des bakteriellen Hemoglobins von *Vitreoscilla* und *Deinococcus radiodurans* in den Expressionsvektor plZ1016; Klonierung und Expression des bud Operon von *Raoultell*a Stämmen und *E. coli* in den pIZ1016 Vektor. Keiner dieser Ansätze bewirkte eine Steigerung der 2,3-BD Produktion.

Task 3.1 Entwicklung und Adaptation der Analytik. BPOL hat analytische Methoden zur Bestimmung von Glycerin und Stoffwechselprodukte, die in der 2,3-BD Produktion beteiligt sind, zusammengestellt.

Task 3.2 Optimierung der Fermentationsmedien; Task 3.3 Optimierung der Fermentationsparameter für freie und immobilisierte Zellen. Mittels Versuchsplanung nach der Taguchi-Methode wurden optimale Kultivierungsbedingungen im kleinen Maßstab für den *Raoultell*a Stamm A ermittelt.

Task 4.3 Fermentation im größeren Maßstab mit ausgewählten Mikroorganismen; Task 4.4: Kinetik und Prozessmodellierung. BPOL war verantwortlich für die Maßstabsvergrößerung der 2,3-Butandiol Produktion von Glycerin in den 50-L-Scale mit dem *Raoutela* Stamm B. Rohglycerin von dem Biodiesel-Unternehmen in Spanien wurde in der Fermentation verwendet. Diese Aufgabe wurde in Zusammenarbeit mit dem Projektpartner UCM durchgeführt. Eine Fütterungsstrategie wurde verwendet, mit der die maximalen Ausbeute und über 50 g/L 2,3-BD produziert wurde. Die Daten wurden dem Projektpartner vTI BS für die LCA Analyse zu Verfügung gestellt.

# Poznan University of Life Sciences (PULS)

Der Projektpartner Poznan University of Life Sciences ist hauptsächlich in WP 2 (Screening nach Mikroorganismen und Gentechnik) WP 3 (Optimierung der Fermentationsparameter) und WP 4 (Immobilisierung, Prozessentwicklung und Maßstabsvergrößerung) involviert.

Task 2.1: Screening nach Klasse 1 - Mikroorganismen die Glycerin als C-Quelle verwerten können und 2,3-BD produzieren. Um Mikroorganismen zu identifizieren, die in der Lage sind 2,3-BD zu produzieren wurden annähernd 700 Stämme aus verschiedenen Quellen wie regionalen Käse aus der Region des Tatra Gebirges untersucht. Der Voges-Proskauer (VP) Farbtest diente zur Vorauswahl positiver Isolate. Das Screening zeigte, dass 236 Stämme Acetoin (positiv in VP-Test) synthetisieren können. Von diesen Stämmen waren 6 Stämme in der Lage zwischen 1 und 2 g/L 2,3-BD zu produzieren und 38 Stämme produzierten zwischen 2 und 5 g/L 2,3-BD.

Task 3.1 Entwicklung und Adaptation der Analytik. Folgende Methoden wurden für die Bestimmung des Wachstum und der Biomasse verwendet: spektrophotometrische Messung bei A600 (nur für synthetische Medien), Bestimmung der Biotrockenmasse und cfu (colony forming unit) Assay. Für die Analyse der Lebensfähigkeit der Zellen wurde Methylviolett 10B und die Durchflusszytometrie verwendet. Zucker und andere Kohlenstoffverbindungen (organische Säuren, Uronsäuren, 2,3-BD, Acetoin) wurden vorzugsweise mittels HPLC und GC bestimmt. Glucose wurde zusätzlich mittels GOD-POD-Test ermittelt. Metall-Ionen-Konzentration wurden durch Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) bestimmt. Um die Fermentation zu kontrollieren wurden Parameter wie osmotischen Druck, pH Wert, Sauerstoff-Konzentration gemessen.

Task 3.2 Optimierung der Fermentationsmedien; Task 3.3 Optimierung der Fermentationsparameter für freie und immobilisierte Zellen. Aufgrund der niedrigen Produktivität der hier isolierten Bakterien, wurde ein vielversprechender *Raoutella* Stamm vom Projektpartner UCM (Spanien) zur Verfügung gestellt und hinsichtlich der Produktion von 2,3-BD auf dem Medium mit „sugar beet pulp hydrolysates“ (SBH) getestet. Aufgrund der geringen fermentierbaren Zuckergehalte des SBHs wurde das Medium mittels Gefriertrocknung auf folgende Werte aufkonzentriert: 45 g/L Glucose, 31 g/L Arabinose und ungefähr 16 g/L Xylose. Eine Mineralstoffanalyse des SBH zeigte erhöhte Mengen an Ionen, wie $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Fe^{2+}$, and $Na^{+}$. Hinzu kommt, dass die Hydrolyse die Freisetzung von Essigsäure und Methanol aus Pektinen und Hemicellulose mit ungefähr 3 und 1,5 g/L verursacht. Die Konzentrationen dieser Substanzen, die das bakterielle Wachstum inhibieren können, nehmen während der Aufkonzentrierung zu. Daher wurde das konzentrierte SBH mit Aktivkohle entgiftet unter optimierten Bedingungen der Temperatur, Inkubationszeit, Menge an Aktivkohle und pH-Wert. Mittels dieser Prozedur wurde das SBH nutzbar für die Fermentation mit dem Nachteil, dass ein Teil der fermentierbaren Zucker verloren gehen (ungefähr 10%). Der *Raoutella* Stamm wurde im Bioreaktor im Maßstab von 50 mL kultiviert. Das verwendete Medium enthielt SBH, angereichert mit unterschiedlichen Konzentrationen an Hefeextrakt (YE) (0-3 g/L), $FeSO_4$ (0-3 g/L), $Mg^{2+}$ (0-0,2 g/L) und $Mn^{2+}$ (0-0,2 g/L). Dieses Experiment wurde nach der Methode des „Central Composition Design“ (CCD) durchgeführt. Die beste 2,3-BD Endkonzentration mit 28 g/L wurde in dem Versuchsansatz mit

konzentriertem SBH angereichert mit 0,2% YE erreicht und 25 g/L 2,3-BD wurde ohne Einsatz von Hefeextrakt produziert.

Task 3.3: Optimierung der Fermentationsparameter für freie und immobilisierte Zellen:

Das Fermentationsverfahren (*Raoutella* Stamm) wurde mittels „Central Composition Design“ (CCD) optimiert. Die Experimente wurden in 5L Bioreaktoren durchgeführt (Sartorius BIOSTAT B +). Durch die Entwicklung für Bakterien toxischer Verbindungen (Maillard-Reaktion) beim Autoklavieren wurde das SBH in kalt sterilisiert. Im ersten Schritt wurden Fermentationsbedingungen wie Temperatur (30-36 °C), pH (6.0-7.0) und Belüftungsraten (0-2 vvm) variiert. Die statistische Analyse zeigte, dass eine pH-Regelung den Prozess nicht beeinflusst. Daher wurde in den weiteren Versuchen die Temperatur (30-36 °C), Belüftungsraten (0-2 vvm) und Rührgeschwindigkeit (20-140 rpm) optimiert. Die höchste Konzentration an 2,3-BD betrug 34 g/L mit einer Ausbeute von 0,42 g/g bei 33 °C, 1 v/vm und 80-140 rpm.

Fermentation mit in Alginat immobilisierten Zellen (*Raoutella* Stamm) war nicht erfolgreich. Die Bakterien erzeugten eine große Menge an Gasen (hauptsächlich Kohlendioxid), welches die Alginatperlen schnell beschädigte. Wohingegen die Immobilisierung mittels Adsorption an Keramsit mit einer Produktion von 30 g/L 2,3-BD und einer Ausbeute von 0,4 g/ erfolgreich war. Jedoch benötigte die Fermentation mit immobilisierten Zellen, verglichen mit freien Zellen 80 h mehr an Kultivierungszeit um diese Endkonzentration an 2,3-BD zu erreichen.

Bei der Fed-Batch-Fermentation betrug die Anfangskonzentration an fermentierbaren Zuckern 80 g/L. Die Fermentationsbrühe, basierend auf SBH, wurde periodisch supplimentiert (3 mal, alle 24h) mit konzentrierter SBH (40 g/L Glucose, 20 g /L Arabinose, 15 g/L Xylose). Mit dieser Fütterungsstrategie wurden 70 g/L 2,3-BD mit einer Ausbeute von 0,28 g/g nach 80 h Fementationszeit produziert.

Task 4.3: Fermentation in größerem Maßstab mit ausgewählten Mikroorganismen Die Fermentation (*Raoutella* Stamm) in einem größerem Maßstab wurde in 30 L Bioreaktoren durchgeführt (Sartorius BIOSTAT C +), mit Kultivierungszeiten von 48 h im Batch Prozess und 80 h im fed-batch Prozess. Hierbei wurde die konstante Belüftung als Scale-up-Kriterium gewählt. Die berechneten Parameter für die Maßstabsvergrößerung auf 30 L sind in der Tabelle 28 zusammengefasst. Im batch prozess wurden mit diese Prozessparametern (Agitation 90 Upm und einer Belüftung 14 L/min) 29 g/L 2,3-BD mit einer Ausbeute von 0,37 g/g erhalten. In der Fed-Batch-Fermentation erreichte die Produktion von 2,3-BD fast 65 g/L mit eier Ausbeute von 0,25 g/g.

**Tabelle 28: Parameters of 2,3-BD fermentation in 5L (working volume – 3.5L) and 30L (working volume – 14) scale**

| Bioreactor | Stirrer diameter $D_i$ [m] | Stirrer speed N [rpm] | Volumetric gas flow $Q_g$ [$m^3s^{-1}$] | Aeration[L/min] | Reynolds Number Re |
|---|---|---|---|---|---|
| 5L | 0,064 | 100 | $5x10^{-5}$ | 3.5 | 6840 |
| 30L | 0,105 | 90 | $2x10^{-4}$ | 14 | 1334 |

Task 4.4: Kinetik und Prozessmodellierung Die Produktbildung in beiden Maßstäben (5L und 30L) erfolgt nach einer gemischten Produkt-Kinetik. Es treten Wachstumsgekoppelte und Nicht-Wachstumsgekoppelte Phase auf. Daher wurde die Produktbildung mit der Kinetik des Luedeking-Piret Modells beschrieben. Im 5 L Maßstab hatte die Gleichung für die spezifische Produktionsrate folgende Form: $q_p = 3{,}14\ \mu + 0{,}037$ und im 30 L Maßstab: $q_p = 3{,}73\ \mu + 0{,}076$. Der Vergleich der Parameter des 5 L und 30 L Maßstabs zeigten, dass im größeren Maßstab sowohl das Wachstum der Biomasse-, und Produkt-Konzentration als auch die Ausbeute leicht zurückgegangen ist.

Task 4.5: Untersuchung und Modellierung mikrobiellen Stresses Um die Effekte der ausgewählten Stressfaktoren auf den Metabolismus der Zelle *Raoultella* auszuwerten, wurde der Proteom-basierender Ansatz gewählt. Die frühen (15 oder 30 min) und späten (24 Std.) Proteine, die in dem Proteom von dem *Raoultella* Stamm nach der Exposition der Zellen auf bestimmte Stressfaktoren entstehen wurden untersucht. Folgende Stressfaktoren wurden untersucht: Hitzeschock (HS), Säurestress (AS), osmotischen Stress (OS), und die Kombination von Säure und osmotischen Stress. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass:

- GroEL und GroES Proteine wurden beide unter dem Stress Hitzeschock induziert, obwohl letztere auf einem nachweisbaren Niveau nur bei der Temperatur von 42 ° C und nicht bei 37 ° C synthetisiert wurde. Die Versuche identifizierten auch das Vorhandensein von mindestens 3 neuartigen noch nicht beschriebenen Hitzeschock induzierten Proteinen.
- GroEL und GroES Proteine wurden auch unter dem Stressfaktor osmotischer Stress gebildet. Verglichen zu den Mengen induziert durch Hitzeschock waren die Proteinmengen wesentlich geringer. Das Vorhandensein von zwei weiteren stressinduzierbaren Proteinen wurde gezeigt, einschließlich des 90 kDa Molekül, das während der Hitze-Schock-Experimente induziert werden konnte.
- GroEL wurde auch während der Säurestress Experimente gebildet, wohingegen GroES, DnaJ und gyrB nicht detektiert werden konnten. GroEL wurde als einziges Protein bei pH = 5,5 gebildet. Bei pH = 4 waren GroEL und drei neuartige stressinduzierbaren Proteine im Elektrophorese-Diagramm sichtbar, einschließlich des 90 kDa Proteins.

# Technical University of Lodz (TUL)

Der Projektpartner Technical University of Lodz ist hauptsächlich in WP 1 (Rohstoffe), WP 2 (Screening nach Mikroorganismen und Gentechnik) WP 3 (Optimierung der Fermentationsparameter) und WP 4 (Immobilisierung, Prozessentwicklung und Maßstabsvergrößerung) involviert.

WP1:

1) Charakterisierung bezüglich Gehalt an Cellulose, Hemicellulose, Pektin und Lignin Gehalt von 10 gut verfügbaren Nebenprodukten der Lebensmittelproduktion wie zum Beispiel frischer, gefrorener und getrockneter Zuckerrübenbrei, frische und gefrorene Zuckerrüben- (schnitzel, häcksel), Kartoffelabfälle (Kartoffelmus, Kartoffelbrei), aus Äpfeln und Apfelbeere gepresste Fruchtmasse, Raps (Rapssamen), Sojabohnen, Sonnenblumen und Nachtkerzen-„kuchen".
2) Optimierung der Thermischen Vorbehandlung und enzymatischen Hydrolyse der genannten Materialen im Labormaßstab. Die enzymatischen Hydrolysate wurden unter Verwendung folgender 10 Enzym Präparate hergestellt: von dem filamentös wachsenden *Aspergillus niger* IBT90 mit der an der TUL in Pektowin Ldt. (Jasło, Polen) entwickelten Methode, Filtrase Premium (DSM) und erworbene Ansätze von Novozymes (Optimash™ VR, Optimash™ BG, Cellustar XL, Cellulosoft®CR, Cellulosoft™ L, Cellulosoft™ APL, Cell Conc L und Denimax 991). Die resultierenden enzymatischen Hydrolysate wurden als Basiskomponente für das Fermentationsmedium für die 2,3-BD produzierenden Mikroorganismen eingesetzt.
3) Analyse der enzymatischen Hydrolysate bezüglich der Konzentration an reduzierten Zucker, Konzentration an ausgewählten Monosaccharide (Glucose und Xylose) und mögliche Fermentationsinhibitoren (Furfural, 5-Hydroxymethylfurfural, Phenolsäuren).
4) Unter den 10 getesteten Enzym Präparationen hat der Ansatz mit *Aspergillus niger* IBT90 die aufzuschließenden Rohmaterialen am effizientesten verzuckert.
5) Fermentationen zeigten, dass die 2,3-BD produzierenden Bakterienstämmen bevorzugt enzymatische Hydrolysate von Apfeltrester, Zuckerrübenschnitzel, IBT Zuckerrübenschnitzel und Kartoffelschalen mit der Präparation aus A. niger erhalten 90 als Bestandteile von Kulturmedien. Produktion von Hydrolysaten aus diesen Rohstoffen wurde in einer Skala bis 100 ml optimiert und dann im Maßstab bis zu 1 L und bis zu 5 L.

Die kompletten Fermentationsversuche zeigten/ deckten auf, dass die getesteten Bakterienstämme (*Lactobacillus* sp. und *Bacillus* sp.) Auszüge von Zuckerrübenbrei, Zuckerrübenschnitzel und Kartoffelabfälle, hergestellt unter diesen Vorbehandlungen, „bevorzugen". Aus diesem Grund wurde die Produktion im Maßstab bis 100 ml und dann in den Größenordnungen bis 1 L und bis 5 L optimiert.

WP2:

1. Vorläufige Auswahl an 2,3-Butandiolbildner aus über 10 Stämmen von antarktischen Bakterien und 4 *Bacillus* Stämmen aus reinen Kultursammlungen an der ITB TUL basierten auf dem Voges-Proskauer (Platten-) Test, der die Ermittlung von Acetoinproduzenten, welches ein direkter 2,3-Butandiol-Ausgangstoff ist, ermöglicht.
2. Die vielversprechendsten 2,3-BD Bilder wurden durch Kultivierungen in Flüssigm erhalten, die entweder Glucose oder Hydrolysate der ausgewählten Nebenprodukte aus der Lebensmittelproduktion (charakterisiert in Aufgabe/ Task 1) als Kohlenstoffquelle enthielten. Diese Stämme gehören zu der Gattung *Bacillus*.
3. Die Wildtyp-Stämme von *B. licheniformis* TUL und *B. amyloliquefaciens* TUL wurden einer Zufallsmutagenese (UV und NTG) unterworfen. Unter den resultierenden Mutanten wurde als effizientester 2,3-BD Bildner die Mutante Nr. 148 von *B. amyloliquefaciens* aufgedeckt, die 3,5-fach mehr 2,3-BD im Kulturmedium mit Hydrolysat (aus getrockneten Apfeltrester mit 20 g/L Glucose) im Vergleich zum Wildtyp-Stamm basiert hergestellt. Allerdings ist die Mutation nicht stabil und die Mutante verliert infolge einer langfristigen Lagerung dieser Mutation.
4. Um Transformanten des *Bacillus* Stammes zu erhalten wurde das Gen, welches Hemoglobin (Hb) von *Vitreoscilla stercoraria* LMG 7756 verschlüsselt, amplifiziert durch PCR und in den Expressionsvektor pHT01 (von MoBiTec) kloniert. Das so erzeugte rekombinante Plasmid pHT01/Hem wurde eingesetzt um folgende transformierte Stämme zu erhalten: *B. subtilis* TUL, *B. subtilis* 1012wt (MoBiTec), *B. licheniformis* TUL und *B. amyloliquefaciens* TUL. Jedoch wurde lediglich vom *Bacillus subtilis* Stamm ein rekombinanter Stamm erhalten, der das Plasmid pHT01/Hem enthält. Aber die 2,3-BD Produktion durch diese rekombinanten Stämme war nicht besser als die der Ausgangsstämme.

WP3:

1. Die Korrelation zwischen dem Biomassewachstum, Veränderungen im pH-Wert, den Abbau der reduzierenden Zuckern und der Bildung an 2,3-Butandiol und Acetoin wurde für die ausgewählten Bakterienstämme bestimmt (siehe WP2, Absatz 2).
2. Die qualitative Analyse von 2,3-BD mittels Dünnschichtchromatographie wurde optimiert.
3. Die 2,3-BD Produktion durch die Bakterien wurde mittels Gaschromatograph quantifiziert.
4. Für *B. licheniformis* NCIMB and *B. subtilis* TUL, welche als am besten geeignete Stämme ermittelt wurden, wurde sowohl die Zusammensetzung des Mediums als auch die Kultivierungsbedingungen optimiert, mittels einer mathematischen Methode (Plackett-Burman Design, Computer Programm „Statistica“). Unter den optimierten Bedingungen (batch Bedingungen) war die 2,3-BD Produktion von *B. subtilis* TUL (Molasse als C-Quelle)

zweifach höher (ungefähr 14 g/L) während *B. licheniformis* NCIMB 30% mehr 2,3-BD produzierte (ungefähr 23 g/L aus getrockneten Apfeltrester Hydrolysaten als C-Quelle). Die weiteren Medienkomponenten waren Hefeextrakt, Na2HPO4 und NH4Cl.

5. Die 2,3-BD Produktion mit *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059 und *B. subtilis* TUL wurden als fedbatch Kultivierung im optimierten Kulturmedium (37 °C und 130 Upm) durchgeführt. Der erste Stamm produzierte ungefähr 124 g/L 2,3-BD in dem Kulturmedium mit einer Glucosestartkonzentration von 43 g/L (Apfeltrester Hydrolysate) und einer dreimaligen Zudosage mit reiner Glucose in Konzentrationen von 50 g/L. *B. subtilis* TUL produzierte ungefähr 76 g/L 2,3-BD in dem Molasse basierendem Medium (68,3 g/L Saccharose) und einer viermaligen Zudosage mit reiner Glucose in Konzentrationen von 50 g/L.

WP4:

1. Die Bedingungen der Fed-Batch-Kultivierungen von *B. licheniformis* NCIMB 8059 und *B. subtilis* TUL wurden in 100 ml Schüttelkolben optimiert und anschließend in den 0,75 L Bioreaktoren mit Belüftungsrate von 1,2 v/vm überführt. Sowohl auf Melasse als auch Apfeltrester Hydrolysaten basierenden Medien und einer Zudosierung reiner Glucose produzierte *B. licheniformis* NCIMB 8059 etwa 90 g/L und und *B. subtilis* TUL bis zu 31 g/L 2,3-BD.
2. Fed-Batch-Kultivierungen mit *B. licheniformis* NCIMB 8059 wurden ebenfalls im 30 L Bioreaktor (Belüftungsrate von 1,2 v/vm, Melasse, Zudosage von viermal je 50 g/L Glucose) durchgeführt. Hierbei wurden bis zu 80 g/L 2,3-BD nach 72 h produziert. In der fed-batch Kultivierung mit Apfeltrester Hydrolysat und viermaliger Zudosage von je 50 g/L Glucose wurden 73 g/L 2,3-BD nach 96 h produziert.

# Complutense University (UCM)

Der Projektpartner UCM hat folgende Arbeiten durchgeführt:

4. Fünf Rohglycerine von drei Biodiesel Herstellern wurden charakterisiert mit folgenden analytischen Methoden: HPLC-RI, GC-MS, Elementaranalysen, TGA, Karl Fischer Titration, Ionen HPLC-AD). Von den untersuchten Rohglycerinen wurden drei für die weiteren Arbeiten ausgesucht.
5. Fünf *Raoultella* Stämme (A7, H7, IA1, IA12, IIIA3), erhalten durch Mutation (Projektpartner BPOL), wurden im Minimalmedium sowohl mit Pharma-, als auch mit Rohglycerinen auf ihre 2,3-BD Produktion hin untersucht. Zwei von diesen Stämmen (IA1 und IIIA3) zeigten mit Pharmaglycerin eine bessere Produktion als der Wildtyp Stamm. Der Einfluss verschiedener Prozessparameter, wie Temperatur, Anfangskonzentration des Pharmaglycerins und der Zusatz an Co-Substraten wurde mit der Mutante *Raoultella* Stamm IA1 untersucht.

6. Entwicklung und/oder Anpassung von quantitativen und einfachen analytischen Techniken für die Bestimmung von Biomasse, Glycerin, m-2,3-BD, R,R-2,3-BD und S,S-2,3-BD, 1,3 Propandiol, Ethanol, Succinat, Lactat, Acetat und Acetoin.
7. Bezüglich der Medienoptimierung und Optimierung der physikalischen Parameter der Fermentation wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:
   - Präparation des Inoculums,
   - Taguchi Methode für die Optimierung der Mediumzusammensetzung und Fermentationsbedingungen für zwei Wildtyp Stämme von *Klebsiella oxytoca*.
   - Optimierung der Mediumzusammensetzung und Fermentationsbedingungen (Temperatur, Rührerdrehzahl, pH Wert, Anfangsglycerinkonzentration, Einfluss von Rohglycerin) für die 2,3-BD Produktion mit zwei Risikoklasse 1 Stämme (*Raoultella* Stämme)
   - Batch Fermentationen mit *Raoultella* Stämmen mit Pharma- und Rohglycerin und unterschiedlichen Startkonzentrationen an Glycerin.
   - Fed-batch Fermentationen mit *Raoultella* Stämmen mit verschiedenen Startkonzentrationen an Pharmaglycerin und verschiedenen Konzentrationen an Glycerin, die zugefüttert wurden. Im fed-batch Prozess wurden unter optimalen Bedingungen 70 g/L 2,3-BD, mit einer Produktivität von 0,43 g/(Lh) und einer Ausbeute von 35 % erreicht. Eine Strategie für die Kultivierung im 2 L Maßstab wurde etabliert.
8. Aus den erhaltenen Ergebnissen, wurde die Möglichkeit für beide Stämme zur Kultivierung als ruhende Zellen in Betracht gezogen und sowohl mit Pharma- als auch Rohglycerin vielversprechende Ergebnisse erzielt.
9. Für die Maßstabsvergrößerung in den 2 L Reaktor wurde als Kriterium die empirische Korrelation für den volumenbezogenem Sauerstoff Stofftransportkoeffizient gewählt, da die 2,3-BD Produktion aus Glycerin einen hohen Sauerstoffbedarf aufweist.

<u>Task 4.3: Fermentation in größerem Maßstab mit ausgewählten Mikroorganismen</u>

Die 2,3-BD Produktion auf Basis von Glycerin wurde von dem Projektpartner Biopolis in den 20 L Bioreaktor Maßstab übertragen. Die Partner vom UCM haben hierzu die Kalkulation für die Maßstabsübertragung ausgehend von den Parametern im 2 L Maßstab durchgeführt.

<u>Task 4.4: Kinetik und Prozessmodellierung</u>

Der volumetrische Sauerstoffübergangskoeffizient für die 2L Bioreaktoren wurde berechnet. Dieser Wert diente als Kriterium für die Maßstabsvergrößerung, da der Sauerstoffbedarf die 2,3-BD Produktion aus Glycerin sehr stark beeinflusst.

Ein kinetisches Modell für Biomassewachstum, Glycerinverbrauch und 2,3-Butandiol Produktion wurde etabliert um den Prozess bei der Verwendung von Rohglycerin zu beschreiben

Task 4.5: Untersuchung und Modellierung mikrobiellen Stresses

Studien bezüglich hydrodynamischen Stress und Einfluss von Rührgeschwindigkeit wurden aufgrund der Sauerstoffabhängigkeit in diesem Prozess durchgeführt.

# Solvay SA – Chemicals Sector Business Deployment (SV)

In WP5 „Produktisolierung, -reinigung und –veredelung“ konzentrierte sich der Projektpartner SV im Task 5.1 „Entwicklung von in-situ/ex-situ Produkt Isolation Techniken“ auf Membran gestützte Isolierungsverfahren der vorbehandelten Fermentationsbrühe. Die Fermentationsbrühe ist ein wässriges System, die das Zielmolekül 2,3-Butandiol enthält. Anforderungen an die Membranen für die Isolierungsverfahren wurden mit der Schwestergesellschaft Solvay Solexis diskutiert, so dass weitere Membran Kandidaten aus deren fluorierten Polymer-Harzen Algoflon ® PTFE, Solef ® PVDF, ECTFE Halar ® und ™ Aquivion PFSA für die Isolierung von 2,3-BD identifiziert wurden.

Kommerziell erhältliche Membran-Materialien wurden dem vTI Braunschweig auf Eignung zur 2,3-BD Isolierung zur Verfügung gestellt. Die ausgewählten Membranen sind alle Derivate von Solvay`s Polymere Membranen und thermoplastischen Harzen: UDEL Polysulfon ® PSF, RADEL ®, ein Polyethersulfon PES und RADEL ® R Polyphenylsulfon PPSU) und Fluorpolymere (SOLEF ® Polyvinylidenfluorid PVDF). Die Fluoromaterialien (PTFE-Membranen mit einer Dicke von 180 µm) wurden von Solvay Solexis hergestellt und vTI BS zur Verfügung gestellt.

Ergebnisse dieser PTFE-Membran (Dicke von 180 µm) sind sehr vielversprechend. Da die Membranen aber nicht über mehrere Zyklen einsetzbar sind, hat Solvay in Zusammenarbeit mit vTI BS beschlossen als alternative Methode die Produktisolierung und Aufreinigung durch Destillation zum reinen 2,3-BD zu prüfen. Deshalb hat sich Solvay auf die 2,3-BD Destillation mittels Aspen Plus Modellrechnung konzentriert. Die am besten verfügbare Technologie scheint die mechanische Dampfrekompressionstechnik zu sein. Im Hinblick auf die Betriebskosten ist Hochdruckdampf der Haupt-Kostentreiber um 2,3-BD aus seiner wässrigen Lösung zu destillieren. Eine Voranreicherung von 2,3-BD aus der Fermentationsbrühe wird die Destillationskosten deutlich beeinflussen. Präzise Berechnungen werden auf die Zusammensetzung der Fermentationsbrühe gestützt. Diese Daten wurden von den Projektpartnern, die in WP3 arbeiten, zur Verfügung gestellt.

Anschließend wurden die Daten, die aus der 2,3-BD Destillation mittels Aspen Plus Modellrechnung erhalten werden, dem vTI BS in WP6 zur Wirtschaftlichkeit des Verfahrens und der Nachhaltigkeitsbewertung zur Verfügung gestellt.

# 2. Verwertbarkeit der Ergebnisse

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

- Rohstoffvorbehandlung: Optimierung und Charakterisierung der Dampfdruck und enzymatischen Aufschlüsse von Holz, der enzymatischen Aufschlüsse von Zuckerrüben, Kartoffel- und Fruchtschalen.
- Screening nach geeigneten Mikroorganismen: Es wurden erfolgreich Mikroorganismen der Risikoklasse 1 gescreent, die in der Lage sind, die verschiedenen aufgeschlossenen Rohstoffe sowie Glycerin und Rohglycerin in guten Ausbeuten zu dem Produkt 2,3-Butandiol umzusetzen.
- Biokonversion: Der Risikoklasse 1 Stamm *B.licheniformis* stellte sich als sehr guter 2,3-Butandiol Produzent heraus. Durch die Entwicklung einer Zufütterungsstrategie für eine hohe Produkt Endkonzentration produzierte *B.licheniformis* mit Glucose als Substrat Endkonzentrationen von bis zu 145 g/L 2,3-Butandiol. Im Vergleich zur Literatur wurden während dieser Projektlaufzeit 2,3-Butandiol Konzentration erreicht, die bisher nur mit Risikoklasse 2 Stämmen beschrieben sind. Weiterhin wurde erfolgreich eine Maßstabsvergrößerung auf 20-40 L mit den Substraten Glucose und Dicksaft in der batch-Verfahrensweise durchgeführt.
- Abtrennung: Mit Membrangestützten Verfahren konnten erfolgreich 100 g/L 2,3-Butandiol auf 420 g/L 2,3-Butandiol aufkonzentriert werden. Unabhängig von den gewählten Parameter und Optimierungen traten jedoch Probleme bzw. deutliche Verschlechterungen der Aufkonzentrierung bei dem wiederholten Einsatz der Membranen auf. Im Hinblick auf die Langzeitstabilität des Systems ist dieses Verfahren nicht für die alleinige Aufkonzentrierung des 2,3-Butandiols aus der Fermentationsbrühe geeignet, so dass als Aufarbeitungsmethode die Destillation (mechanische Dampfrekompressionstechnik) mittels Aspen Plus modelliert und berechnet wurde.
- Veredelung: Verschiedene Varianten zur Veredelung von 2,3-Butandiol wurden eingehend untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Variante der direkten Umsetzung von 2,3-Butandiol eine schlechte Selektivität bezüglich 1,3-BD aufweist, aber eine gute Selektivität zu dem Produkt MEK. Hingegen zeigte die Umsetzung eines veresterten 2,3-Butandiols, 2,3-Butandioldiacetat, hochselektive Umsätze zum 1,3-BD. Diese Ergebnisse und eine Aspen Prozesssimulation zeigen die prinzipielle Machbarkeit eines technischen Verfahrens zur Herstellung von 1,3-BD aus 2,3-Butandioldiacetat.
- Nachhaltigkeitsbewertung: Als Referenzsystem zur fermentativen 2,3-Butandiol Herstellung wurde die petrochemische Verfahrensweise modelliert. Die Nachhaltigkeitsbewertung der

biotechnischen Herstellung von 2,3-Butandiol zeigte, dass auf Basis der vorhandenen Datenlage insbesondere die ökologisch vorteilhaften Substrate, Dicksaft und Rohglycerin, eine Alternative zu dem petrochemisch hergestellten 2,3-BD darstellen.

Die im Projekt gewonnenen Erkenntnisse im Bereich Screening, biotechnischer 2,3-Butandiol Herstellung, Charakterisierung und Verwertbarkeit alternativer Rohstoffe und der Aufarbeitung und Veredelung des 2,3-Butandiols sind von hohem wissenschaftlichen Wert. Das Projekt hat die Machbarkeit der biotechnischen 2,3-Butandiol Herstellung mittels eines Risikoklasse 1 Mikroorganismus gezeigt und die Konkurrenzfähigkeit zur petrochemischen Herstellung klar herausgestellt. Folglich werden die erzielten Erkenntnisse für die weitere Forschung im Bereich der biotechnischen 2,3-Butandiol Herstellung sowie anderer Umsetzungen nachwachsender Rohstoffe erfolgreich Verwendung finden.
Für eine zeitnahe technische Umsetzung des entwickelten Verfahrens mit den bisherigen sehr erfolgreichen und weiterhin vielversprechenden Ergebnissen ist ein weiterer Forschungsbedarf hinsichtlich der erreichbaren Endkonzentration aus dem Substrat Rohgly*cerin* nötig, sowie eine Prozessoptimierung der physikalischen Bedingungen und der Medienzusammensetzung bezüglich der Substrate Glucose und Dicksaft.

# 3. Relevante Ergebnisse Dritter

Während dieser Projektlaufzeit wurde von einer Arbeitsgruppe der TU München in Korporation mit der Wacker Chemie AG relevante Ergebnisse bezüglich biotechnisch hergestellten 2,3-BD erzielt (Häßler 2012). Beschrieben wird ein fed-batch Prozess zur 2,3-BD Produktion mittels *P.polymyxa* DSM 365, der laut dieser Quelle 111 g/L 2,3-BD innerhalb von 54 h Kultivierungsdauer, unter hohem Hefeextrakt Einsatz (60 g/L), herstellt.

# 4. Erfolgte/geplante Veröffentlichungen

Im Rahmen des Projektes wurden folgende Veröffentlichungen getätigt:

Jurchescu I., Iphöfer D., Hamann J., Schütt F., Puls J., Kuenz A., Prüße U., Lang S. (2011). „Microbial production of 2,3-butanediol from renewable resources using free and immobilised cells." 8th ECCE together with ProcessNet-Annual Meeting and 1st ECAB together with 29th DECHEMA Biotechnology Annual Meeting, Poster, Berlin.

Jurchescu I., Iphöfer D., Hamann J., Schütt F., Puls J., Kuenz A., Prüße U., Lang S. (2011). „2,3-Butanediol production using *Paenibacillus polymyxa*.“ 8th ECCE together with ProcessNet-Annual Meeting and 1st ECAB together with 29th DECHEMA Biotechnology Annual Meeting, Poster, Berlin.

Jurchescu I., Hamann J., Zhou X., Kuenz A., Prüße U., Klingeberg M., Lang S. (2011). „Cultivation studies on the potential of *Bacillus licheniformis* to produce 2,3-butanediol.” GVC/DECHEMA Vortrags- und Diskussionstagung „Bioverfahrenstechnik an Grenzflächen“, Poster, Potsdam.

Kuenz, A., Jurchescu I., Lang S., Prüße U. (2012) „2,3-Butandiol-Produktion mittels immobilisierten Zellen in Fed-batch-Kulturen.“ Chemie Ingenieur Technik 84(8): 1210-1210.

Schütt, F., Puls, J., Saake, B. (2010). “Utilization of poplar wood by steam pretreatment and enzymatic hydrolysis.” 105. Zellcheming General Meeting. Oral presentation, Wiesbaden

Schütt, F., Puls, J., Saake, B. (2010). „Optimization of steam pretreatment conditions for enzymatic hydrolysis of poplar wood.” 11th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp. Oral presentation, Hamburg

Schütt, F., Puls, J., Saake, B. (2011). „Optimization of steam pretreatment conditions for enzymatic hydrolysis of poplar wood.” Holzforschung 65:453-459.

Schütt, F., Westereng, B., Puls, J., Saake, B. (2011). “Analysis of by-products from steam refining and steam explosion.” COST FP0901 Workshop in connection with Italic 6. Oral presentation, Viterbo

SCHÜTT, F.; SAAKE, B; SCHREIBER, A.; PULS, J.; (2009). „Two approaches for a hardwood biorefinery.” In: 2nd Nordic wood biorefinery conference, Proceedings Posters Vol. 2, Helsinki, Finland, S. 36-39

SCHÜTT, F.; PULS, J.; SAAKE, B. (2010). „Optimization of steam pretreatment conditions for enzymatic hydrolysis of poplar wood.” In: 11th European workshop on lignocellulosics and pulp, Hamburg, Deutschland, S. 13-16

SCHÜTT, F. (2012). „Dampfdruckaufschluss und enzymatische Hydrolyse von Pappelholz.“ Dissertation, Universität Hamburg

SCHÜTT, F.; WESTERENG, B.; HORN, S.J.; PULS, J.; SAAKE, B. (2012a). “Steam refining as an alternative to steam explosion.” Bioresource Technology 111, 476-481

SCHÜTT, F.; HAAS, N.P.; DEHNE, L.; KOCH, G.; JANZON, R.; SAAKE, B. (2012b). „Steam pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplar wood: Comparison of optimal conditions with and without $SO_2$ impregnation.” Holzforschung, im Druck

# 5. Literaturverzeichniss


Althaus, H.-J., Chudacoff, M., Hischier, R., Jungbluth, N., Osses, M., Primas, A. (2007). “Life Cycle Inventories of Chemicals.” ecoinvent report No. 8, v2.0. Swiss Centre for Life Cycle Inventories, Dübendorf.

Anuradha, R., Suresh, A. K., Venkatesh, K. V. (1999). “Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid.” Process Biochemistry. 35, 3 – 4, S. 367-375.

ARGYROPOULOS, D. S. (1994). "Quantitative phosphorus-31 NMR analysis of lignins, a new tool for the lignin chemist." J. Wood Chem. Technol. 14(1): 45-63.

Behr, A., et al. (2005). „Aliphatische Zwischenprodukte“. Dittmeyer, R., Keim, W., Kreysa, G., Oberholz, A. (Eds.) Winnacker – Küchler: Chemische Technik, Prozesse und Produkte: Organische Zwischenverbindungen, Polymere. 5. Auflage. WILEY-VCH, Weinheim.

Europäische Union. (2009). „Richtlinie 2009/28/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. April 2009 zur Förderung und Nutzung von Energien aus erneuerbaren Quellen und zur Änderung und anschließenden Aufhebung der Richtlinien 2001/77/EG und 2003/30/EG.“

Häßler T., Schieder D., Pfaller R., Faulstich M., Sieber V. (2012). „ Enhanced fed-batch fermentation of 2,3- butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365.“ Bioresource Technology doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.047

Xiao-Jun Ji, He Huang, Ping-Kai Ouyang (2011) “Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review”. Biotechnology Advances, 29, 351–364.

Jungbluth, N., Chudacoff, M., Dauriat, A., Dinkel, F., Doka, G., Emenegger, M. Gnansounou, E., Kljun, N., Schleiss, K., Spielmann, M., Stettler, C. Sutter, J. (2007). „Life Cycle Inventories of Bioenergy. ecoinvent report No. 17.” Swiss Centre for Life Cycle Inventories, Dübendorf.

Menke, A., Hünting, K., Pries, M. (2004). “Rübenprodukte in der Rinderfütterung“, http://www.landwirtschaftskammer.de/landwirtschaft/tierproduktion/rinderhaltung/fuetterung/ruebenprodukte.htm., 14. September 2004.

Myszkowski, J.,Zielinski, A. Z. (1965). „Synthèse de la butylène-chlorhydrine et sa conversion en méthyléthylcétone, oxyde de butylène et butylène-glycol.“ Chimie et industrie, 93, 3.

Qureshi, N., et al. (1994). "Recovery of 2,3-Butanediol by Vacuum Membrane Distillation." Separation Science and Technology 29(13): 1733-1748.

Rödel, A. (2008).“ Ökobilanzierung der Holzproduktion im Kurzumtrieb“, Arbeitsbericht des Instituts für Ökonomie der Forst- und Holzwirtschaft. Arbeitsbericht, Bd 3. Hamburg.

SAAKE, B.; JANZON, R.; SCHÜTT, F.; ADWIRAAH, H.; KÖRNER, I. (2010). „Pre-treatment methods for urban lignocellulosic green waste fractions for an enhanced energetic use.” In: 3rd International conference on engineering for waste and biomass valorization, Peking, China, 6 Seiten

Stalljohann, G. (2009). „Getreidequalitäten 2009“, http://www.landwirtschaftskammer.de/landwirtschaft/tierproduktion/schweinehaltung/fuetterung/getreidequalitaet-2009.htm, 30. September 2009.

Gräfje, H., Körnig, W., Weitz, H.-M., Reiss, W., Steffan, G., Diehl, H., Bosche, H. Schneider, K., Kieczka, H. (2005). „Butanediols, Butenediol, and Butynediol.” Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH, Weinheim.

Verband Süddeutscher Zuckerrübenanbauer e.V. (2011). „Weltmarktpreise für Zucker“, http://www.vsz.de/contenido/cms/front_content.php?idcat=149. 08. Dezember 2011

Weissermel, K., Arpe, H.-J. (1998). „3.3 Spezielle Herstellungsverfahren für Olefine“, 5. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim.

Wernet, G., Papadokonstantakis, S., Hellweg, S. (2009). „Bridging data gaps in environmental assessments: Modelling impacts of fine and basic chemical producs.” Green Chemistry., 11, 1826 – 1831.