Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Kontrollierte Trenn- und Konversionsprozesse für Hemicellulosen

ERA-WoodWisdom: „Controlled separation and conversion for wood hemicellulose (COSEPA)“

Zuwendungsempfänger:

Johann Heinrich von Thünen-Institut Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei

Förderkennzeichen:

22002314

Laufzeit:

01.05.2014 bis **30.04.2017**

Datum der Veröffentlichung:

07.11.2017

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

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

Inhaltsverzeichnis

I. Ziele 1

Gesamtziel des Vorhabens 1

Arbeitsziele des Projekts 1

1. Aufgabenstellung 2

Aufgaben im Arbeitspaket (AP) 3.1 2

Aufgaben im AP3.2 2

2. Stand der Technik 3

2.1 Teilaufgabe AP3.1: Biotechnische Umwandlung von Pentosen zu 2,3-Butandiol 3

2.2 Teilaufgabe AP3.2: Chemisch-katalytische Umsetzung zu Maleinsäure 3

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen 5

II. Ergebnisse 6

1. Erzielte Ergebnisse im AP3.1 6

1.1 Medium 6

1.2 Screening nach neuen 2,3-BDO Produzenten der Risikoklasse 1 6

1.2.1 Screening nach Abstammungsverhältnis 7

1.2.1 a) Auswahl 7

1.2.1 b) Untersuchung der 2,3-BDO-Produktion mit den Substraten Glucose und Xylose 7

1.2.2 Screening nach neuen 2,3-BDO Produzenten: Screening aus Bodenproben 9

1.2.3 Wahl des besten Stammes für die 2,3-BDO Produktion aus Holzhemicellulosen 11

Pufferwahl für Screeningversuche in Mikrotiterplatten 12

1.2.3 a) Umsetzung von Glucose zu 2,3-BDO 12

1.2.3 b) Umsetzung von Xylose zu 2,3-BDO 13

1.2.3 c) Umsetzung von Xylose zu 2,3-BDO unter Einfluss von Holzhemmstoffen 14

1.3 Charakterisierung von *B. atrophaeus* und *B. vallismortis* 15

1.3.1 Bestimmung der maximalen Glucosekonzentration 15

1.3.2 Hefeextrakt 17

1.3.3 Kultivierung mit Modellsubstraten 18

Zusammenfassung Stammwahl 21

1.4 Optimierung der Kultivierungsparameter von *B. vallismortis* 21

1.4.1 Einfluss der Temperatur 21

1.4.2 Einfluss des pH-Wertes auf die 2,3-BDO Produktion von *B. vallismortis* 21

1.4.3 Einfluss der Rührerdrehzahl 23

1.4.4 Kultivierung mit Xylose als Substrat 23

a) Referenzkultivierung mit Xylose 23

b) Maximale initiale Xylosekonzentration 24

c) Fed-Batch mit Xylose 25

1.5 Birkenholz-Hemicellulose-Extrakte 26

1.5.1 Charakterisierung der Birkenholz-Hemicellulose-Extrakte 26

1.5.2 Einfluss der Hemmstoffe auf *B. vallismortis* 28

1.5.3 Detoxifizierung der Hydrolysate 32

1.5.4 Batch Kultivierung mit Birkenholz-Hemicellulose-Hydrolysat 35

1.5.5 Die Herstellung von Methylethylketon (MEK) aus 2,3-Butandiol 37

2. Erzielte Ergebnisse im AP3.2 37

2.1 Experimentelle Durchführung 37

2.2 Ergebnisse für die Umsetzung von Xylose zu Furfural 41

2.3 Ergebnisse für die Oxidation von Furfural zu Maleinsäure 47

2.4 Ergebnisse für die Eintopfsynthese von Xylose zu Maleinsäure 51

3. Ergebnisse der Projektpartner 51

3.1 Bericht von Edinburgh Napier University (AP1 & AP5) 51

3.2 Bericht der Lappeenranta University of Technology (AP2) 52

3.3 Bericht von Innventia/RISE (AP2 & AP4) 52

3.4 Bericht von Xylophane/Seelution (AP4) 53

4. Technologie- und Wirtschaftlichkeitsbetrachtung 53

5. Verwertung 54

6. Erkenntnisse von Dritten 54

7. Veröffentlichungen 55

Literaturverzeichnis 56

Schlussbericht

I. Ziele

Gesamtziel des Vorhabens

Ziel des Vorhabens ist die Entwicklung ressourceneffizienter Bioraffineriekonzepte, d.h. Konzepte für die Umwandlung von Holzhemicellulosen in hochwertige Produkte. Das Thünen-Institut bearbeitet mit den Projektpartnern verschiedene Stufen entlang der Wertschöpfungskette.

Arbeitsziele des Projekts

Die Projektpartner bearbeiten die verschiedenen Stufen entlang der Wertschöpfungskette beginnend vom Rohstoff Holz bis hin zu den Endprodukten 2,3-Butandiol und Maleinsäure (Abbildung 1). Die Arbeiten des Thünen-Instituts befinden sich am Ende der Wertschöpfungskette und beinhalten die Umwandlung der Hemicellulosen zu Chemieprodukten. Hierzu werden sowohl biotechnische als auch chemisch katalytische Konversionsverfahren eingesetzt, um die Plattformchemikalien 2,3-Butandiol (2,3-BDO) sowie Furfural und Maleinsäure zu produzieren. Die Nutzung von 2,3-BDO zur Herstellung von Folgeprodukten wird ebenfalls untersucht.

2,3-BDO wird Baustein für Arzneimittel und Duftstoffe verwendet und kann zusätzlich zu dem Lösungsmittel Methylethylketon (MEK, Produktionsmenge 1,7 Mio. t/Jahr) umgewandelt werden, das für Farben und Beschichtungen Verwendung findet. Maleinsäure bzw. Maleinsäureanhydrid (MSA) ist ein wichtiger Baustein für ungesättigte Polyester (Produktionsmenge 1,5 Mio. t/Jahr) Bisher werden alle diese Produkte ausschließlich aus fossilen Energieträgern erzeugt. Effiziente Herstellungswege aus nachwachsenden Rohstoffen sind noch nicht vorhanden und sollen in diesem Projekt evaluiert werden.

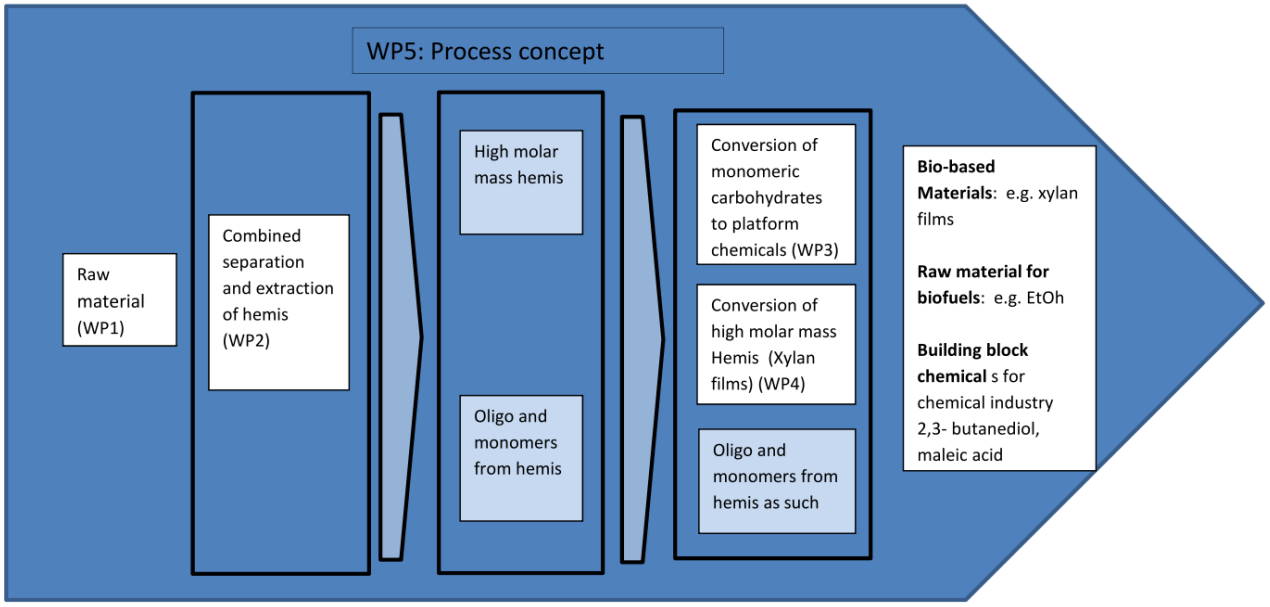


Abbildung 1: Die im COSEPA-Projekt zu bearbeitende Wertschöpfungskette ausgehend von Holz zu den Chemieprodukten 2,3-Butandiol und Maleinsäure.

1. Aufgabenstellung

Aufgaben im Arbeitspaket (AP) 3.1

Die biotechnische Produktion von 2,3-BDO aus Holzhydrolysaten gewonnener Xylose, wird im Arbeitspaket 3.1 in mehrere Schritte unterteilt (Abbildung 2).

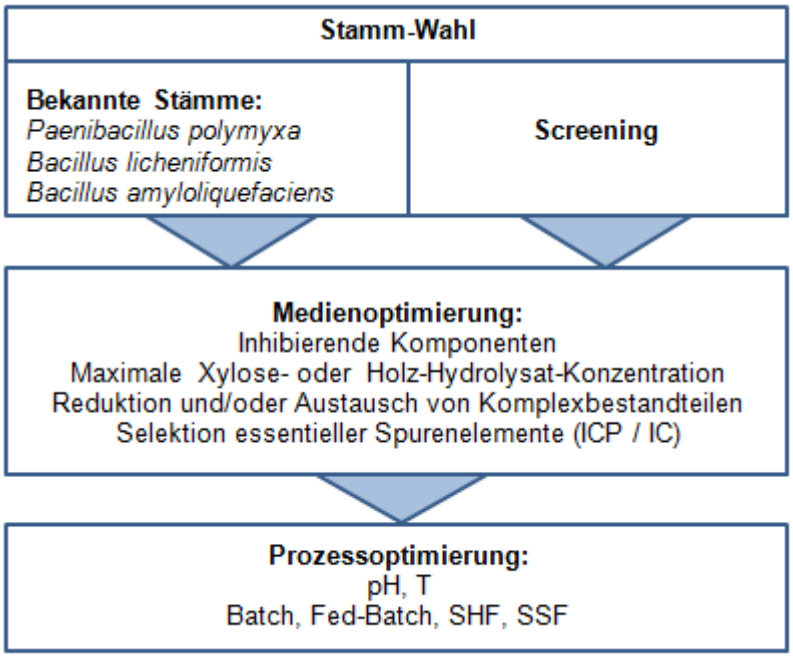


Abbildung 2: Fließschema der Aufgaben im AP3.1 zur biotechnischen Produktion von 2,3-BDO aus nachwachsenden Rohstoffen.

Aufgaben im AP3.2

Im Arbeitspaket 3.2 war die Aufgabe Xylose aus Holzhemicellulose als Ausgangsstoff für die Herstellung von Furfural und Maleinsäure zu nutzen. Die einzelnen Aufgabenbereiche sind in Abbildung 3 dargestellt.

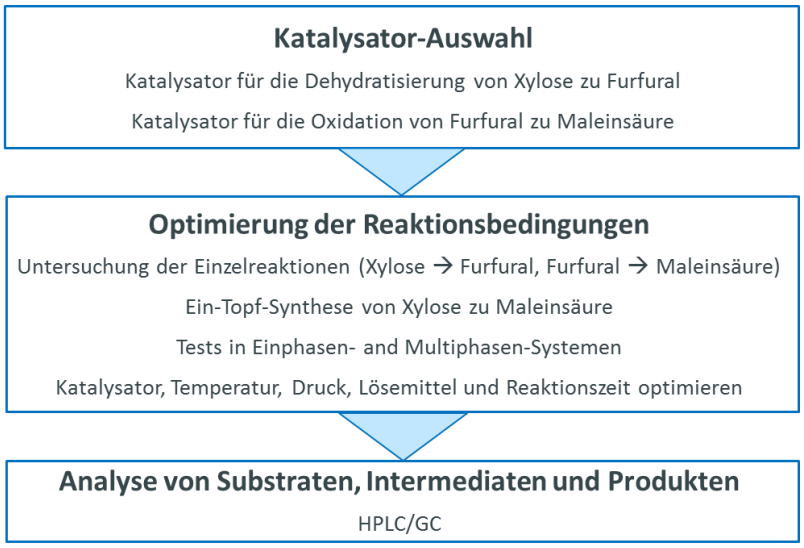


Abbildung 3: Die einzelnen Aufgabenbereiche von AP3.2 zur Umsetzung von Xylose zu Furfural und Maleinsäure.

2. Stand der Technik

2.1 Teilaufgabe AP3.1: Biotechnische Umwandlung von Pentosen zu 2,3-Butandiol

Die biotechnische Herstellung von 2,3-BDO ist schon seit Anfang des 20. Jahrhunderts bekannt. Die derzeit höchsten Konzentrationen wurden mit dem Risikoklasse 2 Stamm *Klebsiella pneumoniae* erreicht. Stämme der Risikoklasse 2 sind jedoch aufgrund hoher Sicherheitsauflagen problematisch für die Umsetzung industrieller Prozesse. Damit sich ein kostengünstiger Prozess realisieren lassen würde, muss ein Stamm der Risikoklasse 1 eingesetzt werden. Bekannte 2,3-BDO-Bildner der Risikoklasse 1 sind *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* oder *Paenibacillus polymyxa*. Mit dem Stamm *P. polymyxa* konnten Konzentrationen von 111 g/L [1] und mit *B. licheniformis* 145 g/L [2] 2,3-BDO mit reiner Glucose produziert werden. Diese Konzentrationen liegen nahe an den 150 g/L 2,3-BDO [3] die mit *K. pneumoniae* mit reiner Glucose produziert werden konnten und sind somit attraktive Risikoklasse 1 Stämme für einen potentiellen industriellen Prozess.

In diesem Projektvorhaben wird anstelle von Glucose aus Hemicellulosen gewonnene Xylose eingesetzt. Über die Umsetzung von Xylose zu 2,3-BDO gibt es derzeit nur wenig Literatur. Die höchsten Konzentrationen 2,3-BDO mit alternativen Substraten wurden mit dem Stamm *B. licheniformis* auf Maisstroh-Hydrolysaten erreicht. Mit einem Gemisch aus Glucose und Xylose (2.7 : 1) wurden 74 g/L 2,3-BDO produziert [4]. Im Vergleich zu den Konzentrationen die mit Glucose erreicht werden, sind die Ausbeuten mit Xylose aus nachwachsenden Rohstoffen gering. Durch ein Screening nach neuen 2,3-BDO-produzierenden Stämmen aus der Risikogruppe 1 und der Optimierung der Prozessparameter, soll die maximale 2,3-BDO-Konzentration aus alternativen Rohstoffen deutlich gegenüber dem Stand des Wissens verbessert werden.

2.2 Teilaufgabe AP3.2: Chemisch-katalytische Umsetzung zu Maleinsäure

Maleinsäure (MA) wird aktuell durch eine katalytische Gasphasenoxidation von unterschiedlichen Petrochemikalien (Benzol, Buten, Butan) hergestellt, wobei nur mäßige Selektivitäten im Bereich 50 – 70 % erreicht werden. In diesem Projektteil des COSEPA-Projekts sollte eine Herstellung von Maleinsäure aus Pentosen erfolgen. Die Herausforderung bestand darin, ob es möglich ist, ein durchgängiges, neues Verfahren zu entwickeln, welches die Reaktionsschritte Pentose → Furfural → Maleinsäure vereinigt (Abbildung 4). Die Alternative dazu wäre ein zweistufiges Verfahren mit den Einzelschritten Xylose → Furfural und Furfural → Xylose Der zu entwickelnde Prozess sollte dabei gegenüber den bisherigen Prozessen effizienter bezüglich Umsatz und Selektivität sein.

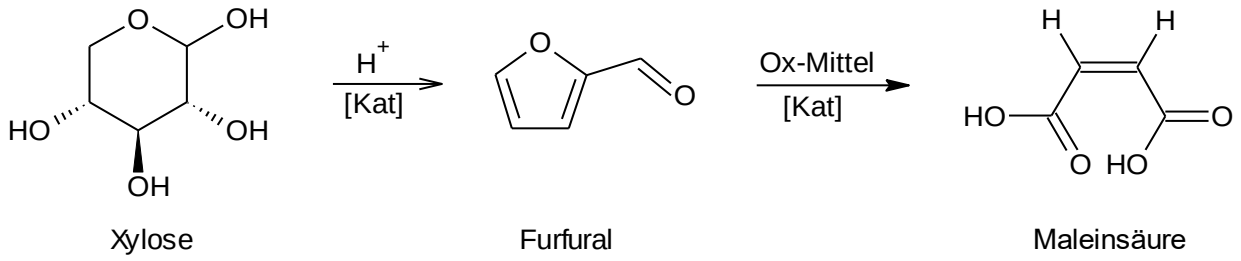


Abbildung 4: Der geplante Reaktionsweg von Xylose über Furfural bis zur Maleinsäure.

Beide in Abbildung 4 dargestellten Einzelreaktionsschritte sind literaturbekannt. Eine Zusammenstellung ausgewählter Katalysatoren liefern Tabelle 1 und Tabelle 2.

Tabelle 1: Eine Auswahl an Katalysatoren für die Synthese von Furfural aus Xylose.

Katalysator	Lösemittel	Umsatz [%]	Ausbeute [%]	Selektivität [%]	Reaktions-bedingungen	Sonstiges	Quelle
HCl	H_2O/SBP	92	71	77	170 °C	homogen	[5]
Ameisensäure	H_2O/MIBK + NaCl	99	82	83	180 °C	homogen	[6]
$AlCl_3$*$6H_2O$	H_2O/THF	> 99	75	75	140 °C	homogen	[7]
Maleinsäure	H_2O	98	72	73	200 °C	homogen	[8]
$H_3PW_{12}O_{40}$	DMSO	94	63	67	140 °C	homogen	[9]
Amberlyst70	H_2O/Toluol	99	70	71	175 °C	heterogen	[10]
M-71-1S-PF-0.53	H_2O/Toluol	99	78	79	180 °C	heterogen	[11]
SBA-15 P100-0.10	H_2O/Toluol	96	85	82	170 °C	heterogen	[12]
P-C-SO_3H	DMSO	> 98	> 98	> 99	150 °C	heterogen	[13]
TMG*HSO_4 + CO_2	H_2O	94	90	95	160 °C	heterogen	[14]
SO_4^{2-} / Sn-MMT	2-MTHF/H_2O + NaCl	> 99	80	80	160 °C	heterogen	[15]
SO_4^{2-} / SnO_2^--MMT	H_2O/Toluol + NaCl	94	82	87	190 °C	heterogen	[16]

SBP = 2-*sek*-Butylphenol

Tabelle 2: Eine Auswahl an Katalysatoren für die Synthese von Maleinsäure aus Furfural.

Katalysator	Lösemittel	Umsatz [%]	Ausbeute [%]	Selektivität [%]	Reaktions-bedingungen	Sonstiges	Quelle
$H_3PMo_{12}O_{40}$*xH_2O	$C_6H_5NO_2$/ H_2O	66,9	37,8	56,4	110 °C, 20 atm O_2	homogen	[17]
$H_3PMo_{12}O_{40}$*xH_2O	CCl_4/ H_2O	74,5	38,3	51,4	110°C, 20 atm O_2	homogen	[17]
$H_3PMo_{12}O_{40}$*xH_2O	$C_2H_2Cl_2$/ H_2O	50,7	30,0	60,6	110°C, 20 atm O_2	homogen	[17]
$H_3PMo_{12}O_{40}$/$Cu(NO_3)_2$	H_2O	95,2	49,2	51,7	98°C, 20 atm O_2	homogen	[18]
$H_5PV_2Mo_{10}O_{40}$*xH_2O/ $Cu(CF_3SO_3)_2$	CH_3CN/HOAc	98,7	54,0	54,7	110 °C, 20 atm O_2	homogen	[19]
Mo_4VO_{14}	CH_3COOH	> 99	> 65	> 65	100°C, 20 atm O_2	heterogen	[20]
Betainhydrochlorid	H_2O	> 99	61	61	100 °C, 10 eq. H_2O_2	heterogen	[21]

Die Hydrolyse der Hemicellulose zu Pentosen (v.a. Xylose und Arabinose) kann sehr unproblematisch durch Säurekatalyse oder Enzyme erfolgen. Die Pentose Xylose wird seit 1921 industriell für die Synthese von Furfural, dem entscheidenden Zwischenprodukt auf diesem Weg zur Maleinsäure, genutzt. Allerdings ist die Effizienz der technischen Prozesse, welche im Allgemeinen Schwefelsäure als Katalysator nutzen, mit Ausbeuten von 30 – 55 % gering. Neue Untersuchungen zeigen, dass durch den Einsatz von komplexen Katalysatoren Ausbeuten von über 90 % möglich sind. Die verwendeten Reaktionssysteme variieren dabei. Durch den Einsatz eines effektiven Extraktionsmittels kann die Ausbeute erhöht werden, weil das gebildete Furfural sofort in die organische Phase übergeht. Dadurch können Nebenreaktionen mit Bestandteilen aus der wässrigen Phase vermindert und die Selektivität erhöht werden. Abbildung 5 zeigt die mögliche Nebenreaktion von Furfural mit Xylose (Furfuralkondensation).[22]

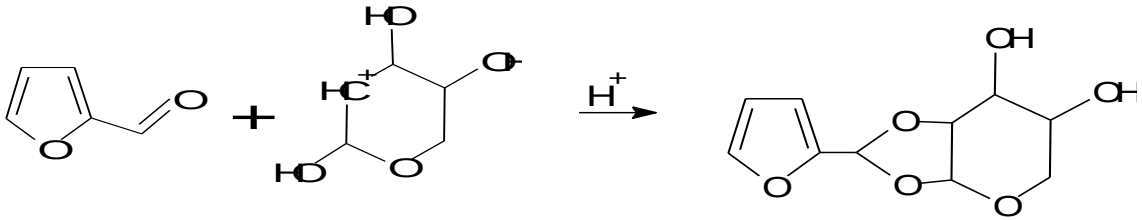


Abbildung 5: Die säurekatalysierte Furfuralkondensations-Reaktion.[22]

Des Weiteren können Nebenprodukte durch die säurekatalysierte Furfuraloligomerisierung bzw. -polymerisierung gebildet werden. Da diese Reaktionen unkontrolliert von statten gehen und eine Charakterisierung auf Grund von komplexen Netzwerken, die dabei gebildet werden, nicht möglich ist, bezeichnet man diese Nebenprodukte als Humine.

Um Maleinsäure aus Furfural herstellen zu können, ist eine Oxidation notwendig. Ein seit 1935 bekanntes Verfahren ist die katalytische Dampfphasenoxidation mit Sauerstoff, wofür hohe Temperaturen im Bereich 200 – 300 °C nötig sind. Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, dass sich die Reaktion auch bei milderen Bedingungen durchführen lässt, wenn ein komplexer Katalysator genutzt wird. Die typischen Ausbeuten liegen im Bereich von 40 – 55 % und müssen somit deutlich gesteigert werden. Um das Gesamtziel einer Eintopfsynthese von der Hemicellulose bis zur Maleinsäure, über Xylose und Furfural als Zwischenstufen verwirklichen zu können, sollten die existierenden Ansätze zusammengeführt und optimiert werden. Dazu mussten zunächst für die Einzelreaktionen Umsatz und Selektivität gesteigert werden, um optimale Parameter für den Gesamtprozess zu finden.

In einem vorausgegangenen Projekt (FKZ 22003813) wurde 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (HFIP) als Lösemittel für Dehydratisierungsreaktionen im Ein- und Zweiphasensystem untersucht (Abbildung 6). HFIP hat einen niedrigen Siedebereich von 58 – 59 °C und kann daher leicht abgetrennt werden und weist zudem, im Vergleich zu herkömmlichen Extraktionsmitteln, einen extrem hohen Verteilungskoeffizienten für Dehydratisierungsprodukte auf.

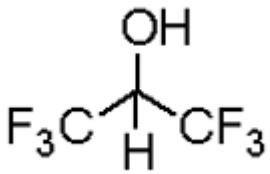


Abbildung 6: 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (HFIP).

Für beide Reaktionsführungen wurden mit Ausbeuten von 80 – 90 % ausgezeichnete Ergebnisse in Bezug auf die Basischemikalie 5-Hydroxymethylfurfural erreicht. Bei der zweiphasigen Reaktionsführung dient HFIP als in-situ Extraktionsmittel für das Dehydratisierungsprodukt aus der wässrigen Reaktionsphase. Das Gemisch besteht aus einer oberen wasserreichen Phase (Reaktionsphase) und unteren HFIP-reichen Phase (Produktphase). Bei der einphasigen Reaktionsführung ist HFIP die Hauptkomponente und wird mit 10 – 15 Vol-% wässriger Zuckerlösung versetzt (mischbar).

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Tabelle 3: Projektpartner und Aufgabenverteilung.

Arbeitspaket	Aufgaben	Bearbeiter
AP1	Untersuchung zu wenig genutzter Rohstoffströme	**Napier Universität,** Lappeenranta Universität
AP2	Entwicklung eines neuen, alternativen Wegs zur Trennung und Fraktionierung der Holz-Hemicellulosen	**Lappeenranta Universität,** Innventia, Napier Universität
AP3	Entwicklung neuer Wege, um Hemicellulosen mittels biotechnischer und chemisch-katalytischer Verfahren zu Plattformchemikalien (2,3-Butandiol, Furfural, Maleinsäure) umzuwandeln	**Thünen-Institut**
AP4	Entwicklung und Charakterisierung neuartiger Folien aus fraktionierten Hemicellulosen	**Innventia, Xylophane**
AP5	Bioraffinerie-Konzepte	**Lappeenranta Universität,** Innventia, Napier, Thünen-Institut

II. Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse im AP3.1

1.1 Medium

Für das Projektvorhaben wurde, soweit nicht anders beschrieben das mBasal-Medium (Tabelle 4) verwendet. Das Medium leitet sich vom Basal-Medium ab, dass 1998 von Nakashimada [23] et al. für die Kultivierung von *P. polymyxa* zur 2,3-BDO-Produktion verwendet wurde.

Tabelle 4: Zusammensetzung des mBasal-Medium.

Lösung	Substanz	Menge [g/L]
1	C-Quelle	20-200
2	Hefeextrakt	10
3	K_2HPO_4	7
	KH_2PO_4	5,5
4	$(NH_4)_2SO_4$	1
	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,25
	$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,12
	$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,021
5	$Co(NO_3)_2 \cdot 6\ H_2O$	0,029
	$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6\ H_2O$	0,039
6	Spurenelementlösung	10 mL

Tabelle 5 zeigt die Zusammensetzung der Spurenelementlösung, die für das mBasal-Medium verwendet worden ist.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Spurenelementlösung für das mBasal-Medium.

Substanz	Menge [g/L]
Nicotinsäure	0,2
$Na_2SeO_3 \cdot 5\ H_2O$	0,0262
$NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,0037
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	0,5
H_3BO_3	0,1
$AlK(SO_4)_2 \cdot 12\ H_2O$	0,0172
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,001
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	0,554

1.2 Screening nach neuen 2,3-BDO Produzenten der Risikoklasse 1

Es wurde ein Screening nach geeigneten Mikroorganismen auf den Substraten Glucose und Xylose durchgeführt. Dabei wurde ausschließlich nach Mikroorganismen der Risikoklasse 1 gesucht, da aus Sicherheitsgründen nur mit ihnen ein späterer industrieller Prozess durchführbar ist. Weitere Anforderungen an die Mikroorganismen sind eine große Toleranz gegenüber den Substrat-, Produkt- und Nebenproduktkonzentrationen sowie hohe Ausbeuten auf den Substraten. Da im Projektverlauf die Xylose aus Holzhydrolysaten bereitgestellt wird, müssen die Mikroorganismen ebenfalls gegenüber den Holzhydrolysat-Bestandteilen eine hohe Resistenz aufweisen.

1.2.1 Screening nach Abstammungsverhältnis

1.2.1 a) Auswahl

2,3-BDO ist ein Produkt der gemischten Säurefermentation. Dieser Stoffwechselweg ist bei Bakterien weit verbreitet. Für das Screening nach neuen 2,3-BDO-bildenen Stämmen wurde daher nach phylogenetisch nahen Verwandten von bereits bekannten 2,3-BDO-Produzenten gesucht. Die derzeit höchsten 2,3-BDO-Konzentrationen mit S1 Mikroorganismen wurden mit den Bakterien *Bacillus licheniformis* DSM 8785 [2], *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 [1] und *Bacillus amyloliquefaciens* [24] erreicht. Für das Screening wurden folglich Bakterien des Genus *Bacillus* und *Bacillus*-Ähnliche (Tabelle 6) ausgewählt. Stämme, die nach der Recherche Potential für eine 2,3-BDO-Produktion besitzen, wurden bei den Stammsammlungen DSMZ (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) und NRRL (Northern Regional Research Laboratory) bestellt.

Die *Geobacillen* weisen die größte genetische Abweichung zu *B. licheniformis* DSM 8785 und *P. polymyxa* DSM 365 auf, jedoch sind auch sie für eine 2,3-BDO-Produktion bekannt. Derzeit liegt die maximal erreichte 2,3-BDO-Konzentration von *Geobacillen* bei 14,5 g/L 2,3-BDO und 7,7 g/L Acetoin mit Glucose [25]. *Geobacillen* sind thermophil und wachsen zwischen Kultivierungstemperaturen von 55 °C und 75 °C. Dieser Temperaturbereich ist für industrielle Zwecke gut geeignet, da das Kulturmedium nicht mehr sterilisiert werden muss, die Prozesskosten sinken und großes Potential zur Verbesserung der Produktivität und der Effizienz des Prozesses besteht. Zusätzlich sind Temperaturen zwischen 55 – 60 °C vorteilhaft für einen „Simultanious Saccarification and Fermentation“ (SSF)-Prozess. Aus diesem Grund wurden auch diese Stämme für das Screening ausgewählt.

Tabelle 6: Liste der auf 2,3-BDO-Bildung gescreenten Stämme.

Stamm	Zusatz
Geobacillus kaustophilus	NRS-81
Geobacillus stearothermophilus	NRS-64
Geobacillus thermoglucosidasius	B-14516
Bacillus atrophaeus	NRS-213
Bacillus amyloliquefaciens	DSM 7
Bacillus amyloliquefaciens	NRS-762
Bacillus mojavensis	B-14698
Bacillus subtilis	B-571
Bacillus subtilis inaquosorum	B-20356
Bacillus vallismortis	B-14891
Paenibacillus polymyxa	B-369
Paenibacillus polymyxa	B-510
Paenibacillus polymyxa	B-719
Bacillus licheniformis	B-23318
Bacillus licheniformis	B-14209

Für eine einfachere Handhabung und einen hohen parallelen Probedurchsatz wurde das Screening in Schüttelkolben und Mikrotiterplatten (MTP) durchgeführt.

1.2.1 b) Untersuchung der 2,3-BDO-Produktion mit den Substraten Glucose und Xylose

Für das Screening wurden die Kulturen in einer Vorkultur für 22-24 h in 50 mL mBasal-Medium mit 20 g/L Glucose bei 100 rpm und 30 °C in einem 300 mL Schüttelkolben mit drei Schikanen kultiviert. Die Hauptkultur erfolgte bei den angegebenen Kultivierungsbedingungen in Tabelle 7 in einem 300 mL Schüttelkolben mit drei Schikanen. Die Kolben wurden hierfür mit 60 mL mBasal-Medium mit 50 g/L Glucose bzw. 50 g/L Xylose befüllt. Bewertet wurden das Wachstum sowie die 2,3-BDO-Produktion mit den verschiedenen Substraten.

Tabelle 7: Übersicht über die 2,3-BDO-Bildung der ausgewählten Stämme mit Glucose und Xylose. Gutes Wachstum bzw. gute 2,3-BDO-Produktion > 2,5 g/L 2,3-BDO (+), mittleres Wachstum bzw. mittlere Produktion zwischen 0,5 g/L und 2,5 g/L 2,3-BDO (o) und kein Wachstum bzw. eine schlechte 2,3-BDO-Produktion < 0,5 g/L (-).

Stamm	**Zusatz**	**Temperatur / Schüttel-frequenz**	**Wachstum auf Glucose**	**2,3-BDO Produktion mit Glucose**	**Wachstum auf Xylose**	**2,3-BDO Produktion mit Xylose**
B. licheniformis	DSM 8785	45 °C / 125 rpm	+	+	+	o
G. kaustophilus	NRS-81	55°C / 125 rpm	n.b.	-	n.b.	-
G. stearothermophilus	NRS-64	55°C / 125 rpm	n.b.	-	n.b.	-
G. thermoglucosida-sius	B-14516	55°C / 125 rpm	-	-	n.b.	-
B. atrophaeus	NRS-213	39 °C / 125 rpm	+	+	+	+
B. amyloliquefaciens	DSM 7	37 °C / 125 rpm	+	+	-	-
B. amyloliquefaciens	NRS-762	39 °C / 125 rpm	+	+	+	+
B. mojavensis	B-14698	39 °C / 125 rpm	+	+	+	+
B. subtilis	B-571	39 °C / 125 rpm	o	o	-	-
B. subtilis inaquosorum	B-20356	39 °C / 125 rpm	+	+	+	+
B. vallismortis	B-14891	39 °C / 125 rpm	+	+	+	+
P. polymyxa	DSM 356	39 °C / 125 rpm	+	+	+	o
P. polymyxa	B-369	39 °C / 125 rpm	+	o	+	+
P. polymyxa	B-510	39 °C / 125 rpm	+	+	+	+
P. polymyxa	B-719	39 °C / 125 rpm	+	o	+	o
B. licheniformis	B-23318	45 °C / 125 rpm	+	+	+	+
B. licheniformis	B-14209	45 °C / 125 rpm	+	+	+	o

n.b. - optische Dichte nicht bestimmbar

Bis auf die *Geobacillen* und *B. subtilis* zeigten alle Kulturen mit dem Substrat Glucose ein gutes Wachstum und produzierten 2,3-BDO. Für die *Geobacillen* sowie für *B. subtilis* waren die gewählten Kultivierungsbedingungen nicht geeignet.

Für die Evaluierung der 2,3-BDO Produktion der *Geobacillen* wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden die empfohlenen Medien der DSMZ für die jeweiligen Stämme angefertigt und nach Vorgabe der DSMZ-Kultivierungsempfehlungen kultiviert. In allen durchgeführten Experimenten konnte keine Bildung von 2,3-BDO beobachtet werden (Daten nicht dargestellt).

Auch für *B. subtilis* waren die gewählten Kultivierungsparameter nicht geeignet. Daher wurden auch für diesen Stamm weitere Untersuchungen durchgeführt. Es konnten keine Kultivierungsparameter gefunden werden, die zu einer höheren 2,3-BDO Bildung führten.

Bei der Umwandlung von Pentosen (Xylose) zu 2,3-BDO entstehen mehr organische Säuren als bei der Umwandlung von Hexosen. Typische organische Säuren die während der Kultivierung von Xylose entstehen sind Milch-, Essig und/oder Bernsteinsäure. Durch die Bildung dieser Nebenprodukte sinkt der pH-Wert während der Kultivierung ab und hemmt damit den weiteren Kultivierungsverlauf. Um zu verhindern, dass der pH-Wert absinkt und die Kulturen inhibiert werden, wurde das Medium mit dem Substrat Xylose zusätzlich mit Phosphatpuffer versetzt und auf einen pH-Wert von 6,7 eingestellt.

Die Konversion von Xylose zu 2,3-BDO fiel bei allen Stämmen insgesamt geringer aus. Die Stämme *G. kaustophilus*, *G. stearothermophilus*, *G. thermoglucosidasius*, *B. subtilis* und *B. amyloliquefaciens* DSM 7 waren nicht in der Lage, Xylose zu verwerten. Bei den Stämmen *P. polymyxa* B-719, *P. polymyxa* DSM 356, *B. licheniformis* B-14209 sowie bei dem Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 wurden nur geringe Mengen (< 2,5 g/L) 2,3-BDO gebildet. Bei all diesen Stämmen sank der pH-Wert auf < 5 wodurch die Kultivierungen gehemmt wurden. Dies zeigt, dass das gewählte Puffersystem an dieser Stelle nicht geeignet war.

1.2.2 Screening nach neuen 2,3-BDO Produzenten: Screening aus Bodenproben

Im Anschluss an das Screening nach der phylogenetischen Abstammung, erfolgte ein Screening nach thermophilen potentiellen 2,3-BDO-Produzenten aus Bodenproben. Das Screening war als Selektionsprozess aufgebaut, sodass am Ende nur die Stämme mit dem größten Potential ausgewählt wurden. Insgesamt wurden 4 Experimente durchgeführt mit denen die Anzahl der Stämme schrittweise reduziert wurde:

- Wachstum bei 50 °C
- Voges-Proskauer-Test
- Verwertung von Xylose
- Nachweis von 2,3-BDO-Produktion

Im ersten Schritt wurde 1 g Bodenprobe in 10 mL 0,9 % NaCl-Lösung in Suspension gebracht und auf Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden für 20 – 24 h bei 50 °C inkubiert. Die hohe Temperatur wurde ausgewählt, um thermophile Bakterien zu selektieren. In diesem ersten Selektionsschritt konnten 226 Kolonien von den Platten gepickt werden und auf die Bildung von Acetoin getestet werden. Acetoin ist das Intermediat zur Bildung von 2,3-Butandiol und wird mit dem Voges-Proskauer-Test nachgewiesen. Durch die Zugabe der Voges-Proskauer-Lösungen (KOH und α-Naphthol) färbt sich das Kulturmedium rot (Abbildung 7), wenn die Bakterien in der Lage sind aus Glucose Acetoin zu bilden.

In diesem Selektionsschritt wurden 100 Kolonien für die weiteren Tests selektiert.

Abbildung 7: Voges-Proskauer Test (Nachweis von Acetoin). Links außen ist die Negativkontrolle, zweites Reagenzglas von links enthält die positiv Kontrolle, alle weiteren Reagenzgläser enthalten Proben.

Im dritten Selektionsschritt wurden die 100 Kolonien im Mikrotiterplatten (MTP)-Maßstab auf die Verwertung von Xylose getestet. In dem Experiment wurden 100 g/L Xylose eingesetzt, die Verwertung von Xylose wurde indirekt über das Wachstum bestimmt. So wurden nur Zellen ausgewählt, die nach 24 h

Inkubationszeit eine optische Dichte bei 595 nm von mindestens 0,5 aufwiesen. Von den 100 getesteten Kolonien zeigten 40 Kolonien ein deutliches Wachstum mit dem Substrat Xylose.

Im letzten Schritt sollte die 2,3-BDO-Produktion der 40 gescreenten Stämme überprüft werden. Für diesen Test wurde eine Kultivierung in mBasal-Medium mit 100 g/L Glucose durchgeführt und nach einer Kultivierungszeit von 20-24 h der 2,3-BDO-Gehalt mittels HPLC-Analyse bestimmt. Der Versuch wurde mit dem Substrat Glucose durchgeführt, da einige Bakterien mit dem Substrat Xylose Acetat als Hauptnebenprodukt produzieren, welches eine Versäuerung des Kulturmediums verursacht. In diesem Fall kann eine Kultivierung pH-inhibiert sein und ein Stamm der in einem pH-geregeltem System gute Leistungen bringt, könnte mit dem Substrat Xylose in einem ungepufferten System ausselektiert werden. Um dies zu verhindern und die 2,3-BDO-Produktion sicher festzustellen, wurde Glucose eingesetzt.

Am Ende des Selektionsprozesses sind 4 Stämme übrig geblieben, die als potentielle 2,3-BDO-Produzenten eingestuft wurden. Die Stämme tragen die internen Namen GB 1, LB 10, B 1-7 und GK 16.

In Zusammenarbeit mit der DSMZ wurden die Screening-Stämme identifiziert und charakterisiert (Tabelle 8). Alle Stämme sind Stämme der Risikoklasse 1. Der Stamm GB 1 wurde anhand einer partiellen Sequenzierung zu 99,9 % den Stämmen *B. subtilis* und *Bacillus tequilensis* zugeordnet. Zusätzliche phänotypische Tests weisen auf den Stamm *B. subtilis* hin. Eine partielle Sequenzierung der Stämme LB 10 und B 1-7 ergab eine Ähnlichkeit von 99,9 % zu dem Stamm *B. licheniformis*. Phänotypische Tests bestätigen dieses Ergebnis. Die beiden Stämme unterscheiden sich jedoch deutlich in der Isomer-Bildung von 2,3-BDO. Der Stamm *B. licheniformis* LB 10 produziert D- zu meso-2,3-BDO in einem Verhältnis von etwa 9:1. Der Stamm *B. licheniformis* B 1-7 hingegen bildet die Isomere in einem Verhältnis von etwa 2:7. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es Stammunterschiede gibt. Der Referenz Stamm *B. licheniformis* DSM 8785 produziert überwiegend meso-2,3-BDO, in einem Verhältnis D- zu meso-2,3-BDO von 2:8.

Die partielle Sequenzierung für den Stamm GK 16 ergab eine Ähnlichkeit von 99,1 % zu den Stämmen *B. licheniformis* und *B. sonorensis*. Die phänotypischen Tests weisen jedoch auf eine *B. licheniformis* ssp. hin.

Tabelle 8: Stammzuordnung und Charakterisierung der Screening-Stämme GB 1, LB 10, B 1-7 und GK 16.

Interner Name	Stammzuordnung	Risikoklasse	Gebildete Sterioisomere	MS-Flächenverhältnis der Sterioisomere [%]
GB 1	*B. subtilis*	1	D(-)-2,3-BDO	92
			Meso-2,3-BDO	8
LB 10	*B. licheniformis*	1	D(-)-2,3-BDO	89
			Meso-2,3-BDO	11
B 1-7	*B. licheniformis*	1	D(-)-2,3-BDO	24
			Meso-2,3-BDO	76
GK 16	*B. licheniformis*	1	D(-)-2,3-BDO	39
			Meso-2,3-BDO	61

Die identifizierten Stämme wurden in 300 mL Schüttelkolben bei 50 °C, einer Schüttelfrequenz von 125 rpm und einem Füllvolumen von 60 mL kultiviert und mit dem Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 verglichen (Abbildung 8). Für den Vergleich wurden 50 g/L Glucose eingesetzt, die theoretisch maximale 2,3-BDO-Konzentration, die erreicht werden kann, liegt damit bei 25 g/L. Der Versuch wurde über einen Zeitraum von 8 h beobachtet. Der Stamm GB 1 verbrauchte in dieser Zeitspanne nur wenig Zucker und die Ausbeute war mit 0,26 g/g Glucose eher gering. Da der Stamm im Screening im MTP-Maßstab gute Ergebnisse erzielte, könnte die geringe Umsetzung und Ausbeute mit den gewählten Kultivierungsparametern im Schüttelkolben einhergehen, die für den Stamm GB 1 möglicherweise nicht optimal gewählt waren. Die Stämme LB 10 und B 1-7 setzten die Glucose gut, mit Ausbeuten von 0,39 – 0,4 g/g Glucose, zu 2,3-BDO um. Die beste Umsetzung von Glucose zu 2,3-BDO erzielte der Stamm GK 16, mit einer Ausbeute von 0,42 g/g Glucose. Die Ausbeute liegt somit, auch ohne Optimierungsversuche, nahe an der theoretisch maximalen Ausbeute von 0,5 g/g Glucose. Der Stamm GK 16 hat daher großes Potential für die 2,3-BDO-Produktion. Die Ausbeuten der Stämme LB 10, B 1-7 und GK 16 sind vergleichbar mit der Ausbeute von 0,45 g/g Glucose die der Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 erreicht.

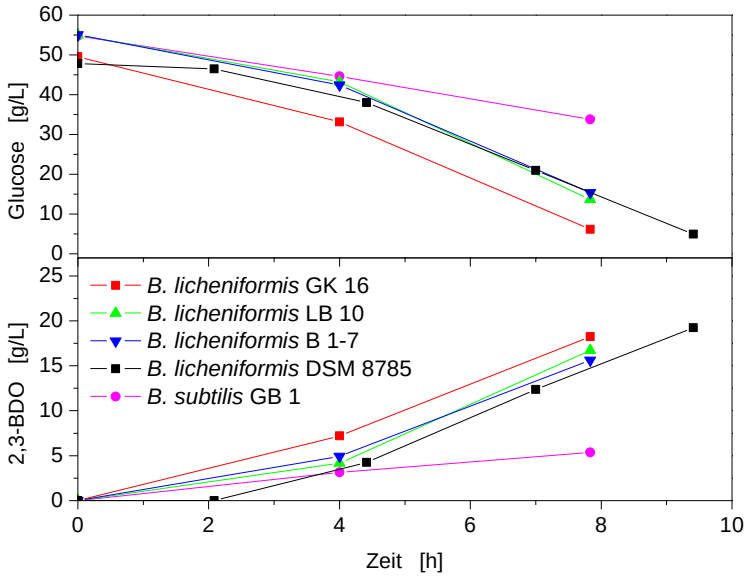


Abbildung 8: Glucose-Verbrauch (oben) und 2,3-Butandiol-Bildung (unten) mit den Screening-Stämmen GB 1, LB 10, B 1-7 und GK 16 und dem Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 bei einer Kultivierungs-Temperatur von 50 °C und einer Schüttelfrequenz von 125 rpm.

1.2.3 Wahl des besten Stammes für die 2,3-BDO Produktion aus Holzhemicellulosen

Für das weitere Projektvorhaben wurden die Stämme mit dem größten Potential nach den ersten Vorversuchen ausgewählt (Tabelle 9). Aus den ausgewählten 16 Stämmen, sollte der Stamm mit dem größten Potential für die Umsetzung von Holzhemicellulosen zu 2,3-BDO identifiziert werden. Die Versuche für die Stammauswahl wurden aufgrund der großen Versuchszahl im MTP-Maßstab durchgeführt.

Tabelle 9: **Vorauswahl der gescreenten Stämme.**

Nummer	Stamm	Stammnummer
1 Referenz	*Bacillus licheniformis*	DSM 8785
2	*Bacillus amyloliquefaciens*	DSM 7
3	*Bacillus amyloliquefaciens*	NRS-762
4	*Bacillus atrophaeus*	NRS-213
5	*Bacillus licheniformis*	B-23318
6	*Bacillus mojavensis*	B-14698
7	*Bacillus subtilis*	B-571
8	*Bacillus subtilis inaquosorum*	B-20356
9	*Bacillus vallismortis*	B-14891
10	*Paenibacillus polymyxa*	DSM 356
11	*Paenibacillus polymyxa*	B-369
12	*Paenibacillus polymyxa*	B-510
13*	*Bacillus licheniformis*	LB 10
14*	*Bacillus licheniformis*	B 1-7
15*	*Bacillus licheniformis*	GK 16
16*	*Bacillus subtilis*	GB 1

* Eigenisolate

Pufferwahl für Screeningversuche in Mikrotiterplatten

Im ersten Screening (Tabelle 7) hat sich gezeigt, dass der gewählte Phosphatpuffer nicht ausreichend war in seiner Pufferkapazität. Um eine Aussage über die 2,3-BDO-Ausbeute der einzelnen Stämme treffen zu können, muss die Versäuerung der Medien verhindert werden. Hierfür wurden verschiedene Puffersysteme mit dem Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 getestet (Abbildung 9).

Phosphatpuffer mit einer Molarität von 0,15 wies keine Verbesserung gegenüber des ungepufferten Systems auf (Abbildung 9). Eine Erhöhung der Pufferkapazität ist im Falle von Phosphatpuffer nicht zweckmäßig, da die Salz- und Phosphatkonzentration im Medium ansteigt und dies einen negativen Effekt auf die Zellen haben kann.

$CaCO_3$ hat ebenfalls keine ausreichende Pufferkapazität. Zudem eignet sich $CaCO_3$ nicht für den Einsatz in MTP und kann daher für das geplante Screening nicht verwendet werden.

Als weiterer Puffer wurde Morpholinoethansulfonsäure (MES) getestet. MES ist ein Zwitterion, mit einem Pufferbereich zwischen 5,8 und 6,5. Der Puffer ist chemisch und metabolisch stabil und weist keine Interaktion mit den Zellen auf. Im durchgeführten Test, war eine Molarität von 0,3 ausreichend, um den pH-Wert nach 30 h Kultivierung auf ≥ 6,0 zu halten.

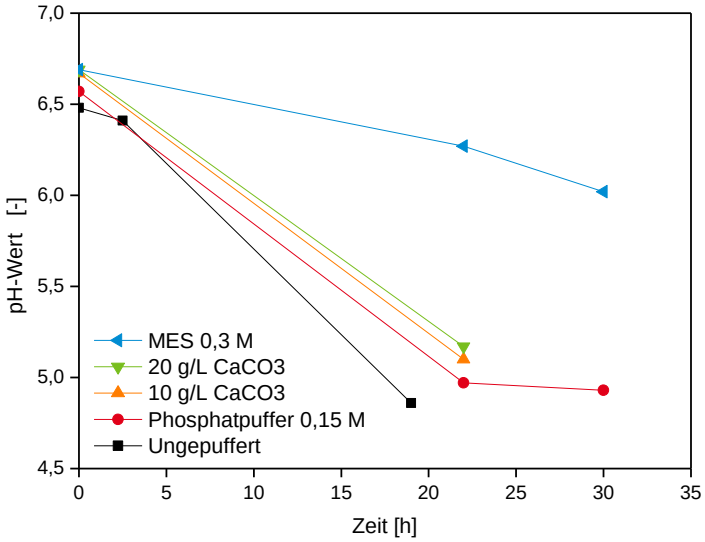


Abbildung 9: Kultivierung von *B. licheniformis* DSM 8785 mit verschiedenen Puffern. Kultivierung mit 50 g/L Xylose im 300 mL Schüttelkolben bei 125 rpm bei 50 °C. Kultivierung mit MES-Puffer in der MTP bei 50 °C und 700 rpm.

Für alle folgenden Versuche im Screening die mit dem Substrat Xylose durchgeführt wurden, wurde 0,3 M MES Puffer eingesetzt.

1.2.3 a) Umsetzung von Glucose zu 2,3-BDO

Literaturrecherchen zeigen, dass derzeit in der Risikoklasse 1, der Stamm *B. licheniformis* DSM 8785 die höchsten 2,3-BDO-Konzentrationen mit reiner Glucose erreicht. Die Stämme aus dem Pre-Screening und *B. licheniformis* DSM 8785 wurden mit 100 g/L reiner Glucose in MTP mit einem Füllvolumen von 200 µL, einer Schüttelfrequenz von 700 rpm, bei 39 °C für 30 h kultiviert. Um Verdunstungseffekte zu vermeiden, wurden jeweils die beiden äußeren Reihen der MTP mit sterilem Wasser befüllt und nur die innenliegenden Wells für die Kultivierung genutzt. Dieser Versuch erfolgte, um die Produktionsleistung der gescreenten Stämme mit dem Referenzstamm vergleichen zu können. Für das Screening wurde 2,3-BDO und Acetoin als Produkt zusammengefasst. Acetoin ist das Intermediat zur Bildung von 2,3-BDO. Acetoin entsteht somit durch denselben Stoffwechselweg wie 2,3-BDO. Studien zeigen, dass durch ideale Kultivierungsbedingungen das Verhältnis von Acetoin zu 2,3-BDO hin zu 2,3-BDO verschoben werden kann [26].

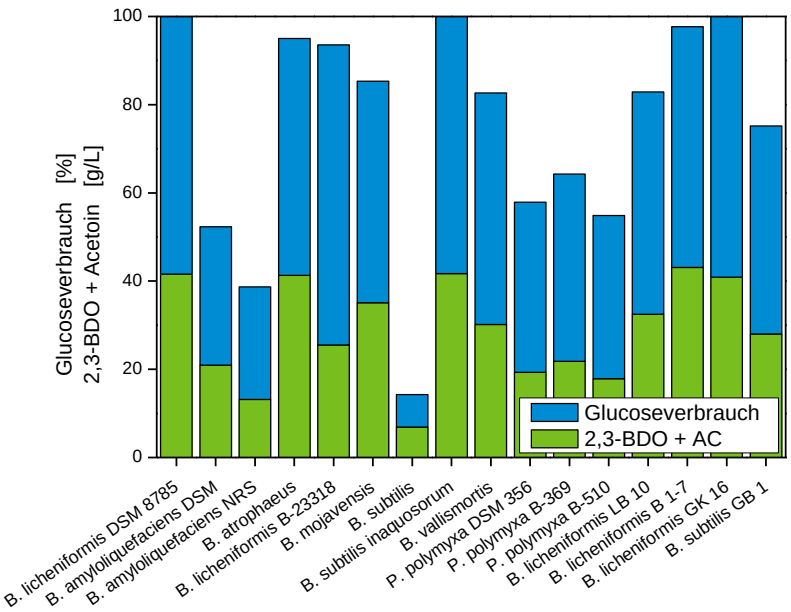


Abbildung 10: Glucoseverbrauch und 2,3-BDO + Acetoinproduktion von 16 Stämmen in mBasal-Medium mit 100 g/L Glucose. Kultivierung in MTP bei 39 °C, 700 rpm für 30 h.

Da für die meisten Stämme keine Daten für die optimalen Kultivierungsparameter vorlagen, wurden alle Stämme bei den gleichen Bedingungen kultiviert. Dies kann bedeuten, dass für einige Stämme ungünstige Parameter vorlagen und nach einer Optimierung die Produktivität und Ausbeute verbessert werden könnte. Abbildung 10 zeigt, dass die Kultivierungsparameter für den Großteil der Stämme geeignet waren. *B. subtilis* und *B. amyloliquefaciens* NRS-762 haben die Glucose am schlechtesten verwertet. Für *B. subtilis* wurden bereits im Pre-Screening weitere Untersuchungen zur Steigerung der 2,3-BDO-Produktion durchgeführt. Es konnten jedoch keine geeigneten Parameter für diesen Stamm ermittelt werden. Daher ist es wahrscheinlich, das weniger die Kultivierungsparameter, als die Medienkomposition für diesen Stamm nicht geeignet ist. Auch für *B. amyloliquefaciens* wurden die Kultivierungsparameter variiert, ohne eine besondere Leistungssteigerung zu erzielen (Daten nicht gezeigt). Die beiden Stämme scheinen daher ungeeignet für das Projektvorhaben.

Der höchste Glucoseverbrauch, als auch die höchste Ausbeute wurde von dem Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 erzielt. Dies war auch der einzige Stamm der die Glucose bereits nach 22,5 h vollständig verwertet hatte. Die erzielte 2,3-BDO-Konzentration, Ausbeute und Produktivität sind vergleichbar mit Werten, die in der Literatur beschrieben werden. Für den Referenzstamm sind die gewählten Kultivierungsparameter daher geeignet.

B. atrophaeus, *B. mojavensis*, *B. subtilis inaquosorum* und *B. vallismortis* sowie die Eigenisolate, zeigten eine gute Gluoseumsetzung zu 2,3-BDO ohne weitere Optimierungsversuche. Die Ausbeuten liegen im Bereich vom Referenzstamm. Diese Stämme sind somit gute 2,3-BDO-Produzenten. *B. atrophaeus*, *B. mojavensis* und *B. vallismortis* sind keine Literaturbekannten effizienten 2,3-BDO-Produzenten. Interessanterweise produzierte der nächste phylogenetisch Verwandte Stamm, *B. subtilis*, die geringsten Mengen an 2,3-BDO.

Fast alle Stämme aus dem Pre-Screening erreichten mit reiner Glucose als Substrat gute Ausbeuten und Endkonzentrationen. Im folgenden Versuch wurde der Umsatz von reiner Xylose mit allen 16 Stämmen untersucht (Abbildung 11). Die Kulturen wurden mit denselben Parametern kultiviert, wie der vorherige Versuch mit reiner Glucose.

1.2.3 b) Umsetzung von Xylose zu 2,3-BDO

Mit Xylose fällt die 2,3-BDO Produktion insgesamt geringer aus. In keinem der Ansätze sank der pH-Wert unter 5,5, wodurch eine pH-Inhibierung, als Grund für den geringen Umsatz, ausgeschlossen werden kann. Der Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 setzte innerhalb von 30 h nur 35 % der zur Verfügung gestellten Xylose um. Die Ausbeute zu 2,3-BDO lag bei 0,15 g/g Xylose und ist damit eher gering, bei einer theoretischen maximalen Ausbeute von 0,5 g/g Xylose.

Die Eigenisolate *B. licheniformis* LB 10 und B 1-7 und *B. subtilis* GB1 konnten etwa 50 % der Xylose verwerten und erreichten höhere 2,3-BDO Konzentrationen als der Vergleichsstamm. Der Stamm *B. licheniformis* B 1-7 erreichte 12,1 g/L 2,3-BDO + Acetoin, *B. licheniformis* LB 10,4 g/L 2,3-BDO + Acetoin und *B. subtilis* GB 1 13,2 2,3-BDO + Acetoin. Nur das Eigenisolat *B. licheniformis* GK 16 konnte die Xylose

nicht gut zu 2,3-BDO umsetzen. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Screening aus Bodenproben ein vielversprechender Ansatz ist.

Die Stämme *B. amyloliquefaciens* NRS-762, *B. subtilis* GB1 und *B. subtilis inaquosorum* verbrauchten je ca. 50 % der Xylose innerhalb von 30 h, die Umsetzung zu 2,3-BDO war in allen drei Fällen moderat. Die *P. polymyxa*-Stämme, *B. licheniformis* B-23318, B. subtilis uns *B. amyloliquefaciens* DSM 7 setzten die Xylose kaum bis gar nicht um. Die höchste Produktion erzielte der Stamm *B. vallismortis* mit 25,8 g/L 2,3-BDO + Acetoin. Die erreichte Produktkonzentration war 8,2 g/L höher als vom nächstbesten Stamm *B. atrophaeus*, der 17,6 g/L 2,3-BDO und Acetoin produzierte.

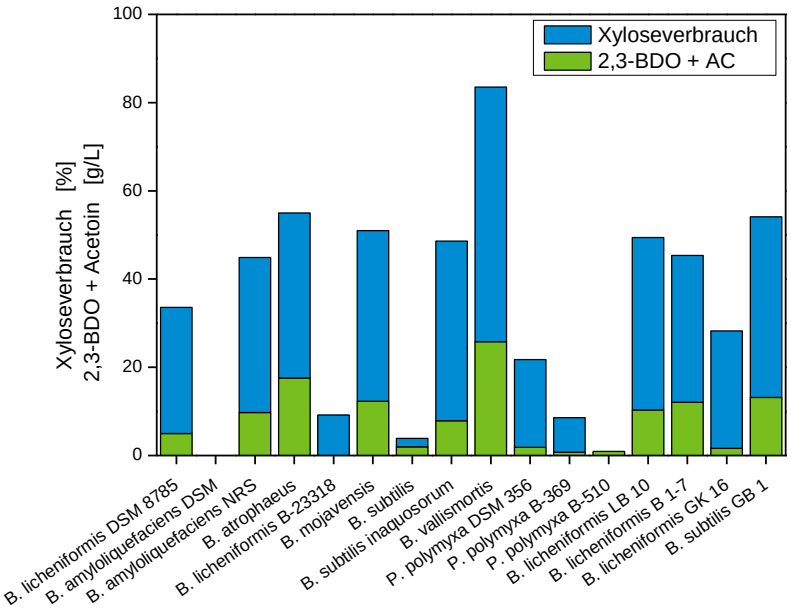


Abbildung 11: Xyloseverbrauch und 2,3-BDO + Acetoinproduktion von 16 Stämmen in mBasal-Medium mit 100 g/L Xylose. Kultivierung in MTP bei 39 °C, 700 rpm für 30 h.

1.2.3 c) Umsetzung von Xylose zu 2,3-BDO unter Einfluss von Holzhemmstoffen

Im Projektverlauf sollte Xylose aus einem Holz-Hemicellulose-Hydrolysat verwendet werden. Bei der Gewinnung der Hemicellulose-Fraktion entstehen jedoch auch Nebenprodukte, die im Hydrolysat verbleiben. Die Nebenprodukte können grob drei Gruppen zugeordnet werden, den organischen Säuren, den Furan Derivaten und den phenolischen Komponenten. Diese Nebenprodukte können sich zum Teil negativ auf die biotechnologische Produktion von 2,3-BDO auswirken, die lag Phase verlängern und/oder die Ausbeute und Produktivität verringern. Um die Sensitivität der einzelnen Stämme gegenüber typischer Holzhydrolysat-Nebenprodukte zu bestimmen, wurde ein weiteres Vergleichsexperiment durchgeführt. Der Versuch lief identisch zu dem vorherigen Versuch (Wachstum auf Xylose), nur das dem mBasal-Medium zusätzlich Holzhydrolysat-Nebenprodukte in typischen Mengen zugefügt wurde (Tabelle 10). Mit diesem synthetischen Modell-Hydrolysat kann ein direkter Vergleich zu den Kultivierungen ohne Hydrolysat-Nebenprodukte erfolgen.

Tabelle 10: Holzhydrolysat-Nebenprodukte in typischen Konzentrationen [27].

Substanz	Konzentration [g/L]
Furfural	0,12
5-Hydroxymethylfurfural	0,16
4-Hydroxybenzoesäure	0,3
Vanillin	0,014
Syringaldehyd	0,02
Essigsäure	1,2
Ameisensäure	3,6

Die Holzhydrolysat-Nebenprodukte wirken sich stammspezifisch aus, sodass keine allgemein gültige Aussage getroffen werden kann (Abbildung 12). Die Ausbeute ist ein wichtiges Kriterium für einen effizienten Prozess und wird daher genauer betrachtet. Bei *B. amyloliquefaciens* NRS-762*, B. subtilis* und den *P. polymyxa*-Stämmen wirkt sich das Modell-Hydrolysat negativ auf die Ausbeuten aus. *B. amyloliquefaciens* DSM 7 produzierte mit Xylose kein Produkt, konnte durch die Zugabe der Hemmstoffe die Xylose jedoch besser verwerten. Bei den Stämmen *B. atrophaeus*, *B. licheniformis* LB 10, B 1-7, GK 16, *B. mojavensis* und *B. subtilis inaquosorum* hat das synthetische Hydrolysat keine Auswirkung auf die Ausbeuten. Bei den Stämmen *B. licheniformis* DSM 8785, B 23318, *B. subtilis* GB 1 und *B. vallismortis* steigt die Ausbeute durch Zugabe der Holzhydrolysat-Nebenprodukte.

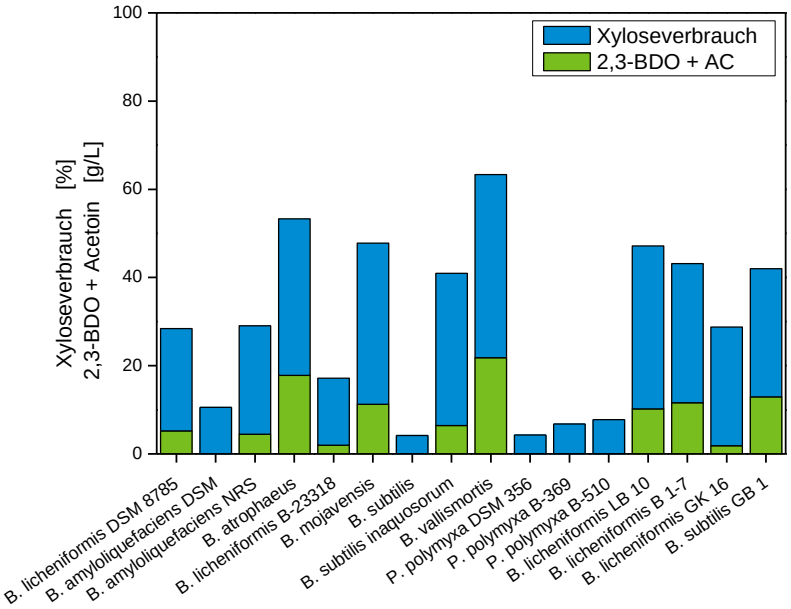


Abbildung 12: Xyloseverbrauch und 2,3-BDO + Acetoinproduktion von 16 Stämmen in mBasal-Medium mit 100 g/L Xylose und Hemmstoffzusatz. Kultivierung in MTP bei 39 °C, 700 rpm für 30 h.

Die Stämme *B. atrophaeus* und *B. vallismortis* erreichen die höchsten Ausbeuten und scheinen für das Projektvorhaben das größte Potential zu haben. *B. atrophaeus* zeigt in Anwesenheit von Holzhydrolysat-Nebenprodukten keine Inhibierung oder Effekte bezüglich der Ausbeute oder Produktbildung. Im Glucose-Experiment erreichte *B. atrophaeus* mit die höchsten Ausbeuten, die vergleichbar mit dem Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 waren. Die Produktivität war geringer, sodass innerhalb der 30 h Kultivierung die Glucose nicht vollständig verbraucht wurde.

B. vallismortis verbraucht in Anwesenheit von Holzhydrolysat-Nebenprodukten weniger Xylose innerhalb von 30 h, jedoch verringert sich die Produktbildung kaum. Dadurch steigt in Anwesenheit der Nebenprodukte die Ausbeute. Mit Glucose erreichte dieser Stamm im Vergleichsexperiment moderate Ausbeuten und lag im Mittelfeld, der getesteten Stämme.

Mit beiden Stämmen konnten in den Vorversuchen die besten Ergebnisse in Hinblick auf das Projektvorhaben erzielt werden. Die Stämme wurden daher eingehender untersucht.

1.3 Charakterisierung von *B. atrophaeus* und *B. vallismortis*

1.3.1 Bestimmung der maximalen Glucosekonzentration

Für einen effizienten Prozess ist die Start-Konzentration der Kohlenstoffquelle wichtig. Mit seigender Konzentration der Kohlenstoffquelle kann die theoretisch maximal erreichbare 2,3-BDO-Endkonzentration proportional erhöht werden. Für Pentosen und Hexosen liegt die theoretische Ausbeute bei 0,5 g/g. Die theoretische maximale Endkonzentration kann allerdings nur erreicht werden, wenn keine Medienkomponenten limitierend sind oder die Mikroorganismen aufgrund der initialen Substratkonzentration selbst oder durch angereicherte Metaboliten inhibiert werden. In diesem Versuch wurde die initiale Glucosekonzentration für die Stämme *B. atrophaeus* und *B. vallismortis* untersucht. Die Versuche wurden im MTP -Maßstab bei 39 °C und einer Schüttelfrequenz von 700 rpm durchgeführt. Für die Versuche wurde mit dem Substrat Glucose gearbeitet, da hier geringere Versäuerungseffekte auftreten. Die Ergebnisse sollten sich auf Xylose übertragen lassen, da Inhibierungseffekte durch steigende Substratkonzentrationen meist durch eine sinkende Wasseraktivität bzw. einem steigenden osmotischen Druck verursacht werden.

Abbildung 13 zeigt die Produktbildung bei steigender initialer Glucosekonzentration mit dem Stamm *B. atrophaeus*. Bei einer initialen Glucosekonzentration von 120 g/L wird eine maximale Produktkonzentration von etwa 50 g/L 2,3-BDO und Acetoin erreicht. Ab 140 g/L Glucose ist der Stamm nicht mehr in der Lage, die Glucose vollständig zu verstoffwechseln. Dies könnte an einer Limitierung von Medienbestandteilen oder der Anreicherung von Metaboliten liegen. Der Acetoinanteil ist bei allen Glucose-Startkonzentrationen relativ hoch. Durch eine Variation der Schüttelfrequenz könnte der Anteil eventuell noch verringert werden. Die höchste 2,3-BDO Konzentration von 29,9 g/L wurde mit einer initialen Glucosekonzentration von 100 g/L erreicht. Die maximale Produktivität wurde ebenfalls bei einer initialen Glucosekonzentration von 100 g/L erreicht und liegt bei 1 g/(L·h).

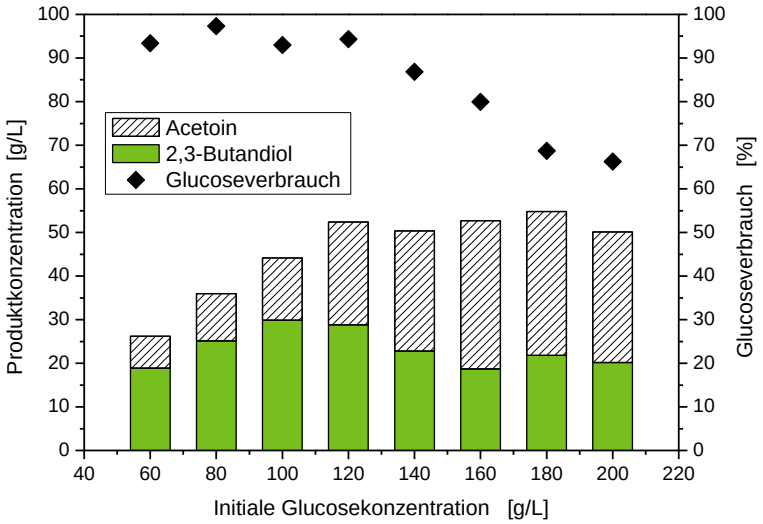


Abbildung 13: 2,3-BDO und Acetoin Konzentration in Abhängigkeit der initialen Glucosekonzentration für den Stamm *B. atrophaeus*. Kultivierung in einer 96-Well-MTP bei 39 °C und 700 rpm.

In Abbildung 14 ist die 2,3-BDO- und Acetoin-Produktion in Abhängigkeit der initialen Glucosekonzentration mit dem Stamm *B. vallismortis* dargestellt. Mit zunehmender initialer Glucosekonzentration steigt die 2,3-BDO-Endkonzentration. Der Zucker kann bis zu der getesteten Konzentration von 200 g/L vollständig verstoffwechselt werden. Die maximale Endkonzentration liegt bei 60,4 g/L 2,3-BDO mit einer initialen Glucosekonzentration von 200 g/L. Bei dieser hohen initialen Glucosekonzentration liegt die Produktivität bei 1,1 g/(L·h) und ist damit immer noch relativ hoch. Die höchste Produktivität lag bei 1,6 g/(L·h) bei einer initialen Glucosekonzentration von 100 g/L. Der Stamm *B. vallismortis* ist in der Lage, hohe initiale Glucose-Konzentrationen schnell zu 2,3-BDO umzusetzen.

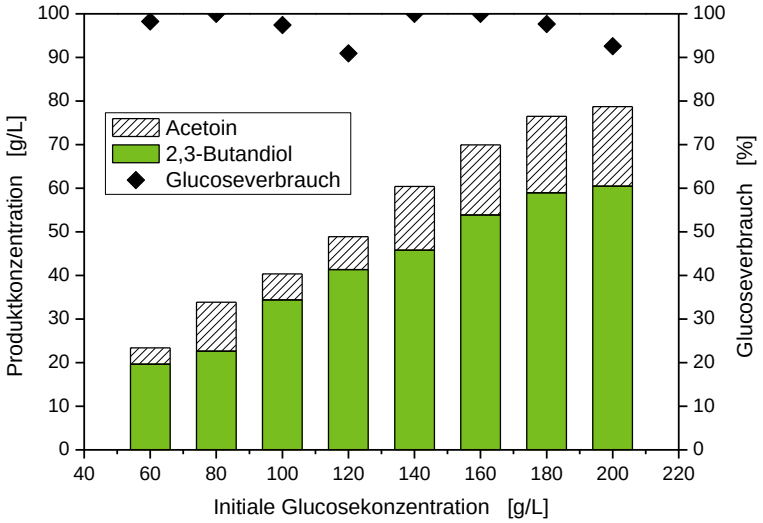


Abbildung 14: 2,3-BDO und Acetoin Konzentration in Abhängigkeit der initialen Glucosekonzentration für den Stamm *B. vallismortis*. Kultivierung in einer 96-Well-MTP bei 39 °C und 700 rpm.

1.3.2 Hefeextrakt

Hefeextrakt ist ein Komplex-Medienbestandteil und versursacht einen Großteil der Kosten für die Medienherstellung. Die Mikroorganismen werden unter anderem durch den Hefeextrakt mit Stickstoff, Aminosäuren, Peptiden und Vitaminen versorgt. Für eine Kostensenkung von Kultivierungsmedien wird häufig versucht, die Hefeextrakt-Konzentration zu senken. Daher ist es vorteilhaft, wenn der verwendete Mikroorganismus wenig Hefeextrakt benötigt.

Der Hefeextraktbedarf wurde für die Stämme *B. atrophaeus*, *B. vallismortis* und *B. licheniformis* DSM 8785 getestet. Die Durchführung erfolgte in 96-Well- MTP bei 39 °C und 700 rpm. Es wurde das mBasal-Medium mit einer Glucosestartkonzentration von 100 g/L eingesetzt.

Für alle Stämme ist ein signifikanter Einfluss der Hefeextraktkonzentration auf die 2,3-BDO- und Acetoinkonzentration zu erkennen (Abbildung 15). Mit abnehmender Hefeextraktkonzentration sinkt die 2,3-BDO- und Acetoinkonzentration.

Mit dem Stamm *B. vallismortis* wurden die höchsten 2,3-BDO + Acetoin Konzentrationen mit einer Hefeextraktkonzentration von 8 g/L erreicht. Für die Produktion von 2,3-BDO + Acetoin benötigt *B. vallismortis* jedoch kein Hefeextrakt, da auch bei 0 g/L Hefeextrakt noch 2,3-BDO + Acetoin gebildet wird. Einige Mikroorganismen sind noch in der Lage ohne Hefeextrakt zu wachsen, jedoch bilden die meisten kein Produkt mehr. Die Abnahme der Produktbildung ist mit der Abnahme des pH-Wertes mit sinkendem Hefeextraktanteil zu begründen. Ab einer Hefeextraktkonzentration von 4 g/L sinkt der pH-Wert im Laufe der Kultivierung auf pH 4,5 (Tabelle 11). Bei diesem niedrigen pH-Wert kann eine Inhibierung nicht ausgeschlossen werden.

B. licheniformis erreicht ebenfalls die höchste 2,3-BDO und Acetoinkonzentration mit 8 g/L Hefeextrakt. Dieser Stamm hat ebenfalls ein Produktmaximum bei 8 g/L. Die Produktbildung nimmt jedoch deutlich, mit abnehmender Hefeextrakt-Konzentration, ab. Mit 0 g/L Hefeextrakt ist *B. licheniformis* DSM 8785 nicht mehr in der Lage 2,3-BDO zu produzieren oder zu wachsen. Die Ursache ist in diesem Fall nicht der pH-Wert, da dieser in keiner der Kultivierungen unterhalb von 5,8 sank und somit noch nicht inhibierend war (Tabelle 11). Für den Referenzstamm ist bekannt, dass ein Wachstum und Produktion bis etwa pH 5 möglich ist.

B. atrophaeus produzierte die höchste Menge an 2,3-BDO und Acetoin mit einer Hefeextraktkonzentration von 10 g/L. Mit sinkendem Hefeextraktanteil nimmt auch bei diesem Stamm die 2,3-BDO-Produktion und das Wachstum sukzessive ab. Ohne Hefeextrakt ist weder ein Wachstum noch eine Produktion von 2,3-BDO möglich.

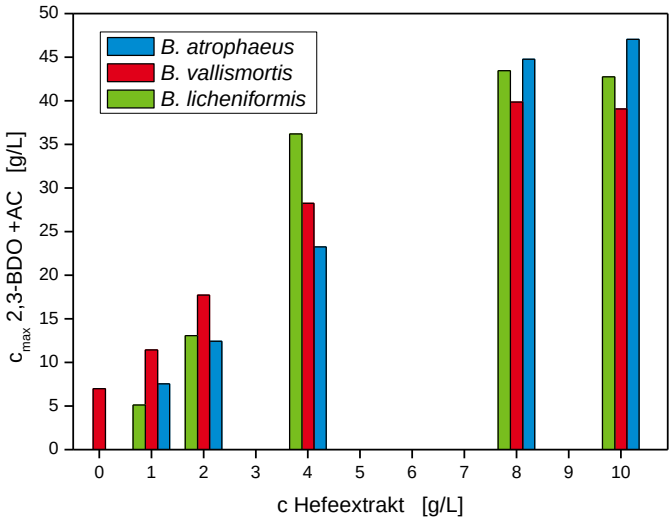


Abbildung 15: Maximale Produktbildung von *B. licheniformis* DSM 8785, *B. atrophaeus* und *B. vallismortis* mit unterschiedlichen Hefeextraktkonzentrationen. Kultivierung in einer 96-Well-MTP bei 37 °C und 700 rpm. Probenahme nach 30 h.

Tabelle 11: pH-Werte und optische Dichten für die Hefeextraktvariation mit *B. licheniformis* DSM 8785, *B. atrophaeus* und *B. vallismortis* nach 30 h Kultivierung.

Hefeextraktkonzentration	*B. licheniformis*		*B. atrophaeus*		*B. vallismortis*	
	pH-Wert	OD	pH-Wert	OD	pH-Wert	OD
[g/L]	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]
10	6,6	2,4	6,5	2,4	5,6	2,0
8	6,0	2,4	6,4	2,4	5,6	2,0
4	6,2	2,0	6,1	1,8	4,5	2,0
2	6,0	1,5	6,0	1,6	4,4	1,9
1	5,8	1,1	6,1	1,3	4,2	1,6
0	6,3	0,3	6,6	0,2	4,2	1,3

1.3.3 Kultivierung mit Modellsubstraten

Für das Projektvorhaben, soll Hemicellulose biotechnisch zu 2,3-BDO umgesetzt werden. Hierfür muss die Hemicellulose in ihre Monomere zersetzt werden. Einige Mikroorganismen verfügen dabei über eine eigene Xylanase und können die Hemicellulose direkt verwenden. Für andere Mikroorganismen muss dem Medium eine Xylanase zugesetzt werden, um die Xylose dem Organismus zugänglich zu machen. In einer ersten Versuchsreihe wurde dem Medium die Modellsubstrate Maisxylan bzw. Haferspelzenxylan als Substrat zugesetzt. Die Xylane unterscheiden sich im Wesentlichen durch ihre Molmassen. Die genauen Größen der Moleküle sind nicht bekannt. Mittels HPLC ließen sich zwei Fraktionen ausmachen. Die kleinere Fraktion wurde indirekt über eine längere Retentionszeit identifiziert. Diese Fraktion wurde von den Organismen bevorzugt verwertet. Im Maisxylan sind die Xylane kurzkettiger. Mittels HPLC konnte nur die kleinere Fraktion 2 detektiert werden. Im Haferspelzenxylan lagen beide Fraktionen vor. Es wurden ungefähr 50 g/L der Modellsubstrate eingesetzt. Die Versuche wurden in MTP bei 39 °C, 700 rpm und einem Füllvolumen von 200 µL durchgeführt.

In Abbildung 16 sind die maximalen Produktkonzentrationen dargestellt die innerhalb von 48 h von den Stämmen *B. licheniformis* (Referenzstamm), *B. atrophaeus* und *B. vallismortis* produziert worden sind. Der Referenzstamm war nicht in der Lage die Substrate zu verwerten. Dies spricht dafür, dass dieser Stamm kein eigenes Enzymsystem zur Verzuckerung von Hemicellulose/Xylan besitzt. Die Stämme *B. atrophaeus* und *B. vallismortis* waren beide in der Lage das kurzkettige Maisxylan zu verwerten, nicht aber das komplexere Haferspelzenxylan. Die maximale Produktkonzentration von *B. atrophaeus* wurde nach 48 h erreicht. Das Maisxylan wurde innerhalb dieser Zeit vollständig verwertet. *B. vallismortis* erreichte die maximale Produktkonzentration bereits nach 24 h. Zu dieser Zeit war das Substrat zu 97 % verbraucht. Mit zunehmender Kultivierungsdauer wurde das 2,3-BDO dann vom Mikroorganismus wieder abgebaut.

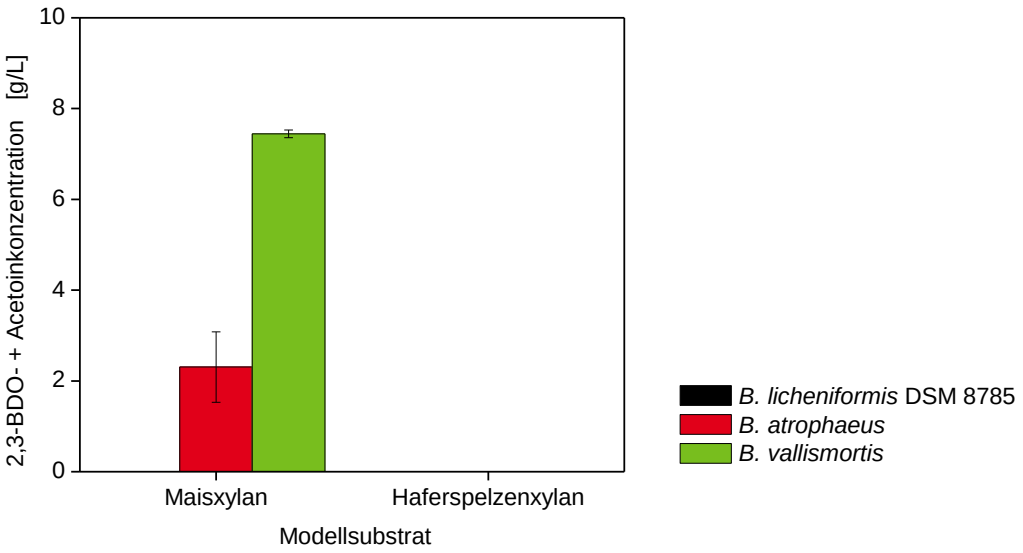


Abbildung 16: Maximale Produktbildung von *B. licheniformis*, *B. atrophaeus* und *B. vallismortis* mit Maisxylan und Haferspelzenxylan als Substrat im mBasal-Medium. Kultivierung in einer 96-Well-MTP bei 37 °C und 700 rpm. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Messungen.

Die Kultivierung der Stämme ohne Zugabe von Enzymen, führte zu geringen Produktbildungen. *B. licheniformis* war dabei gar nicht in der Lage, das Substrat zu verwerten. Das komplexere Haferspelzenxylan, konnte von keinem der getesteten Stämme genutzt werden.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde den Medien mit den Modellsubstraten daher zusätzlich Biogazym 2x (ASA Spezialenzyme GmbH, Deutschland) zugesetzt. Im Vorfeld der nächsten Versuchsreihe wurde das pH- und Temperaturoptima der Xylanase bestimmt.

In Abbildung 17 ist die Enzymaktivität in Abhängigkeit des Medien-pH-Wertes dargestellt. Ein geeigneter Arbeitsbereich liegt zwischen pH 4,5 bis 6,0.

Für die Temperatur zeichnet sich ein klares Optimum bei einer Temperatur von 60 °C aus (Abbildung 18). Ein geeigneter Arbeitsbereich liegt zwischen 50 – 75 °C. Die Enzymaktivität wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten bestimmt. Für Kultivierungen bei hohen Temperaturen müsste daher die Langzeitstabilität nachgewiesen werden.

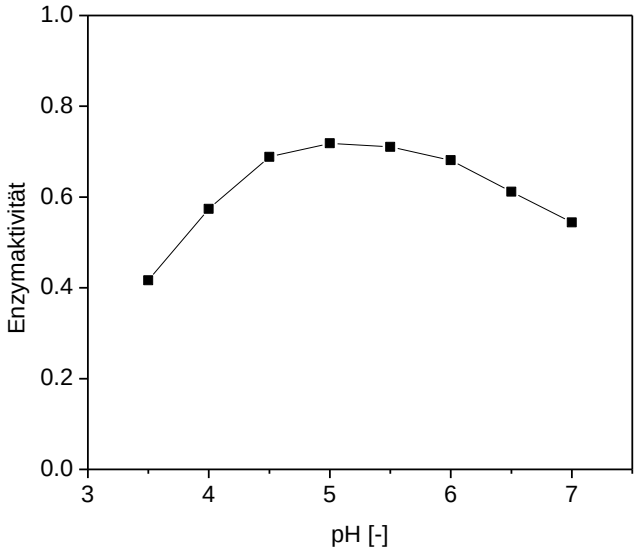


Abbildung 17: Xylanaseaktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes.

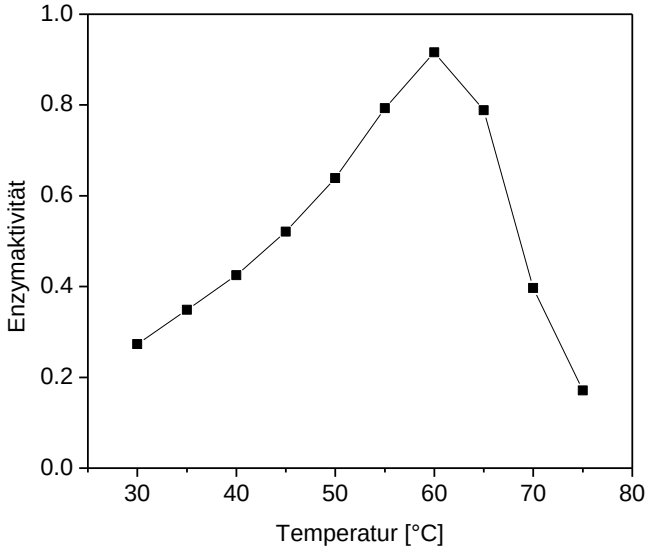


Abbildung 18: Xylanaseaktivität in Abhängigkeit der Temperatur.

Die Kultivierung mit den Modellsubstraten und Enzymzusatz (SSF = Simultaneous Saccharification and Fermentration) erfolgte wie zuvor in MTP. Die Stämme *B. atrophaeus* und *B. vallismortis* wurden bei 39 °C und *B. licheniformis* bei 41 °C kultiviert. Der Start-pH-Wert betrug 6,7 und die Medien wurden mit 0,1 M MES gepuffert.

Die geeigneten Kultivierungsparameter für die Stämme weichen von dem optimalen Arbeitsbereich für die Xylanase ab. Es wurde daher untersucht, wie viel Xylose innerhalb von 70 h durch die Xylanase bei den Kultivierungsparametern freigesetzt wird (Abbildung 19). Bei 39 °C werden bei allen Modellsubstraten 3,6 – 3,8 g/L Xylose freigesetzt. Bei 41 °C ist die Freisetzung etwas höher und betrug für Maisxylan und Buchenxylan 4,3 bzw. 4,0 g/L. Mit dem Modellsubstrat Haferspelzenxylan wurden innerhalb von 70 h nur 2,5 g/L Xylose freigesetzt. Die Kultivierungsparameter, insbesondere die Temperatur, sind für die Xylanase nicht geeignet.

In den durchgeführten SSF-Kultivierungen zeigte sich dennoch eine Steigerung der maximalen Produktbildung (Abbildung 20), gegenüber den Kultivierungen ohne Enzymzusatz. *B. vallismortis* bildete auf allen drei Modellsubstraten Produkt. Mit den höher molekularen Xylanen wurden < 2g/L produziert. Mit Maisxylan erreichte der Stamm eine maximale Produktkonzentration von 10,0 g/L. Auch *B. atrophaeus* produzierte in dieser Versuchsreihe mehr Produkt mit Maisxylan (ca. 4 g/L) und Haferspelzenxylan. *B. licheniformis* war weiterhin nicht in der Lage mit den Modellsubstraten Produkt zu bilden.

Zusammengefasst ist ein SSF-Prozess nicht geeignet, da die Kultivierungsparameter der Stämme, zu stark von den Arbeitsbereichen der Xylanase abweichen. Eine separate Verzuckerung mit anschließender Fermentation scheint daher zweckmäßiger zu sein.

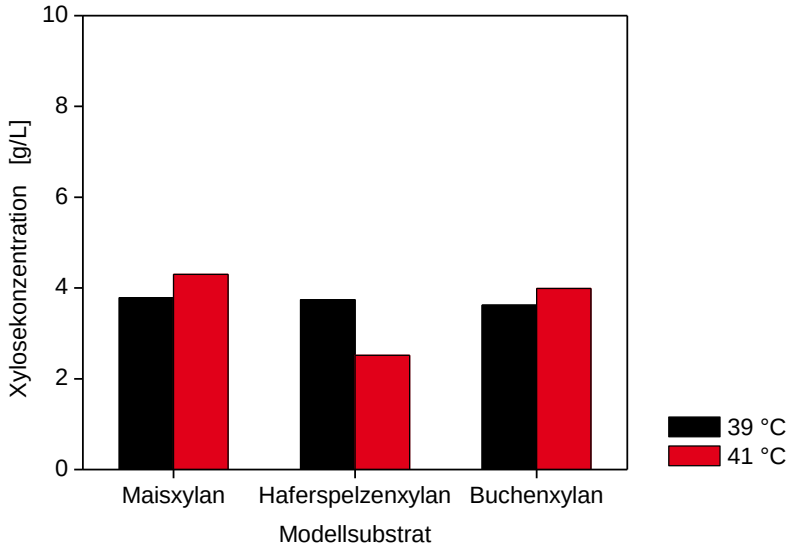


Abbildung 19: Xylosekonzentration nach 70 h Inkubation von 50 g/L Maisxylan, Haferspelzenxylan und Buchenxylan mit Biogazym 2x in 96-Well-MTP bei 39 °C bzw. 41 °C und 700 rpm.

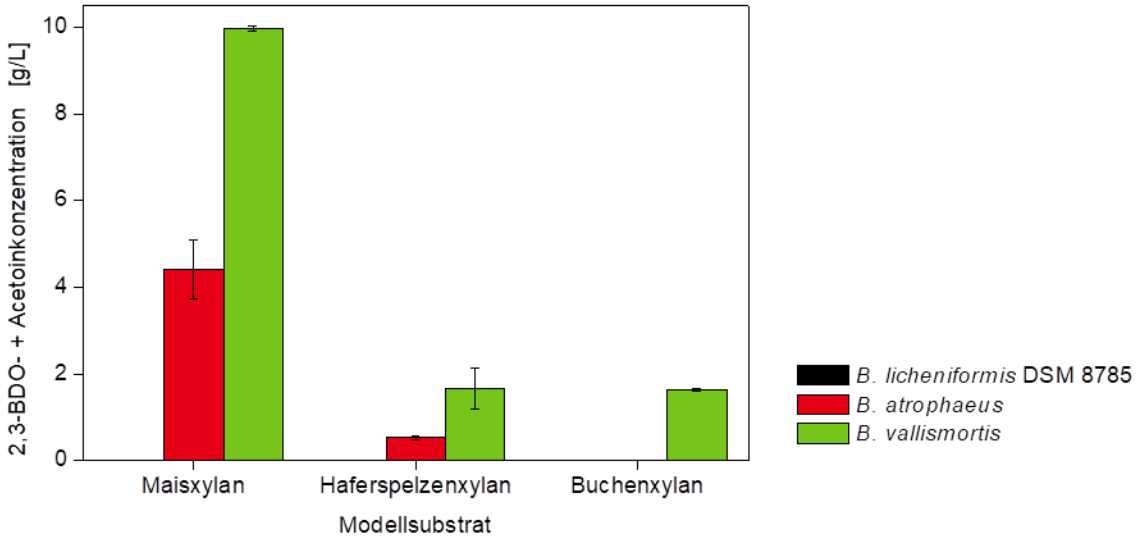


Abbildung 20: Maximale Produktbildung von *B. licheniformis*, *B. atrophaeus* und *B. vallismortis* im SSF mit Biogazym 2x und mit Maisxylan, Haferspelzenxylan und Buchenxylan als Substrat im mBasal-Medium. Kultivierung in einer 96-Well-MTP bei 39 °C (*B. atrophaeus* und *B. vallismortis*), 41 °C (*B. licheniformis*) und 700 rpm.

Zusammenfassung Stammwahl

Im ersten Arbeitspaket wurden 17 Stämme von den Stammsammlungen DSMZ und NRRL sowie 4 Stämme aus einem eigenen Screening, für die Produktion von 2,3-BDO mit Xylose als einzige Kohlenstoffquelle untersucht. Anschließend wurden die Stämme *B. atrophaeus* und *B. vallismortis* hingehend der maximalen initialen Glucosekonzentration und des Hefeextraktbedarfs untersucht. Der Stamm *B. vallismortis* erzielte in allen Versuchen jeweils die besten Ergebnisse. *B. vallismortis* hat daher großes Potential für die 2,3-BDO-Produktion mit Xylose aus Holz-Hemicellulosen als einzige Kohlenstoffquelle. Alle Versuche im Rahmen der Stammauswahl liefen unter einheitlichen Bedingungen für eine bessere Vergleichbarkeit der Stämme untereinander. Für optimale Endkonzentrationen, Ausbeuten und Produktivitäten müssen die Bedingungen für den Stamm *B. vallismortis* noch optimiert werden.

1.4 Optimierung der Kultivierungsparameter von *B. vallismortis*

1.4.1 Einfluss der Temperatur

Im Screening wurden alle Stämme bei 39°C kultiviert. Für die weiteren Versuchsreihen mit *B. vallismortis* sollte nun die optimale Wachstums und Produktionstemperatur bestimmt werden. Die Kultivierung erfolgte in MTP mit einem Füllvolumen von 200 µL, bei 700 rpm. Die Temperatur wurde von 36 – 42 °C variiert. Da *B. vallismortis* hohe initiale Glucosekonzentrationen verstoffwechseln kann, wurden 160 g/L Glucose eingesetzt.

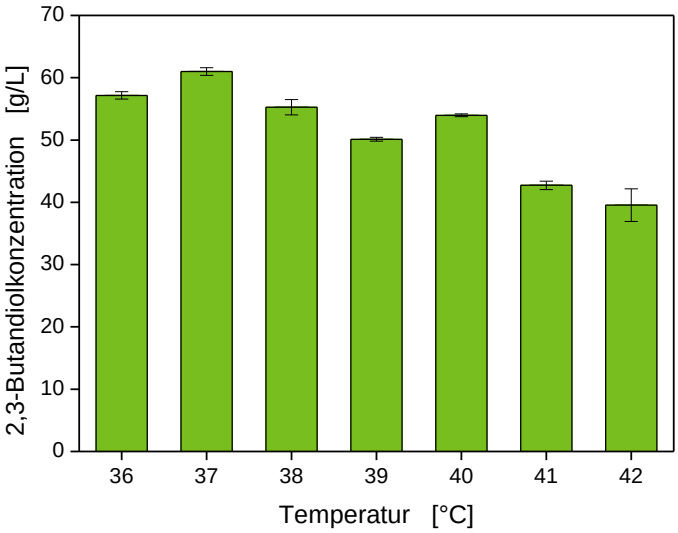


Abbildung 21: Temperaturvariation mit *B. vallismortis*. Kultivierung in MTP mit einem Füllvolumen von 200 µL, 160 g/L Glucose, bei 700 rpm.

B. vallismortis wächst und produziert 2,3-BDO im gesamten Temperaturbereich. Die höchste Produktmenge wird bei 37 °C gebildet. Mit sinkender bzw. steigender Temperatur nimmt die Produktkonzentration sukzessive ab. Alle folgenden Kultivierungen mit *B. vallismortis* wurden bei 37 °C durchgeführt.

1.4.2 Einfluss des pH-Wertes auf die 2,3-BDO Produktion von *B. vallismortis*

Zur Bestimmung des optimalen Fermentations-pH-Wertes wurde der pH-Wert mit dem Substrat Xylose von 4,6 – 6,2 in aufsteigenden Einheiten von 0,2 variiert. Der Start-pH-Wert betrug in allen Kultivierungen 6,6 ± 0,1. Es wurde eine freie Säuerung bis zu dem gewünschten pH-Wert zugelassen. Die pH-Korrektur erfolgte nur mit Natronlauge, wodurch ein witeres Absinken des pH-Wertes verhindert wurde. Die Kultivierungen wurden in 250 mL Bioreaktoren der Firma DASGIP durchgeführt. Das Füllvolumen lag bei 100 mL, begast wurde mit Luft, mit 25 sL/h, die Rührerdrehzahl lag bei 400 rpm und die Temperatur wurde auf 37 °C eingestellt.

In Abbildung 22 ist der Xyloseabbau in Abhängigkeit des End-pH-Werts dargestellt. Mit steigendem pH-End-Wert wird die Xylose vollständiger verwertet. Ab einem pH-End-Wert von 5,8 werden die eingesetzten 100 g/L Xylose vollständig umgesetzt. Somit steigt auch die 2,3-BDO und Acetoin-Bildung mit zunehmendem pH-End-Wert. Das Maximum der 2,3-BDO- und Acetoin-Bildung liegt bei einem pH-End-Wert von 5,8.

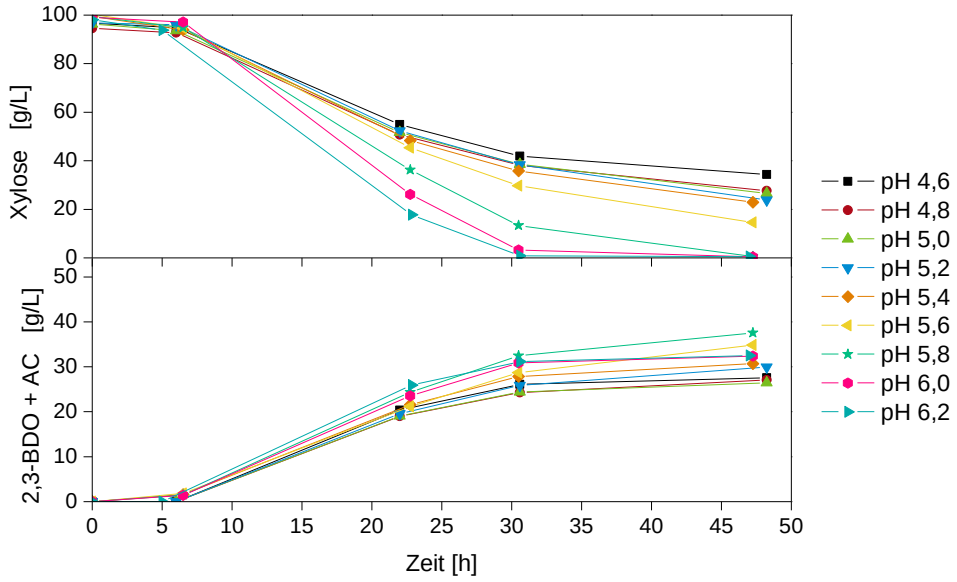


Abbildung 22: Xyloseabbau, 2,3-Butandiol- und Acetoin-Bildung in Abhängigkeit des pH-End-Wertes mit *B. vallismortis*. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 400 rpm und einem Start-pH-Wert von 6,7.

In Abbildung 23 ist zusätzlich das Nebenproduktspektrum der 2,3-BDO-Produktion von *B. vallismortis* mit Xylose in Abhängigkeit des End-pH-Wertes dargestellt. Im pH-Bereich von 4,6 bis 5,6 ist Acetat das einzige Produkt, das neben 2,3-BDO und Acetoin gebildet wird. Anschließend steigt mit zunehmendem pH-End-Wert die Acetatkonzentration auf maximal 7,3 g/L bei einem pH-End-Wert von 5,8. Bei einem pH-End-Wert von 6,2 sinkt die Acetatkonzentration schließlich wieder auf 4,6 g/L.

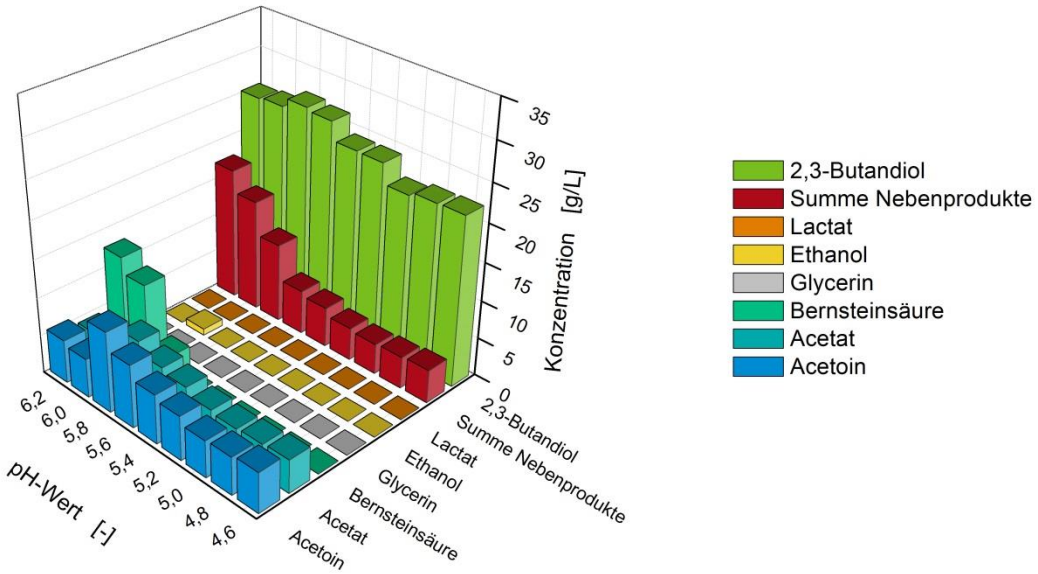


Abbildung 23: Nebenproduktspektrum von *B. vallismortis* in Abhängigkeit des pH-End-Wertes bei der Kultivierung mit Xylose. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 400 rpm und einem Start-pH-Wert von 6,7. Die Probenahme erfolgte jeweils nach Eintritt der Xyloselimitierung bzw. nach 48 h. Die Summe der Nebenprodukte fasst die Bildung von Acetat, Bernsteinsäure, Glycerin, Ethanol und Lactat zusammen.

Die Bildung von Bernsteinsäure setzt ab einem pH-End-Wert von 5,8 ein und steigt mit steigendem pH-End-Wert. Bei einem pH-End-Wert von 6,2 ist Bernsteinsäure mit 12,9 g/L das Hauptnebenprodukt. Die Nebenprodukte Glycerin und Lactat konnten zu keiner Zeit nachgewiesen werden und Ethanol nur in geringen Mengen bei einem pH-End-Wert von 6,0. Die maximale 2,3-BDO Konzentration von 26,9 g/L wird bei einem pH-End-Wert von 5,8 erreicht. Die Bildung von Acetoin steigt mit zunehmenden pH-End-Wert von 5,3 g/L bei pH 4,6 auf 10,6 g/L bei pH 5,8 an und sinkt bei einem pH-Wert von 6,2 wieder auf 5,8 g/L. Bei

einem pH-End-Wert von 5,8 wird der meiste Kohlenstoff in den 2,3-BDO-Stoffwechselweg geschleust und scheint für die Kultivierung von *B. vallismotis*, mit Xylose als einzige Kohlenstoffquelle, am geeignetsten zu sein.

1.4.3 Einfluss der Rührerdrehzahl

Im Anschluss an die pH-Wert-Untersuchung wurde der Einfluss der Rührerdrehzahl untersucht. Die Kultivierungen erfolgten im 250 mL Bioreaktorsystem (Füllvolumen 100 mL, Begasung 25 sL/h mit Luft, Rührerdrehzahl 100 - 600 rpm, Temperatur 37 °C, pH-Start-Wert 6,6 ± 0,1 und End-Wert 5,8).

Bei allen Rührerdrehzahlen konnte die Xylose nahezu vollständig verwertet werden. Ab einer Kultivierungszeit von 24 h ist zu erkennen, dass die Rührerfrequenzen von 100, 200 und 600 rpm zu geringeren Produktkonzentrationen führen (Abbildung 24). Für 300 rpm zeichnet sich ein leichter Trend ab, dass hier die Xyloseverwertung am effizientesten ist. Auch nach 30 h ist die Xyloseverwertung und Produktbildung mit 300 rpm am besten. Nach 45 h wurden mit den Rührerfrequezen 300 – 400 rpm etwa dieselben Mengen an Produkt, 37 g/L, gebildet. Mit 100 – 200 rpm wurden etwa 35 g/L und mit 600 rpm 29 g/L Produkt gebildet. Insgesamt hatte die Rührerdrehzahlvariation keinen so großen Einfluss auf die 2,3-BDO und Acetoin-Bildung, wie die pH-Wert-Variation. Da bei 300 rpm die Produktivität nach 30 h mit 0,91 g/(L·h) höher war, als bei 400 rpm (0,78 g/(L·h)) und 500 rpm (0,72 g/(L·h)), wurden alle folgenden Versuche bei 300 rpm durchgeführt.

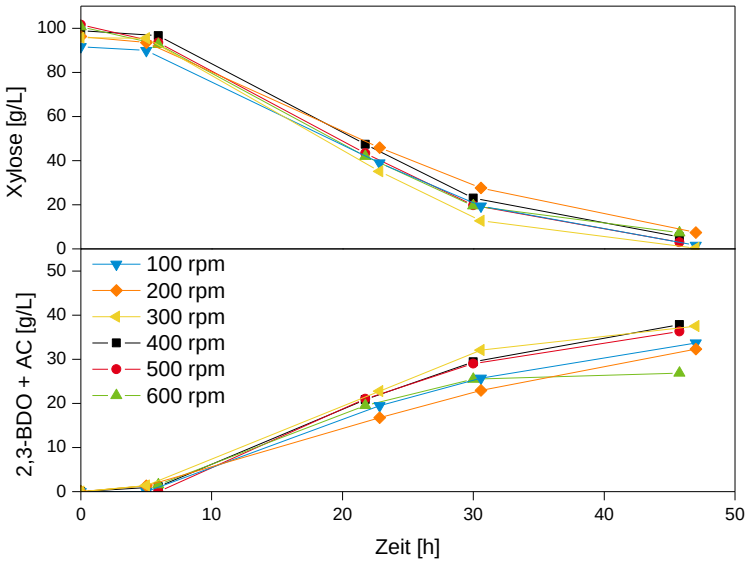


Abbildung 24: Xyloseabbau, 2,3-Butandiol- und Acetoin-Bildung in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl mit *B. vallismortis*. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 100, 200, 300, 400, 500 oder 600 rpm und einem Start-pH-Wert von 6,7 und End-Wert von pH 5,8.

1.4.4 Kultivierung mit Xylose als Substrat

a) Referenzkultivierung mit Xylose

Es wurde eine Referenzkultivierung mit den ermittelten Kultivierungsparametern und 100 g/L Xylose durchgeführt. Die Kultivierung fand bei 300 rpm, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft satt. Der Start-pH-Wert wurde auf 6,7 eingestellt. Anschließend fand eine freie Säuerung bis pH 5,8 statt. Bei Erreichen des pH-Wertes von 5,8 setzte eine pH-Regelung ein, die ein weiteres Absinken des pH-Wertes verhinderte. Als pH-Korrekturmittel wurde 4 M NaOH eingesetzt.

In der Referenzkultivierung (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) wurde die Xylose nnerhalb von etwa 34 h vollständig verbraucht. Die extrapolierte Produktkonzentration betrug 27,3 g/L 2,3-BDO und 5,4 g/L Acetoin. Dabei lag die 2,3-BDO-Ausbeute bei 0,32 g/g und die Gesamtausbeute bei 0,38 g/g.

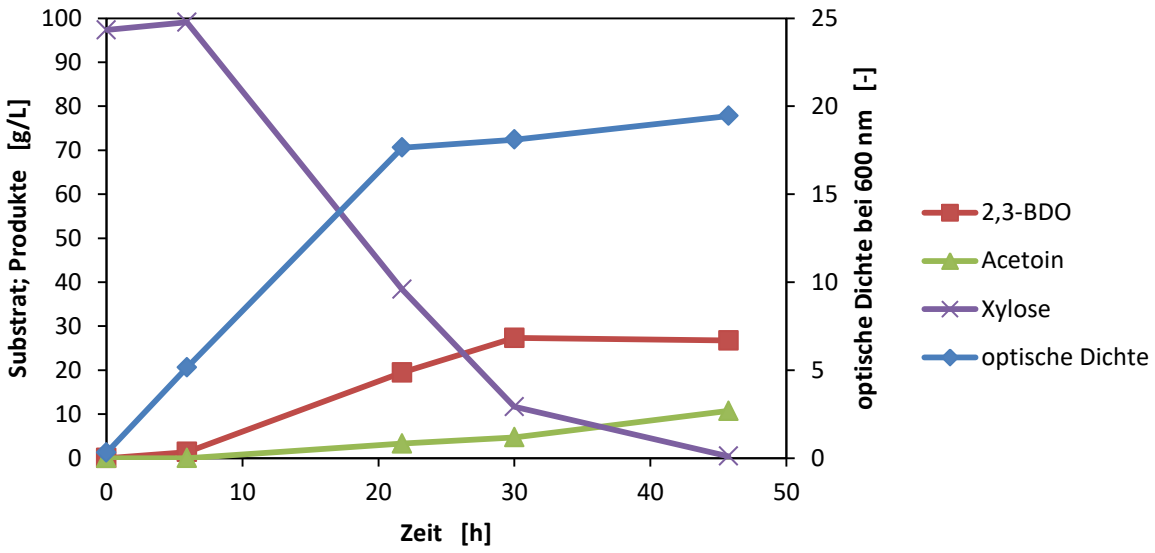


Abbildung 25: Referenzkultivierung mit 100 g/L Xylose mit *B. vallismortis*. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 300 rpm und einem Start-pH-Wert von 6,7 und End-Wert von pH 5,8.

b) Maximale initiale Xylosekonzentration

Es wurde bereits die maximale initiale Glucosekonzentration bestimmt. Diese lag bei 200 g/L. Die Versuchsreihe wurde in MTP durchgeführt. Da mit dem Substrat Xylose das Medium stärker angesäuert wird, wurden die Versuche zur maximalen initialen Xylosekonzentration im DASbox® Reaktorsystem mit pH-Wertregelung durchgeführt. Die Kultivierung fand bei 300 rpm, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft satt. Der Start-pH-Wert wurde auf 6,7 eingestellt. Anschließend fand eine freie Säuerung bis pH 5,8 statt. Bei Erreichen des pH-Wertes von 5,8 setzte eine pH-Regelung ein, die ein weiteres Absinken des pH-Wertes verhinderte. Als pH-Korrekturmittel wurde 4 M NaOH eingesetzt.

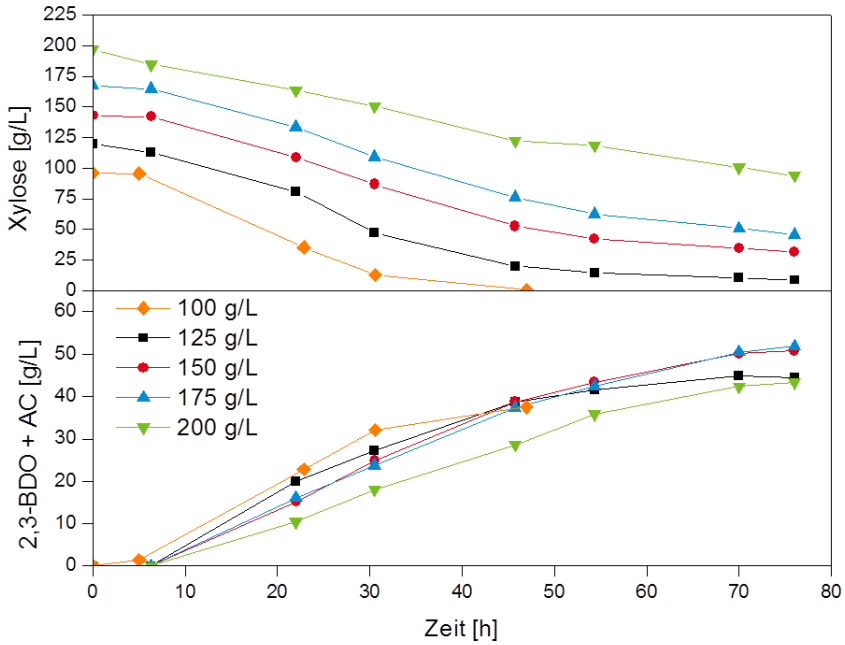


Abbildung 26: Substratverbrauch und Produktbildung von *B. vallismortis* mit variierender initialer Xylosekonzentration. Kultivierung im DASbox-Reaktorsystem bei 37 °C, einer Rührerfrequenz von 300 rpm, einer Begasung von 25 sL/H mit Luft und einer freien Säuerung von pH 6,7 auf pH 5,8 mit anschließender pH-Regelung auf pH 5,8 mit 4 M NaOH.

Mit zunehmender Xylose-Konzentration ist der Stamm nicht in der Lage die Xylose zu verwerten. Die maximale initiale Xylose-Konzentration liegt somit bei 100 g/L. In dieser Kultivierung wurden 26,9 g/L 2,3-BDO und 10,6 g/L Acetoin produziert. Mit höheren initialen Xylose-Konzentrationen werden zwar höhere Produktkonzentrationen erreicht (max. 42,1 g/L 2,3-BDO und 9,7 g/L Acetoin), jedoch sind diese Kultivierungen nicht effizient, da das Substrat nicht vollständig verwertet wird.

Die ermittelten Werte der maximalen initialen Glucose-Konzentration lassen sich somit nicht, wie zuvor angenommen, auf das Substrat Xylose übertragen.

c) Fed-Batch mit Xylose

Anhand der Versuchsreihe der maximalen initialen Xylose-Konzentration konnte bereits gezeigt werden, dass eine Xylose-Konzentration über 100 g/L nicht vollständig verwertet werden kann. Daher wurde ein Fed-Batch-Versuch durchgeführt. Die Xylose und je 1 g/L Hefeextrakt wurden als Feststoff zweimal nachgefüttert, wobei die Xylose-Konzentration unter 100 g/L Xylose gehalten wurde. Die Kultivierung wurde wieder in der DASbox® durchgeführt, mit denselben Parametern wie in der Xylosereferenz-Kultivierung (Abbildung 27).

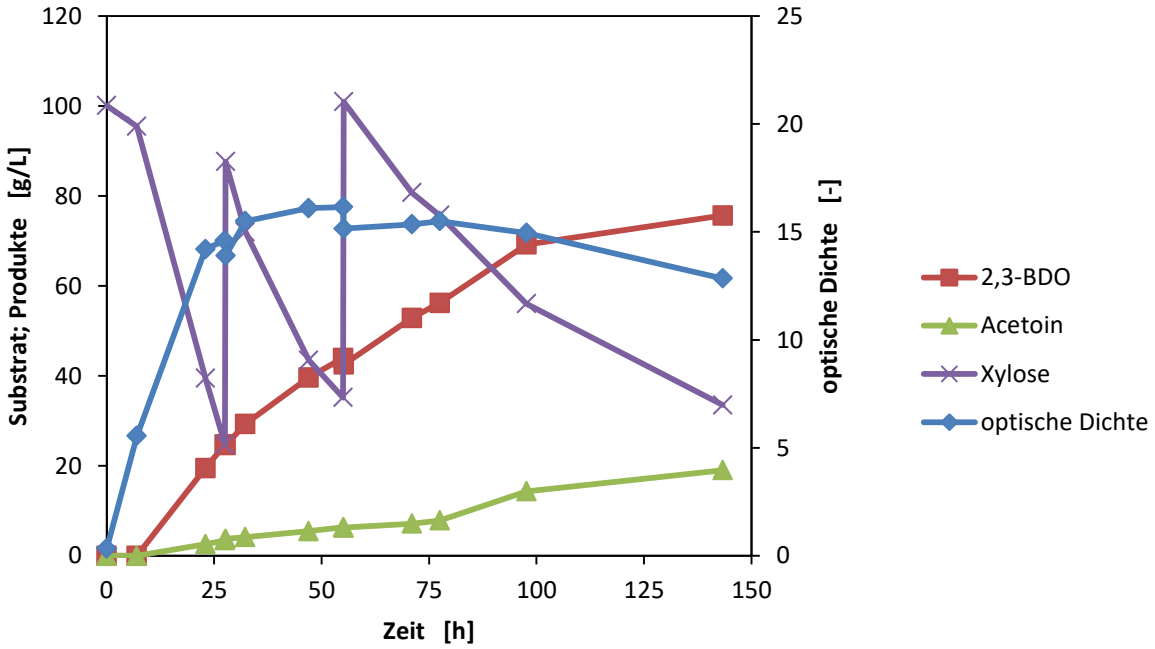


Abbildung 27: Fed-Batch mit *B. vallismortis* mit Xylose als einzige Kohlenstoffquelle. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 300 rpm und einem Start-pH-Wert von 6,7 und End-Wert von pH 5,8.

Die Fed-Batch-Kultivierung kam nach etwa 140 h zum Erliegen, dies konnte anhand der online-Abgasanalytik festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Abbildung 27 zeigt den Kultivierungsverlauf. Nach 143 h wurden 75,6 g/L 2,3-BDO und 19,1 g/L Acetoin gebildet. Dabei wurden insgesamt 195,2 g/L Xylose verbraucht. Die 2,3-BDO-Ausbeute betrug damit 0,39 g/g und die Gesamtausbeute lag bei 0,49 g/g. Die Gesamtausbeute liegt nahe am theoretischen Maximum von 0,5 g/g. Dies zeigt, dass beinahe der gesamte Kohlenstoff in den 2,3-BDO-Stoffwechselweg geschleust worden ist.

Im Fed-Batch wurden insgesamt 94,7 g/L Produkt gebildet. Die bisher höchsten Konzentrationen im Fed-Batch mit Xylose, wurden mit einem *B. licheniformis* Stamm produziert [4]. Es wurden insgesamt 92,2 g/L Produkt gebildet, 87,3 g/L 2,3-BDO und 4,9 g/L Acetoin. Die Produktmenge, die in diesem Versuch mit *B. vallismortis* erzielt wurde, ist soweit bekannt die höchste Produktmenge die bisher mit einem S1 Mikroorganismus erreicht wurde.

1.5 Birkenholz-Hemicellulose-Extrakte

1.5.1 Charakterisierung der Birkenholz-Hemicellulose-Extrakte

Das Thünen-Institut erhielt von der LUT drei Extrakte aus Birkenholz, die neben geringsfügugen Mengen an freien Monosacchariden vor allem oligo und polymere Hemicellulose enthalten. Diese Extrakte wurden nach enzymatischer Verzuckerung/Hydrolyse zur biotechnischen Produktion von 2,3-BDO sowie ohne vorherige enzymatische Verzuckerung/Hydrolyse zur chemisch-katalytischen Konversion zu Furfural eingesetzt. Das erste Extrakt, das Ausgangsextrakt, wurde mittels einer Heißwasserextraktion unter Druck bei 160 °C und 90 min gewonnen. In diesem Extrakt waren nach einem enzymatischen Aufschluss etwa 20 g/L Zuckermonomere, enthalten. Das Extrakt wurde von der LUT mittels Ultrafiltration (UF) konzentriert. Das Permeat der UF wurde aufgefangen und nochmals mittels Nanofiltration (NF) konzentriert. Die konzentrierten Extrakte werden im fortlaufenden Bericht als Ultrafiltrat und Nanofiltrat bezeichnet, das nicht konzentrierte Ausgangsextrakt als Extrakt. In Tabelle 12 sind die Konzentrationen der enthaltenden Zuckermonomere nach einem enzymatischen Aufschluss der Hemicellulose dargestellt. Für den enzymatischen Aufschluss wurde der pH-Wert der Extrakte mit $CaCO_3$ auf ~ 5,2 eingestellt. Anschließend wurden 0,05 g Enzym (Biogazym 2x, ASA Spezialenzyme GmbH, Deutschland) pro Gramm enthaltender Hemicellulose hinzugefügt. Die Lösung wurde bei 50 °C für mindestens 72 h inkubiert.

Tabelle 12: Zuckermonomere in den drei Hemicelluloseextrakten nach enzymatischem Aufschluss.

Monomer	Extrakt: Konzentration [g/L]	Ultrafiltrat: Konzentration [g/L]	Nanofiltrat: Konzentration [g/L]
Arabinose	0,7	0,6	2,2
Galactose	0,6	0,7	1,8
Glucose	0,9	3,0	1,9
Rhamnose	0,5	0,7	1,6
Xylose	17,1	87,1	57,5
Summe	**19,8**	**92,1**	**65,0**

Die drei Extrakte unterscheiden sich im Zuckergehalt und in der Zuckerzusammensetzung (Tabelle 12). Im Ausgangsextrakt sind etwa 20 g/L Zucker enthalten. Für eine biotechnische Umsetzung zu 2,3-BDO ist der Zuckergehalt in diesem Extrakt zu gering. Das Ausgangsextrakt kann somit ohne einen Konzentrierungsschritt nicht verwendet werden. Die Konzentrate Ultrafiltrat und Nanofiltrat enthalten etwa 92 und 65 g/L Zuckermonomere. Ab einer Zuckerkonzentration von 50 g/L, lassen sich Aussagen über die Verwertbarkeit und die inhibitorische Wirkung treffen. Beide Konzentrate können daher ohne eine weitere Konzentrierung getestet werden.

Zusätzlich zu der Zuckeranalyse wurden die einzelnen Extrakte auf den Gehalt bekannter Hemmstoffe untersucht. Die Untersuchung erfolgte ohne weitere Vorbehandlung der Extrakte mittels HPLC-Analyse.

Tabelle 13: Hemmstoffgehalte in den drei Extrakten.

Hemmstoff	Extrakt: Konzentration [g/L]	Ultrafiltrat: Konzentration [g/L]	Nanofiltrat: Konzentration [g/L]
Acetat / Essigsäure	0,21	n.d.	n.d.
Furfural	0,77	0,71	0,81
5-Hydroxymethylfurfural	0,10	0,13	0,13
4-Hydoxybenzoesäure	n.d.	n.d.	n.d.
Ameisensäure	n.d.	n.d.	n.d.
Syringaldehyd	n.d.	0,17	0,29
Vanillin	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = nicht detektiert

Die Konzentrationen der möglichen Hemmstoffe in den drei Extrakten und den daraus hergestellten Hydrolysaten (Tabelle 13), unterscheiden sich wesentlich von dem synthetischen Hydrolysat aus dem Screening. In keinem der Hydrolysate konnte 4-Hydoxybenzoesäure, Ameisensäure oder Vanillin nachgewiesen werden. Die Syringaldehyd-konzentration in den Hydrolysatkonzentraten ist etwa 10-mal höher und die Furfuralkonzentration etwa 7-mal höher. Die Konzentrationen an 5-HMF entsprechen etwa der Konzentration des getesteten synthetischen Hydrolysates. Essigsäure konnte in den Konzentraten nicht eindeutig nachgewiesen werden, da es zu Überlagerungen mit weiteren Hydrolysatnebenprodukten in der HPLC-Methode kam. Die Hemmstoffanalyse erfolge ohne Vorbehandlung. Die Bildung von Acetat/Essigsäure entsteht jedoch zum Großteil bei der Spaltung der Hemicellulose. Die Konzentrationen an Essigsäure wurden daher nochmals zusätzlich nach dem enzymatischen Aufschluss bestimmt. Hierfür wurde eine Methode der Standardaddition gewählt, um die Konzentrationen genau bestimmen zu können. Im Ultrafiltrat waren 19,9 g/L und im Nanofiltrat 14,1 g/L Acetat nach dem Aufschluss enthalten.

Die Extrakte wurden auch auf die enthaltenen Spurenelemente untersucht (Tabelle 14). Hierfür wurden die Extrakte gefriergetrocknet, mit Salpetersäure und H_2O_2 inkubiert und in Mikrowellenvials aufgeschlossen. Die vorbehandelten Extrakte wurden dann mittels ICP-OES untersucht. Durch die Vorbehandlung konnten alle Spurenelemente (gebunden und ungebunden) bestimmt werden.

Anhand einer Spurenelementanalyse mittels ICP-OES lassen sich die Konzentrierungsschritte der Extrakte erkennen. Im Extrakt sind jeweils die geringsten Konzentrationen der Spurenelemente enthalten. Mit der UF und NF steigen jeweils die Konzentrationen der Spurenelemente. Bei einigen Elementen verdoppelt sich die Konzentration mit jedem Konzentrierungsschritt. So z.B. bei Barium, Calcium, Magnesium, Mangan, Schwefel und Zink. Bei Kalium ist die Konzentrierung im Nanofiltrationsschritt etwas höher als im Ultrafiltrationsschritt. Phosphor hat sich erst mit der Nanofiltration des Ultrafiltratpermeats konzentriert. Im Konzentrat der Ultrafiltration befindet sich etwa dieselbe Menge (9 mg/L). Im Nanofiltrat ist die 4-fache Menge (36 mg/L) enthalten.

Tabelle 14: Spurenelementanalyse der drei Extrakte.

Element	Extrakte: Konzentration [mg/L]	Ultrafiltrat: Konzentration [mg/L]	Nanofiltrat: Konzentration [mg/L]
Al	0,30	0,60	1,09
B	0,26	0,27	0,40
Ba	1,52	3,21	6,29
Bi	u.N.	u.N.	u.N.
Ca	90,98	186,62	372,75
Cd	u.N.	u.N.	0,05
Co	n.d.	u.N.	u.N.
Cr	u.N.	0,12	0,14
Cu	0,25	1,08	2,15
Fe	1,31	3,95	3,77
K	71,93	106,33	154,30
Mg	25,05	48,42	104,12
Mn	11,91	22,79	48,03
Mo	n.d.	n.d.	0,01
Na	2,61	3,79	7,08
Ni	0,09	0,17	0,65
P	9,08	8,41	36,02
Pb	u.N.	0,31	0,36
S	2,52	6,00	10,25
Se	0,15	0,10	0,28
Sr	0,41	0,82	1,68
Ti	u.N.	u.N.	u.N.
V	n.d.	u.N.	u.N.
Zn	2,38	6,20	13,67

u.N. – unterhalb der Nachweisgrenze

n.d. – nicht detektiert

Die Spurenelemente sind alle, soweit bekannt, in einer nicht hemmenden Konzentration enthalten. Lediglich Zink wird in der Literatur als Inhibitor für die Butandioldehydrogenase (BDH) ab einer Konzentration von 1 mg/L beschrieben (Zhang et al. 2014). Im Folgenden wurde der Einfluss der Hemmstoffe im Einzelnen getestet. Hierfür wurden die Substanzen in verschiedenen Konzentrationsstufen dem mBasal Medium zugefügt. Die Versuche wurden als Doppelansatz in MTP bei 37 °C und 700 rpm durchgeführt. Das Füllvolumen betrug 200 µL und als Substrat wurden 50 g/L Xylose eingesetzt.

Schließlich wurden noch eine Ionenchromatographie zur Ermittlung der freien Ionen in den Hydrolysaten durchgeführt. Die Ionenchromatographie erfolgte nach einem enzymatischen Aufschluss der Hemicellulose mit anschließender Reinigung der Hydrolysate mittels Kationentauscher.

Tabelle 15: An- und Kationenkonzentration im Ultra- und Nanofiltrat.

Ionen	**Ultrafiltrat: Konzentration [mol/L]**	**Nanofiltrat: Konzentration [mol/L]**
PO_4^{3-}	0,63	1,32
SO_4^{2-}	0,36	0,36
Ca^{2+}	0,50	44,04
Mg_{2+}	-	3,91
K^+	-	3,84
Na^+	0,87	2,18

Im Ultrafiltrat liegen geringere Mengen an Ionen vor als im Nanofiltrat (Tabelle 15). Die höchste Konzentration beträgt 0,87 mol/L an Na^+-Ionen. Die berechnete Ionenstärke im Ultrafiltrat beträgt 5,0 mol/L. Im Nanofiltrat überwiegen der Anteil an Ca^{2+}-Ionen mit 44,04 mol/L. Der hohe Anteil an Ca^{2+}-Ionen kann ein Hinweis drauf sein, dass die Kapazität des Kationentauschers nicht ausreichend war zur Aufreinigung. Für das Nanofiltrat berechnet sich eine Ionenstärke von 105,6 mol/L.

1.5.2 Einfluss der Hemmstoffe auf *B. vallismortis*

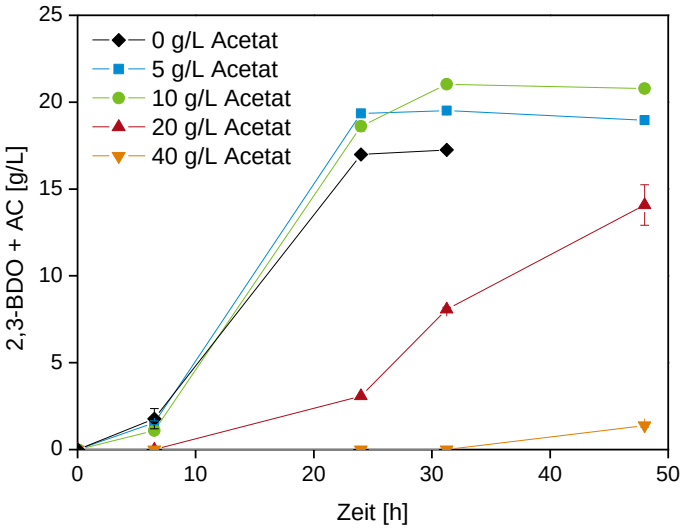


Abbildung 28: Produktbildung von *B. vallismortis* im mBasal-Medium mit Acetatkonzentrationen von 0 bis 40 g/L. Kultivierung in MTP mit einem Füllvolumen von 200 µL, 50 g/L Xylose, bei 37 °C und 700 rpm.

Die Kultivierung ohne zusätzliches Acetat (0 g/L) dient als Referenz. Durch den Zusatz von bis zu 10 g/L Acetat wird die Produktbildung im Vergleich zur Referenz aktiviert (Abbildung 28). Bei den höheren Konzentrationen ab 20 g/L ist eine Inhibierung der Produktbildung zu erkennen. Mit 40 g/L zusätzlichem Acetat im Medium findet innerhalb von 48 h kaum noch eine Produktbildung statt.

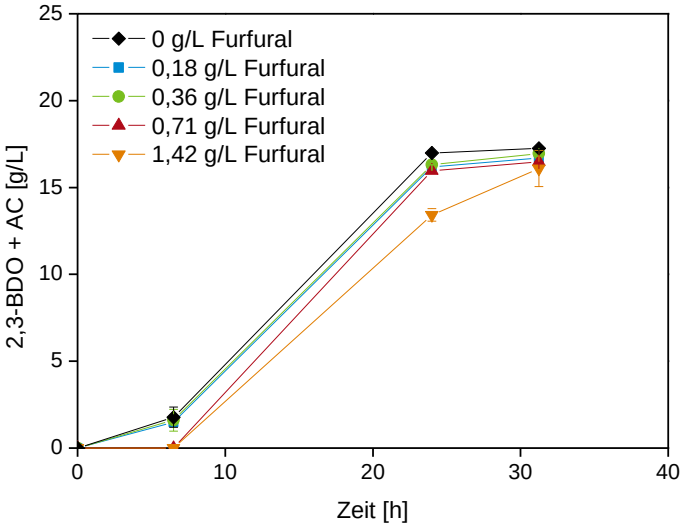


Abbildung 29: Produktbildung von *B. vallismortis* im mBasal-Medium mit Furfuralkonzentrationen von 0 bis 1,42 g/L. Kultivierung in MTP mit einem Füllvolumen von 200 µL, 50 g/L Xylose, bei 37 °C und 700 rpm.

In Abbildung 29 ist die Produktbildung in Abhängigkeit der zugefügten Furfuralkonzentration dargestellt. Furfural übt dabei keine inhibitorische Wirkung bis zu einer Konzentration von 0,36 g/L aus. Bei einer Konzentration von 0,71 g/L ist die Produktbildung verzögert. Dies ist die Konzentration, die im Ultrafiltrat vorliegt. Die maximal erreichte Endproduktkonzentration wird nicht beeinflusst. Bei einer Verdoppelung der Konzentration auf 1,42 g/L ist die Inhibierung etwas stärker ausgeprägt, aber auch hier wird nach 30 h Kultivierung dieselbe Endkonzentration an 2,3-BDO und Acetoin erreicht.

Bei der Zugabe von Syringaldehyd findet bis zu einer Konzentration von 0,17 g/L keine Inhibierung der Produktbildung statt (Abbildung 30). Ab einer Konzentration von 0,34 g/L setzt eine leichte Inhibierung ein.

5-HMF hat keine inhibitorische Wirkung auf den Kultivierungsverlauf und die Produktbildung von *B. vallismortis* (Abbildung 31).

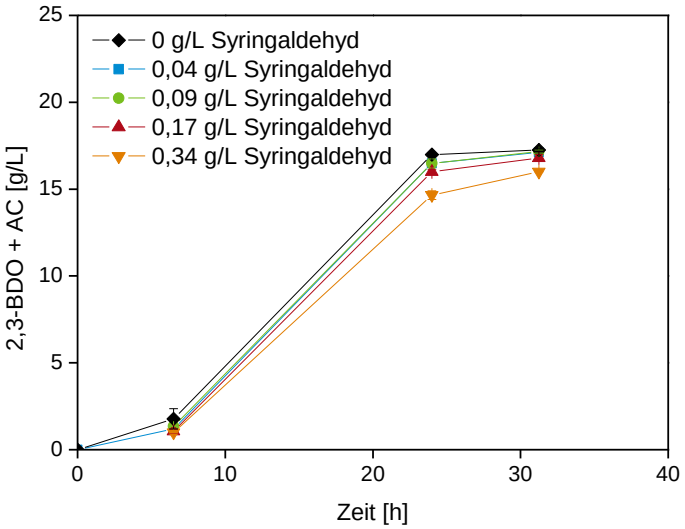


Abbildung 30: Produktbildung von *B. vallismortis* im mBasal-Medium mit Syringaldehydkonzentrationen von 0 bis 0,34 g/L. Kultivierung in MTP mit einem Füllvolumen von 200 µL, 50 g/L Xylose, bei 37 °C und 700 rpm.

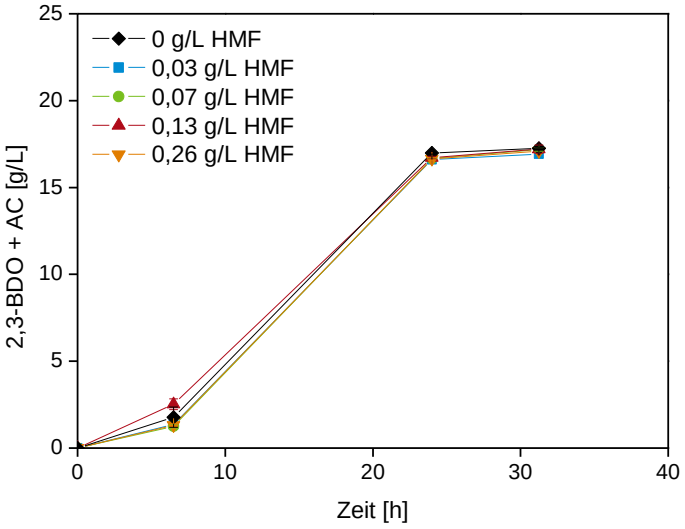


Abbildung 31: Produktbildung von *B. vallismortis* im mBasal-Medium mit 5-Hydroxymethylfurfural-konzentrationen von 0 bis 0,26 g/L. Kultivierung in MTP mit einem Füllvolumen von 200 µL, 50 g/L Xylose, bei 37 °C und 700 rpm.

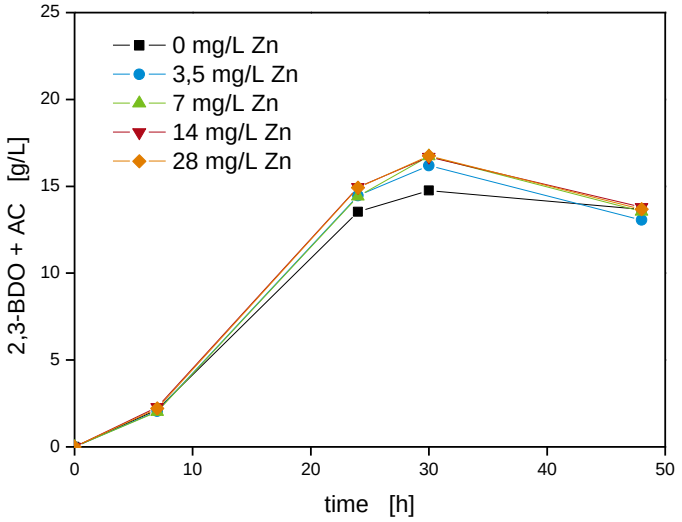


Abbildung 32: Produktbildung von *B. vallismortis* im mBasal-Medium mit Zinkkonzentrationen von 0 bis 28 mg/L. Kultivierung in MTP mit einem Füllvolumen von 200 µL, 50 g/L Xylose, bei 37 °C und 700 rpm.

Zink hat im gesamten, getesteten Konzentrationsbereich eine positive Wirkung auf die Produktbildung (Abbildung 32). Die Hemmstoffversuche mit Zink von Zhang et al. 2014 erfolgten mit einer isolierten BDH. Liegen Zinkionen im Kultivierungsmedium vor, haben diese keinen Einfluss auf die nicht isolierte BDH.

Im Anschluss an die Kultivierungen mit den einzelnen Hemmstoffen wurde ein synthetisches Ultra- und Nanohydrolysat hergestellt. Mit den synthetischen Hydrolysaten sollte die Kreuzinhibierung durch mehrere Substanzen getestet werden. Zusätzlich wurden die realen Hydrolysate mit dem Stamm *B. vallismortis* getestet. In den realen Hydrolysaten liegen noch weitere nicht identifizierte Substanzen vor, deren Einfluss auf die Kultivierung nicht bekannt ist. Für die Kultivierung mit den realen Hydrolysaten, wurde die Hemicellulose mit Biogazym 2x verzuckert. Für den enzymatischen Aufschluss wurde der pH-Wert mit $CaCO_3$ auf ~ 5,2 eingestellt. Anschließend wurden der Hydrolysatlösung 0,05 g Enzym pro Gramm enthaltender Hemicellulose hinzugefügt und die Lösung bei 50 °C für mindestens 72 h inkubiert. Um das überschüssige $CaCO_3$ nach dem Aufschluss wieder aus der Lösung zu entfernen, wurde die Hydrolysate über einen Kationentauscher gereinigt (Dowex 50 WX 8). Nach der Vorbehandlung wurden den Hydrolysaten alle Mediensubstanzen zugesetzt, die im Basal-Medium enthalten sind. An Spurenelementen wurde jedoch nur Nicotinsäure und Na-EDTA zugesetzt. Die synthetischen und realen Hydrolysate wurden zusätzlich mit 0,1 M MES auf pH 6,7 gepuffert. Die Kultivierungen wurden in Doppelansätzen in MTP durchgeführt.

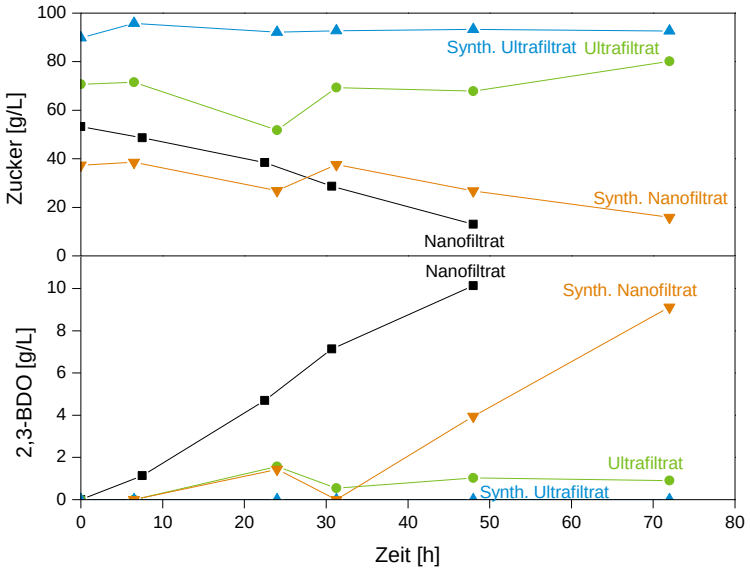


Abbildung 33: 2,3-BDO-Produktion von *B. vallismortis* in synthetischem und realem Ultra- und Nanofiltrat. Kultivierung in MTP mit einem Füllvolumen von 1 mL, bei 37 °C und 320 rpm.

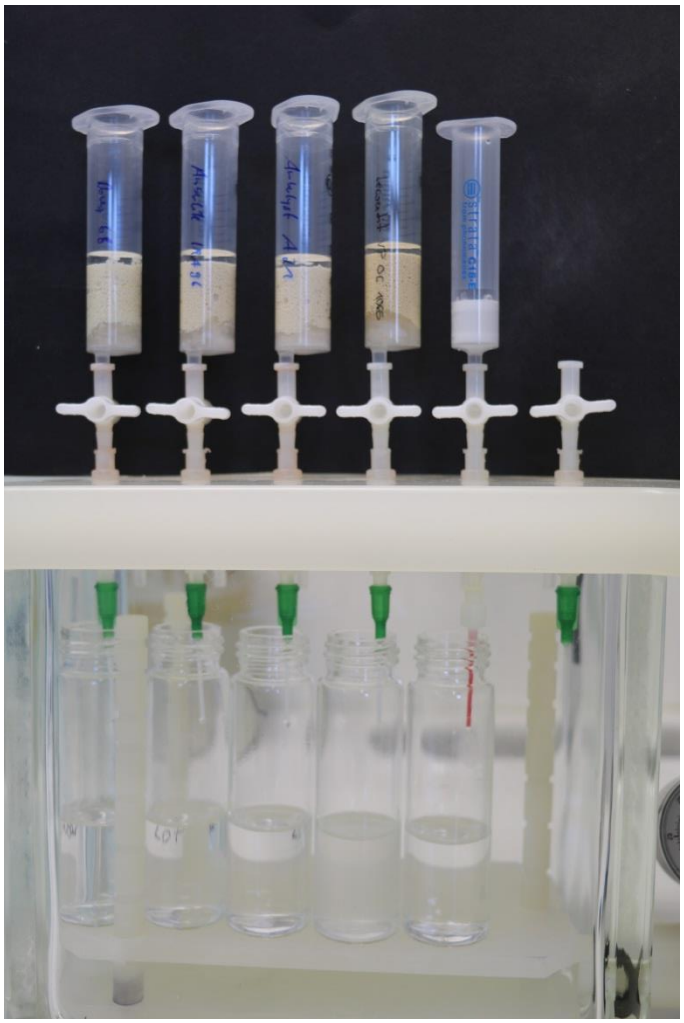


Abbildung 34: Testsystem zur Entfernung von Acetat/Essigsäure aus den Hydrolysaten. Es wurden vier schwache Anionentauscher (Dowex 66, Amberlyst A 21, Amberlite IRA-96 und Lewatit VP OC 1065) und eine Umkehrphase (Strata XC 18e) im 5 mL Maßstab getestet.

Die Kultivierungen mit dem synthetischen und realen Ultrafiltrathydrolysat führte zum selben Ergebnis. Die Kombination aller enthaltenen Hemmstoffe führt dazu, dass eine Umsetzung der Xylose zu 2,3-BDO nicht möglich ist. In den Nanofiltrathydrolysaten hingegen fand eine Umsetzung statt. Dabei war die Produktbildung im realen Hydrolysat besser, als im synthetischen. Ursache hierfür könnte sein, dass durch die Aufreinigung des Hydrolysates mit dem Kationentauscher, inhibierende Substanzen mit entfernt wurden. Eine zweite Möglichkeit ist, dass neben den hemmenden Substanzen noch aktivierende Substanzen im Hydrolysat enthalten waren, die bisher nicht identifiziert wurden.

1.5.3 Detoxifizierung der Hydrolysate

Bei der Bestimmung der hemmenden Substanzen, wirkte sich hauptsächlich Acetat/Essigsäure stark inhibierend auf die Kultivierung aus. Im Ultrafiltrat sind nach der Verzuckerung ca. 20 g/L Acetat und im Nanofiltrat 14 g/L Acetat enthalten. Das Acetat sollte daher aus den Hydrolysaten entfernt bzw. auf eine nicht hemmende Konzentration reduziert werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Anionentauscher bzw. eine Umkehrphase (RP Phase) getestet. Die Versuche mit den Anionentauschern und der RP-Phase wurden mit Proben des Ultrafiltrates durchgeführt.

Der pH-Wert ist ein entscheidender Faktor zur Entfernung von Acetat aus den Hydrolysaten. Die Hydrolysate wurden daher auf pH 7 eingestellt mit einem Verdünnungsfaktor von 1:2. Die Säulen wurden mit Wasser pH 7 gewaschen und anschließend wurden 5 mL der Proben auf die Säulen aufgetragen. Die Probe wurde aufgefangen und die Säule in zwei Waschschritten (2x 5 mL) nachgespült. Die Probe und die beiden Waschfraktionen wurden mittels HPLC auf Zucker- und Acetatgehalt untersucht. Für die RP Phase wurde gleich vorgegangen, nur dass die Probe unbehandelt und ohne Verdünnung auf die Säule aufgegeben wurde (pH < 2,5).

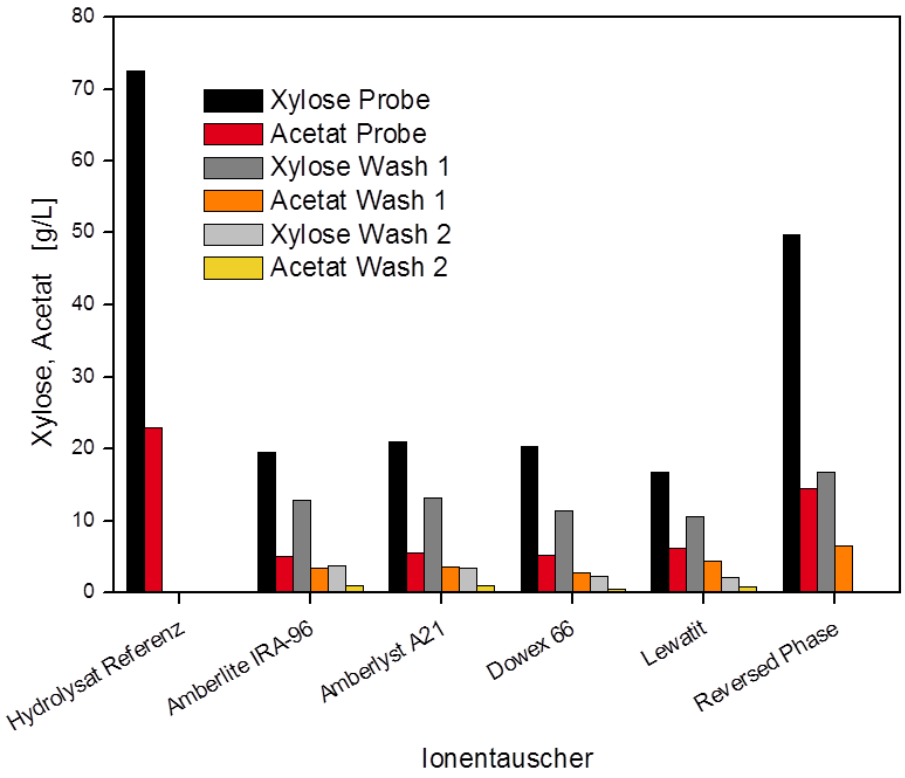


Abbildung 35: Xylose- und Acetatkonzentrationen in den Anionentauscherproben und in den Waschfraktionen. Als Probe wurden je 5 mL Ultrafiltrat verwendet.

In der unverdünnten UF-Referenz sind etwa 72,6 g/L Xylose und 23 g/L Acetat enthalten. In den vorbehandelten Proben (pH-Wert Einstellung; 1:2 Verdünnung) sind demnach maximal 36,3 g/L Xylose und 11,5 g/L Acetat enthalten. Nach dem Anionentauscher Amberlyst IRA-96, Amerlyst A21 und Dowex 66 sind jeweils nur etwa 20 g/L Xylose und 5 g/L Acetat in den Proben enthalten. Im ersten Waschschritt sind weiterhin ca 13 g/L Xylose und 3,5 g/L Acetat enthalten. Mit dem Lewatit Anionentauscher sind die Xylosekonzentrationen in der Probe und im ersten Waschschritt geringer, im zweiten Waschschritt ist daher noch mehr Zucker und Acetat enthalten, als bei den anderen Tauschern. In der RP-Phase sind in der Probe

etwa 50 g/l Xylose und 14,5 g/L Acetat enthalten. Diese Probe war nicht verdünnt. Der Zuckeranteil hat um 22,8 g/L und der Acetatanteil um 8,5 g/L abgenommen.

Werden alle Konzentrationen aus den Proben und den einzelnen Waschschritten, unter Rücksichtnahme der Verdünnung, zusammengerechnet, ergibt sich die normierte Ausbeute mit den einzelnen Tauschern (Abbildung 36).

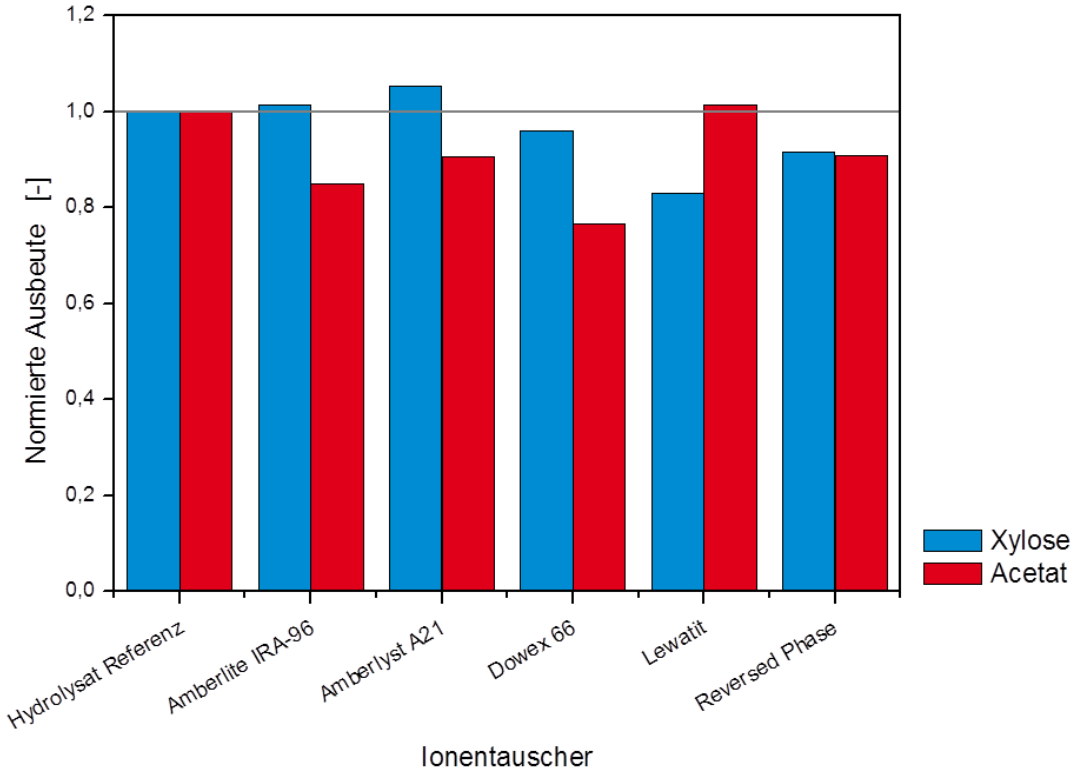


Abbildung 36: Normierte Ausbeute von Xylose und Acetat in den Anionentauscherproben und in den Waschfraktionen.

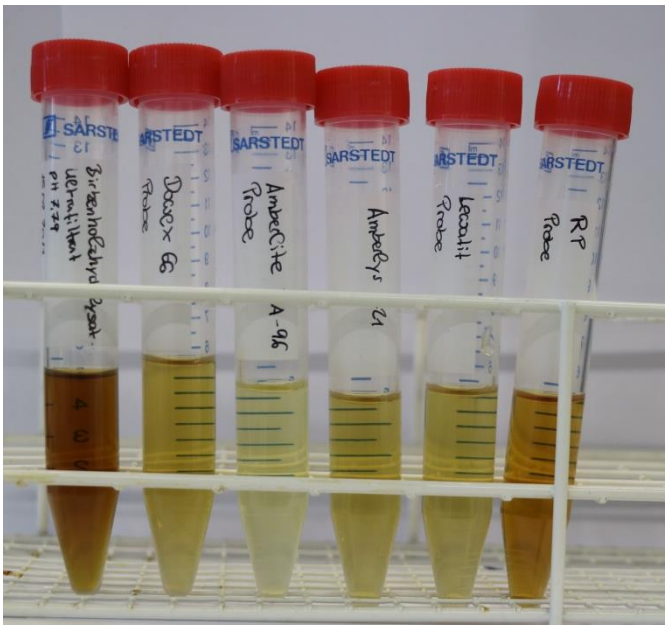


Abbildung 37: Färbung der Proben (von rechts nach links: Referenz, Dowex 66, Amberlite IRA-96, Amberlyst A21 Lewatit VP OC 1065 und RP Phase) nach nach den Anionentauscher bzw. RP Phase.

Mit den Tauschern Amberlite IRA-96 und Amberlyst A21 findet sich der gesamte Zucker in den drei Fraktionen wieder. Der Acetatgehalt wurde mit dem Amberlite Tauscher um 15 % reduziert, mit dem Amberlyst um etwa 9 %. Mit dem Dowex 66 Tauscher wurde das meiste Acetat zurückgehalten (23,5 %), dabei sind 4 % Xylose verloren gegangen. Mit dem Lewatitaustauscher war die normierte Ausbeute für Acetat 100%, für Xylose nur 83,1 %. Dieser Tauscher ist daher für die Acetatentfernung ungeeignet. In der RP-Phase nahm der Xylose und Acetatanteil zu gleichen Teilen ab, jeweils um 8 – 9 %. Auch die RP-Phase ist somit für die Acetatentfernung nicht geeignet.

Abbildung 37 zeigt die Entfärbung der Hydrolysatproben nach der Anionentauscheranwendung. In allen Proben die mit einem Anionentauscher behandelt wurden, ist eine starke Entfärbung zu erkennen. Die Entfärbung durch die RP Phase ist deutlich geringer. Die Entfärbung könnte einen Hinweis darauf geben, weshalb die Acetatentfernung nur in geringen Umfang erfolgreich war. Acetat hat eine relativ schwache negative Ladung und negativ geladene Abbauprodukte im Holzhydrolysat konkurrieren um die Tauscherplätze.

Die Detoxifizierung mittels Anionentauscher war nicht erfolgreich. Das meiste Acetat wurde mit dem Dowex 66 Anionentauscher entfernt. Insgesamt wurde die Acetatkonzentration nur auf 17,6 g/L gesenkt. Die Konzentration ist demnach noch immer zu hoch. Zudem wurde die Probe verdünnt, wodurch eine erneute Konzentrierung nötig wäre. Eine Detoxifizierung mittels Anionentauscher kommt daher nicht in Frage.

In einer weiteren Versuchsreihe, sollte das Acetat mittels Extraktion aus dem Hydrolysat entfernt werden. Hierfür wurden 500 µL Hydrolysat mit 400 µL eines organischen Lösungsmittels vermengt und durchmischt. Nach der Phasentrennung wurde die organische Phase verworfen. Die Proben wurden auf ihren Zucker und Acetatgehalt untersucht. Als organische Lösungsmittel wurden Ethylacetat, MEK, MTBE, n-Octanol und stabilisierter Diethylether untersucht.

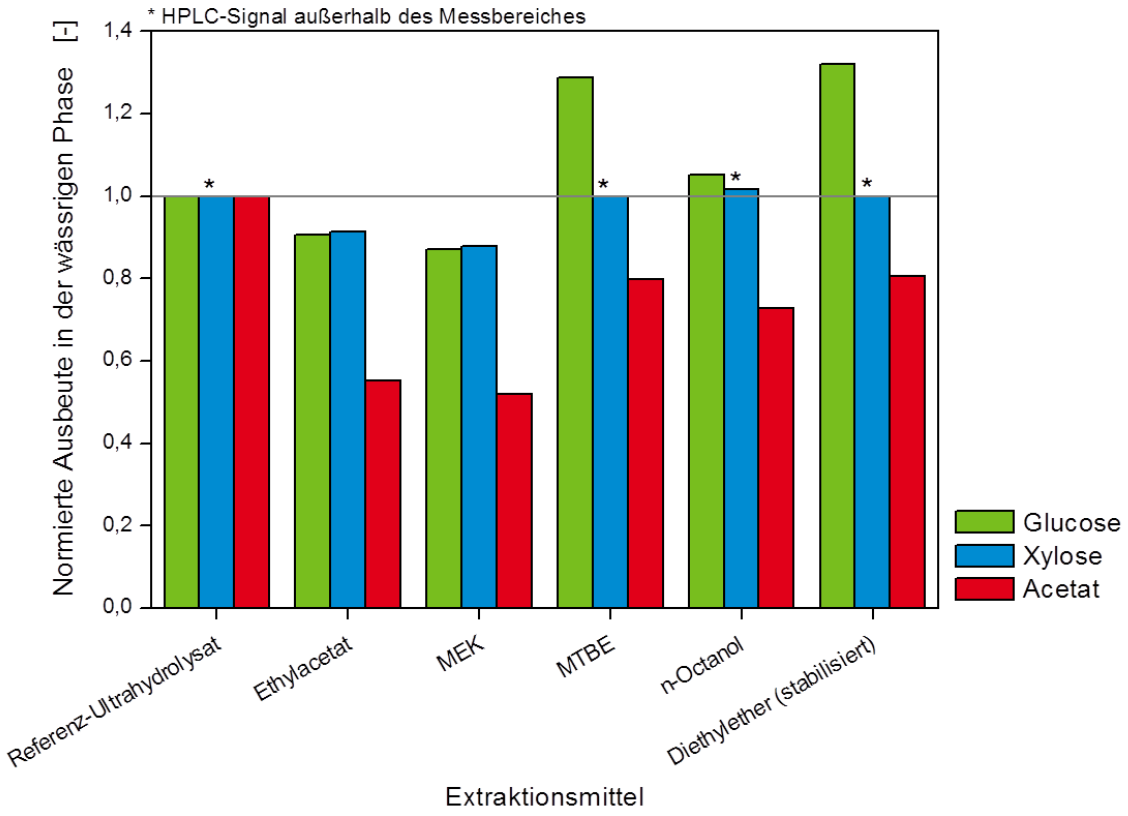


Abbildung 38: Acetat-, Glucose und Xylose-Konzentrationen nach einer flüssig-flüssig Extraktion mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln.

Bei allen Extraktionen konnte Acetat teilweise aus dem Hydrolysat entfernt werden (Abbildung 38). Mit Ethylacetat und und MEK trat zudem ein Zuckerverlust auf. Mit MEK wurde außerdem in der HPLC-Analyse ein zusätzlicher Peak detektiert der zeigt, dass die Phasentrennung nicht vollständig war und Lösemittel im Hydrolysat verblieben ist. Mit MTBE, n-Octanol und stabilisiertem Diethylether fand eine Konzentrierung der Zucker statt. Die Xylose lag dabei außerhalb des Messbereichs und konnte nicht quantifiziert werden. Die

Konzentrierung der Glucose, lässt jedoch darauf schließen, dass die Xylose im gleichen Maße konzentriert wurde. Mit stabilisiertem Diethyether wurde ein unbekannter Peak im Hydrolysat detektiert.

Die Extraktion mit MTBE und n-Octanol schien am zweckmäßigsten zu sein. Mit diesen organischen Lösungsmitteln wurden daher weitere Versuche durchgeführt. Hierfür wurden 300 µL Probe mit 600 µL Solvent vermengt und gemischt. Die organische Phase wurde verworfen. Die Extraktion wurde 3mal wiederholt.

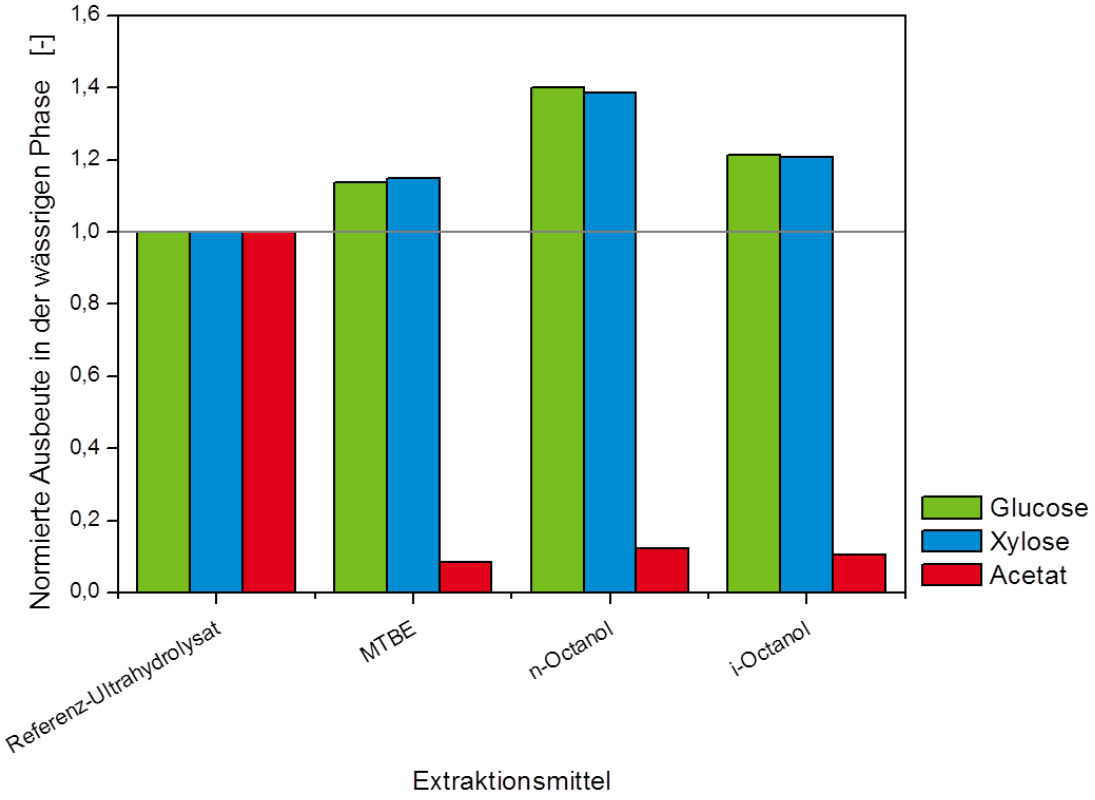


Abbildung 39: Acetat-, Glucose und Xylose-Konzentrationen nach einer flüssig-flüssig Extraktion mit MTBE, n- und i-Octanol.

Mit MTBE, n- und i-Octanol konnte das Acetat zu etwa 90 % entfernt und der Zucker konzentriert werden. Wobei die Konzentrierung der Zucker durch einen Wasserentzug der Lösemittel stattfand. Mit n- und i-Octanol fand keine klare Phasentrennung statt, es bildete sich eine Emulsion, die über mehrere Stunden stabil war. Die beste Acetatentfernung konnte somit mit MTBE erzielt werden.

Die Acetatentfernung vom Nano- und Ultrafiltrat wurde mit MTBE durchgeführt. Jeweils 150 mL Hydrolysat wurde mit 200 mL MTBE vermengt und ausgeschüttelt. Die Extraktion wurde 4mal wiederholt. Mittels HPLC-Analyse wurde die Acetat-Konzentration nach der Detoxifizierung ermittelt. Im Nanofiltrat befanden sich 5,7 g/L Acetat und im Ultrafiltrat 1,9 g/L Acetat. In beiden Fällen lag die Acetat-Konzentration unterhalb der inhibierenden Konzentration.

1.5.4 Batch Kultivierung mit Birkenholz-Hemicellulose-Hydrolysat

Die Kultivierungen fanden mit dem detoxifizierten Nano- und Ultrafiltrat im DASgip® Bioreaktorsystem satt. Den Hydrolysaten wurden zusätzlich alle essentiellen Medienbestandteile zugesetzt. Die Kultivierung fand bei 300 rpm, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft statt. Der Start-pH-Wert wurde auf 6,7 eingestellt. Anschließend fand eine freie Säuerung bis pH 5,8 statt. Bei Erreichen des pH-Wertes von 5,8 setzte eine pH-Regelung ein, die ein weiteres Absinken des pH-Wertes verhinderte. Als pH-Korrekturmittel wurde 4 M NaOH eingesetzt.

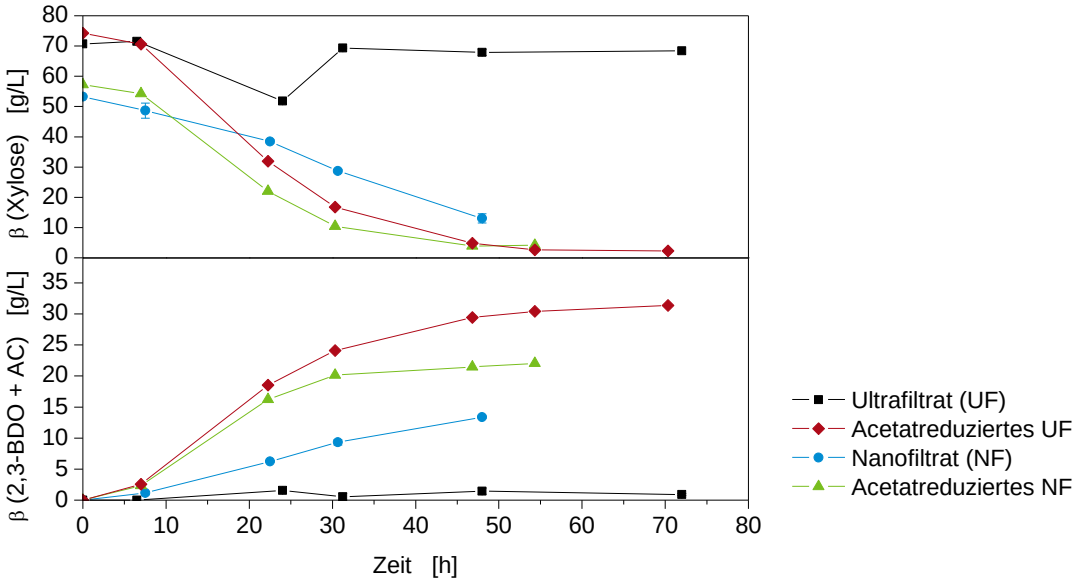


Abbildung 40: Kultivierung von *B. vallismortis* mit UF- (schwarz) und NF-Holzhydrolysat (blau) und Acetatreduziertem UF- (rot) und NF-Hydrolysat (grün). Kultivierung im DASbox Bioreaktor, bei 37 °C, 300 rpm, Begasung mit 25 sL/h mit Luft. Start-pH-Wert 6,7, pH-Korrektur ab pH 5,8 mit 4 M NaOH.

Die Umsetzung der Zucker setzte in beiden acetatreduzierten Hydrolysaten nach etwa 8 h Kultivierung ein. Nach etwa 47 h war der Zucker zum Großteil verbraucht und die maximalen Produktkonzentrationen erreicht. Im Ultrafiltrat betrug die Produktkonzentration 22,7 g/L 2,3-BDO und 6,8 g/L Acetoin. Die Produktivität lag nach 47 h bei 0,63 g/(L·h) bei einer Ausbeute von 0,43 g/g. Im nicht aufgereinigten UF war *B. vallismortis* nicht in der Lage, den Zucker zu verwerten. Durch die Reduzierung des Acetats von 19,9 g/L auf 1,9 g/L, konnte der Zucker von *B. vallismortis* vollständig verwertet werden und zu 2,3-BDO und Acetoin umgesetzt werden.

Mit dem nicht aufgereinigten NF war zwar ein Umsatz des Zuckers möglich, jedoch bei einer relativ geringen Produktivität (0,28 g/(L·h) nach 47 h). Mit dem gereinigten NF wurden 15,3 g/L 2,3-BDO und 6,2 g/L Acetoin produziert. Die Produktivität stieg dabei auf 0,66 g/(L·h) nach 33 h.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei dem Einsatz des acetatreduzierten Ultrafiltrats der Xyloseverbrauch und die Produktbildung den Verläufen bei Verwendung der reinen Xylose entsprechen.

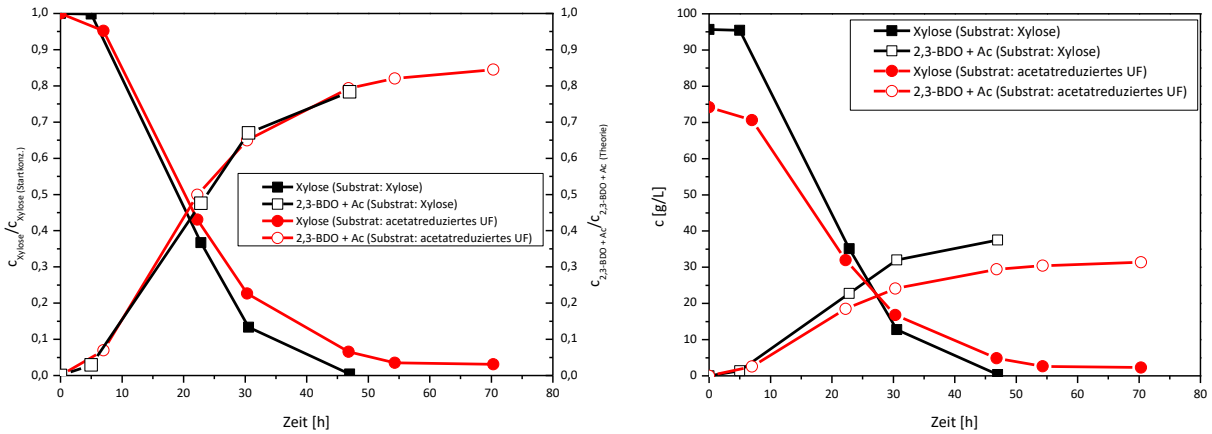


Abbildung 41: Vergleich der Kultivierung von *B. vallismortis* mit reiner Xylose (schwarz) und acetatreduziertes Birkenholzhydrolysat (UF) (rot). Links: Normierte Substratkonzentration und Produktbildung (2,3-BDO + Acetoin) in% der Theorie. Rechts: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Xylose und 2,3-BDO + Acetoin (Ac). Kultivierung in einem 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, 37 °C, Belüftungsrate von 25 sL/h, 300 U/min, pH-Kontrolle bei 5,8.

Die 2,3-BDO Produktion mit *B. vallismortis* auf realem Birkenholzhydrolysat war überaus erfolgreich. Bisher gibt es keine vergleichbaren Studien mit reinen Hemicellulose-Hydrolysaten. Soweit bekannt sind die in dieser Arbeit erzielten 2,3-BDO Konzentrationen somit die höchsten, die bisher mit einem Holzhemicellulose-Hydrolysat und einem S1 Mikroorganismus erreicht wurden.

1.5.5 Die Herstellung von Methylethylketon (MEK) aus 2,3-Butandiol

Die Fermentationsbrühe die aus dem Ultrafiltrat erzeugt wurde (Produktkonzentration 22,7 g/L 2,3-BDO und 6,8 g/L Acetoin) wurde für die Umsetzung zu MEK genutzt. Vergleichsweise wurde ein Versuch mit reinem 2,3-BDO als Ausgangsmaterial durchgeführt. Es handelt sich um eine säurekatalysierte Reaktion, die bei Temperaturen von 200 °C durchgeführt wird. Als Katalysator kam Schwefelsäure zum Einsatz. Die Konzentrationsverläufe von 2,3-BDO und MEK über die Reaktionszeit sind in Abbildung 42 dargestellt.

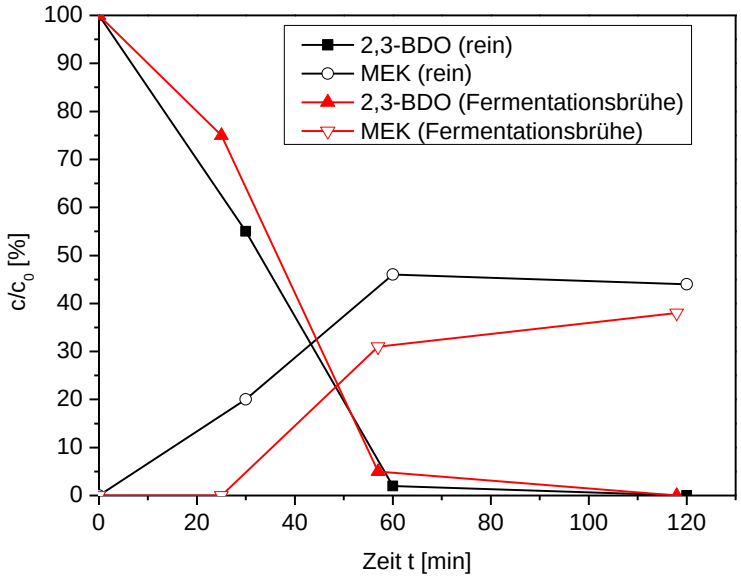


Abbildung 42: Die Konzentrationsverläufe von 2,3-Butandiol (2,3-BDO) und Methylethylketon (MEK) mit reinem Ausgangsmaterial und mit der Fermentationsbrühe (H_2O als Lösemittel, H_2SO_4 als Kat. (10 Gew-%), 200 °C, 20 bar N_2).

Unter identischen Reaktionsbedingungen wurde mit reinem 2,3-BDO eine um 6 % höhere Ausbeute an MEK erreicht, als wenn die Fermentationsbrühe als Ausgangsmaterial diente. Die Ausbeuten sind mit 44 % und 38 % in beiden Fällen ausbaufähig. Dazu muss eine Optimierung der Reaktionsbedingungen durchgeführt werden. Der Verlust an Ausbeute mit der Fermentationsbrühe gegenüber dem reinen 2,3-BDO kommt dadurch zustande, das neben 2,3-BDO und Acetoin noch hemmende, organische Substanzen enthalten sind. Durch das einphasige Reaktionssystem kommt es dadurch zu Nebenreaktionen vom MEK mit diesen Substanzen.

2. Erzielte Ergebnisse im AP3.2

2.1 Experimentelle Durchführung

Umsetzung von Xylose zu Furfural im Batch-Reaktor

Für die Umsetzung von Xylose zu Furfural im Batch-Betrieb wurden zwei Arten von Reaktorsystemen genutzt. Kamen Mineralsäuren (Schwefelsäure oder Salzsäure) zum Einsatz wurde ein druckbeständiger Glasreaktor (300 mL, max. 10 bar, max. stabil bis 225 °C) mit Doppelmantel der Firma Parr bevorzugt (Abbildung 43).

Abbildung 43: Der Glasreaktor für die Umsetzung von Xylose zu Furfural.

Die Startkonzentration an Xylose betrug 5 – 15 Gewichtsprozent (Gew-%) bezogen auf die wässrige Phase. Die Reaktionen fanden entweder im Einphasensystem Wasser oder im Zweiphasensystem Wasser/HFIP (Verhältnis 2/1 – 1/3 (V/V)) statt. Die Mineralsäure diente als homogener Säurekatalysator und sorgt für die Trennung in eine wässrige und organische Phase beim Lösemittelgemisch Wasser/HFIP. Nachdem alle Komponenten im Reaktionsbehälter vorlagen, erfolgte das Fluten des Außenmantels mit vorgeheiztem Silikonöl und damit auch die Zeitmessung. Das Silikonöl wurde vorher im Thermostaten auf die gewünschte Temperatur erhitzt.
Das zweite Reaktorsystem, das für Reaktionen im Batch-Betrieb genutzt wurde, ist ein korrosionsbeständiger Tantal-beschichteter Hochdruckreaktor der Firma Parr (max. 250 °C, max. 250 bar) (Abbildung 44). Genutzt wurde dieses beim Einsatz von Heteropolysäuren als Katalysator, da auf Grund höherer Reaktionstemperaturen auch höhere Drücke vorlagen, die den Maximaldruck des Glasreaktors überschritten hätten. Die Startkonzentration betrug 5 Gew-% Xylose bezogen auf die wässrige Phase. Die Reaktionen wurden im einphasigen und zweiphasigen System Wasser/HFIP = 1/2 (V/V) getestet. Um zwei Phasen zu generieren wurde dem Reaktionssystem Natriumchlorid (50 – 100 g/L bezogen auf den Wasseranteil) zugesetzt. Alle Komponenten wurden im Reaktionsbehälter vorgelegt, der Reaktor druckdicht verschlossen und mit 20 bar Stickstoff versetzt. Anschließend wurde auf die gewünschte Temperatur geheizt. Mit dem Beginn des Heizzyklus wurde auch die Zeitmessung begonnen.

Abbildung 44: Der Parr-Hochdruckreaktor für die Umsetzung von Xylose zu Furfural.

Abbildung 45: Das Reaktorsystem für die kontinuierliche Produktion von Furfural aus Xylose.

Umsetzung von Xylose zu Furfural im kontinuierlichen Reaktor

Für die Umsetzung von Xylose zu Furfural im kontinuierlichen Betrieb wurde ein am Thünen-Institut für Agrartechnologie entwickelter kontinuierlicher Festbettreaktor genutzt (Abbildung 45). Die Startkonzentration an Xylose betrug 1 Gew-% bezogen auf das Gesamtlösemittel. Als Reaktionssystem wurde HFIP mit 10 % Wasseranteil genutzt (einphasig). Über eine handelsübliche HPLC-Pumpe wurde die homogene Lösung in ein beheiztes und mit Ionenaustauscherharz gefülltes Festbett überführt. . Die Pumpleistung richtete sich nach der Verweilzeit am Katalysator. Durch den Einsatz eines programmierbaren Autosamplers war eine regelmäßige Probenahme gewährleistet.

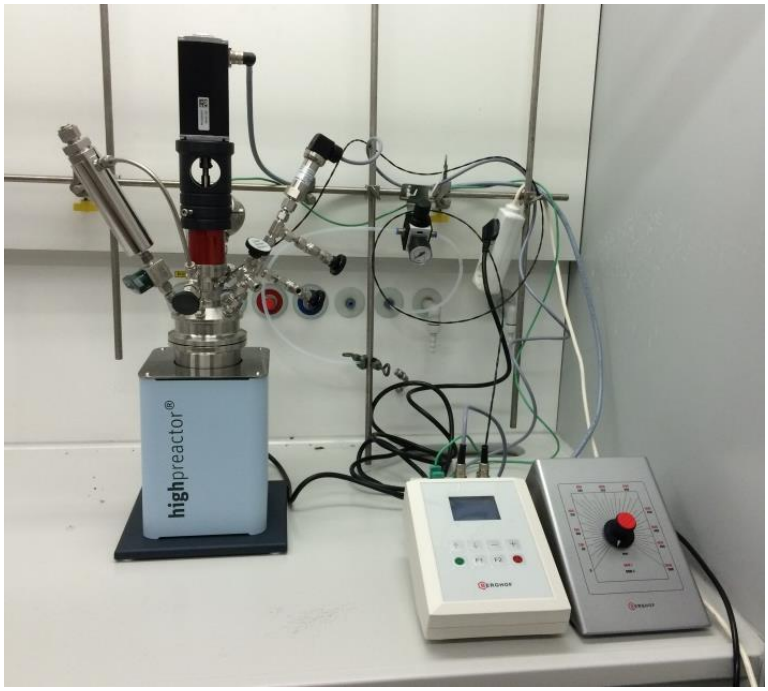


Abbildung 46: Der Hochdruck-Laborreaktor der Firma Berghof.

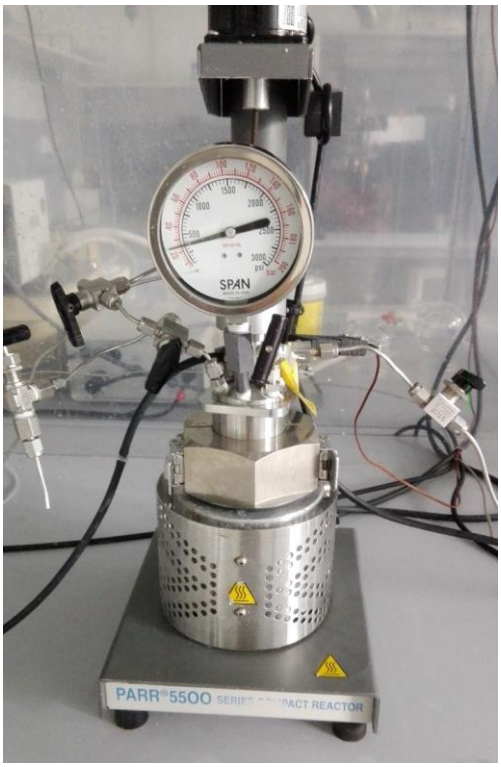


Abbildung 47: Der Oxidationsreaktor, der Firma Parr.

Umsetzung von Furfural zu Maleinsäure

Für die Oxidation von Furfural mit Sauerstoff wurde ein Hochdruckreaktorsystem von Berghof (300 mL, max. 295 bar, max. 200 °C) mit kompletter PTFE-Innenbeschichtung genutzt (Abbildung 46). Je nach Katalysator kamen unterschiedliche Ausgangskonzentrationen an Furfural zum Einsatz. Dienten Heteropolysäuren als Katalysator (10 Mol-% bezogen auf Furfural) wurde eine 2,5 %-ige Furfurallösung eingesetzt. Wurde ein heterogener Katalysator eingesetzt (6,6 g/L) betrug die Ausgangskonszentration an Furfural 0,2 mol/L (1,9 %-ige Lösung). Als Lösemittelsystem diente das Einphasensystem Wasser, HFIP oder das Gemisch von Wasser/HFIP (30 – 70 % Wasseranteil). Die Reaktionstemperatur betrug 80 – 140 °C, der Sauerstoffdruck betrug 10 – 20 bar. Die Reaktionskomponenten wurden gleichzeitig im PTFE-Reaktionsgefäß vorgelegt, der Reaktor druckdicht verschlossen und anschließend auf die gewünschte Temperatur geheizt. Danach wurde der Reaktor mit Sauerstoff gespeist und die Zeitmessung begonnen.

Eintopfsynthese von Xylose zu Maleinsäure

Für die Umsetzung von Xylose zu Maleinsäure in einem Topf und mit Wasser als reinem Lösemittel wurde ein Oxidationsreaktor der Firma Parr genutzt (max. 300 °C, max. 200 bar) (Abbildung 47). Kam das Lösemittelgemisch Wasser/HFIP = 1/1 (V/V) (einphasig) zum Einsatz wurde der Hochdruck-Laborreaktor der Firma Berghof (Abb. 16) gewählt. Die Startkonzentration an Xylose betrug 5 Gew-%, die Reaktionstemperatur 160 °C und die Katalysatorkonzentration 1 Gew-%. Als Katalysatoren kamen eine Auswahl an Heteropolysäuren, sowie Kupfer(II)-nitrat zum Einsatz. Die Xylose und der Katalysator wurden in Wasser gelöst und im Reaktor vorgelegt. Anschließend wurde ggf. HFIP zugegeben, der Reaktor verschlossen, mit 20 bar Sauerstoffdruck versehen und hochgeheizt. Mit Beginn der Heizphase begann auch die Zeitmessung.

Isolierung von HFIP und Furfural

Die Wasser-HFIP-Furfural-Produktmischung wurde in einen Rundkolben überführt und mit der Destillationsapparatur (Abbildung 48) verbunden. Die Vorlage wurde über einen Heizblock erhitzt und das Gemisch im Kolben über eine Füllkörperkolonne destilliert. Das Destillat wurde mit einem Ethanol-Stickstoff-Bad, die Kühlfalle mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Über eine Vakuumpumpe konnte zusätzlich der Druck vermindert werden. Die Fraktionen wurden mit Hilfe eines Vorstoßes nach Anschütz-Thiele einzeln aufgefangen ohne das Vakuum zu verändern.

Abbildung 48: Die Destillationsapparatur zur Auftrennung des Produktgemisches.

2.2 Ergebnisse für die Umsetzung von Xylose zu Furfural

Mineralsäuren als Katalysator

Wie bei den meisten bisher angewendeten technischen Prozessen, diente für erste Untersuchungen Schwefelsäure als homogener Katalysator (vgl. Kapitel 2.2). Zunächst wurde der Nachweis erbracht, dass ein Zweiphasensystem Wasser/HFIP reinem Wasser als Lösemittel vorzuziehen ist (Abbildung 49).

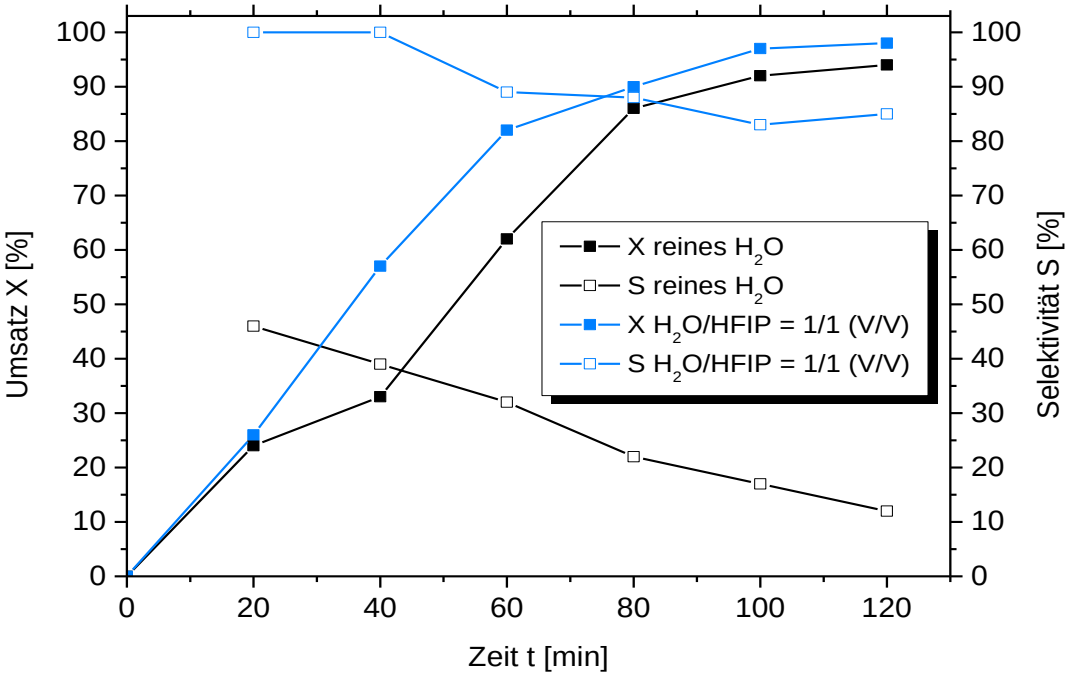


Abbildung 49: Der Vergleich zwischen Wasser und Wasser/HFIP bei der Umsetzung von Xylose zu Furfural (5 % Xylose, 3 M H_2SO_4, 120 °C).

Es wird sichtbar, dass im Einphasensystem Wasser die Selektivität zu Furfural unter 20 % absinkt, wenn der Umsatz oberhalb von 90 % liegt. Im Zweiphasensystem Wasser/HFIP hingegen wird eine Selektivität bis zum Vollumsatz erhalten, die konstant oberhalb von 80 % liegt. Die Anwendung eines in-situ Extraktionsmittels ist daher gegenüber reinem Wasser als Lösemittel zu bevorzugen und es erfolgte eine Optimierung des Reaktionssystems mit Mineralsäuren als Katalysator. Dafür wurden die Reaktionsparameter Temperatur, Lösemittelverhältnis und Reaktionszeit variiert. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind in
Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Die optimierten Reaktionsparameter für die Umsetzung von Xylose zu Furfural mit 3 M und 6 M Schwefelsäure bzw. 6 M Salzsäure als Katalysator für eine Xylosekonzentration von 5 Gew-%.

Katalysator	Lösemittelverhältnis H_2O/HFIP (V/V)	Reaktions-temperatur	Reaktions-zeit	Umsatz [%]	Selektivität [%]	Ausbeute [%]
3 M H_2SO_4	1/2	120 °C	60 min	> 98	89	88
6 M H_2SO_4	1/2	120 °C	20 min	> 99	91	90
6 M HCl	1/2	120 °C	20 min	> 99	> 99	> 99
6 M HCl	1/1	100 °C	60 min	> 99	> 99	> 99

Die maximale Ausbeute Y an Furfural mit 3 M Schwefelsäure beträgt 88 %. Durch die Verdopplung der Schwefelsäurekonzentration auf 6 mol/L konnte eine Ausbeutesteigerung auf 90 % festgestellt werden. Der Verlust an Ausbeute ist durch die Bildung von Huminen zu erklären. Wird bei identischen Reaktionsbedingungen statt Schwefelsäure nun Salzsäure als Katalysator genutzt findet eine komplette Umwandlung (Y > 99 %) von Xylose zu Furfural statt. Die Menge an Extraktionsmittel lässt sich gegenüber Schwefelsäure als Katalysator sogar noch vermindern (von H_2O/HFIP = 1/2 auf 1/1) und die Reaktionstemperatur um 20 °C senken (von 120 °C auf 100 °C), ohne Verlust an Furfuralausbeute. Im Vergleich zu den technischen Prozessen kann durch die Anwendung von HFIP als in-situ Extraktionsmittel die Ausbeute um 45 – 70 % gesteigert werden (von 30 – 55 % auf > 99 %) und die Reaktionstemperatur

kann durch das Reaktionssystem mit HCl als Katalysator um 50 – 100 °C gesenkt werden (von 150 – 200 °C auf 100 °C). In Abbildung 50 ist der Einfluss der Xylose-Ausgangskonzentration auf die Ausbeute dargestellt.

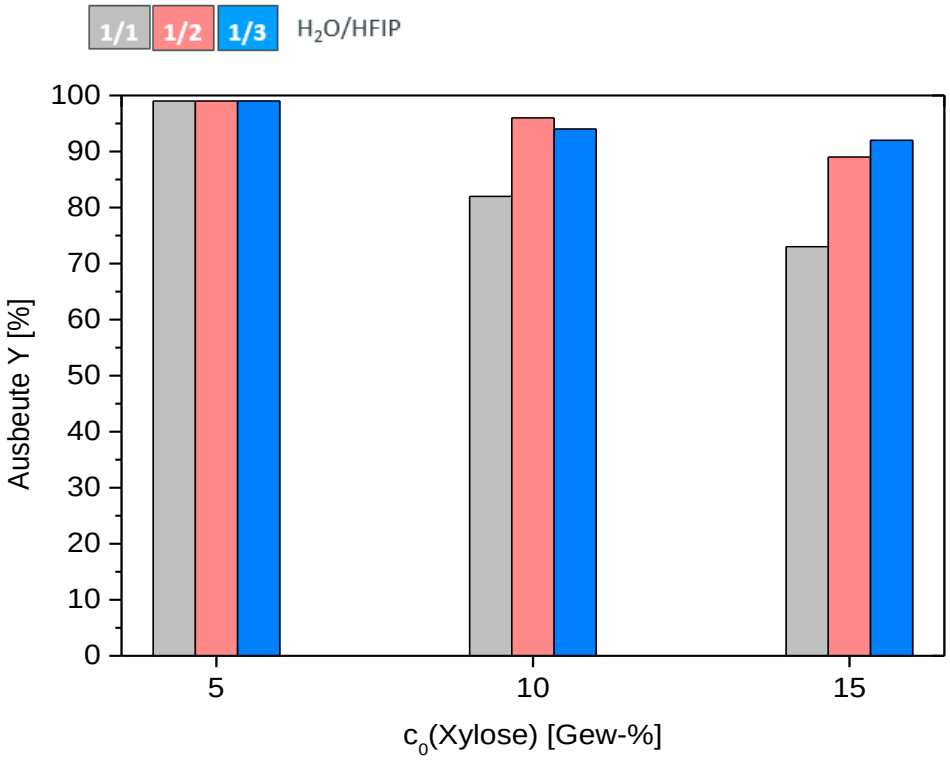


Abbildung 50: Die Ausbeute an Furfural für 5, 10 und 15 Gew-% Xyloseausgangskonzentration und die Abhängigkeit von der Menge des Extraktionsmittels (6 M HCl, 100 °C).

Für eine Xylose-Ausgangskonzentration von 5 Gew-% ist die Ausbeute > 99 %, wenn der Anteil des Extraktionsmittels mindestens 50 % beträgt. Wird die Ausgangskonzentration verdoppelt, sinkt die Ausbeute unter 85 %, wird sie verdreifacht sogar unter 75 % für ein Lösemittelverhältnis von H_2O/HFIP = 1/1 (V/V). Durch Erhöhung des Anteils an Extraktionsmittel können auch für hohe Substratkonzentrationen sehr gute Ausbeuten erreicht werden. Für 10 Gew-% Xylose ist eine Ausbeute oberhalb von 95 % und für 15 Gew-% Xylose eine Ausbeute von über 90 % möglich.

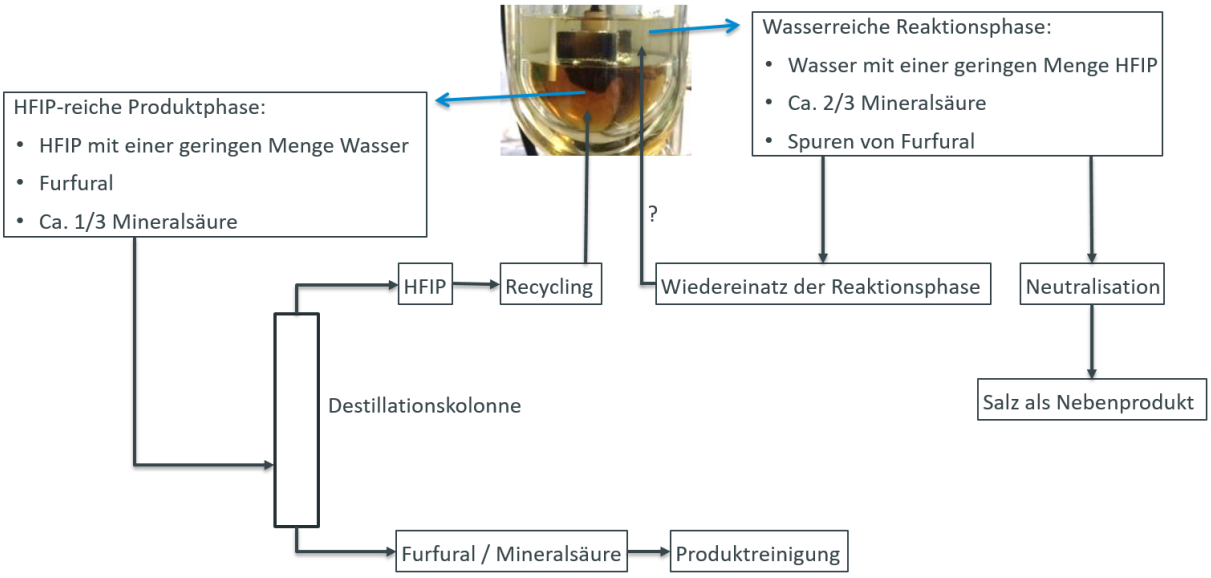


Abbildung 51: Schema zur Wiederverwenudung der Phasen im Zweiphasensystem Wasser/HFIP; Reaktionsphase (oben), Produktphase (unten).

Auf Grund der klaren Phasengrenze zwischen Wasser und HFIP kann die Produktphase leicht von der Reaktionsphase abgetrennt werden. Die Reaktionsphase besteht aus Wasser mit einem geringen Anteil HFIP, Mineralsäure (Verluste, weil ein Teil in die organische Phase übergeht) und Spuren an Furfural (Abbildung 51).

Die Produktphase kann über eine Destillationskolonne aufgetrennt werden. Dabei ist es möglich, reines HFIP wiederzugewinnen und als Lösemittel für weitere Reaktionen zu nutzen. Furfural kann ebenfalls destillativ von der enthaltenen Mineralsäure getrennt werden, wobei zum Teil ein Furfural-Wasser-Azeotrop und zum anderen Teil reines Furfural isoliert wird. Das Furfural im Furfural-Wasser-Azeotrop kann mit Hilfe von herkömmlichen technischen Methoden gewonnen werden.

Um eine Neutralisation der Reaktionsphase und damit eine erhebliche Menge an Salz zu vermeiden, wurde überprüft, ob ein Wiedereinsatz der Reaktionsphase möglich ist. Dazu wurde die Reaktionsphase erneut mit 5 Gew-% Xylose gespeist und eine HCl-Konzentration von 6 mol/L eingestellt. Die Konzentrationsverläufe für Xylose und Furfural für sechs aufeinanderfolgende Durchgänge sind in Abbildung 52 dargestellt.

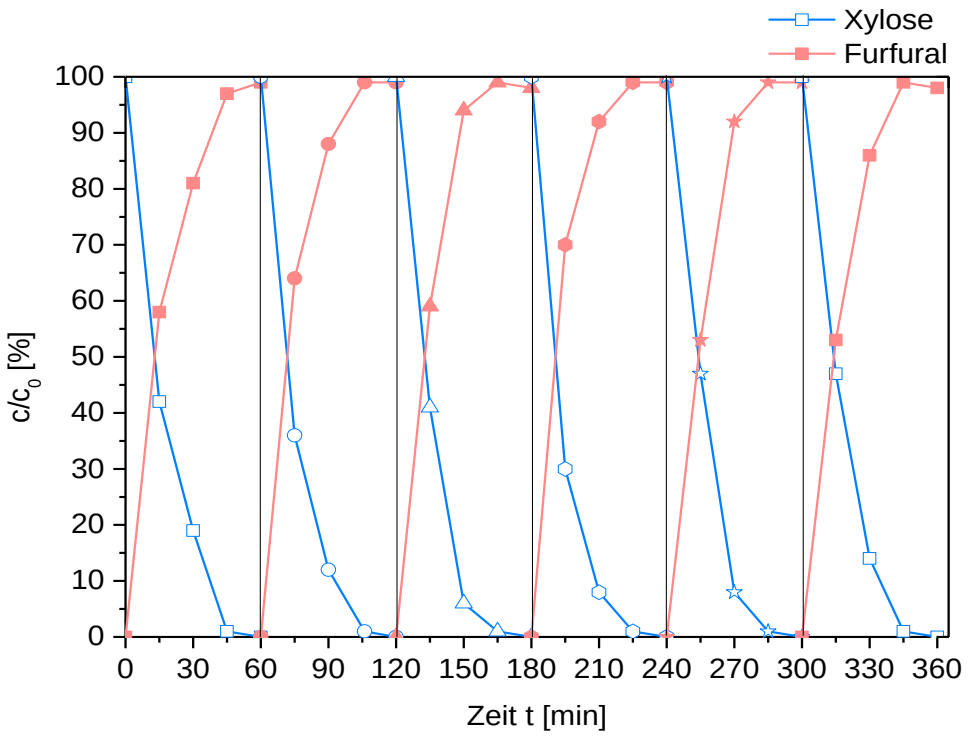


Abbildung 52: Wiedereinsatz der wasserreichen Reaktionsphase unter identischen Reaktionsbedingungen (5 % Xylose, H_2O/HFIP = 1/2 (V/V), 6 M HCl, 120 °C).

Wie in Abbildung 52 zu sehen ist, sind mindestens sechs aufeinanderfolgende Durchgänge ohne Verlust an Ausbeute möglich.

Heteropolysäuren als Katalysatoren

Die Produktphase (vgl. Abbildung 51) besteht aus HFIP mit einem geringen Anteil an Wasser, Furfural und einer geringen Menge an Mineralsäure. Es besteht die Möglichkeit das Furfural destillativ abzutrennen und dann weiterzuverarbeiten. Für einen Eintopfprozess ist es jedoch notwendig, das Furfural in der bestehenden Produktlösung zu oxidieren. Neben dem Einsatz von Mineralsäuren als Katalysator war daher ein weiterer Ansatzpunkt im Projekt, sowohl die Umsetzung von Xylose zu Furfural, als auch die Umsetzung von Furfural zu Maleinsäure (Kapitel 2.3), mit Heteropolysäuren zu katalysieren.

Heteropolysäuren (HPAs) sind auf Grund ihrere chemischen Eigenschaften potentielle Katalysatoren für die säurekatalysierte Wasserabspaltung (Xylose zu Furfural) und für die Oxidationsreaktion von Furfural zu Maleinsäure (vgl. Kapitel 2.3). Für die Umsetzung von Xylose zu Furfural mit HPAs sind höhere Reaktionstemperaturen notwendig, als beim Einsatz von Mineralsäuren. Des Weiteren müssen der Reaktionsmischung Elektrolyte (z.B. Natriumchlorid) beigegeben werden, um eine Phasentrennung zwischen Wasser und HFIP hervorzurufen. In Abbildung 53 sind die Konzentrationsverläufe von Xylose und Furfural unter Einsatz diverser Heteropolysäuren und bei optimierten Reaktionsbedingungen zusammengefasst. Zum Einsatz kamen vier verschiedene Heteropolysäuren im Folgenden als PW

($H_3PW_{12}O_{40}*H_2O$), PMo ($H_3PMo_{12}O_{40}*xH_2O$), SiW ($H_4SiW_{12}O_{40}*xH_2O$) und SiMo ($H_4SiMo_{12}O_{40}*xH_2O$) abgekürzt.

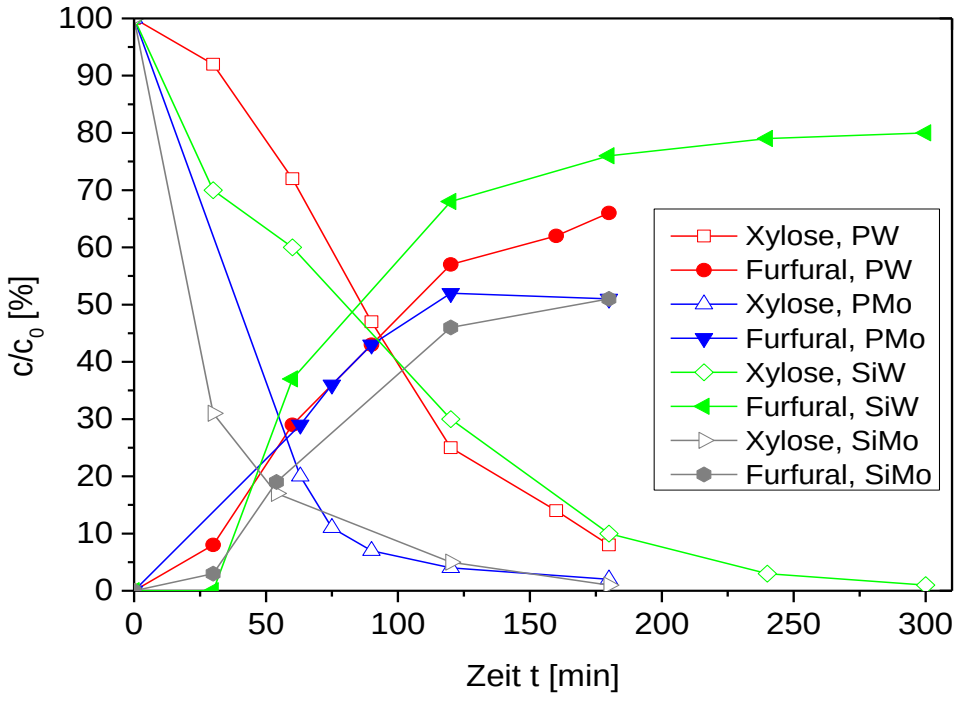


Abbildung 53: Der Konzentrationsverlauf von Xylose und Furfural über der Reaktionszeit bei identischen Reaktionsbedingungen und unter Einsatz von Heteropolysäuren als Katalysator (5 Gew-% Xylose, H_2O/HFIP = 1/2 (V/V) + NaCl (100 g/L bez. auf H_2O), 0,1 mmol Kat, 160 °C, 20 bar N_2).

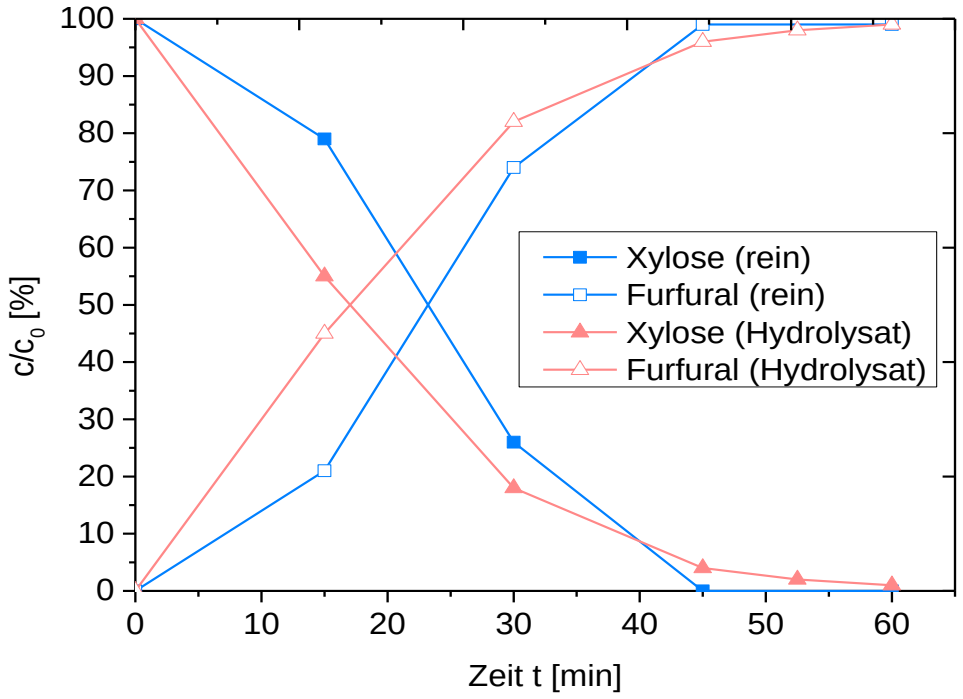
Die Umsatzgeschwindigkeit ist gegenüber Mineralsäuren als Katalysator um den Faktor 4,5 – 9 geringer. Die Ausbeuten liegen im Bereich von 50 – 80 % und sind damit um mindestens 20 % schlechter, als mit Mineralsäuren als Katalysaor. Mit Molybdänhaltigen Heteropolysäuren konnten nur Ausbeuten um die 50 % erreicht werden. Die Wolframhaltigen Heteropolysäuren zeigten die höchste Aktivität zu Furfural. Mit SiW als Katalysator wurde die höchste Furfural-Ausbeute von 80 % erzielt.

Birkenholz-Hemicellulose-Extrakte als Ausgangsmaterial

Im Anschluss wurde überprüft, ob mit HCl als Katalysator auch eine komplette Ausbeute an Furfural erhalten wird, wenn statt reiner Xylose die Extrakte des Projektpartners LUT genutzt werden (Abbildung 54). Für die Umsetzungen wurden die Extrakte mit den höchsten Xylosekonzentrationen gewählt. Das Nanofiltrat mit 71,7 g/L Xylose und das Ultrafiltrat mit 89,4 g/L Xylose (beide nach NREL). Eine detaillierte Zusammenstellung der Inhaltsstoffe liefern Tabelle 12 – Tabelle 15 (Kapitel 1.5.1).

Anhand von Abbildung 54 wird sichtbar, dass die Ausbeute an Furfural identisch bleibt (Y > 99 %), wenn statt reiner Xylose die Extrakte als Ausgangsmaterial genutzt wurden. Die Zeit bis zum vollständigen Umsatz ist um 5 Minuten länger, wenn die Extrakte eingesetzt werden, da teilweise vorhandene Xylanketten noch durch die Salzsäure gespalten werden müssen.

A) Nanofiltrat (71.7 g/L Xylose)



B) Ultrafiltrat (89.4 g/L Xylose)

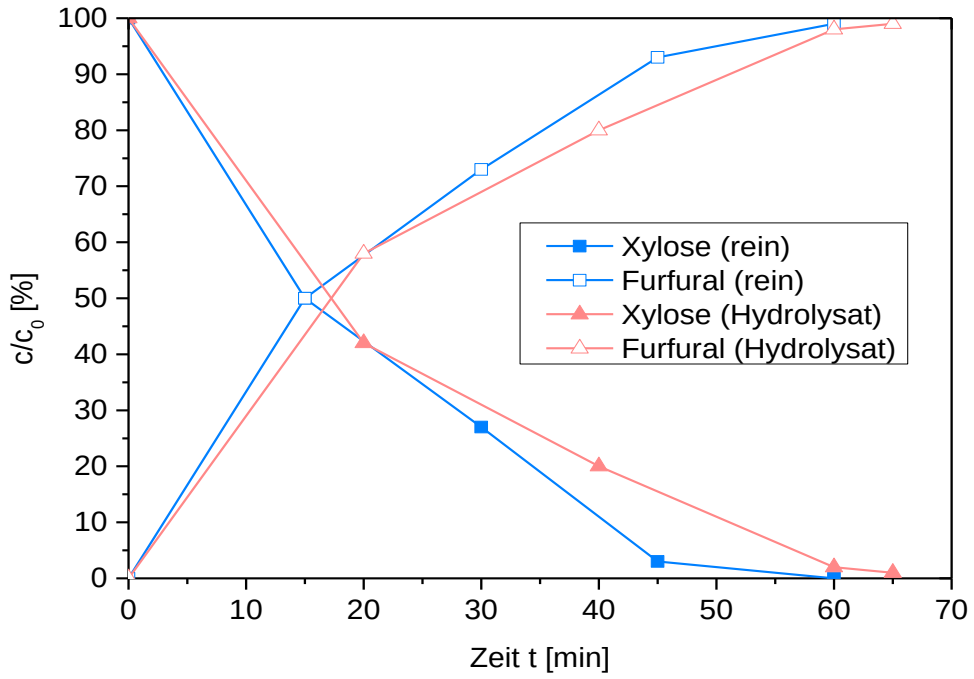


Abbildung 54: Der Konzentrationsverlauf von Xylose und Furfural für das jeweilige Hydrolysat und der Vergleich mit reiner Xylose bei identischen Reaktionsbedingungen (6 M HCl, 100 °C, H_2O/HFIP = 1/1 (V/V)).

Alternative: Wasser/HFIP als Einphasensystem

HFIP ist ein exzellentes in-situ Extraktionsmittel für Furfural aus der wässrigen Phase. In einigen Vorversuchen wurde überprüft, ob die Dehydratisierung der Xylose im einphasigen System Wasser/HFIP auch hohe Ausbeuten bringt. Der Vorteil an diesem System ist, dass eine kontinuierliche Furfuralproduktion

und der Einsatz von heterogenen Katalysatoren möglich ist. Daher wurde für die Tests ein kontinuierlicher Reakor mit einem Katalysatorfestbett genutzt. Als Katalysator diente das Ionenaustauscherharz Lewatit K-2420. Der Umsatz an Xylose und die Selektivität zu Furfural wurden über 24 Stunden hinweg kontrolliert und die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 55 festgehalten.

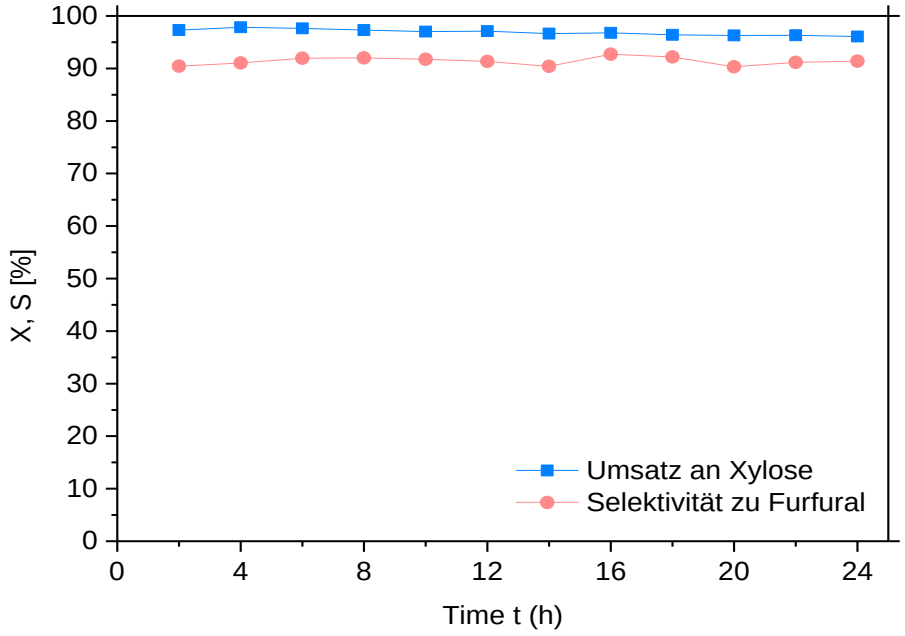


Abbildung 55: Kontinuierliche Produktion von Furfural aus Xylose über eine Dauer von 24 Stunden (1 Gew % Xylose, Lewatit K-2420 als Katalysator-Festbett, HFIP mit 10 % H_2O-Anteil, 120 °C, Verweilzeit: 30 min).

Der Umsatz an Xylose liegt konstant im Bereich von 96 – 98 %. Die Selektivität zu Furfural ist über 24 Stunden Reaktionsdauer hinweg konstant bei 90 – 93 % und zeigt, dass unter den gewählten Bedingungen auch mit festen Säuren gute Ausbeuten bei hoher Katalysatorstabilität erreicht werden können.

2.3 Ergebnisse für die Oxidation von Furfural zu Maleinsäure

Heteropolysäuren als Katalysator

Nachdem die Aktivität der Heteropolysäuren gegenüber dem Reaktionsschritt Xylose zu Furfural überprüft wurde, folgte der Einsatz als Oxidationskatalysator. Wie bei der Dehydratisierung der Xylose, kamen vier verschiedene Heteropolysäuren zum Einsatz. Furfural sollte in einem einphasigen Gemisch aus Wasser und HFIP oxidiert werden, ähnlich der Produktphase aus der Umsetzung von Xylose zu Furfural. Mit dem Unterschied, dass sich zunächst für einen höheren Wasseranteil entschieden wurde, um den wasserlöslichen Katalysator als Lösung zugeben zu können. Bei den Reaktionsbedingungen wurde sich an bereits existierenden Literaturdaten orientiert.[17] Die Ergebnisse sind in Abbildung 56 zusammengefasst.

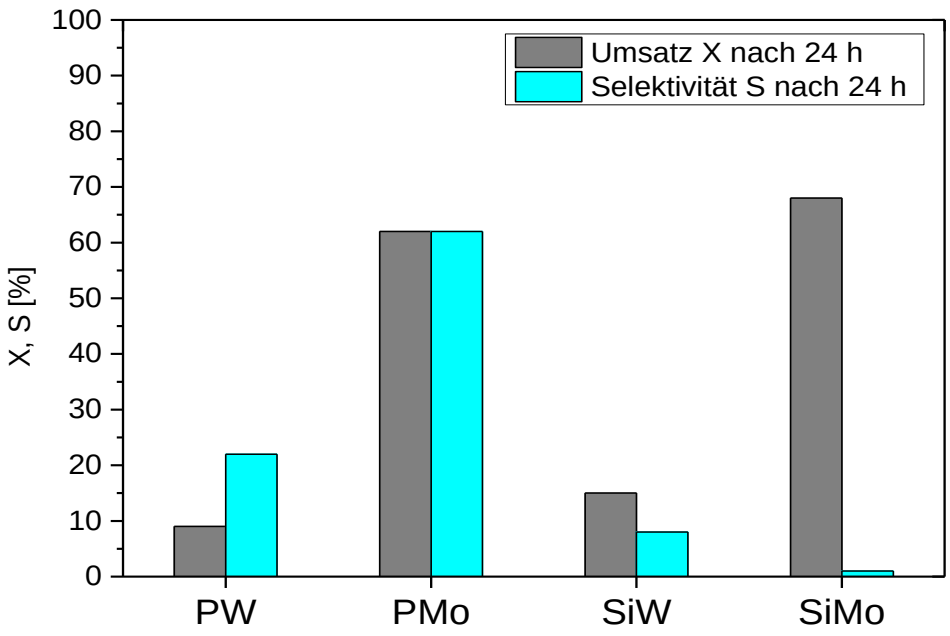


Abbildung 56: Der Umsatz an Furfural und die Selektivität zu Maleinsäure nach 24 Stunden Reaktionszeit unter Einsatz von Heteropolysäuren als Oxidationskatalysator bei identischen Reaktionsbedingungen (2,5 Gew-% Furfural, 10 Mol-% Kat, H_2O/HFIP = 5/2 (V/V), 110 °C, 10 bar O_2).

Ist Wolfram als Übergangsmetall in der HAP enthalten, wird kaum Furfural umgesetzt. Mit PW als Katalysator ist der Umsatz an Furfural niedriger als 10 %, zudem liegt die Selektivität zu Maleinsäure nur knapp oberhalb von 20 %. Als Katalysator für die gewünschte Oxidationsreaktion ist PW daher ungeeignet. Auch mit SiW als Katalysator ist der Umsatz nach 24 Stunden, mit weniger als 20 %, zu gering. Die Selektivität zu Maleinsäure liegt dabei unterhalb von 10 %. Damit ist auch SiW kein geeigneter Katalysator für die gewünschte Oxidationsreaktion.

Mit Molybdän als Übergangsmetall konnten moderate Umsätze erreicht werden. Mit PMo und SiMo als Katalysator lagen die Umsätze im Bereich von 60 – 70 %. SiMo ist dennoch kein geeigneter Katalysator für die Furfuraloxidation zu Maleinsäure, weil die Selektivität lediglich bei 1 % liegt. PMo zeigte die höchste Aktivität zu Maleinsäure. Die Selektivität liegt bei 62 %, was eine Ausbeute von Maleinsäure von 38 % bedeutet. PMo diente für weitere Untersuchungen als Oxidationskatalysator. Durch Änderung der Reaktionsparameter und Modifizierung des Katalysators sollte dabei die Ausbeute gesteigert werden.

Die erste Modifizierung des Katalysators wurde durch den Zusatz von Kupfer(II)-nitrat (CuN) vorgenommen (Tabelle 17). Das ideale Masseverhältnis von PMo zu CuN beträgt 19:1, was einem Molverhältnis von 2:1 entspricht.[18]

Tabelle 17: Umsatz von Furfural und Selektivität zu Maleinsäure unter Einsatz von PMo, CuN oder einer Mischung von Beiden als Katalysator unter variierenden Reaktionsbedingungen (2,5 Gew % Furfural, 10 Mol-% Kat, 110 °C, 10 bar O_2, 24 h).

Katalysator (Molverhältnis)	Lösemittelverhältnis H_2O/HFIP (V/V)	Umsatz [%]	Selektivität [%]	Ausbeute [%]
PMo	5/2	62	62	38
CuN (5.5 Mol-%)	5/2	41	38	15
CuN (5.5 Mol-%)	3/7	12	96	12
PMo/CuN (2:1)	5/2	59	66	39
PMo/CuN (2:1)	3/7	19	58	11
PMo/CuN (2:1)	1/0	97	44	43
PMo/CuN (1:1) (28 h)	5/2	56	78	44
(70 h)		96	41	39

Eine signifikante Ausbeutesteigerung konnte durch den Zusatz von Kupfer(II)-nitrat nicht erreicht werden. Dabei wurde auch das Lösemittelverhältnis und das Verhältnis an PMo und CuN variiert. Mit steigendem HFIP-Anteil nimmt die Umsatzgeschwindigkeit deutlich ab, so dass keine moderaten Umsätze innerhalb von 24 Stunden erreicht werden konnten. Die Erhöhung des CuN-Anteils auf 50 Mol-% führt, für Umsätze im Bereich von 60 %, zu einer Steigerung der Selektivität um mehr als 10 %, auf insgesamt 78 %. Allerdings nimmt die Selektivität bei höher werdenden Umsätzen wieder ab, so dass bei annähernd vollständigem Umsatz die Ausbeute wiederum im Bereich von 40 % liegt. Die bisher höchste Ausbeute von 44 % ist nicht ausreichend für einen technischen Prozess. Neben Maleinsäure wird hauptsächlich Ameisensäure gebildet. Des Weiteren konnte Fumarsäure, als Isomer der Maleinsäure, detektiert werden. Das Produktgemisch aus der Reaktion mit PMo/CuN (1:1) (70 h) (Tabelle 17) ist wie folgt zusammengesetzt: 4 % Furfural, 4 % Fumarsäure, 39 % Maleinsäure, ca. 50 % Ameisensäure). Die Konzentration der Nebenprodukte nimmt dabei, wie die der Maleinsäure auch, kontinuierlich über die Reaktionsdauer zu. Es konnten keine Zwischenstufen detektiert werden.

Reines CuN als Katalysator zeigte die bisher höchste Selektivität zu Maleinsäure (S = 96 %), allerdings bei sehr niedrigen Umsätzen im Bereich von 10 % (Tabelle 17). Die Ausbeute liegt dabei unabhängig vom HFIP-Anteil im Bereich von 12 – 15 %. Durch Temperatur- und Druckerhöhung sollte eine schnellere Umsatzgeschwindigkeit erreicht werden, optimalerweise bei gleichbleibender Maleinsäure-Selektivität oberhalb von 90 % (Abbildung 57).

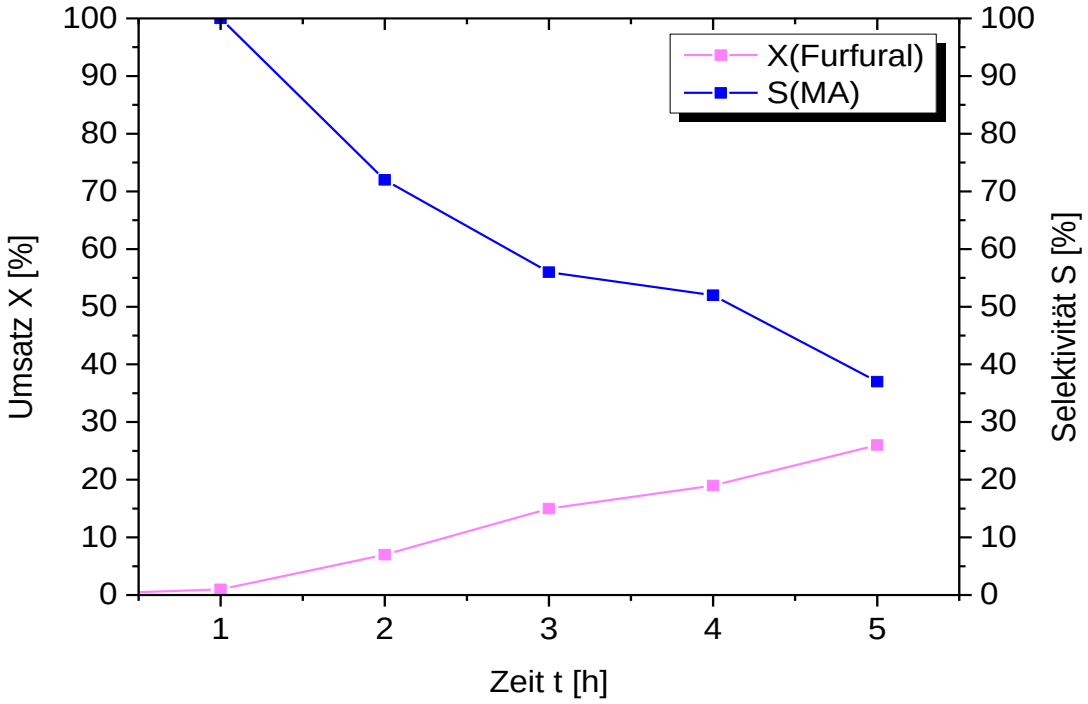


Abbildung 57: Umsatz an Furfural und Selektivität zu Maleinsäure bei höherer Temperatur und höherem Sauerstoffdruck mit reinem Kupfer(II)-nitrat als Katalysator (2,5 Gew-% Furfural, 5.5 Mol-% Kat, H_2O/HFIP = 3/7 (V/V), 140 °C, 20 bar O_2).

Anhand von Abbildung 57 wird deutlich, dass die Selektivität zu Maleinsäure mit steigendem Furfural-Umsatz rasch absinkt. Die Ausbeute liegt dadurch konstant im Bereich von 10 %. Reines CuN ist daher kein geeigneter Katalysator für die Oxidation von Furfural zu Maleinsäure.

Eine weitere Möglichkeit die Umsatzgeschwindigkeit zu erhöhen ist die Erhöhung des Oxidationspotenzials von PMo durch das Einbringen von Vanadium in den Katalysator. Daher wurde die katalytische Aktivität von $H_4PVMo_{11}O_{40}$*xH_2O ($PVMo_{11}$) und $H_4PV_2Mo_{10}O_{40}$*xH_2O (PV_2Mo_{10}) untersucht (Tabelle 18).

Tabelle 18: Der Einsatz van Vanadiumhaltigen Heteropolysäuren als Oxidationskatalysator für die Umsetzung von Furfural zu Maleinsäure (2,5 Gew-% Furfural, 10 Mol-% Kat, 110 °C, 10 bar O_2).

Katalysator	Lösemittel (V/V)	Zeit [h]	Umsatz [%]	Selektivität [%]	Ausbeute [%]
$PVMo_{11}$	H_2O	24	> 99	15	15
$PVMo_{11}$	H_2O/HFIP = 5/2	3	> 99	12	12
$PVMo_{11}$	H_2O/HFIP = 3/7	2	18	0	0
PV_2Mo_{10}	H_2O	1	> 99	6	6
PV_2Mo_{10}	H_2O/HFIP = 5/2	2	> 99	8	8
PV_2Mo_{10}	H_2O/HFIP = 3/7	1	7	0	0

Mit der Einbringung von Vanadium in die Heteropolysäuren findet ein vollständiger Umsatz an Furfural innerhalb von wenigen Stunden statt. Die Ausbeute an Maleinsäure nimmt im Vergleich zu reinen PMo als Katalysator allerdings deutlich ab. Dabei gilt, je höher der Anteil an Vanadium ist, umso geringer ist die Ausbeute. Wenn der Anteil an HFIP den Wasseranteil überwiegt sinkt die Umsatzgeschwindigkeit drastisch ab, ohne dass Maleinsäure detektiert werden konnte. Durch das Vanadium im Katalysator werden kaum noch C2 – C4 Verbindungen gebildet. Der überwiegende Teil wird auch hier zu Ameisensäure oxidiert (ca. 90 %).

Durch die Absenkung der Reaktionstemperatur auf 80 °C sollte die Selektivität zu Maleinsäure mit $PVMo_{11}$ als Katalysator erhöht werden, da ggf. weniger C-C-Bindungen gebrochen werden. Durch die Erhöhung des Sauerstoff-Drucks auf 20 bar sollte ein moderater Umsatz innerhalb von 4 Stunden Reaktionszeit erhalten werden. Die Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 58 dargestellt.

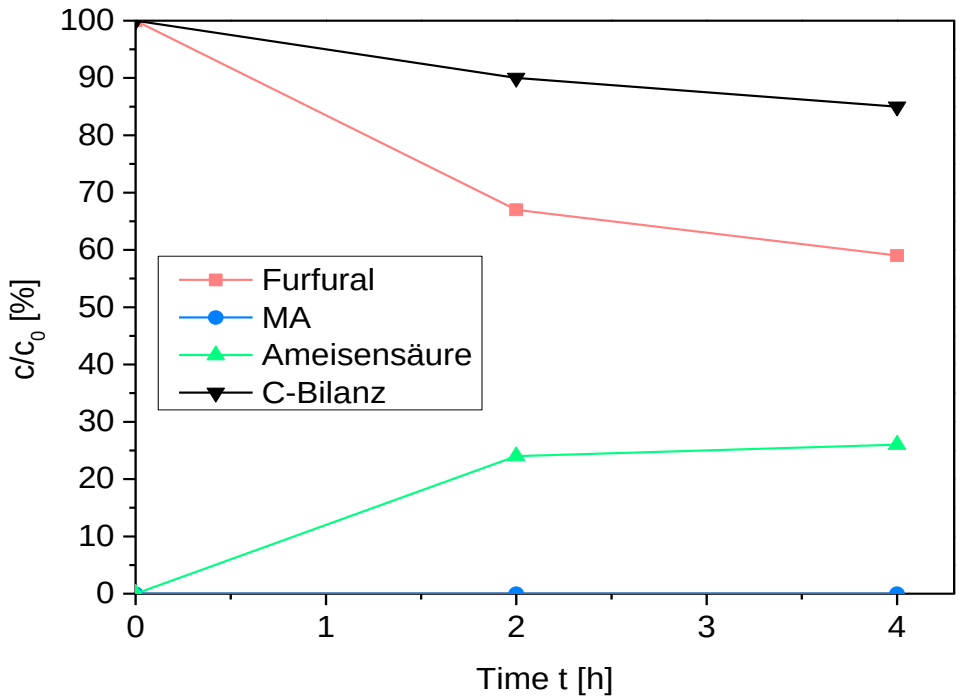


Abbildung 58: Umsatz an Furfural und Selektivität zu Maleinsäure mit $H_4PVMo_{11}O_{40}$*xH_2O als Katalysator bei niedrigerer Reaktionstemperatur und höherem Sauerstoffdruck (2,5 Gew-% Furfural, H_2O/HFIP = 5/2 (V/V), 80 °C, 20 bar O_2).

Anhand von Abbildung 58 wird deutlich, dass trotz niedrigerer Temperatur keine organischen C4-Säuren und somit keine Maleinsäure bzw. Fumarsäure gebildet werden. Auch in diesem Fall ist das Hauptprodukt Ameisensäure (S = 64 %). Bei einem Furfural-Umsatz von 41 % entspricht das einer Ausbeute von 26 %. In der C-Bilanz fehlen 15 %. Weitere Nebenprodukte konnten jedoch nicht identifiziert werden. Die Konzentration der Ameisensäure nimmt über den Reaktionsverlauf hinweg kontinuierlich zu. Zwischenprodukte konnten keine detektiert werden.

Da keine Heteropolysäure als geeigneter Oxidationskatalysator ermittelt werden konnte, wurde die Aktivität des besten bisher publizierten Katalysators für die Umsetzung von Furfural zu Maleinsäure Mo_4VO_{14} für das System H_2O/HFIP überprüft (Tabelle 19).[20]

Tabelle 19: Mo_4VO_{14} als möglicher Katalysator für die Oxidation von Furfural zu Maleinsäure (200 mmol/L Furfural, 6,6 g/L Kat, 100 °C, 20 bar O_2).

Lösemittel (V/V)	Zeit [h]	Umsatz [%]	Selektivität [%]	Ausbeute [%]
HFIP	4	32	0	0
H_2O/HFIP = 3/7	5	6	0	0

Anhand von Tabelle 19 wird deutlich, das Mo_4VO_{14} weder im System HFIP, noch im System H_2O/HFIP Aktivität zu Maleinsäure aufweist. Mit steigendem Wasseranteil nimmt die Umsatzgeschwindigkeit jedoch drastisch ab.

2.4 Ergebnisse für die Eintopfsynthese von Xylose zu Maleinsäure

Eine Zusammenführung von zwei optimierten Einzelreaktionsschritten ist nicht möglich, da für die Umsetzung von Furfural zu Maleinsäure kein geeignetes System gefunden werden konnte. Stattdessen wurde überprüft, ob es möglich ist, Xylose in einem Topf direkt zu Maleinsäure umzusetzen. Die Idee dahinter war, dass der Reaktor von Beginn an einen erhöhten Sauerstoffdruck aufweist, damit das gebildete Furfural sofort oxidiert werden kann. Als Katalysator kamen dafür die Phosphor-haltigen Heteropolysäuren, die eine Aktivität zu Maleinsäure zeigten und Kupfer(II)-nitrat im Einphasensystem Wasser oder Wasser/HFIP zum Einsatz (vgl. Kapitel 2.3). Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Der Xylose-Umsatz und die Ausbeute an Furfural und Maleinsäure bei Durchführung der Reaktion von Xylose zu Maleinsäure in einem Topf mit Heteropolysäuren oder Kupfer(II)-nitrat als Katalysator (5 Gew-% Xylose, 1 Gew-% Kat, 160 °C, 20 bar O_2).

Katalysator	Lösemittel (V/V)	Zeit [h]	Umsatz [%]	Ausbeute Furfural [%]	Ausbeute MA [%]
CuN	H_2O	2	> 99	0	0
PW	H_2O	5	> 98	1	1
PMo	H_2O	2	> 99	0	0
PMo	H_2O/HFIP = 1/1	2	> 99	0	1

In reinem Wasser zeigte über 2 – 5 Stunden Reaktionszeit hinweg keiner der getesteten Katalysatoren eine Aktivität zu Furfural oder Maleinsäure, wobei vollständige Xylose-Umsätze erreicht wurden. Die Ausbeute lag in allen Fällen unterhalb von 2 %. In Wasser/HFIP mit PMo als Katalysator konnte keine Ausbeutesteigerung erzielt werden. Die Maleinsäure-Ausbeute lag auch mit diesem Lösemittelsystem über den kompletten Reaktionsverlauf hinweg, bis hin zum vollständigen Umsatz von Xylose, unterhalb von 1 %. Furfural konnte nicht detektiert werden. Das Hauptprodukt ist wiederum Ameisensäure (70 – 80 %). In Wasser ist die Aktivität zu Fumarsäure gering (< 3 %). In Wasser/HFIP konnten 8 % Fumarsäure detektiert werden. Zusätzlich zu den vorherigen Reaktionen wird bei der Eintopfsynthese aller Voraussicht nach auch Essigsäure als Nebenprodukt gebildet. In Wasser betrug die Ausbeute 25 %, in Wasser/HFIP 15 %. Die Konzentration der Nebenprodukte nimmt über den Reaktionsverlauf hinweg kontinuierlich zu. Es konnten keine Zwischenprodukte detektiert werden.

3. Ergebnisse der Projektpartner

3.1 Bericht von Edinburgh Napier University (AP1 & AP5)

Im AP1 wurde die Verfügbarkeit von Rohstoffen (wenig genutzte Holzspezies und Waldteile) abgebildet, die sich für die Abtrennung von Hemicellulose eignen. Es hat sich herausgestellt, dass nicht genügend Holzarten, insbesondere Hartholz, für die Separation von Hemicellulose zur Verfügung stehen. Eine Möglichkeit für produzierende Unternehmen ist die Zusammenarbeit mit Sägewerken, Eine Studie über mögliche Endanwendungen für Hemicellulose zeigte mehrere Alternativen auf. Der aktuelle Markt für Hemicellulose ist sehr breit. Er repräsentiert eine Reihe von Geschäftsmöglichkeiten in verschiedenen

Bereichen der Technologie, von Lebensmitteln bis hin zu Arzneimitteln, Verpackungen und Feinchemikalien. Die Preisspanne für Hemicellulose ist daher breit gefächert.

Der zusätzliche Vorteil den eine Hemicellulose-Extraktion mit sich bringt, ist die Verbesserung der Brennstoffpellet-Qualität. Unsere Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass durch die Extraktion der Hemicellulose vor dem Pelletieren die Qualität zunimmt. Aus technisch-wirtschaftlichen Gründen ist eine Extraktion alleine zwar nicht sinnvoll, aber kombiniert mit einem Pelletbetrieb bestünde die Möglichkeit zusätzlich zu Brennstoffpellets, Mehrwert-Hemicellulose-Produkte anzubieten. Die Verfügbarkeit von Rohstoffen ist entscheidend für eine Implementierung von Hemicellulose-Extraktionsanlagen. Ein mögliches Szenario ist, dass mehrere HC-Extraktion-Einrichtungen im kleineren Maßstab, eine größere Down-Stream-Manufaktur füttern. Diese alternative Arbeitsweise bedarf jedoch weiterer Forschung.

3.2 Bericht der Lappeenranta University of Technology (AP2)

Im AP2 wurde die Extraktion von Birkenchips durch zwei Projektpartner (LUT und RISE (ehemals Innventia)) untersucht. Für die Extraktionen wurden verschiedene Temperaturen (110 – 160 °C) und Zeiten (1 – 28 h) verwendet, um Hemicellulose und niedermolekulare Kohlenhydrate zu gewinnen. Die Hemicellulose wurde durch Membranfiltration gereinigt und in der Produktion von Verpackungsfolien getestet (Xylophane in Schweden). Die Hemicellulose-Konzentrate wurden hydrolysiert, gereinigt und schließlich vom Thünen-Institut für Fermentations- und chemische Prozesse genutzt.

Zuerst wurde angenommen, dass eine hohe Temperatur bei der Fraktionierung und Reinigung von Extrakten aufgrund geringerer Membranverschmutzung vorteilhaft wäre. Daher war es ein Ziel herauszufinden, wie lange das Extrakt ohne signifikante Änderung der Zusammensetzung erhitzt werden kann, wenn sowohl die Gewinnung, als auch die Separation der Hemicellulose bei hoher Temperatur erfolgt.

Die wichtigste Schlussfolgerung aus den Resultaten ist, dass bei einer Temperatur von 120 °C keine nennenswerte Zersetzung der Hemicellulose beobachtet werden konnte, während bei 160 °C deutliche Veränderungen auftraten. Eine sichere Verarbeitung des Extraktes bei 120 °C kann daher für mehrere Stunden gewehrleistet werden. Jedoch zeigten weitere Filtrationsexperimente mit Keramik-Membranen bei hohen Temperaturen (120 – 150 °C) keine Vorteile im Vergleich zu Temperaturen unter 100 °C. Soweit die Autoren es beurteilen können, wurde bei den hier präsentierten Ergebnissen erstmals eine Temperatur über 100 °C für die Filtration von Holz-Hydrolysaten angewendet.

In den Filtrationsexperimenten erhöhte sich die reine Wasserpermeabilität der Membran mit der Abnahme der Viskosität bei steigender Temperatur, was zeigt, dass die verwendete Membran und die verwendete Ausrüstung, wie angenommen, bei hohen Temperaturen funktioniert. Aber entgegen der Annahme erhöht sich die Permeabilität bei den Birkenchips nicht mit steigender Temperatur. Wenn die Filtration bei 150 °C durchgeführt wurde, verschmutzte die Membran so stark das eine intensive Reinigung notwendig wurde, um die Kapazität wiederherzustellen. Die Retention von Lignin (UV-absorbierende Verbindungen) und TOC sank ebenfalls signifikant mit der Filtrationstemperatur. Daher ist die Annahme, dass die Membran weniger verschmutzt, wenn die Filtrationstemperatur nahe der Extraktionstemperatur liegt, falsch. Dies ist ein wichtiger Befund, der das Design eines Rückgewinnungsprozesses für Hemicellulose in Holzhydolysaten beeinflusst.

Bei den Fermentationsexperimenten mit den konzentrierten Holzhydrolysatproben wurde deutlich, dass die am meisten störende Komponente Essigsäure ist. Weitere Experimente wurden deshalb danach ausgerichtet, Bedingungen zu finden, wo im Fermentationsschritt so wenig Essigsäure wie möglich gebildet wird. Auf der Grundlage der bisherigen Ergebnisse (finnische Förderperiode läuft noch) kann festgehalten werden, das eine Extraktion bei 100 °C oder 110 °C nicht möglich ist, da dann die Ausbeute an Kohlenhydraten zu gering ist. Nach der 28-stündigen Extraktion der Birkenchips bei 100 °C betrug der Brix-Wert, der den trockenen Feststoffgehalt des Extraktes darstellt, nur 0,5. Nach der entsprechenden Extraktion bei 110 °C betrug der Brix-Wert 1,0. Die Analyse und Auswertung der Ergebnisse aus den Extraktions- und Filtrationsexperimenten, wo die Extraktion bei Temperaturen zwischen 120 °C und 140 °C durchgeführt wurde, ist aktuell im Gange und die Ergebnisse werden noch im Sommer 2017 verfügbar sein.

3.3 Bericht von Innventia/RISE (AP2 & AP4)

Die Aktivitäten bei RISE, vorher Innventia, konzentrierten sich im Projekt auf die Auto-Hydrolyse von Birkenholzspäne und die Ultrafiltration von Hydrolysaten. Die Zusammenarbeit mit der LUT, deren Forscher unser Institut in Stockholm besichtigten und hier einen Teil der Arbeiten vollzogen, war ein wichtiger Teil des Projektes. Die Vorversuche hatten zwei Ziele: Zum ersten Bedingungen während der Auto-Hydrolyse zu finden, wo anschließend eine möglichst hohe Ausbeute an hochmolekularer Hemicellulose im Hydrolysat zu finden ist. Zweitens, die Schritte der Autohydrolyse und der Separation der Hemicellulose durch Ultrafiltration zu vereinigen, unter Anwendung erhöhter Temperaturen, mit oder ohne Abkühlung des Hydrolysates. Die

Experimente wurden im 2 kg und 30 kg Maßstab durchgeführt. Die Versuche im kleineren Maßstab dienten zum Screening von Prozessbedingungen und die im größeren Maßstab zur Herstellung von Hydrolysaten, die für die Herstellung von den Verpackungsfolien verwendet werden sollten. Für die Ansätze im großen Maßstab wurden zwei verschiedene Temperaturen für die Autohydrolyse genutzt und für eine dieser Temperaturen wurde ein zusätzlicher Versuch mit einem Puffer durchgeführt. Der Puffer sollte die Geschwindigkeit, mit der die hochmolekulare Hemicellulose abgebaut wird, verringern. Die Ultrafiltration, wurde im Gegensatz zu den Vorversuchen, unter Atmosphärendruck durchgeführt; LUT hat aufgezeigt, dass der Permeationsfluss vergleichbar oder höher ist, wenn, gleichzeitig zu einer unter Druck stehenden Anlage für die Ultrafiltration, eine Temperatur unter 100 °C angewendet wird. Die Hydrolysate wurden von Xylophane, mittlerweile Seelution, für die Bildung und Auswertung der Verpackungsfolien genutzt.

3.4 Bericht von Xylophane/Seelution (AP4)

Ziel der Studie war es, zu untersuchen, ob sich die Holzhydrolysat-Proben als potenzielles Ausgangsmaterial für Verpackungsfolien eignen, deren Anwendungen von Xylophane entwickelt wurden.
Wir erhielten drei eingefrorene flüssige Proben: “160 °C hydrolysate”, “160 °C buffered hydrolysate” und “140 °C hydrolyate”. Die Proben wurden aufgetaut und gerührt, danach der Feststoffanteil gemessen. Die Viskosität wurde bei Raumtemperatur mit einem Brookfield-Instrument bestimmt.
Freie Folienfilme wurden gegossen und in RH 50 % / 23 °C über Nacht getrocknet. Zunächst sollten Folien ohne Zusatz von Weichmachern gegossen werden. Da keine der erzeugten Proben Folienfilme bildete wurden anschließend Mischungen mit Weichmachern hergestellt.
Wenn möglich wurde die Sauerstoffübertragungsrate (OTR) an den freien Folienfilmen gemessen und die mechanischen Eigenschaften durch visuelle Inspektion bzw. wenn durchführbar Zugversuche beurteilt. Arabinoxylan (AX), von Xylophane aus Gerstehülsen extrahiert, wurde als Referenz verwendet.
Die “160 °C hydrolysate”-Probe zeigte sehr schlechte Filmbildungseigenschaften, während die “160 °C buffered hydrolysate”- und “140 °C hydrolysate”-Probe mit den Weichmachern Folienfilme bildeten. An den freien Filmen von der “160 °C buffered hydrolysate”-Probe wurden niedrige OTR-Werte festgestellt. Im Vergleich zu der Arabinoxylan-Referenz allerdings, waren beide Folienfilme sehr brüchig, was sie zu einer weniger attraktiven Alternative für Verpackungsfolien macht.

4. Technologie- und Wirtschaftlichkeitsbetrachtung

Die Technologie- und Wirtschaftlichkeitsbetrachtung der biotechnischen Konversion zu 2,3-Butandiol (2,3-BDO) als Ausgangsstoff zur Herstellung des Lösemittels Methylethylketon (MEK) und die chemo-katalytische Konversion zu Furfural und weiter zu Maleinsäure wurde in das Gesamtprojekt integriert und zusammen mit den Projektpartnern Edinburgh Napier University (ENU, Federführung) und Lappeenranta University of Technology (LUT) erarbeitet. Die Daten sind im Bericht ENU/LUT/TI/10073 der Edinburgh Napier University detaillierter aufgeführt.

Rohstoff Hemicellulose

Ausgangspunkt ist die Verwendung von Holz in Form von Holzschnitzeln bzw. Sägespänen. Nach Extraktion der Hemicellulosefraktion entsprechend der erarbeiteten Verfahrensweise von LUT wird der Rest des Holzes zu Holzpellets gepresst, die als Heizmaterial verwendet werden. Nach der Extraktion kann der Hemicellulose-abgereicherte Holzrest besser zu Pellets gepresst werden als das Originalholz und weist zudem einen höheren Heizwert auf.

Für die Technologie- und Wirtschaftlichkeitsbetrachtung wurden exemplarisch Anlagengrößen von 5.000 und 12.500 t/a zu prozessierendes Holz betrachtet (Spanne typischer Anlagengrößen in Großbritannien). In der 12.500 t/a-Anlage ist es möglich, Hemicellulose profitabel mit einem Verkaufspreis von 500 €/t zu produzieren (Herstellungskosten ca. 450 €/t). In einer 5.000 t/a-Anlage kann Hemicellulose für einen Verkaufspreis von 500 €/t nicht profitabel produziert werden.

2,3-Butandiol und Methylethylketon

Die Nutzung der Hemicellulose zur biotechnischen Herstellung von 2,3-BDO und der weiteren Herstellung von MEK, dessen Preis als Petrochemikalie bei etwa 1.500 €/t liegt, zeigt, dass allein aufgrund der Rohstoffkosten und der Ausbeuten der Schritte Hemicellulose/Xylose zu 2,3-BDO (Ausbeute ca. 0,45 g/g) und 2,3-BDO zu MEK (Ausbeute laut Literatur bis zu 80 %, Faktor der Gewichtsreduktion 0,87) derzeit keine zu diesem Preis konkurrenzfähige Prozessoption in Aussicht steht. Hierzu bedürfte es einer Reduktion der Hemicellulosekosten auf < 250 €/t.

Gelänge dies, wäre die Verwendung des im Projekt entdeckten und charakterisierten Mikroorganismus *Bacillus vallismortis* für die fermentative Herstellung von 2,3-BDO aus technologischer Sicht sicher die beste Option.

Furfural und Maleinsäure

Für die Herstellung von Furfural (Preis ca. 1.500 – 1.800 €/t) besteht jedoch unter der Voraussetzung einer – bislang noch nicht hinreichend bilanzierten – sehr hohen Recyclingquote von HFIP und einer kostengünstigeren Herstellung von HFIP sehr wohl eine gute Perspektive für einen wirtschaftlichen Prozess, da durch das entwickelte Verfahren sehr hohe Furfural-Ausbeuten von 90 bis >99 % erreichbar sind. Die Verwendung von Furfural zur Herstellung von Maleinsäure (Preis ca. 1.500 – 2.000 €/t) liefert auf dem im Projekt untersuchten Weg mit rund 40 % zu geringe Ausbeuten, um diese Prozessroute in Betracht ziehen zu können.

Hier besteht jedoch die Möglichkeit auf den seit den 1930er Jahren bekannten Gasphasenoxidationsprozess der Furfuraloxidation zu Maleinsäure bzw. Maleinsäureanhydrid (MSA) zurückzugreifen, in dem Ausbeuten um 70 % beschrieben werden. Eine Kombination des entwickelten Verfahrens der Furfuralherstellung mit einer Selektivoxidation zu MSA in der Gasphase erscheint auch ökonomisch attraktiv.

5. Verwertung

Im Rahmen des Screenings nach einem geeigneten Stamm zur biotechnischen Produktion von 2,3-BDO mit Xylose wurden viele neue Stämme gefunden. Die guten Ergebnisse erweitern die potentielle Produktionsmöglichkeit von 2,3-BDO auf verschiedenen Reststoffen durch die große Vielfalt der unterschiedlichen Stämme. Unter den neu entdeckten Stämmen erwiesen sich drei der Stämme als sehr aussichtsreich, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis* und *B. vallismortis*. Während dieses Projektes ist *B. vallismortis* aufgrund seines breiten Substratspektrums, der hohen Toleranz gegenüber hohen Substratstartkonzentrationen, der Unempfindlichkeit gegenüber Hemmstoffen, seines geringen Anspruchs ans Medium und seiner hohen Produktivität am aussichtsreichsten für eine mögliche industrielle Umsetzung.

Ein neues Forschungsprojekt mit interessierten Industriefirmen, welches sich mit der 2,3 Butandiol-Produktion beschäftigt scheint aussichtsreich, da eine Vielfalt an bisher nicht bekannten 2,3-BDO Produzenten entdeckt wurden, aber im Rahmen dieses Projektes nicht ausreichend erforscht werden konnten. Unterschiede im Substratspektrum, der Temperatur, im pH-Bereich und im Verhalten gegenüber Hemmstoffen ergeben je nach Verfahrensanspruch neue Möglichkeiten für neue Forschungsprojekte.

Die Herstellung von Furfural aus Xylose im Zweiphasensystem wurde für den Labormaßstab optimiert und ist aussichtsreich, weiter untersucht und im Maßstab vergrößert zu werden. Die Maßstabsvergrößerung muss mit einem Industriepartner geschehen, wobei eine Bilanzierung der HFIP-Rückgewinnung und eine Ökobilanz des gesamten Pozesses, ggf. unter Berücksichtigung der direkten Weiterverarbeitung des Furfurals, durchgeführt werden muss.

Die gewonnenen Erkenntnisse sollen international publiziert werden, um die wissenschaftlichen Community Einblick in die Ergebnisse zu ermöglichen und Anregungen für weiterführende wissenschaftlich/technische Untersuchungen zu geben.

6. Erkenntnisse von Dritten

L.X. Li, K. Li, K. Wang, C. Chen, C. Gao, C.Q. Ma, P. Xu, *Bioresource Technol*, 2014, 170, 256-261.

> *Bacillus licheniformis*-Stamm X10 produziert mit einem Lignocellulose-Hydrolysat (Maisstroh) in einer Fed-Batch-Fermentation 74 g/L 2,3-BDO mit einer Produktivität von 2,1 g/(Lh) und einer Ausbeute von 94,6 %.

A.M. Białkowska, E. Gromek, J. Krysiak, B. Sikora, H. Kalinowska, M. Jędrzejczak-Krzepkowska, C. Kubik, S. Lang, F. Schütt, M. Turkiewicz, *J Ind Microbiol Biot*, **2015**, 42, 1609-1621.

> *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059 produziert mit einem apple-pomace-Hydrolysat während einer Fed-Batch-Fermentationen nach 160 h 87,71 g/L 2,3-BD (Hydrolysat- und Glucose-Mischung und unter Zufütterung reiner Glucose).

J.Y. Dai, P. Zhao, X.L. Cheng, Z.L. Xiu, *Appl Biochem Biotech*, **2015,** 175, 3014-3024.

> *Enterobacter cloacae* (Riskoklasse 2 Stamm, Mutante) produziert in der Fed-Batch Verfahrensweise 99,5 g/L 2,3-BDO und Acetoin nach 60 h mit einer Ausbeute von 0,39 g/g_{Zucker}.

L. Li, K. Li, Y. Wang, C. Chen, Y. Xu, L. Zhang, B. Han, C. Gao, F. Tao, C. Ma, P. Xu, *Metab Eng*, **2015,** 28, 19-27.

Enterobacter cloacae-Stamm SDM (Riskoklasse 2 Stamm, Mutante) wurde mittels Systembiologie und dem Metabolic Engineering für die 2,3-BDO Herstellung konstruiert. Der resultierende Stamm ist in der Lage gleichzeitig Glucose und Xylose zu verwenden. Unter Einsatz eines Lignocellulose-Hydrolysat als Substrat, wurden innerhalb von 51 h 119,4 g/L (2R, 3R) -2,3-BDO (Reinheit > 96,0 %) mit einer Produktivität von 2,3 g/(Lh) und einer Ausbeute 95 % hergestellt.

A.M. Bialkowska, M. Jedrzejczak-Krzepkowska, E. Gromek, J. Krysiak, B. Sikora, H. Kalinowska, C. Kubik, F. Schutt, M. Turkiewicz, *Appl Microbiol Biot*, **2016**, 100, 2663-2676.

Ein genetisch veränderter *Bacillus subtilis* Stamm (Mutante, *Bacillus subtilis* LOCK 1086) wurde konstruiert. Unter Fed-Batch Bedingungen produziert dieser Mutante mit Zuckerrübenmelasse unt vierfache Zufütterung reiner Glucose 75,73 g/L 2,3-BDO mit einer Produktivität von 0,66 g/(Lh). Mit einem apple-pomace-Hydrolysat und dreifacher Zufütterung reiner Saccharose hat die Mutante 51,53 g/L 2,3-BDD mit einer Produktivität von 0,43 g/(Lh) produziert.

B. Sikora, C. Kubik, H. Kalinowska, E. Gromek, A. Bialkowska, M. Jedrzejczak-Krzepkowska, F. Schuett, M. Turkiewicz, *Prep Biochem Biotechnol*, **2016**, 46, 610-619.

Bacillus amyloliquefaciens TUL 308 produziert unter Fed-Batch-Bedingungen unter Einsatz von Melasse-basierten Medium mit vier Zufütterungen an Glucose ca. 60 g/L 2,3-BDO und unter Zufütterung von Saccharose ca. 50 g/L.

X.X. Wang, H.Y. Hu, D.H. Liu, Y.Q. Song, *New Biotechnol.* **2016**, 33, 16-22.

K. pneumoniae (Risikoklasse 2 Stamm) produziert im optimierten Medium (35 g/L Hefeextrakt) mit Xylose als Substrat nach 48 h im Schüttelkolben 39,7 g/L 2,3-BDO.

P. K. Khatri, N. Karanwal, S. Kaul, S. L. Jain, *Tetrahedron Letters* **2015**, *56*, 1203–1206.

Khatri et al. berichteten von einer Synthesemöglichkeit von Furfural aus Xylose im einphasigen System mit DMSO als Lösemittel, wobei eine Ausbeute oberhalb von 98 % erhalten wurde. Als Katalysator diente dabei der komplexe Katalysator P-C-SO_3H, dessen Grundlage unvollständig karbonisierte D-Glucose ist, welche zuerst sulfoniert und dann während des Karbonisierungsprozesses in eine Polymermatrix eingebettet wurde. Die Herstellung des Katalysators ist aufwendig und zeitintensiv. Diese Publikation hatte keinen Einfluss auf die Ausrichtung der eigenen Forschungsarbeiten.

N. Araji, D. D. Madjinza, G. Chatel, A. Moores, F. Jérôme, K. De Oliveira Vigier, *Green Chem.* **2017**, *19*, 98–101.

Araji *et al.* berichten, dass Betainhydrochlorid sowohl die Reaktion von Xylose zu Furfural, als auch die Reaktion von Furfural zu Maleinsäure katalysiert. Ausgehend vom Zucker wurde eine Furfuralausbeute von 48 % erreicht (180 °C, 1 h), die Lösung abgekühlt, mit Wasserstoffperoxid versetzt und zu Maleinsäure (17 % ausgehend von Xylose) und Fumarsäure (4 % ausgehend von Xylose) oxidiert (90 °C, 30 min). Als Lösemittel diente reines Wasser. Die Ausbeuten sind aktuell zu gering für einen technischen Prozess. Diese Publikation hatte keinen Einfluss auf die Ausrichtung der eigenen Forschungsarbeiten.

7. Veröffentlichungen

Artikel

M. Kallbach, A. Kuenz, U. Prüße, Neuer Stamm zur biotechnischen Umsetzung von Xylose zu 2,3-Butandiol, *Chem. Ing. Tech.* **2016**, *88*, 1232.

M. Kallbach, S. Horn, A. Kuenz, U. Prüße, Screening of novel bacteria for the 2,3-butanediol production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 1025–1033.

geplant:

M. Kallbach, D. Jäger, H. Niemi, M. Kallioinen, M. Mänttäri, A. Kuenz, U. Prüße, Conversion of xylose from birch wood hemicellulose extract to 2,3-butanediol with *Bacillus vallismortis*.

M. Kallbach, A. Kuenz, U. Prüße, optimization of 2,3-butanediol production with *Bacillus vallismortis*.

C. Staude, U. Prüße, Acid-catalyzed furfural production using HFIP as in-situ extraction agent.

Vorträge

M. Kallbach, A. Kuenz, U. Prüße, Neuer Stamm zur biotechnischen Umsetzung von Xylose zu 2,3-Butandiol, *ProcessNet-Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen*, Aachen, **2016**.

C. Staude, U. Prüße, The synthesis of furfural from xylose in a biphasic system comprising of water and a new organic solvent, *7th Nordic Wood Biorefinery Conference*, Stockholm (Schweden), **2017**.

E. Weingart, L. Teevs, C. Staude, U. Prüße, Hexafluoroisopropanol as extraction solvent for HMF and furfural production with superior selectivity, *International Symposium on Green Chemistry (ISGC)*, La Rochelle (Frankreich), **2017**.

M. Kallbach, C. Staude, U. Prüße, Biotechnical and chemical conversion of xylose to 2,3-butanediol, furfural and maleic acid, *International Symposium on Green Chemistry (ISGC)*, La Rochelle (Frankreich), **2017**.

Poster

M. Kallbach, A. Kuenz, A. Hevekerl, U. Prüße, Microorganism screening for the conversion of xylose to 2,3-butanediol*, ECCE10+ECAB3+EPIC5*, Nizza (Frankreich), **2015**.

M. Kallbach, A. Kuenz, U. Prüße, Conversion of xylose to 2,3-butanediol with a screened Bacillus ssp. Strain, *12th International Conference on Renewable Resources & Biorefineries*, Gent (Belgien), **2016**.

C. Staude, U. Prüße, Chemical-catalytic conversion of xylose to furfural in an aqueous new organic solvent biphasic system, *12th International Conference on Renewable Resources & Biorefineries*, Gent (Belgien), **2016**.

C. Staude, U. Prüße, HFIP als neues und effektives in-situ Extraktionsmittel für die Synthese von Furfural aus Xylose, *ProcessNet-Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen*, Aachen, **2016**.

C. Staude, U. Prüße, HFIP as new powerful in-situ extractant for the synthesis of furfural from xylose, *8th Green Solvents Conference*, Kiel, **2016**.

E. Weingart, L. Teevs, C. Staude, U. Prüße, Hexafluoroisopropanol as extraction solvent for HMF and furfural production with superior selectivity, *50. Jahrestreffen Deutscher Katalytiker*, Weimar, **2017**.

C. Staude, U. Prüße, Acid-catalyzed xylose dehydration to furfural and its further oxidation to maleic acid, *50. Jahrestreffen Deutscher Katalytiker*, Weimar, **2017**.

M. Kallbach, S. Drewes, H. Niemi, M. Kallioinen, M. Mänttäri, A. Kuenz, U. Prüße, Conversion of xylose from birch hemicellulose hydrolysate to 2,3-butanediol with Bacillus vallismortis, *7th Nordic Wood Biorefinery Conference 2017*, Stockholm (Schweden), **2017**.

Literaturverzeichnis

[1] T. Häßler, D. Schieder, R. Pfaller, M. Faulstich, V. Sieber, *Bioresource Technology* **2012**, *124*, 237–244.

[2] I.-M. Jurchescu, J. Hamann, X. Zhou, T. Ortmann, A. Kuenz, U. Prüße, S. Lang, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2013**, *97*, 6715–6723.

[3] C. Ma, A. Wang, J. Qin, L. Li, X. Ai, T. Jiang, H. Tang, P. Xu, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2009**, *82*, 49–57

[4] L. Li, K. Li, K. Wang, C. Chen, C. Gao, C. Ma, P. Xu, *Bioresource Technology* **2014**, *170*, 256–261.

[5] E. I. Gürbüz, S. G. Wettstein, J. A. Dumesic, *ChemSusChem* **2012**, *5*, 383–387.

[6] X. Zhang, Y. Bai, X. Cao, R. Sun, *Bioresource Technology* **2017,** *238*, 1–6.

[7] Y. Yang, C.-W. Hu, M. M. Abu-Omar, *ChemSusChem* **2012**, *5*, 405–410.

[8] E. S. Kim, S. Liu, M. M. Abu-Omar, N. S. Mosier, *Energy Fuels* **2012**, *26*, 1298–1304.

[9] A. S. Dias, M. Pillinger, A. A. Valente, *Applied Catalysis A* **2005**, *285*, 126–131.

[10] I. Agirrezabal-Telleria, A. Larreategui, J. Requies, M. B. Güemez, P. L. Arias, *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 7478–7485.

[11] I. Agirrezabal-Telleria, F. Hemmann, C. Jäger, P. L. Arias, E. Kemnitz, *Journal of Catalysis* **2013**, *305*, 81–91.

[12] I. Agirrezabal-Telleria, J. Requies, M. B. Güemez, P. L. Arias, *Applied Catalysis B* **2012**, *115–116*, 169–178.

[13] P. K. Khatri, N. Karanwal, S. Kaul, S. L. Jain, *Tetrahedron Letters* **2015**, *56*, 1203–1206.

[14] S. Kumar, J. Kumar, S. Kaul, S. L. Jain, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, *53*, 15571–15575.

[15] Q. Lin, H. Li, X. Wang, L. Jian, J. Ren, C. Liu, R. Sun, *Catalysts* **2017**, *118*, 1–14.

[16] Q. Qing, Q. Guo, L. Zhou, Y. Wan, Y. Xu, H. Ji, X. Gao, Y. Zhang, *Bioresource Technology* **2017**, *226*, 247–254.

[17] H. Guo, G. Yin, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 17516–17522.

[18] S. Shi, H. Guo, G. Yin, *Catalysis Communications* **2011**, *12*, 731–733.

[19] J. Lan, Z. Chen, J. Lin, G. Yin, *Green Chem.* **2014**, *16*, 4351–4358.

[20] X. Li, B. Ho, Y. Zhang, *Green Chem.* **2016**, *18*, 2976–2980.

[21] N. Araji, D. D. Madjinza, G. Chatel, A. Moores, F. Jérôme, K. De Oliveira Vigier, *Green Chem.* **2017**, *19*, 98–101.

[22] K. J. Zeitzsch, *the chemistry and technology of furfural and its many by-products*, 1. Auflage, Elsevier, Amsterdam **2000**, 19–21.

[23] Y. Nakashimada, K. Kanai, N. Nishio, *Biotechnology Letters* **1998**, *20*, 1133–118.

[24] T. Yang, Z. Rao, X. Zhang, Q. Lin, H. Xia, Z. Xu, S. Yang, *Journal of Basic Microbiology* **2011**, *51*, 650–658.

[25] Z. Xiao, X. Wang, Y. Huang, F. Huo, X. Zhu, L. Xi, J. Lu, *Biotechnology for Biofuels* **2012**, *5:88*, 1–11.

[26] C. de Mas, N. Jansen, G. Tsao, *Biotechnology Bioengineering* **1988**, *31*, 366–377.

[27] Jurchescu, Ileana-Maria **2013a**. Dissertation. 2,3-Butanediol production with GRAS microorganisms: screening, cultivation, optimization and scale-up. TU Braunschweig, Braunschweig.