

Sachbericht zum Forschungsprojekt:

Höherwertige Verwertung von xylanhaltiger Biomasse am Beispiel von Biertreber

Projektlaufzeit: 01.07.2005 – 30.06.2007

Datum: 2007-10-29

Az.: 8407-6532-05/1



Berichtverfasser:

Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens
Marie-Curie-Str. 19
66953 Pirmasens

Dipl. Ing. (FH) Benjamin Pacan,

Dr. Stefan Dröge

benjamin.pacan@pfi-ps.de

stefan.droege@pfi-ps.de

Telefon: 06331 / 2490-840

Telefax: 06331 / 2490-669

in Kooperation mit dem

Lehrstuhl für Thermische Verfahrenstechnik der TU Kaiserslautern

Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. habil. Hans-Jörg Bart

Das Forschungsprojekt wurde mit finanzieller Unterstützung des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung – EFRE – und des Ministeriums für Wirtschaft, Verkehr, Landwirtschaft und Weinbau in Rheinland-Pfalz durchgeführt.

1 Arbeitsschrittbezogene Projektaktivitäten und Ergebnisse

Arbeitspaket 1 (Entwicklung einer Methode zur Zuckerbestimmung)

Im Rahmen dieses Arbeitsschrittes ist eine zuverlässige und genaue Methode zur Zuckerbestimmung von aufgeschlossenem Biertreber erarbeitet worden. Für die Bestimmung der in Xylan vorkommenden Monosaccharide *Arabinose*, *Galactose*, *Glucose*, *Mannose* und *Xylose* kommen im Wesentlichen nur 2 Verfahren in Frage: die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und die Kapillarzonenelktrophorese (CE). Da mit der CE sowohl die Zucker als auch die Zuckeralkohole in einem Lauf getrennt und bestimmt werden können (Preis für eine Kapillare ca. 10 €), wurde für dieses Projekt zunächst eine CE Methode entwickelt.

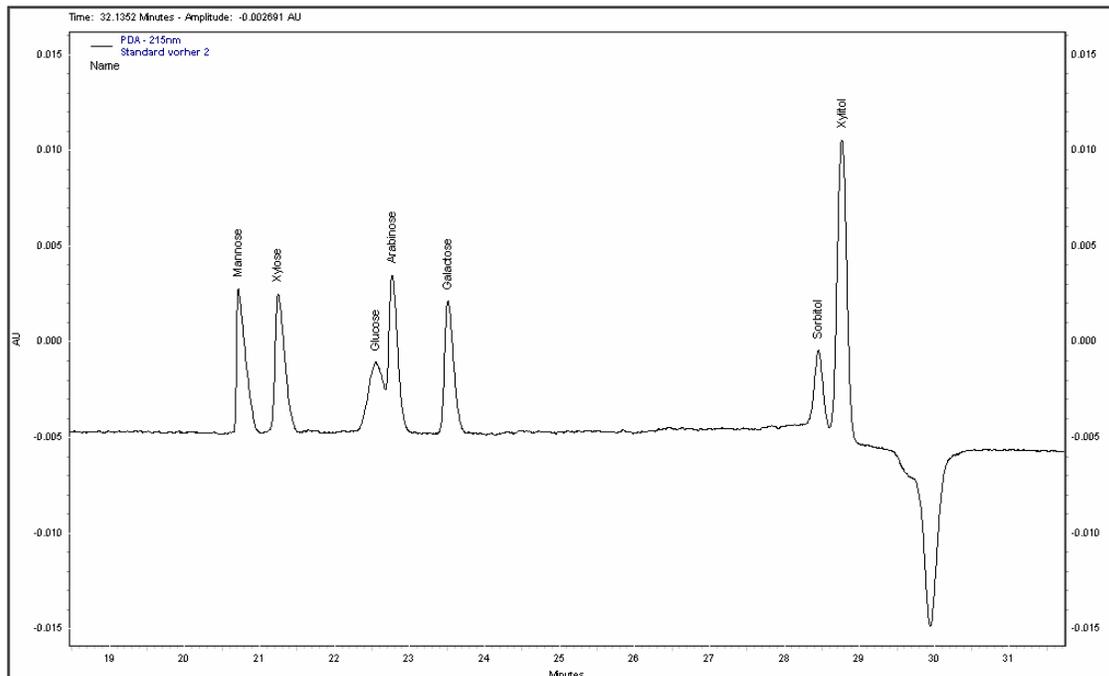


Abb. 1: Trennung der 5 Monosaccharide (je 1.000 mg/l), Sorbitol (1.000 mg/l) und Xylitol (5.000 mg/l), UV bei 215 nm

Je nach Aufschlussverfahren gibt es bei der Kapillarzonenelktrophorese (CE) aufgrund von pH-Wert Verschiebungen einen Drift der Basislinie. Deshalb wurde eine HPLC-Methode zur Bestimmung der Zuckerkonzentrationen von Hydrolysaten entwickelt. In der HPLC werden spezielle Säulen eingesetzt, die als Träger ein Polystyrol-Divinylbenzolharz aufweisen, an das Sulfonsäuregruppen angebracht wurden. Für die Trennung der Zucker werden diese Säulen mit Blei als Gegenion zur Sulfonsäuregruppe verwendet (Eluent: Wasser), für die Bestimmung der Zuckeralkohole wie z. B. Xylit und Sorbit kommt die H-Form zur Anwendung (Eluent: verdünnte Schwefelsäure).

Die Detektion erfolgt, zumindest für die hohen Konzentrationen, wie sie im Rahmen dieses Projektes bestimmt werden sollen, über den Brechungsindex.

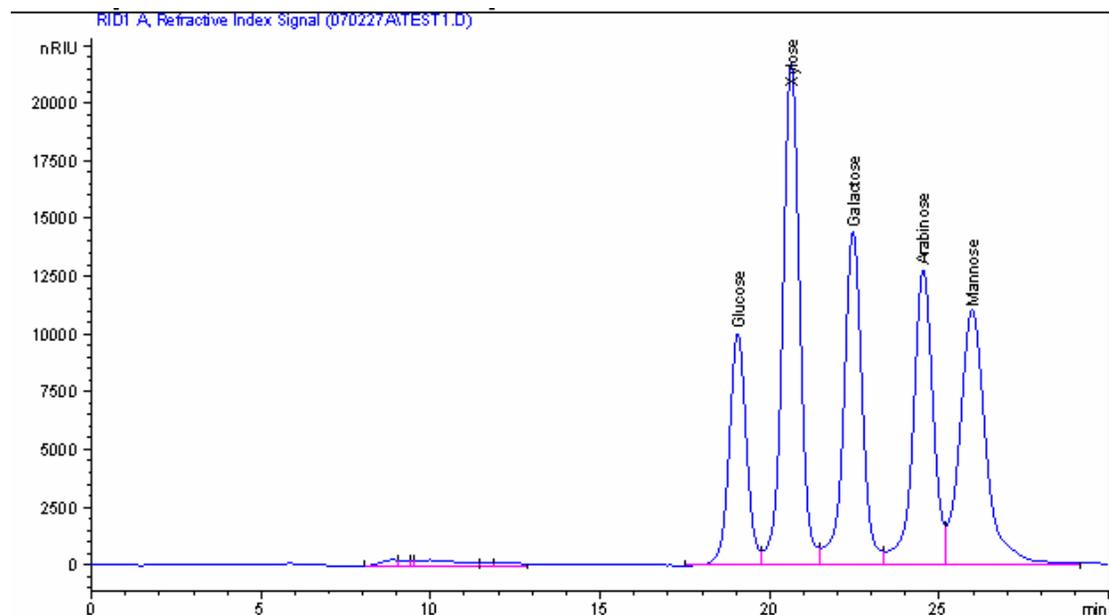


Abb. 2: Trennung der 5 Monosaccharide (je 1.500 mg/l) mit der HPLC und Brechungsindex-Detektor

Diese Methode eignet sich zur Überprüfung von Aufschlüssen und von Fermentationsprodukten. Es sind Kalibrierungen für 20 Substanzen durchgeführt worden (Cellobiose / Glucose / Xylose / Sorbitol / Arabinose / Xylitol / Bernsteinsäure / Milchsäure / Ameisensäure / Essigsäure / Propionsäure / i-Buttersäure / n-Buttersäure / i-Valeriansäure / 3,3-Dimethylbuttersäure (Interner Standard) / n-Valeriansäure / Hydroxymethylfurfural / i-Caprinsäure / n-Caprinsäure / Furfural). Aufgrund der Stabilität der Basislinie und der vielseitigen Einsatzmöglichkeiten wird dieses Analyseverfahren nun als Standard-Methode eingesetzt.

Arbeitspaket 2 (Auswahl geeigneter Mikroorganismen)

Anhand von Literaturdaten wurden einige geeignete Hefestämme, die in der Lage sind, Xylose zu Xylitol zu verstoffwechseln und die für Forschungszwecke bezogen werden können, ausgewählt. Es handelt sich hierbei um folgende Organismen:

- *Candida mogii* (Xylitol-Produzent auf Stroh-Hydrolysaten)
- *Debaryomyces hansenii* (Xylitol-Produzent auf Holzhydrolysaten) und
- *Pichia guilliermondii* bzw. deren ungeschlechtliches Stadium *Candida guilliermondii*.

In Voruntersuchungen zeigte sich, dass die Umsatzraten und Xylitolproduktionsraten der zunächst ausgewählten Stämme für die spätere technische Umsetzung unzureichend waren. Deshalb wurde ein neuer Hefestamm, *Candida guilliermondii* FTI 20037 (=ATCC 201935), für weitere Untersuchungen herangezogen.

Der Hefestamm *Candida guilliermondii* FTI 20037 wächst gut auf Biertreberhydrolysaten die mit einer 0,1 %igen Salpetersäure bei einer Behandlungstemperatur von 160°C erzeugt wurden. Die Umsatzraten im Hydrolysat erreichten je nach Ausgangskonzentration der Xylose Werte zwischen 59 und 67 % (siehe Abb. 3). Bedingt dadurch, dass die Hefen zu Beginn der Fermentation einen Teil der Xylose in Biomasse umwandeln hat die Ausgangskonzentration der Xylose einen Einfluss auf die Gesamteffizienz. So wurden bei einer Startkonzentration von weniger als 30 g/l Xylose am Endpunkt der Fermentationen in der Regel Umsatzraten von unter 50 % erreicht. Wie aus Vergleichsdaten in der Tabelle 1 ersichtlich wird, wurden somit Umsatzraten erzielt welche die Ergebnisse früher Untersuchungen in pflanzlichen Hydrolysaten zum Teil deutlich übertreffen. Die Konversion von Xylose zu Xylitol in definierten und auf die jeweiligen Hefestämme abgestimmten Wachstumsmedien, bei der prinzipiell Umsatzraten von bis zu 90 % zu erreichen sind, wurden im Rahmen des Projekts aufgrund des fehlenden Praxisbezugs nicht weiter verfolgt. Im Hinblick auf möglichst effiziente Konversion sollte das Hydrolysat vor der Fermentation eingengt werden. Dies kann über Verdampfer oder die Nanofiltration erfolgen. Im Rahmen des Projekts wurde u.a. die Einengung des Biertreberhydrolysats mit einem Fallstromverdampfer untersucht wobei eine Aufkonzentrierung der enthaltenen Zucker um den Faktor 3,5 – 4 erreicht wurde. Ähnliche Werte wurden in einem weiteren Versuchsansatz mittels Nanofiltration erzielt. Beide Verfahren haben den Vorteil das verschiedenen Hemmstoffe welche die nachfolgende Fermentation beeinträchtigen können, insbesondere die Essigsäure, nicht oder nur im geringen Maße aufkonzentriert werden.

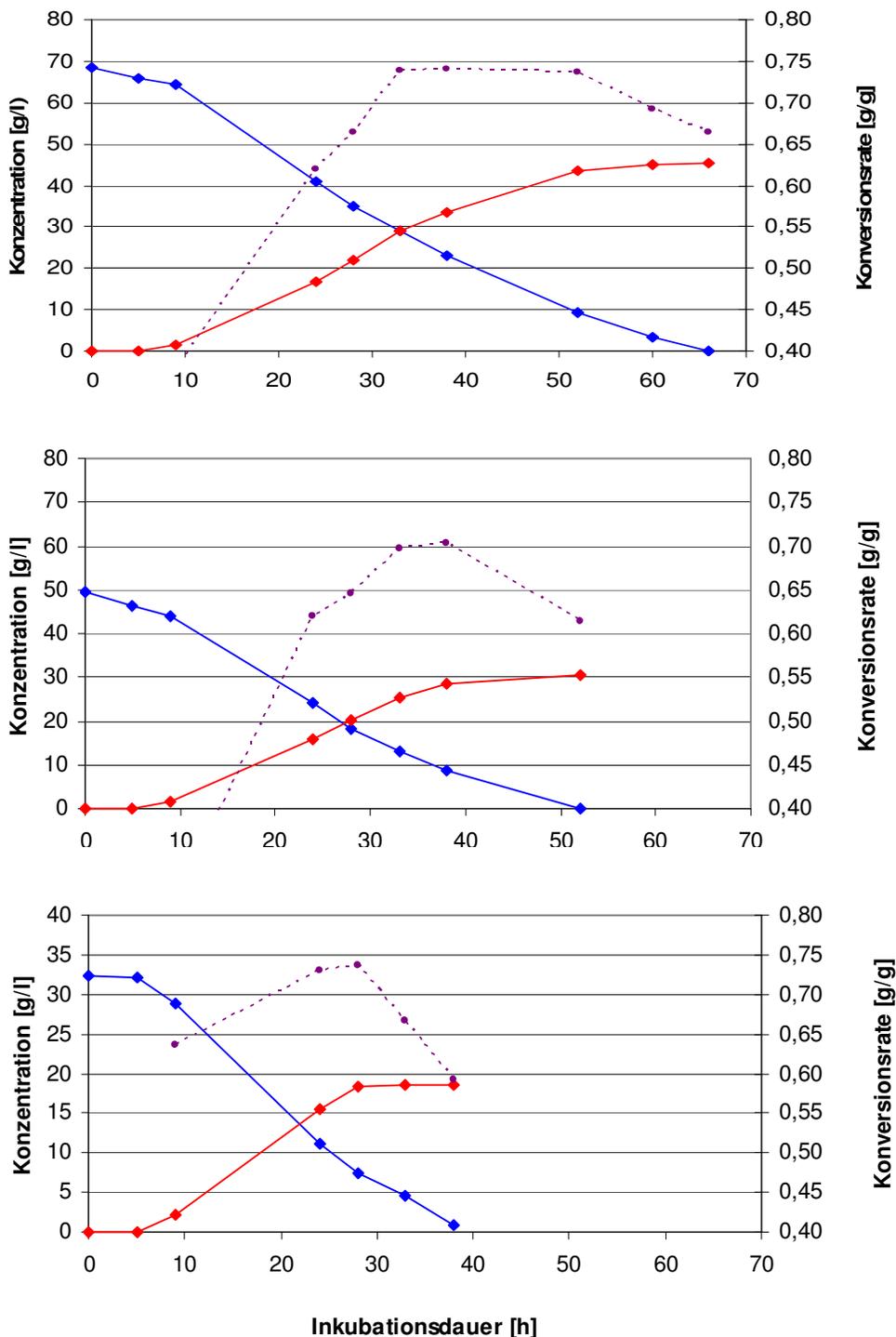


Abb. 3: Fermentation von Biertreberhydrolysaten mit *Candida guilliermondii* FTI 20037 mit verschiedenen Xylose-Ausgangskonzentrationen.

Tabelle 1: Xyloseabbau und Xylitolbildung verschiedener Hefen in pflanzlichen Hydrolysaten

Potentielle Produktionsstämme	Xyloseabbau ² [%]	Xylitolbildung ² [g/g Xylose]
<i>C. frareli</i> FTI-20038	100	0.09
<i>C. guilliermondii</i> IZ-803	38	0.23
<i>C. guilliermondii</i> IZ-1231	100	0.4
<i>C. guilliermondii</i> FTI-20037	100	0.53
<i>C. intermedia</i> RJ-245	100	0.19
<i>C. tropicalis</i> 1004	100	0.57
<i>C. utilis</i> 74-64	100	0.32
<i>K. fragilis</i> FTI-20066	97	0.15
<i>K. marxianus</i> IZ-1821	94	0.17

²nach 48h Inkubation; C = *Candida*; K = *Kluyveromyces*

Wie in Abbildung 4 dargestellt, beträgt die Xyloseabbaurate in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration zwischen 0,8 – 1,1 g/h/l bei einer Xylitol-Produktionsrate zwischen 0,5 – 0,75 g/h/l. Wie aus dem Fermentationsverlauf in Abbildung 3 deutlich wird, sinkt die Produktivität deutlich ab sobald die Xylosekonzentration einen Schwellenwert von ca. 8 g/l unterschreitet. Mit weiteren Optimierungsschritten ließe sich die Fermentationsdauer im Batch-Ansatz, ähnlich der Bioethanolherstellung, auf etwa zwei Tage reduzieren. Da *Candida tropicalis* aufgrund der pathogen Wirkung nicht als Produktionsorganismus in Frage kam, musste auch das Ziel einer sehr hohen Produktionsrate von 5 g/h/l aufgegeben werden. Dieser Nachteil kann durch größere Fermentationsbehälter kompensiert werden.

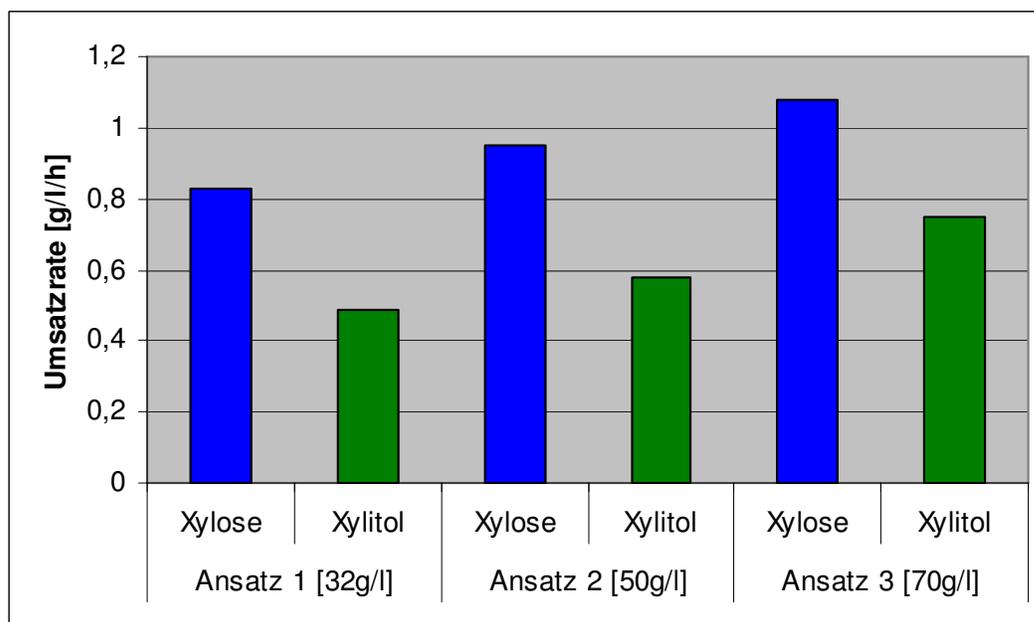


Abb. 4: Umsatzraten verschiedener Ansätze bei der Fermentation von Biertreberhydrolysaten

Arbeitspaket 3 (Optimierung des Treberaufschlusses)

Die Aufschlüsse wurden mit einem Gerät der Fa Anton Paar (Graz, Österreich) des Typs Multiwave 3000 (geschlossenes System) durchgeführt. Die Liner der Aufschlussgefäße bestehen aus modifiziertem Polytetrafluorethylen (PTFE/TFM), der Druckmantel aus Keramik. Diese Gefäße erlauben das Arbeiten bis zu 240 °C bei 40 bar Betriebsdruck, der Maximaldruck liegt bei 70 bar (Berstscheibe). In die Probe taucht eine integrierte Druck- und Temperatursonde, die eine genaue Einstellung der Temperatur und die Überwachung des Drucks ermöglicht. Zusätzlich wird die äußere Oberflächentemperatur des Keramikmantels überwacht (Max. 210 °C). Die ungepulste Mikrowellenleistung beträgt maximal 1400 W. Die Aufschlüsse wurden durchgeführt, indem die Probe innerhalb von 10 min auf die Endtemperatur erwärmt und diese für 1 h gehalten wurde. Anschließend wurde die Probe 15 min gekühlt, filtriert und mit der CE der Gehalt der 5 Monosaccharide Arabinose, Galactose, Glucose, Mannose und Xylose bestimmt.

Dabei konnten die Untersuchungen des Fraunhoferinstitut in Pfinztal, die gezeigt hatten, dass Xylane bei Temperaturen zwischen 170–200 °C in monomere Zuckermoleküle gespalten werden können, bestätigt werden. In reinem Wasser lag das Maximum der Kurve bei 190 °C, allerdings betrug der Xylosegehalt nur 2 bis 2,5 % an der Trockenmasse (TM).

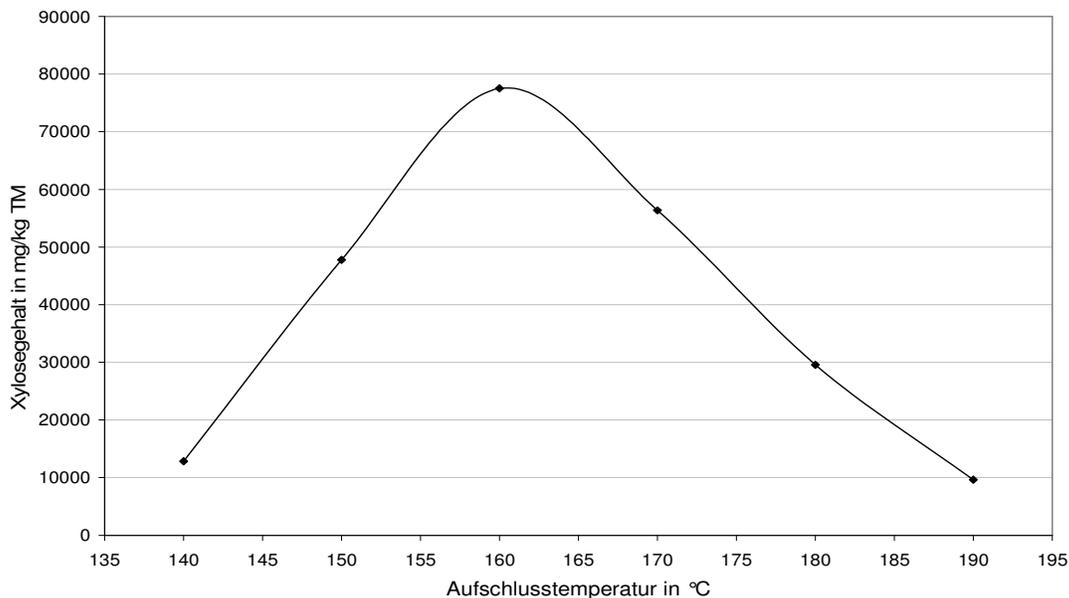


Abb. 4: Temperaturabhängigkeit der Xyloseausbeute bei 1 %iger Milchsäure (TM-Gehalt der Maische von ca. 2 %)

Um höhere Ausbeuten zu erzielen, wurde auch die Katalyse durch mineralische Säuren getestet. Dabei ergab sich bei 0,25 %iger Phosphorsäure allerdings keine wesentliche Erhöhung der Ausbeute (9 % der TS) verglichen mit 1 %iger Milchsäure, und auch das Maximum der Kurve verschob sich nur leicht von 160 auf knapp über 150 °C.

Eine Steigerung der Ausbeute gelang bei Aufschlüssen unter Zusatz von Schwefelsäure in Konzentrationen von 0,25 bzw. 2,5 %. Die maximalen Xyloseausbeuten lagen bei 12 % bzw. 13 % bezogen auf die Biertrebertrockenmasse.

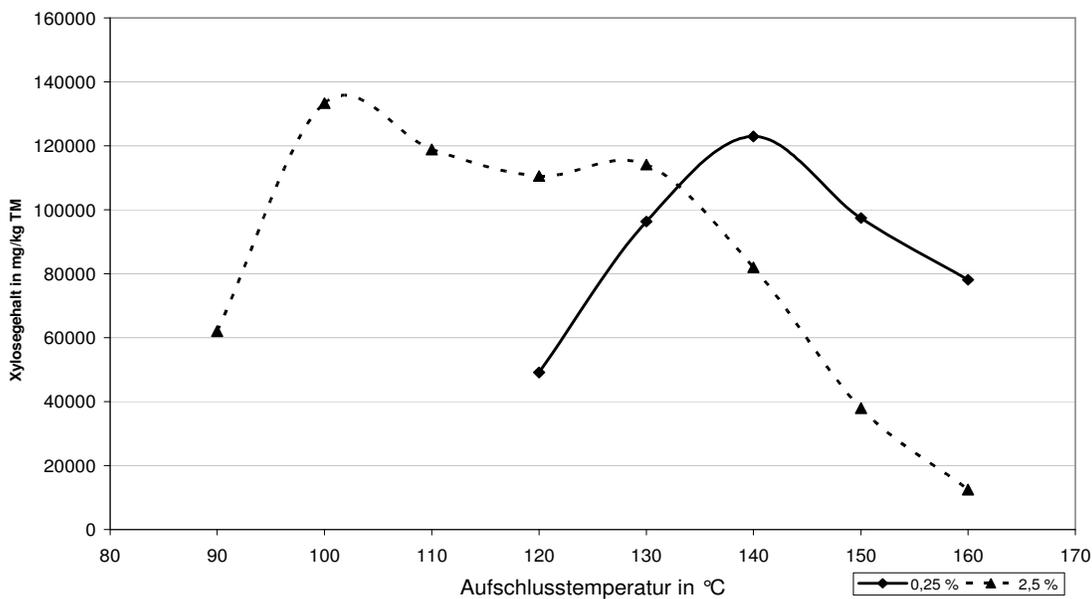


Abb. 5: Xyloseausbeuten bei Zusatz von Schwefelsäure (TM-Gehalt der Maische von ca. 2 %)

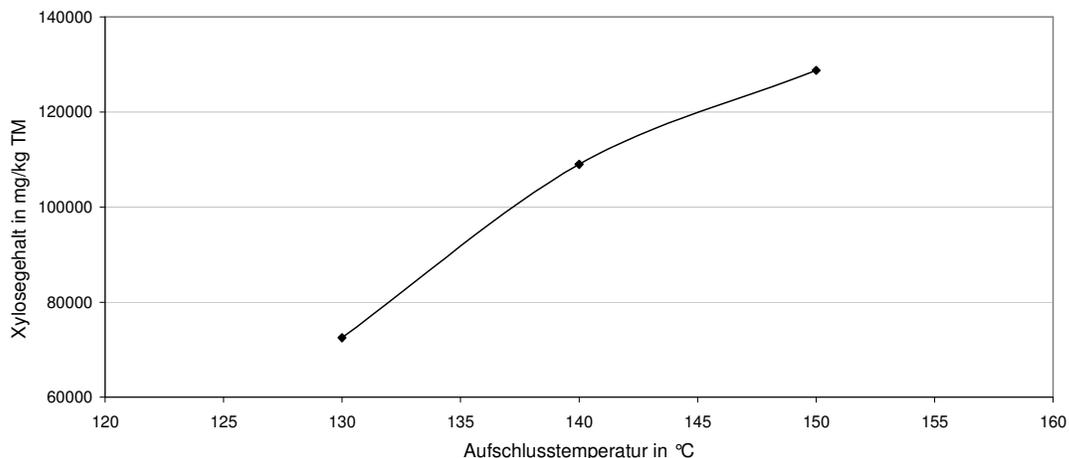


Abb. 6: Xyloseausbeuten bei Zusatz von 0,1 %ger Salpetersäure (TM-Gehalt der Maische von ca. 2 %)

Darüber hinaus wurden auch gute Xyloseausbeuten von 13 % TM bei Mikrowellenaufschlüssen mit einer 0,1 %igen Salpetersäure erzielt.

Im nächsten Schritt wurde die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Mikrowellenaufschlüssen auf Aufschlüsse in einem 5 l Druckreaktor bestätigt. Dabei wurden nur Aufschlussmedien berücksichtigt, die einen technischen Einsatz in einem Wärmetauschersystem aus Edelstahl ohne Korrosionsprobleme ermöglichen.

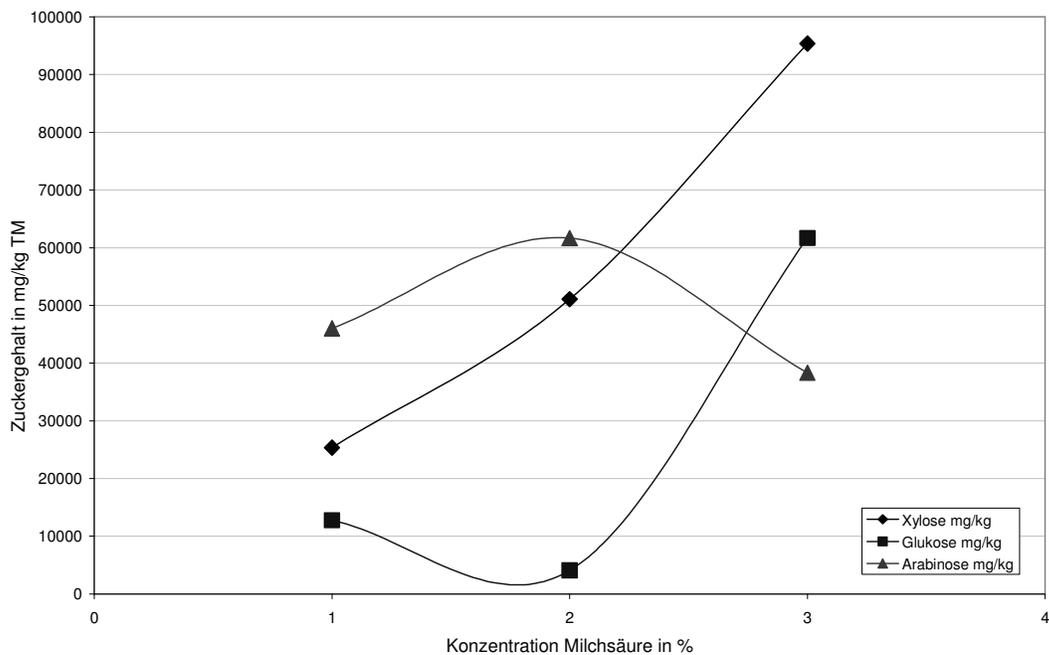
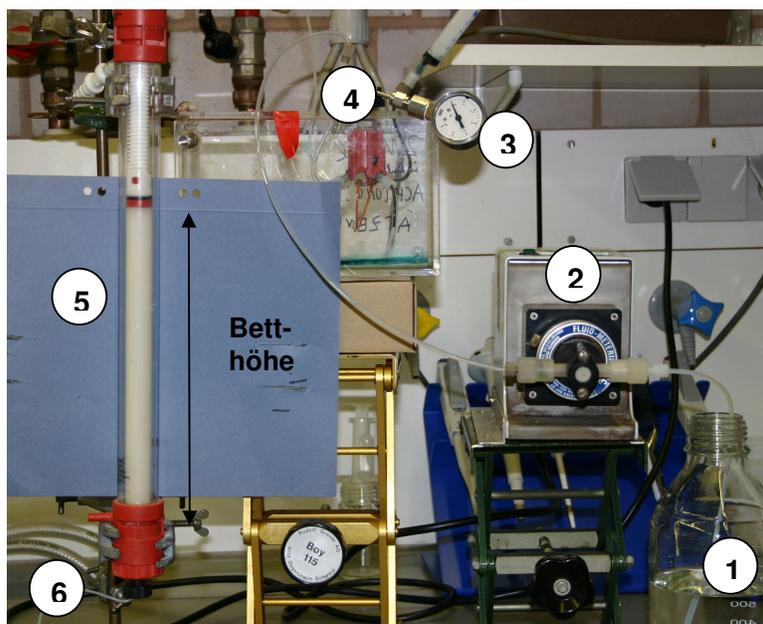


Abb. 7: Zuckerausbeute in Abhängigkeit von der Milchsäurekonzentration nach dem Aufschluss in einem Druckreaktor bei 160 °C (TM-Gehalt der Maische von ca. 5 %)

Parallel zu den Untersuchungen mit Biertreber wurden zu Vergleichszwecken weitere xylanhaltige Biomassen untersucht. Hierbei erwies sich insbesondere Stroh als ein weiteres vielversprechendes Substrat für eine Xylosegewinnung. So wurden in ersten Voruntersuchungen Xyloseausbeuten von bis zu 20 % bezogen auf die Trockenmasse erzielt. Vor diesen Hintergrund plant das PFI vertiefende Untersuchungen zum Strohaufschluss in einem weiteren Forschungsprojekt.

Arbeitspaket 4 (Dimensionierung des Ringspaltchromatographen)

Im Rahmen der Untersuchungen wurden an der in Abbildung 8 gezeigten Batchanlage Versuche zur Bestimmung der Retentionszeiten der verschiedenen Monosaccharide durchgeführt. Mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus ist es möglich, die verschiedenen Variablen der Versuchsdurchführung abzudecken. Es können variierende Volumenströme des Eluenten, variable Mengen an Feedlösung und unterschiedliche Betthöhen untersucht werden. Die Messung der Retentionszeit und die Bestimmung der Isothermen erfolgt mit einem RI-Detektor, der an den Ausgang der Batchsäule angeschlossen ist. Die Aufzeichnung und Auswertung der gemessenen Daten wird durch das Anschließen der Anlage an einen Rechner mit HPLC-Software via Interface ermöglicht.



Erläuterungen zum Anlagen-
aufbau

- 1 Eluent-Vorlage
- 2 Pumpe
- 3 Manometer
- 4 6-Wege-Ventil
- 5 Glas-Säule
- 6 RI-Zuleitung

Abb. 8: Versuchsaufbau zur Batchanlage

Bei der Versuchsdurchführung wird die Säule bis zum Erreichen des stationären Zustands mit Eluent gespült. Hierfür werden unterschiedliche Eluenten, z.B. destilliertes Wasser oder verschiedene verdünnten Säuren, mit und ohne Puffersystem vermessen. Mit Hilfe dieser Daten kann der optimale pH-Wert für die Chromatographie bestimmt und in weiterer Folge mit dem optimalen pH-Wert der TDH abgestimmt werden. Mit Hilfe der durch diese Messungen erhaltenen Daten werden in der Folge Berechnungen für die Parameter zur Trennung des Zuckergemisches auf der CAC durchgeführt. Die an der Technischen Universität Kaiserslautern aufgebaute CAC Versuchsanlage zur kontinuierlichen Auftrennung ist in Abbildung 9 dargestellt.



Abb. 9: Kontinuierlicher annularer Chromatograph im Labormaßstab (Technische Universität Kaiserslautern; Arbeitsgruppe Prof. Bart).

Für die chromatographischen Trennungen, zuerst im Batch- und nachfolgend im kontinuierlichen Ansatz, wurde ein PCR 642 Ca Harz der Firma Purolite, mit einem Hauptpartikeldurchmesser von 295-335 μm verwendet. Die Ergebnisse der Trennung einer aus Treberhydrolysaten gewonnenen Fermentationslösung sind in Abb. 11 dargestellt. Wie aus der Abbildung ersichtlich konnte die während der Fermentation gebildete Xylitolfraktion eindeutig von den übrigen Bestandteilen getrennt werden. Somit hat sich die Methode auf der Basis der bislang durchgeführten Laboruntersuchungen als gut geeignet für die Trennung von Zuckergemischen gezeigt. Durch weitere Optimierungen in Verbindung mit der Einstellung einer definierten Hauptpartikelgröße der Harze lässt sich die Produktreinheit von 99 % gewährleisten.

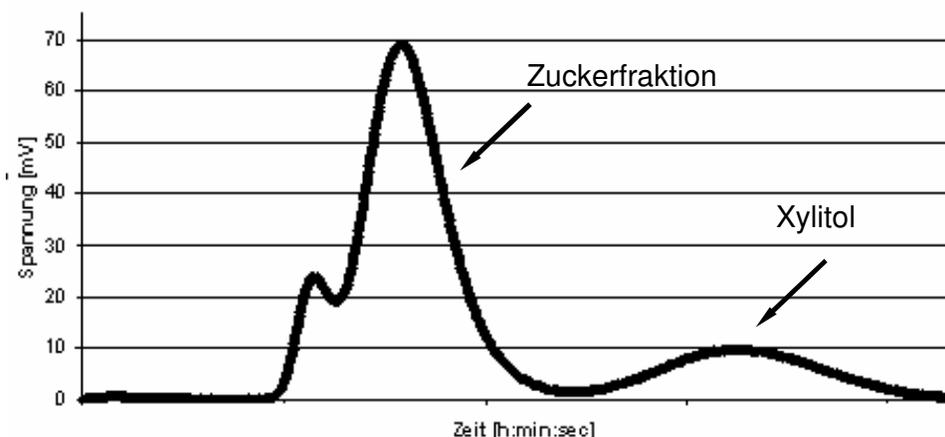


Abb. 10: Trennung einer Fermentationslösung mittels CAC

Arbeitspaket 5 (Upscaling zum Technikumsmaßstab)

Zusammen mit der Fa. Eugen Schmitt GmbH wurde eine Versuchsanlage zu Xylosefermentation konzipiert (siehe Abb. 11).



Abb. 11: Pilotanlage im Technikumsmaßstab zum Aufschluss und Fermentation von Biomassen.
1= Fermenter; 2= Druckbehälter
3 = Hefetank; 4 = Dampferzeuger

Die Hauptkomponenten der Anlage sind ein Fermentationsbehälter im 120 l Maßstab sowie ein Druckbehälter zur Durchführung des hydrothermalen Aufschlusses im 100 l Maßstab. Die Anlage ist so konzipiert, dass das im Druckbehälter erzeugte Hydrolysat direkt in den angeschlossenen Fermentationsbehälter überführt werden kann. Nach dem Abkühlen des Materials wird dieser aus dem Vorratsbehälter mit den Hefen beimpft. Die Prozesswärme für die TDH-Behandlung wird über einen angeschlossenen Dampferzeuger bereitgestellt. Die Anlehnung der Pilotanlage an die fermentative Alkoholherstellung soll im Hinblick auf einen

großtechnischen Einsatz die Möglichkeit eröffnen, eine bewährte und kostengünstige Anlagentechnik einsetzen zu können. Für die Prozessschritte vor und nach der Fermentation wurden ebenfalls technische Lösungen gefunden. So werden notwendige Filtrationsschritte durch den Einsatz eines Laborgerätes zur Crossflow-Mikrofiltration getestet.

Mit der Integration eines Aufschlussbehälters an die Fermentationsanlage kann die hydrothermale Vorbehandlung von feststoffreicher Biomasse, die sonst an der TDH-Pilotanlage der Kläranlage Blümeltal in Pirmasens durchgeführt werden sollte, in den meisten Fällen vor Ort realisiert werden. Dies verbessert die Prozesssicherheit (keine Kontaminationen) und senkt den Transport- und Arbeitsaufwand.